

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**YENİ NESİL DİZİLEMENİN
HEREDİTER RENAL TÜBÜLER
HASTALIKLARIN TANISINDAKİ YERİ**

DR. SÜMEYYE ŞANAL

UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2025

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**YENİ NESİL DİZİLEMENİN
HEREDİTER RENAL TÜBÜLER
HASTALIKLARIN TANISINDAKİ YERİ**

DR. SÜMEYYE ŞANAL

UZMANLIK TEZİ

Danışman: DR. ÖĞR. ÜYESİ EMİNE GÖKTAŞ

KONYA, 2025

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini bizimle paylaşan, tez dönemimde destek ve tavsiyeleri ile yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Mahmut Selman YILDIRIM, Prof. Dr. Ayőe Gül ZAMANI ve Dr. Öğr. Üyesi Emine GÖKTAŞ'a;

Eğitimim boyunca özveri ve anlayıőla birlikte olduğum tüm çalışma arkadaşlarıma;

Hayatıma anlam katan ve bana her zaman destek olan değerli eőim Uzm. Dr. Uğur ŞANAL'a;

Maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan, varlıkları ile onur veren kıymetli aileme;

Teşekkür ederim.

Haziran, 2025

Sümeyye ŞANAL

ÖZET

YENİ NESİL DİZİLEMENİN

HEREDİTER RENAL TÜBÜLER HASTALIKLARIN TANISINDAKİ YERİ

DR. SÜMEYYE ŞANAL, UZMANLIK TEZİ, KONYA, 2025

Amaç: Kalıtsal renal tübüler hastalıklar, sıvı, elektrolit ve asit-baz dengesi bozuklukları ile seyreden, genetik ve fenotipik olarak heterojenite gösteren nadir bir hastalık grubunu oluşturur. Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojileri, bu heterojen yapıyı anlamada ve birden fazla genin eşzamanlı analizini mümkün kılarak tanısal doğruluğu artırmada önemli bir araçtır. Bu çalışmada, merkezimizde değerlendirilen hastaların fenotipik özellikleri ile NGS verileri birlikte ele alınarak, Türk toplumunda gözlenen genetik varyasyonlar hakkında bilgi edinmek, genotip-fenotip ilişkisini daha iyi anlamak ve daha önce tanımlanmamış varyantları inceleyerek klinik veri ile korelasyonlarını değerlendirmek amaçlanmıştır.

Yöntem: 2019–2023 yılları arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na kalıtsal tübüler hastalık ön tanısı veya ilişkili klinik bulgular ile başvuran toplam 56 hastanın genetik analiz verileri retrospektif olarak incelenmiştir. Tüm hastalardan elde edilen DNA örnekleri, kalıtsal tübülopatilerle ilişkili genleri içeren hedefe yönelik NGS paneli ile analiz edilmiştir. Belirlenen dahil etme kriterlerini karşılayan 26 hastanın fenotipik ve genotipik verileri detaylı olarak değerlendirilmiş ve bu hastalar çalışma grubunu oluşturmuştur. Ayrıca, saptanan genetik varyantların aile içi segregasyonunu incelemek amacıyla Sanger dizileme veya hedefe yönelik NGS yöntemleri ile elde edilmiş veriler retrospektif olarak taranmıştır.

Bulgular: Çalışma grubundaki 26 hastada, 12 farklı gende patojenik, olası patojenik ve önemi bilinmeyen varyant sınıflarına dahil olan toplamda 30 varyant tespit edilmiştir. Genetik tanı oranı ise %46,4 olarak belirlenmiştir. En sık saptanan kalıtsal tübülopati Gitelman sendromu olup, 10 hastada (%38,5) saptanmıştır. Bunu sırasıyla Bartter sendromu (4 hasta, %15,4), distal renal tübüler asidoz (3 hasta, %11,5), ailesel hipokalsiürik hiperkalsemi (2 hasta, %7,7) ve hipokalsemi (2 hasta, %7,7) izlemiştir. Ayrıca, beş olguda literatürde daha önce bildirilmemiş, “novel” varyantlara rastlanmıştır.

Sonuç: Bu çalışmada, kalıtsal tübüler hastalıkları ile ilgili genlerde saptanan genetik varyantlar kapsamlı biçimde değerlendirilmiş; klinik önemi bilinmeyen ve literatürde daha önce bildirilmemiş varyantlar tartışılarak olası yeni genotip-fenotip korelasyonları ortaya konulmuştur. Elde edilen bulgular, mevcut literatüre katkı sağlamasının yanı sıra, kalıtsal tblopatilerle ilgili gelecekte planlanacak araştırmalara, hastaların klinik yönetiminde ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde yol gösterici olabilir.

Anahtar kelimeler: Kalıtsal Tübüler Hastalıkları, Yeni Nesil Dizileme, Varyant, Genotip-Fenotip Korelasyonu

ABSTRACT

THE ROLE OF NEXT-GENERATION SEQUENCING IN THE DIAGNOSIS OF HEREDITARY RENAL TUBULAR DISORDERS SÜMEYYE ŞANAL, MD, DISSERTATION, KONYA, 2025

Aim: Inherited renal tubular disorders represent a rare group of diseases characterized by disturbances in fluid, electrolyte, and acid-base balance, exhibiting both genetic and phenotypic heterogeneity. Next-Generation Sequencing (NGS) technologies are valuable tools for understanding this heterogeneity and enhancing diagnostic accuracy by enabling the simultaneous analysis of multiple genes. This study aims to analyze the phenotypic features of patients evaluated at our center in conjunction with NGS data to gain insights into the genetic variations observed in the Turkish population, to understand genotype-phenotype correlations better, and to examine previously unreported variants in relation to clinical findings.

Methods: The genetic analysis data of 56 patients referred to the Department of Medical Genetics at Necmettin Erbakan University, Faculty of Medicine, between 2019 and 2023 with a preliminary diagnosis of inherited tubular disorder or related clinical findings were retrospectively reviewed. DNA samples from all patients were analyzed using a targeted NGS panel covering genes associated with inherited tubulopathies. A total of 26 patients who met the inclusion criteria were evaluated in detail regarding their phenotypic and genotypic characteristics and constituted the study group. Additionally, data obtained through Sanger sequencing or targeted NGS were retrospectively examined to assess familial segregation of the identified genetic variants.

Results: Among the 26 patients in the study group, a total of 30 variants classified as pathogenic, likely pathogenic, or of uncertain significance were detected across 12 different genes. The genetic diagnostic yield was determined to be 46.4%. The most frequently observed inherited tubulopathy was Gitelman syndrome, identified in 10 patients (38.5%), followed by Bartter syndrome (4 patients, 15.4%), distal renal tubular acidosis (3 patients, 11.5%), familial hypocalciuric hypercalcemia (2 patients, 7.7%), and hypocalcemia (2

patients, 7.7%). Additionally, five novel variants not previously reported in the literature were identified.

Conclusion: This study presents a comprehensive evaluation of genetic variants identified in genes associated with inherited tubular disorders. It discusses both variants of uncertain clinical significance and previously unreported variants, thereby proposing potential new genotype-phenotype correlations. The findings not only contribute to the existing literature but may also inform future research and guide clinical management and the development of treatment strategies for inherited tubulopathies.

Keywords: Inherited Tubular Disorders, Next-Generation Sequencing, Variant, Genotype-Phenotype Correlation

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar.....	xi
ŞEKİLLER	xii
KISALTMALAR VE SİMGELER	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 BÖBREK ANATOMİSİ	3
2.2 BÖBREK HİSTOLOJİSİ VE EMBRİYOLOJİSİ.....	5
2.3 BÖBREK FİZYOLOJİSİ	7
2.4 KALITSAL RENAL TÜBÜLER HASTALIKLAR.....	10
2.4.1 Proksimal Tübülün Kalıtsal Hastalıkları	12
2.4.1.1 Renal Fanconi Sendromu	12
2.4.1.2 Proksimal Renal Tübüler Asidoz.....	15
2.4.1.3 İzole Renal Glukozüri.....	16
2.4.2 Henle Kulbunun Kalıtsal Hastalıkları	17
2.4.2.1 Bartter Sendromu.....	17
2.4.2.2 Ailesel hipomagnezemi ile hiperkalsiüri ve nefrokalsinozis (FHHN)	21
2.4.2.3 Otozomal Dominant Hipokalsemi ve Familial Hipokalsiürik Hiperkalsemi	22
2.4.3 Distal Tübülün Kalıtsal Hastalıkları	22
2.4.3.1 Gitelman Sendromu.....	22
2.4.3.2 Psödohipoaldosteronizm tip 2	25
2.4.3.3 EAST/SeSAME sendromu	26
2.4.3.4 Sekonder hipokalsemi ile hipomagnezemi (Hipomagnezemi tip 1).....	26
2.4.3.5 Renal hipomagnezemi 2	27
2.4.3.6 Otozomal dominant hipomagnezemi.....	28
2.4.3.7 İzole resesif hipomagnezemi (Renal hipomagnezemi 2).....	28
2.4.3.8 Diğer hipomagnezemiler	28
2.4.4 Toplayıcı Kanalların Kalıtsal Hastalıkları	29
2.4.4.1 Psödohipoaldosteronizm tip 1	29

2.4.4.2 Liddle sendromu	30
2.4.4.3 Distal Renal Tübüler Asidoz	30
2.4.4.4 Kalıtsal Miks Renal Tübüler Asidoz (Tip III RTA)	32
2.4.4.5 Nefrojenik diyabetes insipidus	33
2.4.4.6 Uygunsuz antidiürez nefrojenik sendromu.....	34
2.5 Genetik Varyasyon Çeşitleri.....	34
2.6 Kalıtsal Tübülopatilerin Moleküler Tanısında Yeni Nesil Dizileme.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1 Araştırmanın Tipi	39
3.2 Araştırma Bölgesi ve Zamanı	39
3.3 Araştırma Evreni ve Yeri.....	39
3.4 Örneklem Seçme Kriterleri.....	39
3.5 Araştırmanın İzni ve Etik Durum	41
3.6 Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Grubuna Uygulanmış Olan Yöntemler	41
3.6.1 Yeni Nesil DNA Dizi Analizi.....	45
3.6.1.1 Kütüphane Hazırlığı	45
3.6.1.2 Kütüphane Amplifikasyonu ve Amplifiye Kütüphanenin Saflaştırılması... 47	
3.6.1.3 DNA Kütüphanesinin Kantifikasyonu ve Kalite Analizi	48
3.6.1.4 Hedef Zenginleştirme Protokolü	48
3.6.1.5. Postcapture kütüphanelerin amplifikasyonu, saflaştırılması ve kalite kontrolü.....	53
3.6.1.6 DNA'nın tek iplikli dairesel forma dönüştürülmesi	56
3.6.1.7. Tek iplikli sirküler DNA'nın nanotoplara (DNB) dönüştürülmesi	58
3.6.1.8 Kütüphane havuzunun dizilenmesi.....	60
3.6.1.9 Veri Analizi	61
3.6.1.10 Varyantların Sınıflandırılması	62
3.7 İstatistiksel Analiz	66
4. BULGULAR	67
4.1 Sosyodemografik Özelliklerin Değerlendirilmesi	67
4.1.1 Yaş.....	67
4.1.2 Cinsiyet.....	68
4.1.3 Ailede renal hastalık öyküsü	68
4.1.4 Hastaların anne ve baba akrabalık durumları	69
4.2 Tespit Edilen Dizi Analizi Verilerinin Değerlendirilmesi.....	69
4.2.1 Saptanan varyant tipleri	70

4.2.2 Saptanan varyantların sınıflandırılması	71
4.3 Olgular	73
5. TARTIŞMA.....	99
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	119
6.1. SONUÇLAR.....	119
6.2. ÖNERİLER	120
7. KAYNAKLAR.....	121

TABLULAR

Tablo 2.1: Tübüler segmentlerin temel işlevleri.....	10
Tablo 2.2: Taşıyıcı proteinlerdeki genetik bozuklukların neden olduğu renal hastalıklar .	12
Tablo 2.3: Genetik geçişli Fanconi sendromu formlarının kalıtım özellikleri.	14
Tablo 2.4: Bartter ve Gitelman sendromlarının ayırt edici özellikleri.	25
Tablo 2.5: Distal RTA etyolojisinde rol alan patojenik varyantların genlere göre oranı ve tespit yöntemi	32
Tablo 3.1: <i>Celeomics Tubular Disorders</i> kit içeriğinde yer alan kalıtsal tübülopatiler ve ayırıcı tanıda yer alan hastalıklar ile ilişkilendirilmiş genler.	42
Tablo 3.2: <i>KAPA HyperCap Heredity Panel</i> çalışılan hastalarda kalıtsal tübülopatiler gen seti filtresine dahil edilen genler.....	42
Tablo 3.3: DNA izolasyon kiti içeriği.	44
Tablo 3.4: Kütüphane amplifikasyonu PZR programı	48
Tablo 3.5: Hibridizasyon reaksiyonu karışımı bileşenleri.....	50
Tablo 3.6: Hibridizasyon sonrası yıkama tamponları ve çalışma konsantrasyonları.	51
Tablo 3.7: Postcapture kütüphane amplifikasyonu için PZR ana karışımı bileşenleri.....	53
Tablo 3.8: Postcapture PZR programı	54
Tablo 3.9: DNB reaksiyon miks 1'in hazırlanması.	59
Tablo 3.10: Primer hibridizasyon reaksiyonu programı.....	59
Tablo 3.11: DNB reaksiyon miks 2'nin hazırlanması	60
Tablo 3.12: Yuvarlanan daire amplifikasyonu koşulları.	60
Tablo 3.13: ACMG varyant sınıflandırma rehberinin kriterleri.....	63
Tablo 3.14: Dizi varyantlarını sınıflandırmak için kriterleri birleştirme kuralları.	65
Tablo 4.1: Saptanan varyant tipleri ve sayıları.....	70
Tablo 4.2: Tüm varyantların patojenite sınıflandırmasına göre sayıları.	71
Tablo 4.3: Yanlış anlamlı varyantların patojenite sınıflamasına göre sayıları.....	72
Tablo 4.4: Çerçeve kayması varyantlarının patojenite sınıflamasına göre sayıları.....	73
Tablo 4.5: Olguların ön tanılarına göre demografik özellikleri ve ilişkili genler.....	74
Tablo 4.6: Olguların ön tanıları ve ilişkili klinik bulguları.	74
Tablo 4.7: Olguların genotip özellikleri ve ilişkili fenotipleri.....	76

ŞEKİLLER

Şekil 2.1: Böbrek anatomisi ve yerleşimi.....	3
Şekil 2.2: Uzun ekseninden kesilen böbreğin parankimal yapıları.	4
Şekil 2.3: Böbreğin vasküler organizasyonu.	5
Şekil 2.4: Kortikal ve jukstamedüller nefronların şematik gösterimi.....	6
Şekil 2.5: Kalıtsal proksimal renal tübüler asidozun patojenik mekanizmasının şematik diyagramı.	16
Şekil 2.6: Bartter sendromu tiplerinin ve Familyal Hipomagnezemi Hiperkalsiüri Nefrokalsinozis (FHHN) sendromunun moleküler şematizasyonu.....	18
Şekil 2.7: Gitelman ve Gordon (pseudohipoaldosteronizm tip 2) sendromlarında distal kıvrımlı tübül hücresinin patofizyolojisini betimleyen basitleştirilmiş diyagram.....	23
Şekil 2.8: TALH ve DKT’de Mg^{+2} katyonlarının reabsorbsiyonunun moleküler transport mekanizmaları.	27
Şekil 2.9: Tek nükleotid değişimlerinin oluşturduğu varyantların şematik gösterimi (solda; yanlış anlamlı, sinonim, anlamsız varyant, sağda; insersiyona bağlı çerçeve kayması oluşumu).	36
Şekil 3.1: Örneklem seçme kriterlerine göre çalışma grubunu gösteren akış şeması.....	41
Şekil 3.2: Uç Tamiri ve A-Tailing karışımının hazırlanması.	46
Şekil 3.3: Hibridizasyon reaksiyonu için çoklu örneklerin eşit miktarda alınarak kütüphane havuzlarının oluşturulması.	49
Şekil 3.4: Manyetik stand üzerine alınan numunelerin saflaştırılması.....	56
Şekil 3.5: dsDNA’dan tek iplikli sirküler DNA oluşumunun şematik gösterimi.....	57
Şekil 3.6: DNA dizilemesi için kullanılan, numunelerin yüklendiği sekanslama cihazı	61
Şekil 4.1: Hasta yaş dağılım histogramı.	67
Şekil 4.2: Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı.	67
Şekil 4.3: a. Çalışma grubunun cinsiyete göre dağılımı. b. Pediatrik ve erişkin grubun kendi içinde cinsiyete göre dağılımı.....	68
Şekil 4.4: Pediatrik ve erişkin hasta grubunda ailede renal hastalık öyküsü dağılımı.	68
Şekil 4.5: Pediatrik ve erişkin hasta grubunda anne ve baba akrabalık durumları dağılımı	69
Şekil 4.6: Saptanan varyantların genlere göre dağılım oranları.	70
Şekil 4.7: Saptanan varyant tiplerinin dağılımını gösteren grafik.....	71
Şekil 4.8: Tüm varyantların patojeniteye göre dağılımı.	72
Şekil 4.9: Yanlış anlamlı varyantların patojeniteye göre dağılımı.	72

Şekil 4.10: Çerçeve kayması varyantlarının patojeniteye göre dağılımı.	73
Şekil 4.11: NGS yöntemi ile genetik test sonrası olguların tanı dağılım yüzdeleri	80
Şekil 4.12: O#1'e ait aile ağacı.....	81
Şekil 4.13: O#1 ve babasında heterozigot CASR geni c.2519G>T varyantına ait moleküler analiz görüntüleri.....	82
Şekil 4.14: O#5'e ait aile ağacı.....	83
Şekil 4.15: O#5 ve ebeveynlerine ait AP2S1 geni c.44G>A varyantına ait moleküler analiz görüntüleri	84
Şekil 4.16: O#7 ve O#8'e ait aile ağacı.	85
Şekil 4.17: O#7 ve ebeveynlerine ait ATP6V1B1 geni c.1037C>G varyantı moleküler analiz görüntüleri.....	86
Şekil 4.18: O#8 ve annesine ait ATP6V1B1 geni varyantlarının moleküler analiz görüntüleri.	88
Şekil 4.19: O#9'a ait aile ağacı.....	90
Şekil 4.20: O#9'a ait ATP6V0A4 geni homozigot c.292-1G>A varyantının IGV görüntüsü	90
Şekil 4.21: O#10 ve ebeveynlerine ait BSND geni c.139G>A varyantının moleküler analiz görüntüleri.	92
Şekil 4.22: O#12'ye ait aile ağacı.....	94
Şekil 4.23: O#12 ve ebeveynlerine ait SLC12A1 geni c.2887_2888del varyantına ait moleküler analiz görüntüleri.....	95
Şekil 4.24: O#18'e ait aile ağacı.....	96
Şekil 4.25: O#18'e ait <i>SLC12A3</i> geni homozigot c.1672T>C varyantının IGV görüntüsü.97	
Şekil 4.26: O#26'ya ait aile ağacı.....	98
Şekil 4.27: O#26'ya ait KLHL3 geni homozigot c.161T>C varyantının IGV görüntüsü... 98	

KISALTMALAR VE SİMGELER

ACMG: Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Topluluğu (*American College of Medical Genetics and Genomics*)

AME: Görüntüde mineralokortikoid fazlalığı (*Apparent Mineralocorticoid Excess*)

c. : kodlayan (*coding*)

CES: Klinik ekzom dizileme (*Clinical Exome Sequencing*)

Cl: Klorür

CNV: Kopya sayısı değişimi (*Copy Number Variant*)

DKT: Distal kıvrımlı tübül

DNB: DNA nanotop (*DNA nanoball*)

dRTA: Distal Renal Tübüler Asidoz

g.: genomik

GRA: Glukokortikoid ile düzeltilbilir hiperaldosteronizm

HNF-1: Hepatosit nükleer faktör 1

HCO₃⁻: Bikarbonat

IGV: Bütünleştirici Genomik Görüntüleyici (*Integrative Genomics Viewer*)

K⁺: Potasyum

KBH: Kronik böbrek hastalığı

KCTF: Karaciğer fonksiyon testi

Mg⁺²: Magnezyum

Na⁺: Sodyum

NCC: Tiyazide duyarlı NaCl kotransporter

NGS: Yeni Nesil Dizileme (*New Generation Sequencing*)

NSAİİ: Non-streoid Anti-İnflamatuvar İlaçlar

SB: ölü doğum (still birth)

SGLT2: Sodyum-glukoz transport proteini 2

pRTA: Proksimal Renal Tübüler Asidoz

PTH: Parathormon

RAAS: Renin-Anjiyotensin-Aldosteron sistemi

ROMK: Renal dış medüller potasyum kanalı (*Renal Outer Medullary K⁺ channel*)

RTA: Renal Tübüler Asidoz

TALH: Henle kulbunun kalın çıkan kolu

FHH: Ailesel hipokalsiürik hiperkalsemi

FHHN: Familial hipomagnezemi ile hiperkalsiüri ve nefrokalsinozis

WES: Tüm ekzom dizileme (*Whole Exome Sequencing*)

WGS: Tüm genom dizileme (*Whole Genome Sequencing*)

WT: yabancı/doğal tip (*wild type*)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Böbrek tübüllerindeki taşıyıcı proteinleri kodlayan genlerdeki hastalık yapıcı varyantlar, vücutta homeostazisin bozulmasına yol açan ve kalıtsal tübülopatiler olarak adlandırılan hastalıklara neden olur. Küresel prevalansının hala tahmin edilmesi zordur ve heterojen bir nadir hastalık grubunu oluşturur. Böbreğin kalıtsal tübülopatileri, hem çocuklarda hem de erişkinlerde kronik böbrek hastalıklarının (KBH) önde gelen nedenlerinden olup, artmış mortalite ve morbidite riski ile ilişkilidir (Iancu & Ashton, 2020). En sık gözlenen kalıtsal renal tübüler hastalıklar pediatrik popülasyonda distal renal tübüler asidozlar ve Bartter sendromu olarak bildirilirken, erişkin popülasyonda Gitelman sendromu ve ailesel hipokalsiürik hiperkalsemi (FHH) ön plana çıkmaktadır; ancak bu hastalıkların sıklıkları farklı çalışmalar ve coğrafi bölgeler arasında değişkenlik göstermektedir. Kalıtsal tübülopatiler yetişkin başlangıçlı hafif klinik bulgulardan, perinatal ölümcül hastalığa kadar geniş bir spektrumda gözlenebilir. Erişkinlerde kesin tanıyı zorlaştıran nedenler arasında, semptomların sinsi gelişimi, eşlik eden hastalıklar ve çoklu ilaç kullanımını yer alır (Hureaux ve ark., 2019; Osman ve ark., 2023).

Kalıtsal tübüler transport bozukluklarına ilişkin araştırmalar, tarihsel olarak tübüler epitel hücrelerinde solüt taşınımı bozukluklarının fizyopatolojisi üzerinde yoğunlaşmıştır. Son yirmi beş yılda ise moleküler genetik alanındaki gelişmeler, bu bozuklukların patojenik mekanizmalarının aydınlatılmasını sağlamış ve çok sayıda hastalıkta temel moleküler defektlerin karakterize edilmesine olanak tanımıştır (Zelikovic, 2019). Kalıtsal renal tübüler hastalıklarda moleküler genetik testlerin potansiyel faydaları fazladır. Minimal invaziv, zaman ve maliyet açısından giderek daha etkin hale gelen bu testler, hastalığın kesin tanısının konmasında önemli bir rol oynamaktadır. Erken genetik tanı; nadir hastalıklarda sıkça karşılaşılan yanlış tanımlar ve uzun araştırma süreçleriyle geçen “tanı yolculuğunu” önleyebilir, hatta bazı durumlarda böbrek biyopsisi ihtiyacını ortadan kaldırabilir. Genetik tanı; mevcut klinik veya histopatolojik sınıflandırmaların yeniden değerlendirilmesini de gerektirebilir. Ek olarak, bazı kalıtsal tübülopatilerde görülen ekstrarenal bulgular için hedefe yönelik tarama protokollerinin uygulanmasına ve erken dönemde tedavi stratejilerinin belirlenmesine olanak sağlar (Knoers ve ark., 2022).

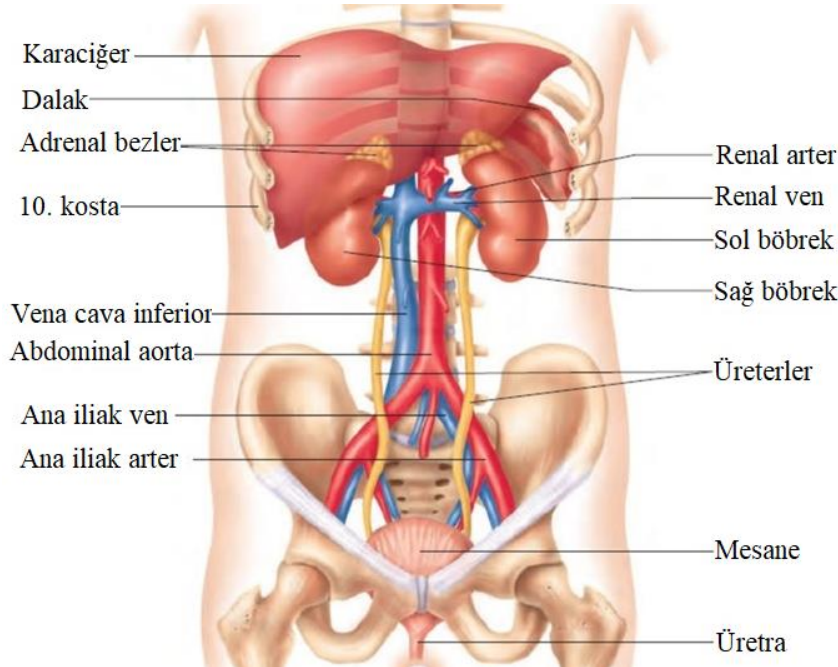
Yeni Nesil Dizileme (NGS; *Next-Generation Sequencing*) teknolojileri, genetik heterojenite gösteren hastalıklarda çoklu gen analizine olanak tanıyarak, hem atipik klinik prezentasyon gösteren olgularda tanısal doğruluğu artırmakta hem de tipik bulgularla başvuran hastalara tanı konmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte, NGS'nin ülkemizde

klirik rutinde yaygın kullanımının görece yeni olması ve fenotipik varyasyonlar nedeniyle Türk popülasyonuna özgü genomik veri birikimi halen yetersizdir. Literatürde, Türkiye'deki kalıtsal tübülopati hastalarının klinik ve genetik korelasyonunu inceleyen çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu tez çalışmasında, renal tübüler hastalık klinik ön tanısı ile Tıbbi Genetik Polikliniği'ne yönlendirilen ve Yeni Nesil Dizileme (NGS) yöntemiyle "Kalıtsal Renal Tübüler Hastalık Paneli" kullanılarak DNA dizi analizi yapılan hastalar retrospektif olarak değerlendirildi. Çalışmamızda, kalıtsal tübülopatilerin tanısında NGS yönteminin non-invaziv, hızlı ve maliyet açısından uygun bir yaklaşım olarak etkili olduğunu vurgulamayı; ayrıca saptanan varyantların genotip-fenotip ilişkisini değerlendirerek literatüre katkı sunmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 BÖBREK ANATOMİSİ

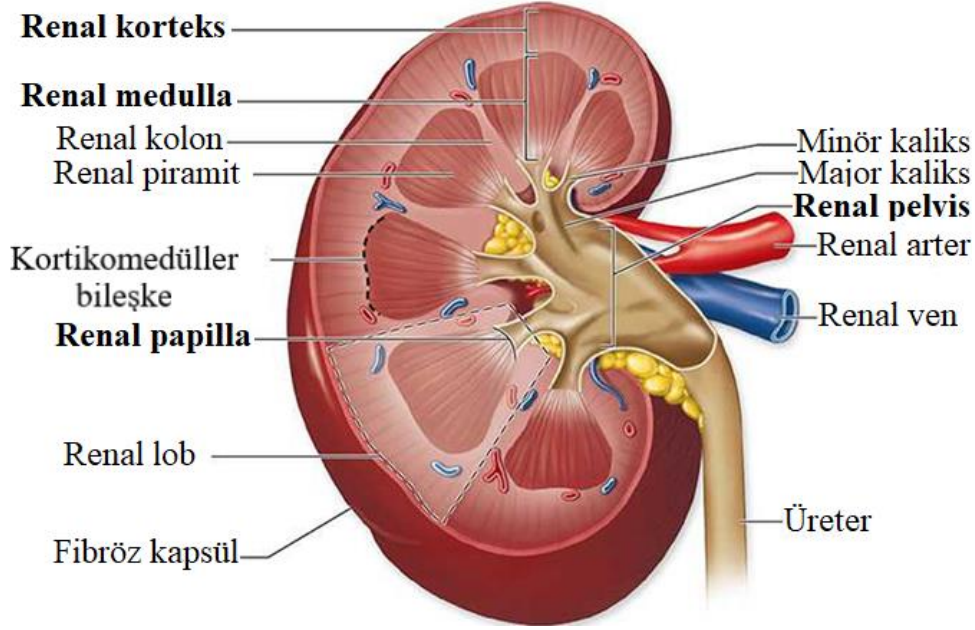
Böbrekler, karın arka duvarında, on ikinci torasik ve üçüncü lomber omurgalar (T12-L3) arasında, vertebral kolonun her iki tarafında birer tane olmak üzere, retroperitoneal olarak yer alırlar (Dalley & Agur, 2023). Cinsiyete göre ağırlıkları farklılık gösterse de ortalama 150 gram civarındadır. Uzunlukları yaklaşık 11-13 cm, genişlikleri 5-7 cm ve kalınlıkları 2-3 cm şeklindedir. Sağ böbrek karaciğer ile komşuluğundan dolayı sola göre biraz daha aşağıda yer alır. Sol böbrek sağa göre hafif daha uzundur ve orta hatta daha yakındır (Demiriz Gülmez, 2022). Her iki böbreğin üst kutbunda, böbrek üzerinde yerleşen böbreküstü bezleri mevcuttur. Sağ böbrek üzerinde karaciğer ve duodenumun retroperitoneal kısmı yerleşir. Alt kutbu ise ince barsaklar ve sağ kolonik fleksura ile komşudur. Sol böbrek, retroperitoneal pankreas, mide, damarlar ve dalak ile komşudur. Alt kutbunun ise sol kolonik fleksura ve jejunum ile komşuluğu vardır. Posterior da psoas kası ve diafram yaprakları üzerine yerleşmişlerdir. Böbrek arterleri; birinci lomber vertebra seviyesinde, abdominal aortadan ayrılarak genellikle tek bir arter olarak böbreğe girerler. Renal venler ise arterlerin önünde yerleşir ve vena cava inferiora açılırlar (Arınsay ve ark., 2017).



Şekil 2.1: Böbrek anatomisi ve yerleşimi (VanPutte ve ark., 2019).

Her iki böbreğin içbükey medial kenarında renal hilus olarak adlandırılan dikey bir yarık bulunur. Böbreğin içinde hilusların girdiği boşluğa renal sinüs adı verilir (Dalley &

Agur, 2023). Hiluslardan renal arter, lenfatikler ve sinirler giriş yaparken renal ven ve üreter çıkar (Arınsoy ve ark., 2017). Renal sinüste pelvikalisiyel yapıların yanı sıra değişik miktarda yağ doku da yer alır (Dalley & Agur, 2023).

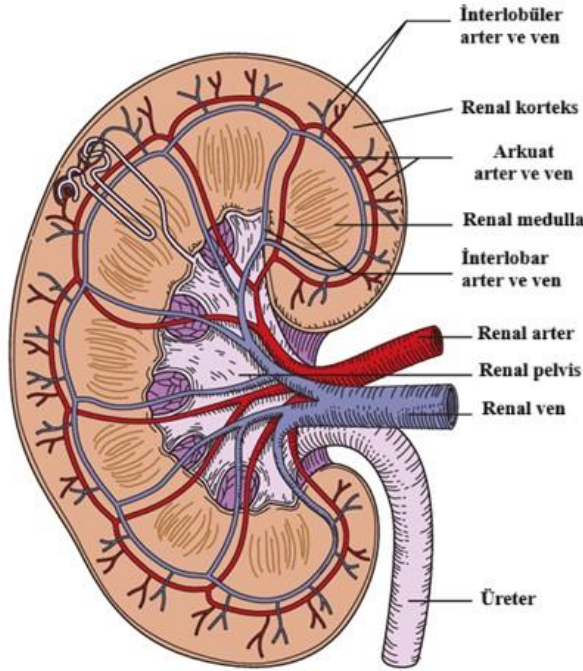


Şekil 2.2: Uzun ekseninden kesilen böbreğin parankimal yapıları (Mescher, 2024).

Böbrek uzun ekseninden kesilip makroskopik olarak incelendiğinde; parankimin dış kısmında korteks, iç kısmında renal kolonların ve konik şekilli piramitlerin yer aldığı medulla, renal papilla ve renal pelvis olmak üzere dört majör anatomik bölge görülür (Demiriz Gülmez, 2022; Dalley & Agur, 2023). Renal pelvis, üreterin üst ucunun düzleşmiş, huni şeklindeki genişlemesidir, her biri iki veya üç minör kalikse bölünen majör kalikslere ayrılır. İdrarın atıldığı 8-15 konik yapıdan oluşan böbrek piramitleri medullada yer alır, tabanları korteksle (kortikomedüller bileşke) birleşir ve böbrek kolonları adı verilen korteks uzantılarıyla birbirinden ayrılır. Her piramidin tepe noktası, renal pelvisin uzantısı olan minör kalikslere açılarak renal papillayı oluşturur (Dalley & Agur, 2023; Mescher, 2024). Her papillanın ucunda toplayıcı kanalların (Bellini kanalları) distal uçlarını temsil eden area kribroza olarak adlandırılan açıklıklar bulunur. Renal papilla, kaliks duvarları, renal pelvis ve üreterler, idrarı mesaneye itmek için ritmik olarak kasılan düz kaslar içerir (Bonnardeaux & Bichet, 2016) .

Abdominal aortadan çıkan ana renal arter, böbrek parankimindeki loblar arasında dallanarak interlobar arterlere ayrılır. Bu arterler, korteks ve medulla arasındaki kortikomedüller bileşkede bir yay çizerek arkuat arterlere dönüşür ve kortekse doğru

ilerleyerek interlobüler arterler halini alır. Glomerüle afferent arteriol olarak giren bu damarlar, efferent arterioller olarak çıkar ve medullaya geri dönerek tübüllerin çevresinde vasa rekta yapılarını oluşturur. Medullaya kan taşıyan tek kaynak olan bu kılcacal damarlar, filtrelenmiş kanı arterlere paralel bir rota izleyerek venöz sisteme yönlendirir ve son olarak vena kava inferiora boşalır. Lenfatik drenaj ise böbrekler ve üst üreterlerden sağ tarafta anteraortokaval ve parakaval, solda paraaortik, lenf nodlarına gerçekleşir (Demiriz Gülmez, 2022).



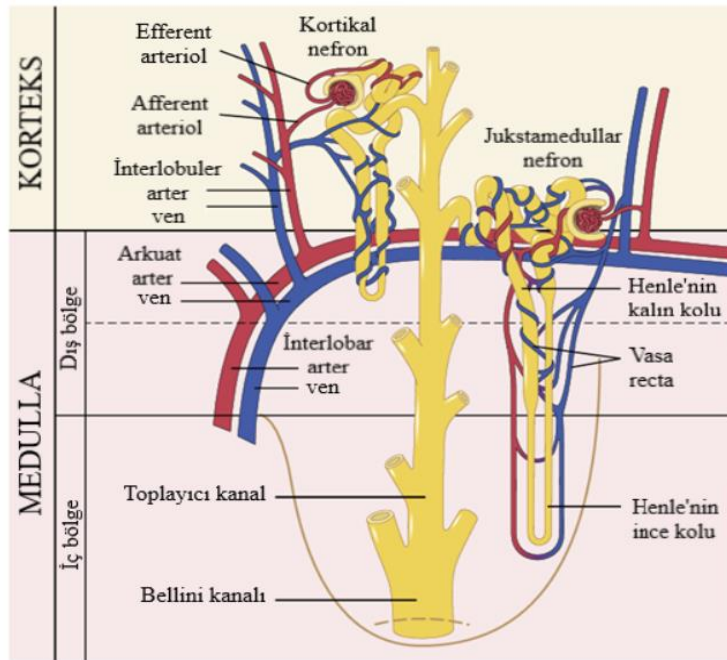
Şekil 2.3: Böbreğin vasküler organizasyonu (Bonnardeaux & Bichet, 2016).

2.2 BÖBREK HİSTOLOJİSİ VE EMBRİYOLOJİSİ

Böbrekler, ürogenital çıkıntının ara mezoderminden üç aşamada (pronefroz, mezonefroz ve metanefroz) gelişir ve yalnızca metanefroz nihai erişkin böbreğini oluşturur. Metanefrik mezenşim ve üreterik tomurcuk arasındaki karşılıklı sinyal etkileşimleri, böbrek gelişiminde kritik rol oynar ve idrar toplayıcı kanal sistemi ile renal tübüllerin oluşumuna yol açar (Bonnardeaux & Bichet, 2016).

Her bir böbrek, nefron adı verilen yaklaşık 1,25 milyon işlevsel birim içerir. Nefronlar hem kortekste hem de medullada yerleşim gösterirler. Nefronların yaklaşık %85'i kortikal nefronlar, %15'i ise jukstamedüller nefronlardır. Her nefron, uzunluğu boyunca üç farklı bölgeye uzanan renal tübülden ve böbrek cisimciğinden (renal korpüskül/Malpighi cisimciği) oluşur (Mescher, 2024). Renal korpüskül, glomerül adı verilen kapiller yumak ve çift katlı epitelle çevrili Bowman kapsülü (renal kapsül) adı verilen yapıyı içerir. Nefronun

tübüler bölümleri ise proksimal kıvrımlı tübül, proksimal düz tübül, Henle kulbunun ince kolunu oluşturan ince segment, distal düz tübül ve distal kıvrımlı tübülden meydana gelir. Distal kıvrımlı tübül, toplama tübülü ile bağlantılıdır. (Hall & Hall, 2020; Ross & Pawlina, 2017; VanPutte ve ark., 2019). Kortikal nefronlarda, renal korpüskül (Malpighi cisimciği) korteksin yüzeyine yakın bir bölgede bulunur. Bu nefronlardaki Henle kulbunun ince kısmı kısa olup yalnızca medullanın dış sınırına kadar uzanır. Jukstamedüller nefronlarda ise renal korpüskül korteksin derin kısımlarına yerleşmiştir. Bu nefronlarda Henle kulbunun inen ve çıkan kolları oldukça uzundur; ince segment hem inen hem de çıkan kollarında bulunarak medullanın iç bölgesine kadar ulaşır. Jukstamedüller nefronların vasküler yapıları, kortikal nefronlardan farklıdır; kortikal nefronlarda tübüler sistem, peritübüler kapillerlerin geniş bir ağıyla çevrelenirken, jukstamedüller nefronlarda uzun efferent arteriyoller medullaya uzanarak vasa rektayı oluşturur. Vasa rekta, konsantre idrar oluşumunda önemli bir rol oynar. (J. E. Hall & Hall, 2020).



Şekil 2.4: Kortikal ve jukstamedüller nefronların şematik gösterimi (J. E. Hall & Hall, 2020).

Böbreğin temel filtrasyon birimi olan renal korpüskül; glomerüler endotel, glomerüler bazal membran ve Bowman kapsülünün visseral tabakasından oluşan filtrasyon yapısını içermektedir. Glomerüler yumağın kapiller endoteli altında yer alan mezangiyal hücreler ve bu hücrelerin oluşturduğu ekstraselüler matriks, renal korpüskülün mezangiyumunu meydana getirir. Mezangiyal hücreler, damar kutbuna doğru uzanarak jukstaglomerüler aparatın bir parçasını oluşturur. Nefronun distal kalın segmentinin son kısmı, afferent arteriyole yakın bir konumda bulunur. Afferent arteriyol çevresindeki tübül

epitel hücreleri makula densa olarak adlandırılır. Makula densanın karşısında yer alan arteriyel düz kas hücreleri, kanın düşük NaCl konsantrasyonuna yanıt olarak renin salgılayan jukstaglomerüler hücreler olarak özelleşmiştir (Ross & Pawlina, 2017; VanPutte ve ark., 2019).

2.3 BÖBREK FİZYOLOJİSİ

Böbrekler, vücuda alınan ve metabolizma ile üretilen atık maddeleri vücuttan uzaklaştırarak, vücut sıvılarının hacmini ve elektrolit bileşimini düzenleyerek iç dengenin korunmasında kritik bir rol oynar. Bu işlevlerini, plazmayı filtreleyip vücudun ihtiyaçlarına göre maddeleri farklı oranlarda geri emerek veya idrar yoluyla atarak gerçekleştirirler (J. E. Hall & Hall, 2020).

Böbreğin temel işlevleri şu şekilde sıralanabilir:

1. Yabancı maddelerin ve metabolik atıkların uzaklaştırılması: Metabolizma ürünleri, ilaçlar ve dışarıdan alınan zararlı maddeler idrar yoluyla vücuttan atılır.
2. Su ve elektrolit dengesinin sağlanması: Vücut sıvılarının osmolalitesi, iyonların atılımı ve geri emilimi ile korunurken, elektrolit düzeyleri dengelenir.
3. Asit-baz dengesinin korunması: Asit salgısının kontrolü ve vücut sıvılarında tampon sistemlerinin düzenlenmesi gerçekleştirilir.
4. Arteriyel kan basıncının düzenlenmesi: Su ve sodyum atılımını kontrol ederek uzun vadeli, renin-anjiyotensin sistemi aracılığıyla ise kısa vadeli arter kan basıncı regülasyonu sağlanır.
5. Eritrosit üretiminin düzenlenmesi: Böbrekler, hipoksi durumunda kemik iliğindeki hematopoetik kök hücreleri uyararak eritrosit üretimini artıran, eritropoetin salgılar.
6. Hormon üretimi, metabolizması ve atılımı: Böbrekler, renin, prostaglandinler ve kininler gibi hormonları salgılar, ayrıca vitamin D'nin aktif formuna dönüşümünü gerçekleştirir.
7. Glikoneojenez: Uzun süreli açlık durumlarında, amino asitler, pirüvat, gliserol, laktat ve α -ketoasitler gibi öncül moleküllerden glikoz sentezi yapılır. Bu glikoneojenez sürecinin yaklaşık %10'u böbreklerde gerçekleşir (J. E. Hall & Hall, 2020).

Nefronlar glomerül ve tübüler sistem olmak üzere başlıca iki kısımdan oluşur(Arınsoy ve ark., 2017.). Proteine sıkı bir şekilde bağlanmayan tüm küçük moleküller glomerüller tarafından filtrelenir. Böbrek tübülleri vücudun bu bileşiklerini yeniden emebilmesini sağlayan primer mekanizmadır(Pyeritz, 2022). Böbreğin ekskretuar ve düzenleyici işlevleri, glomerüler filtrasyon, tübüler reabsorpsiyon ve tübüler sekresyon

mekanizmaları ile gerçekleştirilir. Glomerüler süzüntü, böbrek tübüllerine girdiğinde, idrar olarak atılmadan önce tübülün birbirini takip eden kısımlarından (proksimal tübül, Henle kulbu, distal tübül, toplayıcı tübül ve toplayıcı kanal) sırayla geçerek ilerler. Günlük yaklaşık 180 litre ultrafiltrat, böbrek tübüleri tarafından işlenerek yalnızca 1.5 litre idrar oluşumuna neden olur, bu da süzülen kan hacminin %1'inden daha azdır. Bu süreçte bazı maddeler tübüllerden seçici olarak yeniden kana emilirken, diğerleri kandan tübüler lümenine salgılanır. Tübül hücreleri yüksek miktarda enerji harcayarak, filtratın bileşimini kademeli olarak değiştirir (J. E. Hall & Hall, 2020; Süleymanlar, 2019).

Böbrek tübüllerinin özelleşmiş kısımlarında; elektrolitlerin, glukozun, kalsiyumun, magnezyumun, fosfatların ve aminoasitlerin yeniden emilimi ve protonların salgılanması gibi işlevlerin yerine getirilebilmesi için, çok sayıda özel taşıyıcı (transporter) kanal, tübüler hücre membranlarında spesifik olarak lokalizedir (Bagga ve ark., 2005; Van'T Hoff, 2000).

Renal tübüllerin fizyolojik işlevleri dört bölüme ayrılarak değerlendirilebilir:

- I) Proksimal tübül
- II) Henle kulpu
- III) Distal tübül
- IV) Toplayıcı kanal

Proksimal Tübül:

Proksimal tübül böbreklerde filtrelenen su ve çözülmüş maddelerin büyük bir kısmının geri emildiği temel bölümdür. Filtrelenen sodyumun yaklaşık %65'i burada geri alınır. Bu geri emilim hem paraselüler (hücreler arası) yolla hem de transselüler (hücre içi) yolla Na^+/K^+ -ATPaz pompası aracılığıyla gerçekleşir. Bu pompa enerji gerektirdiği için proksimal tübül, hipoksi ve mitokondriyal enerji bozukluklarına karşı hassastır. Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi, glukoz, amino asit, fosfat gibi maddelerin lüminal membran taşıyıcılarıyla geri emilmesini de sağlar. Bikarbonatın %80'i, NHE3 (Na^+/H^+ Exchanger 3) değiştiricisi ve karbonik anhidraz enzimlerinin yardımıyla geri emilir. Hücre içi karbonik anhidraz, CO_2 ve H_2O 'dan tekrar bikarbonat sentezleyerek asit-baz dengesini korur. Hücreler ayrıca glutamin metabolizması ile ekstra bikarbonat üretir ve amonyak salgılar; bu süreç, asidoz durumlarında önemlidir. İzotonik su ve sodyum geri emilimi, lümen sıvısında klor, kalsiyum ve magnezyum gibi iyonların pasif geri emilimini kolaylaştırır. Kalsiyumun %60'ı, magnezyumun %30'u bu segmentte geri emilir. Fosfatın %85'i, Na^+ -bağımlı taşıyıcılar

(SLC34 ailesi) ile geri alınır. Bu süreç; parathormon, D vitamini, FGF23 ve diyetle alınan fosfor gibi faktörlerle düzenlenir (Joung & Cho, 2023; Soeiro & Helou, 2015).

Henle kulbu:

Normal koşullarda ve ADH (antidiüretik hormon) varlığında, Henle kulbundaki tuz emilimi, yoğun idrar oluşumu için gerekli olan medulladaki konsantrasyon gradyanının korunmasında ana itici güçtür (Bokhari ve ark., 2023). Proksimal tübülden sonra gelen Henle kulpunun kalın çıkan kolu (TALH), filtrelenen sodyumun yaklaşık %30'unu $Na^+-K^+-2Cl^-$ kotransportörü (NKCC2) aracılığıyla geri emer ve parasellüler mekanizmalar yoluyla kalsiyum ve magnezyum dengesine katkı sağlar (Joung & Cho, 2023).

Bazolateral membranda bulunan $Na^+/K^+-ATPaz$, sodyumu hücre dışına taşıyarak NKCC2 için gerekli elektrokimyasal gradyanı oluşturur. Klorür iyonları, CLC-Ka ve CLC-Kb adlı spesifik kanallar aracılığıyla hücre dışına taşınır; bu kanalların düzgün çalışabilmesi için Barttin adlı yardımcı proteine ihtiyaç vardır. Potasyum ise, NKCC2 ile hücre içine alındıktan sonra, ROMK (Kir1.1) kanalı aracılığıyla tekrar tübül lümenine salınır. Bu iyon hareketleri, tübül lümeninde pozitif elektriksel potansiyel oluşturur. Bu potansiyel fark, claudin-16 ve claudin-19 proteinleriyle ilişkili hücreler arası geçitlerden kalsiyum ve magnezyumun pasif (parasellüler) olarak geri emilimini kolaylaştırır. Ayrıca, bu segmentte bulunan CaSR (kalsiyum-duyarlı reseptör), kanda kalsiyum düzeyi yükseldiğinde aktive olur. CaSR aktivasyonu, NKCC2 ve ROMK kanallarını baskılayarak kalsiyum, magnezyum ve potasyumun geri emilimini azaltır. Bu mekanizmalar, elektrolit dengesi ve kalsiyum homeostazının sağlanmasında kritik rol oynar (Soeiro & Helou, 2015).

Distal toplayıcı tübül:

Distal toplayıcı tübül, sodyum, klorür, magnezyum ve kalsiyum gibi iyonların transsellüler yolla geri emildiği bir nefron segmentidir. Sodyum ve klorür, apikal membranda bulunan NCCT (tiazide duyarlı Na-Cl kotransportör) ile hücreye alınır (filtrelenen sodyumun %5-10'u) (Kermond ve ark., 2023; Soeiro & Helou, 2015). Sodyum, $Na^+/K^+-ATPaz$ ile interstisyuma taşınırken; klorür, CLC-Kb gibi özel klorür kanallarıyla hücre içine geçer. Magnezyum, distal tübülün başında apikal membranda bulunan TRPM6 kanalıyla geri emilir. Kalsiyum ise, distal tübülün son kısmı ve bağlantı tübülünde TRPV5 kanalı sayesinde, transsellüler yol ile geri emilir (Soeiro & Helou, 2015).

Toplayıcı kanal:

Toplayıcı kanal; sodyum ve potasyum dengesi, asit-baz regülasyonu, ve idrarın son bileşiminin ayarlanması açısından kritik bir rol oynar. Toplayıcı kanallarda esas (principal)

hücreler ve interkale hücreler olmak üzere temelde iki tip hücre bulunur (Joung & Cho, 2023; Soeiro & Helou, 2015).

Esas hücreler, aldosteron aracılığıyla aktive edilen epitelyal sodyum kanalı (ENaC) sayesinde sodyumun (dolayısıyla suyun) geri emilimini artırır. Potasyum fazlalığı durumunda ise interkale hücreler, aynı mekanizma üzerinden potasyum sekresyonunu kolaylaştırır. Aldosteron salınır ve ENaC uyarılır; bu da ROMK kanalı aracılığıyla potasyumun atılmasını teşvik eden bir elektrokimyasal gradyan oluşturur. İnterkale hücreler aynı zamanda, hidrojen iyonu atılımı ve vücudun asit-baz durumuna bağlı olarak filtrelenen bikarbonatın geri emilimi veya sekresyonu yoluyla asit-baz dengesini sağlar. Son olarak, toplayıcı kanaldaki esas hücreler, antidiüretik hormon (ADH) kontrolünde olan arginin vazopressin reseptörü 2 (AVPR2) ve aquaporin-2 (AQP2) aracılığıyla suyun geri emilimini sağlar (Kermond ve ark., 2023; Zelikovic, 2019).

Renal tübüllerin temel fizyolojik işlevleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Tübüler segmentlerin temel işlevleri (Joung & Cho, 2023).

Tübüler segment	Ana taşıyıcı	İşlev
Proksimal tübül	Na ⁺ -K ⁺ -ATPaz	Su ve solüt maddelerin geri emilimi
Çıkan kalın Henle kulpu	NKCC2	Na ⁺ ve Cl ⁻ geri emilimi Ca ⁺² ve Mg ⁺² seviyelerinin düzenlenmesi
Distal tübül	NCCT	Na ⁺ ve Cl ⁻ geri emilimi Ca ⁺² ve Mg ⁺² seviyelerinin düzenlenmesi
Toplayıcı kanal		
Esas hücreler	ENaC AVPR2, AQP2	Na ⁺ geri emilimi ve K ⁺ salgılanması Serbest suyun geri emilimi
İnterkale hücreler	vH-ATPaz, AE1	H ⁺ ve HCO ₃ ⁻ atılımı

NKCC2: Na⁺-K⁺-2Cl⁻ kotransportörü, NCCT: Na⁺-Cl⁻ kotransportör, ENaC: Epitelyal sodyum kanalı, AVPR2: Arginin vazopressin reseptörü 2, AQP2: Aquaporin 2, vH-ATPaz: Vakuolar tip H⁺-ATPaz, AE1: Anyon değiştirici 1.

2.4 KALITSAL RENAL TÜBÜLER HASTALIKLAR

Böbrekler; diyet, metabolizma ve çevre koşullarındaki değişikliklere rağmen vücudumuzda sıvı, elektrolit ve asit-baz dengesini korurlar. Özellikle, bu kritik görevi gerçekleştiren böbrek tübülleridir. Renal tübüllerin fonksiyonunu yerine getirememesi sonucunda ‘böbrek tübülopatileri’ olarak adlandırılan hastalıklar ortaya çıkar. Kalıtsal renal

tübülopatilerde birincil genetik defekt; belirli bir böbrek taşıma proteininin ve sinyal molekülünün işlevini kaybetmesine veya epitel hücreleri tarafından solüt taşınması için gereken enzimlerden birinin eksikliğine neden olur. Bu nedenle, birçok kalıtsal tübüler bozukluk, belirli maddelerin ya da madde gruplarının tübüler membran üzerinden anormal taşınmasından kaynaklanır. Taşıyıcı proteinlerdeki genetik bozuklukların neden olduğu renal hastalıklar Tablo 2.2’de özetlenmiştir. Buna ek olarak, tübüler epitel membranın toksinler veya iskemi nedeniyle zarar görmesi, önemli renal tübüler bozukluklara yol açabilir (Downie ve ark., 2021; Hall & Hall, 2020; Bonnardeaux & Bichet, 2016).

Renal tübüler fonksiyon bozuklukları, ilgili tübül segmentine veya taşınımı etkilenen substrat(lar)a göre ayrılabilir (Pyeritz, 2022). Bazı tübül segmentlerinin fonksiyonel bozuklukları tübüler reabsorpsiyonda segmente özgü defektlere yol açar. Proksimal tübül defektleri glukozüri, fosfatüri, aminoasidüri veya proksimal renal tübüler asidoza neden olur. Bu özelliklerin birleşimi renal Fanconi sendromu olarak bilinir. Henle kulpunun kalın çıkan kolundaki sodyum reabsorpsiyonunun işlev bozukluğu Bartter sendromuna, renal tuz kaybına ve sekonder hipokalemi metabolik alkalozaya neden olur. Distal kıvrımlı tübül defektleri Gitelman sendromuna ve diğer hipomagnezemi formlarına neden olur. Son olarak, toplayıcı kanalın tübülopatileri su, sodyum, potasyum ve protonların reabsorpsiyonunu bozarak sırasıyla poliüri, tuz kaybı, hiperkalemi ve asidoza neden olur. Aquaporin-2 kanalındaki mutasyonlar resesif nefrojenik diabetes insipidusa neden olurken ve vazopressin V2 reseptöründeki mutasyonlar X'e bağlı nefrojenik diabetes insipidusa neden olur. Sekonder tübülopatilerde genetik defekt tübüler transport veya taşıma sinyal proteinlerini doğrudan etkilemez, bunun yerine spesifik olmayan bir şekilde renal tübüler hücrelerin hasarına yol açar ve dolaylı olarak renal tübüler fonksiyonu bozar (Bonnardeaux & Bichet, 2016). Kalıtsal renal tübülopatilere yol açan genlerin tanımlanması ile, kapsamlı gen panellerinin kullanımı bu hastalık grubuna kesin tanı koymada ve prognozu ön görmede büyük avantaj sağlamıştır.

Tablo 2.2: Taşıyıcı proteinlerdeki genetik bozuklukların neden olduğu renal hastalıklar (Downie ve ark., 2021; Johnson, 2023) .

Taşıyıcı	Gen	Kalıtım Kalıbı	Kalıtsal Tübülopati
Proksimal Tübül			
Apikal Na ⁺ -sistin kotransporter	<i>SLC7A9</i>	OR	Sistinüri
Apikal Na ⁺ -glukoz kotransporter (SGLT2)	<i>SLC3A1</i>	OD	
Bazolateral Na ⁺ -HCO ₃ ⁻ kotransporter	<i>SLC5A2</i>	OD/OR	Renal glukozüri
İntraselüler H ⁺ -Cl ⁻ değiştirici (ClC5)	<i>SLC4A4</i>	OR	Proksimal renal tübüler asidozis
	<i>CLCN5</i>	XLR	Dent hastalığı
Henle Kulpunun Çıkan Kalın Kolu			
Apikal Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ kotransporter	<i>SLC12A1</i>	OR	Bartter sendromu tip 1
Apikal K ⁺ kanalı (ROMK)	<i>KCNJ1</i>	OR	Bartter sendromu tip 2
Bazolateral Cl ⁻ kanalı (CLC-Kb)	<i>CLCNKB</i>	OR	Bartter sendromu tip 3
Bazolateral Cl ⁻ kanalı (CLC-Kb) aksesuar proteini (Barttin)	<i>BSND</i>	OR	Bartter sendromu tip 4a
Bazolateral Cl ⁻ kanalları (CLC-Ka ve CLC-Kb)	<i>CLCNKA+CLCNKB</i>	DR	Bartter sendromu tip 4b
Distal Tübül			
Apikal Na ⁺ -Cl ⁻ kotransporter	<i>SLC12A3</i>	OR	Gitelman sendromu
Toplayıcı Kanal			
Apikal Na ⁺ kanalı (esas hücreler)	<i>SCNN1B, SCNN1G</i>	OD	Artmış ekspresyon: Liddle sendromu
	<i>SCNN1A, SCNN1B, SCNN1G</i>	OR	Azalmış ekspresyon: Psödohipoaldosteronizm tip 1b
Aquaporin 2 kanalı (esas hücreler)	<i>AQP2</i>	OD/OR	Nefrojenik diabetes insipidus
Bazolateral Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ değiştirici (interkale hücreler)	<i>SLC4A1</i>	OD/OR	Distal renal tübüler asidoz
Apikal H ⁺ -ATPaz (interkale hücreler)	<i>ATP6V1B1</i>	OR	Distal renal tübüler asidoz
	<i>ATP6V0A4</i>	OR	(sağlıklı olsun veya olmasın)

OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif, XLR: X'e bağlı Resesif, DR: Digenik Resesif

2.4.1 Proksimal Tübülün Kalıtsal Hastalıkları

2.4.1.1 Renal Fanconi Sendromu

Fanconi sendromu, proksimal tübüllerdeki transport bozuklukları nedeniyle geri emilimin bozulması sonucu, tübüler proteinüri, fosfatüri, glukozüri, aminoasidüri ve proksimal renal tübüler asidoz ile karakterize bir hastalıktır. Fanconi sendromu ilk kez 1900'lü yıllarda De Toni, Debré ve Fanconi tarafından; büyüme geriliği, artmış üriner elektrolit kaybı, hipofosfatemi, glukozürinin gözleendiği rikets vakaları üzerinden tanımlanmıştır. Günümüzde, Fanconi sendromu, proksimal tübüler malabsorpsiyonun hem yaygın hem de parsiyel formlarını kapsayan bir terim olarak kullanılmaktadır. Konjenital

veya edinsel oluşabilir, sistemik hastalıkların bir parçası olarak veya izole proksimal tübüler defekt olarak da görülebilir. Sekonder nedenlerin çeşitliliği ve primer Fanconi sendromu vakalarının nadirliği nedeniyle, bu durumun epidemiyolojik verileri sınırlıdır. En sık eşlik eden genetik hastalık sistinozistir. (Bayrakçı & Özkan, 2022).

Patofizyoloji

Fanconi sendromunun patofizyolojisi tam olarak anlaşılammış olup, genellikle temelde elektrokimyasal gradient bağlantılı olup olmamasına göre sınıflandırılır.

Elektrokimyasal gradiyentle ilişkili mekanizmalar;

Proksimal tübül, yüksek enerji gerektiren reabsorpsiyon kapasitesini, Na-K-ATPaz pompası tarafından oluşturulan elektrokimyasal gradiyent ile sürdürür. Fanconi sendromunda, mitokondriyal disfonksiyon nedeniyle oksidatif fosforilasyonun ve ATP üretiminin azalması, sodyum ve diğer solütlerin reabsorpsiyonunun bozulmasına yol açar. Ayrıca intrasellüler fosfor azalması, ATP üretimini daha da düşürerek bir kısır döngü oluşturur. Enerji yetersizliğinden bağımsız olarak, Na-K-ATPaz pompasının doğrudan disfonksiyonu da gradiyent kaybına neden olabilir.

Elektrokimyasal gradiyentten bağımsız mekanizmalar;

Transkripsiyon faktörlerinden birinde meydana gelen genetik defekt, teorik olarak birden fazla taşıyıcı proteinin işlevini bozabilir ve nihayetinde proksimal tübülün transport fonksiyonu zarar görür. Örneğin, *HNF-1* (hepatosit nükleer faktör 1) delesyonu olan farelerde, elektrokimyasal gradiyentten bağımsız mekanizmalarla Fanconi sendromu geliştiği, ayrıca SGLT-2 (sodyum-glukoz transport proteini 2) sayısının azaldığı ve aminoasit transportunda düşüş gözlenmiştir. Bir diğer mekanizma, megalin ve cubilin proteinleri aracılı endositoz defektleridir, bu durum düşük molekül ağırlıklı proteinlerin ve diğer solütlerin kaybına neden olabilmektedir. Ek olarak, hücre iskeletinin ve fırçamsı kenar bütünlüğünün bozulması veya apikal membran akışkanlığındaki artış, transport fonksiyonlarını olumsuz etkileyen diğer potansiyel mekanizmalardır (Bayrakçı & Özkan, 2022).

Primer Fanconi sendromu genellikle otozomal resesif geçiş gösterse de, bazı formlarında otozomal dominant kalıtım paterni gözlenmektedir. Fanconi sendromu spektrumunda yer alan Lowe sendromu ve Dent Hastalığı'nda ise X'e bağlı resesif geçiş izlenir. Bazı olguların ise heterojen genetik lokuslar, de novo mutasyonlar veya ekzojen faktörlere bağlı geliştiği düşünülmektedir. Fanconi sendromlarının genetik geçişli formları, ilgili genleri ve kalıtım kalıpları tablo 2.3'te özetlenmiştir. (Bayrakçı & Özkan, 2022).

Tablo 2.3: Genetik geçişli Fanconi sendromu formlarının kalıtım özellikleri (Bayrakcı & Özkan, 2022).

Hastalık	Gen (kromozomal lokasyon)	Kalıtım	Kodlanan protein
Sistinozis	<i>CTNS</i> (17p13.2)	OR	Lizozomal sistin taşıyıcı
Fanconi-Bickel sendromu	<i>SLC2A2</i> (3q26.2)	OR	Glukoz taşıyıcı protein 2 (GLUT2)
Tirozinemi (tip 1)	<i>FAH</i> (15q25.1)	OR	Fumaril asetoasetat hidrolaz
Galaktozemi	<i>GALT</i> (9p13.3)	OR	Galaktoz-1-fosfat üridil transferaz
Hereditör fruktoz intoleransı	<i>ALDOB</i> (9q31.1)	OR	Aldolaz B
Wilson hastalığı	<i>ATP7B</i> (13q14.3)	OR	Bakır taşıyıcı ATPaz beta- polipeptid
Lowe sendromu	<i>OCRL</i> (Xq26.1)	XLR	Fosfatidil inozitol 4,5- bifosfat5 fosfataz
Dent hastalığı (tip 1)	<i>CLCN5</i> (Xp11.23)	XLR	Klor kanalı
Fanconi renotübüler sendrom 1	<i>GATM</i> (15q21.1)	OD	L-Arjinin: Glisin Amidinotransferaz
Fanconi renotübüler sendrom 2	<i>SLC34A1</i> (5q35.3)	OR	NaPi-IIa taşıyıcı
Fanconi renotübüler sendrom 3	<i>EHHADH</i> (3q27.2)	OD	Enoil CoA hidrataz/ 3-hidroksiaçil CoA Dehidrogenaz
Fanconi renotübüler sendrom 4	<i>HNF4A</i> (20q13.12)	OD	Hepatosit nükleer faktör 4- α
Fanconi renotübüler sendrom 5	<i>NDUFAF6</i> (8q22.1)	OR	Ubikinon oksidoredüktaz kompleksi-faktör 6

OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif, XLR: X'e bağlı Resesif

Klinik bulgular

Semptomlar ve klinik bulgular altta yatan nedene ya da tübül disfonksiyonunun yaygınlığına göre değişkenlik gösterir. Proksimal tübüldeki transport defektinin yol açtığı primer etkiler kadar, bu bozukluğun diğer tübül segmentlerinde yol açtığı sekonder etkiler de solüt kaybının özelliklerini belirler.

Kanda; hiperkloremik metabolik asidoz, hipokalemi, hipokalsemi, hipofosfatemi, hipomagnezemi, aminoasidüri, glikozüri ve hipouürisemi gözlenir. Proteinüri mevcut ise, genelde nefrotik düzeyin altındadır. 24 saatlik idrarda; glukoz, aminoasit, fosfor, bikarbonat ve kalsiyum atılımı artmıştır (Bayrakcı & Özkan, 2022).

Çocukluk dönemi, klinik bulguların daha belirgin şekilde görüldüğü bir süreçtir. Bu yaş grubunda en sık karşılaşılan bulgular arasında hipovolemik epizodlar ve büyüme geriliği yer almaktadır. Büyüme geriliğinin olası nedenleri arasında; rikets, peptid hormon kayıpları, hipofosfatemi, hipokalemi, kronik dehidratasyon ve asidoz bulunmaktadır. Özellikle sistinozis hastalarında, metabolik bozukluklar düzeltilse bile büyüme geriliği engellenemeyebilir (Bayrakcı & Özkan, 2022).

2.4.1.2 Proksimal Renal Tübüler Asidoz

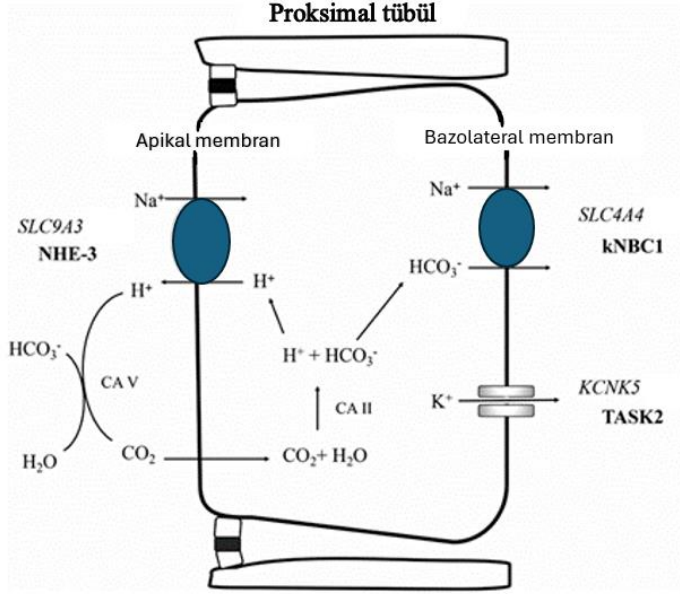
Renal tübüler asidoz (RTA), çeşitli etyolojilerden kaynaklanan renal asidifikasyon disfonksiyonuna bağlı metabolik asidozla karakterize bir sendromdur. Klinik olarak RTA dört türe ayrılır: distal tübüler asidoz (tip I), proksimal tübüler asidoz (tip II), miks tübüler asidoz (tip III) ve hiperkalemik tübüler asidoz (tip IV) (Guo ve ark., 2023).

Proksimal renal tübüler asidoz (pRTA) veya tip 2 RTA, proksimal tübülde bikarbonatın defektif reabsorbsiyonundan kaynaklanır. Bu tübülopati, normal anyon açığı, anoreksi, poliüri ve kabızlık ile hiperkloremik metabolik asidoz ile karakterizedir (Soeiro & Helou, 2015). Kalıtsal pRTA genellikle Fanconi sendromunun bir bileşeni olarak ortaya çıkar, nadiren ise izole bir HCO₃-transport bozukluğudur. OD-RTA ve göz anormallikleri olan OR-pRTA olarak ayrılabilir. OD-pRTA ile ilişkili genler hakkında yeterli bilgi yoktur (Guo ve ark., 2023).

Patofizyoloji

Glomerüllerden filtrelenen HCO₃⁻ün yaklaşık %85'i proksimal renal tübüllerde yeniden emilir. Bu süreç esas olarak proksimal renal tübül apikal membranındaki Na⁺-H⁺ değiştiricinin (NHE), bazolateral membrandaki Na⁺-HCO₃⁻ eş-taşıyıcısının (böbrek NBC1, NBCe1) ve hücre içi karbonik anhidrazın sinerjik etkisiyle gerçekleştirilir. NBCe1 proteinleri, *SLC4A4* geni (chr4q21) tarafından kodlanır; böbrek, göz, beyin gibi çeşitli dokularda eksprese edilir. *SLC4A4* genindeki patojenik mutasyonlar Na⁺-HCO₃⁻ eş-taşıyıcısının fonksiyonunu bozarak, HCO₃⁻'in renal reabsorbsiyonu ve aköz hümörün dolaşım kusurlarına yol açar. Sonuçta pRTA ve göz anormalliklerine neden olur.

Ek olarak, *KCNK5* geninin (chr6p21) patojenik varyantları da OR-pRTA'ya neden olabilir. *KCNK5* geni, bazolateral membran tarafındaki *TWIK-ilişkili asit duyarlı tip 2 K⁺ kanalını (TASK2)* kodlar ve K⁺ geri emiliminde rol oynar (Guo ve ark., 2023).



Şekil 2.5: Kalıtsal proksimal renal tübül asidozun patojenik mekanizmasının şematik diyagramı (Guo ve ark., 2023).

Klinik bulgular

pRTA hastalarında, poliüri, polidipsi, yorgunluk, dehidratasyon ve çocukluk çağında büyüme geriliği gibi belirtiler görülebilir. Distal tübüllerde idrar asidifikasyon fonksiyonunun korunması (kan HCO_3^- emilim eşliğinin altında olduğunda, distal tübül hala idrarı asitleştirebilir) sayesinde, böbrek taşı ve nefrokalsinozis daha az yaygındır. Ayrıca, pRTA hastaları, mental gerilik, göz hastalıkları (katarakt, glokom, korneal opasite), diş lezyonları ve bazal gangliyon kalsifikasyonu gibi spesifik klinik bulgular da gösterebilir (Guo ve ark., 2023).

2.4.1.3 İzole Renal Glukozüri

Kalıtsal izole glukozüri, normal kan glukoz düzeylerine rağmen idrarda yalnızca glukoz atılımıyla karakterize, otozomal resesif geçişli ve genellikle asemptomatik seyreden bir bozukluktur. Bu durumun moleküler patofizyolojisinde, proksimal tübülün kıvrımlı segmentinde bulunan ve filtre edilen glukozun yaklaşık %90'ının reabsorbsiyonunda görevli olan düşük afiniteli-yüksek kapasiteli SGLT2 (*Sodium-Glucose Cotransporter 2*) proteininin kodlandığı *SLC5A2* genindeki mutasyonlar rol oynar. SGLT2 aracılığıyla reabsorbe edilemeyen glukoz, idrarla atılır; buna rağmen karbonhidrat metabolizması, insülin sekresyonu ve kan glukoz düzeyleri normaldir. Bugüne kadar *SLC5A2* geninde tanımlanmış 30'dan fazla patojenik varyant, renal glikozürinin genetik temelini oluşturmakta ve bazı

olgularda nedeni açıklanamayan aminoasidüri ile birlikte görülebilmektedir (Zelikovic, 2019).

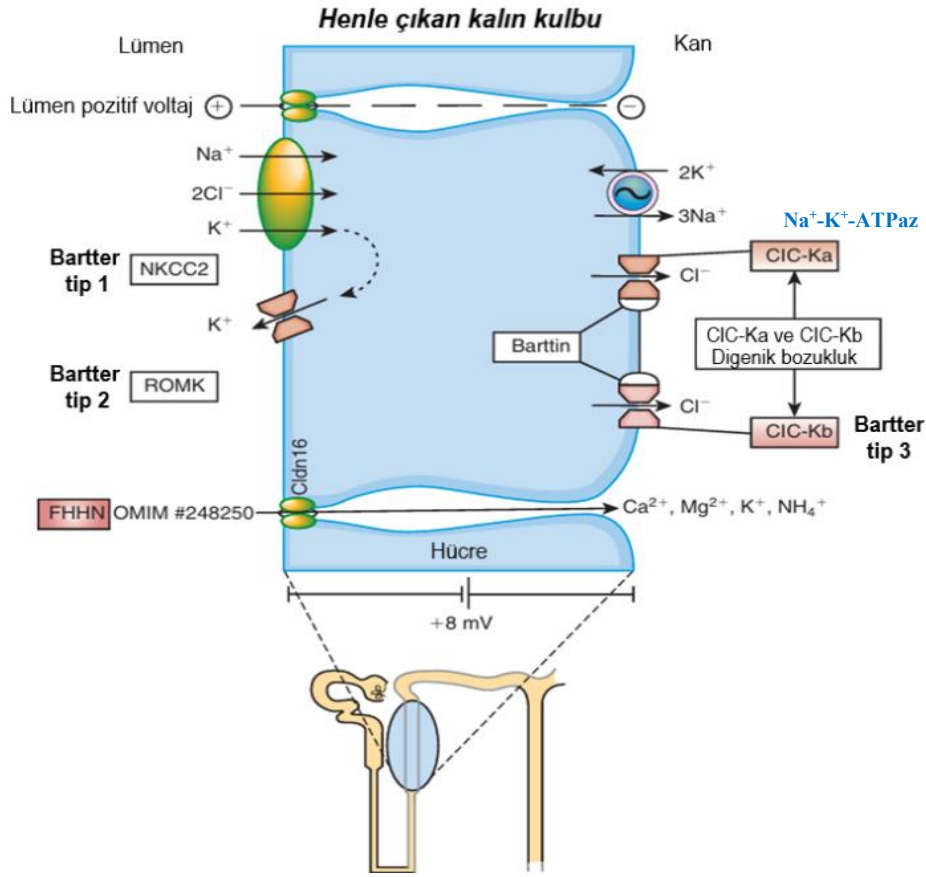
2.4.2 Henle Kulbunun Kalıtsal Hastalıkları

2.4.2.1 Bartter Sendromu

Bartter sendromu (OMIM #601678, #241200, #607364, #602522, #613090 ve #300971), Henle kulbunun kalın çıkan kolunun (TALH) fonksiyonunu etkileyen, tuz kaybı ve hipokalemik metabolik alkaloz ile karakterize, sıklıkla otozomal resesif kalıtım gösteren heterojen bir hastalıktır (Bokhari ve ark., 2023; Bonnardeaux & Bichet, 2016). İlk kez 1962 yılında Frederic Bartter ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve sonrasında, bu sendromun çeşitli varyantları bildirilmiştir. 1995 yılında altta yatan moleküler kusurlar aydınlatılmış ve fenotipik heterojenitenin nedenleri netleştirilmiştir (Chadha & Alon, 2009). Bartter sendromu 1.000.000 kişide 1 görülür ve Gitelman sendromuna göre daha nadirdir (Bokhari ve ark., 2023). Çoğu hastada gebelik sırasında bulgu ortaya çıkar ve antenatal Bartter sendromu terimi kullanılır, daha geç başlayan form ise genellikle klasik Bartter sendromu- Bartter ve arkadaşları tarafından ilk tanımlanan fenotip- olarak adlandırılır (Johnson et al., 2023).

Patofizyoloji

Bartter sendromu, TALH'daki sodyum ve klorun kusurlu transeptilyal taşınmasından kaynaklanır. Bu bölgedeki taşıma süreci karmaşıktır ve birkaç taşıyıcı, kanal ve reseptör arasında koordineli bir etkileşimi içerir (Şekil). Bazolateral yüzeyde yer alan Na-K-ATPaz pompası, sodyumun hücre içine alınması için konsantrasyon gradyanı oluşturur. Bu derişim farkı neticesinde, tübüler lümenindeki sodyum, potasyum ve klorür, luminal yüzeydeki furosemid duyarlı $Na^+-K^+-2Cl^-$ kotransporterleri (NKCC2) tarafından yeniden emilir (Furosemid, NKCC2'nin klorür bağlama bölgesinde etki eder). NKCC2 kotransporterini kodlayan SLC12A1 geninin (chr15q21.1) biallelik patojenik varyantları, antenatal form olan Bartter sendromu tip I'e neden olur(Chadha & Alon, 2009).



Şekil 2.6: Bartter sendromu tiplerinin ve Familial Hipomagnezemi Hiperkalsüri Nefrokalsinozis (FHHN) sendromunun moleküler şematizasyonu (Bonnardeaux & Bichet, 2016)

NKCC2 kotransporterleri, yalnızca ilgili dört iyonun (Na⁺, 2Cl⁻, K⁺) varlığında etkili bir şekilde işlev görür ve lüminal K⁺'un varlığı hız sınırlayıcı adımdır. Buna karşı koymak için hücre içi K⁺, luminal kenarda yer alan ATP ile düzenlenen, potasyum taşıyıcı bir kanal olan ROMK (*renal outer medullary potassium channel*) aracılığıyla lümeneye geri gönderilir. ROMK'yı kodlayan *KCNJ1* geninin (chr11q24.3) biallelik inaktive edici mutasyonları, antenatal varyant fenotipi olan Bartter sendromu tip II'ye neden olur (Chadha & Alon, 2009; Bonnardeaux & Bichet, 2016). ROMK defekti olan bazı yenidoğanlarda, başlangıçta hiperkalemi, metabolik asidoz ve psödohipoaldosteronizmi (tip I) taklit eden tuz kaybı gözlenebilir ve birkaç hafta içinde tipik Bartter fenotipine dönüşebilir. Bu anormal sunum, kortikal toplayıcı kanalda da ifade edilen ROMK izoformunun kusurlu K sekresyonundan kaynaklanır (Chadha & Alon, 2009).

Klorür iyonları, hücrede bazolateral tarafta yer alan voltaj kapılı klorür kanalları olan, ClC-Ka ve ağırlıklı olarak ClC-Kb aracılığıyla kana geçer. ClC-Kb kanalını kodlayan *CLCNKB* geninin (chr1p36.13) biallelik hastalık yapıcı varyantları klasik tip Bartter sendromuna (tip III) yol açar. Bu formun klinik özellikleri, klorür iyonlarının hücreden ClC-

Ka kanalı gibi diğer yollardan çıkabilmesi nedeniyle daha hafiftir (Chadha & Alon, 2009). ClC-Kb kanalı distal tübülde de bulunur, bu nedenle Bartter sendromu tip 3'ün bulguları Gitelman sendromuyla örtüşebilir, dolayısıyla bu hastalarda hipomagnezemi gözlenir (Johnson et al., 2023).

Hem ClC-Ka hem de ClC-Kb, uygun membran lokalizasyonu ve işlevi için bir B-alt birimine (Barttin) ihtiyaç duyar. Barttin proteini, hem böbrek tübüllerinin bazolateral membranlarında hem de iç kulağın potasyum salgılayan epitelinde lokalizedir. Tip 4a Bartter sendromunda ise Barttin proteinini kodlayan *BSND* geninde (chr1p32.3) homozigot veya birleşik heterozigot patojenik varyantlar görülür. Bu hastalarda antenatal renal tuz kaybının yanı sıra sensörinöral sağırılık da görülür (Chadha & Alon, 2009; Johnson et al., 2023). ClC-Ka ve ClC-Kb kanallarının her ikisinde birden işlev kaybı yaşanması, Barttin proteini defektine benzer etkiye yol açmaktadır. Literatürde, ağır antenatal Bartter fenotipi ve sensörinöral sağırılığı olup *BSND* geninde mutasyon saptanmayan az sayıda vakada hem *CLCNKA* hem de *CLCNKB* genlerinde biallelik fonksiyon kaybına yol açan varyantlar bildirilmiştir. Sonrasında bu fenotip digenik resesif kalıtımla aktarılan Bartter sendromu tip 4b olarak adlandırılmıştır (Nozu ve ark., 2008; O'Neill, 2009; Schlingmann ve ark., 2004).

Kortikal Henle kulbunun çıkan kalın kolunun bazolateral membranında ifade edilen kalsiyum algılayan reseptör (*CASR-calcium-sensing receptor*), yüksek konsantrasyondaki ekstraselüler Ca^{+2} ve/veya Mg^{+2} tarafından aktive edilir. Yakın zamanda, luminal yüzeyde yer alan potasyum taşıyıcı kanal ROMK'nın aktivitesinin *CASR* tarafından düzenlendiği bildirilmiştir. *CASR*'nin aktivasyonu, adenilat siklaz ve ardından ROMK'nın inhibisyonuna yol açar. *CaSR* geninin (chr3q13.33-q21.1) aktive edici mutasyonları hipokalsemik hiperkalsiüriye ve renal tuz kaybına yol açarak Bartter benzeri sendroma (eskiden Bartter sendromu tip V olarak adlandırılmıştır) neden olur; bu fenotip otozomal dominant kalıtım gösterir (Chadha & Alon, 2009; Seyberth ve ark., 2017).

2016 yılında Laghmani ve arkadaşlarının, polihidroamniyoz ve antenatal Bartter sendromu (aBS) olan fetüsleri incelediği tüm ekzom dizileme çalışmasında, 15 erkek hastada geçici aBS ile ilişkili *MAGED2* geninde dokuz farklı mutasyon tespit edilmiştir. *MAGED2*, melanomla ilişkili antijen D2'yi (*MAGE-D2: melanoma associated antigen D2*) kodlar ve X kromozomunda (chrXp11.21) bulunur. Hem fetal hem de yetişkin böbreğinde çıkan kalın Henle ve distal tübülde eksprese edildiği ve bu nedenle MAGE-D2'nin böbrekteki taşıyıcı kanalların (NKCC2 ve NCCT) düzenlenmesinde rol oynayabileceği gösterilmiştir (Kömhoff & Laghmani, 2018). Sonrasında OMIM veritabanına XLR kalıtımla 'geçici, antenatal

Bartter sendromu tip 5' olarak girmiştir. Özetle, genetik etiyolojiye göre Bartter sendromu alt tipleri:

Tip I) NKCC2 kotransporterini kodlayan *SLC12A1* genindeki mutasyonlardan kaynaklanır.

Tip II) ROMK'yı kodlayan *KCNJ1* genindeki mutasyonlardan kaynaklanır.

Tip III) Klorür kanalı CLC-Kb'yi kodlayan *CLCNKB* genindeki mutasyonlardan kaynaklanır.

Tip IVa) Barttin proteinini kodlayan *BSND* genindeki fonksiyon kaybı mutasyonlarından kaynaklanır.

Tip IVb) Klorür kanallarını kodlayan *CLCNKA* ve *CLCNKB* genlerinin ikisinin birden fonksiyon kaybı mutasyonlarından kaynaklanır.

Tip V) NKCC2 ve NCCT kanallarının düzenlenmesinde rol oynayan *MAGED2* genindeki mutasyonlardan kaynaklanır.

Klinik bulgular

Bartter sendromunun temel özellikleri, böbreklerde Cl ve K kaybı bulguları olan hipokalemik, hipokloremik alkaloz ve düşük veya normal kan basıncıdır. Bartter sendromu, genetik varyantların türüne bağlı olarak farklı başlangıç zamanları ve fenotipler gösterir. Antenatal Bartter sendromu (aBS), fetal poliüri, polihidroamniyoz, prematüre doğum ve doğum sonrası devam eden renal tuz kaybıyla karakterize, yaşamı tehdit edebilen bir hastalıktır. SLC12A1, KCNJ1 ve BSND varyantları genellikle doğum öncesi başlayan aBS'a yol açarken; CLCNKB varyantları klasik Bartter sendromu (BS3) ile ilişkilidir, genellikle çocuklukta başlar ve elektrolit bozuklukları daha ağır olabilir ve sıklıkla hipomagnezemi eşlik eder. BS2 tipi, doğum sonrası dönemde hiperpotasemi ve hiponatremi ile başlayabilir, bu da bazen yanlışlıkla psödoaldosteronizm tip 1 (PHA1) olarak tanı almasına neden olabilir. BS4 tipi ise sensörinöral işitme kaybı ve ciddi elektrolit bozuklukları ile karakterizedir ve genellikle ilerleyici kronik böbrek hastalığına yol açabilir (Johnson et al., 2023).

Geçici antenatal Bartter sendromu tip 5'te, polihidroamniyoz ve doğum eylemi diğer tiplere göre birkaç hafta daha erken başlar ve poliüri genellikle 30-33. gebelik haftasında sona erer. Yenidoğan döneminde hiponatremi, hipokalemi, hiperaldosteronizm ve hiperklastiüri gibi bulgular görülebilir; bunlar zamanla düzelirken, bazı durumlarda nefrokalsinozis kalıcı olabilir (Laghmani ve ark., 2016). Bartter ve Gitelman sendromunun tipik özelliği olan renal tuz kaybının ayırıcı tanısını yapmada, idrarda Mg^{+2} ve Ca^{+2} atılımının ileri analizleri faydalı olsa da, alt tiplerin belirlenmesinde ve kesin tanıyı doğrulamada genotipleme yapılması önerilir (Johnson et al., 2023).

Tedavi

Bartter sendromunun tedavisinde sıvı ve elektrolit dengesi dikkatle düzenlenmeli, tuz ve potasyum takviyesi yapılırken yan etkiler ve komplikasyonlar göz önünde bulundurulmalıdır. Özellikle antenatal Bartter sendromunda, NSAİİ'lerle prostaglandin sentezinin inhibisyonu, poliüri ve polidipsiyi azaltarak büyüme ve aktiviteyi iyileştirir ve elektrolit kontrolünü sağlamada önemli bir rol oynar (Alhasan ve ark., 2022; Johnson, 2023).

2.4.2.2 Ailesel hipomagnezemi ile hiperkalsiüri ve nefrokalsinozis (FHHN)

Renal hipomagnezemi 3 olarak da adlandırılan bu sendrom (OMIM #248250), nadir görülen bir otozomal resesif hastalıktır. Magnezyum takviyesiyle düzeltilemeyen, derin hipomagnezemiye yol açan magnezyum atılımı ile karakterizedir. Bu hastalık, sıkı bağlantılarda (*tight junctions*) bulunan ve claudin ailesi ile ilişkili olan claudin-16 proteinini kodlayan *CLDN16* genindeki biallelik patojenik varyantlardan kaynaklanmaktadır (Bonnardeaux & Bichet, 2016). Orphanet veritabanına göre prevalansı 1/1000 000'nun altındadır. *CLDN16* geni ilk olarak 1999 yılında Simon ve ark. tarafından paraselüler Mg^{+2} geri emiliminde rol alan *tight junction* proteini paracellin-1 olarak tanımlanmıştır (Simon ve ark., 1999). Defektinde, iyon geçirgenliği azalır ve TALH bölgesinde Mg^{+2} 'nin yeniden emilimi engellenir. Ca^{+2} reabsorpsiyonu da eş zamanlı bozulur, ancak böbrek ve bağırsaktaki alternatif kalsiyum geri kazanım yolları aracılığıyla normal serum Ca^{+2} seviyeleri korunabilmektedir. Claudin ailesinin bir diğer üyesi olan claudin-19 proteinini kodlayan *CLDN19* geni, böbrek tübüllerinde ve gözde ekspresyon gösterir, bu genin biallelik patojenik varyantları oküler tutulumla birlikte renal hipomagnezemi 5 (OMIM #248190) fenotipine yol açar (Konrad ve ark., 2006; Bonnardeaux & Bichet, 2016; Soeiro & Helou, 2015).

Ailesel hipomagnezemi ile hiperkalsiüri ve nefrokalsinozisli hastalarda, idrar Mg^{+2} fraksiyonel atılımı %10'un üzerindedir. Böbrekte artmış kalsiyum atılımı, parankimal kalsifikasyona (nefrokalsinoz) ve böbrek yetmezliğine yol açar, sıklıkla diyaliz gerektirir. Böbrek yetmezliğinin ilerleme hızı, nefrokalsinozun şiddetiyle korelasyon göstermektedir. Diğer klinik bulgular arasında poliüri, polidipsi, gözle ilgili anormallikler, tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları ve renal taşla bağlı kolik yer alır. Serum PTH seviyeleri anormal şekilde yüksektir. Serum kalsiyum, fosfor ve potasyum seviyeleri ile idrar ürik asit ve oksalat atılımı normaldir. *CLDN19* patojenik varyantı bulunan hastalarda, *CLDN16* bozukluğu olanlara ek olarak; şiddetli görme bozukluğu, maküler kolobom, horizontal nistagmus ve belirgin miyopi gibi oküler semptomlar bulunur. Hastalığın spesifik bir tedavisi yoktur, semptomlara yönelik destek tedavisi uygulanır. Tiazid grubu ilaçlar, idrarla kalsiyum atılımını azaltmada

etkilidir. Son dönem böbrek hastalığı geliştiğinde renal replasman tedavisi endikedir (Bonnardeaux & Bichet, 2016).

2.4.2.3 Otozomal Dominant Hipokalsemi ve Familial Hipokalsiürik Hiperkalsemi

Kalsiyum duyarlı reseptör (*CASR*) mutasyonlarında farklı fenotipler oluşabilir. Fonksiyon kazandırıcı varyantlar otozomal dominant hipokalsemiye neden olur. Bu bireylerde genellikle primer hipoparatiroidizme benzer düşük paratiroid hormonu (PTH) seviyeleri ile hipokalsemi görülür. Özellikle çocukluk döneminde nöbetler görülebilirken, bazı hastalar asemptomatik de seyredebilir. Çoğu hastada hipomagnezemi eşlik edebilir. Tedavi yönetimi açısından otozomal dominant hipokalsemili hastaların, primer hipoparatiroidili bireylerden ayrımı önemlidir. *CASR*'deki ciddi fonksiyon kazandırıcı mutasyonlar, belirgin magnezyum, sodyum potasyum ve su kaybına neden olarak tip 5 Bartter sendromuna neden olabilir.

CASR genindeki fonksiyon kaybına yol açan varyantlar ise otozomal resesif kalıtımla neonatal ağır hiperparatiroidizm (NSHPT), otozomal dominant kalıtımla ise familial hipokalsiürik hiperkalsemi (FHH) tip 1 fenotiplerini oluşturur. FHH prevalansının 1:10.000 ila 1:100.000 arasında olduğu tahmin edilmektedir FHH hastalarında genellikle hafif-orta düzeyde hiperkalsemi görülür, böbreklerden kalsiyum ve magnezyum atılımı azalmıştır, serum PTH düzeyleri artmıştır ve çoğu hastada belirgin semptom yoktur. FHH vakalarının %60'ında *CASR* geninde, daha nadiren *CASR*'nin downstream bölgesinde yer alan proteinleri kodlayan *AP2S1* (tip 3) veya *GNA11* (tip 2) genlerinde inaktive edici mutasyonlar saptanır (Lasbleiz ve ark., 2022). NSHPT'li yenidoğanlarda aşikar hiperkalsemiye bağlı poliüri ve dehidratasyon gözlenir. Tedavisiz kalmaları neticesinde nörogelişimsel hasar ve iskelet deformiteleri gelişebilir (Kara, 2022).

2.4.3 Distal Tübülün Kaltsal Hastalıkları

2.4.3.1 Gitelman Sendromu

Gitelman sendromu (OMIM #263800), ilk olarak 1966 yılında tanımlanmış olup hipokalemik metabolik alkaloz ile karakterize otozomal resesif kalıtılan bir tübüler hastalıktır (Gitelman, 1966). Gitelman sendromunun beyaz ırkta görülme sıklığının yaklaşık 1:40.000 olduğu tahmin edilmektedir ve bu da onu en sık görülen kaltsal tübülopati yapmaktadır (Johnson et al., 2023). Gitelman sendromunda, Bartter sendromundan ayırt edici olarak hipokalsiüri ve hipermagnezüri gözlenir ve bu hastalar genellikle geç çocuklukta veya erişkin dönemde tanı alırlar (Chadha & Alon, 2009).

Patofizyoloji

Gitelman Sendromu, distal tübüldeki kusurlu Na-Cl reabsorbsiyonundan kaynaklanır (Şekil 2.7). Bu bölgedeki Na ve Cl reabsorbsiyonu, lüminal tiyazid duyarlı elektronötral Na-Cl kotransporterleri (NCCT) tarafından sağlanır. Tübülden Na çıkışı, bazolateral Na-K-ATPaz'dan, Cl çıkışı ise bazolateral klorür kanalı CLC-Kb'den gerçekleşir (Chadha & Alon, 2009).



Şekil 2.7: Gitelman ve Gordon (pseudohipoaldosteronizm tip 2) sendromlarında distal kıvrımlı tübül hücresinin patofizyolojisini betimleyen basitleştirilmiş diyagram (Chadha & Alon, 2009)

Hastaların çoğunda NCCT'yi kodlayan *SLC12A3* geninde (chr16q13) biallelik inaktive edici mutasyonlar saptanır. Sekonder hipovolemi ve metabolik alkalozla birlikte sodyum ve klorür kaybı neticesinde tiyazid diüretik kullanımına benzer bir etkiyle sonuçlanır. Hipovolemiye bağlı renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin aktivasyonu, kortikal toplayıcı kanala gelen sodyum yükünün artmasıyla birlikte epitelyal sodyum kanalından sodyum geri emiliminin artmasına yol açar. Bu durum, potasyum ve hidrojen atılımıyla dengelenmeye çalışılarak hipokalemi ve metabolik alkalozla neden olur. Yapılan fonksiyonel çalışmalarla, Gitelman sendromunun ayırt edici özelliği olarak kabul edilen hipokalsiüri ve hipermagnezürinin mekanizmaları aydınlatılmıştır. Hipokalsiürinin, hipovoleminin bir sonucu olarak artan Na transportuna bağlı olarak proksimal tübülde pasif paraselüler Ca²⁺ emiliminin artmasından kaynaklandığı gösterilmiştir. Distal tübül hücrelerinde NCCT ile birlikte yer alan apikal magnezyum kanalı olan TRPM6 (epithelial Mg²⁺ channel transient receptor potential channel subfamily M, member 6)'nın hem Gitelman sendromunda hem de kronik tiyazid kullanımında baskılandığı böylece hipermagneziüriye yol açtığı gözlenmiştir. Nadiren, çıkan kalın henle kulbu hücrelerinin

bazolateral membranında ve distal tübüllerde bulunan renal klorür kanalı CLC-Kb'yi kodlayan *CLCNKB* genindeki patojenik varyantlardan kaynaklanır. Bu hastaların kliniğinde beklenen Bartter fenotipi değil, Gitelman fenotipidir (Chadha & Alon, 2009; Bonnardeaux & Bichet, 2016). Yakın bir zamanda, Gitelman benzeri fenotiplerle ilişkili olarak mitokondriyal DNA'da mutasyonlar bildirilmiş ve böylece bu bozuklukların genetik temelini ek kalıtım kalıplarına doğru genişletildiği görülmüştür (Palazzo ve ark., 2022).

Klinik bulgular

Bartter sendromunun aksine, Gitelman sendromlu hastalar yenidoğan döneminde genellikle asemptomatiktir ve sıklıkla insidental olarak tanı alırlar (Bonnardeaux & Bichet, 2016). Tablo 2.4'te Bartter ve Gitelman sendromlarının ayırt edici özellikleri özetlenmiştir. Semptom gösteren hastalarda, klinik bulguların şiddeti büyük ölçüde değişkendir. Ciddi şekilde etkilenen hastalarda; yorgunluk, kas güçsüzlüğü, tuz yeme isteği ve poliüri ile yaşam kalitesinin düşmesi görülür. Kardiyak bulgular, kas krampları ve tetani nadirdir (Johnson et al., 2023). Hastalar kondrokalsinozise bağlı (hipomagnezemiye sekonder) çeşitli eklemlerde artritten muzdarip olabilirler (Bonnardeaux & Bichet, 2016). Laboratuvar değerlendirmesi; hipokalemik hipokloremik metabolik alkaloz ile hipokalsüri, hipomagnezemi ve idrarda yüksek Cl, K ve Mg atılımı gösterir. Kan basıncı genellikle düşük-normal aralıktadır. Ayırıcı tanı, Bartter sendromunu (özellikle tip 3), HNF1B ile ilişkili hastalık, EAST sendromunu ve ayrıca tiyazid kötüye kullanımı ve Sjögren sendromu gibi edinilmiş bozuklukları içerir. Klinik şüphe halinde tanıyı doğrulamak için genotipleme yapılmalıdır (Johnson et al., 2023).

Tedavi

Gitelman sendromu bir tuz kaybı bozukluğu olduğundan, tedavide farmakolojik takviye olmasa bile, tedavi bol miktarda tuz alımını içermelidir. K ve Mg takviyeleri genellikle kas güçsüzlüğü veya krampları iyileştirmek için verilir. Potasyum tutucu diüretikler biyokimyasal bulguları iyileştirebilir ancak tuz kaybını arttırabilir, bu nedenle dikkatli kullanılmalıdır. Üriner prostaglandin E2 düzeyleri normal olduğundan NSAİİ'ler genellikle yararlı değildir. Elektrolit dengesizliğinin şiddeti ile semptomlar arasında net bir orantı yoktur, bu da tedavinin ayarlanmasını zorlaştırır (Johnson, 2023; Bonnardeaux & Bichet, 2016).

Tablo 2.4: Bartter ve Gitelman sendromlarının ayırt edici özellikleri (Johnson et al., 2023).

Özellik/Sendrom	BS tip 1	BS tip 2	BS tip 3 ^a	BS tip 4	BS tip 5 ^b	Gitelman Sendromu
Antenatal bulgular (polihidroamniyoz)	Sık	Sık	Değişken	Sık	Her zaman	Yok
Başvuru yaşı	Yenidoğan	Yenidoğan	Değişken	Yenidoğan	Yenidoğan	Çocukluk/Adölesan
Poliüri/poldipsi	Belirgin	Belirgin	Nadir	Sık	Belirgin	Nadir
Neonatal hiperkalemi/asidoz	Yok	Sık	Yok	Yok	Yok	Yok
Spontan düzelme	Yok	Yok	Yok	Yok	Her zaman	Yok
İdrar Ca ⁺² atılımı	Artmış	Artmış	Değişken	Normal	Artmış	Düşük
Nefrokalsinoz	Sık	Sık	Nadir	Nadir	Nadir	Yok
Hipomagnezemi	Nadir	Nadir	Sık	Sık	Nadir	Sık
İdrar prostaglandinleri	Yüksek	Yüksek	Değişken	Yüksek	Yüksek	Normal

BS: Bartter sendromu

^a Bartter sendromunun tipik özelliklerini gösterebildiği gibi, Gitelman sendromunun da fenokopisini oluşturabilir.

^b Genellikle doğum tarihine yakın dönemde kendiliğinden düzelme gösterir. Tablodaki özellikler sadece aktif hastalık döneminde görülür.

2.4.3.2 Psödohipoaldosteronizm tip 2

Psödohipoaldosteronizm tip II (PHAI), hipertansiyon, hiperkalemi ve normal böbrek fonksiyonu ile karakterize nadir bir kalıtsal hastalıktır. Gordon sendromu veya ailesel hiperkalemik hipertansiyon olarak da adlandırılır. PHAI, *WNK1* (With no Lysine Kinases 1), *WNK4*, *KLHL3* (Kelch-like 3) ve *CUL3* (Cullin 3) genlerindeki varyantlardan kaynaklanabilir. Distal kıvrımlı tübül (DKT) hücrelerinde tiyazide duyarlı NaCl kotransporter (NCCT)'ler aracılığıyla idrar sodyumunun artan yeniden emilimi PHAI'nin ana patofizyolojik mekanizmasıdır. Artmış Na⁺ reabsorpsiyonuna sekonder olarak idrarda potasyum atılımı azalır, bu durum hiperkalemiye ve metabolik asidoza yol açar. Hiperkalemi ve volüm genişlemesi neticesinde, renin seviyesi düşer, aldosteron ise normal veya düşüktür. Bu nedenle, tiyazid diüretikler PHAI'de etkilidir. *WNK* (özellikle *WNK4*), DKT'deki NCCT, epitel Na⁺ kanalı ENaC ve K⁺ kanalı ROMK'nın aktivitelerini düzenler. Ek olarak, *WNK*, *KLHL3/CUL3* tarafından ubiquitinasyon yoluyla kontrol edilir. *KLHL3* proteini, *CUL3* tabanlı ubiquitin ligaz kompleksleri için substratları toplar ve NCCT ekspresyonunu azaltarak düzenler. Bu varyantlar genellikle DKT hücrelerinde *WNK1/WNK4* proteininin artmış seviyelerine yol açarak NCCT sayısını ve aktivitesini artırır (Zhang ve ark., 2021).

PHAI'de hiperkalsiüri DKT'de kalsiyum reabsorpsiyonunun azalması nedeniyle ortaya çıkabilir. *TRPV5* (transient reseptör potansiyeli kanalı vanilloid alt tipi 5), *TRPV6* ve CBP-D28k (kalbindin-D28k) dahil olmak üzere DKT'deki epitel Ca⁺ kanallarının

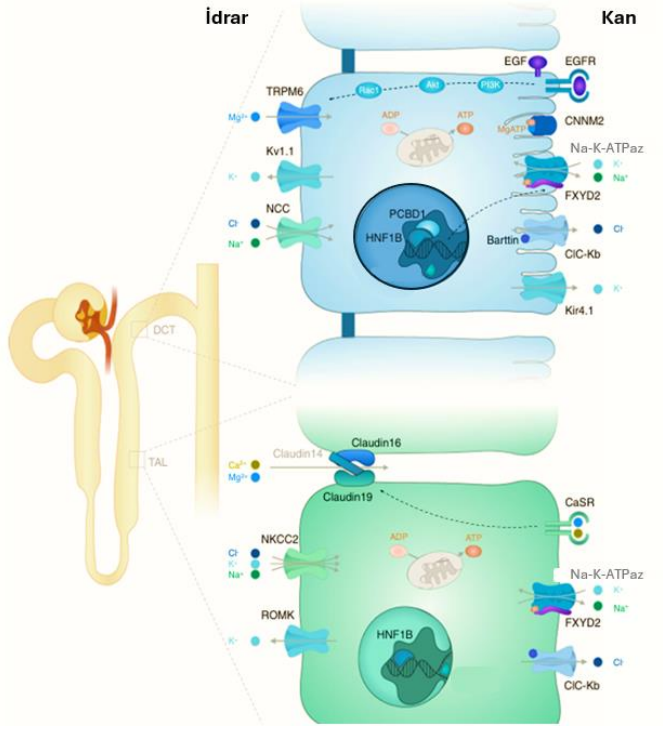
ekspresyonu mekanizmada rol oynar. Hayvan çalışmalarında, *WNK4*'teki mutasyonların *TRPV6* ve CBP-D28k'yi aşağı yönde düzenlediği ve kalsiyum reabsorpsiyonunun azalmasına yol açtığı bulunmuştur (Zhang ve ark., 2021).

2.4.3.3 EAST/SeSAME sendromu

EAST (epilepsi, ataksi, sensorinöral sağırılık, tübülopati) veya SeSAME (nöbetler, sensorinöral sağırılık, ataksi, mental retardasyon ve elektrolit imbalansı), distal kıvrımlı tübülün bazal membranında eksprese edilen bir potasyum kanalı olan Kir4.1'i kodlayan *KCNJ10* geninin fonksiyon kaybı mutasyonlarından kaynaklanan otozomal resesif bir hastalıktır. Kir4.1 beyin, iç kulak, böbrek ve gözde bulunur, Na⁺-K⁺-ATPaz pompası ile birlikte potasyum iyonlarının lokal resirkülasyonuna yardımcı olur. Renin anjiyotensin-aldosteron sisteminin aktivasyonu artmıştır. Hastalarda zihinsel gelişim bozukluğu, nöbetler, ataksi, sensorinöral işitme kaybı ve Gitelman sendromundakine benzer elektrolit anormallikleri (tuz kaybı, hipokalemik metabolik alkaloz, hipokalsiüri ve hipomagnezemi) gözlenir (Kara, 2022; Soeiro & Helou, 2015).

2.4.3.4 Sekonder hipokalsemi ile hipomagnezemi (Hipomagnezemi tip 1)

Hipomagnezemi tip 1 (OMIM #602014), doğumdan kısa bir süre sonra elektrolit anormalliklerine, yaygın konvülsiyonlara veya artmış nöromusküler uyarılabilirlik belirtilerine neden olan otozomal resesif bir hastalıktır. Bağırsakta ve böbreğin distal kıvrımlı tübülünde magnezyum (Mg) emiliminde rol oynayan geçici reseptör potansiyeli (TRP) katyon kanalları ailesinin bir üyesi olan TRPM6'yı kodlayan *TRPM6* geninde işlev kaybına yol açan mutasyonlardan kaynaklanır. Hastalarda Mg'un intestinal emiliminin bozulması ve renal kaybı görülür. Hipokalseminin, derin hipomagnezemiye ikincil PTH salınımının azalması sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Yüksek doz magnezyum takviyesi ile serum magnezyum konsantrasyonlarının normal değerlere döndürülmesi, magnezyum emilimindeki ve serum kalsiyum konsantrasyonlarındaki belirgin kusuru giderebilir. Tedavi edilmezse; büyüme ve gelişme geriliğine, zihinsel engelliliğe, kardiyak aritmilere ve kalp yetmezliğine yol açabilir. Vakaların çoğunda erken teşhisle komplikasyonlar önlenir (Jain ve ark., 2021; Orphanet: Primary Hypomagnesemia with Secondary Hypocalcemia).



Şekil 2.8: TALH ve DKT'de Mg^{+2} kationlarının reabsorpsiyonunun moleküler transport mekanizmaları (Viering ve ark., 2017).

2.4.3.5 Renal hipomagnezemi 2

İzole dominant hipomagnezemi ve hipokalsiüri (OMIM #154020) olarak da adlandırılan renal hipomagnezemi 2, nadir görülen bir otozomal dominant hastalıktır ve *FXYD2* (*FXYD domain containing ion transport regülatör 2*) genindeki dominant negatif mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Bu mutasyonlar, DKT'nin bazolateral membranında Na^+K^+ -ATPaz γ -alt biriminin taşıma fonksiyonunda bozulmalara yol açar; bu alan, böbreklerde Mg^{+2} aktif geri emiliminin gerçekleştiği ana bölgedir. Hastalarda hipomagnezemi, 0.40 mmol/L seviyelerine kadar düşebilir ve bu durum nöbetlere yol açabilir. *FXYD2* genindeki defekt sonucunda, Na^+K^+ -ATPaz γ -alt biriminin yanlış yönlendirilir ve Mg^{+2} geri emilimi azalır. Hipomagnezemili hastalarda, Henle kulpundaki artmış geri emilim nedeniyle, idrarda kalsiyum atılımının azaldığı gözlemlenmektedir.

HNF1B (*Hepatosit nükleer faktör 1 homeobox B*) transkripsiyon faktörünün, *FXYD2* geninin düzenlenmesinde rol oynadığı ve *HNF1B* patojenik varyantına sahip bireylerin %44'ünde hipomagnezemi, hipermagnezüri ve hipokalsiüri gibi bulguların görüldüğü bildirilmiştir (OMIM #137920). Ayrıca, *hepatosit nükleer faktör 1 homeobox A* (*Dimerization Cofactor of Hepatic Nuclear Factor 1-Alpha*) (*PCBD1*) 'yı kodlayan *PCBD1* genindeki mutasyonlarla da ilişkilendirilmiştir (Bonnardeaux & Bichet, 2016).

2.4.3.6 Otozomal dominant hipomagnezemi

İlk olarak 2009 yılında büyük bir Brezilyalı ailenin 21 üyesinin *KCNA1* geninde bir missense mutasyon tanımlanmış ve bu bireylerde ciddi hipomagnezemi, tetani ve kas krampları saptanmıştır. *KCNA1* geni, böbreklerde DKT'de ve belirli nöronlarda eksprese edilen voltaj kapılı K^+ kanalı olan Kv1.1'i kodlar. DKT'nin lüminal membranı boyunca Kv1.1 kanalının, Mg^{+2} iyonlarına geçirgen katyon kanalı olan TRPM6 ile birlikte yer aldığı bulunmuştur. Kv1.1 aktivitesinin, TRPM6 aracılığıyla aktif Mg^{+2} reabsorpsiyonu için itici gücü belirlediği varsayılmaktadır. Hastalarda serum magnezyum seviyesi düşük olmasına rağmen, kalsiyum ve potasyum düzeyleri ile idrar kalsiyum atılımı normaldir. Erken tanı ve günlük magnezyum replasmanı prognoz açısından kritik öneme sahiptir (Glaudemans ve ark., 2009; Kara, 2022; Van Der Wijst ve ark., 2018; Viering ve ark., 2017).

2.4.3.7 İzole resesif hipomagnezemi (Renal hipomagnezemi 2)

Epidermal büyüme faktörü (*EGF*) genindeki bir mutasyon, nörolojik belirtiler (entellektüel yetersizlik gibi) ile seyreden bir resesif hipomagnezemi formu ile ilişkilendirilmiştir. Bu mutasyon, çıkan kalın henle kulpu ve DKT hücrelerinde pro-EGF sinyalizasyonunu bozarak peritübüler otokrin EGF konsantrasyonunun azalmasına neden olur. Sonrasında, EGF reseptöründen (EGFR) Rac1'in Akt aracılı aktivasyonuna giden sinyal kaskadı kapatılır ve TRPM6'nın apikal yüzeye taşınmasında azalma ile magnezyum transportu azalır. Etkilenen bireylerde ciddi hipomagnezemiye bağlı olarak infantil dönemde nöbetler, zihinsel yetersizlik görülebilir. Diğer elektrolitler genellikle normaldir (Kara, 2022; Viering ve ark., 2017).

2.4.3.8 Diğer hipomagnezemiler

Hipomagnezemi ile ilişkili diğer bozukluklar, heterojen yapıları nedeniyle "diğer hipomagnezemiler" olarak sınıflandırılmıştır. Çıkan kalın henle kulpu, DKT ve beyinde yüksek ekspresyon gösteren Siklin M2'yi kodlayan *CNNM2* genindeki patojenik varyantların, dominant formda "hipomagnezemi (renal hipomagnezemi 6-OMIM #613882)" ve hem dominant hem de resesif formda "hipomagnezemi, nöbetler, zihinsel gelişim yetersizliği 1 (OMIM #616418)" fenotipi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Başlangıçta, *CNNM2*'nin bazolateral Mg^{+2} taşıyıcısı olduğu düşünülmüşse de günümüzde Mg -ATP bağlanmasıyla konformasyonel değişim geçiren ve hücre içi Mg^{+2} sensörü olarak işlev gören bir protein olduğu kabul edilmektedir. Ancak, bu konformasyonel değişikliğin Mg^{+2} taşıma

kapasitesindeki azalmaya nasıl yol açtığı ve nörolojik semptomların kesin temeli belirsizdir (Viering ve ark., 2017).

Ayrıca, katyon transportunda rol alan Na^+K^+ -ATPaz'ın katalitik $\alpha 1$ alt birimini kodlayan *ATP1A1* genindeki monoallelik patojenik varyantı olan bireylerde “hipomagnezemi, nöbetler, zihinsel gelişim yetersizliği 2 (OMIM #618314)” fenotipi bildirilmiştir. Bu hastalarda, infantil dönemde jeneralize nöbetler, şiddetli hipomagnezemi ve renal magnezyum kaybı gözlenmektedir. Nöbetler magnezyum takviyesine rağmen devam eder ve önemli ölçüde bozulmuş entelektüel gelişimle ilişkilidir (Schlingmann ve ark., 2018).

2.4.4 Toplayıcı Kanalların Kalıtsal Hastalıkları

2.4.4.1 Psödohipoaldosteronizm tip 1

Psödohipoaldosteronizm tip I (PHAI), hipotansiyon, hiperkalemi, metabolik asidoz ve infantil dönemde büyüme geriliği ile karakterize nadir bir hastalıktır. PHAI'nin iki alt tipi vardır. Otozomal resesif form, yetişkinlikte devam eden şiddetli belirtilere yol açar ve ENaC'nin α , β , γ alt birimlerini kodlayan *SCNN1A*, *SCNN1B*, *SCNN1G* genlerinden herhangi birinde meydana gelen inaktive edici mutasyonlardan kaynaklanır. Diğer biyolojik özellikler arasında hiponatremi, hiperkalemiye rağmen yüksek plazma ve idrar aldosteron seviyeleri ve yükselmiş plazma renin aktivitesi bulunur. Otozomal dominant form, yaşla birlikte düzelen daha hafif belirtilerle ilişkilidir ve mineralokortikoid reseptörünü kodlayan *NR3C2* genindeki fonksiyon kaybına yol açan varyantlardan kaynaklanır (Bonnardeaux & Bichet, 2016).

PHAI'nin ayırıcı tanısında; aldosteron sentaz eksikliği, konjenital adrenal hiperplazinin tuz kaybı formları ve adrenal hipoplazi konjenita yer alır, bunların hepsi aldosteron eksikliğine neden olur ve hiponatremi, hiperkalemi, hipovolemi, yükselmiş plazma renin aktivitesi gözlenir. Bartter sendromu tip 2 de yenidoğan döneminde benzer (geçici) bir klinik tabloyla ortaya çıkabilir (Bonnardeaux & Bichet, 2016). Ayrıca ENaC cilt ve akciğerlerde de eksprese edildiğinden, OR form PHAI hastalarında bronşların viskoz, yüksek tuz içeren salgıları nedeniyle kistik fibrozis benzeri akciğer hastalığı gelişebilir (Johnson et al., 2023).

2.4.4.2 Liddle sendromu

Liddle sendromu, hipokalemi, hipertansiyon, düşük plazma renin ve aldosteron düzeyleri ile karakterize otozomal dominant bir hastalıktır. Epitelyal Na⁺ kanalının (ENaC), β (*SCNN1B*) veya γ (*SCNN1G*) alt birimlerini kodlayan genlerdeki varyantlar nedeniyle ortaya çıkar. Hastaların çoğunluğu, kanalı membrandan geri almayı engelleyen bir varyanta sahiptir, bu da ENaC aktivitesinin artmasına yol açar. Varyantlar, etkilenen alt birimlerin sitoplazmik C-terminal kuyruğunun kısalmasına neden olur. Toplayıcı kanallardaki Na reabsorpsiyonu, apikal hücre membranında bulunan kanal yoğunluğuna bağlıdır. Kanal yoğunluğu, ENaC'in hücre membranından ubiquitinasyon ve yıkım yoluyla kaldırılmasıyla düzenlenir. Liddle sendromunda, mutasyona uğramış ENaC proteini, bir ubiquitin ligaz proteini olan NEDD4 tarafından tanınmaz; bu nedenle kanallar, hücre membranında uzun süre kalır. Bu durum, artmış sodyum reabsorpsiyonu, hipertansiyon ve hipokalemik alkalozise yol açar. Tedavide hipertansiyona, spironolakton ile yanıt alınamazken, düşük tuzlu diyet ve ENaC antagonistleri (amilorid veya triamteren) fayda sağlar. Benzer fenotipe yol açan “Görüntüde Mineralokortikoid Fazlalığı (*Apparent Mineralocorticoid Excess, AME*)” ve “Glukokortikoid ile Düzeltilebilir Hiperaldosteronizm (*Glucocorticoid-Remediable Aldosteronism, GRA*)”, 11 β -hidroksilaz veya 17 α -hidroksilaz eksiklikleri idrar steroid profilleri ve genetik testlerle ayrılabilir (Johnson, 2023; Bonnardeaux & Bichet, 2016).

2.4.4.3 Distal Renal Tübüler Asidoz

Kalıtsal distal renal tübüler asidoz (dRTA), tip-1 RTA olarak da bilinir ve toplayıcı kanallarda tip A interkale hücrelerin işlev bozukluğundan kaynaklanan otozomal dominant ve resesif formları olan genetik olarak heterojen bir hastalıktır. Genellikle H⁺ ve NH₄⁺ sekresyonunun bozulması sonucu meydana gelir. Bu durum, böbreğin günlük asit yükünü atma yeteneğini azaltarak, ilerleyici H⁺ birikimi ve normal anyon açığı olan hiperkloremik metabolik asidoz ile karakterizedir (Guo ve ark., 2023; Bonnardeaux & Bichet, 2016).

Patofizyoloji

Tip-A interkale hücrelerin bazolateral membranında Cl⁻/HCO₃⁻ değiştiricisi kAE1 (*kidney anion exchanger 1*) eksprese edilir. Bu hücreler idrar asidifikasyonunda temel rol oynar ve lümen H⁺ salgılar. Hücre içinde üretilen HCO₃⁻, kAE1 aracılığıyla periferik kana taşınırken, Cl⁻ hücre içine alınır. Renal tübüllerde H₂O+CO₂ reaksiyonu sonucu üretilen H⁺,

apikal membrandaki H^+ -ATPaz pompası tarafından lümene salgılanır. Toplayıcı kanal hücreleri ve kan arasındaki Cl^-/HCO_3^- değişimine H^+ iyonu ekskresyonu eşlik eder. AE1 proteinini kodlayan *SLC4A1* (*solute carrier family 4, member 1*) genindeki mutasyonlar, H^+ sekresyonu ve HCO_3^- reabsorpsiyonunu bozarak, HCO_3^- 'ın hücreden uzaklaştırılmasını ve Cl^- 'un hücreye taşınmasını önleyebilir. Hücre içi pH dengesinin değişmesi sonucunda dRTA'ya yol açar. *SLC4A1* genindeki mutasyonlar sıklıkla OD-dRTA (OMIM # 179800)'ya neden olmaktadır. Bu gen tarafından kodlanan AE1 proteinin, eritrosit membranında eksprese edilen eAE1 (*erythrocyt anion exchanger 1*) izoformu (band-3 proteini), eritrosit iskelet yapısını koruması ve Cl^-/HCO_3^- iyon değişiminde görev aldığından, biallelik mutasyonlarında hemolitik aneminin eşlik edebildiği OR-dRTA (OMIM # 611590) gözlenir (Guo ve ark., 2023).

ATP6V1B1 (OMIM #267300) ve *ATP6V0A4* (OMIM #602722) genleri sırasıyla vakuoler H^+ -ATPaz pompasının B1 ve a4 alt birimlerini kodlar ve bu alt birimler lümene H^+ sekresyonu ve idrarın asidifikasyonu için gereklidir. B1 ve a4 alt birimleri, böbrekteki tip A interkale hücrelerde, iç kulaktaki lenfatik kesede ve epididimde eksprese edilir ve H^+ -ATPaz pompasının sentezi ve iyon transportunda rol oynar. *ATP6V1B1* ve *ATP6V0A4* genlerinin biallelik mutasyonları, bu pompanın aktivitesini bozarak H^+ sekresyonunu azaltır, idrar asidifikasyonunu engeller ve OR-dRTA formlarına yol açar. Tablo 2.5'te distal RTA etyolojisinde rol alan patojenik varyantların genlere göre oranı ve tespit yöntemi özetlenmiştir (Alexander ve ark., 2025).

Yukarıda belirtilen patojenik gen mutasyonları kalıtsal OR-dRTA hastalarının yaklaşık üçte birinde bulunmaz, bu da tanımlanmamış başka yeni patojenik genler olabileceğini düşündürmektedir. Son yıllarda, OR-dRTA ailelerinde ağırlıklı olarak *FOX11*, *WDR72* ve *ATP6VIC2* genlerinde yeni patojenik varyantlar bildirilmiştir (Guo ve ark., 2023).

Tablo 2.5: Distal RTA etyolojisinde rol alan patojenik varyantların genlere göre oranı ve tespit yöntemi (Alexander ve ark., 2025)

Gen	Genlere göre patojenik varyantların görülme oranı	Patojenik varyantların tespit yöntemine göre dağılımı
<i>ATP6V0A4</i>	%40	Sekans analizi ~%98 Gen-hedefli delesyon/ duplikasyon analizi ~%2
<i>ATP6V1B1</i>	%30	%100 Bildirilmemiş
<i>SLC4A1</i>	%15	>%95
<i>WDR72</i>	Birkaç aile	%100 Bildirilmemiş
<i>FOX11</i>	2 aile	%100 Bildirilmemiş
Bilinmeyen	%15	

Klinik Bulgular

Kalıtsal dRTA'larda, çocukluk çağında hipokalemi, metabolik asidoz, poliüri, polidipsi, büyüme geriliği ile nefrokalsinozis gibi bulgular gözlenir. OR-dRTA genellikle daha erken yaşta ortaya çıkar, daha ağır klinik belirtiler gösterir. Çoğunlukla sensörinöral işitme kaybı *ATP6V1B1* gen mutasyonlarına bağlı daha erken ve ağır ortaya çıkarken, *ATP6V0A4* gen mutasyonlarına bağlı daha hafif ve geç dönemde eşlik eder. Buna karşılık OD-dRTA, genellikle ergenlik sonrasında başlar ve daha hafif bir klinik tablo sergiler. Hiperkalsiüri, hipofosfatüri, düşük sitrat atılımı ve alkali idrar pH'ı gibi laboratuvar bulguları, böbrek taşı oluşumu ve kemik mineralizasyon bozuklukları (osteomalazi, raşitizm) açısından risk oluşturur. Genotip-fenotip ilişkileri, hastalığın şiddeti, sistemik etkileri ve işitme kaybı gibi komplikasyonların öngörülmesinde kritik öneme sahiptir (Guo ve ark., 2023).

Tedavi

Distal RTA'nın tedavisinde, metabolik asidoz ve hipokalemiyi düzeltmek, büyüme geriliği ve nefrokalsinozis gibi kronik komplikasyonları önlemek amacıyla potasyum sitrat gibi oral alkali tedavi ile asit-baz dengesi sağlanır (Guo ve ark., 2023).

2.4.4.4 Kalıtsal Miks Renal Tübüler Asidoz (Tip III RTA)

Normal anyon açıklı hiperkloremik metabolik asidoz, hipokalemi, idrarda asit ve NH_4^+ atılımının azalması ve HCO_3^- geri emiliminde azalma gibi hem dRTA hem de pRTA

klirik belirtileri gözlenir. Karbonik anhidraz II enzimini kodlayan *CAII* genindeki biallelik patojenik varyantlara bağlı gelişir; bu gen böbrek (hem proksimal hem de distal tübül sitozolünde), kemik ve beyinde eksprese olur. Bu nedenle osteopetrozis, serebral kalsifikasyonlar ve zihinsel yetersizlik eşlik edebilir. Osteopetrozis, osteokast disfonksiyonuna bağlı artmış kemik dansitesi ve frajilitesi ile karakterizedir; aşırı kemik büyümesi işitme kaybı ve optik sinir basısına yol açabilir (Guo ve ark., 2023; Zelikovic, 2019).

2.4.4.5 Nefrojenik diyabetes insipidus

Nefrojenik Diabetes İnsidus (NDI); böbreklerin, antidiüretik hormon olan arginin vazopressine (AVP) yanıt verememesi sonucunda oluşan, idrarı konsantre edememesi ile karakterize, sıklıkla kalıtsal bir hastalıktır. Klinik bulgular arasında poliüri, polidipsi, hipernatremi, hipostenüri, çocuklarda gelişme geriliği ve dehidratasyon ataklarına bağlı nörolojik sekeller yer alır. Klinik tanı, su kısıtlama testi sonrası desmopressine yanıtız düşük dansiteli idrarla doğrulanır (Zelikovic, 2019).

NDI'nin patofizyolojisinde, toplayıcı kanaldaki esas (*principal*) hücrelerin apikal yüzeyinde bulunan ve filtrelenen hacmin %10'unu reabsorbe eden, vazopressin duyarlı aquaporin-2 (AQP2) su kanalları kilit rol oynar. Vazopressin, bazolateral membranda bulunan V2 (Vazopressin tip 2) reseptörüne bağlanarak G proteini (Gs) aktive eder ve hücre içi cAMP düzeylerini artırır, bu da AQP2'nin apikal membrana taşınmasını sağlayarak suyun geri emilimini mümkün kılar. AVP'nin reseptöründen ayrılması üzerine, AQP2 kanalları, endositoz yoluyla geri hücre içine taşınır ve hücre suya geçirimsiz duruma döner. Genetik olarak en yaygın form (%90), X'e bağlı resesif kalıtılan, *AVPR2* (*Arginine Vasopressin Receptor 2*) genindeki patojenik varyantlardan kaynaklanır. Bu varyantlar genellikle işlevseldir, ancak reseptörün endoplazmik retikulumda sıkışıp kalmasına ve plazma membranına ulaşamamasına neden olur. Daha nadir olarak (%10) görülen otozomal resesif veya dominant formlar ise *AQP2* genindeki patojenik varyantlara bağlıdır; bu varyantlar proteinin yanlış katlanmasına veya hücre içi taşınımının bozulmasına neden olur (Zelikovic, 2019).

Tedavide sıvı kaybının telafisi, sodyum ve protein kısıtlaması, diüretik tedaviler (tiyazid, amilorid) ve bazı vakalarda indometazin kullanılır. Ayrıca, V2 reseptör ve AQP2'nin doğru katlanmasını sağlayan farmakolojik şaperonlar ile AVP'den bağımsız

cAMP üretimini artırmaya yönelik yeni tedavi yaklaşımları üzerinde çalışmalar devam etmektedir (Zelikovic, 2019).

2.4.4.6 Uygunsuz antidiürez nefrojenik sendromu

AVPR2 geninde işlev kazancına yol açan yanlış anlamlı mutasyonlar (ör. R137C/L) V2 reseptörünün yapısal aktivasyonuna yol açarak, hiponatremi ve konsantre idrarla seyreden, uygunsuz antidiürez nefrojenik sendromuna (*NSIAD; nephrogenic syndrome of inappropriate diuresis*) neden olur. X'e bağlı resesif kalıtılan nadir bir durumdur. Klinik ve laboratuvar bulguları uygunsuz ADH sendromuna benzer. Ancak, NSIAD'daki mutasyonlar plazma vazopressin düzeyleri düşük olmasına rağmen antidiüretik etki oluşturur (Zelikovic, 2019).

NDI ve NSIAD kalıtsal tübüler hastalıklar arasında yer almasına rağmen, bu ön tanı ile yönlendirilen hastalara, laboratuvarımızda sadece *AVPR2* ve *AQP2* genlerini içeren YND paneli çalışıldığı için çalışmaya dahil edilmedi.

2.5 Genetik Varyasyon Çeşitleri

Genetik materyalde meydana gelen ve yeni allellerin oluşumuna yol açan kalıcı değişimler, "genetik varyasyon" olarak tanımlanır. DNA dizilimindeki bireyler arası farklılıkların belirlenmesinde doğru analiz yöntemini seçebilmek için, insan genomunun yapısal özellikleri ve varyasyon çeşitlerinin iyi anlaşılması gereklidir. İnsan genomunun %1,5'lik kısmı protein kodlayan genlerden oluşmaktadır, yaklaşık üçte ikisi ise tekrarlayan sekanslardan meydana gelir. Varyasyonların büyük bir bölümü protein kodlamayan geniş genomik alanlarda bulunsa da fonksiyonel etkiye sahip varyasyonlar çoğunlukla protein kodlayan bölgelerde yoğunlaşmaktadır.

İnsan genomundaki varyasyonlar, yapısal ve yapısal olmayan varyantlar şeklinde iki ana kategoride incelenebilir. Yapısal varyantlar; 50 baz çiftinden büyük tüm genomik değişiklikleri ifade eder ve dozaj etkisine göre kopya nötral/dengeli değişiklikler (inversiyonlar, dengeli translokasyonlar) ve kopya nötral olmayan/dengesiz değişiklikler (delesyon, insersiyon, duplikasyon) yani kopya sayısı varyantları (CNV) olarak iki grupta sınıflandırılır. Yapısal olmayan varyantlar ise tek nükleotid değişikliklerini (SNV; *Single Nucleotide Variation*) ve 2-50 baz çifti boyutundaki genomik değişiklikleri (kısa insersiyonlar, delesyonlar, duplikasyonlar, kısa ardışık tekrarlar) içerir. Yapısal olmayan varyantların çoğunluğu yeni nesil dizileme teknolojisi ile saptanabilmektedir (Guan & Sung,

2016; Pavlopoulos ve ark., 2013). Söz konusu dizi varyantları, uluslararası standartları belirleyen İnsan Genomu Varyasyon Topluluğu (*Human Genome Variation Society; HGVS*) tarafından sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırmaya göre:

Yanlış anlamlı (missense) varyantlar: Tek nükleotid değişikliği (SNV) sonucu bir kodonun anlamı değişerek farklı bir amino asidin sentezlenmesine neden olan varyasyonlardır.

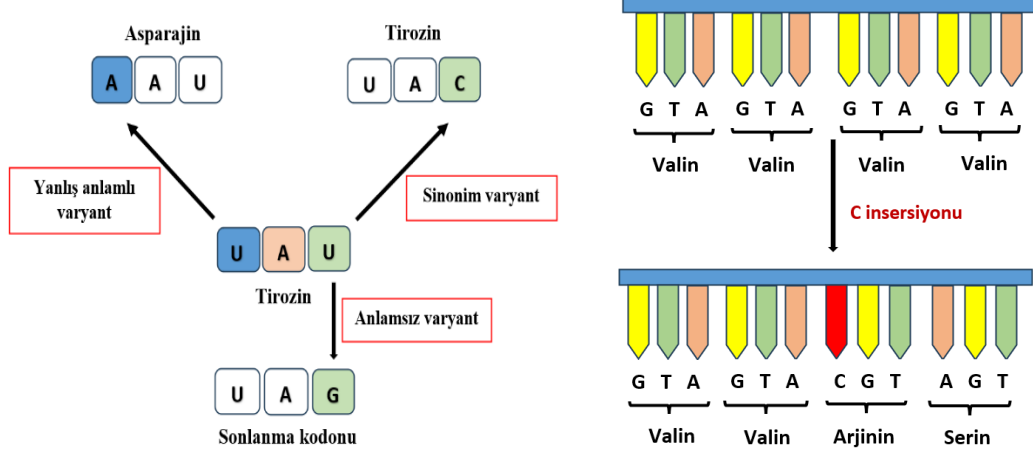
Sinonim (sessiz) varyantlar: Protein dizisinde herhangi bir değişikliğe yol açmadan, aynı amino asidi kodlayan farklı bir kodon oluşturan tek nükleotid değişimleridir.

Anlamsız (nonsense) varyantlar: Nükleotid değişimi sonucu erken bir stop (sonlanma) kodonunun oluşmasına ve protein sentezinin tamamlanamadan kesilmesine sebep olan varyantlardır.

Splice bölge varyantları: Ekzon-intron geçiş bölgelerinde yer alan ve RNA işlenmesi (*splicing*) sürecini bozan genomik değişikliklerdir. Bu varyantlar, transkripsiyon sonrasında intronların çıkarılmamasına veya ekzon kayıplarına yol açarak anormal mRNA transkriptlerinin oluşmasına neden olabilmektedir.

İnseriyon/Delesyon (Indel) varyantları: DNA dizisine 1-50 nükleotidlik eklenme (*insersiyon*) veya silinmelerle (*delesyon*) karakterize edilen varyasyonlardır. Eğer eklenen veya silinen baz sayısı üçün katı değilse, okuma çerçevesi kayması (*frameshift*) meydana gelir. Bu durum, varyant sonrasındaki kodonların yanlış okunmasına, protein yapısının ve uzunluğunun değişmesine sebep olur (den Dunnen ve ark., 2016).

Bahsedilen yapısal olmayan varyasyon tipleri, güncel DNA dizileme teknolojileri kullanılarak tespit edilebilmektedir.



Şekil 2.9: Tek nükleotid değişimlerinin oluşturduğu varyantların şematik gösterimi (solda; yanlış anlamlı, sinonim, anlamsız varyant, sağda; insersiyona bağlı çerçeve kayması oluşumu).

2.6 Kalıtsal Tübülopatilerin Moleküler Tanısında Yeni Nesil Dizileme

DNA dizileme yöntemlerinin temelini, birinci nesil yöntemler olan dideoksi sentezine dayanan Sanger ve DNA'nın kimyasal modifikasyonuna dayanan Maxam-Gilbert yöntemleri oluşturur. Maxam-Gilbert tekniği, uygulama zorluğu ve toksik reaktifler içermesi, kısa okuma uzunluğu (maksimum 100 baz çifti) nedeniyle zamanla yerini altın standart olarak kabul edilen Sanger dizileme tekniğine bırakmıştır (Duman & Tekin, 2024; Slatko ve ark., 2018). 1977 yılında geliştirilen Sanger dizileme tekniğinde, 3'OH grubu bulunmayan özel zincir sonlandırıcı nükleotidler (dideoksinüklotidler, ddNTP'ler) kullanılır. Bu nedenle DNA polimeraz tarafından bir fosfodiester bağı oluşturulamaz ve DNA zincirinin büyümesi o noktada sonlanır. ddNTP'ler, radyoaktif veya floresan işaretli olarak "dizileme" jellerinde veya otomatik dizileme cihazlarında tespit edilir. Otomatize sistemlerdeki elektroforez basamağı ile zincir uzunluklarının ayrılabilmesi sonucunda, genomda spesifik olarak hedeflenen 600-1000 baz uzunluğundaki bölgenin yüksek doğruluklu dizilemesi sağlanır (Slatko ve ark., 2018). Sanger dizileme yönteminin; okuma uzunluğunun kısalığı, işgücü-yoğun olması, yüksek maliyet gerektirmesi, analiz zorluğu gibi kısıtlılıkları nedeniyle yeni metodolojilere ihtiyaç duyulmuştur (Duman & Tekin, 2024; Morey ve ark., 2013). Böylece, ikinci ve üçüncü nesil dizileme teknolojileri ortaya çıkmıştır ve geliştirilmeye devam etmektedir (Duman & Tekin, 2024).

İnsan Genom Projesi'nin 2003'te tamamlanmasını takiben, daha hızlı, ekonomik ve yüksek verimli dizileme tekniklerinin geliştirilmesi bilimsel öncelik haline gelmiştir. Bu sürecin bir ürünü olarak 2005'te uygulamaya giren masif paralel dizileme olarak da adlandırılan Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojisi, genetik araştırmalarda verimlilik, analiz

hızı ve maliyet etkinliği bakımından devrimsel bir atılım sağlamıştır (Green ve ark., 2015; Shendure & Ji, 2008). NGS, toplam boyutu 1 milyon baz çiftinden daha büyük olan bir DNA molekülünün dizisinin tek bir testte belirlenmesine olanak tanıyan ikinci nesil dizileme teknolojisidir. Klinik açıdan bakıldığında NGS'nin önemli özelliği, tek bir testte yüzlerce/binlerce genin, hatta bütün bir genomun dizilenebilmesidir (Płoski, 2016). Derin dizileme olarak da bilinen bu yöntem ile nükleotidler birçok kez okunarak, yüksek kaplamalı dizilenir. Bu teknoloji, genetik etiyojiye sahip hastalıkların tanısında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Renkema ve ark., 2014).

İkinci nesil dizileme teknolojileri, hibridizasyona dayalı dizileme ve senteze dayalı dizileme (SBS; *sequencing by synthesis*) olarak iki ana kategoriye ayrılır. Hibridizasyona dayalı yöntem, bilinen dizilime sahip DNA oligonükleotidlerinin filtreler üzerine dizilmesi ve ardından işaretlenmiş DNA fragmanlarının bu filtrelerle hibridizasyonu temeline dayanır. Bu yöntem ile bilinen gende hastalık ilişkili tek nükleoid polimorfizmleri (SNP; *single nucleotide polymorphism*) ve büyük kromozom anomalileri (delesyon, duplikasyon, kopya sayısı varyantları vd.) saptanabilir. SBS yöntemleri, dideoksi sonlandırıcılar olmaksızın, sentez, görüntüleme ve uzayan zincire ilave nükleotidler ekleme yöntemlerinin tekrarlanmasına dayanan Sanger dizilemenin daha da geliştirilmiş halidir. Günümüzde, biyokimyasal mekanizmaları değişkenlik gösteren çeşitli NGS platformları bulunmaktadır. Bu platformlardaki temel yaklaşım benzerdir ve tipik olarak DNA izolasyonu sonrası, DNA'nın fragmanlara (parçalara) ayrılıp kütüphane hazırlığı ile başlar. Takip eden aşamalarda; fragmanların uçlarına tanıma bölgelerini taşıyan moleküler barkodların (adaptör) ligasyonu, fragmanların sinyal yoğunluğunu arttırmak için hedef zenginleştirme protokolleri uygulanması ve örneklerin otomatik cihazlara yüklenerek dizilmesi gerçekleştirilir (Duman & Tekin, 2024; Slatko ve ark., 2018).

Yeni nesil dizileme platformları, tanısal ve araştırma amaçlı olarak; hedeflenmiş genom dizileme (gen panelleri), klinik ekzom dizileme (*CES-clinical exome sequencing*), tüm ekzom dizileme (*WES-whole exome sequencing*), epigenomik çalışmalar (Metilasyon-seq, ChIP-seq) ve transkriptom analizleri (RNA sekanslama) gibi çeşitli alanlarda uygulamaya girmiştir. Yüksek verimli gen paneli dizilemesinin kullanıma sunulması, genetik olarak heterojen hastalıklar için aynı anda birden fazla genin analizini mümkün kılar ve atipik klinik prezentasyonu olan hastalarda doğru tanıya olanak tanır (Hureaux ve ark., 2019; Knoers ve ark., 2022). Nefrogenetik alanındaki tanılarda ve DNA çalışmalarında,

renal homeostazı düzenleyen genler ve ilişkili yolakların paralel analizlerinde özellikle NGS'den yararlanılmıştır (Renkema ve ark., 2014).

Birçok renal tübüler hastalık genetik olarak heterojen olduğundan (örn. Fanconi sendromu, Bartter sendromu, distal renal tübüler asidoz ve hiperkalsemi) ve hastalığın gelişimi sırasında semptomlar örtüşebildiğinden, mümkün olduğunca hedefe yönelik fenotiple ilişkili gen panelleri veya hedefli ekzom bazlı dizileme panelleri ile genetik tanının doğrulanması önerilmektedir. Klinik olarak tübülopati ön tanısı alan hastalarda genetik test, klinik yönetim, prognoz tayini, taşıyıcı bireylerin tespiti açısından da yüksek öneme sahiptir. Bazı herediter renal tübüler hastalık taşıyıcıları ilerleyen dönemlerde hiperkalsiüri, nefrokalsinoz gibi semptomlar geliştirebileceğinden, potansiyel böbrek donörü olan bu bireylerin asemptomatik dönemde taşıyıcılıklarının belirlenerek uygun olmayan böbrek transplantasyonunun önüne geçilmesinde genetik testler oldukça kıymetlidir. Genetik danışma ile herediter tübülopatili aileler için gelecekteki gebeliklerin tübüler hastalık taşıma riski belirlenebilmekte ve gerektiğinde prenatal veya preimplantasyon testlere ilişkin bilgiler verilebilmektedir (Knoers ve ark., 2022). Kalıtsal tübülopatilerde genetik tanının hız kazanmasıyla birlikte, nedene yönelik gen tedavisi gereksinimi artmakta olup, bu alanda özellikle proksimal tübüler hastalıklar olmak üzere çeşitli tübülopatiler için yeni tedavi yaklaşımları aktif olarak araştırılmaktadır (Joung & Cho, 2023).

Bu çalışmada, renal tübüler hastalık klinik ön tanısı ile Tıbbi Genetik Polikliniği'ne yönlendirilen ve Yeni Nesil Dizileme (NGS) yöntemi kullanılarak "Kalıtsal Renal Tübüler Hastalık Paneli" ile DNA dizi analizi gerçekleştirilen hastalar retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmanın amacı, kalıtsal tübülopatilerin tanısında hedeflenmiş gen panelleri aracılığıyla uygulanan NGS yönteminin; invaziv olmayan, hızlı ve maliyet açısından uygun bir tanı aracı olarak etkinliğini ortaya koymak ve ayrıca saptanan genetik varyantlar doğrultusunda genotip-fenotip ilişkisini irdeleyerek literatüre katkı sağlamaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırma retrospektif şekilde tasarlanmış tanımlayıcı klinik bir çalışmadır.

3.2 Araştırma Bölgesi ve Zamanı

Araştırma 2019-2023 yılları arasında Konya bölgesi ve çevre illerden Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi (NEUTF) 'ne başvuran hastaları içermektedir.

3.3 Araştırma Evreni ve Yeri

Araştırma NEUTF Pediatri Klinikleri ve Dâhiliye Anabilim Dalı Nefroloji Kliniğinde kalıtsal tübüler hastalık ön tanısı ile takip edilen ve bu klinik tablonun moleküler nedeninin anlaşılabilmesi ve net tanı koyulabilmesi amacıyla NEUTF Tıbbi Genetik polikliniğine yönlendirilen hastalardan oluşmaktadır. Çalışma basamakları, NEUTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

3.4 Örneklem Seçme Kriterleri

Çalışmamızda, 2019 ile 2023 yılları arasında NEUTF Hastanesi Tıbbi Genetik Bölümü'ne renal tübüler hastalık ön tanısı ve/veya ilintili şikâyetleriyle başvurmuş ve ön değerlendirmeden geçirildikten sonra Kalıtsal Renal Tübüler Hastalıklara yönelik genetik araştırma gerekli görülen 56 hasta değerlendirilmiştir. Bunlar arasından, aşağıda belirtilen dâhil etme ve dışlama kriterlerine göre seçilen 26 hastaya genotip fenotip korelasyonu, tespit edilen varyantlar ve hastaların kliniğini bir arada değerlendirerek yapılmıştır (Şekil 3.1). Ek olarak, hastalarda saptanan varyantların aile içi segregasyonunu ve de novo olup olmadığını değerlendirmek için hastaların ebeveynlerine uygulanan, Sanger dizileme veya hedefe yönelik NGS analizi verilerinin retrospektif taraması yapılmıştır.

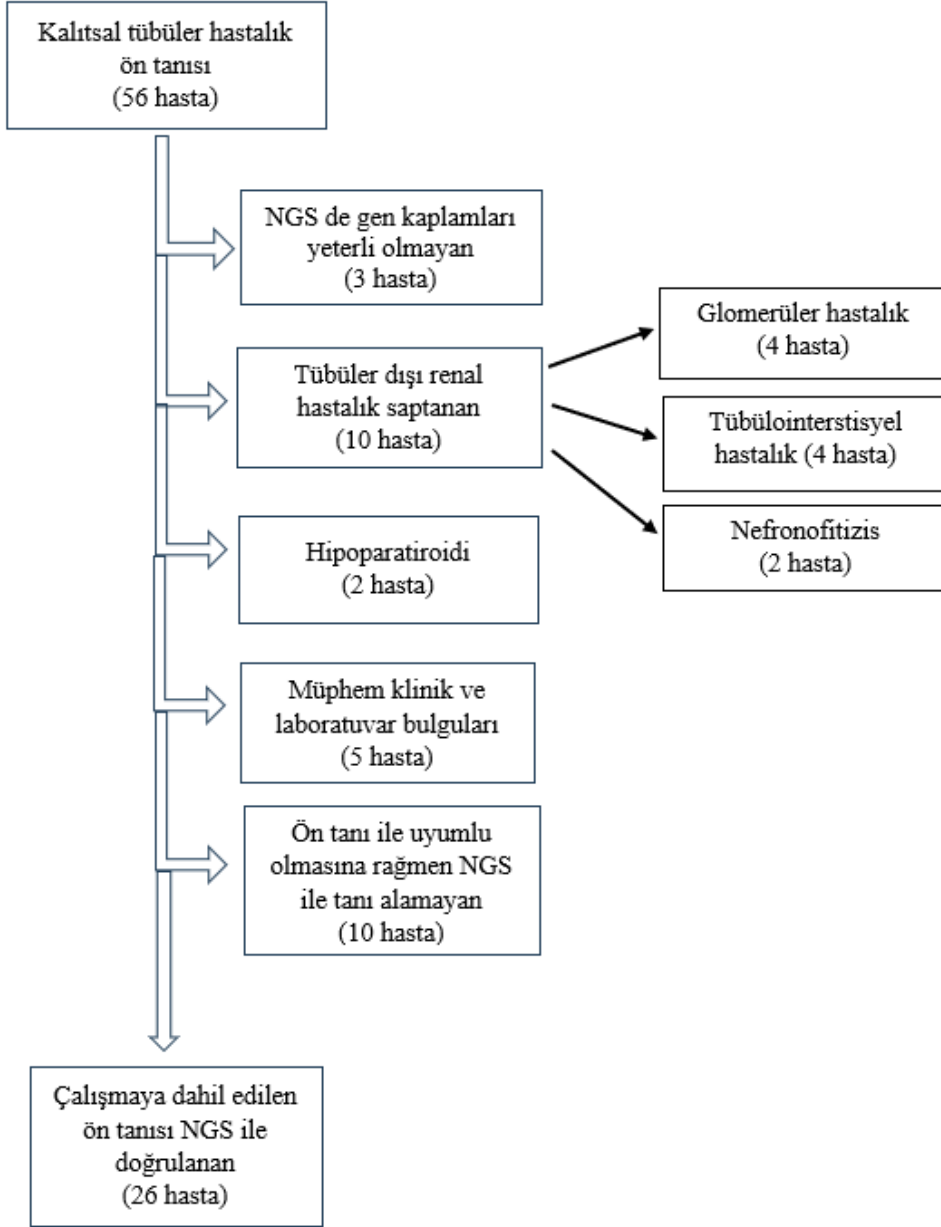
Çalışma grubuna dahil etme kriterleri

- Klinik olarak renal tübüler hastalık ön tanısı almış olması
- Primer renal tübüler hastalık olmasa da, renal tübüleri etkileyebilecek kalsiyum metabolizması bozukluğu ön tanısı almış olması (örn; familial hipokalsiürik hiperkalsemi)
- Genetik test için aydınlatılmış onam alınmış olması

- Yapılan analizde patojenik, olası patojenik ve önemi bilinmeyen varyant tespit edilmiş olması
- Tespit edilen varyantlar ile klinik bulgular arasında korelasyon gözlenmesi

Çalışma grubundan dışlama kriterleri

- Klinik olarak tübüler hastalık dışındaki diğer renal hastalık tanılarını almış olması (Örn: Alport sendromu, Polikistik böbrek hastalığı vd.)
- Genetik test için aydınlatılmış onam alınamamış olması
- Yapılan analizde literatürle uyumlu benign ve olası benign varyant tespit edilmiş olması
- Tespit edilen varyantlar ile klinik bulgular arasında korelasyon sağlanamaması



Şekil 3.1: Örneklem seçme kriterlerine göre çalışma grubunu gösteren akış şeması.

3.5 Araştırmanın İzni ve Etik Durum

NEÜTF etik kuruluna araştırma öncesinde gerekli belgeler sunulmuş ve araştırmamız 05.01.2024 tarihli 2024/4733 sayılı kararla etik kurul onayı almıştır (Ek-1).

3.6 Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Grubuna Uygulanmış Olan Yöntemler

Bu çalışmada, hastalara daha önce moleküler tanı testi olarak NGS yöntemi uygulanmış olan hastaların Hereditör Renal Tübüler Hastalıklar DNA Dizi Analizi verileri retrospektif olarak incelenerek, yeniden analiz edildi. Ayrıca, hastalara ait anabilim dalımız arşivinde bulunan hasta dosya bilgileri, prenatal, natal ve postnatal tıbbi öyküleri, çizilen aile

ağacı, ailede renal hastalık öyküleri, fizik muayene ve laboratuvar bulguları sonuçları retrospektif olarak incelendi. İncelenen 26 hastanın; dokuzunda kalıtsal tübülopatilerin tanı ve ayırıcı tanısına yönelik 45 geni içeren Illumina Miniseq platformunda (Illumina, San Diego, Kaliforniya, ABD) tasarlanmış hedefli NGS kiti (Celemics Tubular Disorders Kit) (Tablo 3.1), on yedisinde MGI DNBSEQ platformunda (MGI Tech Co., Ltd, Shenzhen, Çin) 3300 geni içeren herediter hastalıkları hedefleyen NGS kiti (KAPA HyperCap Heredity Panel) çalışılmıştı. MGI DNBSEQ platformunda çalışılan hastalara analiz esnasında kalıtsal tübülopatilerin tanısına yönelik Tablo 3.2'deki 55 geni içeren gen seti filtresi uygulanmıştı. Kullanılan bu iki yöntemde de, çalışmaya dahil olan hastaların periferik venöz kanlarından yaklaşık 4 ml alınarak DNA izolasyonu yapılmıştı. Yöntemlerdeki ıslak laboratuvar basamaklarınının (*wet-lab*) bazı aşamaları farklılık gösterebilmektedir.

Tablo 3.1: *Celemics Tubular Disorders* kit içeriğinde yer alan kalıtsal tübülopatiler ve ayırıcı tanıda yer alan hastalıklar ile ilişkilendirilmiş genler.

SLC12A1, KCNJI, BSND, CLCNKA, CLCNKB, SLC12A3, MAGED2, CTNS, CLCN5, CLCN1, OCRL1, ATP6V0A4, ATP6V1B1, SLC4A1, CA2, CLDN19, CLDN16, CNNM2, EGF, FXYD2, RET, WNT11, GDNF, WTI, EYA1, PAX2, CD2AP, ANLN, CRB2, PAX2, TRPC6, INF2, MYO1E, ACTN4, APOL1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, MYH9, SLC12A3, SCNN1B, SCNN1G, CASR, GNA11, AP2S1

Tablo 3.2: *KAPA HyperCap Heredity Panel* çalışılan hastalarda kalıtsal tübülopatiler gen seti filtresine dahil edilen genler

AQP2, AVPR2, AP2S1, ATP1A1, ATP6V1B1, ATP6V0A4, BSND, CA2, CASR, CLCN5, CLCNKA, CLCNKB, CLDN16, CLDN19, CNNM2, CUL3, CYP11B1, CYP11B2, GNA11, EGF, EGFR, FXYD2, GATM, GNAS, HNF4A, HNF1B, HSD11B2, KCNA1, KCNJI, KCNJ10, KLHL3, MAGED2, NR3C2, OCRL, PCBD1, PHEX, SCNN1A, SCNN1B, SCNN1G, SLC2A2, SLC3A1, SLC4A1, SLC6A19, SLC6A20, SLC7A7, SLC7A9, SLC12A1, SLC12A3, SLC34A1, SLC34A3, SLC36A2, TRPM6, WDR72, WNK1, WNK4

Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Kullanılan Cihazlar

- Yeni Nesil Dizileme cihazı (İllumina Miniseq, MGI DNBSEQ-G400RS)

- PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) cihazı (Thermo Fisher Scientific SimpliAmp Thermal Cycler)
- Mikrosantrifüj (Biosan)
- 4°C buzdolabı (Finlux)
- -20°C soğutucu (Regal®)
- -80°C soğutucu (New Brunswick U570)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop 2000)
- Qubit™ 4 Fluorometre (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)
- Otomatik mikropipetler (Eppendorf)
- Vorteks tüp karıştırıcı (MX-F, Dragon Lab)
- Kuru ısı bloğu
- Rotatör-Mikrosantrifüj Karıştırıcı (Combi-Spin FVL-2400N, Biosan)
- Mikroplaka santrifüj (LSC2100, QLAB)
- Kronometre
- Bilgisayar

Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler

- DNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics High Pure PCR Template Preparation Kit)
- Yeni nesil dizileme kiti (Celegics Tubular Disorders Kit, KAPA HyperCap Heredity Panel)
- KAPA kütüphane hazırlık karışımı (Roche, KAPA HyperPlus kit, Cape Town, Güney Afrika)
- Saflaştırma boncukları (KAPA HyperPure Bead, Cape Town, Güney Afrika)
- Hibridizasyon reaksiyonu karışımı (KAPA HyperCapture Reagent Kit, Roche Sequencing Solutions, Inc. Santa Clara, CA USA).
- İzopropanol
- %80'lik etanol
- PZR kartuşu
- Steril, filtreli ve filtresiz geniş uçlu pipet uçları
- Çok kanallı pipet: Axypet® 8 kanallı pipet
- Filtre tüpü

- Toplama tüpleri
- Eppendorf tüpleri
- ddH₂O, nükleaz içermeyen saf, steril su
- Manyetik stand (Mıknatıslı ayrıştırıcı) (DynaMag, Thermo Fisher Scientific)

DNA İzolasyonu ve Kalitesinin Ölçümü

Periferik kan numunelerinden manuel DNA izolasyonu, High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, ABD) ticari kiti (Tablo 3.3) kullanılarak aşağıdaki protokol ile yapıldı.

Tablo 3.3: DNA izolasyon kiti içeriği.

Kit içeriği	Kullanılan miktar (her bir numune için)
Bağlama tamponu	200 µl
Liyofilize Proteinaz K	40 µl
İnhibitör uzaklaştırma tamponu	500 µl
Yıkama tamponu	1000 µl
Elüsyon tamponu	40 µl

- I. 200 µl hasta periferik kan numuneleri, 200 µl bağlama tamponu (*Binding Buffer*) ve 40 µl proteinaz K; 1,5 ml'lik PZR tüplerine eklendi.
- II. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- III. Karışıma 100 µl İzopropanol eklendi, ardından toplama tüpünün içine yerleştirilmiş filtrelili tüplere aktarıldı ve 1 dk boyunca 8000 g'de santrifüje tabi tutuldu.
- IV. Santrifüjü takiben, tüplerin altında kalan süzölmüş sıvı uzaklaştırıldı ve filtrelili tüplerdeki karışım yeni tüplere aktarıldı.
- V. Her tüpe 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon (*Inhibitor Removal Buffer*) eklenip 8000 g'de 1 dk. santrifüj uygulandı.
- VI. Filtre tüpü, toplama tüpünden alındı. Toplama tüpü kalan süzölmüş sıvıyla birlikte atıldı. Filtre tüpü yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi ve 500 µl yıkama tamponu (*Wash Buffer*) ilave edildi.
- VII. Karışım, 1 dk boyunca 8.000 g'de santrifüj edildi. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı.

- VIII. 13000 g'de 10 sn santrifüje tabi tutuldu ve toplama tüpünde kalan süzölmüş sıvı atıldı.
- IX. Filtre tüpü, 1,5 ml'lik steril, nükleaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve 70 °C'de ısıtılmış 40 µl elüsyon tamponu (*Elution Buffer*) eklendi. 1 dk 8.000 g'de santrifüj edildi.
- X. Nihai DNA, tüplerin alt kısmında elde edildi. İzole edilen DNA örneklerinin kantifikasyonu ve kalite kontrolü Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Oregon USA) ve Qubit™ 4 Fluorometre (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) cihazı kullanılarak fluorometrik yöntemle ölçüm yapıldı. Uygun kalitedeki örneklerde, 50 ng/µl'nin üzerinde ölçüm saptandı.

3.6.1 Yeni Nesil DNA Dizi Analizi

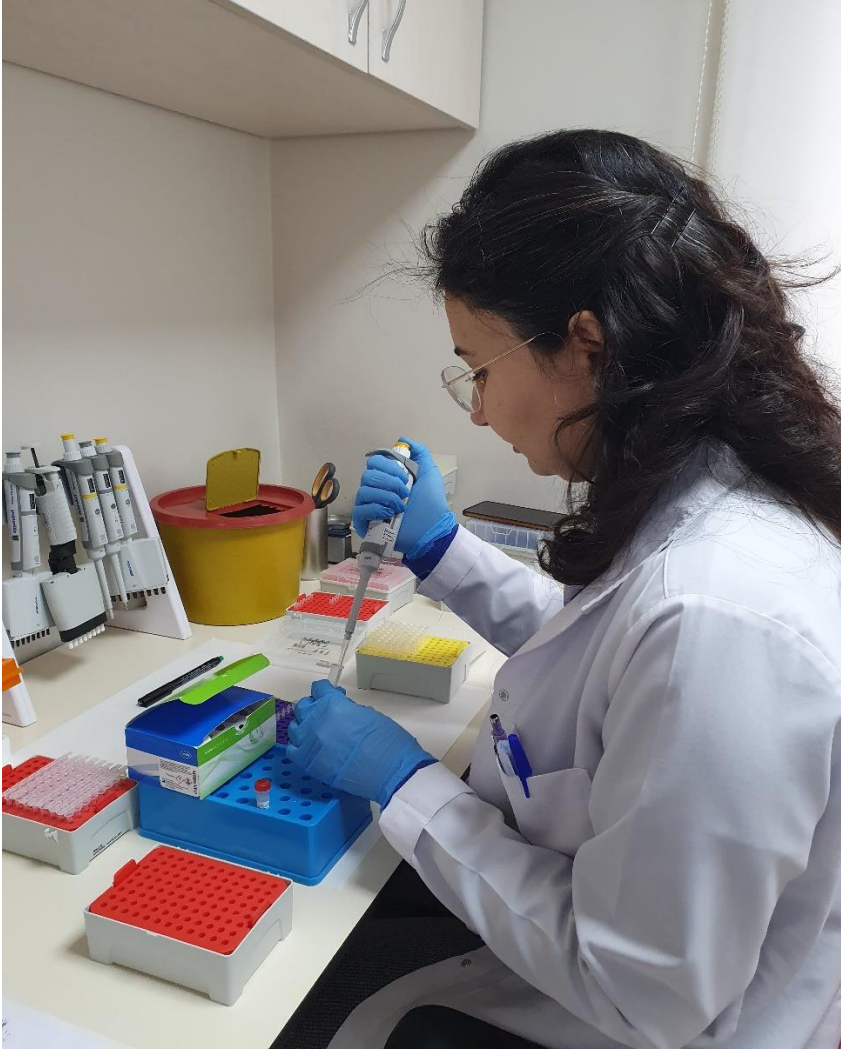
3.6.1.1 Kütüphane Hazırlığı

DNA Fragmentasyonu

50 ng konsantrasyondaki 25 µl g-DNA örneğinden 17,5 µl alınarak üzerine, 7,5 µl fragmentasyon miksi (2,5 µl fragmentasyon tamponu ve 5 µl fragmentaz enzimi içerir-Roche, KAPA HyperPlus kit, Cape Town, Güney Afrika) eklenip, soğuk blok üzerinde pipetaj yapılarak karıştırıldı. PZR'nin gerçekleştirildiği termal döngü programının ilk basamağı olan 4°C'ye gelinceye kadar örnekler, buz bloğu üzerinde bekletildi ve sonrasında örnekler PZR cihazına (Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific) yüklendi. 37°C'da 25 dakika inkübe edildi ve ikinci basamak 4°C'de sonlandı.

Uç Tamiri ve A-Tailing

3,5 µl uç tamiri-A-tailing tamponu ve 1,5 µl uç tamiri-A-tailing enzimi (Roche, KAPA HyperPlus kit, Cape Town, Güney Afrika) içeren 5 µl'lik karışım oluşturuldu (Şekil 3.2). 25 µl fragmente DNA içeren numunelerin üzerine 5'er µl uç tamiri-A-tailing karışımı eklenip, buz bloğu üzerinde pipetaj sayesinde karıştırıldı. Tüplere vorteks ve kısa spin işlemi uygulandıktan sonra PZR cihazına yerleştirildi. 65°C'de 30 dk'dan oluşan bir termal döngü uygulandı. 4°C'de PZR bittiğinde tüpler buz standına alındı. Uç tamiri gerçekleştirilmiş ve 3' ucuna Adenin bazı eklenmiş 30 µl numune elde edildi.



Şekil 3.2: Uç Tamiri ve A-Tailing karışımının hazırlanması.

Adaptör Ligasyonu

Uç tamiri ve A-tailing yapılmış DNA numunelerinin üzerine, her tüpe 2,5 µl olacak şekilde MGIEasy DNA Adapter (Roche, KAPA HyperPlus kit, Cape Town, Güney Afrika) eklendi ve pipetaj yapıldı. Daha sonra 20 µl ligasyon reaksiyon karışımı (15 µl KAPA ligasyon tamponu ve 5 µl KAPA DNA ligaz enzimi) eklenip, tüplere pipetaj yapıldı. Numunelere vorteks ve kısa spin işlemi uygulandıktan sonra termal döngü cihazına yerleştirildi. 20°C’de 30 dk boyunca inkübe edildi. Reaksiyon 4°C’de sonlandırılarak, tüpler standı alındı ve saflaştırma basamağına geçildi. Adaptör numaraları, hasta bilgilerini içeren Excel dosyasına kaydedildi. **Saflaştırma**

- I. Adaptör ligasyonu tamamlanmış DNA üzerine oda sıcaklığında bulunan saflaştırma boncuklarından (KAPA HyperPure Bead, Cape Town, Güney Afrika)

44 µl eklenerek, fragmentasyon sonrası boyut seçimi (*size selection*) aşamasına geçildi.

- II. Her bir tüpte toplam hacim 96,5 µl'ye ulaştı, çok sayıda pipetaj yapıldı ve homojen karışım elde edildi.
- III. Numuneler 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra, manyetik stand üzerine alındı ve 3-5 dk da saflaştırma boncuklarının pelet oluşturması için (süpernatantta berrak görünüm oluşana kadar) bekletildi.
- IV. Tüplerde oluşan süpernatant mikropipet yardımıyla alınarak atıldı.
- V. Her bir tüpe 100'er µl %80'lik etanol eklenip, 30 saniye bekledikten sonra, etanol tüplerden uzaklaştırıldı.
- VI. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı ve tüpler manyetik stand üzerindeki oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- VII. Ardından, numuneler manyetik standdan alınıp üzerlerine 11 µl nükleaz içermeyen distile su eklenerek çözülmesi sağlandı ve pipetaj yapılarak homojen karışım elde edildi, DNA'nın boncuklardan ayrılması için 2 dk inkübe edildi.
- VIII. Spin işlemi uygulanıp, tüpler tekrar manyetik standda yerleştirildi ve saflaştırma boncukları tamamen ayrışana kadar (3-5 dk) bekletildi.
- IX. Saf DNA kütüphaneleri içeren süpernatanttan 10 µl çekilerek, oda sıcaklığındaki stand üzerinde yerleştirilen, yeni PZR tüplerine aktarıldı.

3.6.1.2 Kütüphane Amplifikasyonu ve Amplifiye Kütüphanenin Saflaştırılması

- I. On µl saflaştırılmış DNA içeren kütüphane örneklerinin üzerine, 1,25 µl IVT (*In Vitro Transcription*) primer 1 ve 1,25 µl IVT primer 2 eklendi.
- II. Bu süspansiyonun üzerine 12,5 µl DNA polimeraz karışımı (KAPA HiFi HotStart ReadyMix, Roche Sequencing Solutions, Inc. Santa Clara, CA USA) ilave edilerek pipetaj yapıldı, vorteks ve spin işlemi uygulandı.
- III. Tüpler PZR cihazına yerleştirildi ve Tablo 3.4'teki protokol uygulanarak kütüphane amplifikasyonu yapıldı.

Tablo 3.4: Kütüphane amplifikasyonu PZR programı

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Kapak ısıtması	105		
Aşama 1	98	45 sn	1
Aşama 2	98	15 sn	10
	60	30 sn	
Aşama 3	72	30 sn	1
	72	1 dk	
Durdurma	4		

PZR işlemi bittikten sonra her tüpe 35 µl oda sıcaklığında bulunan manyetik boncuk süspansiyonu (KAPA HyperPure Bead, Cape Town, Güney Afrika) eklendi, pipetaj ve spin yapılarak homojen karışım elde edildi. Örnekler 5 dk oda ısısında inkübe edilerek DNA'nın boncuklara bağlanması sağlandı. Tüpler daha sonra manyetik standda alınıp, süpernatant berraklaşmaya kadar bekletildi. Üstteki sıvı kısım pipetle dikkatlice çekilip, atıldı. Örneklerin her birinin üzerine taze hazırlanmış %80 etanolden 100 µl eklenip, 30 sn muamele edildi, ardından etanol tüplerden uzaklaştırıldı. Etanol basamağı bir kez daha tekrarlandı, tüpler oda sıcaklığında kurutuldu. Sonrasında, numuneler manyetik standdan alınıp üzerlerine 16 µl distile su eklendi ve pipetaj yapılarak homojen karışım elde edildi, 2 dk inkübe edilerek DNA'nın boncuklardan ayrılması sağlandı. Tüpler yeniden manyetik standda yerleştirilip, her bir örnekten 15 µl alınarak yeni tüplere saflaştırılmış amplifiye kütüphane aktarımı yapıldı.

3.6.1.3 DNA Kütüphanesinin Kantifikasyonu ve Kalite Analizi

Kütüphane hazırlandıktan sonra, çift zincirli DNA (dsDNA) kantifikasyonu ve kalite kontrolü için örneklerden 2 µl alınarak, 198 µl qubit ölçüm solüsyonu karışımına (Qubit dsDNA HS Buffer ve Qubit dsDNA HS Reagent 200x'den oluşur) eklendi ve Qubit™ 4 Fluorometre (invitrogen, Thermo Fisher Scientific) cihazı aracılığıyla ölçüm yapıldı. Uygun kalitedeki örneklerde, 40 ng/µl'nin üzerinde ölçüm saptandı. Sonuçlar Excel dosyasına kaydedildi. Uygun kalitede olmayan numuneler elimine edilerek, çalışma basamakları baştan itibaren tekrarlandı.

3.6.1.4 Hedef Zenginleştirme Protokolü

Hibridizasyon İçin Kütüphane Havuzlarının Hazırlanması

Hibridizasyon reaksiyonu için, çoklu örnekler eşit miktarda (kütle bazında) toplanarak, indekslenmiş amplifiye DNA örneği kütüphanelerinden toplam 750 ng kütlede havuz (*pool*) oluşturuldu (Şekil 3.3). 0,2 ml 'lik PZR tüplerine her numunedan 93,75 (750/8)

ng örnek alınarak, sekiz numuneden bir havuz hazırlandı. Aynı zamanda her bir havuzdaki toplam karışım hacmi 22,5 µl'ye ayarlandı. Bu karışım 'Çoklu (Multipleks) DNA Örneği Kütüphane Havuzu' olarak adlandırıldı.



Şekil 3.3: Hibridizasyon reaksiyonu için çoklu örneklerin eşit miktarda alınarak kütüphane havuzlarının oluşturulması.

Kütüphane havuzlarının her birinin üzerine, genomdaki tekrarlayan dizilerin hedef zenginleştirme (*target enrichment*) probu ile yanlış eşleşmesini (*off-target binding*) önlemek için 10 µl COT Human DNA (1 mg/mL) eklenerek, 32,5 µl karışım elde edildi. Ardından, bu karışımların üzerine 65'er µl oda sıcaklığında bulunan manyetik boncuk çözeltisi (KAPA HyperPure Bead, Cape Town, Güney Afrika) eklendi. Örnekler 10 sn vorteks ve spin işlemi uygulanıp, 10 dk oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Kütüphane havuzunun ve COT Human DNA'nın boncuklara bağlandığından emin olunduktan sonra, tüpler manyetik standı alındı,

süpernatant berraklaşınca kadar bekletildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve örneklerin her birinin üzerine taze hazırlanmış %80 etanolden 200 µl eklenip, 30 sn muamele edildi. Daha sonra etanol tüplerden uzaklaştırıldı ve tüpler oda sıcaklığında kurutuldu. Numuneler manyetik standdan alınıp üzerlerine 5,7 µl distile su eklendi ve pipetaj yapılarak homojen karışım elde edildi. Sonrasında boncuk bağlı DNA örneklerinin üzerine, adaptör dizilerinin veya hedef dışı bölgelerin yanlış bağlanmasını önlemek için birer µl özel bloklama oligonükleotidleri (Nanodigmbio, NadPrep NanoBlockers, Nankin, Çin) eklendi. Örnekler manyetik standdan alınıp, vorteks ve spin uygulandı.

Hibridizasyon

Yakalama hedefi boyutuna (*capture target size*) göre hibridizasyon reaksiyonu karışımı hazırlandı. Tablo 3.5'te belirtilen reaktifler, her havuz başına toplamda 21,5 µl olacak şekilde yeni mikrosantrifüj tüpünde birleştirildi.

Tablo 3.5: Hibridizasyon reaksiyonu karışımı bileşenleri (KAPA HyperCapture Reagent Kit, Roche Sequencing Solutions, Inc. Santa Clara, CA USA).

≥ 40 Mbp yakalama hedef boyutu – Hibridizasyon reaksiyonu karışımı	Her havuz başına hacim (µl)
Hibridizasyon tamponu	14 µl
Hibridizasyon komponent H	4,5 µl
Distile su	3 µl
Toplam hacim	21,5 µl

Örneklere hibridizasyon karışımı eklendikten sonra pipetaj ve spin yapıp, 2 dk oda ısısında bekletildi. Numuneler manyetik standda alındı, süpernatant berraklaştıktan sonra, her bir örnekten 28,2 µl sıvı yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerlerine ikişer µl hedef zenginleştirme probu (KAPA HyperCap Heredity Panel, Roche Sequencing Solutions, Inc. Santa Clara, CA USA) ilave edildi. 10 sn vorteks, spin yapıldıktan sonra numuneler hibridizasyon için termal döngü cihazına yerleştirildi. 95°C sıcaklıkta 5 dakika bekletildikten sonra cihazın sıcaklığı 55°C'ye getirilerek numuneler 17-18 saat inkübe edildi ve hibridizasyon sağlandı.

Hibridizasyon sonrası hedef DNA kütüphanelerinin seçilmesi

Hedef zenginleştirme problemlerine hibridizasyondan sonra yakalanan multipleks DNA örneklerinin, yıkanması ve yakalanan hedef kütüphanelerin seçilmesi süreci bu basamakta

gerçekleştirildi. Hibridizasyon inkübasyonu tamamlanmadan önce hibridizasyon yıkama tamponları (KAPA HyperCapture Reagent Kit, Roche Sequencing Solutions, Inc. Santa Clara, CA USA) ve streptavidin boncuk içeren kit (KAPA HyperCapture Bead Kit, Roche Sequencing Solutions, Inc. Santa Clara, CA USA) buzdolabından çıkarıp oda sıcaklığında çözülmeye bırakıldı.

a) Yıkama tamponlarının hazırlanması

Tamponlar, konsantre (10x veya 2.5x) halden 1x çalışma konsantrasyonuna seyreltildi. Her bir havuz tüpü için tamponlar, tablo 3.6'da belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 3.6: Hibridizasyon sonrası yıkama tamponları ve çalışma konsantrasyonları.

Konsantre Tampon	Konsantre Hacim	Saf Su Hacmi	Toplam 1x Hacim	Saklama Sıcaklığı
10x Stringent yıkama tamponu	20 µl	180 µl	200 µl	55°C (ön ısıtmalı)
10x yıkama tamponu-1	5 µl	45 µl	50 µl	55°C (ön ısıtmalı)
10x yıkama tamponu-1	10 µl	90 µl	100 µl	Oda sıcaklığı
10x yıkama tamponu-2	10 µl	90 µl	100 µl	Oda sıcaklığı
10x yıkama tamponu-3	10 µl	90 µl	100 µl	Oda sıcaklığı
2.5x Bead yıkama tamponu	60 µl	90 µl	150 µl	Oda sıcaklığı

Bu tamponlar hazırlandıktan sonra her bir havuz için 1x çalışma konsantrasyonundaki hacim, 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı.

b) Hibridize hedeflere streptavidin boncuklarının bağlanması

I) Her bir havuz için 0,2 ml'lik PZR tüplerine 50'şer µl streptavidin boncuk (KAPA HyperCapture Bead Kit) eklendi.

II) Boncukları toplamak için tüpler manyetik standın üzerine yerleştirildi.

III) Sıvı berraklaşana kadar inkübe edildi ve sonrasında süpernatant atıldı.

IV) Tüpler manyetik standda iken üzerlerine hazırlanmış olan 1x bead yıkama tamponundan 50 µl ilave edildi.

V) Tüpler manyetik standdan alınıp, vorteks ve spin uygulandı.

VI) Numuneler tekrardan manyetik standda yerleştirildi. 1x bead yıkama tamponu ile muamele işlemi iki kez daha tekrarlandı.

VII) On sn vorteks sonrası alikotlar yeni 0,2 ml'lik tüplere aktarıldı.

VIII) Tüpler tekrar manyetik standda konulup, sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. Yakalama boncukları (*capture beads*) artık hibridize DNA'yı bağlamaya hazır hale geldi.

VIII) İnkübasyon sonrası PZR cihazından çıkarılan her hibridizasyon örneği, bir önceki adımda hazırlanan yakalama boncukları içeren 0,2 ml'lik tüplere aktarıldı.

IX) İyice pipetaj yapılarak karışım homojenize edildi.

X) Numuneler tekrar termal döngü cihazına yerleştirildi, 55°C 15 dk inkübasyona bırakıldı.

c) Yıkama

I. 30,2 µl yakalama boncukları ile bağlanmış DNA'ya 50 µl önceden ısıtılmış (55°C'de) 1x yıkama tamponu-1 eklendi.

II. Vorteks ve spin yapıldıktan sonra tüpler manyetik standda konuldu.

III. Sıvı kısım berraklaştıktan sonra süpernatant atıldı.

VI. Ardından, numunelerin üzerine hedef DNA'nın problara özgün bağlanmasını sağlamak ve spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla, yüksek tuz konsantrasyonlu 100 µl önceden ısıtılmış (55°C'de) 1x Stringent yıkama tamponu eklendi.

V. Tüpler manyetik standdan alınıp, vorteks ve spin işlemi uygulandı.

VI. Tüpler termal döngü cihazına yerleştirildi, 55°C 5 dk inkübe edildi.

VII. Son üç basamak bir kez daha tekrar edildi.

VIII. İkinci inkübasyon sonrası numuneler tekrar manyetik standda yerleştirildi.

VIII. Sıvı kısım berraklaştıktan sonra süpernatant atıldı, bundan sonraki basamaklarda oda ısısındaki yıkama tamponları kullanıldı.

IX. Örnekler manyetik stand üzerindeyken 100 µl 1x yıkama tamponu-1 eklendi, pipetaj ve spin işlemi ile homojenizasyon sağlandı.

X. Tüpler normal standda alınarak, 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

XI. Sonrasında örnekler manyetik standda yerleştirildi ve berraklaşan süpernatant atıldı.

XII. Örneklerin üzerine 100 µl 1x yıkama tamponu-2 eklendi, pipetaj ve spin işlemi ile homojenizasyon sağlandı.

XIII. Karışım yeni tüplere aktarılıp, 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve tekrar manyetik standda yerleştirildi.

XIV. Süpernatant atıldıktan sonra 100 µl 1x yıkama tamponu-3 eklenip, pipetaj ve spin işlemi ile homojenizasyon sağlandı.

XV. Tüpler normal standda alınarak, 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

XVI. Sonrasında örnekler manyetik standda yerleştirildi ve berraklaşan süpernatant atıldı.

XVII. Numuneler 10 µl distile su ile çözülüp, spin yapıldıktan sonra yakalama sonrası (post-capture) seçilen hedef kütüphanelere PZR işlemine geçildi.

3.6.1.5. Postcapture kütüphanelerin amplifikasyonu, saflaştırılması ve kalite kontrolü

Amplifikasyon

I) Liyofilize postcapture PZR oligonükleotidleri (MGI Primer Mix-IVT1+IVT2-) kısa spin işlemiyle resüspanse edildi.

II) Postcapture PZR ana karışımı reaksiyon başına tablo 3.7’de belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 3.7: Postcapture kütüphane amplifikasyonu için PZR ana karışımı bileşenleri.

Postcapture PZR ana karışımı	Reaksiyon başına miktar
KAPA HiFi HotStart Ready Mix (polimeraz karışımı)	12,5 µl
MGI Primer Mix (IVT1+IVT2)	1,25 µl +1,25 µl
Toplam	15 µl

III) Reaksiyon başına 15 µl postcapture PZR ana karışımı, 0,2 ml’lik tüplerde streptavidin boncuk bağlı hedef DNA kütüphanelerine (10 µl) eklendi.

IV) Toplamda 25 µl ürün içeren karışım vorteks ve spin yapıldıktan sonra amplifikasyon amacıyla termal döngü cihazına yerleştirildi, tablo 3.8’de belirtilen PZR basamakları uygulandı.

Tablo 3.8: Postcapture PZR programı

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Kapak ısıtması	105		
Aşama 1	98	45 sn	1
	98	15 sn	
Aşama 2	60	30 sn	10
	72	30 sn	
Aşama 3	72	1 dk	1
Durdurma	4		

Saflaştırma

V) PZR tamamlandıktan sonra örnekler manyetik standı alındı, sıvı kısım berraklaşana kadar inkübe edildi.

VI) Süpernatantlar (amplifiye zenginleştirilmiş kütüphane içeriyor) atılmayıp, yeni tüplere 25 µl transfer edildi.

VII) Üzerlerine 35 µl manyetik boncuk solüsyonu eklenip, pipetaj yapıldıktan sonra vorteks ve spin uygulandı.

VIII) Homojenize karışım 5 dk oda ısısında inkübe edilerek, amplifiye zenginleştirilmiş DNA kütüphanelerinin manyetik boncuklara bağlanması sağlandı.

IX) Numuneler manyetik stand üzerine alındı ve süpernatantta berrak görünüm oluşana kadar bekletildi (Şekil 3.3).

X) Tüplerde oluşan süpernatant mikropipet yardımıyla alınarak atıldı.

XI) Her bir tüpe 100’er µl taze hazırlanmış %80’lik etanol eklenip, 30 saniye beklendikten sonra, etanol tüplerden uzaklaştırıldı.

XII) Bu işlem bir kez daha tekrarlandı ve tüpler manyetik stand üzerindeyken oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

XIII) Kutuplaşan manyetik boncuklar kuruduktan sonra üzerlerine 11 µl nükleaz içermeyen distile su eklenerek çözülmesi sağlandı ve pipetaj yapılarak homojen karışım elde edildi, DNA'nın boncuklardan elüsyonu için 2 dk inkübe edildi.

XIV) Spin işlemi uygulanıp, tüpler tekrar manyetik standı üzerine yerleştirildi ve boncuklar tamamen ayrışana kadar (3-5 dk) bekletildi.

XV) Saflaştırılmış amplifiye DNA kütüphaneleri içeren süpernatanttan 10 µl çekilerek, alikotlar oda sıcaklığındaki stand üzerine yerleştirilen, yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

XVI) Kalan numunelerden 2 µl yeni tüplere aktarılarak, *Qubit* ölçümü için ayrıldı.

Postcapture amplifiye kütüphanelerin kalite analizi

Saflaştırma işleminden sonra postcapture amplifiye kütüphanelerin DNA kantifikasyonu ve kalite analizi için 2 µl alınan örnekler, 1/10 oranında distile su ile dilüe edildi. Dilüe numunelerden 5'er µl, qubit ölçüm solüsyonu karışımına (Qubit dsDNA HS Buffer ve Qubit dsDNA HS Reagent 200x'den oluşur) eklendi ve Qubit™ 4 Fluorometre (invitrogen, Thermo Fisher Scientific) cihazı aracılığıyla ölçüm yapıldı. Uygun kalitedeki örneklerde, 20 ng/µl'nin üzerinde ölçüm saptandı. Sonuçlar Excel dosyasına kaydedildi. Uygun numuneler, DNA'nın tek iplikli dairesel forma dönüştürülmesi (*single strand circularization*) aşamasına kadar -20°C'de buzdolabında bekletildi.



Şekil 3.4: Manyetik stand üzerine alınan numunelerin saflaştırılması.

3.6.1.6 DNA'nın tek iplikli dairesel forma dönüştürülmesi

Bu aşamada, uç bölgelerinde adaptör dizileri bulunan dsDNA, denatüre edilerek tek sarmallı DNA (ssDNA) elde edilmesi sağlandı. Önerilen girdi DNA miktarı olan 1 pmol'e göre uygun hacimler hazırlandı.

I) Ortalama fragmant pik boyutu 300 bp alınarak, 1 pmol dsDNA örneğine karşılık gelen kütleyle ng cinsinden hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı. Ardından örnek hacmi hesaplandı.

1 pmol PCR ürününe karşılık gelen kütle (ng)=300(PCR ürünü boyutu-bp)x0,66=198ng

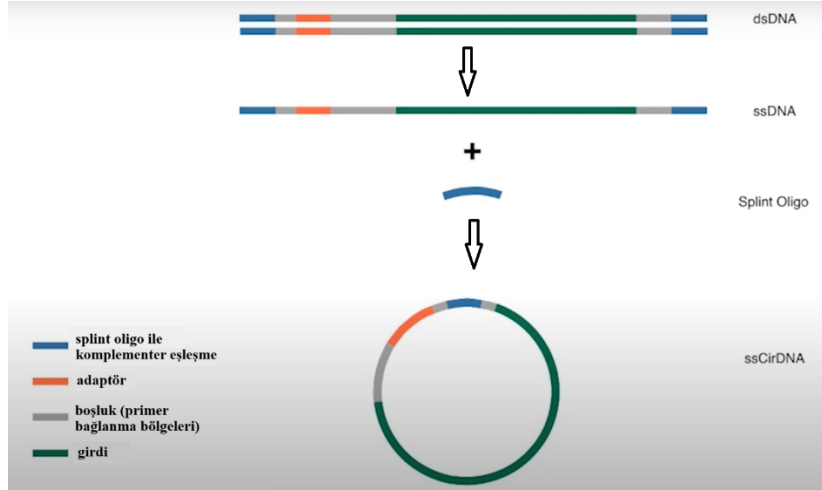
Örnek hacmi (μ l) = örnek kütlesi (ng)/örnek konsantrasyonu (ng/ μ l) x0,5

II) Bu formülden çıkan değer ile her havuzdan hesaplanan hacimde alınıp, yeni 0,2 ml'lik PZR tüplerinde toplam numune TE (Tris-EDTA) tamponu ile 24 μ l'ye tamamlandı.

III) Tüplere vorteks ve spin uygulanıp, termal döngü cihazında denatürasyon amacıyla 95°C'de 3 dk inkübe edildi.

IV) Program tamamlandığında, tüpler 2 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi.

Denatürasyon sonrasında, hedef dsDNA'nın bir zincirinin 5' ve 3' uçlarındaki adaptör dizilerle, splint oligonükleotidin (kılavuz dizi) komplementer dizisi hibritleşti. Hedef ssDNA'nın her iki ucu bir araya gelerek, "nicked" (kopuk) bir dairesel yapı oluşturdu. Bu kopukluk, DNA ligaz enzimi ile onarılarak tek iplikli sirküler DNA (ssCirDNA) yapısı elde edildi.



Şekil 3.5: dsDNA'dan tek iplikli sirküler DNA oluşumunun şematik gösterimi.

Bunun için sırasıyla aşağıdaki adımlar uygulandı;

I) Soğuk stand üzerine yerleştirilen yeni mikrosantrifüj tüplerine reaksiyon başına 5,8 µl splint tamponu, 0,25 µl DNA hızlı ligaz eklenerek toplamda 6,05 µl hacminde tek iplikli sirkülarizasyon karışımı hazırlandı.

II) Hazırlanan karışım her tüpe dağıtıldı ve 3 kez kısaca vortkes, ardından spin yapıldı.

III) Homojenize edilen tüpler termal döngü cihazına yerleştirilerek, 37°C'de 30 dk hibridize edildi.

IV) Hibridizasyon sonrası numuneler buzlu stand üzerine alındı ve sirküler formda olmayan DNA'yı ortadan kaldırmak için ekzonükleaz içeren 2 µl sindirim enzimi karışımı (0,7 µl sindirim tamponu, 0,2 µl sindirim enzimi) ilave edildi.

V Hazırlanan karışım her tüpe dağıtıldı ve 3 kez kısaca vortkes, ardından spin yapıldı.

VI) Sonra tüpler tekrar termal döngü cihazına yerleştirilerek, 37°C'de 30 dk inkübe edildi.

VII) İnkübasyon sonrası örneklerin üzerine 3,75 µl ekzonükleaz aktivitesini sonlandırıcı (*digestion stop buffer*) eklendi.

VIII) Vortkes ve spin yapıldıktan sonra örnekler yeni 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı.

IX) Örneklerden sindirim ürünlerini uzaklaştırmak için, saflaştırma boncukları (MGIEasy DNA Clean Beads) kullanıldı, ardından taze hazırlanmış %80'lik etanolle iki kez yıkanıp, kurutuldu.

X) Kuruyan boncuk bağlı ssDNA'yı çözmek için 16 µl TE tamponu eklendi, 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

XI) Tüpler manyetik standı yerleştirildi, boncuklar ayrıldıktan sonra süpernatanttan 15'er µl yeni tüplere aktararak alikotlandı.

XII) Saflaştırılmış ssDNA numunelerinden 2 µl qubit ölçümü için ayrıldı.

XIII) Qubit ssDNA Assay Kit ve Qubit™ 4 Fluorometre (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) cihazı ile kalite analizi yapılan ssDNA örneklerinin sonuçları Excel dosyasına kaydedildi.

XIV) Uygun numuneler (1/10 dilüsyonda 0,8-2 ng/µl aralığında olanlar), DNA nanotop (*DNB; DNA nanoball*) oluşturma aşamasına kadar -20°C'de buzdolabında bekletildi.

3.6.1.7. Tek iplikli sirküler DNA'nın nanotoplara (DNB) dönüştürülmesi

DNA nanotopları, tek zincirli sirküler DNA'yı şablon olarak kullanarak yuvarlanan daire amplifikasyonu (*RCA; rolling circle amplification*) ile üretilir. RCA, yüksek doğrulukta bir DNA polimerazı kullanır ve her amplifikasyonda, kalıp olarak DNA çemberinin orijinal kopyasını kullanır, bu da diğer PZR yöntemlerindeki hataları azaltır. Çeşitli boyutlardaki DNA fragmanları yaklaşık 100 ila 1000 kopya amplifiye edilir.

DNB yapımı için reaktiflerin hazırlanması

- Kütüphane (ssDNA) -20'deki buzdolabından çıkarılıp, kullanılana kadar soğuk stand üzerinde bekletildi.
- Make DNB Buffer, Low TE Buffer ve Stop DNB Reaction Buffer'ı depolamadan çıkarılıp ve oda sıcaklığında çözülmeye bırakıldı.
- Make DNB Enzyme Mix'i çıkarıldı ve reaktif yaklaşık yarım saat soğuk stand üzerinde çözülmeye bırakıldı.

- Çözülme işlemi tamamlandıktan sonra, reaktifler vorteks ile 5 saniye karıştırılıp, kısaca santrifüjlendi ve kullanılabileceği kadar soğuk stand üzerinde bekletildi.

DNB oluşturma

DNBSEQ-G400RS dizileme cihazı 4 şerit (*lane*) akış hücresi (*flow cell*) içerir. DNB yüklemek için kullanılan MGIDL-200H kartuşuna göre her şerit için 25 µl DNB gereklidir.

- Qubit ssDNA Assay Kit ile ölçülen numunelerin kütüphane konsantrasyonları (C) aşağıdaki formülle, ng/µl'den fmol/µl'ye dönüştürüldü.

$$C(\text{fmol}/\mu\text{l}) = 3030 \times C(\text{ng}/\mu\text{l}) / N$$

[N: Adaptörler dahil toplam nükleotit sayısı (kütüphane uzunluğu)]

- Sonrasında ssDNA kütüphanesinden gerekli hacim (V) $V = 40 \text{ fmol} / C$ formülü ile hesaplandı. Konsantrasyon (C) = 2 fmol/µl olarak ayarlandı ve $V = 40 \text{ fmol} / 2 \text{ fmol} / \mu\text{l}$ 'den 20 µl olarak belirlendi.
- 0,2 ml'lik PCR tüplerine her bir şerit için Tablo 3.9'da içeriği belirtilen DNB reaksiyon miksi 1'i hazırlandı.

Tablo 3.9: DNB reaksiyon miksi 1'in hazırlanması.

Bileşen	Hacim (µl)
Low TE Buffer	20-V
Make DNB Buffer	20
ssDNA kütüphaneleri	V
Toplam Hacim	40

- Oluşturulan karışım nazikçe vortekslenip, 5 saniye spin yapıldı.
- Karışım termal döngü cihazına yerleştirildi ve primer hibridizasyon reaksiyonu için Tablo 3.10'da gösterilen PZR programı uygulandı.

Tablo 3.10: Primer hibridizasyon reaksiyonu programı.

Sıcaklık	Süre
Kapak ısısı (105°C)	Açık
95 °C	1 dakika
65 °C	1 dakika
40 °C	1 dakika
4 °C	Bekletme

- Make DNB Enzyme Mix II (LC) depolamadan çıkarıldı, santrifüjlenip soğuk stand üzerine yerleştirildi.

- PZR programı sonlanan tüplere 5 saniye kısaca spin yapıp, tüpler soğuk stand üzerine alındı ve Tablo 3.11’de içeriği belirtilen DNB reaksiyon miks 2 hazırlandı.

Tablo 3.11: DNB reaksiyon miks 2’nin hazırlanması.

Bileşen	Hacim (μ l)
Make DNB Enzyme Mix I	40
Make DNB Enzyme Mix II (LC)	4

- DNB reaksiyon miks 2, önceki adımda hazırlanan DNB reaksiyon miks 1’in içine eklendi.
- Tüm karışım, filtresiz geniş uçlu (*wide bore*) pipetlerle nazikçe karıştırıldı.
- Tüpleri bir sonraki reaksiyon için termal döngü cihazına yerleştirildi ve Tablo 3.12’deki yuvarlanan daire amplifikasyonu reaksiyonu koşulları sağlandı.

Tablo 3.12: Yuvarlanan daire amplifikasyonu (*RCA; rolling circle amplification*) koşulları.

Sıcaklık	Süre
Kapak ısı (35°C)	Açık
30 °C	25 dakika
4 °C	Bekletme

- PZR sıcaklığı 4°C’ye ulaştığında hemen 20 μ l Stop DNB Reaction Buffer eklendi.
- Geniş uçlu pipet ucu kullanarak 5-8 kez nazikçe pipetleyerek karıştırıldı (DNA nanotoplarının zarar görmesini önlemek için).
- DNB oluşturma işlemi tamamlandığında, 2 μ l DNB alınarak Qubit ssDNA Assay Kit ve Qubit 4.0 Fluorometre kullanarak DNB miktarını ölçüldü.
- Numunelerin konsantrasyonunun minimum 20 ng/ μ l, maksimum 40 ng/ μ l olduğu görüldü.

3.6.1.8 Kütüphane havuzunun dizilenmesi

Kantitesi ve kalitesi kontrol edilen amplifiye edilmiş DNB’ler, dizileme öncesi yükleme tamponu ve enzimi eklenerek, yavaşça pozitif yüklü akış hücresine (*flow cell*) aktarıldı, kartuş hazırlandı. Yeni nesil dizileme için, akış hücresine immobilize edilmiş amplifiye kütüphaneler, nanoball PZR tabanlı ligasyon teknolojisiyle çalışan MGI DNBSEQ G400RS platformuna (MGI Tech Co., Ltd, Shenzhen, Çin) yüklendi (Şekil 3.6). Dizileme esnasında oluşan optik görüntülerden dönüştürülen FASTQ formatındaki veri setleri elde edildi.

Çalışmaya dahil edilen 26 hastanın; dokuzunda köprü PZR tabanlı yeni nesil dizileme yöntemiyle çalışan Illumina Miniseq platformunda (Illumina, San Diego, Kaliforniya, ABD) tasarlanmış hedefli NGS kiti (Celemics Tubular Disorders Kit) çalışılmıştı. On yedi hastada ise yukarıda detaylı bahsedilen nanoball PZR tabanlı MGI DNBSEQ platformunda (MGI Tech Co., Ltd, Shenzhen, Çin) kalıtsal tübülopati genlerini içeren NGS kiti (KAPA HyperCap Heredity Panel) çalışılmıştı.



Şekil 3.6: DNA dizilemesi için kullanılan, numunelerin yüklendiği sekanslama cihazı (MGI DNBSEQ G400RS).

3.6.1.9 Veri Analizi

Dizileme sonucu üretilen FASTQ formatındaki veri setleri, SEQ (Genomize, İstanbul, Türkiye) platformu kullanılarak işlendi. Standart biyoinformatik akış ile sırasıyla hizalama, varyant çağırma ve anotasyon işlemleri yapıldı. FASTQ dosyaları “Human Genome (hg)” referans dizisine (kullanılan sürüme göre GRCh37/hg19 veya GRCh38/hg38) hizalanarak BAM (*Binary Alignment Map*) dosyası elde edildi. BAM formatındaki dizi verileri için Bütünleştirici Genomik Görüntüleyici (*IGV: Integrative Genomics Viewer*) programı kullanıldı. Haritalanan okumalarda referans dizisinden farklı olarak bulunan varyantlar VCF (*Variant Calling File*) dosyasına dönüştürüldü. Varyantlar kalite standartlarına göre filtrelenerek analize hazır hale getirildi.

Analiz kapsamına alınan varyantların ham okuma kalitesi IGV 2.8.6 programı ile görsel olarak değerlendirildi. Hedeflenen genomik bölgenin en az %80'inin 20 kez okunup okunmadığı kontrol edildi. 20X okuma derinliğinde allel fraksiyonu %35-65 arası olan varyantlar germline heterozigot, >%65 olan varyantlar germline homozigot olarak kabul edildi. Tespit edilen varyantlar, İnsan Genom Varyasyon Topluluğu (HGVS) Dizi Varyantı Adlandırma Kuralları'na (den Dunnen ve ark., 2016) uygun olarak isimlendirildi.

3.6.1.10 Varyantların Sınıflandırılması

Tespit edilen dizi varyantlarının yorumlanmasında Tablo 3.13'te yer alan *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) varyant sınıflandırma rehberinin kriterleri uygulandı (Richards ve ark., 2015). Kriterler, kanıt gücüne ve türüne göre (örn. patojenik veya benign) gruplandırılırken Tablo 3.14'te belirtilen varyant sınıflamasında birleştirme kuralları kullanılmıştır.

Tablo 3.13: ACMG varyant sınıflandırma rehberinin kriterleri.

Kriter Kodu	Kanıtın niteliği	Açıklama
PVS1	Çok Güçlü (Patojenik)	Fonksiyon kaybının hastalık mekanizması olduğu bilinen bir gende <i>null</i> varyant (nonsense, çerçeve kayması, kanonik +/- 1 veya 2 splice bölgesi, başlangıç kodonu kaybı, tek veya çoklu ekzon delesyonu)
PS1	Güçlü (Patojenik)	Farklı bir nükleotid değişikliğiyle oluşan, daha önce patojenik olduğu belirlenmiş aynı amino asit değişimi.
PS2	Güçlü (Patojenik)	De novo (paternite ve maternite doğrulanmış) varyant ve aile öyküsü yok.
PS3	Güçlü (Patojenik)	İn vitro veya in vivo iyi tanımlanmış fonksiyonel çalışmalar, gen ya da gen ürününde zararlı etki olduğunu destekliyor.
PS4	Güçlü (Patojenik)	Varyantın hasta bireylerdeki görülme sıklığı, kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde artmış.
PM1	Orta (Patojenik)	Mutasyonel hot-spot bölgede ve/veya iyi tanımlanmış benign varyasyon içermeyen işlevsel bölgede yer alan varyant.
PM2	Orta (Patojenik)	Ekzom Dizileme Projesi, 1000 Genom Projesi gibi büyük çalışmalarda kontrol gruplarında bulunmaması veya homozigot frekansının çok düşük olması
PM3	Orta (Patojenik)	Resesif hastalıklarda patojenik varyant ile trans pozisyonunda gözlenmesi.
PM4	Orta (Patojenik)	Tekrarlanmayan bölgelerde çerçeve içi delesyonlar/insersiyonlar veya stop kodonu kaybı varyantları ile protein uzunluğunda değişiklik olması
PM5	Orta (Patojenik)	Daha önce patojenik olduğu belirlenmiş farklı bir missense varyantın bulunduğu amino asit pozisyonunda <i>novel</i> bir missense değişiklik.
PM6	Orta (Patojenik)	De novo olduğu varsayılmış ancak paternite ve maternite doğrulanmamış.
PP1	Destekleyici (Patojenik)	Hastalıkla ilişkisi kesin olarak bilinen bir gende, birden fazla etkilenmiş aile üyesinde varyantın hastalıkla birlikte kalıtılması (kosegregasyon).
PP2	Destekleyici (Patojenik)	Benign missense değişimlerin düşük sıklıkta görüldüğü ve hastalık mekanizmasında missense varyantların sık yer aldığı gendeki missense değişim
PP3	Destekleyici (Patojenik)	Çeşitli hesaplamalı analizler ile gen ya da gen ürününe zararlı etkinin desteklenmesi. (korunmuşluk, evrimsel, splicing etkisi, vb.)
PP4	Destekleyici (Patojenik)	Hastanın fenotipi veya aile öyküsünün tek bir genetik etiyojisi olan bir hastalık için oldukça özgül olması.
PP5	Destekleyici (Patojenik)	Saygın bir kaynak tarafından varyantın patojenik olarak bildirilmesi; ancak laboratuvar çalışması ile patojenitesi bağımsız olarak kanıtlanmamış.

PVS: *Pathogenic Very Strong*; PS: *Pathogenic Strong*, PM: *Pathogenic Moderate*; PP: *Pathogenic Supporting*

Tablo 3.13: ACMG varyant sınıflandırma rehberinin kriterleri (devamı).

Kriter Kodu	Kanıtın niteliği	Açıklama
BA1	Benign etkinin tek başına kanıtı	Varyantın popülasyon frekansının %5'in üzerinde olması.
BS1	Güçlü (Benign)	Varyantın allel frekansının hastalık için beklenenin üzerinde olması.
BS2	Güçlü (Benign)	Tam penetrans beklenen bir hastalık için sağlıklı bireylerde resesif hastalıklar için homozigot, dominant hastalıklar için heterozigot ve X'e bağlı hastalıklar için hemizigot gözlenen değişim.
BS3	Güçlü (Benign)	Fonksiyonel çalışmalar, gen/protein fonksiyonu veya splicing üzerine zararlı etki göstermemiş.
BS4	Güçlü (Benign)	Etkilenmiş aile bireylerinde varyantın segregasyon göstermemesi.
BP1	Destekleyici (Benign)	Esas olarak <i>truncating</i> varyantların hastalığa neden olduğu bilinen bir gende missense varyant
BP2	Destekleyici (Benign)	Tam penetrans gösteren dominant bir gen/hastalık için patojenik bir varyant ile trans konumda gözlenmesi veya herhangi bir kalıtım modelinde patojenik bir varyant ile cis konumda gözlenmesi.
BP3	Destekleyici (Benign)	Fonksiyonu bilinmeyen tekrar bölgelerinde yer alan çerçeve içi delesyonlar/insersiyonlar.
BP4	Destekleyici (Benign)	Çok sayıda hesaplamalı analizler ile (korunmuşluk, evrimsel, splicing) gen ya da gen ürünü üzerinde etkisiz olan varyantlar.
BP5	Destekleyici (Benign)	Hastalık için alternatif moleküler temeli olan bir vakada bulunan varyant.
BP6	Destekleyici (Benign)	Saygın bir kaynak varyantı benign olarak bildirmiş; ancak kanıtlar bağımsız bir laboratuvar ortamında değerlendirilememekte.
BP7	Destekleyici (Benign)	Splicing üzerine etkisi öngörülmemiş ve türler arasında korunmamış eş anlamlı (sinonim) varyant.

Benign: Zararsız, BA: *Benign Stand-Alone*; BS: *Benign Strong*, BP: *Benign Supporting*

Tablo 3.14: Dizi varyantlarını sınıflandırmak için kriterleri birleştirme kuralları.

Patojenik	<p>(I) 1 çok güçlü (PVS1) ve</p> <p>a) ≥ 1 güçlü (PS1-PS4) veya</p> <p>b) ≥ 2 orta (PM1-PM6) veya</p> <p>c) 1 orta (PM1-PM6) ve 1 destekleyici (PP1-PP5) veya</p> <p>d) ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5)</p> <p>(II) ≥ 2 güçlü (PS1-PS4) veya</p> <p>(III) 1 güçlü (PS1-PS4) ve</p> <p>a) ≥ 3 orta (PM1-PM6) veya</p> <p>b) 2 orta (PM1-PM6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya</p> <p>c. 1 orta (PM1-PM6) ve ≥ 4 destekleyici (PP1-PP5)</p>
Olası Patojenik	<p>(I) 1 çok güçlü (PVS1) ve 1 orta (PM1-PM6) veya</p> <p>(II) 1 güçlü (PS1-PS4) ve 1-2 orta (PM1-PM6) veya</p> <p>(III) 1 güçlü (PS1-PS4) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya</p> <p>(IV) ≥ 3 orta (PM1-PM6) veya</p> <p>(V) 2 orta (PM1-PM6) ve ≥ 2 destekleyici (PP1-PP5) veya</p> <p>(VI) 1 orta (PM1-PM6) ve ≥ 4 destekleyici (PP1-PP5)</p>
Benign	<p>(I) Benign etkinin tek başına kanıtı (BA1) veya</p> <p>(II) ≥ 2 güçlü (BS1-BS4)</p>
Olası Benign	<p>(I) 1 güçlü (BS1-BS4) ve 1 destekleyici (BP1-BP7) veya</p> <p>(II) ≥ 2 destekleyici (BP1-BP7)</p>
Önemi Bilinmeyen	<p>(I) Diğer kriterlerin karşılanmaması</p> <p>(II) Patojenik ve benign kriterlerin çelişkili olması</p>

3.7 İstatistiksel Analiz

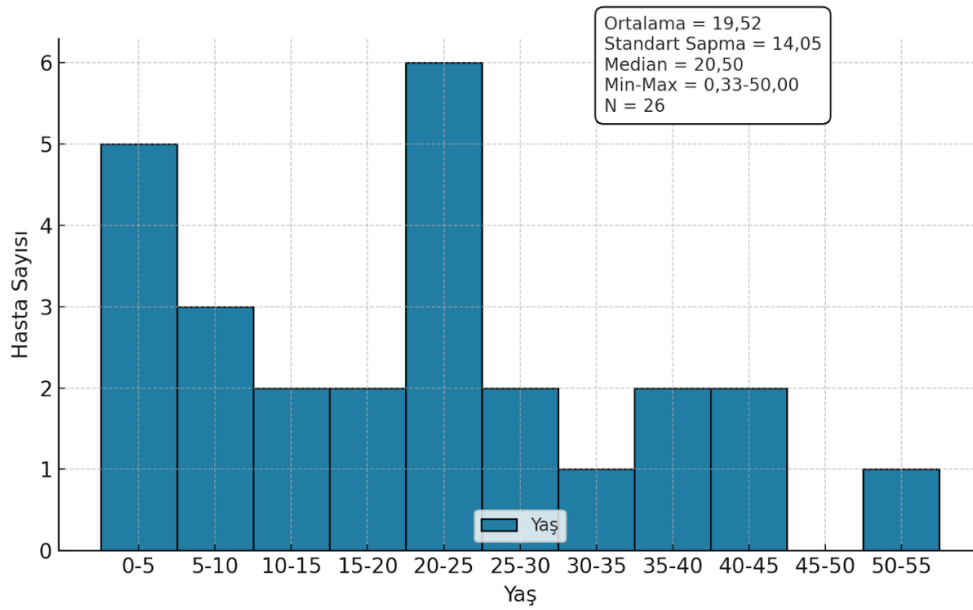
Çalışmadaki tüm tanımlayıcı analizler, görseller ve grafikler Sosyal Bilimler İçin İstatistik Paket Programı versiyon 26.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA) ve Microsoft Excel programları kullanılarak hazırlandı. Bu analizlerde sürekli değişkenler için ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerler; kategorik değişkenler için ise frekans (n) ve yüzde (%) hesaplamaları yapıldı. Çalışmanın ilk aşamasında örnekleme ilişkin demografik verilerin görselleştirilmesi amacıyla yaş dağılımı, pediatrik ve yetişkin popülasyon oranları, cinsiyet yüzdeleri, ailede renal hastalık öyküsü ve anne-baba akrabalık durumu çubuk grafikler veya pasta grafikleri ile sunuldu. Genetik analizler kapsamında tanımlanan varyantların, genlere ve varyant tiplerine göre dağılımı, pediatrik ve yetişkin popülasyonlar ayrı ayrı değerlendirilerek yüzdelik frekans tabloları ve dağılım grafikleri ile gösterildi. Varyantların patojenite düzeylerinin belirlenmesinde "patojenik", "olası patojenik" ve "önemi bilinmeyen varyant" kategorileri kullanıldı; bu kategorilere göre dağılımlar frekans tabloları ve pasta grafikleri ile analiz edildi. Özellikle yanlış anlamlı ve çerçeve kayması varyantlarının patojenite durumları ayrıca değerlendirildi, bu veriler de benzer biçimde görselleştirildi. Tanımlanan tüm varyantların sayısı, genetik lokasyonları, varyant tipleri ve sıklıkları ayrı bir tabloda detaylandırıldı. Ayrıca klinik tanımlar ile genetik varyantlar arasındaki ilişkiler gen bazında raporlanıp; hasta sayısı, cinsiyet dağılımı, yaş aralıkları, akrabalık oranları ve aile öyküsü bakımından detaylı olarak karşılaştırıldı. Varyantların klinik karşılıklarının değerlendirilmesinde mevcut literatür bilgisi temel alınarak genotip-fenotip ilişkilendirmesi yapıldı. Bu bağlamda çalışmanın istatistiksel analizi, büyük oranda tanımlayıcı analiz tekniklerine dayalı olarak yürütüldü; anlamlılık testleri kullanılmadan, genetik ve klinik bulguların detaylı frekans temelli sunumu ile veri seti tanımlandı.

4. BULGULAR

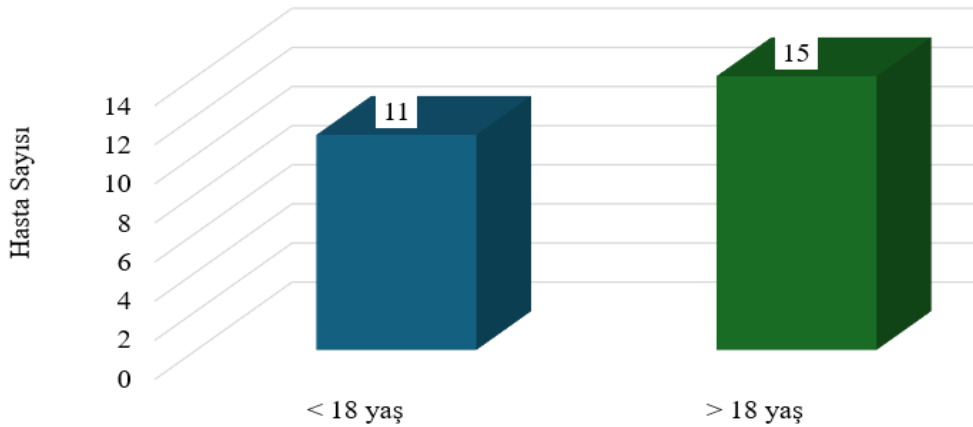
4.1 Sosyodemografik Özelliklerin Değerlendirilmesi

4.1.1 Yaş

Çalışma grubundaki hastaların kliniğimize başvuru anındaki yaş ortalaması $19,52 \pm 14,05$ olup, medyan genetik tanı yaşı 20,5 (en küçük 4 aylık, en büyük 50 yaş) olarak hesaplandı (Şekil 4.1). Hastaların %58'i (n=15) erişkin (18 yaş ve üzeri), %42'si (n=11) pediatrik (18 yaş altı) grupta idi (Şekil 4.2). Pediatrik popülasyonun medyan tanı yaşı 5 (4 ay-16 yıl), erişkin popülasyonun medyan tanı yaşı 25 (19-50 yıl) olarak hesaplandı.



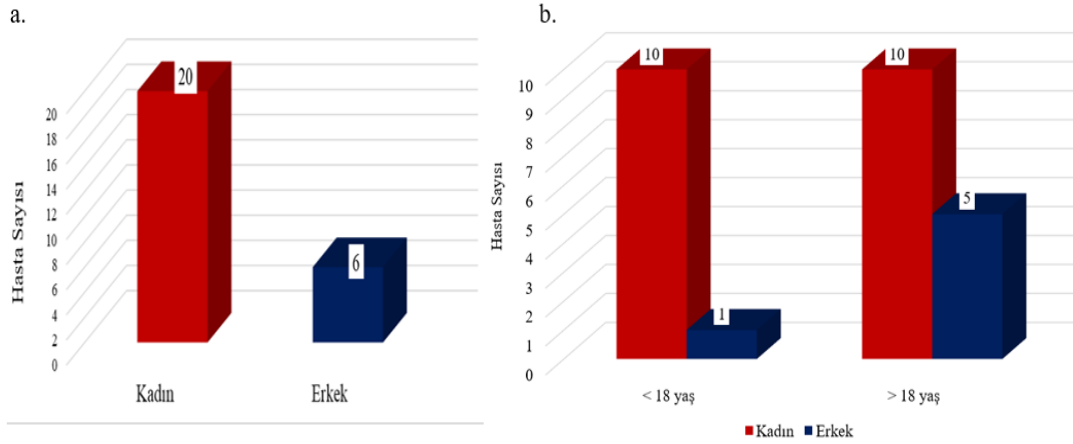
Şekil 4.1: Hasta yaş dağılım histogramı (X eksenini hasta yaş aralıklarını, Y eksenini ise hasta sayısını göstermektedir).



Şekil 4.2: Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı.

4.1.2 Cinsiyet

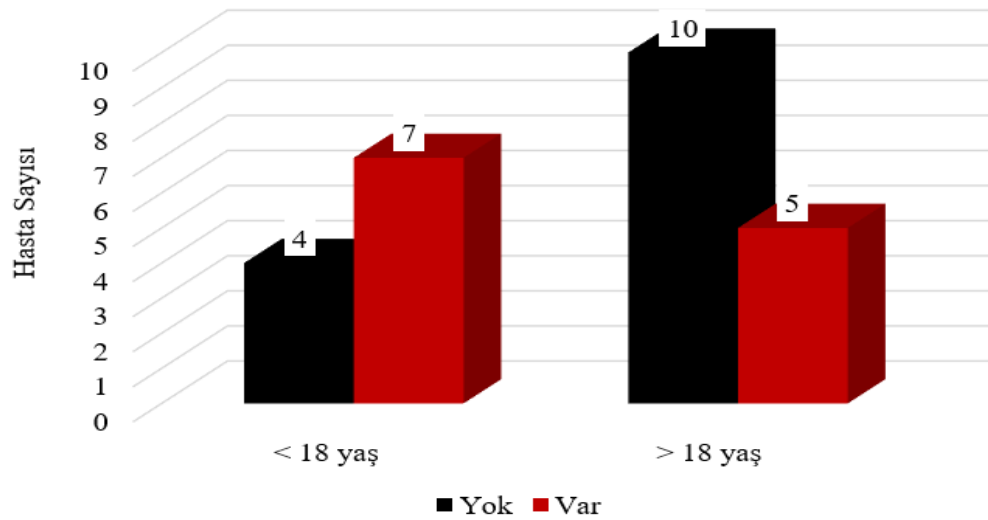
Değerlendirilen 26 hastanın 20'si kadın (%77), 6 tanesi ise erkek (%23) cinsiyette idi (Şekil4.3). Pediatrik ve erişkin grupta kadın cinsiyet sayısı eşit olmakla birlikte, her iki grupta da kadın/erkek oranı yüksekti (10:1, 10:5).



Şekil 4.3: a. Çalışma grubunun cinsiyete göre dağılımı. b. Pediatrik ve erişkin grubun kendi içinde cinsiyete göre dağılımı.

4.1.3 Ailede renal hastalık öyküsü

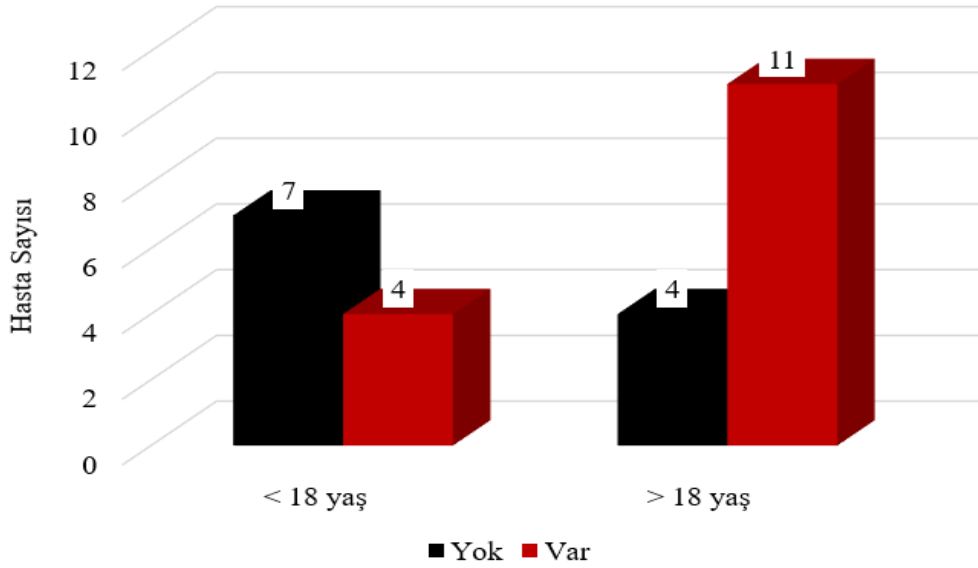
Çalışma grubundaki hastaların anamnez ve çizilen aile ağacı kayıtlarından elde edilen bilgilere göre %46'sında (n:12) renal hastalık kliniği mevcut idi. 18 yaş altı hastaların %63,6'sında (n:7), 18 yaş ve üzeri hastaların ise %33,3'ünde (n:5) ailede renal hastalık öyküsü olduğu belirlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Pediatrik ve erişkin hasta grubunda ailede renal hastalık öyküsü dağılımı.

4.1.4 Hastaların anne ve baba akrabalık durumları

Çalışma grubundaki hastaların %58'inde (n:15) beşinci derece ve altı olmak üzere anne-baba akrabalığı mevcut idi. 18 yaş altı hastaların %36,4'ünün (n:4), 18 yaş ve üzeri hastaların ise %73,3'ünün (n:11) anne ve babasının akraba olduğu belirlendi (Şekil 4.5).

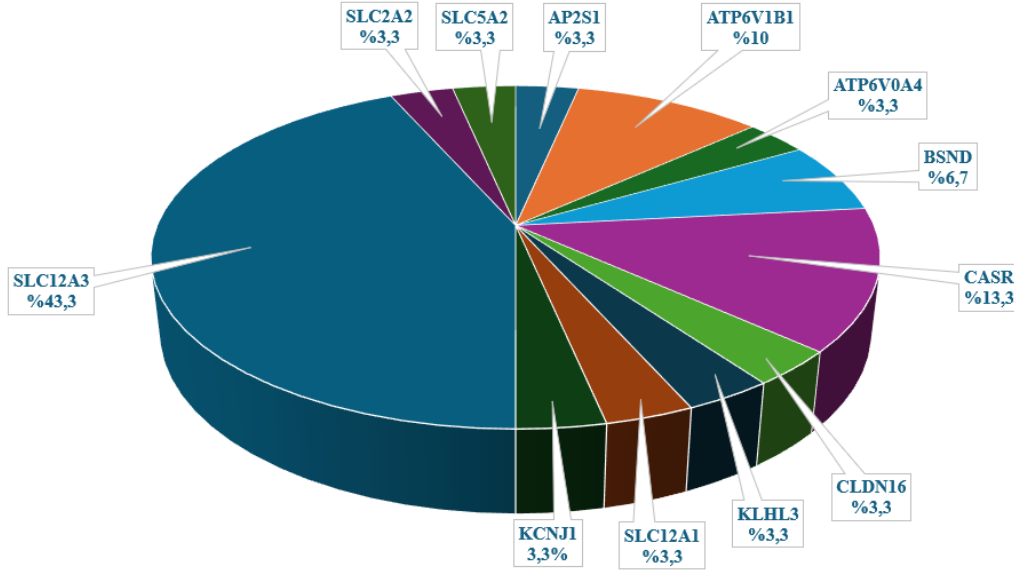


Şekil 4.5: Pediatrik ve erişkin hasta grubunda anne ve baba akrabalık durumları dağılımı.

4.2 Tespit Edilen Dizi Analizi Verilerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda ACMG kriterlerine (Richards ve ark., 2015) uygun şekilde patojenik, olası patojenik ve önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırılan nonsinonim varyantlar değerlendirildi. Ekzon-intron bileşkesindeki protein kodlamayan, nispeten korunmuş bölgelerde yerleşen dizi varyantlarını tanımlamak için 'splice bölge' varyantı terimi kullanıldı.

Yirmi altı hastada, 12 farklı gende varyant raporlanmıştı. Bazı hastalarda birden çok varyant raporlandığından, 24 farklı olmak üzere toplamda 30 varyant tespit edildi. Hastalarda en sık raporlanan gen *SLC12A3* idi (10 hasta, %38,5), bunu *CASR* (4 hasta, %15,4), *BSND* (2 hasta, %7,7) ve *ATP6V1B1* (2 hasta, %7,7) izledi. Şekil 4.6'da ise saptanan 30 varyantın genlere göre dağılımı görselleştirilmiştir.



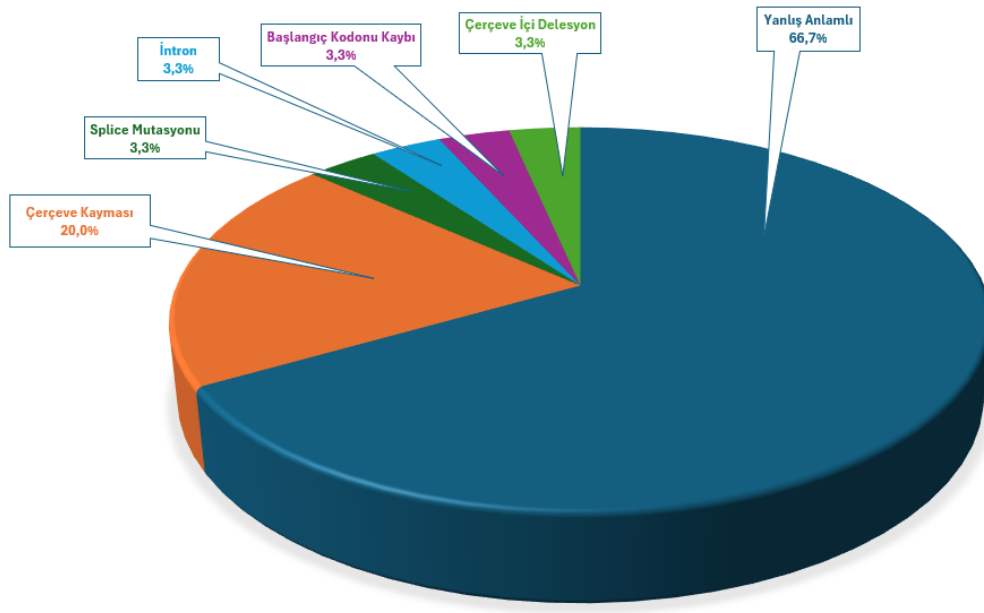
Şekil 4.6: Saptanan varyantların genlere göre dağılım oranları.

4.2.1 Saptanan varyant tipleri

Çalışmamızda tespit edilen 30 varyanttan büyük çoğunluğu (20 varyant, %66,7) yanlış anlamlı (missense) varyant idi. İkinci sırada (6 varyant, %20) çerçeve kayması (frameshift) varyantları yer alırken, diğer varyant tipleri eşit sıklıkta gözlemlendi (Tablo 4.1 ve şekil 4.7).

Tablo 4.1: Saptanan varyant tipleri ve sayıları.

Varyant tipi	Sayı ve yüzde (n, %)
Yanlış Anlamlı	20 (%66,7)
Çerçeve Kayması	6 (%20)
Splice Bölge	1 (%3,3)
İntron	1 (%3,3)
Başlangıç Kodonu Kaybı	1 (%3,3)
Çerçeve İçi Delesyon	1 (%3,3)
Toplam	30 (%100)



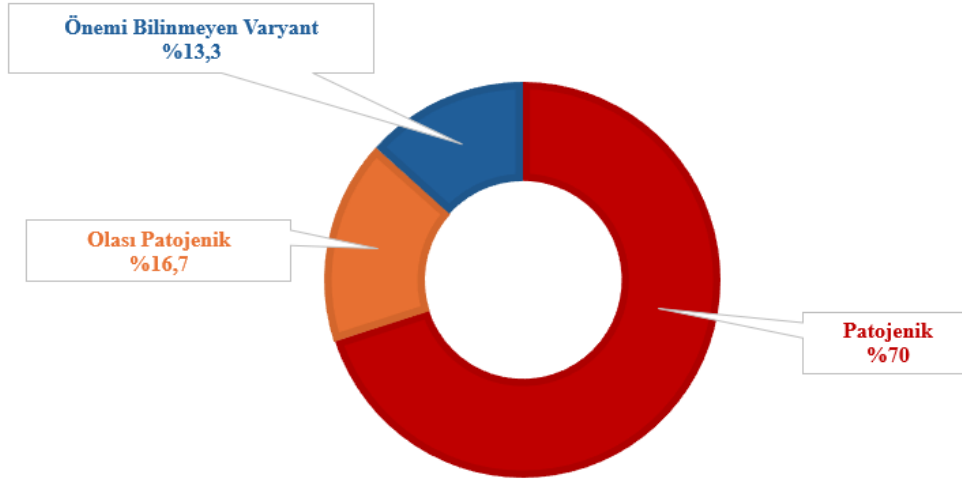
Şekil 4.7: Saptanan varyant tiplerinin dağılımını gösteren grafik.

4.2.2 Saptanan varyantların sınıflandırılması

Çalışmamıza raporlanan genlerde sadece patojenik, olası patojenik ve önemi bilinmeyen varyanta sahip hastalar dahil edildiği için, varyant sınıflandırması üç kategoriye ayrıldı. Otuz varyantın büyük çoğunluğu (n:21, %70) patojenik varyant kategorisinde idi. En düşük oranda (n:4, %13,3) ise önemi bilinmeyen varyant kategorisi izlendi (Tablo 4.2 ve şekil 4.8).

Tablo 4.2: Tüm varyantların patojenite sınıflandırmasına göre sayıları.

Tüm varyantların patojenitesi	Sayı ve yüzde (n, %)
Patojenik	21 (%70)
Olası Patojenik	5 (%16,7)
Önemi Bilinmeyen Varyant	4 (%13,3)
Toplam	30 (%100)



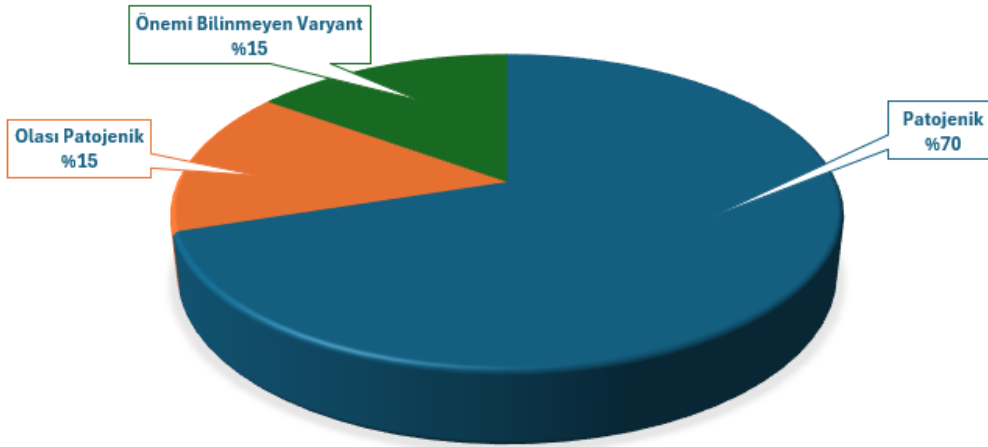
Şekil 4.8: Tüm varyantların patojeniteye göre dağılımı.

En sık saptanan ilk iki varyant tipi olan yanlış anlamlı ve çerçeve kayması varyantlarının patojenite sınıflandırmasına göre dağılımı sırasıyla tablo 4.3, şekil 4.9 ve tablo 4.4, şekil 4.10'da belirtildi.

Yanlış anlamlı varyantların istatistikleri

Tablo 4.3: Yanlış anlamlı varyantların patojenite sınıflamasına göre sayıları.

Yanlış anlamlı varyantların sınıflandırması	Sayı ve yüzde (n, %)
Patojenik	14 (%70)
Olası Patojenik	3 (%15)
Önemi Bilinmeyen Varyant	3 (%15)
Toplam	20 (%100)

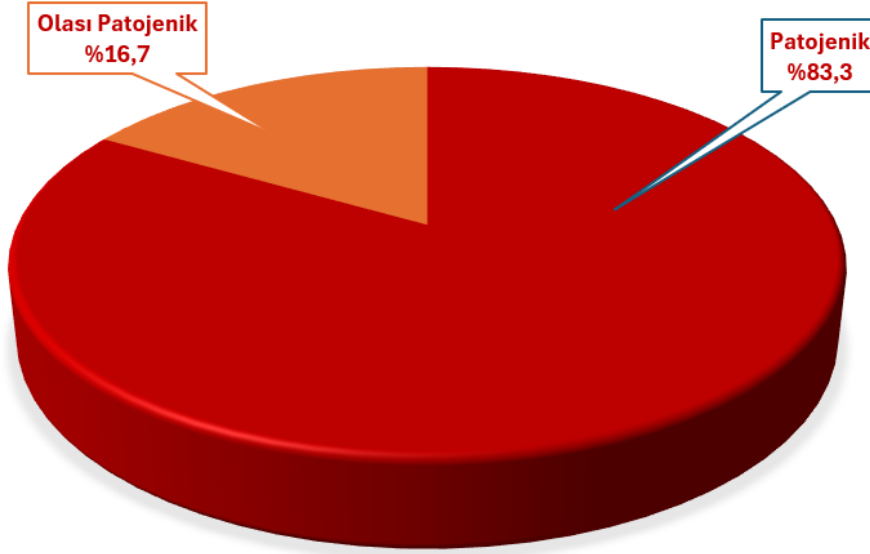


Şekil 4.9: Yanlış anlamlı varyantların patojeniteye göre dağılımı.

Çerçeve kayması varyantlarının istatistikleri

Tablo 4.4: Çerçeve kayması varyantlarının patojenite sınıflamasına göre sayıları.

Çerçeve kayması varyantlarının patojenitesi	Sayı ve yüzde (n, %)
Patojenik	5 (%83,3)
Olası Patojenik	1 (%16,7)
Önemi Bilinmeyen Varyant	-
Toplam	6 (%100)



Şekil 4.10: Çerçeve kayması varyantlarının patojeniteye göre dağılımı.

4.3 Olgular

NGS ile genetik tanı alan olguların başvuru esnasındaki ön tanılarına göre demografik özellikleri ve ilişkili genler tablo 4.5'te, ön tanı ve klinik bulguları tablo 4.6'da, varyant saptanan genler, varyant bilgileri gibi genotip özellikleri ve ilişkili fenotipleri tablo 4.7'de sunuldu.

Tablo 4.5: Olguların ön tanılarına göre demografik özellikleri ve ilişkili genler

Ön tanı	Hiperkalsemi	Hipokalsemi	Distal RTA	Bartter Sendromu	Gitelman Sendromu	Renal Fanconi Sendromu	Renal Glikozüri	Psödohipoaldosteronizm	Toplam
Hasta Sayısı	3	2	3	3	12	1	1	1	26
Cinsiyet (K/E)	3/0	2/0	2/1	3/0	8/4	1/0	0/1	1/0	20/6
Yaş, medyan (yıl);	7	8	10	2,5	24,5	0,8	50	4	20,5
(min-maks)	(7-42)	(5-11)	(3-23)	(0,3-16)	(19-40)				(0,3-50)
Akrabalık (%)	0	0	1 (33)	2 (67)	9 (75)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	15 (57,7)
Aile Öyküsü (%)	3 (100)	2 (100)	3 (100)	1 (33)	3 (25)	0	0	0	12 (46)
Varyant saptanan genler	<i>CASR, AP2S1</i>	<i>CASR</i>	<i>ATP6V04A, ATP6V1B1</i>	<i>BSND, SLC12A1</i>	<i>SLC12A3, CLDN16, KCNJ1</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>SLC5A2</i>	<i>KLHL3</i>	

K: Kadın, E: Erkek

Tablo 4.6: Olguların ön tanıları ve ilişkili klinik bulguları.

Olgu no	Yaş	Cinsiyet	Ön tanı	Klinik bulgular	Ailede renal hastalık öyküsü	Anne-baba akrabalık
O#1	11	K	Hipokalsemi	Yenidoğan döneminde nöbet geçirme, serum kalsiyum, magnezyum ve PTH düşük, fosfor yüksek, hiperkalsiüri, hiperokzalüri, nefrokalsinozis	+	-
O#2	5	K	Hipokalsemi	Kas krampları, serum kalsiyum, magnezyum ve PTH düşük, fosfor yüksek, idrar kalsiyum atılımı normal, nefrokalsinozis yok, tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonu	+	-
O#3	42	K	Hiperkalsemi	Serum kalsiyum ve PTH yüksek, fosfor düşük, paratiroid hiperplazisi/ adenomu yok, idrar kalsiyum atılımı düşük veya normal	+	-
O#4	7	K	Hiperkalsemi	Kabızlık, erken yorulma, kas ağrısı, serum kalsiyum, PTH ve magnezyum yüksek, fosfor düşük, paratiroid hiperplazisi/ adenomu yok, hipokalsiüri, hipofosfatüri	+	-
O#5	7	K	Hiperkalsemi	Kas güçsüzlüğü, serum kalsiyum yüksek, magnezyum hafif yüksek, fosfat hafif düşük, PTH normal, hipokalsiüri, renal yetmezlik yok, konuşma gecikmesi ve hafif düzeyde öğrenme güçlüğü	+	-
O#6	27	E	Gitelman sendromu	Evre 3 kronik böbrek hastalığı, metabolik asidoz, tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonu, nefrokalsinozis (4 yaştan itibaren), tekrarlayan nefrolitotomi, serum magnezyum düşük, PTH ve ürik asit yüksek, idrar magnezyum, kalsiyum atılımı artmış, proteinüri, lökositüri, hipositratüri	+	+
O#7	10	E	Distal RTA	İnfanal dönemde kusma, beslenememe, medüller nefrokalsinozis, bilateral ileri derecede SNİK, idrar ph>6.5, hiperkloremik metabolik asidoz, hiperkalsiüri, hipokalsemi, eklem ağrısı	+	-

Tablo 4.6: Olguların başvuru esnasındaki ön tanıları ve ilişkili klinik bulguları (Devamı).

Olgu no	Yaş	Cinsiyet	Ön tanı	Klinik bulgular	Ailede renal hastalık öyküsü	Anne-baba akrabalık
O#8	3	K	Distal RTA	Büyüme geriliği, 2 aylıktan geçirdiği pnömoni esnasında insidental tanı, bilateral ileri derecede SNİK, normal anyon açıklı metabolik asidoz, hipokalemi, idrar pH>6.5, hiperkalsiüri, böbrek parankiminde hafif ekojenite artışı	+	-
O#9	23	K	Distal RTA	Büyüme geriliği, kas güçsüzlüğü, bacaklarda ağrı, yürümeye zorlanma, infantil dönemde semptomların başlangıcı, skolyoz ve iskelet deformiteleri, tibia valgus, hiperkloremik metabolik asidoz, hipokalemi, hipokalsemi, hipofosfatem, hiperkalsiüri, SNİK, nefrokalsinozis, idrar pH >6.5, hiperamonyemi, idrada sitrat atılımı azalmış, okzalit atılımı artmış	+	+
O#10	2,5	K	Bartter Sendromu	Polihidroamniyoz, 31w prematür, düşük doğum ağırlığı, poliüri, ağır SNİK, büyüme ve gelişme geriliği, hipokalemi, hipokloremi, metabolik alkaloz, hiponatremi, hipermagnezemi, hiperkalsiüri, hiperaldosteronizm, böbrek parankiminde hafif ekojenite artışı, düşük idrar dansitesi	-	-
O#11	4 ay	K	Bartter Sendromu	Polihidroamniyoz, 32w3d prematür, düşük doğum ağırlığı, poliüri, dehidratasyon, hipotansiyon, hipokalemi, hipokloremi, metabolik alkaloz, hipomagnezemi, artmış Renin-Aldosteron, hiponatremi, hipokalsemi, 5 aylıktan hemodinamik instabilite ve çoklu organ yetmezliğinden eksitus	+	+
O#12	16	K	Bartter Sendromu	Polihidroamniyoz, 27w prematür, IVF gebeliği, düşük doğum ağırlığı, büyüme geriliği, tekrarlayan kusma-diare/kabızlık dehidratasyon atakları, normotansif, poliüri, prematür retinopatisine bağlı görme kaybı, sol böbrek pelvik yerleşimli, bilateral nefrokalsinozis ve ekojenite artışı, nöbet geçirme, hafif zihinsel yetersizlik, hipostenüri, metabolik alkaloz, hipokloremi, hipokalemi, hiperkalsemi, idrarda artmış kalsiyum, sodyum, potasyum ve klor atılımı	-	+
O#13	24	E	Gitelman Sendromu	Halsizlik, kas güçsüzlüğü, prenatal öykü bilinmiyor, çocukluk döneminde nöbet, hipokalemi, sınırda hipomagnezemi, metabolik alkaloz, hipostenüri, idrarda artmış potasyum atılımı, normokalsiüri, D vitamini düşük, PTH artmış	-	+
O#14	19	K	Gitelman Sendromu	Son bir yıldır yaygın kas güçsüzlüğü, kas krampları, normotansiyon, hipokalemi alkalozis, artmış Renin-Aldosteron, hipomagnezemi, idrarda potasyum ve magnezyum atılımı artmış	-	+
O#15	20	K	Gitelman Sendromu	3-4 yıldır ara ara karın ağrısı, kas güçsüzlüğü, abdominal ağrı, hipokalemi, hipokloremik metabolik alkaloz, hipomagnezemi	-	-
O#16	36	K	Gitelman Sendromu	Artmış Renin, hipomagnezemi, hafif hipokalemi, metabolik alkaloz, hipokloremi	+	+
O#17	24	K	Gitelman Sendromu	Son 8 aydır halsizlik, kas krampları, hipokalemi, hipomagnezemi, artmış Renin, hipokloremik metabolik alkaloz, hipermagneziüri, hipokalsiüri	-	+
O#18	35	K	Gitelman Sendromu	Kas güçsüzlüğü, hipokloremik metabolik alkaloz, hipokalemi, hipomagnezemi, artmış Renin-Aldosteron, hipokalsiüri, idrarda potasyum ve magnezyum atılımı artmış	+	+
O#19	25	K	Gitelman Sendromu	2 yıl önce doğum sonrasında kasılma, uyuşma, yaygın kas güçsüzlüğü, hipokalemi, hipomagnezemi, artmış Renin, hipokalsiüri, normoasidoz	-	-
O#20	21	K	Gitelman Sendromu	10 yıldır halsizlik, güçsüzlük, 3 yıldır epilepsi, hipokalemi, hipomagnezemi, hipokloremik metabolik alkaloz, hipokalsiüri, hipermagneziüri	-	+

Tablo 4.6: Olguların başvuru esnasındaki ön tanıları ve ilişkili klinik bulguları (Devamı).

Olgu no	Yaş	Cinsiyet	Ön tanı	Klinik bulgular	Ailede renal hastalık öyküsü	Anne-baba akrabalık
O#21	21	E	Gitelman Sendromu	Artmış Renin-Aldosteron, hipokloremik metabolik alkaloz, hipokalemi, hipomagnezemi, hipofosfatemi, hipokalsiüri	-	+
O#22	40	E	Gitelman Sendromu	Hipokalemi, hipokloremik metabolik alkaloz, Mg alt sınırda, Renin-Aldosteron normal, hipouürisemi, idrarda potasyum ve magnezyum atılımı artmış	-	-
O#23	34	K	Gitelman Sendromu	Kronik halsizlik, artmış defekasyon sıklığı, normotansiyon, kronik hipokalemi, metabolik alkaloz, hipomagnezemi, hipokloremi, artmış Renin, hiperkalsiüri,	-	+
O#24	10 ay	K	Renal Fanconi Sendromu	Büyüme geriliği, ateş, hepatomegali, KCTF yüksekliği, beslenme problemi, hipofosfatemi, hipokalsemi, hafif hipermagnezemi, hipouürisemi, serum ALP yüksek, glikozüri, proteinüri, ketonüri, böbreklerde hafif ekojenite artışı	-	+
O#25	50	E	Renal Glukozüri	İnsidental tanı, glukozüri (strip testi 3+), serum glukozu normal, HbA1C normal	-	+
O#26	4	K	Psödohipoaldosteronizm	Büyüme geriliği, hiperkalemi, hiponatremi, hiperkloremi, metabolik asidoz, hiperfosfatemi, düşük Renin, Aldosteron normal	-	+

K: Kadın, E: Erkek, PTH: Parathormon, SNİK: Sensörinöral İritme Kaybı, IVF: In Vitro Fertilizasyon, w: week/hafta, ALP: Alkalenfosfataz, KCTF: Karaciğer Fonksiyon Testi

Tablo 4.7: Olguların genotip özellikleri ve ilişkili fenotipleri.

Olgu no	Gen	Kalıtım kalıbı	Zigosite	Varyant lokasyonu	Protein değişimi	Varyant tipi	dbSNP ID	ACMG Kriterleri	Varyant sınıflandırması	Fenotip #MIM no
O#1	CASR	OD	Heterozigot	ENST00000498619.1:c.2519G>T Ekzon:7	p.G840V	Yanlış anlamlı	-*	PM2, PM5, PP2, PP3	Olası Patojenik	Hipokalsemi #601198
O#2	CASR	OD	Heterozigot	ENST00000498619.1:c.2329G>A Ekzon:7	p.E777K	Yanlış anlamlı	rs2074935748	PM2, PM5, PP2, PP3, PP5	Olası Patojenik	Hipokalsemi #601198
O#3	CASR	OD	Heterozigot	ENST00000498619.1:c.314C>A Ekzon:3	p.S105Y	Yanlış anlamlı	-*	PM2, PP2, PP3	Önemi Bilinmeyen Varyant	Hiperparatiroidi #239200
O#4	CASR	OD	Heterozigot	ENST00000498619.1:c.554G>A Ekzon:4	p.R185Q	Yanlış anlamlı	rs104893689	PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP5	Patojenik	FHH tip 1 #145980
O#5	AP2S1	OD	Heterozigot	ENST00000263270.6:c.44G>A Ekzon:5	p.R15H	Yanlış anlamlı	rs397514499	PS3, PS4, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5	Patojenik	FHH tip 3 #600740

Tablo 4.7: Olguların genotip özellikleri ve ilişkili fenotipleri (Devamı).

Olgu no	Gen	Kalıtım kalıbı	Zigosite	Varyant lokasyonu	Protein değişimi	Varyant tipi	dbSNP ID	ACMG Kriterleri	Varyant sınıflandırması	Fenotip #MIM no
O#6	CLDN16	OR	Homozigot	ENST00000264734.2:c.453G>T Ekzon:3	p.L151F	Yanlış anlamlı	rs104893729	PS3, PM2, PM3, PM5, PP3, PP5	Patojenik	Renal hipomagnezemi 3 #248250
O#7	ATP6V1B1	OR	Homozigot	ENST00000234396.4:c.1037C>G Ekzon:10	p.P346R	Yanlış anlamlı	rs781838938	PS3, PM2, PM3, PP3, PP5	Patojenik	Progresif işitme kaybı ile distal RTA 2 #267300
O#8	ATP6V1B1	OR	Birleşik Heterozigot	ENST00000234396.4:c.1037C>G Ekzon:10 ENST00000234396.4:c.484_486del Ekzon:6	p.P346R p.E162del	Yanlış anlamlı Çerçeve içi delesyon	rs781838938 rs1572920649	PS3, PM2, PM3, PP3, PP5 PM2, PM4	Patojenik Önemi Bilinmeyen Varyant	Progresif işitme kaybı ile distal RTA 2 #267300
O#9	ATP6V0A4	OR	Homozigot	ENST00000310018.7:c.292-1G>A İntron:5	-	Splice bölge	rs776867749	PVS1, PM2, PP5	Patojenik	Sensörinöral işitme kaybı olsun veya olmasın, distal RTA tip 3 #602722
O#10	BSND	OR	Homozigot	ENST00000371265.4:c.139G>A Ekzon:1	p.G47R	Yanlış anlamlı	rs74315289	PM3_VS, PS3, PM2, PP5	Patojenik	Bartter Sendromu tip 4a #602522
O#11	BSND	OR	Homozigot	ENST00000371265.4:c.1A>T Ekzon:1	p.M1?	Başlangıç kodonu kaybı	rs74315284	PVS1, PS1, PM2, PM3, PP5	Patojenik	Bartter Sendromu tip 4a #602522
O#12	SLC12A1	OR	Homozigot	ENST00000396577.3:c.2887_2888del Ekzon:24	p.L963Efs*4	Çerçeve kayması	-*	PVS1, PM2	Olası Patojenik	Bartter Sendromu tip 1 #601678
O#13	KCNJ1	OR	Homozigot	ENST00000392664.2:c.658C>T Ekzon:2	p.L220F	Yanlış anlamlı	rs200320892	PS3, PM2, PM3, PM5, PP3, PP5	Patojenik	Bartter Sendromu tip 2 # 241200
O#14	SLC12A3	OR	Homozigot	ENST00000438926.2:c.237_238dup Ekzon:1	p.R80Pfs*35	Çerçeve kayması	rs780299444	PVS1, PM2, PM3, PP5	Patojenik	Gitelman Sendromu #263800

Tablo 4.7: Olguların genotip özellikleri ve ilişkili fenotipleri (Devamı).

Olgu no	Gen	Kalıtım kalıbı	Zigosite	Varyant lokasyonu	Protein değişimi	Varyant tipi	dbSNP ID	ACMG Kriterleri	Varyant sınıflandırması	Fenotip #MIM no
O#15	SLC12A3	OR	Homozigot	ENST00000563236.6:c.514T>C Ekzon:4	p.W172R	Yanlış anlamlı	rs757792232	PM3_S, PM1, PM2, PP3, PP5	Patojenik	Gitelman Sendromu #263800
O#16	SLC12A3	OR	Homozigot	ENST00000563236.6:c.1928C>T Ekzon:16	p.P643L	Yanlış anlamlı	rs140012781	PM3_VS, PM2, PP3, PP5	Patojenik	Gitelman Sendromu #263800
O#17	SLC12A3	OR	Homozigot	ENST00000438926.2: c.2089_2095del Ekzon:17	p.T697Gfs*2	Çerçeve kayması	rs771701344	PVS1, PM2, PM3, PP5	Patojenik	Gitelman Sendromu #263800
O#18	SLC12A3	OR	Homozigot	ENST00000438926.2:c.1672T>C Ekzon:14	p.W558R	Yanlış anlamlı	-*	PM2, PP3	Önemi Bilinmeyen Varyant	Gitelman Sendromu #263800
O#19	SLC12A3	OR	Birleşik Heterozigot	ENST00000438926.2: c.237_238dup Ekzon:1	p.R80Pfs*35	Çerçeve kayması	rs780299444	PVS1, PM2, PM3, PP5	Patojenik	Gitelman Sendromu #263800
				ENST00000438926.2:c.1928C>T Ekzon:16	p.P643L	Yanlış anlamlı	rs140012781	PM3_VS, PM2, PP3, PP5	Patojenik	
O#20	SLC12A3	OR	Birleşik Heterozigot	ENST00000438926.2: c.237_238dup Ekzon:1	p.R80Pfs*35	Çerçeve kayması	rs780299444	PVS1, PM2, PM3, PP5	Patojenik	Gitelman Sendromu #263800
				ENST00000438926.2:c.1928C>T Ekzon:16	p.P643L	Yanlış anlamlı	rs140012781	PM3_VS, PM2, PP3, PP5	Patojenik	
O#21	SLC12A3	OR	Homozigot	ENST00000438926.2:c.1925G>A Ekzon:15	p.R642H	Yanlış anlamlı	rs147901432	PM1, PM2, PM3, PM5, PP3	Patojenik	Gitelman Sendromu #263800
O#22	SLC12A3	OR	Birleşik Heterozigot	ENST00000438926.2:c.1763C>T Ekzon:14	p.A588V	Yanlış anlamlı	rs121909382	PS3, PM2, PM3, PM5, PP3, PP5	Patojenik	Gitelman Sendromu #263800
				ENST00000438926.2:c.1963C>T Ekzon:16	p.R655C	Yanlış anlamlı	rs747249619	PM3_VS, PM1, PM2, PM5, PP3	Patojenik	

Tablo 4.7: Olguların genotip özellikleri ve ilişkili fenotipleri (Devamı).

Olgu no	Gen	Kalıtım kalıbı	Zigosite	Varyant lokasyonu	Protein değişimi	Varyant tipi	dbSNP ID	ACMG Kriterleri	Varyant sınıflandırması	Fenotip #MIM no
O#23	SLC12A3	OR	Homozigot	ENST00000438926.2: c.237_238dup Ekzon:1	p.R80Pfs*35	Çerçeve kayması	rs780299444	PVS1, PM2, PM3, PP5	Patojenik	Gitelman Sendromu #263800
O#24	SLC2A2	OR	Homozigot	ENST00000314251.8:c.380C>A Ekzon:4	p.A127D	Yanlış anlamlı	rs760201098	PS3, PM2, PM3, PP3	Olası Patojenik	Fanconi-Bickel Sendromu #227810
O#25	SLC5A2	OD/OR	Homozigot	ENST00000330498.3:c.885+5G>A İntron:7	-	İntronik	rs200228142	PS4, PM2, PP3, PP5	Olası Patojenik	Renal Glukozüri # 233100
O#26	KLHL3	OD/OR	Homozigot	ENST00000309755.9:c.161T>C Ekzon:3	p. I54T	Yanlış anlamlı	-*	PM2, PP3, PP4	Önemi Bilinmeyen Varyant	Psödohipoaldosteronizm tip 2d #614495

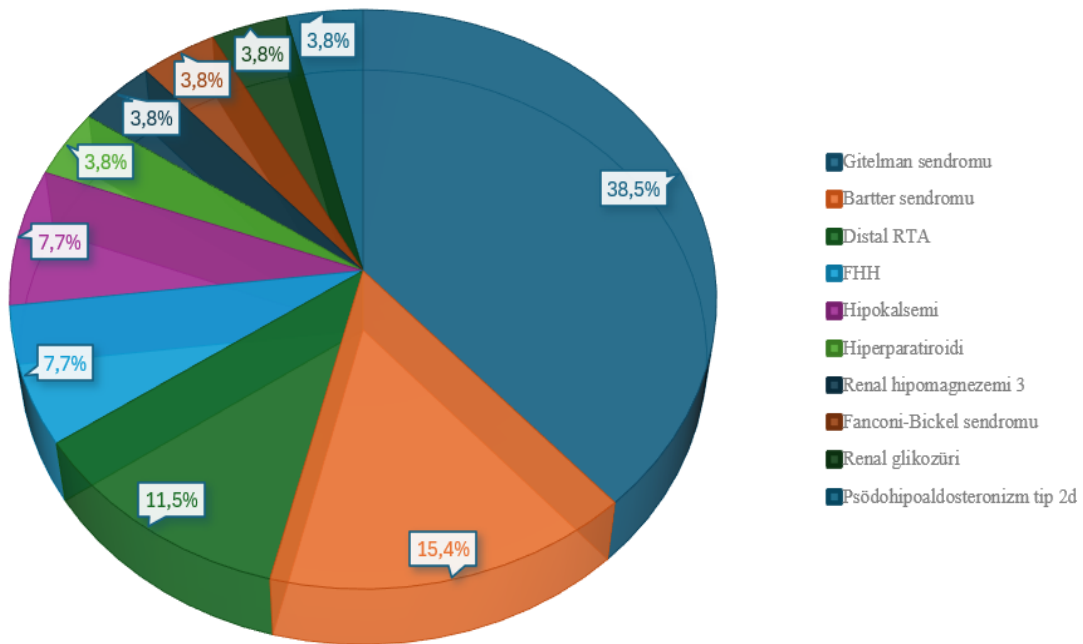
OD: Otozomal Dominant, OR: Otozomal Resesif, dbSNP: database of Single Nucleotide Polymorphism, MIM: Mendelian Inheritance in Man FHH: Familyal Hipokalsiürik Hiperkalsemi

*: Daha önce tanımlanmamış yeni (novel) varyant

Genetik test sonrası tanı dağılımı

Çalışmamızda yer alan 26 hastada NGS yöntemi ile yapılan genetik analiz sonucunda, en sık saptanan kalıtsal tübülopati %38,5 oranı ile (n=10) Gitelman sendromu olmuştur. İkinci sıklıkta, %15,4 oranında (n=4) Bartter sendromu (Tip 1, Tip 2 ve Tip 4a dahil) tespit edilmiştir. Üçüncü sırada ise %11,5 oranı ile (n=3) distal renal tübüler asidoz (dRTA) olguları yer almaktadır. Bunu, %7,7 oranı ile eşit sıklıkta saptanan ailesel hipokalsiürik hiperkalsemi (FHH; Tip 1 ve Tip 3 dahil) ve hipokalsemi olguları takip etmiştir.

Diğer yandan, her biri %3,8 oranında olmak üzere (n=1) hiperparatiroidi, renal hipomagnezemi tip 3, Fanconi-Bickel sendromu, renal glukozüri ve psödohipoaldosteronizm tip 2d olguları tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Ayrıca, genetik test uygulaması sonucunda 2 olguda (%7,7) (O#6 ve O#13) önceki klinik tanının değiştiği belirlenmiştir.



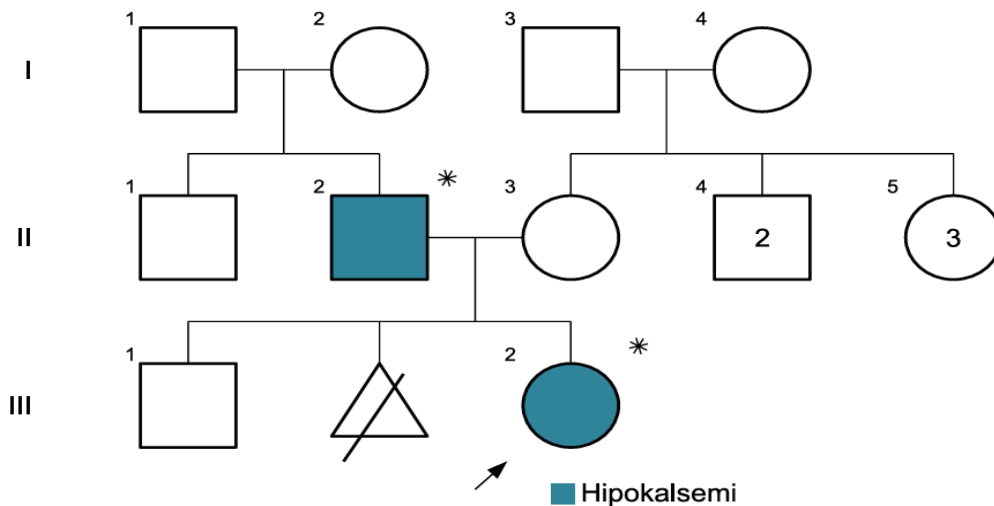
Şekil 4.11: NGS yöntemi ile genetik test sonrası olguların tanı dağılım yüzdeleri

Olgu örnekleri

Aşağıda ilgili gen varyantına ait aile taraması analiz sonuçları bulunan, novel varyant saptanan ya da ailesinde aynı hastalık öyküsü bulunan olguların verileri detaylı olarak sunulmuştur.

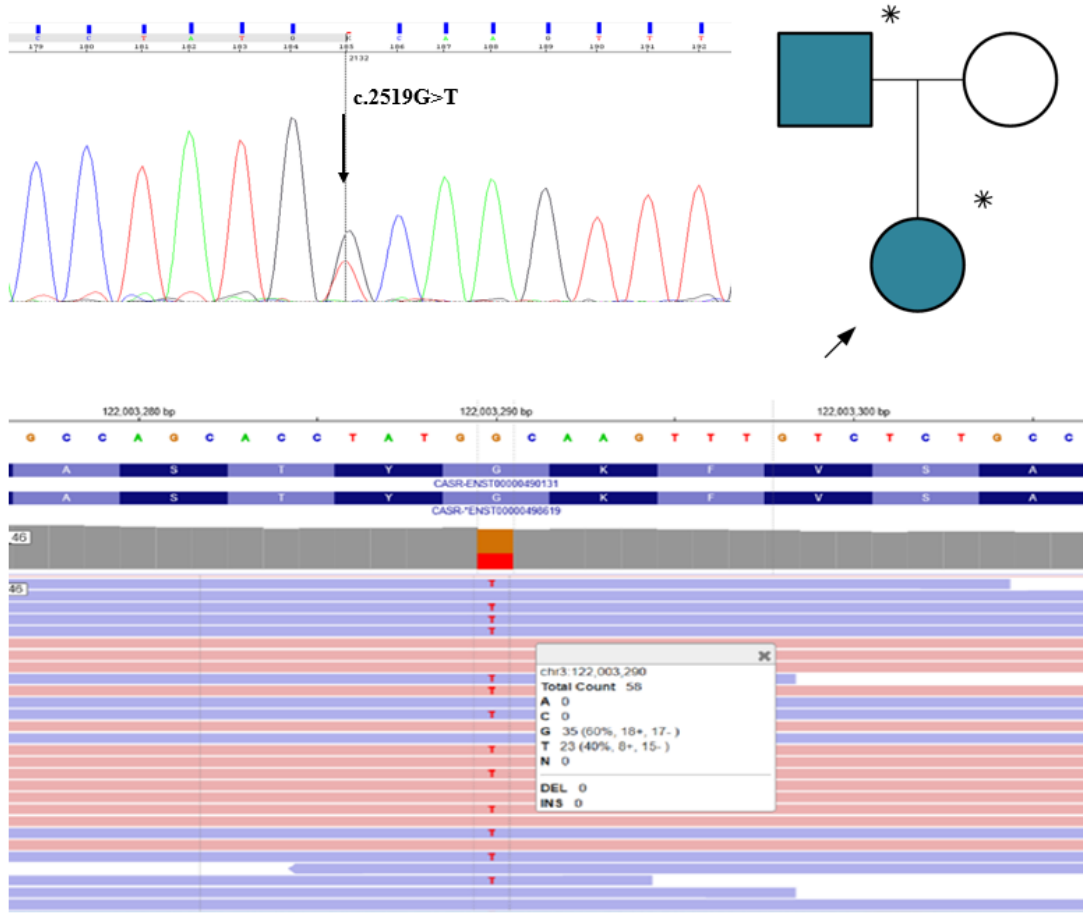
Olgu 1 (O#1)

11 yaş kız hasta, hiperkalsiürik hipokalsemi ön tanısı ile Tıbbi Genetik polikliniğine NGS ile kalıtsal tübüler hastalık paneli çalışılması için yönlendirilmişti. Özgeçmişinde yenidoğan döneminde nöbet geçirme, kan kalsiyum seviyesinde düşüklük olduğu, sonrasında hipoparatiroidi ve böbrek taşı nedeniyle takip ve tedavi edildiği öğrenildi. Fizik muayenesinde dismorfik bulgu saptanmayan hastanın, klinik ve laboratuvar bulguları arasında hipokalsemi, Parathormon (PTH) düşüklüğü, hiperfosfatemi, hipomagnezemi, nefrokalsinozis, hiperkalsiüri, hiperokzalüri yer almaktaydı. Aile öyküsünde 46 yaşındaki babasında benzer bir öykü bulunmakta ve ebeveynler arasında akrabalık yoktu (Şekil 4.12). Babanın anamnezinde 8 yıldır ara ara bacaklarda kasılma, kas ağrısı olduğu, hipoparatiroidizm klinik tanısı ile takip edildiği, kalsiyum iyonları, kolekalsiferol ve kalsitriol tedavisi aldığı öğrenildi. Laboratuvar incelemelerinde ise hipokalsemi, PTH düşük, fosfor yüksek, magnezyum normalin alt sınırında gözlemlendi. Olgudan kalıtsal tübülopati genlerinin incelenmesine yönelik yapılan hedeflenmiş NGS analizinde, *CASR* (*ENST00000498619.1*) geni ekzon 7’de heterozigot *c.2519G>T*, p. G840V yanlış anlamlı varyantı saptanmıştı. Varyant ACMG kriterlerine göre “olası patojenik” (PM2, PM5, PP2, PP3) olarak sınıflandırıldı ve daha önce literatürde bildirilmemiş “novel” nitelikteydi. Olgunun otozomal dominant kalıtılan “Hipokalsemi” (MIM #601198) fenotipi ile uyumlu olduğu saptandı. İlgili varyantın, paternal kalıtıldığı Sanger dizileme ile gösterildi. O#1 ve babasına ait moleküler analiz görüntüleri Şekil 4.13’te gösterilmiştir.



Şekil 4.12: O#1’e ait aile ağacı.

Moleküler analiz çalışılan bireyler sağ üst köşede “*” işareti ile gösterilmektedir.

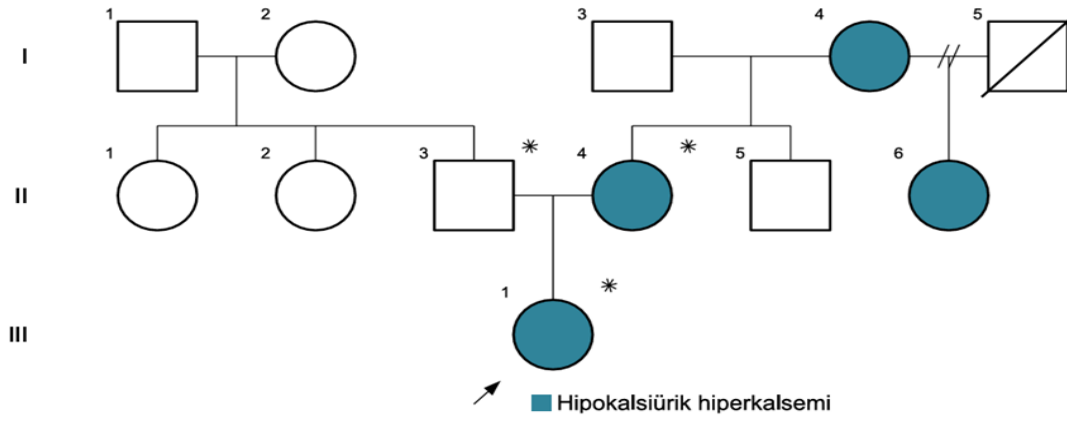


Şekil 4.13: O#1 ve babasında heterozigot CASR (ENST00000498619.1) geni c.2519G>T varyantına ait moleküler analiz görüntüleri (Sol üstte babanın Sanger elektroferogram görüntüsü, altta olguya ait IGV görüntüsü).

Olgu 5 (O#5)

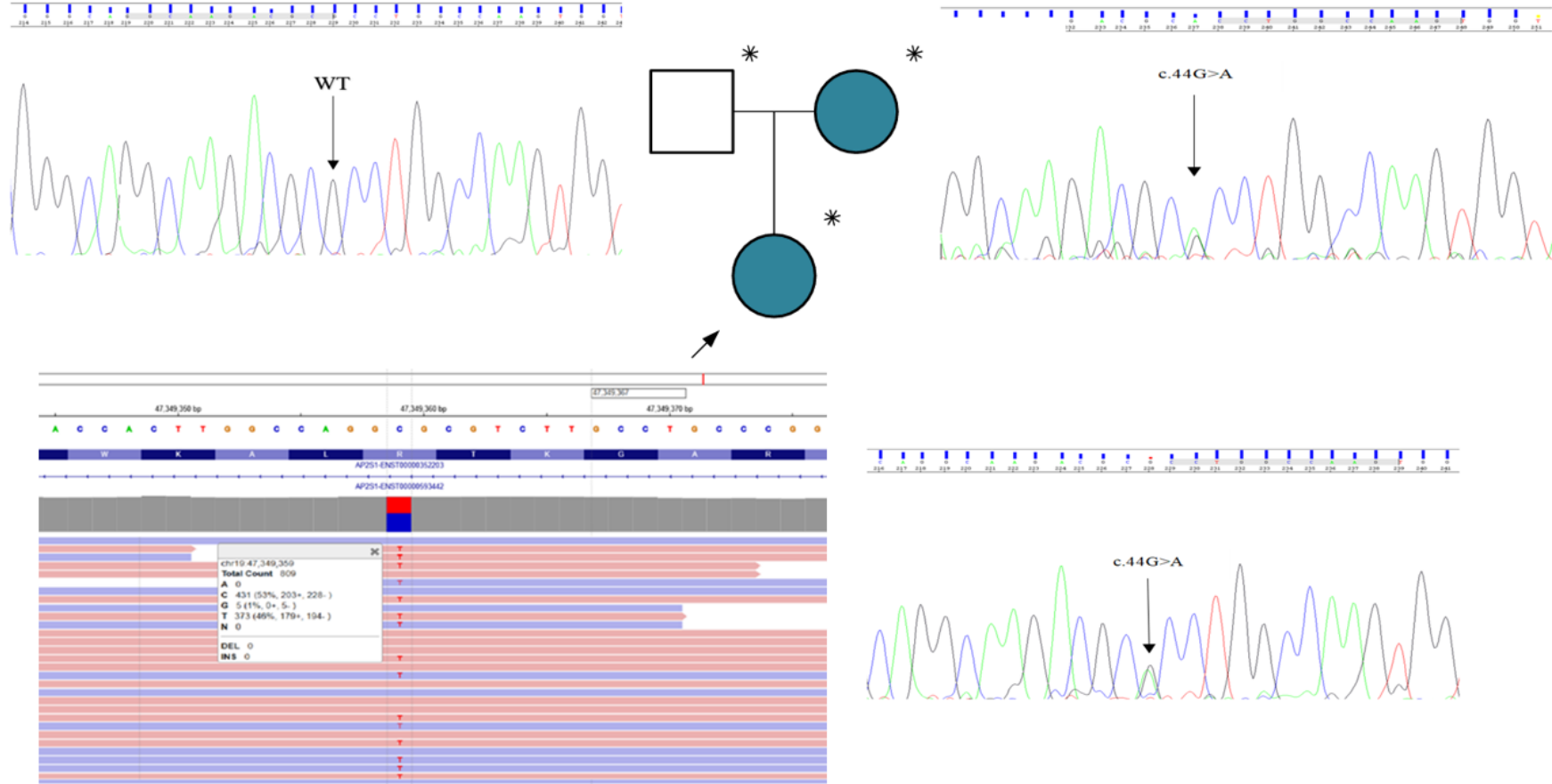
7 yaş kız hasta, hipokalsürik hiperkalsemi ön tanısı ile Tıbbi Genetik polikliniğine NGS ile kalıtsal tübüler hastalık paneli çalışılması için yönlendirilmişti. Anamnezinde, ilk kez 3 yaşında karın ağrısı, bulantı-kusma ve halsizlik şikayetleri ile hastaneye başvurduğu, bu başvuru sırasında kan kalsiyum düzeyinin yüksek saptandığı öğrenildi. Ayrıca nöromotor gelişim basamaklarının sorgulanmasında, konuşma gecikmesi ve hafif düzeyde öğrenme güçlüğü olduğu belirtilmişti. Fizik muayenesinde dismorfik bulgu saptanmayan hastanın, klinik ve laboratuvar bulguları arasında kas güçsüzlüğü, hiperkalsemi, hipokalsüri, hafif hipofosfatemi, sınırda hipermağnezemi ve normal PTH seviyeleri yer almaktaydı. Ailede asemptomatik olan annesinin, anneannesinin ve teyzesinin aile taraması amacıyla yapılan laboratuvar tetkiklerinde, hiperkalsemi bulunmaktaydı ve olgunun ebeveynleri arasında akrabalık yoktu (Şekil 4.14). Ayrıca Annenin laboratuvar incelemelerinde hiperkalsemi,

hipokalsiüri, sınırda hipermağnezemi ve normal PTH seviyeleri gözlemlendi. Olgudan kalıtsal tübülöpati genlerinin incelenmesine yönelik yapılan hedeflenmiş NGS analizinde, *AP2S1* (*ENST00000263270.6*) geni ekzon 5'te heterozigot c.44G>A, p.R15H yanlış anlamlı varyantı saptanmıştı. Varyant ACMG kriterlerine göre “patojenik” (PS3, PS4, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5) olarak sınıflandırıldı. Bu varyant daha önce literatürde ve ClinVar veritabanında 39426 ID numarası ile FHH tip 3 için “patojenik” olarak bildirilmişti. Olgunun otozomal dominant kalıtılan “FHH tip 3” (MIM #600740) fenotipi ile uyumlu olduğu tespit edildi. Sanger dizileme yöntemi ile yapılan aile taramasında, ilgili varyantın maternal kalıtıldığı gözlemlendi. O#5 ve ebeveynlerine ait moleküler analiz görüntüleri Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14: O#5'e ait aile ağacı.

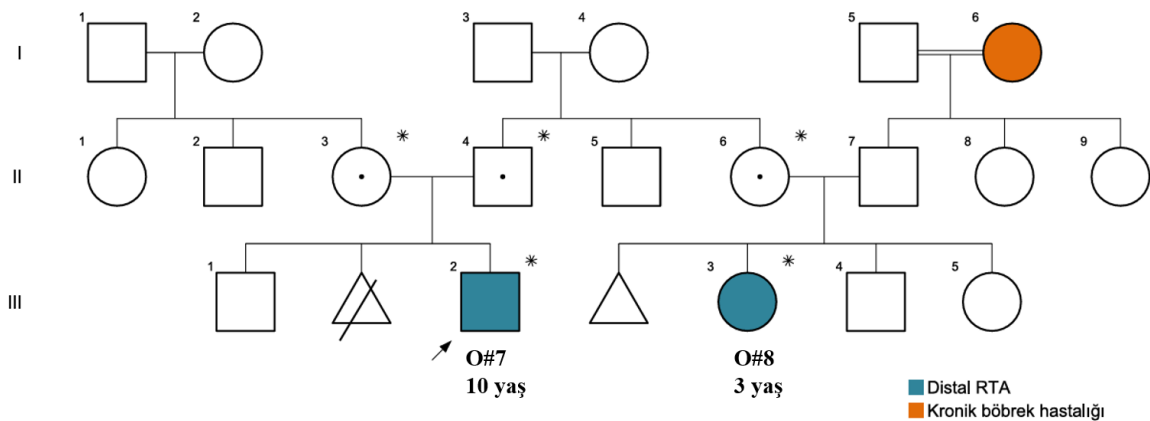
Moleküler analiz çalışılan bireyler sağ üst köşede “*” işareti ile gösterilmektedir.



Şekil 4.15: O#5 ve ebeveynlerine ait AP2S1 (ENST00000263270.6) geni c.44G>A varyantına ait (reverse okuma C>T) moleküler analiz görüntüleri (Sol üstte babanın -referans dizi, WT alel-, sağ üstte annenin -varyant heterozigot- Sanger elektroferogram görüntüsü, altta olguya ait IGV ve Sanger elektroferogram görüntüsü). WT: wild type

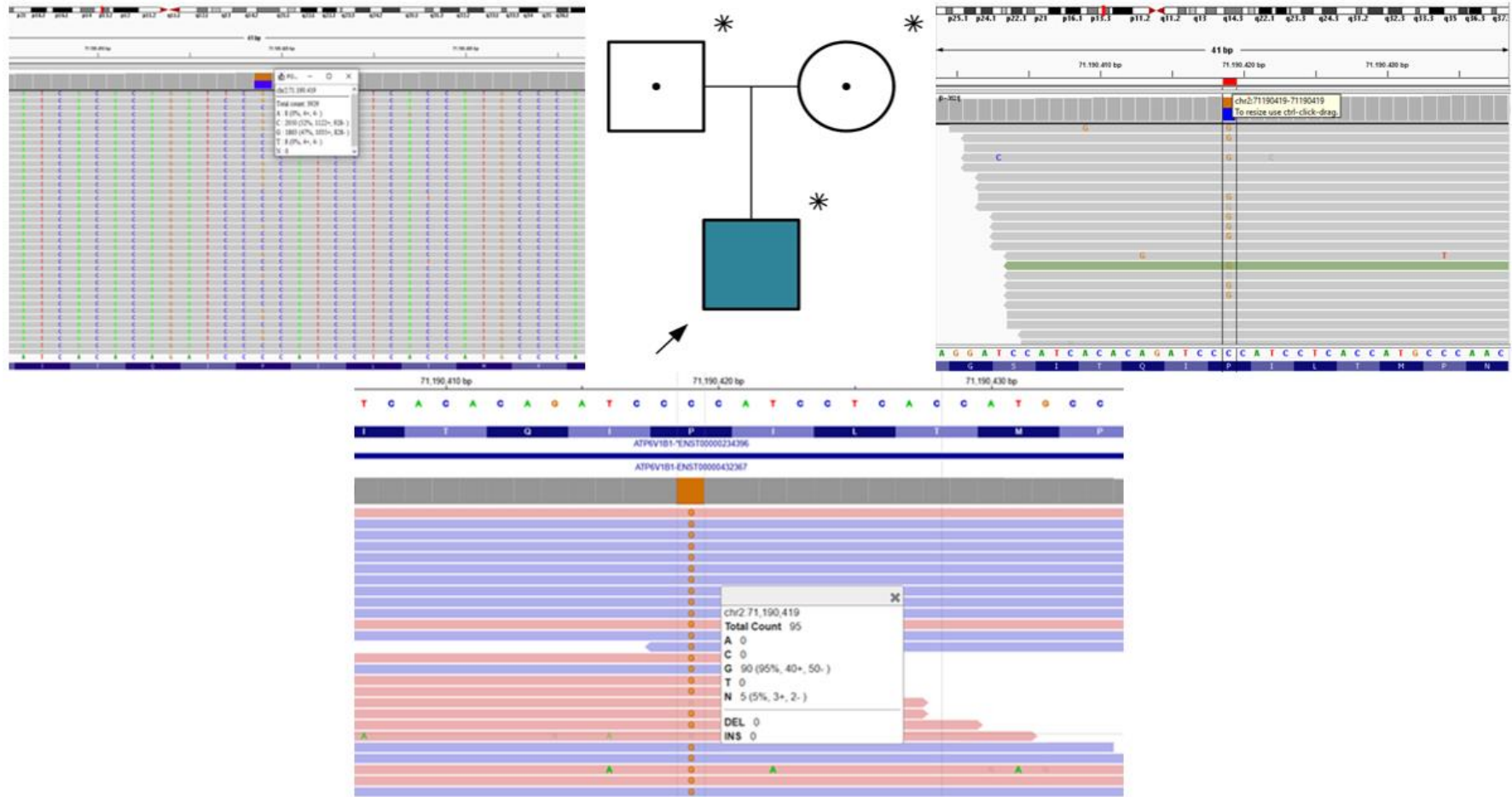
Olgu 7 (O#7)

10 yaş erkek olgu, distal RTA ön tanısı ile Tıbbi Genetik polikliniğine NGS ile kalıtsal tübüler hastalık paneli çalışılması için yönlendirilmişti. Anamnezde ilk kez 40 günlükken kusma, beslenme problemi, huzursuzluk nedeniyle yapılan hastane başvurusunda, elektrolit seviyelerinde anormallik olduğu, sonrasında RTA tanısıyla takip ve tedavisinin devam ettiği, 19 aylıkken işitme kaybı nedeniyle koklear implant cerrahisi geçirdiği öğrenildi. Fizik muayenesinde dismorfik bulgu saptanmayan hastanın, klinik ve laboratuvar bulguları arasında eklem ağrısı, bilateral ileri derecede SNİK, hiperkloremik metabolik asidoz, idrar pH>6.5, hiperkalsiüri, hipokalemi, medüller nefrokalsinozis yer almaktaydı. Aile öyküsünde 3 yaşındaki halasının kızında (O#8) da aynı hastalık bulunmaktaydı ve ebeveynler arasında akrabalık yoktu (Şekil 4.16: O#7 ve O#8'e ait aile ağacı çizimi). Olgudan kalıtsal tübülopati genlerinin incelenmesine yönelik yapılan hedeflenmiş NGS analizinde, *ATP6V1B1* (*ENST00000234396.4*) geni ekzon 10'da homozigot c.1037C>G, p.P346R yanlış anlamlı varyantı saptanmıştı. Varyant ACMG kriterlerine göre “patojenik” (PS3, PM2, PM3, PP3, PP5) olarak sınıflandırıldı. Bu varyant daha önce literatürde ve ClinVar veritabanında 280139 ID numarası ile renal tübüler asidoz ve progresif nöronal sağırılık için “patojenik” olarak bildirilmişti. Olgunun otozomal resesif kalıtılan “Progresif işitme kaybı ile distal RTA 2” (MIM # 267300) fenotipi ile uyumlu olduğu tespit edildi. *ATP6V1B1* geni hedeflenmiş dizileme analizi ile yapılan aile taramasında, ilgili varyant için anne ve babanın heterozigot taşıyıcı olduğu gözlemlendi. O#7 ve ebeveynlerine ait moleküler analiz görüntüleri Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



Şekil 4.16: O#7 ve O#8'e ait aile ağacı.

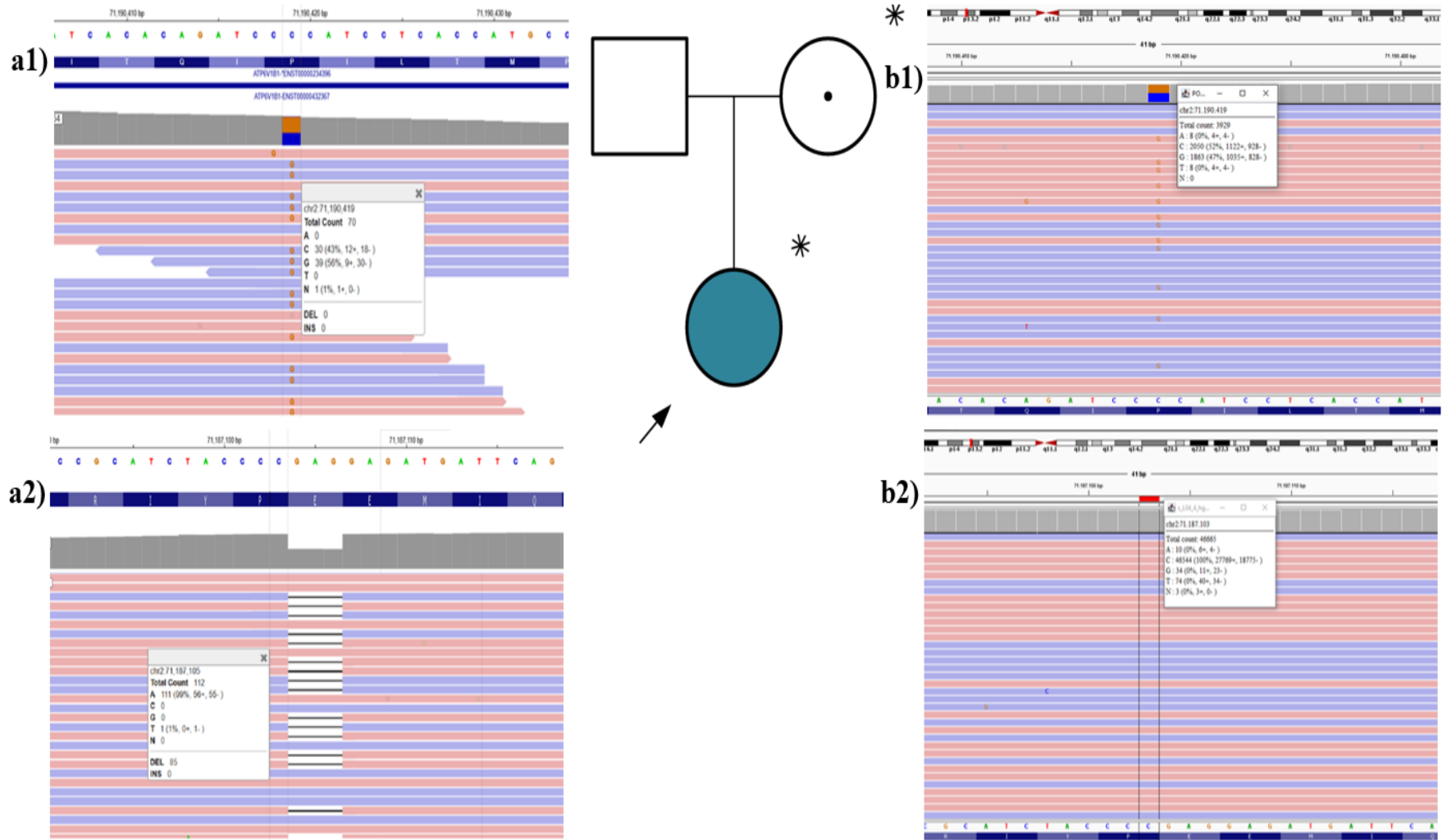
Moleküler analiz çalışılan bireyler sağ üst köşede “*” işareti ile gösterilmektedir.



Şekil 4.17: O#7 ve ebeveynlerine ait ATP6V1B1 (ENST00000234396.4) geni c.1037C>G varyantı moleküler analiz görüntüleri (Sol üstte babanın -varyant heterozigot- sağ üstte annenin -varyant heterozigot-, altta olguya ait -varyant homozigot- IGV görüntüsü).

Olgu 8 (O#8)

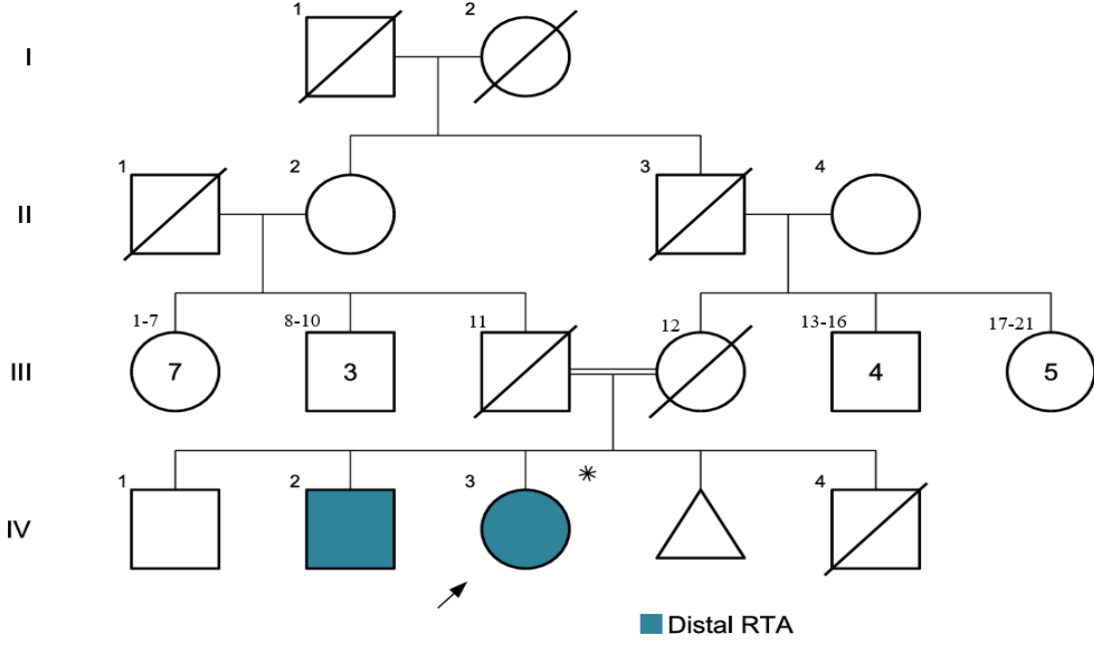
3 yaş kız olgu, distal RTA ön tanısı ile Tıbbi Genetik polikliniğine NGS ile kalıtsal tübüler hastalık paneli çalışılması için yönlendirilmişti. Anamnezde 2 aylıkken geçirdiği pnömoni nedeniyle hastane yatışı esnasında insidental RTA tanısı aldığı, takip ve tedavisinin devam ettiği, işitme kaybı nedeniyle koklear implant cerrahisi planlandığı öğrenildi. Fizik muayenesinde dismorfik bulgu saptanmayan hastanın, klinik ve laboratuvar bulguları arasında büyüme geriliği, , bilateral ileri derecede SNİK, normal anyon açıklı metabolik asidoz, hipokalemi, idrar ph>6.5, hiperkalsiüri, böbrek parankiminde hafif ekojenite artışı mevcuttu. Aile öyküsünde 10 yaşındaki dayısının oğlunda (O#7) da aynı hastalık bulunmaktaydı ve ebeveynler arasında akrabalık yoktu (Şekil 4.18: O#7 ve O#8'e ait aile ağacı çizimi). Olgudan kalıtsal tübülopati genlerinin incelenmesine yönelik yapılan hedeflenmiş NGS analizinde, *ATP6V1B1* (*ENST00000234396.4*) geni ekzon 10'da heterozigot c.1037C>G, p.P346R yanlış anlamlı varyantı ve ekzon 6'da çerçeve içi delesyona yol açan heterozigot c.484_486del, p.E162del varyantı saptanmıştı. Varyantlardan ilki ACMG kriterlerine göre “patojenik” (PS3, PM2, PM3, PP3, PP5), ikincisi ise “ önemi bilinmeyen varyant” (PM2, PM4) olarak sınıflandırıldı. ClinVar veritabanında, yanlış anlamlı varyant 280139 ID numarası ile renal tübüler asidoz ve progresif nöronal sağırılık için “patojenik”, çerçeve içi delesyon varyantı ise 635435 ID numarası ile “ önemi bilinmeyen varyant” olarak bildirilmişti. Olgunun otozomal resesif kalıtılan “Progresif işitme kaybı ile distal RTA 2” (MIM # 267300) fenotipi ile uyumlu olduğu tespit edildi. İlgili varyantların cis-trans pozisyonunu belirlemek için aile taraması önerilmiş, ancak yalnızca anne katılım sağlamıştı. Olgunun asemptomatik olan annesinin, *ATP6V1B1* geni hedeflenmiş dizileme analizinde c.1037C>G varyantı için heterozigot taşıyıcı olduğu, c.484_486del varyantı için referans genomla aynı diziye sahip olduğu belirlendi. Böylece semptomatik olguda saptanan değişimlerin birleşik heterozigot varyant olduğu teyit edildi, ancak c.484_486del varyantının *de novo* oluşup oluşmadığı veya babadan aktarıldığı değerlendirilemedi. O#8 ve annesine ait moleküler analiz görüntüleri Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



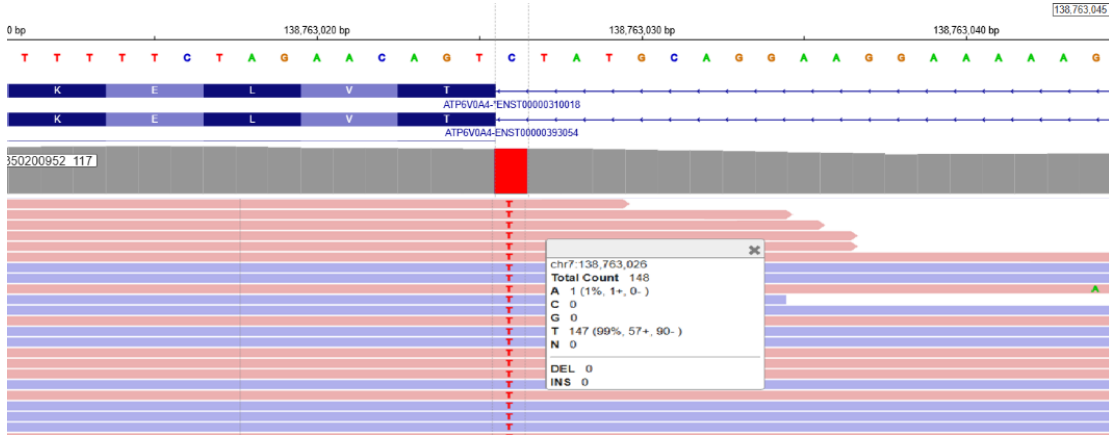
Şekil 4.18: O#8 ve annesine ait ATP6V1B1 (ENST00000234396.4) geni varyantlarının moleküler analiz görüntüleri. a1) Olguya ait heterozigot c.1037C>G varyantının, a2) olguya ait heterozigot c.484_486del varyantının, b1) annesine ait heterozigot c.1037C>G varyantının IGV görüntüsü, b2) annesinde c.484_486del varyantı bölgesinde WT alelin IGV görüntüsü.

Olgu 9 (O#9)

RTA ön tanısı ile takipli 23 yaş kadın olgu, elektrolit replasmanı için hastane yatışı esnasında sendromik görünüm ve renal hastalık nedeniyle tarafımıza konsülte edilmişti. 40 günlük genel durum bozukluğu nedeniyle yapılan hastane yatışında, elektrolit seviyelerinde anormallik olduğu, sonrasında RTA klinik tanısı aldığı öğrenildi. Hasta 9 yaşından beri kemik ağrısı, kemiklerde şekil bozukluğu ve kas krampları nedeniyle yürümekte zorluk çekmekteydi, ayrıca sağ bacakta bir kez kırık öyküsü mevcuttu. Fizik muayenesinde yüksek ve geniş alın, konveks burun sırtı, geniş burun tabanı, aşağı dönük kalın kaşlar, zigomatik hipoplazi gibi fasiyal dismorfik bulguları gözlenmişti. Klinik ve laboratuvar bulguları arasında büyüme-gelişme geriliği, kas güçsüzlüğü, rotoskolyoz, genu valgum, rikets ile uyumlu iskelet deformiteleri, hiperkloremik metabolik asidoz, hipokalemi, hipokalsemi, hipofosfatemi, hiperkalsiüri, SNİK, nefrokalsinozis, idrar pH>6.5, artmış kan amonyak seviyesi, idrarda artmış okzalit atılımı ve azalmış sitrat atılımı yer almaktaydı. Aile öyküsünde 27 yaşındaki abisinde de erken çocukluk döneminden beri aynı hastalık bulunmaktaydı ve ebeveynler arasında akrabalık mevcuttu (Şekil 4.19: O#9'a ait aile ağacı çizimi). Olgudan kalıtsal tübülopati genlerinin incelenmesine yönelik yapılan hedeflenmiş NGS analizinde, *ATP6V0A4* (*ENST00000310018.7*) geni intron 5- ekzon 6 bileşkesinde fonksiyon kaybına yol açan, homozigot c.292-1G>A, splice akseptör varyantı saptanmıştı (Şekil 4.20). Varyant ACMG kriterlerine göre “ patojenik” (PVS1, PM2, PP5) olarak sınıflandırıldı. Bu varyant daha önce literatürde ve ClinVar veritabanında 1323843 ID numarası ile distal renal tübüler asidoz tip 3 için “patojenik/olası patojenik” olarak bildirilmişti. Olgunun otozomal resesif kalıtılan “Sensörinöral işitme kaybı olsun veya olmasın, distal RTA tip 3” MIM #602722 fenotipi ile uyumlu olduğu tespit edildi.



Şekil 4.19: O#9'a ait aile ağacı.

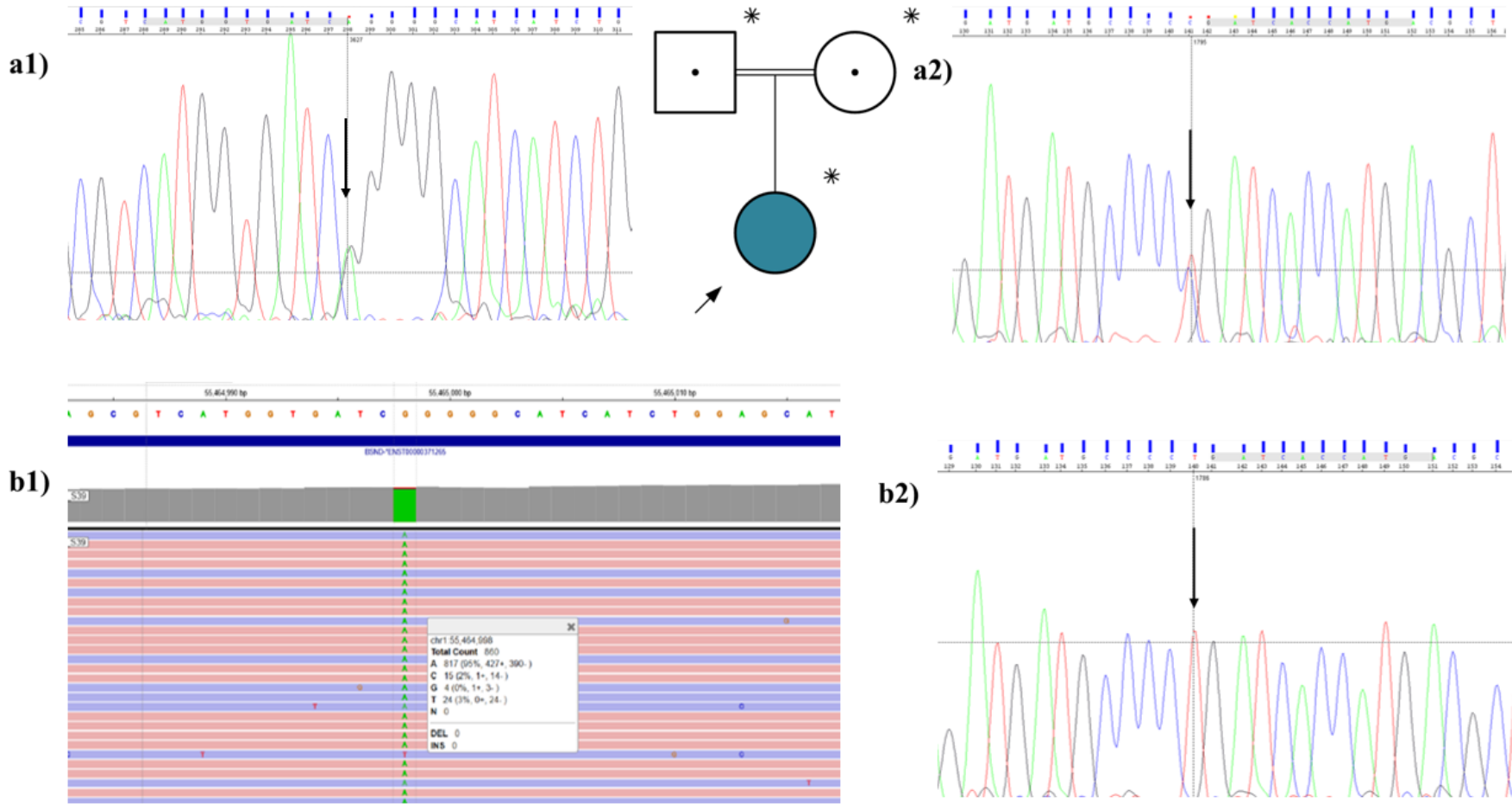


Şekil 4.20: O#9'a ait ATP6V0A4 (ENST00000310018.7) geni homozigot c.292-1G>A varyantının IGV görüntüsü (reverse okuma C>T).

Olgu 10 (O#10)

2,5 yaş kız hasta, Bartter sendromu ön tanısı ile Tıbbi Genetik polikliniğine NGS ile kalıtsal tübüler hastalık paneli çalışılması için yönlendirilmişti. Prenatal öyküde, polihidroamniyoz ve intrauterin gelişme geriliği mevcuttu. Hasta, 31. gebelik haftasında sezeryan ile 1700 gram ağırlığında doğmuştu. Doğum sonrası, prematüriteye bağlı sorunlar ve elektrolit dengesizliği nedeniyle hasta, 35 gün boyunca yenidoğan yoğun bakım ünitesinde tedavi edilmişti. Olguya 6 aylıkken Bartter sendromu ön tanısı konmuş, sonrasında takip ve tedavisi devam ettiği, 18 aylıkken konjenital işitme kaybı nedeniyle koklear implant cerrahisi geçirdiği öğrenildi. Fizik muayenesinde belirgin dismorfik bulgu

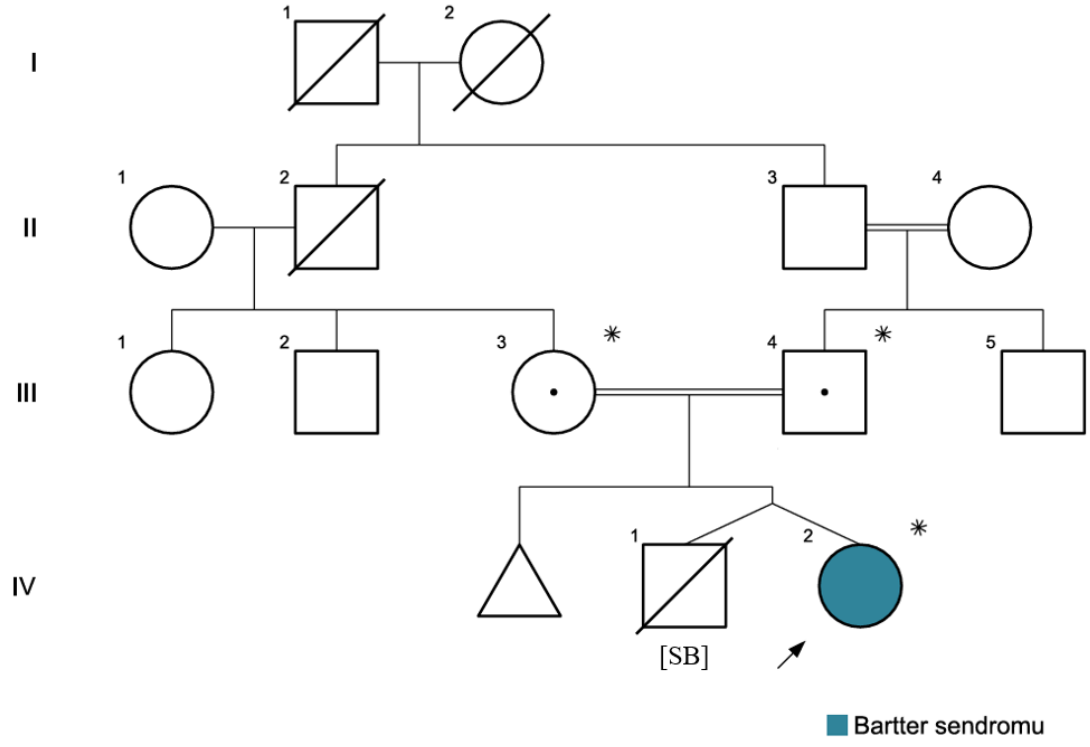
saptanmayan hastanın, klinik ve laboratuvar bulguları arasında; poliüri, ağır SNİK, büyüme ve gelişme geriliği, hipokalemi, hipokloremi, metabolik alkaloz, hiponatremi, hipermagnezemi, hiperkalsiüri, hiperaldosteronizm, böbrek parankiminde hafif ekojenite artışı, düşük idrar dansitesi bulunmaktaydı. Aile öyküsünde benzer renal hastalığa sahip birey ve ebeveynler arasında akrabalık mevcut değildi. Olgudan kalıtsal tübülopati genlerinin incelenmesine yönelik yapılan hedeflenmiş NGS analizinde, *BSND* (*ENST00000371265.4*) geni ekzon 1'de yanlış anlamlı değişime yol açan homozigot c.139G>A, p.P47R varyantı saptanmıştı. Varyant ACMG kriterlerine göre “patojenik” (PM3_VS, PS3, PM2, PP5) olarak sınıflandırıldı. Bu varyant daha önce literatürde ve ClinVar veritabanında 4387 ID numarası ile Bartter sendromu tip 4a için “patojenik” olarak bildirilmişti. Olgunun otozomal resesif kalıtılan “Bartter sendromu tip 4a” (MIM # 602522) fenotipi ile uyumlu olduğu tespit edildi. *BSND* geni c.139G>A varyantına yönelik Sanger dizileme yöntemi ile yapılan aile taramasında, anne ve babanın ilgili varyant için heterozigot taşıyıcı olduğu gözlemlendi. O#10 ve ebeveynlerine ait moleküler analiz görüntüleri Şekil 4.21'de gösterilmiştir.



Şekil 4.21: O#10 ve ebeveynlerine ait BSND (ENST00000371265.4) geni c.139G>A varyantının moleküler analiz görüntüleri. a1) Babaya ait heterozigot varyantın, a2) anneye ait heterozigot varyantının (reverse okuma C>T), Sanger dizileme ile görüntüsü, b1) olguya ait homozigot varyantın IGV görüntüsü, b2) olguya ait homozigot varyantın Sanger dizileme ile doğrulaması (reverse okuma C>T).

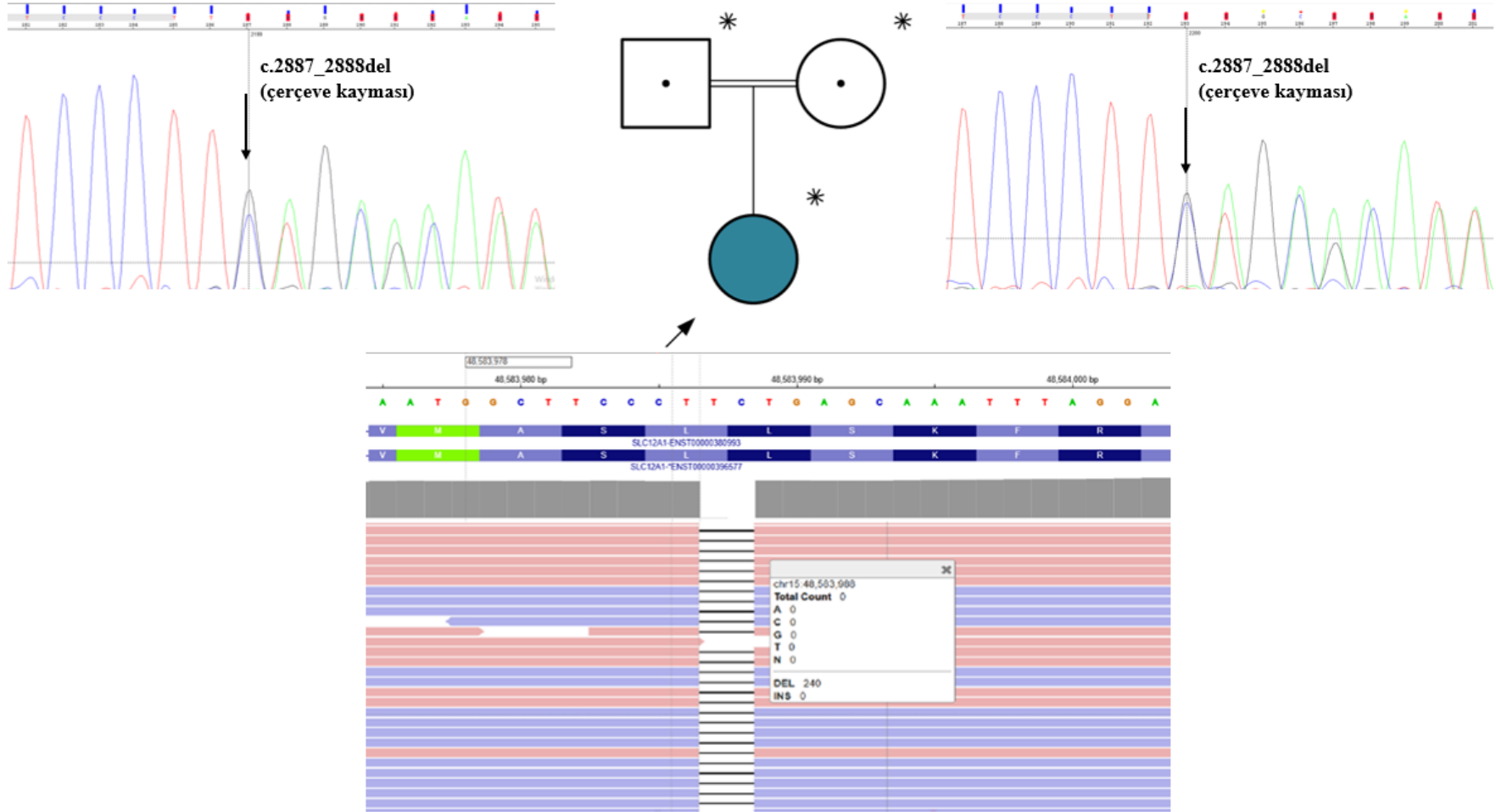
Olgu 12 (O#12)

16 yaş kız hasta, Bartter sendromu ön tanısı ile Tıbbi Genetik polikliniğine NGS ile kalıtsal tübüler hastalık paneli çalışılması için yönlendirilmişti. Prenatal öyküde, gebeliğin IVF yöntemiyle elde edilen ikiz gebelik olduğu, polihidroamniyoz ve intrauterin gelişme geriliği bulunduğu belirtilmişti. Hasta, 27. gebelik haftasında spontan vajinal doğumla 845 gram ağırlığında SGA (gebelik yaşına göre küçük) bir bebek olarak dünyaya gelmiş, ikiz kardeşi ise ölü olarak doğmuştu. Doğum sonrası, prematüriteye bağlı sorunlar ve elektrolit dengesizliği nedeniyle hasta, 3 ay boyunca yenidoğan yoğun bakım ünitesinde tedavi edilmişti. Olguya 9 aylıkken tekrarlayan kusma-diyare/kabızlık dehidratasyon atakları, nöbet geçirme nedeniyle yapılan hastane yatışı esnasında Bartter sendromu ön tanısı konmuş, sonrasında takip ve tedavisi devam etmişti. Fizik muayenesinde dismorfik bulgu saptanmayan hastanın, klinik ve laboratuvar bulguları arasında; büyüme geriliği, hafif zihinsel yetersizlik, prematür retinopatisine bağlı görme kaybı, metabolik alkaloz, hipokloremi, hipokalemi, hiperkalsemi, poliüri, pelvik yerleşimli sol böbrek, bilateral nefrokalsinozis ve böbreklerde ekojenite artışı, hipostenüri, idrarda artmış kalsiyum, sodyum, potasyum ve klor atılımı yer almaktaydı. Aile öyküsünde benzer renal hastalığa sahip birey yoktu ve ebeveynler arasında akrabalık mevcuttu (Şekil 4.22: O#12'ye ait aile ağacı çizimi). Olgudan kalıtsal tübülopati genlerinin incelenmesine yönelik yapılan hedeflenmiş NGS analizinde, *SLC12A1* (*ENST00000396577.3*) geni ekzon 24'te fonksiyon kaybına yol açan homozigot c.2887_2888del, p.L963Efs*4 çerçeve kayması varyantı saptanmıştı. Varyant ACMG kriterlerine göre “olası patojenik” (PVS1, PM2) olarak sınıflandırıldı ve daha önce literatürde bildirilmemiş “novel” nitelikteydi. Olgunun otozomal resesif kalıtılan “Bartter sendromu tip 1” (MIM #601678) fenotipi ile uyumlu olduğu tespit edildi. Sanger dizileme yöntemi ile yapılan aile taramasında, anne ve babasının ilgili varyant için heterozigot taşıyıcı olduğu gözlemlendi. O#12 ve ebeveynlerine ait moleküler analiz görüntüleri Şekil 4.23'te gösterilmiştir.



Şekil 4.22: O#12'ye ait aile ağacı.

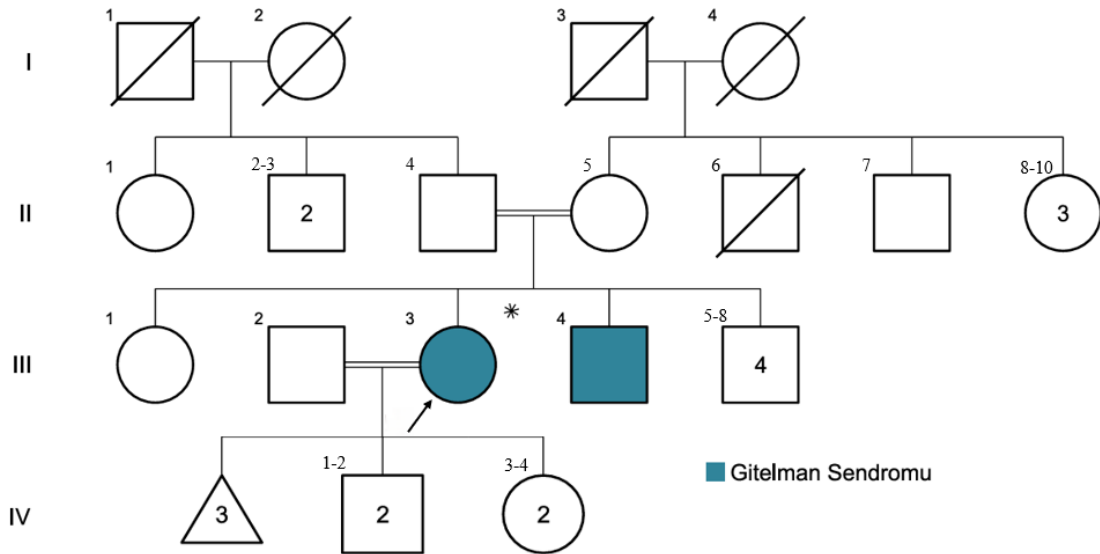
Moleküler analiz çalışılan bireyler sağ üst köşede "*" işareti ile gösterilmektedir. SB: ölü doğum (*still birth*)



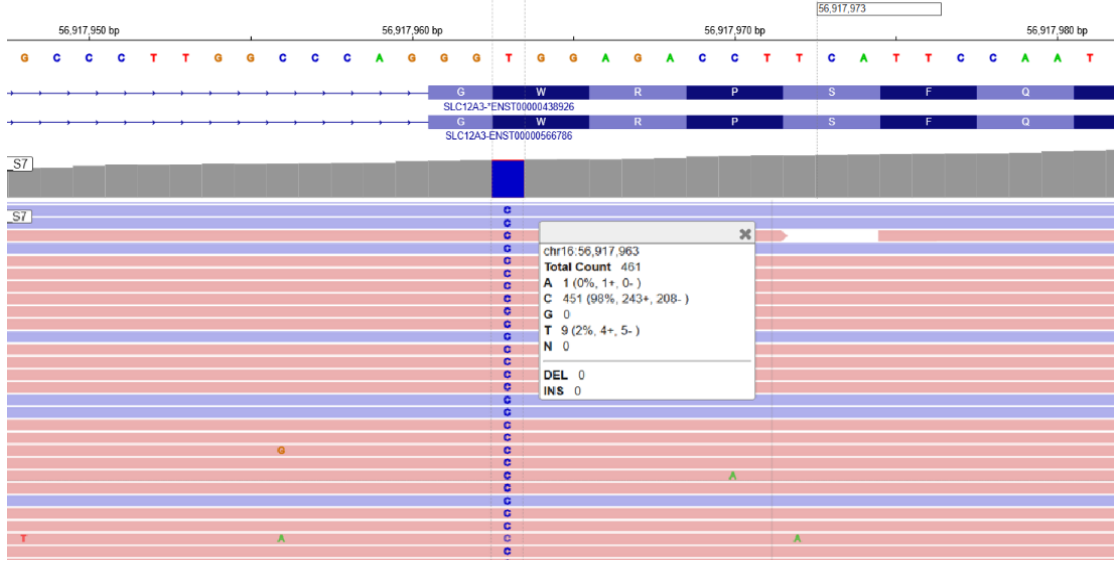
Şekil 4.23: O#12 ve ebeveynlerine ait SLC12A1 (ENST00000396577.3) geni c.2887_2888del varyantına ait moleküler analiz görüntüleri (Sol üstte babanın -varyant heterozigot, sağ üstte annenin -varyant heterozigot- Sanger elektroferogram görüntüsü, altta olguya ait homozigot varyantın IGV görüntüsü).

Olgu 18 (O#18)

Bir yıldan fazla süredir kan potasyum ve magnezyum düşüklüğü ile takip edilen 35 yaşındaki kadın olgu, Gitelman sendromu ön tanısı ile polikliniğimize NGS ile kalıtsal tübüler hastalık paneli çalışılması için yönlendirilmişti. Fizik muayenesinde dismorfik bulgu saptanmayan hastanın, kas güçsüzlüğü, halsizlik yakınması ve laboratuvar bulguları arasında hipokloremik metabolik alkaloz, hipokalemi, hipomagnezemi, artmış Renin-Aldosteron düzeyi, hipokalsiüri, idrarda artmış potasyum ve magnezyum atılımı bulunmaktaydı. Aile öyküsünde 25 yaşındaki erkek kardeşi de aynı hastalık sebebiyle tedavi görmekteydi ve ebeveynler arasında akrabalık mevcuttu (Şekil 4.24). Ayrıca hasta, Behçet hastalığı tanısı ile de takip edilmekteydi. Olgudan kalıtsal tübülopati genlerinin incelenmesine yönelik yapılan hedeflenmiş NGS analizinde, SLC12A3 (*ENST00000438926.2*) geni ekzon 14’te homozigot c.1672T>C, p. W558R yanlış anlamlı varyantı saptanmıştı (Şekil 4.25). Bu değişim ACMG kriterlerine göre “önemi bilinmeyen varyant” (PM2, PP3) olarak sınıflandırıldı ve daha önce literatürde bildirilmemiş “novel” nitelikteydi. Olgunun otozomal resesif kalıtılan “Gitelman sendromu” (MIM #263800) fenotipi ile uyumlu olduğu tespit edildi.



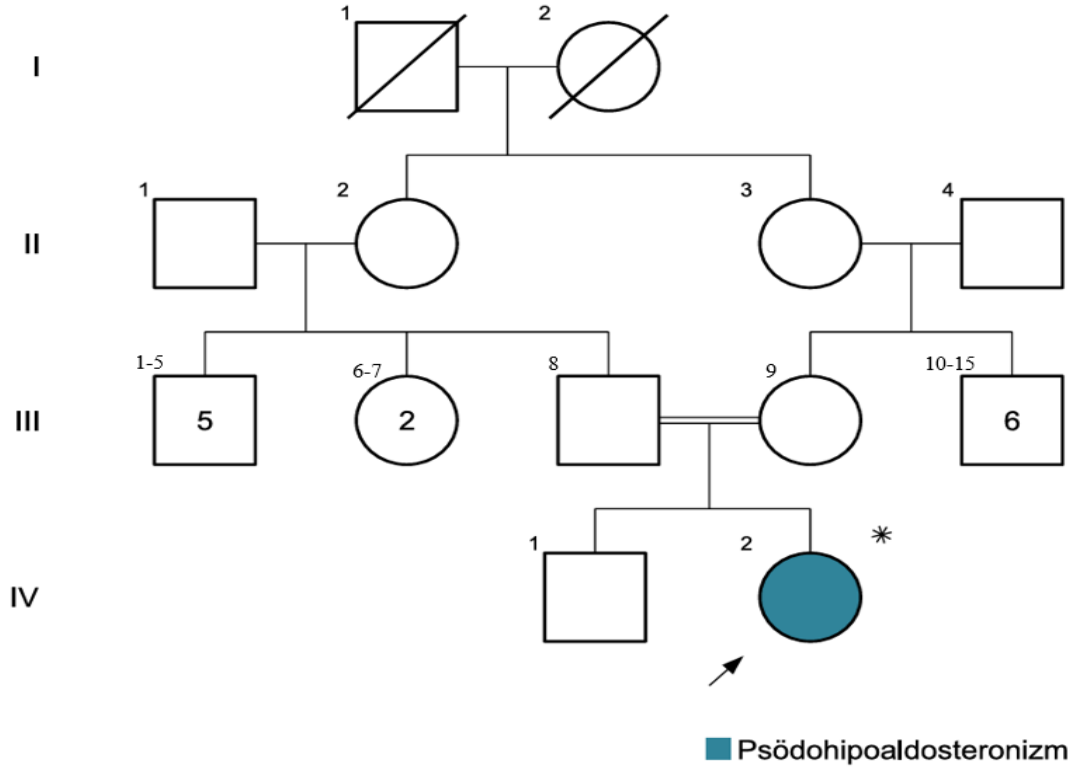
Şekil 4.24: O#18’e ait aile ağacı.



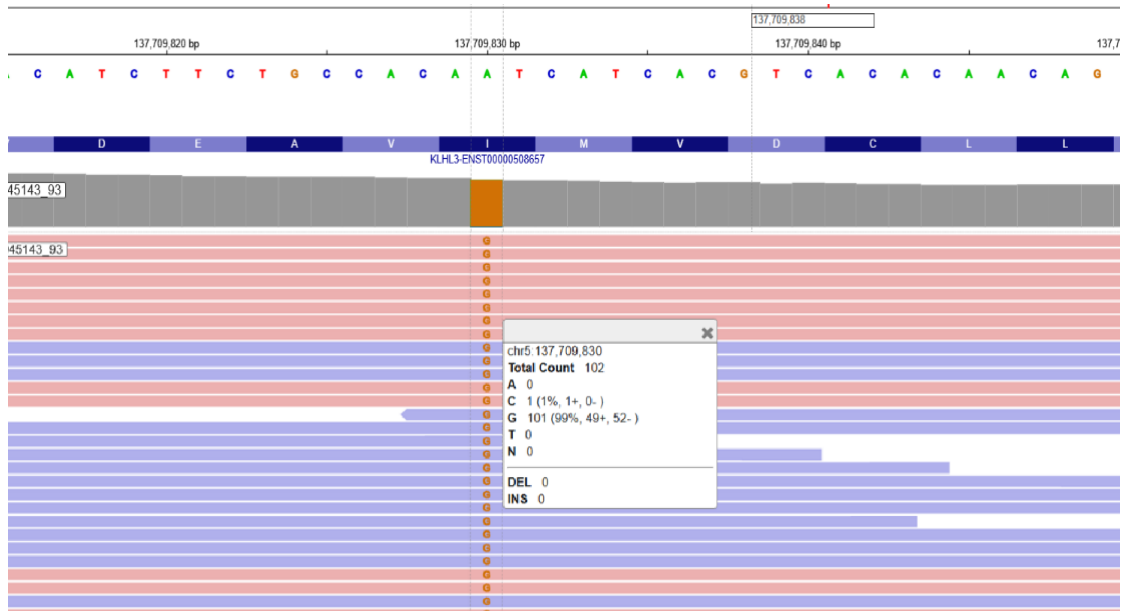
Şekil 4.25: O#18'e ait *SLC12A3* (*ENST00000438926.2*) geni homozigot c.1672T>C varyantının IGV görüntüsü.

Olgu 26 (O#26)

4 yaş kadın olgu, psödohipoaldosteronizm ön tanısı ile polikliniğimize NGS ile kalıtsal tübüler hastalık paneli çalışılması için yönlendirilmişti. Hastanın prenatal öyküsünde özellik yoktu, miadında spontan vajinal doğumla 2500 gram ağırlığında dünyaya gelmişti. 6 ay önce bronşiolit nedeniyle yapılan hastane yatışında elektrolit bozukluğu tespit edilmişti . Fizik muayenesinde dismorfik bulgu saptanmayan hastanın, klinik ve laboratuvar bulguları arasında; büyüme geriliği (kilo -2,19 SDS, boy -2,11 SDS), hiperkalemi, hiponatremi, hiperkloremi, metabolik asidoz, hiperfosfatemi, Renin düzeyi düşük ve normal Aldosteron seviyesi yer almaktaydı. Aile öyküsünde benzer hastalığa sahip bilinen herhangi bir birey bulunmamaktaydı. Ebeveynler, Afganistan kökenli yabancı uyruklu olup, aralarında akrabalık mevcuttu (Şekil 4.26). Olgudan kalıtsal tübülopati genlerinin incelenmesine yönelik yapılan hedeflenmiş NGS analizinde, *KLHL3* (*ENST00000309755.9*) geni ekzon 3'te homozigot c.161T>C, p. I54T yanlış anlamlı varyantı saptanmıştı (Şekil 4.26). Bu değişim ACMG kriterlerine göre “ önemi bilinmeyen varyant” (PM2, PP3, PP4) olarak sınıflandırıldı ve daha önce literatürde bildirilmemiş “novel” nitelikteydi. Olgunun hem otozomal dominant hem de otozomal resesif kalıtılan “Psödohipoaldosteronizm tip 2d” (MIM #614495) fenotipi ile uyumlu olduğu tespit edildi. Hem taşıyıcı oldukları düşünülen hem de otozomal dominant kalıtım paterninden dolayı hafif klinik bulgular sergileyebilecek olan anne ve babaya, ilgili varyant için moleküler analiz çalışılmamıştı, ancak tansiyon ölçümleri ve kan elektrolit seviyelerinin normal olduğu gözlenmişti.



Şekil 4.26: O#26'ya ait aile ağacı.



Şekil 4.27: O#26'ya ait KLHL3 (ENST00000309755.9) geni homozigot c.161T>C varyantının IGV görüntüsü (reverse okuma A>G).

5. TARTIŞMA

Kalıtsal renal tübüler hastalıklar, sıvı, elektrolit ve asit-baz homeostazındaki bozukluklarla karakterize, renal tübüllerin nadir genetik hastalıklarının heterojen bir grubunu temsil eder. Bu hastalar, büyüme-gelişme yetersizliği, dehidratasyon atakları, nöbetler, hipokalemi, metabolik asidoz, KBH gibi ciddi morbidite ve mortaliteler ile sonuçlanabilecek komplikasyonlara maruz kalırlar (Osman ve ark., 2023). Kalıtsal tübülopatilerin neredeyse tamamı nadir ya da yetim hastalık olarak kabul edilir (prevalansları 1/2000'den azdır), etiyojileri çoğunlukla monogeniktir ve kronik seyirlidir (Mejía ve ark., 2013).

Kalıtsal tübüler hastalık grubunda, bazı farklı genlerin aynı klinik tabloya neden olabilmesi lokus heterojenitesine, aynı gendeki varyantların farklı sendromlara yol açabilmesi fenotipik heterojeniteye, aynı gende bulunan farklı varyantların benzer klinik tablo oluşturması ise allelik heterojeniteye örnek teşkil eder. Ayrıca, birden fazla ve birbirinden bağımsız organ ya da sistemin etkilenmesi pleiotropik etkileri göstermektedir. Kalıtsal tübülopatiler, benzer belirtileri nedeniyle birbirlerinin ayırıcı tanısında yer almanın yanı sıra, bazıları aynı genetik temele dayandığı için allelik hastalıklar olarak da sınıflandırılabilir (Renkema ve ark., 2014). Bu nedenle genetik böbrek hastalığına sahip olgularda, geçmişte uygulanan ön tanıya spesifik tek gen dizileme yöntemleri yerine kapsamlı veya hedeflenmiş gen panellerinin kullanılması tanı başarısını arttırmaktadır (Cogal ve ark., 2021).

Literatürde farklı yaş gruplarında tübülopati hastalarının moleküler tanısında NGS'nin kullanıldığı az sayıda çalışma bildirilmiştir. Bunlardan 2018'de Ashton ve ark. tarafından yayınlanan 37 geni içeren hedeflenmiş NGS panel analizleri yapılan 384 pediatrik indeks olgu ve 26 kardeşi içeren çok merkezli çalışmada; toplam 26 gende 269 farklı varyant saptanmıştı ve genetik tanı oranı %64 olarak tespit edilmişti (Ashton ve ark., 2018). 2019'da Hureaux ve arkadaşları 1033 erişkin tübülopati hastasına uyguladıkları biri 37 diğeri 46 gen içeren iki farklı hedeflenmiş NGS panel analizinde, toplamda 26 gende 275 varyant saptayarak, genetik tanı oranını %26 olarak bildirmişlerdir (Hureaux ve ark., 2019). Araştırmamıza tablo 3.1 ve 3.2 de yer alan sırasıyla 45 ve 55 gen içeren kalıtsal tübülopati paneli uygulanan 56 hastadan; kalıtsal tübüler hastalıklarla ilişkili patojenik, olası patojenik ve hastanın fenotipiyle uyumlu önemi bilinmeyen varyant saptanan 26'sı dahil edilmiştir. Analiz sonrası genetik tanı oranı ise %46,4 olarak tespit edilmiştir. Çalışma grubunda yer

alan 26 hastada, 12 gende 24 farklı, toplamda 30 varyant tespit edilmiştir. Saptanan beş varyant ise literatürde daha önce bildirilmemiş olup, “novel” niteliktedir ve bu varyantlar, kalıtsal tübüler hastalıkların genetik spektrumuna katkı sağlaması açısından literatür için önem arz etmektedir.

Çalışmamız, hem pediatrik (%42,3) hem de erişkin (%57,7) yaş grubunu ve çok sayıda geni içermesi nedeniyle, literatürde sıklıkla bildirilen sadece pediatrik yaş grubunun dahil edildiği ya da az sayıda bildirilen erişkin popülasyonu içeren kalıtsal tübüler hastalık çalışmalarına göre veya az sayıda genin değerlendirildiği Bartter-Gitelman sendromları gibi sadece tuz kaybına yol açan tübülopatileri içeren çalışmalara göre kapsayıcıdır (Anshuman Saha ve ark., 2021; Ashton ve ark., 2018; Blázquez Gómez ve ark., 2021; Hureaux ve ark., 2019; Peters ve ark., 2002). Ülkemizde kalıtsal renal tübüler hastalıkların insidans ve prevalansı net olarak bilinmemektedir. Bu konudaki en geniş seri Topaloğlu ve ark.’nın 226 pediatrik hastayı içeren çok merkezli çalışmasıdır; ancak bu çalışmada olgulara klinik ve laboratuvar bulguları neticesinde kalıtsal tübülopati tanısı konulmuş olup, vakaların genotip verilerini içermemektedir (Topaloğlu ve ark., 2011). Hastaların genetik analiz verilerini de içeren çalışmamız, Türkiye’den bildirilen ve yalnızca klinik değerlendirmelerle sınırlı kalan tübülopati vakalarına ilişkin çalışmalardan farklı olarak, genotipik verilerle desteklenmiş daha kapsamlı bir değerlendirme sunmaktadır.

Avustralya ve Yeni Zelanda'dan yayımlanan bir çalışmada, hem pediatrik hem de erişkin kohortlar farklı renal hastalık grupları kapsamında gen panelleri ile değerlendirilmiş ve 68 hasta tübüler hastalık grubunda sınıflandırılmıştır. Bu çalışmada, pediatrik kohortta genetik test başvurusu için medyan tanı yaşı 5, erişkin kohortta ise 31 olarak rapor edilmiştir (Tanudisastro ve ark., 2021). Çalışmamızda elde edilen bulgular, pediatrik grup açısından söz konusu çalışmayla uyumlu olup, medyan tanı yaşı 5’tir (min: 4 ay, maks: 16 yıl). Ancak erişkin kohortta medyan tanı yaşı daha düşük bulunmuş ve 25 olarak hesaplanmıştır (min: 19, maks: 50). Çalışma grubumuzun tamamı değerlendirildiğinde ise medyan genetik tanı yaşı 20,5’tir (min: 4 ay, maks: 50 yıl). Bu sonuçlar, genetik tanıya yönlendirme yaşının çalışmadan çalışmaya değişkenlik gösterebileceğini ve hasta popülasyonunun demografik özellikleri ile sağlık sistemine erişim gibi faktörlerden etkilenebileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda cinsiyet dağılımı kadın cinsiyet lehine belirgin bir ağırlık göstermekte olup, olguların %77’si kadın (n=20), %23’ü erkekti (n=6). Bu dağılım, daha önce yayımlanan literatür verileriyle karşılaştırıldığında dikkat çekici bir farklılık göstermektedir.

Önceki çalışmalarda bildirilen kadın cinsiyet oranları sırasıyla %57, %47 ve %58 olarak rapor edilmiştir (Anshuman Saha ve ark., 2021; Blázquez Gómez ve ark., 2021; Tanudisastro ve ark., 2021). Çalışmamızda erkek hasta oranının düşük olmasının, X'e bağlı kalıtım gösteren klinik tablolarla ilişkili olgu saptanmamış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu durum, genetik etiyolojinin ve örneklem özelliklerinin, cinsiyet dağılımı üzerinde etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Kalıtsal tübüler hastalıklar bağlamında 58 Mısırlı çocuk üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, ailede renal hastalık öyküsü oranı %60,3 olarak bildirilmiştir (Osman ve ark., 2023). Benzer şekilde, 226 Türk çocukla yürütülen başka bir çalışmada ise bu oran %28,5 olarak rapor edilmiştir (Topaloglu ve ark., 2011). Bu araştırmalar göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızda aile öyküsü oranı %46 olup, pediatrik hastaların %63,6'sında (n=7), erişkin hastaların ise %33,3'ünde (n=5) ailevi renal hastalık öyküsü saptanmıştır. Özellikle pediatrik grupta saptadığımız oran, Mısırlı çocuklar üzerinde yürütülen çalışmanın aile öyküsü pozitiflik oranıyla benzerlik göstermektedir (Osman ve ark., 2023). Bununla birlikte, Batı Hindistan'da 14 pediatrik olgunun değerlendirildiği bir çalışmada ise bu oran %7 olarak bildirilmiştir (Anshuman Saha ve ark., 2021). Farklı çalışmalarda aile öyküsü oranlarında gözlenen değişkenlik; hasta seçim kriterleri, örneklem büyüklükleri ve aile bireylerinin taranma düzeylerindeki farklılıklardan kaynaklanabilir. Ayrıca bazı bireylerde aile öyküsünün eksik ya da hatalı bildirilmesi ile retrospektif veri toplama yöntemlerine bağlı bilgi sınırlılıkları da bu oranları etkileyebilmektedir. Bu nedenle, aile öyküsünün varlığı genetik geçişli tübüler hastalıkların tanısında destekleyici bir parametre olarak değerlendirilmelidir; ancak yokluğu, kalıtsal etyolojiyi dışlamak için tek başına yeterli değildir.

Kalıtsal tübülöpati tanısı alan hastalarımızın %58'inde (n=15), ebeveynler arasında birinci ile beşinci derece arasında değişen düzeylerde akrabalık saptanmıştır. Bu oran çocuk hastalarda %36,4 (n=4), erişkin hastalarda ise %73,3 (n=11) olarak belirlenmiştir. Yalnızca pediatrik popülasyonu içeren önceki çalışmalarda bildirilen oranlarla karşılaştırıldığında; 2011 yılında Türkiye'den bildirilen çalışmada anne-baba akrabalık oranı %72 (Topaloglu ve ark., 2011), Mısır'dan bildirilen çalışmada ise %72,4 (Osman ve ark., 2023), Batı Hindistan'da yapılan çalışmada ise %14,2 olarak rapor edilmiştir (Anshuman Saha ve ark., 2021). Bu veriler, çalışmamızdaki genel oranı Batı Hindistan çalışmasından yüksek, ancak Türkiye ve Mısır kaynaklı çalışmaların gerisinde konumlandırmaktadır. Pediatrik

grubumuzdaki göreceli olarak daha düşük oran ise, çalışmamızın erişkin hasta ağırlıklı yapısından kaynaklanmış olabilir. Akraba evliliği, özellikle otozomal resesif geçişli tübülopatilerde önemli bir risk faktörü olmakla birlikte, oranların ülkelere ve bölgesel sosyokültürel özelliklere göre değişiklik gösterebileceği göz önünde bulundurulmalı ve popülasyonlar arası karşılaştırmalarda dikkatle yorumlanmalıdır.

Çalışmamızda en sık saptanan kalıtsal tübülopati, olguların %38,5'inde (n=10) tespit edilen *SLC12A3* gen varyantlarına bağlı gelişen Gitelman sendromudur. Bu hastaların tamamı genetik tanıları erişkin yaş grubunda almıştır. Hureau ve arkadaşlarının 1033 erişkin tübülopati hastasını incelediği geniş kapsamlı çalışmada da benzer şekilde genetik tanı alan olgular arasında en sık görülen sendromun %46 oranıyla Gitelman sendromu olduğu bildirilmiştir (Hureau ve ark., 2019). Blázquez Gómez ve arkadaşlarının primer tübülopati tanısı almış 53 pediatrik olguyu kapsayan çalışmasında ise, %36 oranıyla Gitelman sendromu en sık saptanan tübülopati olarak belirlenmiştir. Yazarlar, bu yüksek oranın çocukluk döneminde değil, genellikle erişkin yaşlarda tanı alan hastaların aile taramaları sırasında asemptomatik bireylerde de varyant tespit edilmesiyle açıklanabileceğini belirtmişlerdir (Blázquez Gómez ve ark., 2021).

Çalışmamızda Gitelman sendromundan sonra ikinci sıklıkta tespit edilen tübülopati, olguların %15,4'ünde (n=4) saptanan Bartter sendromudur. Bu hastalarda genetik etiyoloji farklı genlerdeki varyantlarla ilişkilendirilmiş olup, *BSND*, *SLC12A1* ve *KCNJ1* genleri saptanmıştır. Bartter sendromlu olguların tanı yaşları 4 ay ile 24 yaş arasında değişmektedir. Çalışmamızda yalnızca pediatrik popülasyon değerlendirildiğinde ise, Bartter sendromu çocuklarda en sık görülen tübülopati olarak öne çıkmaktadır. Blázquez Gómez ve arkadaşlarının çalışmasında Bartter sendromu olgusuna rastlanmazken, Domingo-Gallego ve arkadaşlarının tübülopati tanısı genetik analizle doğrulanmış 25 hastayı içeren serisinde, %12 oranla (n=3) Bartter sendromu üçüncü sıklıkta tespit edilmiştir; bu olgularda *CLCNKB* ve *SLC12A1* genleri etiyolojik olarak bildirilmiştir (Blázquez Gómez ve ark., 2021; Domingo-Gallego ve ark., 2022). Benzer şekilde, Ashton ve arkadaşlarının pediatrik hasta grubunu içeren çalışmasında Bartter sendromu, Gitelman sendromundan sonra %18,7 oranla (n=72) ikinci en sık tanı olarak yer almıştır ve etiyolojide *BSND*, *SLC12A1*, *KCNJ1* ve *CLCNKB* genleri raporlanmıştır (Ashton ve ark., 2018).

Çeşitli kalıtsal tübülopati ön tanısı ile genetik değerlendirmeye yönlendirilen olgularımızın %7,7'sinde (n=2), NGS yöntemiyle yapılan analiz sonucunda önceki klinik

tanının revize edilmesi gerekmiştir. Literatürde benzer bulgular, Ashton ve arkadaşlarının çalışmasında %4,2 (n=16) oranında, Hureaux ve arkadaşlarının çalışmasında ise %2,1 (n=16) oranında tanı değişikliği olarak bildirilmiştir (Ashton ve ark., 2018; Hureaux ve ark., 2019). Bu durum, genetik testlerin, fenotipik benzerlik gösteren tübülopatilerde ayırıcı tanı koymadaki önemini ve klinik tanılarının doğrulanmasında genetik analizlerin katkısını ortaya koymaktadır.

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışma, temel olarak kalıtsal renal tübüler hastalıkların moleküler genetik temellerinin aydınlatılmasına odaklandığından, çalışmamızın ana eksenini hastalarda saptanan varyantlar ve ilişkili genler oluşturmaktadır. Çalışmamızda varyant saptanan genler aşağıda ayrıntılı biçimde incelenmiştir:

CASR

CASR geni, paratiroid bezinin PTH üreten şef hücrelerinde ve böbreklerde çıkan kalın Henle kulbu hücrelerinde eksprese edilen plazma membran G proteinine bağlı bir reseptörü kodlayan genidir. Dolaşımdaki kalsiyum konsantrasyonundaki küçük değişiklikleri algılayarak, mineral iyon homeostazını korumada önemli bir rol oynar. *CASR* geninin fonksiyon kaybına yol açan patojenik varyantları hiperkalsemi kliniğine yol açarken, fonksiyon kazandırıcı mutasyonları hipokalsemi fenotipine yol açmaktadır (Chadha & Alon, 2009; Hendy ve ark., 2000). ClinVar veritabanında bildirilen yapısal olmayan *CASR* gen varyantlarının 276'sı patojenik/olası patojenik olarak sınıflandırılmış olup, bunların 123'ünü yanlış anlamlı değişimler oluşturmaktadır (erişim tarihi 12.05.2025). Çalışmamızda dört olguda *CASR* geninde yanlış anlamlı varyant saptanmış olup, bunların ikisinde (O#1, O#2) hipokalsemi, diğer ikisinde (O#3, O#4) ise hiperkalsemi kliniği mevcuttur.

O#1 olarak tanımlanan 11 yaşındaki kız hastada, *CASR* geninde (NM_001178065) heterozigot tespit edilen c.2519G>T değişimi, proteinin 840. pozisyonundaki glisin kalıntısının valin ile yer değiştirmesine (p.Gly840Val) neden olan yanlış anlamlı bir varyanttır. Bu değişim, alternatif transkript NM_000388.4'e göre c.2489G>T, p.Gly830Val olarak tanımlanmakta olup, GnomAD (v2.1.1) ekzom ve genom dahil popülasyon veritabanlarında bildirilmemiştir. Literatürde daha önce tanımlanmamış ve "novel varyant" olarak değerlendirilmiştir. Evrimsel olarak orta/yüksek korunmuşluk düzeyine sahip (GERP: 5.89, PhyloP100way: 9.87) bir konumda yerleşmektedir. In silico analizlerde varyantın olası patojenitesi güçlü biçimde desteklenmektedir: REVEL (0.90),

AlphaMissense (0.99), MutationTaster (1.000), DANN (0.99), MetaLR (0.88), SIFT (0.00), PolyPhen-2 HumDiv (1.00), CADD PHRED (27.90) gibi çok sayıda algoritmada yüksek patojenite skorları elde edilmiştir. Varyantımız ile aynı amino asit pozisyonunu etkileyen ve literatürde yer alan diğer değişikliklerden; ClinVar (ID: 35792) veritabanında kayıtlı NM_001178065.2:c.2519G>A, p.Gly840Asp (p.Gly830Asp, rs193922436) varyantı olası patojenik, Uniprot (ID: VAR_078179) veritabanında kayıtlı NM_000388.4: c.2488G>A, p.Gly830Ser varyantı patojenik olarak bildirilmiştir. Bu bağlamda, yanlış anlamlı varyantlarının patojenite etkisini öngörmeye kullanılan REVEL skoru (ClinGen, 2022), çalışmamızda saptanan p.Gly840Val değişiminde 0.90 olup, aynı pozisyondaki Aspartat değişimiyle eşdeğer, Serin değişiminden (0.89) ise daha yüksektir. p.Gly830Ser varyantının literatürde fonksiyon kazanımına ve hastalarda otozomal dominant hipokalsemi fenotipine yol açtığı bildirilmiştir (Cole ve ark., 2009; Letz ve ark., 2010; Raue ve ark., 2011). O#1 ve klinik bulguları uyumlu olan babasında tespit edilen c.2519G>T değişiminin, aynı kodonda yer alan ve patojenik kabul edilen varyantlarla aynı fenotipe yol açması, çalışmamızda tespit edilen bu varyantın patojenitesini desteklemektedir.

O#2 olarak tanımlanan 5 yaşındaki kız hastada, CASR geninde (NM_001178065.2) heterozigot saptanan c.2329G>A varyantı, proteinin 777. pozisyonundaki asidik özellikteki glutamat (Glu) rezidüsünün bazik özellikteki lizin (Lys) ile yer değiştirmesine neden olmaktadır. Bu değişim, alternatif transkript olan NM_000388.4'e göre c.2299G>A, p.Glu767Lys (E767K) olarak tanımlanmakta olup, GnomAD (v2.1.1) populasyon veritabanında bildirilmemiştir. Literatürde bu varyant ilk kez 2005 yılında Uçkun-Kitapçı ve arkadaşları tarafından, yenidoğan döneminde hipokalsemiye bağlı nöbet geçiren ve yüksek fosfor düzeylerine sahip olan, PTH düzeyinin düşük, idrar kalsiyum atılımının ise normal-yüksek seviyelerde olduğu bildirilen 2 yaşındaki bir kız hastada tanımlanmıştır. Aynı çalışmada, hastanın genç yaşta hipokalsemiye bağlı koroner arter spazmı geçiren babasında da aynı varyantın saptanması ile bu değişimin otozomal dominant hipokalsemi fenotipine yol açan aktive edici bir mutasyon olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, 4 yıllık takipte renal kalsifikasyon veya böbrek yetmezliği gelişmediği; çizilen aile ağacında ise hafif kas krampları ve karıncalanma dışında genellikle asemptomatik olan dokuz aile bireyinde hipokalsemi bulunduğu bildirilmiştir (Uçkun-Kitapçı ve ark., 2005). Mevcut çalışmada yer alan olgumuzda da kas krampları, düşük serum kalsiyum ve PTH düzeyleri, yüksek fosfor düzeyi ve normal idrar kalsiyum atılımı gözlenmiş olup, bu klinik tablo literatürde tanımlanan fenotip ile uyumluluk göstermektedir. Hastamızın babası ve baba tarafından 5

aile bireyinde de hipokalsemi mevcuttur. Ek olarak, 2012 yılında Leach ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen deneysel hücre kültürü çalışmasında, p.E767K varyantının CASR geninde fonksiyon kazanımına yol açtığı gösterilmiştir (Leach ve ark., 2012). Söz konusu varyant, ClinVar veritabanında (ID: 959995) otozomal dominant hipokalsemi fenotipi ve nefrolitiazis/nefrokalsinozis açısından olası patojenik olarak sınıflandırılmıştır. Ancak, bu bildirimle kıyasla, Uçkun-Kitapçı ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi, çalışmamızdaki indeks olguda da nefrokalsinozis izlenmemiştir.

Olgu 3 (O#3) olarak tanımlanan 42 yaşındaki kadın hastada hiperkalsemi kliniği mevcuttu ve CASR geninde (NM_001178065.2) heterozigot c.314C>A değişimi saptanmıştır. Bu varyant, proteinin 105. pozisyonunda yer alan serin amino asidinin tirozin ile yer değiştirmesine (p.Ser105Tyr) neden olmaktadır. GnomAD (v2.1.1) popülasyon veritabanında yer almayan bu varyant, literatürde de daha önce bildirilmemiş olup, "novel" olarak değerlendirilmiştir. Evrimsel olarak orta/yüksek korunmuşluk düzeyine sahip (GERP: 5.75, PhyloP100way: 7.82) bir konumda yerleşmektedir. In silico analizlerde varyant, REVEL (0.85), AlphaMissense (0.92), MutationTaster (1.000), DANN (0.99), MetaLR (0.78), MetaRNN (0.88), PolyPhen-2 HumDiv (0.99) ve CADD PHRED (23.90) algoritmaları ile patojenite lehine skorlar verirken, yalnızca SIFT (0.08) skoru benign yönde değerlendirilmiştir. Bu değişim, CASR geninin 3. ekzonunda yer almakta olup, aynı ekzon bölgesinde ClinVar veritabanında FHH, otozomal dominant hipokalsemi ve primer hiperparatiroidi fenotipleri ile ilişkilendirilmiş 20 adet patojenik/olası patojenik yanlış anlamlı varyant raporlanmıştır. Ancak, 105. kodona özgü herhangi bir varyant kaydı bulunmamaktadır. Olgumuzda, serum kalsiyum ve PTH seviyesinin yüksek, fosfor düzeyinin düşük olması otozomal dominant formda hiperparatiroidi fenotipini desteklemektedir. Ancak yapılan radyolojik ve nükleer görüntüleme çalışmalarında paratiroid adenom ya da hiperplazisine dair bulgu saptanmamıştır. İdrar kalsiyum atılımı (spot idrarda kalsiyum/kreatinin oranı) bir ölçümde düşük izlenmiş olsa da, takip eden ölçümlerde normal sınırlarda bulunmuş ve PTH düzeylerinin yüksek seyretmesi nedeniyle FHH olasılığı ön planda değerlendirilmemiştir. Bu bulgular doğrultusunda, c.314C>A değişimi çalışmamızda önemi bilinmeyen varyant olarak sınıflandırılmıştır, patojenitesinin ve olası genotip-fenotip ilişkisinin netleştirilebilmesi için fonksiyonel çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Olgu 4 (O#4)'te saptanan CASR genindeki (NM_001178065.2) c.554G>A varyantı, proteinin 185. pozisyonunda yer alan bazik ve polar özellikteki arjinin kalıntısının, nötr ve polar özellikteki glutamin ile yer değiştirmesine (p.Arg185Gln) yol açmaktadır. Bu varyant, GnomAD (v2.1.1) popülasyon veritabanında yer almamakta ve literatürde ilk kez 1993 yılında Pollak ve arkadaşları tarafından, 13 aile üyesinde familial hipokalsiürik hiperkalsemi (FHH) tanısı konulan bir hastada tanımlanmıştır . Sonraki çalışmalarda da bu varyantın FHH ve neonatal ağır hiperparatiroidi (NSHPT) fenotipleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Glaudo ve ark., 2016; Obermannova ve ark., 2009; Pollak, ve ark., 1993). In vitro deneysel çalışmalar, bu varyantın normal genotipli (wild tip) alel üzerinde dominant negatif inhibisyona yol açarak fonksiyon kaybına neden olduğunu göstermiştir (Marx ve ark., 2020; Obermannova ve ark., 2009). 2021 yılında Fransa'dan yayımlanan bir derlemede, bu varyanta sahip 7 yenidoğanda de novo veya paternal aktarım sonucu NSHPT geliştiği, ayrıca en az 14 bireyde ise yenidoğan döneminde belirti vermeksizin FHH fenotipine yol açtığı raporlanmıştır (Aubert-Mucca ve ark., 2021). Bizim olgumuzda da hipokalsiürik hiperkalsemi mevcuttu ve hastanın babasında da benzer şekilde hiperkalsemi kliniği bulunmaktaydı; ancak baba genetik test yaptırmadığından aile içi segregasyon analizi gerçekleştirilememiştir. Tüm bu bulgular, saptadığımız varyantın otozomal dominant geçişli FHH fenotipi ile uyumlu olduğunu desteklemektedir.

AP2S1

AP2S1 geni, klatrin aracılı endositozda görev alan adaptor protein-2 (AP2) kompleksinin sigma 2 alt birimi olan AP2 σ 2 proteinini kodlamaktadır; bu protein, hücre zarındaki proteinlerin endozomlara taşınmasında rol oynar. Bu gende yer alan patojenik varyantlar endositoz mekanizmasını bozarak, CASR proteini aracılığıyla hücrelerin ekstrasellüler kalsiyuma duyarlılığını azaltır; bunun sonucunda paratiroid bezlerinden parathormon (PTH) salınımı artar ve böbreklerden kalsiyum geri emilimi azalır. Kodon 15'teki arjinin (Arg15) rezidüsünü etkileyen (p.Arg15Cys, p.Arg15His, p.Arg15Leu) yanlış anlamlı (missense) patojenik varyantlar, bugüne kadar yaklaşık 70 FHH tip 3 olgusunda bildirilmiştir (Aashiq ve ark., 2020; Hannan ve ark., 2021). Çalışmamızda 7 yaş kız hastanın (O#5) AP2S1 geninde (NM_001301078.2) c.44G>A, p.Arg15His varyantı saptanmıştır. Bu varyantın literatürde birçok olguda bildirildiği ve son yıllarda FHH tip 3 ile ilişkili olarak nörogelişimsel anormalliklerin –özellikle konuşma ve motor gelişimde gecikme, öğrenme güçlüğü, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu gibi– tanımlandığı vurgulanmaktadır

(Aashiq ve ark., 2020; Chinoy ve ark., 2023; Shah ve ark., 2021). Bizim olgumuzda da FHH tip 3 fenotipine ek olarak konuşma gecikmesi ve hafif düzeyde öğrenme güçlüğü mevcuttu. Bu bulgular, p.Arg15His varyantının yalnızca kalsiyum metabolizması ile sınırlı kalmayan, daha geniş spektrumlu bir fenotiple ilişkili olabileceğini desteklemektedir.

CLDN16

CLDN16 geni, çıkan kalın Henle kolundaki epitel hücrelerinin sıkı bağlantılarında eksprese edilir ve burada iki değerlikli katyonların geri emiliminde rol oynayan claudin 16 proteinini kodlar. Bu gende fonksiyon kaybına yol açan biallelik patojenik varyantlar Familial Hipomagnezemi ile Hiperkalsüri ve Nefrokalsinozis (FHHN) olarak da bilinen renal hipomagnezemi 3 fenotipine yol açmaktadır (Jaya Kausalya ve ark., 2006). Çalışmamızda, hipomagnezemi nedeniyle Gitelman sendromu ön tanısıyla değerlendirilen 27 yaşındaki erkek hastada (O#6), *CLDN16* geninde (NM_006580.3) c.453G>T, p.L151F varyantı homozigot olarak saptanmıştır. Bu olguda; evre 3 kronik böbrek hastalığı, metabolik asidoz, tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonları, nefrokalsinozis, tekrarlayan nefrolitotomi öyküsü, hipomagnezemi, hiperürisemi, hiperparatiroidizm, idrarda artmış magnezyum ve kalsiyum atılımı, proteinüri, lökositüri ve hipositratüri gibi çok sayıda klinik bulgu, FHHN fenotipi ile uyumlu bulunmuştur. Hastaya uygulanan NGS temelli genetik analiz sayesinde, Gitelman sendromu ön tanısından farklı olarak genotip-fenotip korelasyonu kurularak doğru tanıya ulaşılmıştır.

p.L151F varyantı, literatürde ilk kez 2000 yılında FHHN fenotipine sahip 4 hastanın üçünde birleşik heterozigot, birinde ise homozigot olarak tanımlanmıştır (Weber ve ark., 2000). Sonrasında yapılan daha geniş kapsamlı bir çalışmada, Almanya ve Doğu Avrupa kökenli 18 FHHN ailesinin 14'ünde aynı varyant tespit edilmiş ve Avrupa toplumlarında kurucu mutasyon etkisi (*founder effect*) gösterdiği bildirilmiştir (Weber ve ark., 2001). Türkiye'den ise bu varyant ilk olarak 2008 yılında yayımlanan bir vaka takdiminde, akraba evliliği bulunan bir ailede FHHN fenotipine sahip üç erkek kardeşte homozigot olarak rapor edilmiştir (Peru ve ark., 2008). Bizim olgumuzda da ebeveynler arasında akrabalık mevcuttu, probandın iki kardeşinde daha nefrokalsinozis ve kronik böbrek hastalığı öyküsü bulunmaktadır. Ayrıca yapılan fonksiyonel çalışmalarda; söz konusu varyantın parsiyel fonksiyon kaybına yol açtığı, bu nedenle tamamen işlev kaybettiren varyantlara kıyasla renal yetmezliğin daha yavaş progresyon gösterdiği bildirilmiştir (Hou ve ark., 2005; Konrad ve ark., 2008). Bu bilgilerle uyumlu olarak, bizim olgumuzun da 4 yaşından itibaren

nefrokalsinozis ve tekrarlayan üriner sistem enfeksiyonu nedeniyle takipte olduğu, son poliklinik başvurusunda ise evre 3 kronik böbrek hastalığı geliştiği saptanmıştır.

ATP6V1B1

Distal nefronun asit salgılanmasında görevli apikal proton pompasının β alt birimini kodlayan *ATP6V1B1* (eski adıyla *ATP6B1*) genindeki mutasyonların, ilerleyici sensörinöral işitme kaybıyla seyreden distal renal tübüler asidoz (dRTA) ile ilişkili olduğu ilk kez 1999 yılında bildirilmiştir. Bu gen, asit-baz dengesinin sağlanmasında temel rol oynayan proton pompası kompleksinin işlevsel bütünlüğü açısından kritik öneme sahiptir (Karet ve ark., 1999). ClinVar veritabanında bildirilen yapısal olmayan *ATP6V1B1* gen varyantlarının 108'i patojenik veya olası patojenik olarak sınıflandırılmış olup, bu varyantların yalnızca 9'u yanlış anlamlı (missense) değişimlerden oluşmaktadır. Mevcut verilerde çerçeve içi delesyon varyantlarının bu grupta yer almadığı dikkat çekmektedir (erişim tarihi: 16.05.2025). Çalışmamızda, anne ve babaları akraba olmayan ancak birbiriyle kuzen olan iki distal RTA olgusunda (O#7 ve O#8) *ATP6V1B1* geninde biri yanlış anlamlı, diğeri çerçeve içi delesyon olmak üzere iki farklı varyant saptanmıştır.

Çalışmamızda 10 yaşındaki erkek hastada (O#7), *ATP6V1B1* geninde (NM_001692.4) c.1037C>G, p.P346R yanlış anlamlı varyantı homozigot olarak saptanmıştır. Yapılan fonksiyonel çalışmalarda, P346R varyantının proton pompa aktivitesinde işlev kaybına neden olduğu deneysel olarak gösterilmiştir ve ark., (Fuster ve ark., 2008; Yang ve ark., 2006). Literatürde bu varyanta sahip bireylerde; erken bebeklik döneminde hastalık başlangıcı, nefrokalsinozis, sensörinöral işitme kaybı, metabolik asidoz, hipokalemi ve hiperkalsiüri gibi klinik bulguların bildirildiği görülmektedir (Besouw ve ark., 2017; Jobst-Schwan ve ark., 2020; Karet ve ark., 1999). Çalışmamızda bildirilen olguda da bu fenotipik özelliklerin tamamı gözlenmiş olup, literatürle uyum göstermektedir.

Olgu 8 (O#8) olarak tanımlanan 3 yaşındaki kız hastada, *ATP6V1B1* geninde O#7'de tanımlanan (NM_001692.4) c.1037C>G, p.P346R yanlış anlamlı varyanta ek olarak, çerçeve içi delesyona neden olan c.484_486del, p.E162del varyantı birleşik heterozigot olarak tespit edilmiştir. p.E162del varyantı, GnomAD (v4.1.0) popülasyon veritabanlarında son derece nadir görülmekte (allel frekans: 0.000001239), homozigot olarak raporlanmamış olup, literatürde daha önce tanımlanmamıştır. ClinVar veritabanında (ID: 635435) yalnızca bir kez Önemli Bilinmeyen Varyant (kayıt tarihi: 31 Ekim 2018) girdisi mevcuttur. Varyant,

ATP6V1B1 geninin evrimsel olarak yüksek oranda korunan 6. ekzonunda (PhyloP100way: 9.653) yer almakta, tekrar bölgelerinde bulunmamakta ve protein dizisinde bir amino asitlik kısalma ile sonuçlanmaktadır. p.E162del varyantının fonksiyonel etkisi henüz bilinmemekle birlikte, hastada saptanan büyüme geriliği, bilateral ileri derecede SNİK, normal anyon açıklı metabolik asidoz, hipokalemi, idrar pH>6.5, hiperkalsiüri, böbrek parankiminde hafif ekojenite artışı gibi klinik bulgular, *ATP6V1B1* geninde tanımlanan birleşik heterozigot varyant ile ilişkili olarak Progresif İşitme Kaybı ile Distal RTA 2 fenotipiyle uyumludur. Bu bulgular doğrultusunda p.E162del varyantının potansiyel klinik öneminin daha iyi anlaşılabilmesi için fonksiyonel çalışmalara ve benzer genotipe sahip ek olgu bildirimlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

ATP6V0A4

ATP6V0A4 geni, protonların hücre zarından taşınmasını sağlayan vakuoler tip proton pompasının V0 alt birimini kodlar (Golder & Karet Frankl, 2016). Kalıtsal distal RTA olgularında en sık patojenik varyant tespit edilen (%40) gen olan *ATP6V0A4*'te, fonksiyon kaybına yol açan biallelik varyantların hastalık fenotipi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Alexander ve ark., 2025). Çalışmamızda yer alan 23 yaşındaki kadın hastada (O#9), *ATP6V0A4* geninde ekzon-intron bileşkesini etkileyerek *null* ürüne neden olan (NM_020632.3) c.292-1G>A, splice akseptör varyantı homozigot olarak tespit edilmiştir. Bu varyant, literatürde ilk kez Smith ve arkadaşları tarafından Türkiye kökenli, işitme kaybı, rikets bulguları ve hiperkalsiüri olmayan distal RTA tanısı almış 11 yaşındaki bir kız olguda tanımlanmıştır (*ATP6NIB* geni, intron 6 splice akseptör AG→AA varyantı olarak) (Smith ve ark., 2000). Takip eden yıllarda, farklı hasta gruplarına tüm ekzom sekanslama (WES) yapılan bir çalışmada, ebeveynleri akraba olan 13 yaşında bir kız hastada aynı varyant homozigot olarak saptanmış ve bu olguda distal RTA, progresif sensörinöral işitme kaybı (SNİK), nefrokalsinozis ve hipotiroidi bildirilmiştir (Trujillano ve ark., 2017). Son olarak, 2022 yılında Türkiye'den yayımlanan bir çalışmada, üç yaşındaki distal RTA tanılı bir kız hastada c.292-1G>A varyantı homozigot olarak raporlanmış ve bu olguda SNİK, hiperkalsiüri, nefrokalsinozis gibi klinik bulguların varlığı ve hiperamonyeminin eşlik etmediği belirtilmiştir (Güven ve ark., 2022). Çalışmamızda yer alan olguda saptanan SNİK, hiperkalsiüri ve nefrokalsinozis bulguları, literatürde aynı varyantla ilişkilendirilmiş klinik özelliklerle uyumludur. Hipotiroidi durumu bilinmemekle birlikte, olgumuzun literatürde bildirilen vakalardan farklı olarak daha ileri yaşta genetik tanı almış olması dikkat çekicidir.

Ayrıca, hiperamonyemi ve rikets bulgularının eşlik etmesi, bu varyantın fenotipik spektrumunun daha geniş olabileceğini ya da zamanla gelişen komplikasyonlarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

BSND

BSND geni, böbrekte tuz geri emilimini ve iç kulakta potasyum geri dönüşümünü sağlayan CIC-Ka ve CIC-Kb klorür kanallarının beta alt birimi olan Barttin proteinini kodlar (Estévez ve ark., 2001). *BSND* geninin işlev kaybına yol açan biallelik varyantları Bartter sendromu tip 4a fenotipine yol açar (Johnson et al., 2023). Çalışmamızda, Bartter sendromu ön tanılı iki hastada (O#10 ve O#11) *BSND* geninde, ekzon 1’de biri yanlış anlamlı, diğeri başlangıç kodonu kaybı olmak üzere iki farklı varyant tespit edilmiştir.

Çalışmamızda yer alan, 2,5 yaşındaki kız hastada (O#10), *BSND* geninde (NM_057176.3) c.139G>A, p.G47R yanlış anlamlı varyantı homozigot olarak saptanmıştır. *Ksenopus* oositlerinde ve renal hücre hatlarında yapılan fonksiyonel çalışmalarda, p.Gly47Arg varyantının Barttin proteinin/klorür kanallarının (CLC-Ka) ekspresyonunu azalttığı; ancak Barttin’in hücre yüzeyine yerleşmesini veya CLC-Kb/Barttin kanallarının aktive edilmesini engellemediği, dolayısıyla orta etkili bir fenotipe neden olacağı gösterilmiştir (Estévez ve ark., 2001; Janssen ve ark., 2009). Literatürde bu varyanta sahip bireylerin çoğunda, Bartter sendromu tip 4 fenotipine ait olan polihidroamniyoz, prematürite, düşük doğum ağırlığı, neonatal dönemde ağır sıvı-elektrolit kaybı, progresif renal hastalık ve SNİK gibi bulgular bildirilmiştir. Bununla birlikte, nadir vakalarda antenatal bulgular olmaksızın yalnızca SNİK ve hafif renal semptomlarla genç erişkinlik döneminde tanı alan olgular da mevcuttur (Heilberg ve ark., 2015; Miyamura ve ark., 2003). Bizim olgumuzda (O#10) saptanan polihidroamniyoz, 31. gebelik haftasında prematür doğum, düşük doğum ağırlığı ve bilateral SNİK bulguları, literatürde tanımlanan Bartter sendromu tip 4 fenotipiyle uyumludur. Miyamura ve arkadaşları, bu varyanta sahip bireylerde gözlenen fenotip şiddetindeki değişkenliğin, in vitro modellerin fizyolojik koşulları tam olarak yansıtamaması ve Barttin’in CLC-Ka/Kb dışındaki kanallarla da etkileşime girmesi olasılığıyla açıklanabileceğini ileri sürmüştür (Miyamura ve ark., 2003).

BSND geninde varyant saptanan diğer olgu olan (O#11), 4 aylık kız hastada, başlangıç kodonu kaybına neden olan (NM_057176.3) c.1A>T, p.M1? varyantı homozigot olarak tespit edilmiştir. *BSND* geni, 320 amino asitlik bir proteini kodlamakta olup, bu

varyant sonucunda translasyonun başlama noktası olan ilk ATG dizisinin kaybı söz konusudur. Bu durumda, protein sentezinin alternatif olarak 26. kodonda yer alan ikinci ATG dizisinden başlaması ve dolayısıyla ilk 25 amino asidin kaybı beklenmektedir (*Mutation Taster*, n.d.). Ancak, Birkenhäger ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada, bu varyantın Türkiye kökenli beş farklı hastada saptandığı ve alternatif başlangıç noktasının yer almadığı, çünkü metiyonin kodlayan diğer amino asit kodonlarının Kozak dizisi (ökaryotik hücrelerde translasyonunun başladığı yeri tanımlayan özel bir nükleotid dizisidir) içerisinde yer almalarına rağmen güvenilirlik skorlarının düşük olduğu ifade edilmiştir (Birkenhäger ve ark., 2001). Bu bulgular, proteinin etkin bir şekilde sentezlenemeyeceğini ve dolayısıyla fonksiyon kaybının tam olacağını göstermektedir. Literatürde başlangıç kodonu kaybına neden olan mutasyonların, hastalığın ağır fenotipiyle ve böbrek fonksiyonlarının erken dönemde bozulmasıyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Birkenhäger ve ark., 2001; Janssen ve ark., 2009; Jeck ve ark., 2001). Bizim olgumuzda da antenatal dönemde klinik bulguların mevcut olması ve hastanın postnatal 5. ayında hemodinamik instabilite ve çoklu organ yetmezliği sonucu eksitus olması, bu varyantın ciddi klinik seyirle ilişkili olabileceğini güçlü biçimde desteklemektedir.

SLC12A1

SLC12A1 geni, Henle kulbunun kalın çıkan kolunda sodyum, potasyum ve klorürün yeniden emiliminden sorumlu olan ve idrarın konsantrasyonunda kilit rol oynayan $Na^+-K^+-2Cl^-$ kotransport proteinini (NKCC2) kodlamaktadır (Chadha & Alon, 2009). Çalışmamızda 16 yaşındaki kız hasta (O#12)'da, SLC12A1 geninde (NM_000338.3) c.2887_2888del, p.L963Efs*4 varyantı homozigot olarak tespit edilmiştir. Yirmi yedi ekzondan oluşan bu gende, 24. Ekzonda yer alan iki baz çiftinin delesyonu sonucu oluşan çerçeve kayması, 963. pozisyondaki lösin amino asidinin yerine glutamik asidin gelmesine ve ardından dört amino asit sonra prematür sonlanma kodonunun oluşmasına neden olmaktadır. Bu durumun, NKCC2 proteininin erken sonlanarak "truncating" bir etki oluşturmasına ve fonksiyon kaybına yol açması beklenmektedir.

Bahsi geçen varyant, gnomAD (v2.1.1) popülasyon veritabanında yer almamakta ve literatürde daha önce tanımlanmamış olması nedeniyle "novel" olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca varyant, evrimsel olarak orta-yüksek korunmuşluk düzeyine sahip bir konumda yer almakta olup (GERP: 5.53, PhyloP100way: 7.50), biyolojik işlev açısından önem taşıdığı düşünülmektedir. ClinVar veritabanında *SLC12A1* genine ait 123 varyant patojenik/olası

patojenik olarak sınıflandırılmış olup, bunların 74'ünü çerçeve kayması (frameshift) ve anlamsız (nonsense) tipteki, yani genin fonksiyon kaybına neden olan değişiklikler oluşturmaktadır (erişim tarihi: 22.05.2025). Bu bağlamda, çalışmamızda saptanan *frameshift* türündeki c.2887_2888del varyantı da fonksiyon kaybı üzerinden hastalık patogenezinin katkı sunabilecek niteliktedir. Klinik olarak O#12 olgusunda gözlenen polihidroamniyoz, prematür doğum, büyüme geriliği, nefrokalsinozis, metabolik alkaloz, elektrolit dengesizlikleri ve idrarda artmış sodyum, potasyum ve kalsiyum atılımı gibi bulgular, *SLC12A1* gen mutasyonlarına bağlı Bartter sendromu tip 1 fenotipi ile uyumludur. Bu doğrultuda c.2887_2888del varyantı, olası patojenik olarak değerlendirilmiş olup, patojenitesinin kesinleştirilebilmesi için fonksiyonel çalışmalara ve daha fazla hasta verisine ihtiyaç vardır.

KCNJI

KCNJI geni, böbrekte özellikle Henle'nin kalın çıkan kolu ve distal nefronda bulunan, hücre zarının dinlenme potansiyelini ve uyarılabilirliğini düzenleyen içe akım düzenleyici (*inward rectifier*) bir potasyum kanalını (ROMK) kodlar (Lorenz ve ark., 2002). Çalışmamızda, Gitelman sendromu ön tanısı ile yönlendirilen 24 yaşındaki erkek hasta (O#13)'da, *KCNJI* geninde (NM_000220.5) c.658C>T, p.Leu220Phe varyantı homozigot olarak tespit edilmiştir. Bu varyant, literatürde ilk kez Vollmer ve arkadaşları tarafından Türkiye kökenli, antenatal Bartter sendromu kliniğine sahip olguda Ala156Val varyantı ile birleşik heterozigot olarak tanımlanmıştır (Vollmer ve ark., 1998). Takip eden yıllarda, farklı vaka raporlarında, aynı varyant hem homozigot (Elfert ve ark., 2020; Jayasinghe ve ark., 2021) hem de farklı varyantlarla (örn; S219R, T191P) birleşik heterozigot formda (Sharma ve ark., 2014; Srivastava ve ark., 2013) bildirilmiştir.

Çalışmamızda yer alan olguda saptanan halsizlik, kas güçsüzlüğü, çocukluk döneminde nöbet, hipokalemi, metabolik alkaloz, hipostenüri, idrarda artmış potasyum atılımı, sınırda hipomagnezemi bulguları Bartter sendromu tip 2 fenotipi ile uyumludur. Ancak, prenatal öykü durumu ve nefrokalsinozis varlığı değerlendirilmemiştir, idrar kalsiyum atılımı normal saptanmıştır. Ayrıca, hastada D vitamini eksikliği, sekonder hiperparatiroidi gözlenmiştir. Literatürdeki homozigot L220F varyantına sahip olgular incelendiğinde; Huang ve ark. tarafından bildirilen 35 yaşındaki vakada nefrokalsinozis ve hafif hiperkalsiüri mevcuttur, Jayasinghe ve ark. tarafından yayımlanan çalışmada erişkin yaştaki iki olguda nefrokalsinozis saptanmıştır. Ancak Elfert ve ark. tarafından tanımlanan

26 yaşındaki olguda nefrokalsinozis tespit edilmesine rağmen idrar kalsiyum atılımı normal olarak değerlendirilmiştir (Elfert ve ark., 2020; Huang ve ark., n.d.; Jayasinghe ve ark., 2021). Bu durum söz konusu varyantın, kalsiyum metabolizması üzerindeki etkilerinin değişken olabileceğini ve D vitamini durumu gibi çevresel faktörlerin klinik tabloyu modüle edebileceğini düşündürmektedir. Ek olarak, homozigot L220F mutasyonuna sahip yukarıda bahsedilen hastaların bizim çalışmamızda olduğu gibi erişkin yaşta tanı almış olması dikkat çekmektedir. Ayrıca, in vitro fonksiyonel çalışmalar L220F varyantının ROMK kanal fonksiyonunu tamamen ortadan kaldırmadığını (~%50 aktivite korunumu), ancak S219R gibi başka bir varyantla birleşik heterozigot formda ise kanal aktivitesinin neredeyse tamamen kaybolduğunu, bu nedenle homozigot bireylerde bile nispeten hafif bir fenotipin gelişebileceğini göstermiştir (Srivastava ve ark., 2013). Tüm bu veriler neticesinde, Leu220Phe varyantının klinik spektrumu, neonatal ağır formlardan erişkin dönemde tanı alan atipik olgulara kadar geniş bir yelpazede karşımıza çıkabilir. Bu fenotipik heterojenite, genetik ve çevresel faktörlerin kompleks etkileşiminden kaynaklanıyor olabilir. Dolayısıyla, özellikle geç başlangıçlı hipokalemik metabolik alkaloz vakalarında, Bartter sendromu tip 2'nin ayırıcı tanıda düşünülmesi ve *KCNJ1* gen analizinin yapılması önem taşımaktadır.

SLC12A3

SLC12A3 geni, distal kıvrımlı tübüllerin lüminal membranında yer alan tiyazid duyarlı sodyum-klorür kotransporterini (NCCT) kodlamakta olup, bu taşıyıcı renal tuz dengesinin sağlanmasında kritik rol oynamaktadır (Simon ve ark., 1996). Çalışmamızda yer alan 10 hastada *SLC12A3* genine ait toplam sekiz farklı varyant (NM_000339.3: c.237_238dup, c.2089_2095del, c.1672T>C, c.1763C>T, c.1925G>A, c.1928C>T, c.1963C>T, NM_001126108.2: c.514T>C) tespit edilmiş olup, bunlardan yedisi literatürde daha önce bildirilmiş ve patojenik olarak tanımlanmıştır. En sık rastlanan değişim, homozigot ya da c.1928C>T ile birleşik heterozigot olarak gözlenen çerçeve kaymasına yol açan c.237_238dup varyantıdır. Yakın zamanda Türkiye'den bildirilen, pediatrik yaş grubundaki sekiz Gitelman sendromlu olguyu içeren bir çalışmada da bu varyantın en sık saptanmış olması, bulgularımızı desteklemektedir (Güven ve ark., 2021).

Öte yandan, 14. ekzonda yer alan NM_000339.3: c.1672T>C (p.W558R) varyantı literatürde daha önce bildirilmemiş olup, çalışmamızda ilk kez tanımlanmıştır ve “novel” olarak değerlendirilmiştir. Bu varyant 558. pozisyonda yer alan nötral ve hafif polar triptofan (W) amino asidinin, bazik ve polar arjinin (R) ile yer değiştirmesine sebep olmaktadır.

GnomAD (v2.1.1) popülasyon veritabanında yer almayan bu varyant, evrimsel olarak korunmuş bir bölgede konumlanmakta (GERP: 4.90; PhyloP100way: 7.90) ve çok sayıda in silico analiz (REVEL: 0.72; AlphaMissense: 0.99; MutationTaster: 1.000; DANN: 0.99; MetaLR: 0.59; MetaRNN: 0.95; PolyPhen-2 HumDiv: 1.00; SIFT: 0.00; CADD PHRED: 25.20) ile patojenite lehine güçlü skorlar sergilemektedir ClinVar veritabanında, 558. kodon ile ilişkili yalnızca bir adet patojenik varyant (c.1674G>A, p.W558*) yer almakta olup, bu değişim erken sonlanma kodonu oluşturan bir anlamsız (nonsense) varyanttır. Bu veriler ışığında, c.1672T>C varyantı, potansiyel olarak patojenik bir değişim olarak dikkat çekmektedir ve patojenitesinin doğrulanabilmesi için ileri düzey fonksiyonel analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda SLC12A3 geninde varyant saptanan olguların genetik tanı yaş aralığı 19 ila 40 yıl arasında değişmekte olup, pediatrik popülasyonda Gitelman sendromu tanısı alan hasta bulunmamaktadır. Bu durum, Gitelman sendromunun sıklıkla geç çocukluk, adolesan ya da erişkin dönemde tanı almasıyla uyumludur. Benzer şekilde, Kore'den bildirilen bir çalışmada, SLC12A3 varyantı taşıyan 31 hastada yaş dağılımı 16–67 yıl arasında (Lee ve ark., 2016); Japonya'dan bildirilen başka bir çalışmada ise 1–78 yıl arasında bildirilmiştir (Fujimura ve ark., 2019). Bulgularımız, Gitelman sendromunun tanısal spektrumunun yaşla ilişkili olarak geniş bir aralıkta değişebileceğini ve çoğunlukla geç tanı aldığını desteklemektedir.

SLC2A2

SLC2A2 geni, karaciğer, pankreas, bağırsak ve böbrek epitelinde kolaylaştırılmış çift yönlü glukoz taşınımını sağlayan GLUT2 adlı membran glikoproteinini kodlar (NCBI, n.). Bu genin biallelik patojenik varyantlarının, hepatorenal glikojen birikimi, böbrek proksimal tübül disfonksiyonu ve glukoz ile galaktoz intoleransı ile karakterize Fanconi-Bickel sendromuna yol açtığı ilk kez 1997 yılında tanımlanmıştır (Santer ve ark., 1997). Çalışmamızda, renal Fanconi sendromu ön tanısıyla değerlendirilen 10 aylık kız hastada (O#24), *SLC2A2* genine ait (NM_000340.2) c.380C>A (p.A127D) varyantı homozigot olarak saptanmıştır. Bu varyant, GLUT2 proteininin 127. pozisyonunda yer alan hidrofobik ve nötral özellikteki alanin (A) rezidüsünün, negatif yüklü asidik özellikteki aspartat (D) ile yer değiştirmesine neden olmakta, böylece proteinin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü etkileyebilecek anlamlı bir değişikliğe yol açmaktadır. Varyant, GnomAD (v4.1.0) veritabanında 1612500 allelden yalnızca birinde heterozigot olarak bildirilmiş olup (frekans:

6.202e-7), homozigot formda raporlanmamıştır. ClinVar veritabanında da bu varyanta ilişkin bir kayıt bulunmamaktadır.

c.380C>A varyantı ilk olarak 2015 yılında, Çinli bir Fanconi-Bickel sendromu hastasında, bir insersiyon varyantı ile birleşik heterozigot formda tanımlanmıştır (Wang ve ark., 2015). Aynı yıl Elmaogulları ve arkadaşları tarafından yayımlanan başka bir bildiriye bu varyant, 9 aylık bir kız hastada homozigot olarak tespit edilmiş ve hastanın yenidoğan döneminde geçici diyabet geçirdiği, ancak karaciğer tutulumu göstermediği belirtilmiştir (Elmaogulları ve ark., 2015). Çalışmamızda yer alan O#24'te homozigot p.A127D varyantına ek olarak büyüme geriliği, beslenme problemi, hipofosfatemi, hipokalsemi, hafif hipermagnezemi, hipouremi, ALP yüksekliği, glikozüri, proteinüri, ketonüri ve böbreklerde ekojenite artışı gibi tipik Fanconi-Bickel sendromu bulguları ile birlikte karaciğer tutulumu (hepatomegali ve KCTF yüksekliği) da gözlenmiştir. Ancak hastanın yenidoğan dönemine ait geçici diyabet öyküsüne ulaşamamıştır.

Ayrıca, Enogieru ve arkadaşlarının SLC2A2 geni varyantlarına yönelik yaptıkları fonksiyonel çalışmada, p.A127D varyantının GLUT2 taşıyıcısının glukoz transport aktivitesinde ciddi azalma ve plazma membranda kısmi ekspresyon gösterdiği bildirilmiştir (Enogieru ve ark., 2019). Bu bulgular, varyantın fonksiyon kaybına yol açtığını desteklemektedir. Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, c.380C>A (p.A127D) varyantı Fanconi-Bickel sendromu ile ilişkili olabilecek bir patojenik varyant olarak öne çıkmaktadır. Elmaogulları ve arkadaşlarının bildirisindeki hastayla çalışmamızdaki olgu arasında gözlenen klinik farklılıklar, aynı varyanta sahip bireylerde klinik şiddet ve fenotipik çeşitliliğin değişkenliğini ortaya koymakta ve genotip-fenotip korelasyonunun daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini göstermektedir.

SLC5A2

SLC5A2 geni, böbrekte proksimal tübüllerin başlangıç kısmında bulunan bir Na⁺/glukoz kotransporterini kodlar. Bu taşıyıcı protein, her bir sodyum iyonu ile birlikte bir glukoz molekülünü taşıyarak, kandaki glukozun idrarla kaybını önler (Wells ve ark., 1992). Çalışmamızda, insidental olarak glikozüri saptanan 50 yaşındaki erkek hastada (O#25), *SLC5A2* geninde (NM_003041.4) c.885+5G>A varyantı homozigot tespit edilmiştir. Bu değişim, *SLC5A2* geninin 7. intronunda yer alan ve türler arasında evrimsel olarak korunmuş olan +5 splice donör varyantıdır. In silico tahmin aracı SpliceAI tarafından yapılan analizde,

bu varyantın patojenik olduğu 0.93 puanla öngörölmüştür. Literatürde, söz konusu varyant ilk olarak Santer ve arkadaşları (2003) tarafından tanımlanmış olup, farklı hastalarda hem homozigot, hem birleşik heterozigot hem de heterozigot formlarında gözlemlenmiştir (Santer ve ark., 2003). Bu varyantın etkileri, ilerleyen yıllarda yapılan çalışmalarla daha da netleşmiş ve homozigot ve birleşik heterozigot formlarında daha belirgin klinik bulgulara yol açtığı bildirilmiştir (Calado ve ark., 2008). Bizim olgumuzda da varyantın homozigot varlığı, normal kan glukoz düzeylerine rağmen aşikar glukozüri ile uyumludur ve literatür verilerini desteklemektedir. Bu bulgular, c.885+5G>A varyantının *SLC5A2* geninin *splicing* bölgesini etkileyerek fonksiyon kaybına yol açtığını ve renal glukoz geri emiliminde bozukluğa neden olduğunu düşündürmektedir. Varyantın heterozigot bireylerde hafif fenotipik etkiler göstermesi, genin dozaj etkisini yansıtmaktadır. İleri çalışmalarda, bu varyantın moleküler etki mekanizmasının aydınlatılması yararlı olacaktır.

KLHL3

KLHL3 geni, distal tübülde *CUL3* ile kompleks oluşturarak Na⁺-Cl⁻ kotransportörünün (NCCT) ubikütinasyon yoluyla yüzeyden uzaklaştırıp yıkımını sağlayan bir adaptör proteini kodlar. Bu gende fonksiyon kaybına yol açan varyantlar, NCCT'nin hücre membranında birikmesine yol açarak psödohipoaldosteronizm tip 2d fenotipinin gelişmesine neden olmaktadır (Louis-Dit-Picard ve ark., 2012). Çalışmamızda O#26 olarak tanımlanan 4 yaşındaki kız hastanın *KLHL3* geninde (NM_017415.3) c.161T>C, p.I54T varyantı homozigot tespit edilmiştir. Bu varyant, proteinin 54. pozisyonundaki hidrofobik özellik gösteren izolösin (I) amino asidinin, polar ve yüksüz özellikteki treonin (T) ile yer değiştirmesine neden olmaktadır. Söz konusu varyant, GnomAD (v4.1.0) popülasyon veritabanında bildirilmemiş olup, literatürde daha önce tanımlanmamıştır ve bu nedenle “novel” olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca varyant, yüksek derecede evrimsel olarak korunmuş bir pozisyonda yer almakta olup (GERP: 5.5, PhyloP100way: 7.15), bu da biyolojik önemini desteklemektedir. In silico analizlerde, p.I54T varyantı çeşitli algoritmalar tarafından patojenite lehine skorlarla değerlendirilmiştir: REVEL (0.68), AlphaMissense (0.98), SIFT (0.00), MutationTaster (0.99), DANN (0.99), MetaLR (0.56), MetaRNN (0.87), PolyPhen-2 HumDiv (0.77) ve CADD PHRED (25.40). Bu bulgular varyantın fonksiyonel etki potansiyelini göstermektedir. Ancak, yalnızca FATHMM algoritması varyantı benign olarak değerlendirmiştir (-0.88).

KLHL3 proteini üç ana yapısal domaine sahiptir: BTB (bric-a-brac, tramtrack, broad complex), BACK ve kelch. Bu domainlerden BTB bölgesi, proteinin oligomerizasyonunu sağlayan ve *CUL3* ile etkileşerek ubikütin ligaz kompleksinin oluşumunda rol oynayan önemli bir yapıdır (Louis-Dit-Picard ve ark., 2012). Daha önce BTB domaininde tanımlanan A77E, M78V ve E85A gibi *missense* varyantların *KLHL3*'ün *CUL3* ile etkileşimini bozarak *WNK* kinazların birikimine ve NCCT aktivitesinin artmasına neden olduğu, fonksiyonel çalışmalarla ortaya konmuştur (Ji & Privé, 2013; Lin ve ark., 2019).

ClinVar veritabanında *KLHL3* genine ait bildirilen ve yapısal olmayan varyantların 30'u patojenik veya olası patojenik olarak sınıflandırılmıştır; bunların 22'si *missense* türündedir ve sadece 4 tanesi (A77E, M78V, M78I, E85A) BTB domaininde yer almaktadır (erişim tarihi: 29.05.2025). Çalışmamızda saptanan ve BTB domaini içinde yer alan p.I54T varyantı, benzer mekanizmalarla *KLHL3*'ün *CUL3* ile etkileşimini bozarak psödohipoaldosteronizm tip 2d patofizyolojisine katkıda bulunabilir.

Olgumuzda gözlenen büyüme geriliği, hiperkalemi, hiponatremi, hiperkloremi, metabolik asidoz, hiperfosfatemi ve normal aldosteron düzeyine karşın düşük renin seviyesi, psödohipoaldosteronizm tip 2d fenotipi ile uyumludur. p.I54T varyantı, ACMG kriterlerine göre “önemi bilinmeyen varyant (VUS)” olarak sınıflandırılmış olsa da; BTB domaininde yer alması, biyoinformatik analizlerde patojenite lehine bulgular sunması ve hastanın fenotipiyle gösterdiği uyum, bu varyantın hastalıkla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu ilişkinin kesinleştirilebilmesi için *in vitro* veya *in vivo* düzeyde fonksiyonel çalışmalar ile daha geniş klinik vaka serilerine ihtiyaç vardır.

Tüm bulguların yorumlanmasında çalışmamızın bazı sınırlılıkları göz önünde bulundurulmalıdır. İlk olarak, hasta grubunun kapsamlı bir ön değerlendirme sürecinden geçirilerek seçilmesi ve toplamda yalnızca 26 hastanın çalışmaya dahil edilmesi, sonuçların genellenebilirliğini sınırlayan temel bir faktördür. Bu durum, nadir kalıtsal böbrek hastalıklarına yönelik çalışmalarda sık karşılaşılan bir sınırlılık olmakla birlikte, istatistiksel analizlerin gücünü de azaltmaktadır. İkinci olarak, bazı kalıtsal tübülopatilerin patogeneğinde kopya sayısı değişikliklerinin (CNV) rol oynayabileceği bilinmesine karşın, teknik nedenlerle bu çalışmada CNV analizine yer verilememiştir. Bu durum, genomik varyasyonların daha kapsamlı ve bütüncül bir biçimde değerlendirilmesini engellemiştir. Üçüncü olarak, çalışmanın retrospektif tasarımı nedeniyle bazı klinik verilere eksiksiz ulaşılamamış, bu da hasta fenotiplerinin ayrıntılı biçimde tanımlanmasını sınırlamıştır. Son

olarak, aile öyküsünde benzer renal hastalık bulunan bazı bireylerin genetik analiz sürecine dahil edilememesi, ailesel segregasyon analizlerinin yapılmasına engel olmuş ve bu durum varyantların patojenitesine ilişkin sınıflamada kullanılacak önemli bir verinin eksikliğine yol açmıştır. Aynı zamanda bu durum, varyantların penetrans düzeylerinin daha net bir şekilde değerlendirilmesini de kısıtlamaktadır. Tüm bu sınırlılıklara rağmen, elde edilen veriler literatüre katkı sunmakta ve ileriye dönük, daha geniş hasta gruplarını içeren, prospektif çalışmalara zemin oluşturmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. SONUÇLAR

Çalışmamızda, NGS yöntemi ile hedeflenmiş gen panelleri kullanılarak kalıtsal tübülöpato tanı alan hem pediatrik hem de erişkin olguların dizi analizi verileri ve fenotipik bulguları değerlendirilmiştir.

- Toplam 26 hastada, 12 farklı gende klinik anlam ifade eden 24 farklı varyant saptanmıştır.
- Tespit edilen dizi değişimlerinin %70'i (n:21) patojenik varyant, %16,7'si (n:5) olası patojenik ve %13,3'ü (n:4) önemi bilinmeyen varyant kategorisinde sınıflandırılmıştır.
- Hastalarda en sık raporlanan gen SLC12A3 (10 hasta, %38,5) olup, bunu sırasıyla CASR (4 hasta, %15,4), BSND (2 hasta, %7,7) ve ATP6V1B1 (2 hasta, %7,7) izlemiştir.
- En sık raporlanan genle uyumlu olarak en sık saptanan kalıtsal tübülöpato %38,5 oranı ile (n=10) Gitelman sendromu olmuştur. Ancak kalıtsal tübülopatilerin genetik ve fenotipik heterojenite göstermesi nedeniyle ikinci sıklıkta, %15,4 oranı ile (n=4) Bartter sendromu (Tip 1, Tip 2 ve Tip 4a dahil) tespit edilmiştir. Üçüncü sırada ise %11,5 oranı ile (n=3) distal renal tübüler asidoz olguları yer almaktadır. Bunu, %7,7 oranı ile eşit sıklıkta saptanan ailesel hipokalsiürik hiperkalsemi (FHH; Tip 1 ve Tip 3 dahil) ve hipokalsemi olguları takip etmiştir.
- Gitelman sendromu ön tanısı ile yönlendirilen 2 olguda (%7,7), genetik analiz sonucunda önceki klinik tanının revizyonu sağlanmıştır.
- Dört farklı önemi bilinmeyen varyant (CASR c.314C>A, ATP6V1B1 c.484_486del, SLC12A3 c.1672T>C, KLHL3 c.161T>C) tespit edilmiştir. In siliko tahmin araçları, varyantların yer aldığı bölgelerinin evrimsel korunmuşluğu, bu varyantların popülasyonda nadir gözlenmesi ve hastaların klinik bulgularının ilgili genlerin fenotipik bulguları ile örtüşmesi dikkate alındığında klinik anlam taşıyabileceği düşünülmüştür. Hastaların aile içi segregasyon analizlerinin yapılması neticesinde, bu varyantların sınıflamasının değişme olasılığı bulunmaktadır.
- Literatürde daha önce bildirilmemiş olan beş farklı "novel" varyant; CASR c.2519G>T, SLC12A1:c.2887_2888del, CASR c.314C>A, SLC12A3 c.1672T>C, KLHL3 c.161T>C tespit edilmiştir. Bu varyantlardan ilk ikisi, olası patojenik olarak kategorize edilmiştir. Bu novel varyantların, literatürde ilgili genetik hastalıkların mutasyon spektrumuna önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6.2. ÖNERİLER

- Hasta sayısının artırıldığı, çok merkezli ve prospektif tasarımı çalışmaları planlanması, nadir kalıtsal tübülopatilerin genetik ve fenotipik çeşitliliğini daha kapsamlı biçimde ortaya koyarak, istatistiksel analizlerin gücünü artıracaktır.
- Kopya sayısı değişikliklerinin (CNV) analizine olanak tanıyan yöntemlerin dizileme testlerine entegre edilmesi, tübülopatilerin genomik alt yapısının daha bütüncül şekilde değerlendirilmesini sağlayarak, tanı oranını olumlu yönde etkileyebilir.
- Aile bireylerinin genetik analiz sürecine aktif olarak dahil edilmesi, segregasyon analizlerinin yapılmasına olanak tanıyacak ve özellikle önemi bilinmeyen varyantların sınıflandırılmasına dair belirsizliklerin giderilmesinde önemli katkı sağlayacaktır.
- Hedeflenmiş gen panelleri ile tanı konulamayan veya klinik bulgularla genetik veriler arasında uyumsuzluk saptanan olgularda, tüm ekzom dizileme (WES) ya da tüm genom dizileme (WGS) gibi daha geniş kapsamlı dizileme tekniklerinin kullanılması önerilmektedir. Bu yöntemler, tanı oranını artırmanın yanı sıra, literatürde daha önce tanımlanmamış yeni varyantların ve gen-hastalık ilişkilerinin saptanmasına olanak tanıyabilir.

7. KAYNAKLAR

- Aashiq, M., Malallah, A. J., Khan, F., & Alsada, M. (2020). Clinical and Biochemical Features in a Case of Familial Hypocalciuric Hypercalcemia Type 3 with AP2S1 Gene Mutation in Codon Arg15His . *Case Reports in Pediatrics*, 2020, 1–3. <https://doi.org/10.1155/2020/7312894>
- Alexander, R. T., Law, L., Gil-Peña, H., Greenbaum, L. A., & Santos, F. (2025). Hereditary Distal Renal Tubular Acidosis. *GeneReviews®*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547595/>
- Alhasan, K., D'Alessandri-Silva, C., Mongia, A., Topaloglu, R., Tasic, V., & Filler, G. (2022). Young Adults With Hereditary Tubular Diseases: Practical Aspects for Adult-Focused Colleagues. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 29(3), 292–307. <https://doi.org/DOI:10.1053/j.ackd.2021.11.004>
- Altunören, O., Aydın, G., & Güngör, Ö. (2017). Böbrek Anatomisi. In T. Arınsoy, Güngör G, & Koçyiğit İ (Eds.), *Böbrek Fizyopatolojisi* (pp. 1–6). Reaktif.
- Anshuman Saha, Kinnari B Vala, & Himanshu V Patel. (2021). Next-generation sequencing in children of West India with suspected inherited tubulopathies. *Indian Journal of Child Health*, 8(3), 109–114. <https://doi.org/10.32677/ijch.2021.v08.i03.001>
- Ashton, E. J., Legrand, A., Benoît, V., Roncelin, I., Venisse, A., Zennaro, M. C., Jeunemaitre, X., Iancu, D., van't Hoff, W. G., Walsh, S. B., Godefroid, N., Rothier, A., Del Favero, J., Devuyt, O., Schaefer, F., Jenkins, L. A., Kleta, R., Dahan, K., Vargas-Poussou, R., & Bockenhauer, D. (2018). Simultaneous sequencing of 37 genes identified causative mutations in the majority of children with renal tubulopathies. *Kidney International*, 93(4), 961–967. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.10.016>
- Aubert-Mucca, M., Dubucs, C., Groussolles, M., Vial, J., Le Guillou, E., Porquet-Bordes, V., Pasmant, E., Salles, J. P., & Edouard, T. (2021). Prenatal features and neonatal management of severe hyperparathyroidism caused by the heterozygous inactivating calcium-sensing receptor variant, Arg185Gln: A case report and review of the literature. *Bone Reports*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2021.101097>
- Bagga, A., Bajpai, A., & Menon, S. (2005). Approach to Renal Tubular Disorders. *Indian Journal of Pediatrics*, 72(Approach to Renal Tubular Disorders), 771–776. <https://doi.org/DOI:10.1007/BF02734150>
- Bayrakçı, N., & Özkan, G. (2022). FANCONİ SENDROMU. In Ö. GÜNGÖR, S. ULU, & G. SÜLEYMANLAR (Eds.), *GENETİK BÖBREK HASTALIKLARI* (pp. 199–205). Güneş Tıp Kitabevleri.
- Besouw, M. T. P., Bienias, M., Walsh, P., Kleta, R., van't Hoff, W. G., Ashton, E., Jenkins, L., & Bockenhauer, D. (2017). Clinical and molecular aspects of distal renal tubular acidosis in children. *Pediatric Nephrology*, 32(6), 987–996. <https://doi.org/10.1007/s00467-016-3573-4>
- Birkenhäger, R., Otto, E., Schürmann, M. J., Vollmer, M., Ruf, E. M., Maier-Lutz, I., Beekmann, F., Fekete, A., Omran, H., Feldmann, D., Milford, D. V., Jeck, N., Konrad, M., Landau, D., Knoers, N. V. A. M., Antignac, C., Sudbrak, R., Kispert, A., & Hildebrandt, F. (2001). Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nature Genetics*, 29(3), 310–314. <https://doi.org/10.1038/ng752>
- Blázquez Gómez, C. J., Gil-Peña, H., Ordóñez Álvarez, F. A., & Santos Rodríguez, F. (2021). Evolución de tubulopatías renales primarias diagnosticadas en edad

- pediátrica. *Nefrología*, 41(2), 182–190.
<https://doi.org/10.1016/j.nefro.2020.07.015>
- Bokhari, S. R. A., Zulfiqar, H., & Mansur, A. (2023). Bartter Syndrome. In *In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017 Jun-*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442019/>. StatPearls Publishing.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442019/>
- Calado, J., Sznajder, Y., Metzger, D., Rita, A., Hogan, M. C., Kattamis, A., Scharf, M., Tasic, V., Greil, J., Brinkert, F., Kemper, M. J., & Santer, R. (2008). Twenty-one additional cases of familial renal glucosuria: Absence of genetic heterogeneity, high prevalence of private mutations and further evidence of volume depletion. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 23(12), 3874–3879.
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfn386>
- Chadha, V., & Alon, U. S. (2009). Hereditary Renal Tubular Disorders. *Seminars in Nephrology*, 29(4), 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2009.03.013>
- Chinoy, A., Nicholson, J., Skae, M., Hannan, F. M., Thakker, R. V., Mughal, M. Z., & Padidela, R. (2023). Neurodevelopmental Abnormalities in Patients with Familial Hypocalciuric Hypercalcemia Type 3. *Journal of Pediatrics*, 257.
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2023.02.013>
- ClinGen. (2022). *ClinGen general sequence variant curation process standard operating procedure (Version 3.2)*.
https://clinicalgenome.org/site/assets/files/7438/variant_curation_sop_v3_2_oct_2022.pdf
- Cogal, A. G., Arroyo, J., Shah, R. J., Reese, K. J., Walton, B. N., Reynolds, L. M., Kennedy, G. N., Seide, B. M., Senum, S. R., Baum, M., Erickson, S. B., Jagadeesh, S., Soliman, N. A., Goldfarb, D. S., Beara-Lasic, L., Edvardsson, V. O., Palsson, R., Milliner, D. S., Sas, D. J., ... Harris, P. C. (2021). Comprehensive Genetic Analysis Reveals Complexity of Monogenic Urinary Stone Disease. *Kidney International Reports*, 6(11), 2862–2884.
<https://doi.org/10.1016/j.ekir.2021.08.033>
- Cole, D. E. C., Yun, F. H. J., Wong, B. Y. L., Shuen, A. Y., Booth, R. A., Scillitani, A., Pidasheva, S., Zhou, X., Canaff, L., & Hendy, G. N. (2009). Calcium-sensing receptor mutations and denaturing high performance liquid chromatography. *Journal of Molecular Endocrinology*, 42(4), 331–339.
<https://doi.org/10.1677/JME-08-0164>
- Dalley, A., & Agur, A. (Eds.). (2023). *Moore's Clinically Oriented Anatomy* (9th ed.). Wolters Kluwer.
- Demiriz Gülmez, D. (2022). Böbrek Anatomisi ve Fizyolojisi. In S. Özkan & S. Epözdemir (Eds.), *Türkiye Klinikleri* (Issue Yoğun Bakımda Renal Problemler ve Çözümleri, pp. 1–6).
- den Dunnen, J. T., Dalgleish, R., Maglott, D. R., Hart, R. K., Greenblatt, M. S., McGowan-Jordan, J., Roux, A. F., Smith, T., Antonarakis, S. E., & Taschner, P. E. M. (2016). HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human Mutation*, 37(6), 564–569. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>
- Domingo-Gallego, A., Pybus, M., Bullich, G., Furlano, M., Ejarque-Vila, L., Lorente-Grandoso, L., Ruiz, P., Fraga, G., López González, M., Piñero-Fernández, J. A., Rodríguez-Peña, L., Llano-Rivas, I., Sáez, R., Bujons-Tur, A., Ariceta, G., Guirado, L., Torra, R., & Ars, E. (2022). Clinical utility of genetic testing in early-onset kidney disease: Seven genes are the main players. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 37(4), 687–696. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfab019>
- Downie, M. L., Lopez Garcia, S. C., Kleta, R., & Bockenhauer, D. (2021). Inherited tubulopathies of the kidney insights from genetics. *Clinical Journal of the*

- American Society of Nephrology*, 16(4), 620–630.
<https://doi.org/10.2215/CJN.14481119>
- Duman, D., & Tekin, M. (2024). Yeni Nesil Dizileme Uygulamalarına Giriş. In A. O. Çağlayan & Z. Yüksel (Eds.), *YENİ NESİL DİZİLEME VE KLİNİKTEKİ UYGULAMALARI* (pp. 3–9). Güneş Tıp Kitabevleri.
- Elfert, K. A., Geller, D. S., Nelson-Williams, C., Lifton, R. P., Al-Malki, H., & Nauman, A. (2020). Late-onset bartter syndrome type II due to a homozygous mutation in KCNJ1 gene: A case report and literature review. *American Journal of Case Reports*, 21, 1–7. <https://doi.org/10.12659/AJCR.924527>
- Elmaogullari, S., Demirel, F., Tepe, D., Dincel, N., Tayfun, M., Ucakturk, S., Gurbuz, F., & Jayne, H. (2015). Fanconi-Bickel syndrome due to a novel SLC2A2 mutation presenting with transient neonatal diabetes (P3-719). *Hormone Research in Paediatrics*, 84(1), 369. <https://doi.org/10.1159/000437032>
- Enogieru, O. J., Ung, P. M. U., Yee, S. W., Schlessinger, A., & Giacomini, K. M. (2019). Functional and structural analysis of rare SLC2A2 variants associated with Fanconi-Bickel syndrome and metabolic traits. *Human Mutation*, 40(7), 983–995. <https://doi.org/10.1002/HUMU.23758>;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Entry - #618314 - *HYPOMAGNESEMIA, SEIZURES, AND IMPAIRED INTELLECTUAL DEVELOPMENT 2; HOMGSMR2 - OMIM*. (n.d.). Retrieved March 17, 2025, from <https://www.omim.org/entry/618314>
- Estévez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhäger, R., Otto, E., Hildebrandt, F., & Jentsch, T. J. (2001). Barttin is a Cl⁻ channel β -subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature*, 414(6863), 558–561. <https://doi.org/10.1038/35107099>,
- Fujimura, J., Nozu, K., Yamamura, T., Minamikawa, S., Nakanishi, K., Horinouchi, T., Nagano, C., Sakakibara, N., Nakanishi, K., Shima, Y., Miyako, K., Nozu, Y., Morisada, N., Nagase, H., Ninchoji, T., Kaito, H., & Iijima, K. (2019). Clinical and Genetic Characteristics in Patients With Gitelman Syndrome. *Kidney International Reports*, 4(1), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.ekir.2018.09.015>
- Fuster, D. G., Zhang, J., Xie, X. S., & Moe, O. W. (2008). The vacuolar-ATPase B1 subunit in distal tubular acidosis: Novel mutations and mechanisms for dysfunction. *Kidney International*, 73(10), 1151–1158. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.96>
- Gitelman, H. J., G. J. B., & W. L. G. (1966). A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia. *Transactions of the Association of American Physicians*, 79, 221–235.
- Glaudemans, B., Van Der Wijst, J., Scola, R. H., Lorenzoni, P. J., Heister, A., Van Der Kemp, A. M. W., Knoers, N. V., Hoenderop, J. G., & Bindels, R. J. (2009). A missense mutation in the Kv1.1 voltage-gated potassium channel-encoding gene KCNA1 is linked to human autosomal dominant hypomagnesemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(4), 936–942. <https://doi.org/10.1172/JCI36948>
- Glaudo, M., Letz, S., Quinkler, M., Bogner, U., Elbelt, U., Strasburger, C. J., Schnabel, D., Lankes, E., Scheel, S., Feldkamp, J., Haag, C., Schulze, E., Frank-Raue, K., Raue, F., Mayr, B., & Schöf, C. (2016). Heterozygous inactivating CaSR mutations causing neonatal hyperparathyroidism: Function, inheritance and phenotype. *European Journal of Endocrinology*, 175(5), 421–431. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0223>,
- Golder, Z. J., & Karet Frankl, F. E. (2016). Extra-renal locations of the α 4 subunit of H⁺ATPase. *BMC Cell Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/S12860-016-0106-8>,

- Green, E. D., Watson, J. D., & Collins, F. S. (2015). Human Genome Project: Twenty-five years of big biology. *Nature*, *526*, 29–31. <https://doi.org/DOI:10.1038/526029a>
- Guan, P., & Sung, W. K. (2016). Structural variation detection using next-generation sequencing data: A comparative technical review. In *Methods* (Vol. 102, pp. 36–49). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.01.020>
- Guo, W., Ji, P., & Xie, Y. (2023). Genetic Diagnosis and Treatment of Inherited Renal Tubular Acidosis. *Kidney Diseases*, *9*(5), 371–383. <https://doi.org/10.1159/000531556>
- Güven, S., Gokce, I., Alavanda, C., Cicek, N., Bodur DEMIRCI, E., Sak, M., Pul, S., Nisa TURKKAN, O., Yildiz, N., Ata, P., & Alpay, H. (2021). MARMARA MEDICAL JOURNAL Differential diagnosis of classical Bartter syndrome and Gitelman syndrome: Do we need genetic analysis? *Marmara Med J*, *34*(3), 254–259. <https://doi.org/10.5472/marumj.X>
- Güven, S., Gökçe, İ., Alavanda, C., Hişmi, B. Ö., Çiçek, N., Demirci, E. B., Sak, M., Yıldız, N., Ata, P., & Alpay, H. (2022). Molecular Aspects of Distal Kidney Tubular Acidosis in Children, Its Long-Term Outcome, and Relationship with Hyperammonemia. *Turkish Archives of Pediatrics*, *57*(4), 432–440. <https://doi.org/10.5152/TurkArchPediatri.2022.21362>
- Hall, J. E., & Hall, M. E. (Eds.). (2020). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (14th Edition). Elsevier.
- Hannan, F. M., Stevenson, M., Bayliss, A. L., Stokes, V. J., Stewart, M., Kooblall, K. G., Gorvin, C. M., Codner, G., Teboul, L., Wells, S., & Thakker, R. V. (2021). Ap2s1 mutation causes hypercalcaemia in mice and impairs interaction between calcium-sensing receptor and adaptor protein-2. *Human Molecular Genetics*, *30*(10), 880–892. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab076>
- Heilberg, I. P., feferman, Tótolí, C., & Calado, J. T. omaz. (2015). Adult presentation of Bartter syndrome type IV with erythrocytosis. *Einstein (São Paulo, Brazil)*, *13*(4), 604–606. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RC3013>,
- Hendy, G. N., D’Souza-Li, L., Yang, B., Canaff, L., & Cole, D. E. C. (2000). Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. In *Human Mutation* (Vol. 16, Issue 4, pp. 281–296). [https://doi.org/10.1002/1098-1004\(200010\)16:4<281::AID-HUMU1>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1098-1004(200010)16:4<281::AID-HUMU1>3.0.CO;2-A)
- Hou, J., Paul, D. L., & Goodenough, D. A. (2005). Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *Journal of Cell Science*, *118*(21), 5109–5118. <https://doi.org/10.1242/JCS.02631>
- Huang, L., Luiken, G. P. M., Van Riemsdijk, I. C., Petrij, F., Zandbergen, A. A. M., & Dees, A. (n.d.). *nephrocalcinosis as adult presentation of Bartter syndrome type ii*.
- Hureaux, M., Ashton, E., Dahan, K., Houillier, P., Blanchard, A., Cormier, C., Koumakis, E., Iancu, D., Belge, H., Hilbert, P., Rotthier, A., Del Favero, J., Schaefer, F., Kleta, R., Bockenhauer, D., Jeunemaitre, X., Devuyst, O., Walsh, S. B., & Vargas-Poussou, R. (2019). High-throughput sequencing contributes to the diagnosis of tubulopathies and familial hypercalcemia hypocalciuria in adults. *Kidney International*, *96*(6), 1408–1416. <https://doi.org/10.1016/J.KINT.2019.08.027>
- Iancu, D., & Ashton, E. (2020). Inherited renal tubulopathies—Challenges and controversies. In *Genes* (Vol. 11, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes11030277>
- Jain, G., Das, G., Malhotra, R., Ramchandran, S., Phani, N. M., Appaswamy, G., Sridharan, U., & Dwivedi, A. (2021). Hypomagnesemia with Secondary

- Hypoparathyroidism and Hypocalcemia due to Novel Variants in the Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 6 (TRPM6) Gene. *Journal of Pediatric Genetics*, 13(01), 035–042. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1733949>
- Janssen, A. G. H., Scholl, U., Domeyer, C., Nothmann, D., Leinenweber, A., & Fahlke, C. (2009). Disease-Causing Dysfunctions of Barttin in Bartter Syndrome Type IV. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(1), 145. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008010102>
- Jaya Kausalya, P., Amasheh, S., Günzel, D., Wurps, H., Müller, D., Fromm, M., & Hunziker, W. (2006). Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(4), 878–891. <https://doi.org/10.1172/JCI26323>
- Jayasinghe, K., Stark, Z., Kerr, P. G., Gaff, C., Martyn, M., Whitlam, J., Creighton, B., Donaldson, E., Hunter, M., Jarmolowicz, A., Johnstone, L., Krzesinski, E., Lunke, S., Lynch, E., Nicholls, K., Patel, C., Praver, Y., Ryan, J., See, E. J., ... Quinlan, C. (2021). Clinical impact of genomic testing in patients with suspected monogenic kidney disease. *Genetics in Medicine*, 23, 183–191. <https://doi.org/10.1038/s41436>
- Jeck, N., Reinalter, S. C., Henne, T., Marg, W., Mallmann, R., Pasel, K., Vollmer, M., Klaus, G., Leonhardt, A., Seyberth, H. W., & Konrad, M. (2001). Hypokalemic salt-losing tubulopathy with chronic renal failure and sensorineural deafness. *Pediatrics*, 108(1). <https://doi.org/10.1542/PEDS.108.1.E5>,
- Ji, A. X., & Privé, G. G. (2013). Crystal Structure of KLHL3 in Complex with Cullin3. *PLOS ONE*, 8(4), e60445. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0060445>
- Jobst-Schwan, T., Klämbt, V., Tarsio, M., Heneghan, J. F., Majmundar, A. J., Shril, S., Buerger, F., Ottlewski, I., Shmukler, B. E., Topaloglu, R., Hashmi, S., Hafeez, F., Emma, F., Greco, M., Laube, G. F., Fathy, H. M., Pohl, M., Gellermann, J., Milosevic, D., ... Hildebrandt, F. (2020). Whole exome sequencing identified ATP6V1C2 as a novel candidate gene for recessive distal renal tubular acidosis. *Kidney International*, 97(3), 567–579. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.09.026>
- Johnson, J. R., Floege, J., & Tonelli, M. (Eds.). (2023). *COMPREHENSIVE CLINICAL NEPHROLOGY* (Seventh Edition). ELSEVIER.
- Joung, J., & Cho, H. (2023). Tubulopathy: the clinical and genetic approach in diagnosis. In *Childhood Kidney Diseases* (Vol. 27, Issue 1, pp. 11–18). Korean Society of Pediatric Nephrology. <https://doi.org/10.3339/ckd.23.001>
- Kara, A. V. (2022). Magnezyum Transport Bozuklukları. In Ö. Güngör, S. Ulu, & G. Süleymanlar (Eds.), *GENETİK BÖBREK HASTALIKLARI* (pp. 373–383). GÜNEŞ TIP KİTABEVLERİ.
- Karet, F. E., Finberg, K. E., Nelson, R. D., Nayir, A., Mocan, H., Sanjad, S. A., Rodriguez-Soriano, J., Santos, F., Cremers, C. W. R. J., Di Pietro, A., Hoffbrand, B. I., Winiarski, J., Bakkaloglu, A., Ozen, S., Dusunsel, R., Goodyer, P., Hulton, S. A., Wu, D. K., Skvorak, A. B., ... Lifton, R. P. (1999). Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nature Genetics*, 21(1), 84–90. <https://doi.org/10.1038/5022>
- Kermond, R., Mallett, A., & McCarthy, H. (2023). A clinical approach to tubulopathies in children and young adults. *Pediatric Nephrology*, 38(3), 651–662. <https://doi.org/10.1007/s00467-022-05606-1>
- Knoers, N., Antignac, C., Bergmann, C., Dahan, K., Giglio, S., Heidet, L., Lipska-Ziğtkiewicz, B. S., Noris, M., Remuzzi, G., Vargas-Poussou, R., & Schaefer, F. (2022). Genetic testing in the diagnosis of chronic kidney disease:

- Recommendations for clinical practice. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 37(2), 239–254. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfab218>
- Kömhoff, M., & Laghmani, K. (2018). MAGED2: A novel form of antenatal Bartter's syndrome. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 27(4), 323–328. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000422>
- Konrad, M., Hou, J., Weber, S., Dötsch, J., Kari, J. A., Seeman, T., Kuwertz-Bröking, E., Peco-Antic, A., Tasic, V., Dittrich, K., Alshaya, H. O., Von Vigier, R. O., Gallati, S., Goodenough, D. A., & Schaller, A. (2008). CLDN16 Genotype Predicts Renal Decline in Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 19(1), 171. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007060709>
- Konrad, M., Schaller, A., Seelow, D., Pandey, A. V., Waldegger, S., Lesslauer, A., Vitzthum, H., Suzuki, Y., Luk, J. M., Becker, C., Schlingmann, K. P., Schmid, M., Rodriguez-Soriano, J., Ariceta, G., Cano, F., Enriquez, R., Jüppner, H., Bakkaloglu, S. A., Hediger, M. A., ... Weber, S. (2006). Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *American Journal of Human Genetics*, 79(5), 949–957. <https://doi.org/10.1086/508617>
- Laghmani, K., Beck, B. B., Yang, S.-S., Seaayfan, E., Wenzel, A., Reusch, B., Vitzthum, H., Priem, D., Demaretz, S., Bergmann, K., Duin, L. K., Göbel, H., Mache, C., Thiele, H., Bartram, M. P., Dombret, C., Altmüller, J., Nürnberg, P., Benzing, T., ... Kömhoff, M. (2016). Polyhydramnios, Transient Antenatal Bartter's Syndrome, and MAGED2 Mutations. *New England Journal of Medicine*, 374(19), 1853–1863. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1507629>
- Lasbleiz, A., Paladino, N. C., Romanet, P., Castinetti, F., Cuny, T., Sebag, F., & Taïeb, D. (2022). Familial hypocalciuric hypercalcemia: the challenge of diagnosis. In *Endocrine* (Vol. 75, Issue 2, pp. 646–649). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12020-021-02909-5>
- Leach, K., Wen, A., Davey, A. E., Sexton, P. M., Conigrave, A. D., & Christopoulos, A. (2012). Identification of molecular phenotypes and biased signaling induced by naturally occurring mutations of the human calcium-sensing receptor. *Endocrinology*, 153(9), 4304–4316. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1449>
- Lee, J. W., Lee, J., Heo, N. J., Cheong, H. Il, & Han, J. S. (2016). Mutations in SLC12A3 and CLCNKB and their correlation with clinical phenotype in patients with Gitelman and Gitelman-like syndrome. *Journal of Korean Medical Science*, 31(1), 47–54. <https://doi.org/10.3346/JKMS.2016.31.1.47>
- Letz, S., Rus, R., Haag, C., Dörr, H. G., Schnabel, D., Möhlig, M., Schulze, E., Frank-Raue, K., Raue, F., Mayr, B., & Schöfl, C. (2010). Novel activating mutations of the calcium-sensing receptor: The calcilytic NPS-2143 mitigates excessive signal transduction of mutant receptors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(10). <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0651>
- Lin, C. M., Cheng, C. J., Yang, S. Sen, Tseng, M. H., Yen, M. T., Sung, C. C., & Lin, S. H. (2019). Generation and analysis of a mouse model of pseudohypaldosteronism type II caused by KLHL3 mutation in BTB domain. *FASEB Journal*, 33(1), 1051–1061. <https://doi.org/10.1096/fj.201801023R>
- Lorenz, J. N., Baird, N. R., Judd, L. M., Noonan, W. T., Andringa, A., Doetschman, T., Manning, P. A., Liu, L. H., Miller, M. L., & Shull, G. E. (2002). Impaired renal NaCl absorption in mice lacking the ROMK potassium channel, a model for type II Bartter's syndrome. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37871–37880. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205627200>
- Louis-Dit-Picard, H., Barc, J., Trujillano, D., Miserey-Lenkei, S., Bouatia-Naji, N., Pylypenko, O., Beaurain, G., Bonnefond, A., Sand, O., Simian, C., Vidal-Petiot,

- E., Soukaseum, C., Mandet, C., Broux, F., Chabre, O., Delahousse, M., Esnault, V., Fiquet, B., Houillier, P., ... Jeunemaitre, X. (2012). KLHL3 mutations cause familial hyperkalemic hypertension by impairing ion transport in the distal nephron. *Nature Genetics*, *44*(4), 456–460. <https://doi.org/10.1038/ng.2218>
- Marx, S. J., Sinaii, N., & Marx, S. (2020). Neonatal Severe Hyperparathyroidism: Novel Insights from Calcium, PTH, and the CASR Gene. *J Clin Endocrinol Metab*, *105*(4), 1061–1078. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgz233/5645387>
- Mejía, N., Santos, F., Claverie-Martín, F., García-Nieto, V., Ariceta, G., & Castaño, L. (2013). RenalTube: A network tool for clinical and genetic diagnosis of primary tubulopathies. *European Journal of Pediatrics*, *172*(6), 775–780. <https://doi.org/10.1007/s00431-013-1934-6>
- Mescher, A. L. . (Ed.). (2024). The Urinary System. In *Junqueira's basic histology : text and atlas* (17th ed., pp. 947–982). McGraw-Hill, LANGE.
- Miyamura, N., Matsumoto, K., Taguchi, T., Tokunaga, H., Nishikawa, T., Nishida, K., Toyonaga, T., Sakakida, M., & Araki, E. (2003). Atypical Bartter Syndrome with Sensorineural Deafness with G47R Mutation of the β -Subunit for ClC-Ka and ClC-Kb Chloride Channels, Barttin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *88*(2), 781–786. <https://doi.org/10.1210/JC.2002-021398>
- Morey, M., Fernández-Marmiesse, A., Castiñeiras, D., Fraga, J. M., Couce, M. L., & Cocho, J. A. (2013). A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. In *Molecular Genetics and Metabolism* (Vol. 110, Issues 1–2, pp. 3–24). <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.04.024>
- Mutation Taster*. (n.d.). Retrieved May 22, 2025, from <https://www.mutationtaster.org/MT69/MutationTaster69.cgi>
- NCBI. (n.d.). *SLC2A2 Solute Carrier Family 2 Member 2 [Homo sapiens (Human)] - Gene*. Retrieved May 28, 2025, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6514>
- Nozu, K., Inagaki, T., Fu, X. J., Nozu, Y., Kaito, H., Kanda, K., Sekine, T., Igarashi, T., Nakanishi, K., Yoshikawa, N., Iijima, K., & Matsuo, M. (2008). Molecular analysis of digenic inheritance in Bartter syndrome with sensorineural deafness. *Journal of Medical Genetics*, *45*(3), 182–186. <https://doi.org/10.1136/JMG.2007.052944>
- Obermannova, B., Banghova, K., Sumník, Z., Dvorakova, H. M., Betka, J., Fencel, F., Kolouskova, S., Cinek, O., & Lebl, J. (2009). Unusually severe phenotype of neonatal primary hyperparathyroidism due to a heterozygous inactivating mutation in the CASR gene. *European Journal of Pediatrics*, *168*(5), 569–573. <https://doi.org/10.1007/s00431-008-0794-y>
- O'Neill, M. J. F. (2009, October 15). #613090 - BARTTER SYNDROME, TYPE 4B, NEONATAL, WITH SENSORINEURAL DEAFNESS. <https://www.omim.org/entry/613090?search=bartter&highlight=bartter>
- Orphanet: Primary hypomagnesemia with secondary hypocalcemia*. (n.d.). Retrieved March 11, 2025, from <https://www.orpha.net/en/disease/detail/30924#menu>
- Osman, M. A. M., Abd-Elrehim, G. A. B., Abdelkreem, E., Abosdera, M. M., & Kassem, M. A. (2023). Pattern of hereditary renal tubular disorders in Egyptian children. *Turkish Journal of Pediatrics*, *65*(4), 611–619. <https://doi.org/10.24953/turkjpmed.2022.688>
- Palazzo, V., Raglianti, V., Landini, S., Cirillo, L., Errichiello, C., Buti, E., Artuso, R., Tiberi, L., Vergani, D., Dirupo, E., Romagnani, P., Mazzinghi, B., & Becherucci, F. (2022). Clinical and Genetic Characterization of Patients with Bartter and Gitelman Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(10). <https://doi.org/10.3390/ijms23105641>

- Pavlopoulos, G. A., Oulas, A., Iacucci, E., Sifrim, A., Moreau, Y., Schneider, R., Aerts, J., & Iliopoulos, I. (2013). Unraveling genomic variation from next generation sequencing data. In *BioData Mining* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1756-0381-6-13>
- Peru, H., Akin, F., Elmas, S., Elmaci, A. M., & Konrad, M. (2008). Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: Report of three Turkish siblings. *Pediatric Nephrology*, *23*(6), 1009–1012. <https://doi.org/10.1007/s00467-008-0758-5>
- Peters, M., Jeck, N., Reinalter, S., Leonhardt, A., Tönshoff, B., Klaus, G., Konrad, M., & Seyberth, H. W. (2002). Clinical Presentation of Genetically Defined Patients with Hypokalemic Salt-losing Tubulopathies. In *Am J Med* (Vol. 112).
- Phenotypic Series-Bartter syndrome- OMIM*. (n.d.). Retrieved December 26, 2024, from <https://www.omim.org/phenotypicSeries/PS601678>
- Płoski, R. (2016). Next Generation Sequencing-General Information about the Technology, Possibilities, and Limitations. In U. Demkow & R. Płoski (Eds.), *Clinical Applications for Next-Generation Sequencing* (pp. 1–18). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801739-5.00001-5>
- Pollak, M. R., Brown, E. M., Chou, Y.-H. W., Hebert, S. C., Marx, S. J., Steinmann, B., Levi, T., Seidman, C. E., & Seidman, J. G. (1993). Mutations in the Human Ca²⁺-Sensing Receptor Gene Cause Familial Hypocalciuric Hypercalcemia and Neonatal Severe Hyperparathyroidism. In *Cell* (Vol. 75).
- Pyeritz, R. E. (2022). Renal Tubular Disorders. In *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics: Hematologic, Renal, and Immunologic Disorders* (pp. 115–124). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812534-2.00011-4>
- Raue, F., Pichl, J., Dörr, H. G., Schnabel, D., Heidemann, P., Hammersen, G., Jaursch-Hancke, C., Santen, R., Schöfl, C., Wabitsch, M., Haag, C., Schulze, E., & Frank-Raue, K. (2011). Activating mutations in the calcium-sensing receptor: Genetic and clinical spectrum in 25 patients with autosomal dominant hypocalcaemia - A German survey. *Clinical Endocrinology*, *75*(6), 760–765. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2265.2011.04142.X>
- Renkema, K. Y., Stokman, M. F., Giles, R. H., & Knoers, N. V. A. M. (2014). Next-generation sequencing for research and diagnostics in kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*, *10*(8), 433–444. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.95>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, *17*(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2017). *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas* (B. Baykal, Ed.; 6th ed., pp. 699–721). Palme Yayıncılık.
- Santer, R., Kinner, M., Lassen, C. L., Schneppenheim, R., Eggert, P., Bald, M., Brodehl, J., Daschner, M., Ehrich, J. H. H., Kemper, M., Li Volti, S., Neuhaus, T., Skovby, F., Swift, P. G. F., Schaub, J., & Klaerke, D. (2003). Molecular Analysis of the SGLT2 Gene in Patients with Renal Glucosuria. *Journal of the American Society of Nephrology*, *14*(11), 2873–2882. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000092790.89332.D2>
- Santer, R., Schneppenheim, R., Dombrowski, A., Götze, H., Steinmann, B., & Schaub, J. (1997). Mutations in GLUT2, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Nature Genetics*, *17*(Letter), 324–326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/ng1197-324>

- Schlingmann, K. P., Bandulik, S., Mammen, C., Tarailo-Graovac, M., Holm, R., Baumann, M., König, J., Lee, J. J. Y., Drögemöller, B., Imminger, K., Beck, B. B., Altmüller, J., Thiele, H., Waldegger, S., van't Hoff, W., Kleta, R., Warth, R., van Karnebeek, C. D. M., Vilsen, B., ... Konrad, M. (2018). Germline De Novo Mutations in ATP1A1 Cause Renal Hypomagnesemia, Refractory Seizures, and Intellectual Disability. *American Journal of Human Genetics*, *103*(5), 808–816. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2018.10.004>
- Schlingmann, K. P., Konrad, M., Jeck, N., Waldegger, P., Reinalter, S. C., Holder, M., Seyberth, H. W., & Waldegger, S. (2004). Salt Wasting and Deafness Resulting from Mutations in Two Chloride Channels. *New England Journal of Medicine*, *350*(13), 1314–1319. <https://doi.org/10.1056/NEJM0A032843>
- Seyberth, H. W., Weber, S., & Kömhoff, M. (2017). Bartter's and Gitelman's syndrome. *Current Opinion in Pediatrics*, *29*(2), 179–186. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000447>
- Shah, N., Amjad, M., Benamer, S., Deshmukh, H., Sathyapalan, T., & Mohammed, K. (2021). Familial hypocalciuric hypercalcaemia (FHH) type 3: A rare cause of parathyroid (PTH) dependent hypercalcaemia with associated learning disabilities and behavioural problems. *Endocrine Abstracts*, *77*. <https://doi.org/10.1530/ENDOABS.77.CC2>
- Sharma, P. K., Saikia, B., Sharma, R., Ankur, K., Khilnani, P., Aggarwal, V. K., & Cheong, H. (2014). Genetic Analysis in Bartter Syndrome from India. *Indian Journal of Pediatrics*, *81*(10), 1095–1098. <https://doi.org/10.1007/s12098-014-1379-6>
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. In *Nature Biotechnology* (Vol. 26, Issue 10, pp. 1135–1145). <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
- Simon, D. B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S., & Lifton, R. P. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science*, *285*(5424), 103–106. <https://doi.org/10.1126/science.285.5424.103>
- Simon, D. B., Nelson-Williams, C., Bia, M. J., Ellison, D., Karet, F. E., Molina, A. M., Vaara, I., Iwata, F., Cushner, H. M., Koolen, M., Gainza, F. J., Gitelman, H. J., & Lifton, R. P. (1996). Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nature Genetics*, *12*(1), 24–30. <https://doi.org/10.1038/ng0196-24>
- Bonnardeaux, A., & Bichet, D. G. (2016). Inherited Disorders of the Renal Tubule. In Karl. Skorecki, G. M. . Chertow, P. A. . Marsden, M. W. . Taal, & A. S. L. . Yu (Eds.), *Brenner & Rector's the kidney* (10th ed., pp. 1434–1473). Elsevier.
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, *122*(1). <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
- Smith, A. N., Skaug, J., Choate, K. A., Nayir, A., Bakkaloglu, A., Ozen, S., Hulton, S. A., Sanjad, S. A., Al-Sabban, E. A., Lifton, R. P., Scherer, S. W., & Karet, F. E. (2000). Mutations in ATP6N1B, encoding a new kidney vacuolar proton pump 116-kD subunit, cause recessive distal renal tubular acidosis with preserved hearing. *Nature Genetics*, *26*(1), 71–75. <https://doi.org/10.1038/79208>
- Soeiro, E. M. D., & Helou, C. M. de B. (2015). Clinical, pathophysiological and genetic aspects of inherited tubular disorders in childhood. In *Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia* (Vol. 37, Issue 3, pp. 385–398). <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20150060>

- Srivastava, S., Li, D., Edwards, N., Hynes, A. M., Wood, K., Al-Hamed, M., Wroe, A. C., Reich, D., Moochhala, S. H., Welling, P. A., & Sayer, J. A. (2013). Identification of compound heterozygous KCNJ1 mutations (Encoding ROMK) in a kindred with Bartter's syndrome and a functional analysis of their pathogenicity. *Physiological Reports*, *1*(6), 1–8. <https://doi.org/10.1002/phy2.160>
- Süleymanlar, G. (2019). *TEMEL NEFROLOJİ* (Y. Yeniçerioglu, Ö. Güngör, & M. Arıcı, Eds.). Güneş Tıp Kitabevleri. www.guneskitabevi.com
- Tanudisastro, H. A., Holman, K., Ho, G., Farnsworth, E., Fisk, K., Gayagay, T., Hackett, E., Jenkins, G., Krishnaraj, R., Lai, T., Wong, K., Patel, C., Mallawaarachchi, A., Mallett, A. J., Bennetts, B., Alexander, S. I., & McCarthy, H. J. (2021). Australia and New Zealand renal gene panel testing in routine clinical practice of 542 families. *Npj Genomic Medicine*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/s41525-021-00184-x>
- Topaloglu, R., Baskın, E., Bahat, E., Kavukcu, S., Cakar, N., Donmez, O., Guven, A. G., Callskan, S., Erdogan, O., & Yalcinkaya, F. (2011). Hereditary renal tubular disorders in Turkey: Demographic, clinical, and laboratory features. *Clinical and Experimental Nephrology*, *15*(1), 108–113. <https://doi.org/10.1007/s10157-010-0367-z>
- Trujillano, D., Bertoli-Avella, A. M., Kumar Kandaswamy, K., Weiss, M. E., Köster, J., Marais, A., Paknia, O., Schröder, R., Garcia-Aznar, J. M., Werber, M., Brandau, O., Calvo Del Castillo, M., Baldi, C., Wessel, K., Kishore, S., Nahavandi, N., Eyaid, W., Al Rifai, M. T., Al-Rumayyan, A., ... Abou Jamra, R. (2017). Clinical exome sequencing: Results from 2819 samples reflecting 1000 families. *European Journal of Human Genetics*, *25*(2), 176–182. <https://doi.org/10.1038/EJHG.2016.146>,
- Uçkun-Kitapçı, A., Underwood, L. E., Zhang, J., & Moats-Staats, B. (2005). A novel mutation (E767K) in the second extracellular loop of the calcium sensing receptor in a family with autosomal dominant hypocalcemia. *American Journal of Medical Genetics*, *132 A*(2), 125–129. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30403>
- Van Der Wijst, J., Konrad, M., Verkaart, S. A. J., Tkaczyk, M., Latta, F., Altmüller, J., Thiele, H., Beck, B., Schlingmann, K. P., & De Baaij, J. H. F. (2018). A de novo KCNA1 Mutation in a Patient with Tetany and Hypomagnesemia. *Nephron*, *139*(4), 359–366. <https://doi.org/10.1159/000488954>
- VanPutte, C. L. ., Regan, J. L. ., Russo, A. F. ., & Seeley, R. R. . (2019). *Seeley's anatomy & physiology* (12th ed.). McGraw Hill.
- Van'T Hoff, W. G. (2000). *Leading articles Molecular developments in renal tubulopathies*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1136/adc.83.3.189>
- Viering, D. H. H. M., de Baaij, J. H. F., Walsh, S. B., Kleta, R., & Bockenhauer, D. (2017). Genetic causes of hypomagnesemia, a clinical overview. In *Pediatric Nephrology* (Vol. 32, Issue 7, pp. 1123–1135). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00467-016-3416-3>
- Vollmer, M., Koehrer, M., Topaloglu, R., Strahm, B., Omran, H., & Hildebrandt, F. (1998). Two novel mutations of the gene for Kir 1.1 (ROMK) in neonatal Bartter syndrome. *Pediatric Nephrology*, *12*(1), 69–71. <https://doi.org/10.1007/s004670050408>
- Wang, W., Wei, M., Song, H.-M., Qiu, Z.-Q., Zhang, L.-J., Li, Z., & Tang, X.-Y. (2015). SLC2A2 gene analysis in three Chinese children with Fanconi-Bickel syndrome. *Chin J Contemp Pediatr*, *17*(4), 362–366. <https://doi.org/doi:10.7499/j.issn.1008-8830.2015.04.014>
- Weber, S., Hoffmann, K., Jeck, N., Saar, K., Boeswald, M., Kuwertz-Broeking, E., Meij, I. I., Knoers, V., Cochat, P., Terezašuláková, T. T., Bonzel, K. E., Soergel, M., Manz, F., Schaerer, K., Seyberth, H. W., Reis, A., & Konrad, M. (2000). Familial

- hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis maps to chromosome 3q27 and is associated with mutations in the PCLN-1 gene. In *European Journal of Human Genetics* (Vol. 8). <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200475>
- Weber, S., Schneider, L., Peters, M., Misselwitz, J., Rönnefarth, G., Böswald, M., Bonzel, K. E., Seeman, T., Suláková, T., Kuwertz-Bröking, E., Gregoric, A., Palcoux, J. B., Tasic, V., Manz, F., Schärer, K., Seyberth, H. W., & Konrad, M. (2001). Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, *12*(9), 1872–1881. <https://doi.org/10.1681/ASN.V1291872>
- Wells, R. G., Pajor, A. M., Kanai, Y., Turk, E., Wright, E. M., & Hediger, M. A. (1992). Cloning of a human kidney cDNA with similarity to the sodium-glucose cotransporter. *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology*, *263*(3 32-3). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1992.263.3.F459>
- Yang, Q., Li, G., Singh, S. K., Alexander, E. A., & Schwartz, J. H. (2006). Vacuolar H⁺-ATPase B1 subunit mutations that cause inherited distal renal tubular acidosis affect proton pump assembly and trafficking in inner medullary collecting duct cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, *17*(7), 1858–1866. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005121277>
- Zelikovic, I. (2019). Hereditary Tubulopathies. In W. Oh & M. Baum (Eds.), *Nephrology and Fluid/Electrolyte Physiology: Neonatology Questions and Controversies* (Third Edition, pp. 315–344). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-53367-6.00019-4>
- Zhang, R., Zhang, S., Luo, Y., Li, M., Wen, X., Cai, X., Han, X., & Ji, L. (2021). A case report of pseudohypoaldosteronism type II with a homozygous KLHL3 variant accompanied by hyperthyroidism. *BMC Endocrine Disorders*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/s12902-021-00767-w>

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı: 189


Toplantı Tarihi: 05 Ocak 2024

Karar Sayısı:2024/4733; (Başvuru ID: 17278) N.E.Ü. Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Emine GÖKTAŞ'ın "Yeni Nesil Dizilemenin Herediter Renal Tübüler Hastalıkların Tanısındaki Yeri" başlıklı uzmanlık tez çalışması ile ilgili dilekçesi ve ekleri görüşüldü. Arş. Gör. Dr. Sümeyye ŞANAL'ın uzmanlık tez çalışması N.E.Ü. Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Emine GÖKTAŞ'ın sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izinlerin alınması ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Dr. Öğr. Üyesi Emine GÖKTAŞ

Yardımcı Araştırmacılar: Arş. Gör. Dr. Sümeyye ŞANAL, Prof. Dr. Ayşegül ZAMANI, Prof. Dr. Mahmut Selman YILDIRIM, Prof. Dr. Kültigin TÜRKMEN, Prof. Dr. Beray Selver EKLİOĞLU, Prof. Dr. Vesile Meltem ENERGİN


Prof. Dr. Saim AKIKGÖZÜ
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

