

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**WILSON HASTALARINDA ATP7B GENİNİN
8,12,13,14 ve 17 NOLU EKZONLARINDA
DNA DİZİ ANALİZİ ile MUTASYONLARIN
TARANMASI**

ÖZLENEN ŞİMŞEK

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2006

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**WILSON HASTALARINDA ATP7B GENİNİN
8,12,13,14 ve 17 NOLU EKZONLARINDA
DNA DİZİ ANALİZİ ile MUTASYONLARIN
TARANMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZLENEN ŞİMŞEK

Prof.Dr.Orhan Terzioğlu

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından proje no:
2005.KB.SAG.024 ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER	I
Tabloların listesi.....	III
Şekillerin listesi.....	IV
Kısaltmalar ve tanımlamalar.....	V
Özet(Türkçe).....	1
Özet(İngilizce).....	2
Giriş ve Amaç.....	3
1.GENEL BİLGİLER	5
1.1 Wilson hastalığının tarihçesi.....	6
1.2 Wilson Hastalığının tanımı, <i>ATP7B</i> geninin işlevi ve Wilson hastalığıyla ilişkisi, <i>ATP7B</i> geninde gözlenen mutasyonlar ve bu mutasyonların Wilson Hastalığındaki önemi.....	7
2.GEREÇ VE YÖNTEMLER	23
2.1 örnek alımı,çalışma grubunun oluşturulması.....	24
2.2 Kan örneklerinden DNA eldesi.....	24
2.2.1 Stok Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	24
2.2.2 Kullanıma Hazır Kimyasallar.....	26
2.2.3 DNA Eldesinde Uygulanan Protokol.....	26
2.2.4 Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Kalitesinin Saptanması.....	29
2.3 β -actin geninin ve <i>ATP7B</i> Geninin 8.,12.,13.,14. ve 17. ekzonlarının PCR Teknolojisiyle çoğaltılması.....	30
2.3.1 Sekizinci Ekzon Bölgesinin Çoğaltılması için Primer Dizileri.....	30
2.3.2 Onikinci Ekzon Bölgesinin Çoğaltılması için Primer Dizileri.....	31
2.3.3 Onüçüncü Ekzon Bölgesinin Çoğaltılması için Primer Dizileri.....	32
2.3.4 Ondördüncü Ekzon Bölgesinin Çoğaltılması için Primer Dizileri.....	33
2.3.5 Onyedinci Ekzon Bölgesinin Çoğaltılması için Primer Dizileri.....	34
2.4 PCR'da Kullanılan Kimyasallar ve PCR'ın Hazırlanışı.....	35
2.4.1 PCR Şartları.....	37

2.5 PCR Ürünlerinin %2'lik Agaroz Jel Elektroforeziyle Kontrol Edilmesi	38
2.5.1 PCR Ürünlerinin Kontrolü ve fotoğraflanması	39
2.6 DNA Dizi Analizi.....	39
3.BULGULAR	40
3.1 Wilson Hastalarında ATP7B geninin 8,12,13,14 ve 17 nolu ekzonlarındaki mutasyonların DNA dizi analiziyle taranması ve saptanan mutasyonlar.....	41
3.1.1 Kan Örneklerinden DNA Eldesi.....	41
3.2 PCR ürünlerinin kontrolüne ait bulgular	42
3.3 <i>ATP7B</i> Geninin 8,12,13,14 ve 17 nolu Ekzonlarındaki Mutasyonlar.....	46
4.TARTIŞMA	71
5.EKLER	81
6.KAYNAKLAR.....	88

TABLO LİSTESİ

Tablo1.1 Wilson hastalığının tanısı için skorlama sistemi.....	15
Tablo1.2 ATP7B geninin 8.ekzonundaki WH'ye yönelik mutasyonlar.....	18
Tablo1.3 ATP7B geninin 12.ekzonundaki WH'ye yönelik mutasyonlar.....	19
Tablo1.4 ATP7B geninin 13.ekzonundaki WH'ye yönelik mutasyonlar.....	19
Tablo1.5 ATP7B geninin 14.ekzonundaki WH'ye yönelik mutasyonlar.....	20
Tablo1.6 ATP7B geninin 17.ekzonundaki WH'ye yönelik mutasyonlar.....	21
Tablo2.1 10 örnek için PCR bileşenlerinin miktarının gösterilmesi	36
Tablo2.2 β -actin geninin ve <i>ATP7B</i> geninin beş ekzonun PCR profili	37
Tablo3.1 Şekil3.1'deki DNA'ların OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ oranları ve hesaplanan Konsantrasyonları.....	41
Tablo3.2 Çalışmaya dahil edilen 26 ailenin,ATP7B geninin 8,12,13,14 ve 17 nolu ekzonlarına ait DNA dizi analizi sonuçları	70
Tablo4.1 ATP7B geninin 8.ekzonunda saptadığımız mutasyonların ülkelere göre dağılımı ve görülme sıklığı	75
Tablo4.2 ATP7B geninin 12.ekzonunda saptadığımız mutasyonların ülkelere göre dağılımı ve görülme sıklığı	76
Tablo 4.3 ATP7B geninin 13.ekzonunda saptadığımız mutasyonların ülkelere göre dağılımı ve görülme sıklığı	76
Tablo4.4 ATP7B geninin 14.ekzonunda saptadığımız mutasyonların ülkelere göre dağılımı ve görülme sıklığı	77
Tablo 4.5 WH'de genotip-fenotip ilişkisinin kurulmasına yönelik yapılan Çalışmalar.....	79

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Bakır homeostasisinin fizyolojisi	8
Şekil 1.2	ATP7B geninin kromozom üzerindeki yerinin, ekzonlarının ve domainlerinin şematik gösterimi.....	9
Şekil 1.3	ATP7B proteininin şematik gösterimi	10
Şekil 1.4	Bakır taşınmasının genel görünümü	11
Şekil 3.1	DNA örneklerinin %1 lik agaroz jeldeki görüntüsü	42
Şekil 3.2.1	β -actin (internal kontrol) PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	43
Şekil 3.2.2	8. ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	43
Şekil 3.2.3	12. ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	44
Şekil 3.2.4	13 ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	44
Şekil 3.2.5	14. ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	45
Şekil 3.2.6	17. ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	45
Şekil 3.3.1	8.Ekzonda mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları	48
Şekil 3.3.2	12.Ekzonda mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları	50
Şekil 3.3.3	13.Ekzonda mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları	51
Şekil 3.3.4	14.Ekzonda mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları	52
Şekil 3.3.5	17.Ekzonda mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları	56
Şekil 3.4.1	12.ekzonda saptanan SNP sonuçları.....	57
Şekil 3.4.2	13.ekzonda saptanan SNP sonuçları.....	67

KISALTMALAR:

A	: Alanin
Aa	: Aminoasit
ABD	: Anabilim Dalı
Alm	: Almanya
K.Am	: Kuzey Amerika
ATP7A	: Katyon transporte edici p-tipi ATPaseA
ATP7B	: Katyon transporte edici p-tip ATPaseB
Avt	: Avustralya
Bul	: Bulgaristan
cm	: Santimetre
Cp	: Seruloplazmin
CT	: "Canine Copper Toxicosis"
CTR	: Copper Transporter Reseptör
Cez	: Cezayir
del	: delesyon
DEÜ	: Dokuz Eylül Üniversitesi
dk	: dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid Trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ETIC	: "Endemik Tyrolean Infantile Cirrhosis"
(F)	: Forward-ileri
Fin	: Finlandiya
Fra	: Fransa
G	: Glisin
gr	: gram
H	: Histidin
Hst	: Hasta
ICC	: "Indian Childhood Cirrhosis"
Ita	: İtalya

İng	: İngiltere
ins	: insersiyon
İsk	: İskoçya
İsp	: İspanya
İsv	: İsviçre
Jap	: Japonya
K	: Lizin
K.Avp	: Kuzey Avrupa
KF	: "Kayser Fleischer"
kro	: Kromozom
L	: Lösin
M	: Molar
Mac	: Macaristan
µg	: mikrogram
mg	: miligram
µl	: mikrolitre
ml	: mililitre
mM	: Milimolar
MNK	: Menkes Hastalığı
mut	: Mutasyon
N	: Nükleotid
NÜL	: Normalin Üst Limiti
ng	: nanogram
OD	: Optik dansite
Pak	: Pakistan
PCR	: "Polymerase Chain Reaction"
Ph	: Fosforilasyon
Pol	: Polanya
Q	: Glutamin
(R)	: Reverse-geri
R	: Arjinin
Rus	: Rusya

s	: Sayı
S	: Serin
S.Arb	: Sudi Arabistan
Sar	: Sardunya
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	: "Single Nucleotid Polymorphism"
SOD	: Süperoksit Dismütaz
SSCP	: "Single Nucleotide Conformational Polymorphism"
T	: Treonin
Tai	: Tayvan
TBE	: Tris Buffer EDTA
Td	: "Transduction Domain"
TE	: Tris EDTA
TFAUH	: Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi
Tm	: "Transmembran"
Tur	: Türkiye
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
V	: Valin
W	: Triptofan
WD	: "Wilson Disease"
WH	: Wilson Hastalığı
X	: stop kodonu
Yug	: Yugoslavya
Yun	: Yunanistan

ÖZET

WILSON HASTALARINDA ATP7B GENİNİN 8, 12, 13, 14 ve 17 NOLU EKZONLARINDA DNA DİZİ ANALİZİ ile MUTASYONLARIN TARANMASI

ÖZLENEN ŞİMŞEK

Wilson hastalığı-WH, doğal gereksinimi karşılayacak bakırın fazlasının, karaciğerde işlenerek safra yoluyla atılamaması sonucu çeşitli organlarda birikimiyle ortaya çıkar. Çocukluk çağında genellikle karaciğer hasarıyla başlayan, yaş ilerledikçe artan bakır birikimine bağlı olarak başta karaciğer olmak üzere, sinir sistemi, göz, böbrek gibi çeşitli yapılarda artan ciddiyette bozuklukların gözleendiği, erken yaşlarda tedavi edilmezse ölümcül olabilen, ailesel geçişli, otozomal resesif kalıtmımlı bir hastalıktır. Yapılan çalışmalar, WH'nin dünya çapında taşıyıcılık sıklığının 1/90 olduğunu, yaklaşık olarak 1/30000'de görülen bir hastalık olduğunu göstermektedir.

Yürütölen çalışmada, birbiriyle akrabalık ilişkisi olmayan 26 aile'den 50 bireyin DNA'ları elde edilerek, *ATP7B* geninin 8, 12, 13, 14 ve 17 nolu ekzonları PCR ile çoğaltıldı. Her bir ekzona ait PCR ürününe ileri ve geri primerler kullanılarak DNA dizi analizi yapıldı, elde edilen veriler değerlendirilerek mutasyonlar saptandı.

Akraba olmayan altı ailede, biri yeni altı farklı mutasyon 8.ekzonda; bir ailede, bir mutasyon ve 23 ailede bir SNP 12.ekzonda; iki ailede, iki farklı mutasyon, yedi ailede üç farklı SNP 13.ekzonda; bir ailede, bir literatürde tanımlı olmayan mutasyon ve yedi ailede, bir mutasyon 14.ekzonda; bir ailede bir yeni mutasyon 17.ekzonda saptanmıştır. Sonuçlar toplu değerlendirildiğinde, *ATP7B* geninin 21 ekzondan seçilen 5'inde mutasyonlar ve SNP'ler tanımlanmıştır, sonuçlar 26 akraba olmayan ailelerin %96.15'ini kapsamaktadır.

Sonuç olarak, WH ile ilişkili gen olan *ATP7B* mutasyonları Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesinde Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında uluslararası standartlara uygun olarak tarandı. Elde edilen veriler, hastaların takibini yapan klinisyenlere ve çalışmaya dahil edilen ailelere iletildi, böylece mutasyon taşıyan ama klinik semptomları olmayan aile bireylerinin koruyucu tedavi almaları sağlandı.Tanımlanan yeni mutasyonlarla literatüre katkıda bulunuldu. Hastaların klinik bulgularıyla mutasyon analizi sonuçları arasında ilişki kurularak koruyucu tıbbin gelişmesine katkıda bulunuldu.

Anahtar Kelimeler: Wilson Hastalığı, *ATP7B* geni , mutasyon, bakır, SNP

ABSTRACT

SCREENING MUTATIONS ON EXONS 8, 12, 13, 14 and 17 OF *ATP7B* GENE BY DNA SEQUENCING ON PATIENTS WITH WILSON DISEASE

ÖZLENEN ŞİMŞEK

Accumulation of excess copper in the body will cause Wilson Disease(WD). Depending on the copper accumulation level the symptoms arise in various organs. Copper processed in the liver can not secrete via biliary excretion. WD is mainly initiated as liver damage in the childhood. In the advanced ages liver, nervous system, eyes and kidneys have damages due to excess copper. WD can be fatal if it is not cured at early ages.It is a hereditary autosomal recessive disorder.The researches demonstrate that WD carrier frequency in the world is 1 in 90 and approximately has incidence of 1/30000.

In our research, mutations screened in 50 individuals members of 26 unrelated families. Exons 8, 12, 13, 14 and 17 of *ATP7B* gene were amplified by PCR from the genomic DNA that extracted from individuals. The PCR product belong to each exons sequenced by using both forward and reverse primers and the obtained data from sequencing result were evaluated and mutations screened.

Five different mutations and additionally one new mutation are observed on exon eight of six unrelated families; one mutation and one SNP is found on exon 12 of 23 unrelated families; two different mutations and three SNPs are observed on exon 13 of nine unrelated families; two different mutations one is new, observed on exon 14 of eight unrelated families; one new mutation is observed on exon 17 in one family. As a cumulative observation the mutations and SNPs on five exons out of 21 exons of *ATP7B* gene were defined. The results covered %96.15 of the patients members of 26 unrelated families.

In conclusion, *ATP7B* mutations in WD defined according to international standards in the laboratory of Medical Biology and Genetics, School of Medicine of Dokuz Eylül University.The data evaluated with the clinicians to confirm the WD and additionally the members of the families who have no symptoms but have the mutations, have a chance to get the preventive therapy. Defined new mutations contribute to the literature.The relationship between patient's clinical findings and mutation analysis assist the improvement of protective medicine.

Key Words:Wilson Disease,*ATP7B* gene,mutation,copper,SNP

GİRİŞ VE AMAÇ:

Wilson hastalığı-WH (Wilson disease-WD), doğal gereksinimi karşılayacak bakırın fazlasının, karaciğerde işlenerek safra yoluyla atılamaması sonucu çeşitli organlarda birikimiyle ortaya çıkar. Çocukluk çağında genellikle karaciğer hasarıyla başlayan, yaş ilerledikçe artan bakır birikimine bağlı olarak başta karaciğer olmak üzere, sinir sistemi, göz, böbrek gibi çeşitli yapılarda artan ciddiyette bozuklukların gözleendiği, erken yaşlarda tedavi edilmezse ölümcül olabilen, ailesel geçişli, otozomal resesif kalıtmı bir hastalıktır. Yapılan çalışmalar, WH'nin dünya çapında taşıyıcılık sıklığının 1/90 olduğunu, yaklaşık olarak 1/30000'de görülen bir hastalık olduğunu göstermektedir.

Vücuttaki birçok metabolik olayın gerçekleşmesi için belli dozda bakır gereklidir. Bakır, çeşitli besinlerle (ceviz, fındık, soya ürünleri, mantar, çikolata, su vb.) alınan ve hücrel işlemlere aracılık enzimler (sitokrom-c oksidaz, süperoksit dismutaz, ferrosidaz..vb) için kofaktör işlevi gören bir iz elementtir. Bu nedenlerle erişkin insan vücudunda ortalama 70mg-100mg bakır bulunur. Vücuttaki bakır dengesi, gastroentestinal sistemden emilim ve safradan atılım arasındaki koordinasyonla korunur.Günlük gastroentestinal sistemden alınan bakır ortalama 1.5mg ile 5mg arasındadır.

Hepatositte, bakırın gerekli olan miktarının düzenlenmesinde ve ihtiyaçtan fazla olan bakırın atılmasında *ATP7B* geni ve bu genin ürünü (*ATP7B* proteini) işlev görür.

Wilson hastalarında *ATP7B* geninde gözlenen birçok mutasyon sonucunda, *ATP7B*'nin biyokimyasal aktivitesi bozulur. Bu nedenle, bakırın safra yoluyla atılması ve holoseruloplazmin halinde kan dolaşımına verilmesi gerçekleşemez, bakır hepatositte birikir. Biriken bakır karaciğer hasarına; karaciğer sirozuyla başlayan nörolojik bozukluklara yol açar. Wilson hastalığı tanısının konması, uzun yıllar boyunca bakırın karaciğer ve sinir sisteminde birikmesinden sonra olmaktadır. Bu sorunun giderilmesi amacıyla 2003 yılında Ferenci ve arkadaşları WH tanısı için bir skorlama sistemi oluşturmuşlardır. Bu skorlamada, hastalığa neden olan mutasyonların her iki kromozomda görülmesini dört, bir kromozomda görülmesini bir puan olarak belirlemişlerdir.Toplam skorun dört ve üstü olması Wilson Hastalığı tanısının konabilmesi için yeterli olduğundan, mutasyon analizinin tanı konmadaki kritik önemi açıkça görülmektedir.

Wilson Hastalarında hastalıkla ilişkilendirilen *ATP7B* geninde mutasyon analizinin yapılmasıyla, WH tanılı bireyin ailesindeki ve akrabalarındaki genç bireylerde hastalık belirtileri oluşmadan ve/veya hastalık ilerlemeden erken tanı konması sağlanabilecektir. Bireylere uygun diyet uygulanması, ilaç tedavisi veya ikisinin beraber uygulanması ile karaciğer sirozu oluşmadan veya nörolojik bozukluklar meydana gelmeden hastaların tedavi edilmeleri mümkün olabilecektir. Ayrıca erken teşhis konmasıyla ve tedaviye başlanmasıyla; hastalığın ilerlemesi engellenerek, hastalara karaciğer nakli yapılmasına gerek kalmadan yaşamlarını sürdürebilmeleri öngörülmektedir.

ATP7B genindeki mutasyonların saptanması amacıyla DNA dizi analizi yönteminin kullanılmasıyla tanımlı mutasyonların saptanabilmesinin yanısıra, hastalarımıza spesifik yeni mutasyonların ve/veya SNP'lerin saptanabilir olması; günümüz koşullarında işbirliği içinde olduğumuz firmayla kısa sürede ve düşük maliyetle veri elde edildiğinden tercih edilmiştir. *ATP7B* geninin 8,12,13,14 ve 17 nolu ekzonlarının hem sayıca fazla mutasyon içerdiği hem de en sık gözlenen mutasyonların bu ekzonlarda bulunduğu ve bu mutasyonların saptandığı ülkelerin Akdeniz ülkesi oluşu ve bölgemize yakınlığı yaptığımız literatür incelemesinde saptanmıştır. Bu nedenle öncelikli olan bu beş ekzonla çalışmaya başlamanın uygun olduğuna karar verilmiştir.

BÖLÜM 1 :

GENEL BİLGİLER

1.GENEL BİLGİLER

1.1 Wilson Hastalığının Tarihçesi

1912'de İngiliz nörolog Samuel Alexander Kinnier Wilson, 7 hastada karaciğer sirozuyla bağlantılı nörolojik ailesel bozukluğu rapor etmiştir ve buna 'İlerlemiş Lentikular Dejenerasyon' demiştir. Aynı yıl, Fleischer WH'nin korneal pigmentasyonun, nöropsikiyatrik semptomun ve karaciğer sirozunun bir kombinasyonu olduğunu tanımlamıştır. Bu bulgular, şu anda Wilson Hastalığı olarak bilinen bozukluktan bahseden ilk yayınlardır. 1948'de Cumings, hastaların karaciğerinde ve beyin dokusunda bir metalin fazla miktarını saptayarak WH'nin patogenezinde bakırın rolünü tanımlamıştır. Scheinberg ve Gitlin, 4 yıl sonra WH hastalarında serum seruloplazmin defektini rapor ettiler bu da günümüzde yaygın olarak kullanılan tanısal testlerden birinin temelini oluşturmaktadır.

1960 yılında, Bearn WH'nin otozomal resesif kalıtıldığını göstermiştir. 1985'te Frydman ve arkadaşları WH geninin linkage ile 13q14.3 bölgesinde bulunduğunu saptadılar. 1993'te WH ile ilgili proteini kodlayan gen klonlandı ve katyon transportu edici p-tipi ATPaz ailesinin yeni bir üyesi olduğu gösterildi. Aynı yıl Bull ve arkadaşları, Tanzi ve arkadaşları, Yamaguchi ve arkadaşları WH ile ilgili genin *ATP7B* geni olduğunu gösterdiler. 1995'te Thomas ve arkadaşları, Figus ve arkadaşları *ATP7B* geninde gözlenen mutasyonları ve bunların klinik yansımalarını tanımlamışlardır (1,2).

1.2. Wilson Hastalığının tanımı, *ATP7B* geninin işlevi ve Wilson hastalığıyla ilişkisi, *ATP7B* geninde gözlenen mutasyonlar ve bu mutasyonların Wilson Hastalığındaki önemi

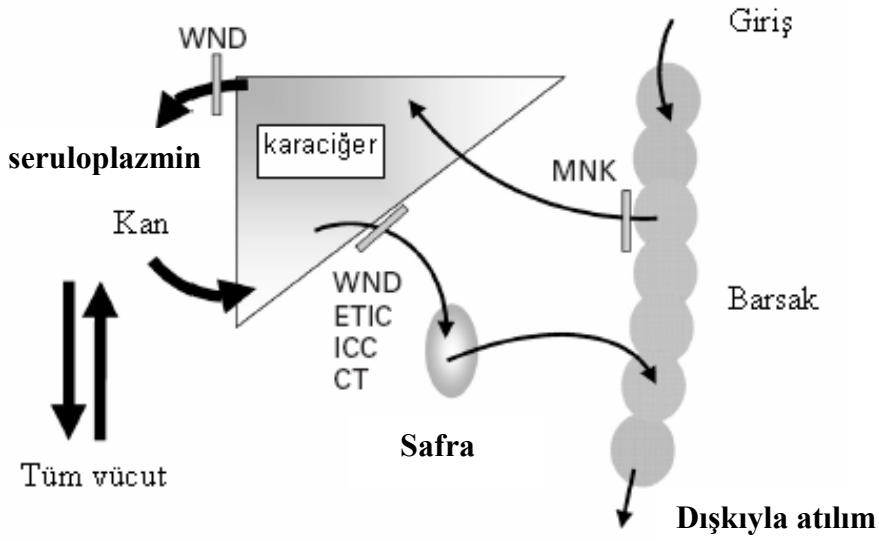
Wilson hastalığı-WH (Wilson disease-WD), doğal gereksinimi karşılayacak bakırın fazlasının, karaciğerde işlenerek safra yoluyla atılamaması sonucu çeşitli organlarda birikimiyle ortaya çıkar. Çocukluk çağında genellikle karaciğer hasarıyla başlayan, yaş ilerledikçe artan bakır birikimine bağlı olarak başta karaciğer olmak üzere, sinir sistemi, göz, böbrek gibi çeşitli yapılarda artan ciddiyette bozuklukların görüldüğü, erken yaşlarda tedavi edilmezse ölümcül olabilen, ailesel geçişli, otozomal resesif kalıtmalı bir hastalıktır. Yapılan çalışmalar, WH'nin dünya çapında taşıyıcılık sıklığının 1/90 olduğunu, yaklaşık olarak 1/30000'de görülen bir hastalık olduğunu göstermektedir (2-7).

Vücuttaki birçok metabolik olayın gerçekleşmesi için belli dozda bakır gereklidir. Bakır, çeşitli besinlerle (ceviz, fındık, soya ürünleri, mantar, çikolata, su vb.) alınan ve hücresel işlemlere aracılık eden liste1'de adı geçen enzimler için kofaktör işlevi gören bir iz elementtir(4,6-10).

Liste1:

1. Sitokrom-c oksidaz (Mitokondrial enerji üretimi)
2. Ferroksidaz (Demir homeostasisi)
3. Mn^{+2}/Cu^{+2} süperoksit dismutaz (Serbest radikal detoksifikasyonu)
4. Tirozinaz (Melanin oluşumu)
5. Dopamin-b hidrolaz (Nörotransmitter sentezi)
6. Lizis oksidaz (Connective doku çapraz bağlanması)

Bu nedenlerle erişkin insan vücudunda ortalama 70mg-100mg bakır bulunur. Vücuttaki bakır dengesi, gastroentestinal sistemden emilim ve safradan atılım arasındaki koordinasyonla korunur (2,8).Günlük gastroentestinal sistemden alınan bakır ortalama 1.5mg ile 5mg arasındadır (4,8).



Şekil 1.1: Bakır homeostasisinin fizyolojisi

MNK: Menkes Hastalığı

WND: Wilson hastalığı

ETIC: Endemik Tyrolean infantile cirrhosis (Endemik Tyrolean çocuğa özgü siroz)

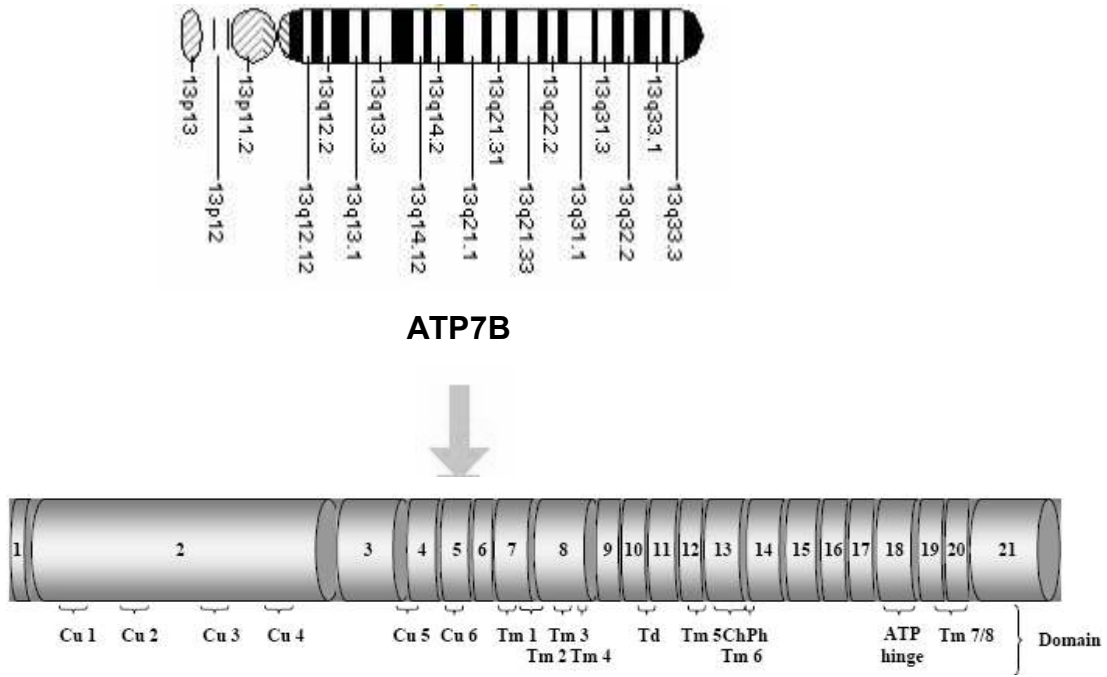
ICC: Indian childhood cirrhosis (Hindistan çocukluk çağı sirozu)

CT : Canine copper toxicosis (Kanin bakır toksisitesi) (9)

ATP7B geni (eski adıyla *WND* geni), karaciğer, böbrek ve beyinde ekspres edilir (11-13). Menkes Hastalığından sorumlu *ATP7A* geninin ürünü olan *ATP7A* proteiniyle %54 aminoasit benzerliği gösterir (14). Her iki proteinin de katyon transportu edici p-tipi ATPaz aktivitesinin oluşu, bu proteinlerin bakır taşınmasında rol oynamasını sağlar (7, 15-18).

Hepatositte, bakırın gerekli olan miktarının düzenlenmesinde ve ihtiyaçtan fazla olan bakırın atılmasında *ATP7B* geni ve bu genin ürünü (*ATP7B* proteini) işlev görür (2, 10, 14, 17).

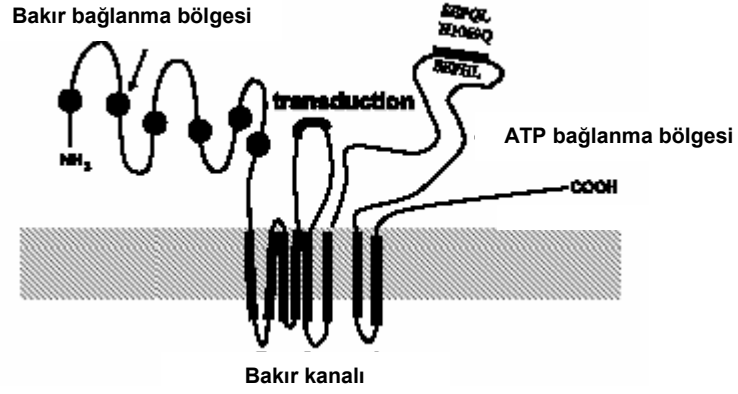
ATP7B geni,13q14.3 bölgesinde yer alır(19).



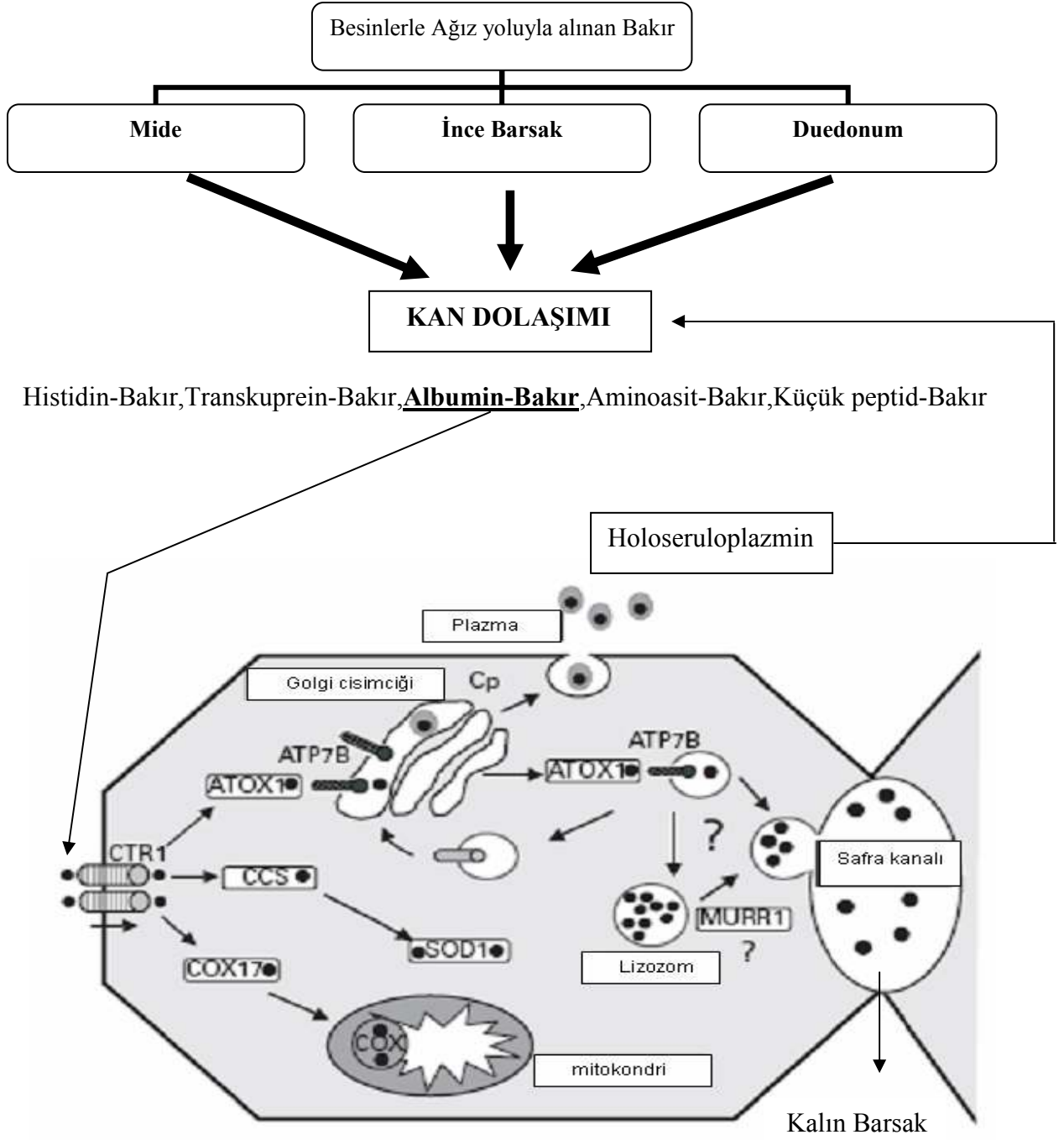
Cu1,Cu2,Cu3,Cu4,Cu5,Cu6	altı bakır bağlama bölgesi
Tm1,Tm2,Tm3,Tm4,Tm5,Tm6,Tm7,Tm8	sekiz transmembran segment
Td	transduction domain
ChPh	bir fosforilasyon bölgesi
	bir transmembran katyon kanalı
ATP hinge	bir ATP bağlama domaini

Şekil 1.2:*ATP7B* geninin kromozom üzerindeki yerinin,ekzonlarının ve domainlerinin şematik gösterimi (7,9,12,20 nolu kaynaklardan yararlanarak tarafımızdan geliştirilmiştir).

ATP7B geni 21 ekzondan oluşur. Transkripsiyon ürünü ortalama 7.5kb büyüklüğündedir. Bu transkripsiyon ürününden 1465 aminoasitten oluşan ve insanda daha çok karaciğer, böbrek ve plasentada üretilen bir protein sentezlenir. ATP7B proteini, altı bakır bağlama bölgesi (Cu1,Cu2,Cu3,Cu4,Cu5,Cu6), sekiz transmembran segment (Tm1,Tm2,Tm3,Tm4,Tm5,Tm6,Tm7,Tm8), ATP'nin hidroliziyle oluşan enerjinin katyon taşınmasında kullanılmasından sorumlu bir transduction domain (Td), bir fosforilasyon bölgesi (ChPh), bir transmembran katyon kanalı ve bir ATP bağlama domaini (ATP hinge) içerir (2,7,10,12).



Şekil 1.3: ATP7B proteininin şematik gösterimi(7).



Şekil 1.4: Bakır taşınmasının genel görünümü(4,6-10 nolu kaynaklardan yararlanarak tarafımızdan geliştirilmiştir).

Besinlerle ağız yoluyla alınan bakır; mide, ince barsak ve duodenumda emilir, ilk dört saat içinde kan dolaşımına katılır. Bakır, kanda serbest halde bulunmaz albumin, histidin, transkuprein, aminoasitler ve küçük peptitlere bağlı haldedir (7). Bu yolla çoğunluğu karaciğer olmak üzere (9), beyin, böbrek, göz gibi organlara taşınır. Albumine bağlı bakırın %90'ı karaciğere gider(4).

Bakır, hepatosit membranındaki bakır bağlayıcı proteinler (hCTR1, hCTR2) aracılığıyla hepatosite alınır. Hepatositteki bakır, tiol zengin proteinlere, sülfidril bakır ligandlarına, glutatyona, bakır spesifik enzimlere, bakır şaperonlarına (COX17, ATOX1, CCS) bağlanır. Bakırın şaperonlarına bağlanma yönünü aşağıda verilen yollardan biri veya birkaçı belirlemektedir.

-Sitokrom c oksidaz aktivitesi için mitokondriye gidecekse bir bakır şaperonu olan COX17'ye bağlanır.

-Trans golgi ağına ATP7B aracılığıyla girecekse ATOX1 (HAH1)'e bağlanır.

-Süperoksit dismutaz1 (SOD1) enzimine bağlanacaksa, şaperonu olan CCS'ye bağlanır.(9)

Bu durumun sonucu olarak hepatositte bakır, serbest halde bulunmamaktadır, bakırın fazlası, metallothioneine bağlı olarak bulundurulur ve bu bakır toksik değildir(17).

ATOX1, 68 aminoasitten oluşan, ATP7B'nin altı metal bağlama bölgesiyle benzer katlanma yapısına sahip bir proteindir. ATOX1, bakır atılımında ATP7B ile birlikte işlev gören bir bakır şaperonudur. ATOX1, hepatosite alınan bakıra bağlanır ve trans golgi ağına ATP7B ile bakır bağımlı bir birlik kurar. ATP7B, bakırın karaciğerde taşınmasında ve atılmasında işlev görür. Hepatositte ATP7B, ATOX1'e bağlı bakırın sitozolden trans golgi ağına geçişinde rol oynar. Karaciğerdeki fazla bakırın atılması, ATP7B aracılığıyla, trans golgi ağından safra kanalına verilerek gerçekleştirilir (9).

ATP7B, kendisine bağlı olan bakırı aposeruloplazmine aktararak, redoks aktif holoseruloplazmin oluşumunu sağlar. Oluşan bu holoseruloplazmin, altı bakır atomu içeren, ferroksidaz aktivitesi olan bir moleküldür. Vücuttaki bakırın bir kısmı, ATP7B aracılığıyla holoseruloplazmin halinde vezikül içinde hepatositte çıkarılır.

Apoeruloplazmin, bakırla bağlanamayıp kendisi plazmaya verilirse hızlıca parçalanır (2,6,12).

Normal fizyolojik koşullar altında bakırın %98'i safra aracılığıyla sadece %2'si üriner sistem aracılığıyla atılır (2).

Hücresel bakır durumuna göre ATP7B değişik hücrel kompartmanlarda bulunabilir. Hücrel bakır seviyesi artınca ATP7B trans golgi ağından veziküller kompartmana difüz olur. Bu bakır bağımlı yer değiştirme hızlıdır ve denova protein sentezi içermez. Bu olay geri dönüşümlüdür. Bakır konsantrasyonu azalınca, ATP7B proteini perikanaliküler veziküller kompartmana geri döner(12,21).

Wijmenga ve arkadaşları 2004 yılındaki çalışmalarında, ATOX1'in ATP7B'nin katalitik aktivitesini artırarak bakıra bağlanmasını sağladığı görüşündedirler. Mayalarla yapılan çalışmalar, ATOX1'in sitozolik bakıra bağlanarak detoksifiye ettiğini ve transmembran taşıma için bakırın ATP7B ile birlikte bulunduğunu göstermiştir(9).

ATP7B'nin bakır bağımlı dönüşümlerinin moleküler mekanizması çoğunlukla bilinmemektedir. Bazı araştırmacılar, bakır bağımlı sinyal iletim yolağı olabileceğini düşünmektedir. Fazla bakırın endozomal kompartmandan lizozoma geçişini sağlayan, ATP7B içeren tanımlanmamış veziküllerin olabileceği düşünülmektedir (12).

Harada ve arkadaşlarının 2002 yılındaki çalışmalarına göre, Hepatosit içeriğindeki fazla bakır, endoplazmik retikulum-golgi yoluyla geç endozoma verilir. Buradan *ATP7B* geni ve bu genin ürünü koordinatörlüğünde lizozoma verilerek, direk safraya ulaştırılır. Bu sonuçlar, lizozomal içeriğin ekzositozla safra kanalına geçmesinin, safra aracılığıyla bakır atılımı için önemli bir mekanizma (en azından hepatik bakır birikimi boyunca) olduğunu göstermektedir (6,12,22).

Bazı araştırmacılar, Bedlington teriyerlerde MURR1 geninin mutasyonları sonucu oluşan mutant proteinin bakır birikime yol açtığını göstermişlerdir ve MURR1 proteininin insanda, ATP7B proteininin N-ucuna bağlı bakır bağlanma domaini aracılığıyla direk ATP7B proteiniyle ilişkide olduğunu düşünmektedirler. Bu görüş,

WH'de safra yoluyla bakır atılımında ATP7B proteini ile etkileşen MURR1 proteinin işlevi olabileceğini göstermektedir (23). Bir diğer görüş ise, MURR1 ile Wilson Hastalığı arasında herhangi bir ilişki olmadığı yönündedir (24).

ATP7B geninin ve bu genin ürünü olan ATP7B proteininin, bakır metabolizmasında kritik ve önemli işlevi vardır. Wilson hastalarında *ATP7B* geninde gözlenen birçok mutasyon sonucunda, ATP7B'nin biyokimyasal aktivitesi bozulur. Bu nedenle, bakırın safra yoluyla atılması ve holoseruloplazmin halinde kan dolaşımına verilmesi gerçekleşemez, bakır hepatositte birikir. Biriken bakır karaciğer hasarına; karaciğer sirozuyla başlayan nörolojik bozukluklara yol açar (4,7).

Wilson hastalarında, kandaki bakır bağlayıcı glikoprotein olan seruloplazminle bakır birleşemediğinden seruloplazmin düzeyi azalır, buna karşın bakır safra kanalından atılamadığından karaciğerde toksik bakır birikmesi ve idrarda bakır düzeyinde artma gözlenir (7,8,25).

WH tanısı için;

Serum seruloplazmin	: <20mg/dL
24 saatlik üriner Cu	: >100µg
Hepatik bakır(kuru ağırlık)	: >250µg/g
Serum bakır	: <100 µg/dL
Kayser-Fleischer halkası	: var

kriterlerinin bireyde bulunması gerekmektedir (4,7). 2001 yılında, Almanyada düzenlenen 8.uluslararası Wilson hastalığı ve Menkes hastalığı toplantısında, Wilson hastalığında fenotip genotip arasındaki ilişkinin kurulamamasındaki engelin, standart tanı kriterlerindeki ve fenotipik sınıflandırmadaki eksiklikten kaynaklandığı görüşüne varılmıştır. Yapılan görüşmeler sonucunda WH tanı kriterlerinin standardize edilmesi uygun görülmüştür. Ferenci ve arkadaşları 2003 yılında yayınladıkları makalelerinde, bu standardizasyonu bir skorum sistemi oluşturarak Tablo 1.1'deki şekliyle belirlemişlerdir(26).

Tablo1.1:Wilson hastalığının tanısı için skarlama sistemi

Semptomlar		Skor
-KF-halkası		()
Var	2	
Yok	0	
-WD'yi gösteren nöropsikatrik semptomlar		()
(veya tipik beyin MRI *)		
var	2	
yok	0	
-Coombs negatif hemolitik anemi(+yüksek serum bakır)		()
var	1	
yok	0	
-Laboratuar testleri		
Üriner bakır(akut hepatitis yokken)		()
Normal	0	
1-2X NÜL	1	
>2X NÜL	2	
Normal Fakat bir günde 2x0.5g D-penisilamin uygulandıktan sonra >5X NÜL	2	
Karaciğer bakır miktarı (**)		()
Normal	-1	
5X NÜL'ye kadar yükseldiğinde	1	
>5X NÜL	2	
Rodanin pozitif hepatosit(miktarsal bakır ölçümü yapılmadıysa)		()
Yok	0	
Var	1	
Serum seruloplazmin(neflometrik ölçüm,normal>20mg/dl***)		()
Normal	0	
10-20	1	
<10	2	

Mutasyon analizi		()
Hastalığa neden olan mutasyonlar her iki kromozomda	4	
Hastalığa neden olan mutasyonlar bir kromozomda	1	
Hastalığa neden olan mutasyon saptanamadıysa	0	

Toplam skor(bulunmuyorsa skor 0) ()

WH tanı skorunun değeri

4 veya fazla : Wilson Hastalığı tanısı yüksek olasılıklı

2-3 : Wilson Hastalığı tanısı olası,daha fazla araştırma yapılmalı

0-1 : Wilson Hastalığı tanısı olası değil

*Detaylı MR görüntüsü veya EEG çalışmaları, nörolojik semptomlar klinik nörolojik muayeneyle tam olarak belirlenemiyorsa gereklidir.**Karaciğer biyopsisi,nörolojik hastaların tanı ve değerlendirmesi için zorunlu değildir. Karaciğerin histopatolojik değerlendirilmesinin, klinik araştırma protokolleri için önemli olduğu düşünülmektedir. ***Serulopasmin oksidaz assay-seruloplazmin oksidaz tayini ile ölçüldüğü zaman diğer değerlere başvurulur. NÜL:Normalin üst limiti, KF:Kayser-Fleischer(26).

Bu kriterlere uyan bireylere WH tanısı konur ve ilaç tedavisine başlanır. WH 'nin tedavisinde kullanılan dört farklı ilaç vardır, bunlar:

D-penisilamin : Bakırın idrarla atılmasını artıran genel bir chelatordur.

Trientin : Bakırın idrarla atılmasını artıran genel bir chelatordur.

Çinko : metalotionini artırır ve bu yolla bakırın barsaktan emilimini engeller.

Tetratiomolibdat : bakır emilimini engelleyen, idrarla ve barsaktan bakırın atılmasını sağlayan genel bir chelatordur(8,27).

WH tanısı konan ve tedavisi devam eden bireylere, hastalığın ilerleme sürecine göre karaciğer nakli yapılması gerekmektedir; yapılmaması durumunda karaciğer sirozu ardından ölüm gerçekleşmektedir (3,7,28).

Tablo1.1'de, hastalığa neden olan mutasyonların her iki kromozomda görülmesinin dört, bir kromozomda görülmesinin bir puan olarak belirlenmesiyle, Wilson hastalığı tanısının konmasında mutasyon analizinin önemi ve gerekliliği vurgulanmaktadır(26).

Şimdiye kadar WH geninde 250'den fazla farklı mutasyon saptanmıştır(29). Bunlar; tek baz insersiyonu ve delesyonu, çerçeve kayması , missense, nonsense ve splice site mutasyonlarıdır (20).

Kuzey ve Doğu Avrupanın 1/3'ünde en sık gözlenen missense mutasyon H1069Q mutasyonudur ve *ATP7B* geninin 14.ekzonunda tanımlanmıştır (6,30). Ekzon 13'te P969Q mutasyonu Macaristan, İtalya ve Türkiyede gözlenen bir mutasyondur (31,32). Ekzon 17'deki Thr1221Met mutasyonunun çalışılan Türk WH'de %10 oranında görüldüğü tanımlanmıştır (33).

Cox ve arkadaşlarının, WH'de *ATP7B* genindeki mutasyonları saptayan literatür çalışmalarını derleyerek oluşturdukları veri tabanından ve literatürdeki çalışmaların sonuçlarından yararlanılarak Tablo1.2-1.6 aşağıdaki şekliyle oluşturulmuştur (1,3,5,19,20,29,32-63).

Tablo1.2 : *ATP7B* geninin 8.ekzonundaki WH'ye yönelik mutasyonlar

Ekzon	Mutasyon	Mutasyon	Tipi	Protein	Etnik	Sekans	Çalışılan	Makale
	nt	a.a.		bölgesi	köken		kontroller	
8	2123T>C	L708P	missense	TM 2	K.Am	<u>C</u> T <u>C</u> - <u>C</u> C <u>C</u>	100c	Shah et al 1997
8	2128G>C	G710R	missense	TM 2	Ita	<u>G</u> G <u>T</u> - <u>C</u> G <u>T</u>	ASO	Loudianos et al 1996
8	2128G>A	G710S	missense	TM 2	Tur, Ita, ME	<u>G</u> G <u>T</u> - <u>A</u> G <u>T</u>	100c	Waldenstrom et al 1996
8	2129G>C	G710A	missense	TM2	Alm	<u>G</u> G <u>T</u> - <u>G</u> C <u>T</u>		Ha-Hao et al 1998
8	2131G>A	G711R	missense	TM2	Ita	<u>G</u> G <u>G</u> - <u>A</u> G <u>G</u>	100c	Loudianos et al 1999
8	2131G>T	G711W	missense	TM2	Pak	<u>G</u> G <u>G</u> - <u>T</u> G <u>G</u>	104c	Curtis et al 1999
8	2132G>A	G711E	missense	TM 2	Ita	<u>G</u> G <u>G</u> - <u>G</u> A <u>G</u>	ASO	Loudianos et al 1996
8	2138A>G	Y713C	missense	TM 2	Ita	<u>T</u> A <u>C</u> - <u>T</u> G <u>C</u>	ASO	Loudianos et al 1996
8	2158delA	K720N	delesyon	TM 2/3	Ita	<u>T</u> A <u>C</u> <u>A</u> A <u>T</u> C <u>T</u>		Thomas et al 1995
8	2163-2164insT	L722S-fs	insersiyon	TM 3	Jap	<u>T</u> C <u>T</u> <u>T</u> C <u>T</u> G		Nanji et al 1997
8	2222A>G	Y741C	missense	TM3	Alm	<u>T</u> A <u>T</u> - <u>T</u> G <u>T</u>		Ha-Hao et al 1998
8	2223T>A	Y741X	nonsense	TM3	Ita	<u>T</u> A <u>T</u> - <u>T</u> A <u>A</u>		Loudianos et al 1999
8	2239A>T	I747F	missense	TM3	Sar	<u>A</u> T <u>C</u> - <u>T</u> T <u>C</u>	100c	Loudianos et al 1998
8	2279C>T	P760L	missense	TM3/4	Alm	<u>C</u> C <u>T</u> - <u>C</u> T <u>T</u>	50	Genschel et al 2000
8	2280-2301del22	P760p-fs	delesyon	TM3/4	İng	<u>C</u> C <u>C</u> ~ <u>C</u> C <u>C</u> A		Curtis et al 1999
8	2293G>A	D765N	missense	TM 4	Ita	<u>G</u> A <u>C</u> - <u>A</u> A <u>C</u>	100 c.	Figus et al 1995
8	2299delC	P767P fs	delesyon	TM4		<u>A</u> C <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u>		Kim et al 1998
8	2298-2299insC	P767P-fs	insersiyon	TM 4	Jap, Ita, Isv,İng, Alb, Alm, Avt ,Tur, Rus, K.Am. Sar,	<u>A</u> C <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> C <u>C</u> A		Thomas et al 1995
8	2305A>G	M769V	missense	TM 4	K.Avp, Avt	<u>A</u> T <u>G</u> - <u>G</u> T <u>G</u>	100c	Shah et al 1997
8	2306T>G	M769R	missense			<u>C</u> A <u>T</u> G- <u>C</u> A <u>G</u> G	60c	Curtis et al 1999
8	2307G>T	M769I	missense	TM4	Jap	<u>A</u> T <u>G</u> - <u>A</u> T <u>I</u>	100C	Okada et al 2000
8	2326C>G	L776V	missense	TM 4	İng	<u>C</u> T <u>G</u> - <u>G</u> T <u>G</u>		Thomas et al 1995
8	2332C>G	R778G	missense	TM 4	Tur	<u>C</u> G <u>G</u> - <u>G</u> G <u>G</u>	100 c.	Figus et al 1995
8	2332C>T	R778W	missense	TM 4	K.Am.	<u>C</u> G <u>G</u> - <u>T</u> G <u>G</u>	0	Shah et al 1997
8	2333G>A	R778Q	missense	TM 4	Tai	<u>C</u> G <u>G</u> - <u>C</u> A <u>G</u>	0	Chuang et al 1996
8	2333G>T	R778L	missense	TM 4	Cin, Fra, Kore, Jap, İng, Tur	<u>C</u> G <u>G</u> - <u>C</u> T <u>G</u>	0	Thomas et al 1995
8	2337G>A	W779X	nonsense	TM 4	K. Avp, Alm, Avt	<u>T</u> G <u>G</u> - <u>T</u> G <u>A</u>		Waldenstrom et al 1996

Tablo 1.3: *ATP7B* geninin 12.ekzonundaki WH'ye yönelik mutasyonlar

Ekzon	Mutasyon nt	Mutasyon a.a.	Tipi	protein bölgesi	Etnik köken	Sekans	Çalışılan kontroller	Makale
12	2752G>A	D918N	missense	TM5	Ita	<u>G</u> AC- <u>A</u> AC	100c	Loudianos et al 1998
12	2755C>G	R919G	missense		Jap	<u>C</u> GG - <u>G</u> GG	54c	Yamaguchi et al 1998
12	2755C>T	R919W	missense	TM5	Ita, Tur	<u>C</u> GG- <u>T</u> GG	100c	Loudianos et al 1998
12	2762G>A	S921N	missense	TM5	Sar	<u>A</u> GT- <u>A</u> AT	100c	Loudianos et al 1998
12	2764- 2772	del 922- 924	delesyon		Jap	<u>G</u> GATATTTT <u>G</u> T	100C	Okada et al 2000
12	2797A>C	T933P	missense	TM5	Tur	<u>A</u> CT- <u>C</u> CT	100c	Loudianos et al 1998
12	2807T>A	L936X	nonsense	TM 5	Alm,S.Arb	<u>T</u> TG - <u>T</u> AG		Thomas et al 1995
12	2827G>A	G943S	missense	TM 5	Ita	<u>G</u> GT - <u>A</u> GT		Thomas et al 1995
12	2828G>A	G943C	missense	TM5	Tai	<u>G</u> GT- <u>G</u> AT	100c	Tsai et al 1998

Tablo1.4: *ATP7B* geninin 13.ekzonundaki WH'ye yönelik mutasyonlar

Ekzon	Mutasyon nt	Mutasyon a.a.	Tipi	protein bölgesi	Etnik köken	Sekans	Çalışılan kontroller	Makale
13	2868delC	N956N-fs	delesyon	Ch/TM 6	Jap	<u>A</u> ACCCC AAC		Nanji et al 1997
13	2899A>T	I967F*	missense	Ch/TM 6		<u>A</u> TC - <u>I</u> TC	0	Waldenstrom et al 1996
13	2954G>A	C985Y	missense	Ch/TM6		<u>T</u> GC- <u>T</u> AC		Haas et al 1999
13	2906G>A	R969Q	missense	Ch/TM 6	Ita, Tur	<u>C</u> GG - <u>C</u> AG		Figus et al 1995
13	2930T>C	T977M	missense	Ch/TM 6	Isv	<u>A</u> CG- <u>A</u> TG	100c	Olsson et al 2000
13	2975C>T	P992L	missense	Ch/TM 6	Jap	<u>C</u> CC - <u>C</u> TC		Nanji et al 1997
13	2996insC	T999T-fs	insersiyon		Yemen	<u>A</u> CCCGG	104c	Curtis et al 1999
13	3007G>A	A1003T	missense	Ch/TM6	Ita	<u>G</u> CG- <u>A</u> CG	100c	Loudianos et al 1998
13	3008C>T	A1003V	missense		Tur	<u>G</u> CG- <u>G</u> TG	100c	Loudianos et al.
13	3053C>T	A1018V	missense	Ph	Sar	<u>G</u> CG- <u>G</u> TG	100c	Loudianos et al 1998
	IVS13-1g>a		splice					Butler et al 2001
	IVS13-1		splice		Tur			Loudianos et al 1996

Tablo 1.5: *ATP7B* geninin 14.ekzonundaki WH'ye yönelik mutasyonlar

Ekzon	Mutasyon nt	Mutasyon a.a.	Tipi	protein bölgesi	Etnik köken	Sekans	Çalışılan Kontroller	Makale
14	3083-3084delAG	K1028N- fs	delesyon	Ph	Ing	<u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u>		Curtis et al 1999
14	3083- 2085delAGA>G	K1028S-fs	delesyon	Ph	Ita	<u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u>		Figus et al 1995
14	3085-3086delAC	T1029W- fs	delesyon	Ph	Ing	<u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u>		Thomas et al 1995
14	3091A>T	T1031S	missense	Ph	Alm	<u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> - <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u>		Ha-Hao et al 1998
14	3097A>G	T1033A	missense	Ph	Pak	<u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> - <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u>	72c	Curtis et al 1999
14	3104G>T	G1035V	missense	Ph	Jap	<u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> - <u>G</u> <u>T</u> <u>C</u>		Nanji et al 1997
14	3113G>A	R1038K	missense	Ph	Fin	<u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> - <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u>	0	Kemppainen et al 1997
14	3121C>T	R1041W	missense	ATP loop	Ita	<u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> - <u>I</u> <u>G</u> <u>G</u>	100c	Loudianos et al 1998
14	3122G>C	R1041P	missense	ATP loop	Ita	<u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> - <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u>	100c	Loudianos et al 1999
14	3128T>C	L1043P	missense	Ph	Sar	<u>C</u> <u>T</u> <u>C</u> - <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u>	ASO	Loudianos et al 1996
14	3146delC	A1049A-fs	delesyon	Ph	Pak	<u>G</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u>		Thomas et al 1995
14	3155C>T	P1052L	missense			<u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> - <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>C</u>	72c	Curtis et al 1999
14	3182G>A	G1061E	missense	ATP loop	Avp	<u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> - <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u>	60c	Misrahi et al 1996
14	3188C>T	A1063V	missense	ATP loop	Ita	<u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> - <u>G</u> <u>T</u> <u>G</u>	100c	Loudianos et al 1999
14	3190G>A	E1064K	missense	ATP loop	Tur, Avp	<u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> - <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u>	100 c.	Figus et al 1995
14	3191A>C	E1064A	missense	ATP loop	Jew	<u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> - <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u>	0	Shah et al 1997
14	3193G>C	A1065P	missense	ATP loop	Avp	<u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> - <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u>		Misrahi et al 1996
14	3203A>G	E1068G	missense	SEHPL	Ita	<u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> - <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u>	100c	Loudianos et al 1999
14	3207C>A	H1069Q	missense	ATP loop	Alm, Yug, Rus, Ing, Pol, Lat ,Yun, Bul, Irak, Ne, Isv, İsk, Ita, Cze, Ita, Tur, Alb, Avt	<u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> - <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u>		Misrahi et al 1996

Tablo 1.6: *ATP7B* geninin 17.ekzonundaki WH'ye yönelik mutasyonlar

Ekzon	Mutasyon nt	Mutasyon a.a.	Tipi	Protein bölgesi	Etnik köken	Sekans	Çalışılan Kontroller	Makale
17	3587-3588insC	A1197R-fs	insersiyon	ATP loop	?	A <u>C</u> CGCTGT		Waldenstrom et al 1996
17	3627-3632del6		delesyon	ATP- bag.böl	Alm	ACTCT <u>GCAGAGC</u>		
17	3627-3630del4		delesyon	ATP- bag.böl.	Isv	ACTCT <u>GCAGAGC</u>		Thomas et al 1995
17	3638G>T	G1213V	missense	TM1	Tur	<u>GG</u> T- <u>GT</u> T		Kalinsky et al 1998
17	3646G>A	V1216M	missense	ATP cebi	Tur	<u>GT</u> G- <u>AT</u> G	100c	Loudianos et al 1998
17	3649-3654del6	V12171218L del	delesyon	ATP- bag.böl	Ing, Fin	GTG <u>GTTCTG</u> ATC	0	Chuang et al 1996
17	3659C>T	T1220M	missense	ATP- bag.böl	Tur	A <u>C</u> G - <u>AT</u> G	ASO	Loudianos et al 1996
17	3664G>T	D1222Y	missense	ATP- bag.böl	Rus	<u>G</u> AC - <u>I</u> AC		Shah et al 1997
17	3665A>T	D1222V	missense	ATP- bag.böl	Tur	<u>G</u> AC- <u>G</u> IC	100c	Loudianos et al 1999
	IVS17-2A>T		splice		Tai	ttagGT-tttgGT	100c	Tsai et al 1998

Wilson Hastalığının fenotipik yönden önemli birçok tipi vardır. Aynı genotipteki genç hastalarda hepatik bozukluklar gözlenirken, ilerleyen yaşlarda nörolojik bozuklukların gözlenme nedeni bilinmemektedir (61). H1069Q mutasyonunu homozigot olarak taşıyan hastalar, tanı ve semptomlarının başında ileri yaşadıkları ve %93 nörolojik tutulum gösterirler (64), sıklıkla(%82) Kayser-fleischer halkasına sahiptirler (32).

Mayalarla yapılan deneyler, H1069Q mutasyonunu taşıyan *ATP7B* geninin ürününün, bu hasardan dolayı fonksiyonunu tamamlayamadığını göstermiştir. Bu da az miktarda bakırın karaciğerden safra yoluyla atılmasına yol açar (32). *ATP7B* proteinin düşük aktivitesine bağlı olarak az miktarda da olsa bakırın atılmasına izin verilmesi, metalin yavaş çoğalmasına ve sonraki yaşlarda tutulum göstermesine yol

açar. Bu da H1069Q mutasyonu ile geç n6rolojik bulgular arasındaki iliŐkiyi doğrulamaktadır (64).

Bazı gruplar, H1069Q genotipiyle n6rolojik tutulum arasında korelasyon saptamamıŐtır. UyuŐmayan bu sonuçlar, farklı etnik k6kenden seçilen hastaların çalıŐılmıŐ olmasıyla, çevresel (6rneğin beslenme) ve genetik fakt6rler ile açıklanabilir (32).

Wilson Hastalığının tanısının konmasındaki zorluklar g6z 6n6ne alındığında, mutasyon analiziyle saptanan genetik değişikliklerin 6nemi ortaya çıkmaktadır. Wilson Hastalığıyla ilişkili gen olan *ATP7B*'deki mutasyonların saptanmasıyla kliniğe 6nemli bir hizmet verileceği anlaŐılmaktadır.

Cox ve arakadaŐları tarafından oluŐturulan Wilson hastalığının mutasyon veri tabanı, burada referans g6sterilen makaleler ve literat6rdeki diğer WH ile ilgili yayınlar incelendiğinde; *ATP7B* geninin 8,12,13,14 ve 17 nolu ekzonlarının hem sayıca fazla mutasyon içerdiği, hem de en sık g6zlenen mutasyonların bu ekzonlarda bulunduğu saptanmıştır. Bu nedenle 6ncelikli olan bu beş ekzon çalışılmıştır (5,14,30,31,33,48).

BÖLÜM 2 :
GEREÇ VE YÖNTEMLER

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1 örnek alımı,çalışma grubunun oluşturulması

Wilson Hastalarında *ATP7B* geninin 8, 12, 13, 14 ve 17 nolu ekzonlarındaki mutasyonların taranması amacıyla; İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi (DEÜ TFAUH) Çocuk Gastroenteroloji ve Beslenme Anabilim Dalı (ABD), Nöroloji ABD;İzmir Tepecik Araştırma ve Uygulama Hastanesi, İzmir Dr.Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Yeşilyurt Devlet Hastanesinde görev yapmakta olan uzman hekimler tarafından Wilson Hastalığı (WH) tanısı konan 26 aile çalışmaya dahil edilmiştir. DEÜ TFAUH Çocuk Gastroenteroloji ve Beslenme ABD'den 2 aile, DEÜ TFAUH Nöroloji ABD'den 3 aile, İzmir Tepecik Araştırma ve Uygulama Hastanesinden 13 aile, İzmir Dr.Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesinden 4 aile, Yeşilyurt Devlet Hastanesinden 4 aile çalışmaya katılmıştır. Çalışmanın amacı ve içeriği gönüllülere açık bir dille anlatılarak DEÜ TFAUH Yerel Etik Komitesinin onay verdiği gönüllü bilgilendirme formu aracılığıyla izinleri alındı (Ek3).Tüm bireylerden DNA eldesinde kullanılmak üzere 2ml periferik kan etik kurulun onayladığı protokole uygun olarak alındı.

2.2 Kan örneklerinden DNA eldesi

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

2.2.1 Stok Çözeltiler ve Hazırlanışları

Retikulosit Tuz Solüsyonu (pH=7.2)

0.13 M NaCl

5mM KCl

7.4mM MgCl₂

Hazırlanışı:

3.796 gram(gr) NaCl (Sigma S 3014), 0.185 gr KCl (Sigma P 9327) ve 0.785 gr MgCl₂ (Merck 5832) hassas terazide tartıldı, distile su ile 400ml'ye tamamlanarak çözülünceye kadar karıştırıldı. Son olarak pH'ı 7.2 olacak şekilde ayarlandıktan sonra distile su ile 500ml'ye tamamlandı ve kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

10X Lizis Solüsyonu (pH=7.6)

0.77M NH₄Cl
0.046M KHCO₃

Hazırlanışı:

20.6gr NH₄Cl (Sigma A 9434) ve 2.3 gr KHCO₃ (Merck 4852) hassas terazide tartıldı, distile su ile 400ml'ye tamamlanarak çözülünceye kadar karıştırıldı. Son olarak pH'ı 7.6 olacak şekilde ayarlandıktan sonra distile su ile 500ml'ye tamamlandı ve kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

DNA eldesi sırasında stok 10X lizis solüsyonundan taze hazırlanan 2X lizis solüsyonu kullanıldı.

Lizis Solüsyon (pH=7.6)

100mM NaCl
25mM EDTA

Hazırlanışı:

2.92gr NaCl ve 4.6525gr EDTA (Sigma E5134) hassas terazide tartıldı, distile su ile 400ml'ye tamamlanarak çözülünceye kadar karıştırıldı. Son olarak pH'ı 7.6 olacak şekilde ayarlandıktan sonra distile su ile 500ml'ye tamamlandı ve kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

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

10mmol/L Tris base
1mmol/L EDTA

Hazırlanışı:

0.6055gr Tris base ve 0.1865gr EDTA hassas terazide tartıldı, distile su ile 400ml'ye tamamlanarak çözülünceye kadar karıştırıldı. Son olarak pH'ı 8.0 olacak şekilde ayarlandıktan sonra distile su ile 500ml'ye tamamlandı ve kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

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

100mg Proteinaz K üzerine 5ml deiyonize su eklenerek 20mg/ml konsantrasyona sahip proteinaz K hazırlandı. DNA eldesinde kullanılmak üzere 100µg/ml ara stoklar hazırlanarak ana stokla birlikte -20°C'de saklandı.

%10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS,Laury Sülfat)

10gr SDS (Sigma L 4390) tartılarak üzerine 75ml distile su ilave edildi, ısıtıcı karıştırıcıda 65°C'de çözüldü tamamen çözüldünce distile su ile 100ml'ye tamamlanarak %10'luk son konsantrasyon elde edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

2.2.2 Kullanıma Hazır Kimyasallar

Fenol/Kloroform/İzoamilalkol (25:24:1) pH=8.0 (AppllichemA0889,0500)

Etanol (%95)

Etanol (%70) :%95'lik etanolün 70ml'sine 26ml dH₂O eklenerek hazırlandı.

2.2.3 DNA Eldesinde Uygulanan Protokol:

Maniatis,T. (65,66) tarafından tanımlanan fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemine dayalı protokol laboratuvar koşullarımıza göre modifiye edilerek (67,68) DNA ekstraksiyonu yapıldı.

1.Gün

-20°C'de EDTA'lı tüplerde saklanan kan örnekleri çıkarılıp oda sıcaklığında bırakılarak çözüldü.

1. Erimiş kan örneklerinden 400µl alınıp 1.5ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı.
2. Tüp içindeki kan hacminin 3 katı kadar (1.2ml) retikülosit tuz solüsyonu eklendi, el hareketiyle hafifçe karıştırıldı.
3. Tüpler karıştırma cihazına (Hofer Red Rocker) yerleştirildi, 5 dakika karıştırıldı.
4. Karıştırma işleminden sonra tüpler soğutmalı santrifüjde (Eppendorf 5417R) 12000rpm'de +4°C'de 5 dakika çevrildi.
5. Santrifüjden çıkan tüplerin üst fazları atıldı.

6. Taze hazırlanan 1.2ml 2X lizis solüsyonu tüplerin içine eklendi, el hareketiyle hafifçe karıştırıldı.
7. Tüpler karıştırma cihazına yerleştirildi, 5 dakika karıştırıldı.
8. Karıştırma işleminden sonra tüpler soğutmalı santrifüjde 12000rpm'de +4°C'de 5 dakika çevrildi.
9. Santrifüjden çıkan tüplerin üst fazları atıldı.
10. Tüplerin dibinde kalan lökosit hücreleri beyaz bulutsu renkte gözlenene kadar 2X lizis solüsyonuyla muamele edildi.
11. Beyaz bulutsu görünüş elde edilince, tüplerin üzerine 400µl lize edici solüsyon eklendi, karıştırıldı.
12. Başta eklenen kan hacminin 1/10'u (40µl) kadar %10'luk SDS eklendi. 5µl Proteinaz K (100µg/ml) eklendi ve el hareketiyle karıştırıldı.
13. Tüpler 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

2.Gün

14. 37°C'den çıkarılan tüplerin üzerine tüp içindeki hacim kadar (1:1 oranında) 25:24:1 oranındaki fenol kloroform izoamil alkol solüsyonu eklendi.
15. Tüpler 30saniye hafifçe vortekslendi (Elektro-mag).
16. Tüpler karıştırma cihazına yerleştirildi, 5 dakika karıştırıldı.
17. Karıştırma işleminden sonra tüpler soğutmalı santrifüjde 12000rpm'de +4°C'de 5 dakika çevrildi.
18. Santrifüj sonrası tüp içindeki üst faz yeni bir 1.5ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı.
19. Berrak bir görünüm elde edilinceye kadar 15.-19. basamaklardaki işlemler tekrarlandı.
20. Tüplerin üzerine (-20°C'de saklanan) %95'lik etil alkol eklendi, el hareketiyle hafifçe karıştırıldı bu sırada DNA'nın beyaz iplikçik halinde çökmesi gözlemlendi.
21. Tüpler -20°C'lik derin dondurucuya konur 10 dakika bekletildi.
22. Tüpler soğutmalı santrifüjde 12000rpm'de +4°C'de 5 dakika çevrildi.

23. Santrifüjden çıkarılan tüplerin dibinde bir miktar sıvı kalacak şekilde el hareketiyle boşaltıldı.
24. 1ml'lik mikropipet ucuyla dipte kalan DNA pellet kaldırıldı. DNA 1.5ml'lik yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı, üzerine %70'lik etil alkol eklendi.
25. Tüpler soğutmalı santrifüjde 12000rpm'de +4°C'de 5 dakika çevrildi.
26. Üst faz el hareketiyle uzaklaştırıldı.
27. Tüplerin ağzı açık pozisyonda parafilmle kapatılıp toplu iğneyle birkaç delik açıldı, oda sıcaklığında bir gece bekletilerek kuruması sağlandı.

3.Gün

28. Fazla suyu uçurulan çökelti üzerine 150µl 0.5X TE tamponu eklendikten sonra tüpler 37°C'de bir gece veya 55°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı, DNA'nın çözünmesi sağlandı.

DNA örneklerine standart bir numaralandırma sistemi uygulandı. Öncelikle her aileye 001'den 026'ya kadar numaralar verildi. Örneğin ilk ailenin WH tanılı ilk bireyine 011C1K numarası verildi. Hasta 18 yaşından büyükse 'B' küçükse 'C' harfi kullanıldı, harften sonraki ilk rakam çalışmaya katılan kardeşlerden ilkinin temsil ettiği, diğer kardeşler 2, 3 olarak numaralandırıldı. En sonda bulunan harf kişi erkekse 'E' kadınsa 'K' olarak düzenlendi. Bireylerin anne ve babaları için ebeveyni simgeleyen 'E' harfi 'B' ve 'C' nin yerine kullanıldı. 011 nolu aile için anne 011E1K ile numaralandırılırken baba 011E1E ile numaralandırılmıştır. Tüm DNA içeren tüplerin üzerine bu numaralar yazıldı, PCR tüpleri için aynı numara kullanıldı hangi ekzon çalışılacaksa sonuna ekzon numarası eklendi. Dizi analizine gidecek örneklerin üzerinde de PCR'daki numara kullanıldı.

2.2.4 Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyonunun ve Kalitesinin Saptanması

DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen değerlerle belirlenebilir. 260nm dalga boyunda 1 optik dansite (OD) değeri ile solüsyonun 50µg/ml çift iplikli DNA içerdiği kabul edilir.

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

260nm'deki OD değeri kullanılarak örneklerin konsantrasyonları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı(65).

DNA örneklerinin saflığı $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ oranı kullanılarak değerlendirildi. İyi saflaştırılmış DNA'nın $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ değeri yaklaşık 1.8'dir. Ortamda fenol ve protein bulunursa $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ değeri 1.8'den küçük olacaktır. $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ değeri 2'den büyükse RNA bulaşı olduğu anlamına gelmektedir (65).

Elde edilen DNA'ların miktarı ve saflığının belirlenmesi için her örnekten 4µl alındı ve üzerine 96µl 0.5X TE tamponu ile tamamlanarak 1/25 dilüsyon sağlandı.

Hazırlanan örnekler spektrofotometrede (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000 UV/Visible) 260nm ve 280nm'deki dalga boylarında OD ölçümleri yapıldı.

PCR'da kullanılan tüm DNA'lar yukarıdaki standartlara uygun olarak hazırlandı. Bu DNA'ların intakt olup olmadıkları %1'lik agaroz jelde 1µl DNA örneği yürütülerek kontrol edildi.

2.3 β -actin Geninin ve *ATP7B* Geninin 8.,12.,13.,14. ve 17. ekzonlarının PCR Teknolojisiyle çoğaltılması

β -actin primer dizileri (internal kontrol):

β -actin(ileri) : 5'ATCATGTTTGAGACCTTCAA 3'

β -actin(geri) : 5'CATCTCCTGCTCGAAGTCCA 3'

2.3.1 Sekizinci Ekzon Bölgesinin Çoğaltılması için Primer Dizileri:

8.ekzon bölgesi ileri primer : 5'CGCTCATTGAACTCTCCTCC3'

8.ekzon bölgesi geri primer :5'AACATGGTGTTTCAGAGGAAGTGAG3'

52851 5'AAAGCTAGAG GCTTTGCCAT CCCAGGGCC CTTGGCCCTG TGT**CGCTCAT**
3'TTTCGATCTC CGAAACGGTA GGGGTCCCGG GAACCGGGAC ACAG**CGAGTA**
8.ekzon ileri primer

52901 **TGAACTCTCC** **TCCCTACTTG** CTGGCAGCCT TCACTGTCCT TGTCTTTTCAG
ACTTGAGAGG **AGGGATGAAC** GACCGTCGGA AGTGACAGGA ACAGAAAGTC

52951 **CTCCTCGGTG** **GGTGGTACTT** **CTACGTTTCAG** **GCCTACAAAT** **CTCTGAGACA**
GAGGAGCCAC **CCACCATGAA** **GATGCAAGTC** **CGGATGTTTA** **GAGACTCTGT**

53001 **CAGGTCAGCC** **AACATGGACG** **TGCTCATCGT** **CCTGGCCACA** **AGCATTGCTT**
GTCCAGTCGG **TTGTACCTGC** **ACGAGTAGCA** **GGACCGGTGT** **TCGTAACGAA**

53051 **ATGTTTATTC** **TCTGGTCATC** **CTGGTGGTTG** **CTGTGGCTGA** **GAAGGCGGAG**
TACAAATAAG **AGACCAGTAG** **GACCACCAAC** **GACACCGACT** **CTTCCGCCTC**

53101 **AGGAGCCCTG** **TGACATTCTT** **CGACACGCC** **CCCATGCTCT** **TTGTGTTTCAT**
TCCTCGGGAC **ACTGTAAGAA** **GCTGTGCGGG** **GGGTACGAGA** **AACACAAGTA**

53151 **TGCCCTGGGC** **CGGTGGCTGG** **AACACTTGGC** **AAAGGTAACA** **GCAGCTTCAG**
ACGGGACCCG **GCCACCGACC** **TTGTGAACCG** **TTTCCATTGT** **CGTCGAAGTC**

53201 **G TTCAGAAAA** **GAGCTGCTCC** **TTCAGTAAAC** **AAATCTCACT** **TCCTCTGAAC**
CAAGTCTTTT **CTCGACGAGG** **AAGTCATTTG** **TTTAGAGTGA** **AGGAGACTTG**
8.ekzon geri primer

53251 **ACCATGTTTA** **GAATTACTAA** **TTATACACAG** **CATAGAGACAGACTTAAAGA**3'
TGGTACAAAT **CTTAATGATT** **AATATGTGTC** **GTATCTCTGTCTGAATTTCT**5'

2.3.2 Onikinci Ekzon Bölgesinin Çoğaltılması için Primer Dizileri:

12.ekzon bölgesi ileri primer : 5'TTCTTCATAGGTTGTAATTTCCCATG3'

12.ekzon bölgesi geri primer : 5'GGATCAATGTCAGTAGATTATTTAAAACAC3'

616015' TAAATGAAGG AGATTATCCC AATCTTTATC CATGCTTGTG GTGTTTTAT
3' ATTTACTTCC TCTAATAGGG TTAGAAATAG GTACGAACAC CACAAAATA

NcoI

12.ekzon ileri primer ~~~~~

61651 TCTTCATAGG TTGTAATTTT CCATGGTCTT GGTGTTTTAT TTTCATAGGC
AGAAGTATCC AACATTAAAG GGTACCAGAA CCACAAAATA AAAGTATCCG

61701 ACCCATTCAG CAGCTGGCTG ACCGGTTTAG TGGATATTTT GTCCCATTTA
TGGGTAAGTC GTCGACCGAC TGGCCAAATC ACCTATAAAA CAGGGTAAAT

61751 TCATCATCAT GTCAACTTTG ACGTTGGTGG TATGGATTGT AATCGGTTTT
AGTAGTAGTA CAGTTGAAAC TGCAACCACC ATACCTAACA TTAGCCAAAA

ClaI

~~~~~

61801 ATCGATTTTG GTGTTGTTCA GAGATACTTT CCTGTAAGTT GAATGCCTTG  
TAGCTAAAAC CACAACAAGT CTCTATGAAA GGACATTCAA CTTACGGAAC

61851 GGCTATATGG TGGTTGTGTT TTAAATAATC TACTGACATTGATCCTGTTC3'  
CCGATATACC ACCAACACAA AATTTATTAG ATGACTGTAAGTAGGACAAG5'

12.ekzon geri primer



### 2.3.3 Onüçüncü Ekzon Bölgesinin Çoğaltılması için Primer Dizileri:

13.ekzon bölgesi ileri primer : 5'CAACCTGCCTCTGACTCT 3'

13.ekzon bölgesi geri primer : 5' GGATGGGGAAAGCCGTGCTAC3'

13.ekzon ileri primer

64951 5' TGATTAGAGT TCTGGGAGCT TCCTTATTGA ACTCTCAACCTGCCTCTGAC  
3' ACTAATCTCA AGACCCTCGA AGGAATAACT TGAGAGTTGGACGGAGACTG

65001 TCTGTCCTGT TTTCAGAAC CCAACAAGCA CATCTCCCAG ACAGAGGTGA  
AGACAGGACA AAAGTCTTGG GGTGTTTCGT GTAGAGGGTC TGTCTCCACT

65051 TCATCCGGTT TGCTTTCCAG ACGTCCATCA CGGTGCTGTG CATTGCCTGC  
AGTAGGCCAA ACGAAAGGTC TGCAGGTAGT GCCACGACAC GTAACGGACG

65101 CCCTGCTCCC TGGGGCTGGC CACGCCACG GCTGTCATGG TGGGCACCGG  
GGGACGAGGG ACCCCGACCG GTGCGGGTGC CGACAGTACC ACCCGTGGCC

65151 GGTGGCCGCG CAGAACGGCA TCCTCATCAA GGGAGGCAAG CCCCTGGAGA  
CCACCGGCGC GTCTTGCCGT AGGAGTAGTT CCCTCCGTTC GGGGACCTCT

65201 TGGCGCACAA GGTCAGCCTG TAGCACGGCT TTCCCCATCCTGAGAGATGA3'  
ACCGCGTGTT CCAGTCGGAC ATCGTGCCGA AAGGGTAGGACTCTCTACT5'

13.ekzon geri primer

### 2.3.4Ondördüncü Ekzon Bölgesinin Çoğaltılması için Primer Dizileri:

14.ekzon bölgesi ileri primer : 5'AGTTCTGCCTCAGGAGTGTGAC3'

14.ekzon bölgesi geri primer : 5'CAGCTAGGAGAGAAGGACATGG3'

#### 14.ekzon ileri primer

67101 5' TTTCTGTCT GAGGCAGGTT GGGTGAAGTT CTGCCTCAGGAGTGTGACTA  
3' AAAGGACAGA CTCCGTCCAA CCCACTCAA GACGGAGTCCTCACACTGAT

67151 TGGAAGCCCC TCCATCTGTA TTGTGGTCAG TGAGTTGTGG TTGTTTTTGG  
ACCTTCGGGG AGGTAGACAT AACACCAGTC ACTCAACACC AACAAAACC  
NcoI

~~~~~

67201 CAGATAAAGA CTGTGATGTT TGACAAGACT GGCACCATTA CCCATGGCGT
GTCTATTTCT GACACTACAA ACTGTTCTGA CCGTGGTAAT GGGTACCGCA

67251 CCCCAGGGTC ATGCGGGTGC TCCTGCTGGG GGATGTGGCC AACTGCCCC
GGGGTCCCAG TACGCCACG AGGACGACCC CCTACACCGG TGTGACGGGG

67301 TCAGGAAGGT TCTGGCTGTG GTGGGGACTG CGGAGGCCAG CAGTGAACAC
AGTCCTTCCA AGACCGACAC CACCCCTGAC GCCTCCGGTC GTCACTTGTG

67351 CCCTTGGGCG TGGCAGTCAC CAAATACTGT AAAGAGGTAC GTGGACTTGG
GGGAACCCGC ACCGTCAGTG GTTTATGACA TTTCTCATG CACCTGAACC

67401 GCGTGGCCCT GCCCTCCCCG CCAATGCTCT TTTATTCCTC ACCATGTCCT
CGCACCGGGA CGGGAGGGGC GGTACGAGA AAATAAGGAG TGGTACAGGA

AvaI

~~~~~

67451 TCTCTCCTAG CTGCCCTCGA GGAGCCTTCT CTGTGTGGTCTGGAAAACCA3'  
AGAGAGGATC GACGGGAGCT CCTCGGAAGA GACACACCAGACCTTTTGGT5'

14.ekzon geri primer

### 2.3.5Onyedinci Ekzon Bölgesinin Çoğaltılması için Primer Dizileri:

17.ekzon bölgesi ileri primer : 5'CATTGCAAGTGTGGTATCTTGGT3'

17.ekzon bölgesi geri primer : 5'TACAGCTCAGTGCTGGGCC3'

#### 17.ekzon ileri primer

72201 TTTTGCACAT AATATTATAT GATGAGAACA TTGCAAGTGT GGTATCTTGG  
AAAACGTGTA TTATAATATA CTACTCTTGT AACG TTCACA CCATAGAACC

72251 TGCGGGGTGC CCCAACTTGT GTAGCTGCTG ATGCTGGCTG GTTCGCTCCA  
ACGCCCCACG GGGTTGAACA CATCGACGAC TACGACCGAC CAAGCGAGGT

72301 GGTGTGCTCT GTGGGATGAT CGCAATCGCA GACGCTGTCA AGCAGGAGGC  
CCACACGAGA CACCCTACTA GCGTTAGCGT CTGCGACAGT TCGTCCTCCG  
ApaLI PstI  
~~~~~ ~~~~~

72351 TGCCCTGGCT GTGCACACGC TGCAGAGCAT GGGTGTGGAC GTGGTTCTGA
ACGGGACCGA CACGTGTGCG ACGTCTCGTA CCCACACCTG CACCAAGACT

72401 TCACGGGGGA CAACCGGAAG ACAGCCAGAG CTATTGCCAC CCAGGTACAG
AGTGCCCCCT GTTGGCCTTC TGTCGGTCTC GATAACGGTG GGTC CATGTC

72451 CCCTTTAATG TTGCAAACCTG TGTAAGCTC ATAAAAGCAG TTAGAGACAA
GGGAAATTAC AACGTTTGAC ACATTTTCGAG TATTTTCGTC AATCTCTGTT

72501 AAGTAAGCAC CAGTTGGCCC AGCACTGAGC TGTA CTCTTTCTCC
TTCATTCGTG GTCAACCGGG TCGT GACTCG ACATGAGGAC GAGAAAGAGG

17.ekzon geri primer

2.4 PCR'da Kullanılan Kimyasallar ve PCR'ın Hazırlanışı

DNA Taq polimeraz enzimi (5u/ μ l) : MBI Fermentas (Cat no:EPO402)

PCR reaksiyonunda 1 unite kullanılacak şekilde 25 μ l'lik PCR reaksiyonuna eklendi.

dNTP'ler (100 μ mol/ml) : MBI Fermentas (Cat no:R0141dATP,R0151dCTP, R0161dGTP,R0171dTTP)

100mM'lık her bir dNTP'den (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) 10 μ l alınarak (toplam 40 μ l) 0.2 μ l'lik tüpe kondu ve üzerine 60 μ l dH₂O eklenerek 100 μ l hacimde 10mM'lık dNTP karışımı hazırlandı ve -20°C'de saklandı.

PCR'ın Hazırlanışı:

PCR tablo 2.1'deki bileşenler belirtilen miktarda kullanılarak son hacim 25 μ l olacak şekilde 0.2ml'lik steril tüpte hazırlandı. 10 örnek çalışılacak ise pipetaj hataları için 1 ve negatif kontrol için 1 olmak üzere toplam 12 örnek varmış gibi reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 2.1:10 örnek için PCR bileşenlerinin miktarının gösterilmesi

| | İlk konsantrasyon | Son konsantrasyon | Kullanılan hacim | 10+2'lik reaksiyon |
|----------------------------|-------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| dH ₂ O | | | 15.6 µl | 187.2 µl |
| Tampon(Taq polimeraz için) | 10X | 10X | 2.5 µl | 30 µl |
| MgCl ₂ | 25mM | 25mM | 2.5 µl | 30 µl |
| dNTP | 10mM | 10mM | 0.5 µl | 6 µl |
| İleri primer | 100pmol/µl | 10pmol//µl | 0.7 µl | 8.4µl |
| Geri primer | 100pmol/µl | 10pmol//µl | 0.7 µl | 8.4µl |
| Taq polimeraz enzimi | 5U/µl | 5U/µl | 0.5 µl | 6 µl |
| DNA | | 200-300ng | 2 µl | |
| Toplam | | | 25µl | |

8., 12., 13., 14. ve 17. nolu ekzonları çoğaltmak için yapılan PCR işleminde yukarıdaki miktarlar aynen kullanıldı, sadece karışım hazırlanırken çoğaltılmak istenen bölgeye özgü primerler kullanıldı.

Taq polimeraz enzimi reaksiyon kurulurken buz üzerinde tutuldu ve Taq polimeraz eklendikten sonra vakit kaybetmeden tüp içine konan bileşenlerin iyice karışması için pipetaj yapıldı. Hemen ardından 0.2ml'lik tüplere 23µl reaksiyon karışımı dağıtıldı.

Son olarak her bir tüpe 2µl DNA eklendi ve PCR cihazına (Thermal cycler) örnekler hızlı bir şekilde yerleştirildi, PCR işlemi başlatıldı.

2.4.1 PCR Şartları

PCR reaksiyonunda, 8, 12, 14, 17 nolu ekzonlar için Petruchin ve arkadaşlarının (14), 13 nolu ekzon için Waldenstrom ve arkadaşlarının (1) kullandıkları primerler kullanıldı. Bu primerlerin sentezi MWG Biotech (Almanya) firmasında yaptırıldı. Bu firmanın hazırladığı primerlerin annealing derecesi 8. ekzon için 61°C, 12.ekzon için 59°C, 13.ekzon için 56°C, 14.ekzon için 62°C ve 17.ekzon için 60°C olduğu primerlerle birlikte gönderilen formda yazılmıştı. Ancak laboratuvar şartlarımızda annealing sıcaklıkları sırasıyla 59°C, 55°C, 59°C, 62°C ve 62°C olarak standardize edildi (tablo 2.2).

Tablo2.2: β -actin geninin ve *ATP7B* geninin beş ekzonunun PCR profili

| β-actin | | | |
|---------------------------------|------|------|---------|
| Denatürasyon | 93°C | 5dk | |
| Annealing | 93°C | 40sn | 29döngü |
| | 56°C | 40sn | |
| | 72°C | 40sn | |
| Sonlanma | 72°C | 5dk | |
| | 4°C | 10dk | |

| | 8.EKZON | 12.EKZON | 13.EKZON | 14.EKZON | 17.EKZON | Süre |
|---------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|
| Denatürasyon | 95°C | 95°C | 95°C | 95°C | 95°C | 5dk |
| Annealing | 94°C | 94°C | 94°C | 94°C | 94°C | 1dk |
| | 59°C | 55°C | 59°C | 62°C | 62°C | 1dk |
| | 72°C | 72°C | 72°C | 72°C | 72°C | 1dk |
| Sonlanma | 72°C | 72°C | 72°C | 72°C | 72°C | 5dk |
| | 4°C | 4°C | 4°C | 4°C | 4°C | 10dk |
| Döngü sayısı | 36 | 36 | 36 | 36 | 36 | |

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

Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler:

5X Tris Buffer EDTA(TBE) Stok Tampon Hazırlanışı:

54gr Tris base (Sigma T 8524) ve 27.5gr borik asit (Sigma B 6768) tartılarak 800ml dH₂O da çözüldü. Üzerine 20ml 0.5M EDTA(pH=8.0) ilave edildi son hacim dH₂O ile 1000ml'ye tamamlandı.

Elektroforezde stok 5X TBE tamponundan 0.5X TBE hazırlanarak kullanıldı.

Yükleme Tamponu(Loading buffer):

Yükleme tamponu olarak %40 süzkroz ve %0.25 bromofenol mavisini karışımı kullanıldı.

Etidyum bromür 10µg/ml'lik stoktan 1µl kullanıldı (cat no:Applichem A1151)

DNA marker :pUC mix (cat no:Fermentas SM0301)

%2'lik Agaroz Jel Hazırlanması:

%2'lik agaroz jel hazırlandıktan sonra 0.5X TBE tamponunu içeren jel tankına (Hoefler) uygun şekilde konuldu.

Jelin üzerine 2-3mm yüksekliğinde olacak şekilde 0.5X TBE tamponunu eklendi.

4µl PCR ürününe 1µl yükleme tamponu eklenerek pipetaj yapıldı.

5µl örnek karışımı kuyulara sırayla yüklendi.

Yükleme işleminden sonra tankın kapağı kapatıldı ve güç kaynağı (ATTA-crosspower 500) 80 Volt 30 miliampere ayarlanıp elektroforez sistemi başlatılarak jelin yürütmesi sağlandı.

2.5.1 PCR Ürünlerinin Kontrolü ve fotoğraflanması

β -actin genine ve *ATP7B* geninin 8, 12, 13, 14 ve 17 nolu ekzonlarına özgü PCR ürünleri yukarıda tanımlanan elektroforez sisteminde yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel ultraviyole ışını (UV) altında incelendi ve fotoğrafı UV transillüminatör düzeneğinde 'EAGLE EYE' çekildi.

β -actin PCR reaksiyonu sonucu 318 bp'lik ürün elde edilmesi beklendi.

8.ekzon PCR reaksiyonu sonucu 365 bp'lik ürün elde edilmesi beklendi.

12.ekzon PCR reaksiyonu sonucu 246 bp'lik ürün elde edilmesi beklendi.

13.ekzon PCR reaksiyonu sonucu 255 bp'lik ürün elde edilmesi beklendi.

14.ekzon PCR reaksiyonu sonucu 337 bp'lik ürün elde edilmesi beklendi.

17.ekzon PCR reaksiyonu sonucu 306 bp'lik ürün elde edilmesi beklendi.

2.6 DNA Dizi Analizi

Her hasta için 50 μ l PCR örneği elde edildi ve dizi analizi için Güney Koredeki Macrogen (www.macrogen.com) firmasına gönderildi. Her örnek için hem ileri primerle hem de geri primerle dizi analizinin yapılması istendi, bu işlem için örnek başına 2 μ l primer (10pmol/ml) PCR örnekleriyle beraber gönderildi. Dizi analizi, ABI 3100 ve 3730xl DNA analizörü kullanılarak gerçekleştirildi.

BÖLÜM 3 :

BULGULAR

3.BULGULAR

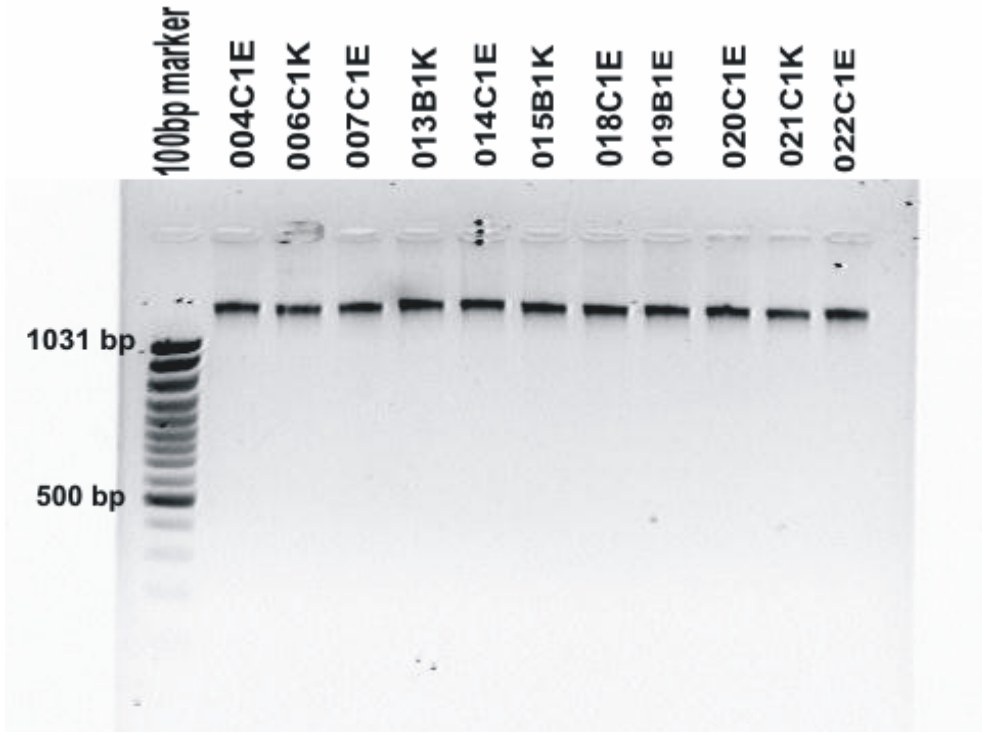
3.1 Wilson Hastalarında *ATP7B* geninin 8, 12,13,14 ve 17 nolu ekzonlarındaki mutasyonların DNA dizi analiziyle taranması ve saptanan mutasyonlar:

3.1.1 Kan Örneklerinden DNA Eldesi:

Kan örneklerinden elde edilen DNA'ların saflığı spektrofotometrede OD 260/280 nm dalga boyunda verdikleri optik dansiteler oranlanarak saflık kontrolü yapıldı (tablo3.1). DNA'ların bütünlüğünü saptamak için DNA örnekleri %1'lik agaroz jelde yürütüldü (Şekil 3.1). Spektrofotometredeki 260/280nm optik dansite oranı 1.8 ve üzerinde olan, jelde tek bant görünümü veren DNA örnekleri PCR'da kalıp olarak kullanıldı.

Tablo 3.1: Şekil 3.1'deki DNA'ların OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranları ve hesaplanan konsantrasyonları

| Hasta numarası | Konsantrasyon | OD260/OD280 |
|----------------|---------------|-------------|
| 004C1E | 321.25 µg/ml | 1.8 |
| 006C1K | 557.5 µg/ml | 1.9 |
| 007C1E | 282.5 µg/ml | 1.8 |
| 013B1K | 266.25 µg/ml | 1.9 |
| 014C1E | 390.00 µg/ml | 1.8 |
| 015B1K | 275.00 µg/ml | 1.9 |
| 018C1E | 271.25 µg/ml | 1.7 |
| 019B1E | 753.75 µg/ml | 1.9 |
| 020C1E | 298.00 µg/ml | 1.8 |
| 021C1K | 467.25 µg/ml | 1.9 |
| 022C1E | 426.75 µg/ml | 1.8 |

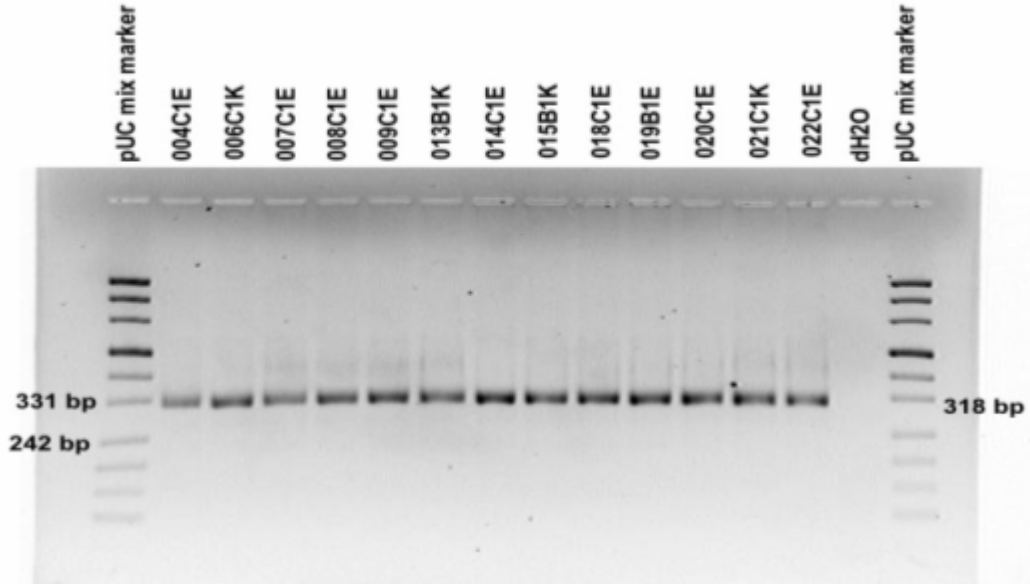


Şekil 3.1 : DNA örneklerinin %1 lik agaroz jeldeki görüntüsü

3.2 PCR ürünlerinin kontrolüne ait bulgular

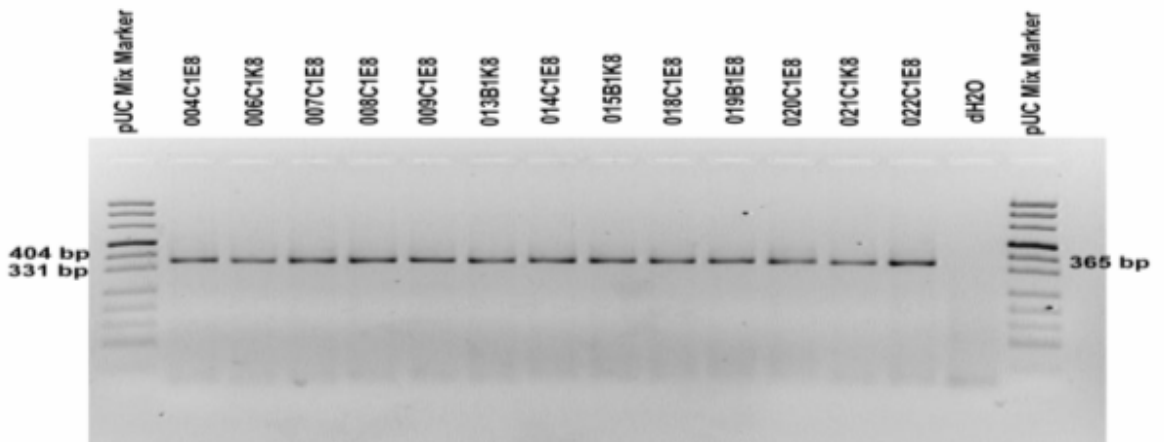
Elde edilen DNA örneklerinin PCR için uygunluğunu saptamak amacıyla internal kontrol olarak β -actin geni seçildi. Bu gene spesifik primerler kullanılarak kurulan PCR ürünleri DNA markerı eşliğinde (pUC mix) %2'lik agaroz jelde yürütüldü (Şekil 3.2). Jelde β -actin PCR ürünlerine ait beklenen yerde ve tek bant görüldü; bu sonuca bağlı olarak aynı DNA'lar kullanılarak, *ATP7B* geninin 8, 12, 13, 14 ve 17 nolu ekzonlarının PCR ile çoğaltılması işlemine geçildi. Elde edilen PCR ürünleri, %2'lik agaroz jelde DNA markerı eşliğinde yürütüldü (Şekil 3.3-3.7).

β -ACTİN PCR SONUÇLARI



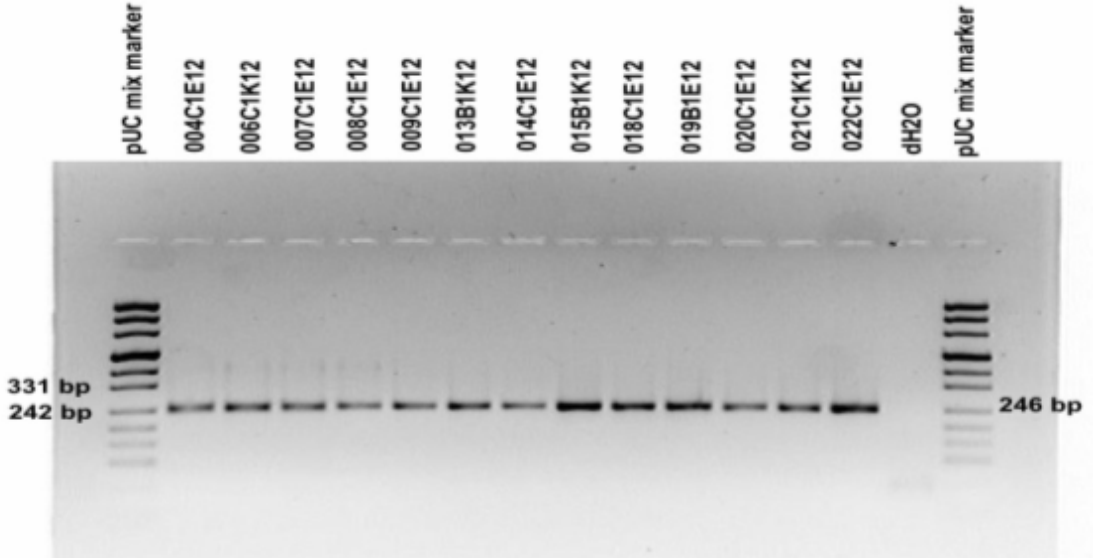
Şekil 3.2.1 : Beta actin (internal kontrol) PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

8.EKZON PCR SONUÇLARI



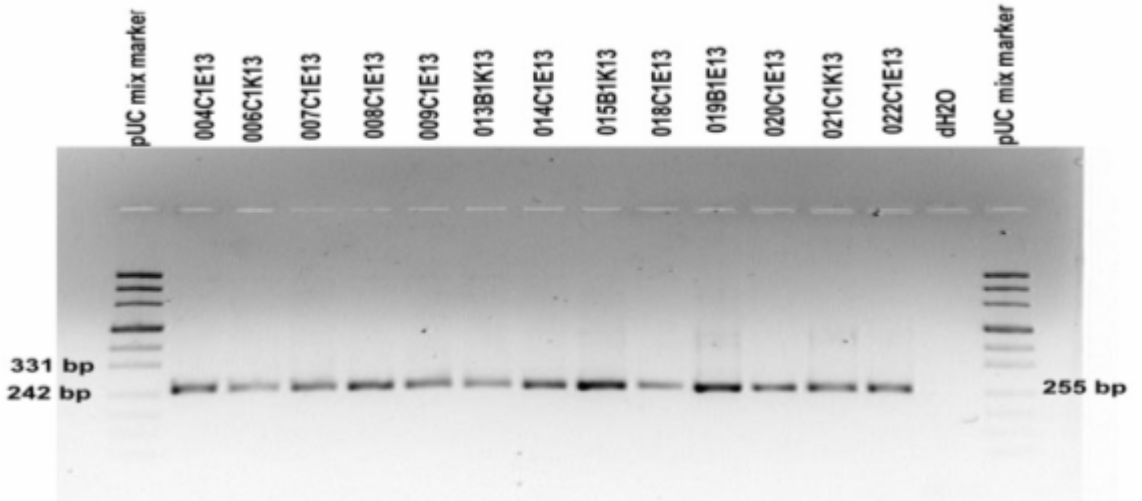
Şekil 3.2.2 : 8. ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

12.EKZON PCR SONUÇLARI



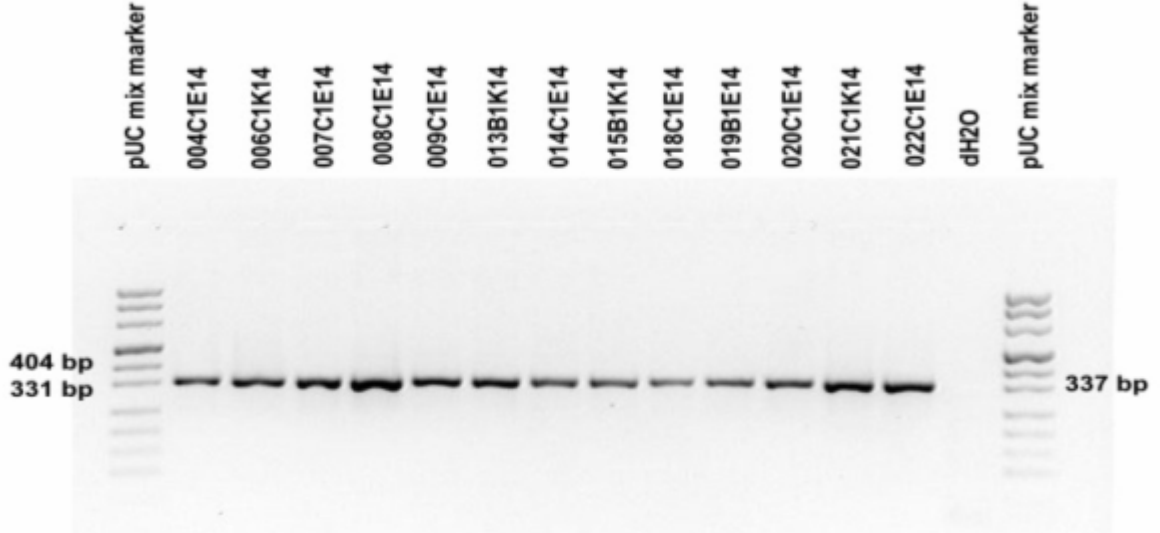
Şekil 3.2.3 : 12. ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

13.EKZON PCR SONUÇLARI



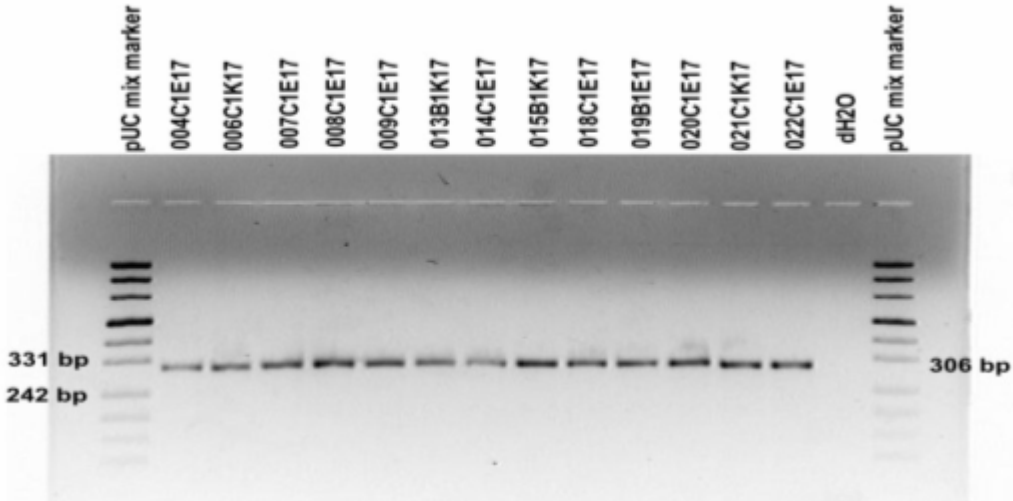
Şekil 3.2.4 : 13 ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

14.EKZON PCR SONUÇLARI



Şekil 3.2.5 : 14. ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

17.EKZON PCR SONUÇLARI



Şekil 3.2.6 : 17. ekzon PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

3.3 *ATP7B* Geninin 8,12,13,14 ve 17 nolu Ekzonlarındaki Mutasyonlar

Jelde, uygun büyüklükte DNA içeren, tek bant gözlenen hastaların ayrılan PCR örnekleri DNA dizi analizi için macrogen firmasına gönderildi. DNA dizisindeki farklılıkları saptamak üzere sonuçlar, *ATP7B* geninin NCBI'da tanımlanan NC000013 dizisi ile karşılaştırıldı. İleri yöndeki primer gönderilerek elde edilen verileri doğrulamak amaçlı geri yöndeki primerle tekrardan dizi analizi yapıldı. Mutasyon saptanan hastaların ilgili ekzon bölgeleri PCR ile yeniden çoğaltıldı, iki yönlü dizi analizi yapılmak üzere macrogen firmasına gönderildi. Böylece elde edilen verilerin doğrulanması sağlandı. Buna ilave olarak ulaşabildiğimiz hastaların anne, baba ve kardeşlerinden gönüllü olarak çalışmaya katılmak isteyenler aynı protokol uygulanarak çalışıldı, sonuçlar hastalarinkiyle ve klinik bulgularla korele olduğundan çalışma sonucunda elde edilen verilerin bir kez daha doğrulanması sağlandı.

Sekans sonuçlarına göre saptanan değişimler, ekzonlara göre Şekil 3.3.1-3.4.1'te belirtilmiştir. Değişikliğin olduğu nükleotid üzerine ok konarak işaretlenmiştir. Saptanan değişimi iki kromozomda da taşıyan homozigot hastaların değişen nükleotidi ok ile işaretlenip normal dizide bulunması gereken nükleotid ok'un üzerine yazılmıştır. Değişimi heterozigot olarak taşıyan hastaların değişen nükleotidi ok ile üzerinden işaretlenerek belirtilmiştir. Delesyon (nükleotid eksilmesi) taşıyan hastalarda, delesyonun olduğu bölge ok ile işaretlenip üzerine delesyona uğrayan nükleotid 'delN' şeklinde yazılırken; insersiyon(nükleotid eklenmesi) taşıyan hastalarda, insersiyonun olduğu bölge ok ile işaretlenip üzerine eklenen nükleotid 'ins N' şeklinde yazılmıştır.

Çalışmamızda 8.ekzonda gözlenen mutasyonlardan;

2298-2299insC, WH tanılı 2 kardeşte heterozigot olarak gözlenmiştir. Toplam hastaların %7.7'si 2298-2299insC mutasyonunu taşımaktadır.

G710S, WH tanılı 1 hastada homozigotken hastanın annesi heterozigottur. Hastaların %3.8'i G710S mutasyonunu taşımaktadır.

R778W, WH tanılı 1 hastada heterozigot olarak taşınırken hastanın annesi normal, babası heterozigottur. Hastaların %3.8'i R778W mutasyonunu taşımaktadır.

R778G, 1 hastada heterozigot olarak bulunmuştur. Hastaların %3.8'i R778G mutasyonunu taşımaktadır.

Çalışmamızda, 12.ekzonda L936X mutasyonu WH tanılı 1 hastada homozigot olarak saptanırken anne ve babasının heterozigot olduğu saptanmıştır. Hastaların %3.8'i L936X mutasyonunu taşımaktadır.

Çalışmamızda 13.ekzonda gözlenen mutasyonlardan;

R969Q mutasyonu WH tanılı 1 hastamızda homozigot olarak saptanmıştır. Hastaların %3.8'i R969Q mutasyonunu taşımaktadır.

A1003V mutasyonu WH tanılı 1 hastamızda heterozigot olarak saptanmıştır. Hastaların %3.8'i A1003V mutasyonunu taşımaktadır.

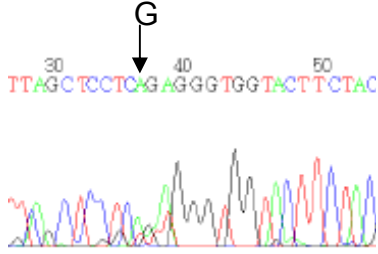
Çalışmamızda 14.ekzonda gözlenen mutasyonlardan,

H1069Q mutasyonu, WH tanılı 8 hastanın 3'ünde homozigotken, 5'inde heterozigot olarak taşımaktadır. Mutasyonu homozigot olarak taşıyan hastalardan 1'nin tanılı olmayan kardeşi heterozigottur, heterozigot olan 1 hastanın anne ve babası da heterozigottur. Hastalarımızın %30.7'si H1069Q mutasyonunu taşımaktadır.

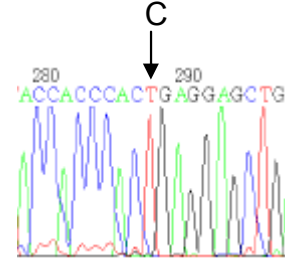
Bunlara ilave olarak; 8.ekzonda gözlenen 2145C → T değişimi (1 hasta heterozigot), 14.ekzondaki 3108delC değişimi (1 hasta heterozigot, babası normal annesi heterozigot) ve 17. ekzondaki 3620A → G değişimi (2 kardeş hasta heterozigot, tanılı olmayan 2 kardeş ve anneleri heterozigot, babaları normal) literatürde tanımlı olmayan mutasyonlardır.

Şekil 3.3.1: 8.Ekzonda mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları:

004C1E nolu hastada G710S mutasyonu homozigot olarak saptandı.

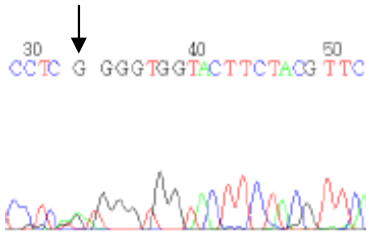


Şekil 3.3.1.1
(F)004C1E

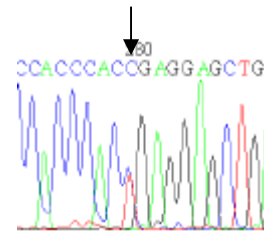


Şekil 3.3.1.2
(R)004C1E

004C1E nolu hastanın annesi 004E1K G710S mutasyonunu heterozigot olarak taşımaktadır. Hastanın babası ex olduğu için çalışmaya dahil edilemedi.

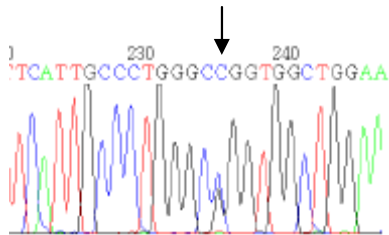


Şekil 3.3.1.3
(F)004E1K

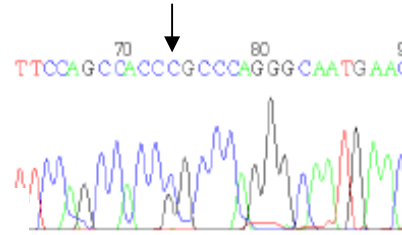


Şekil 3.3.1.4
(R) 004E1K

018C1E nolu hasta R778G mutasyonunu heterozigot olarak taşımaktadır.

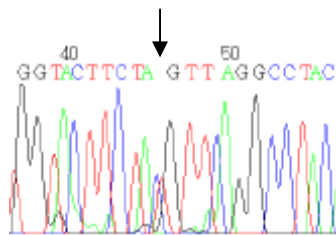


Şekil 3.3.1.5
(F)018C1E

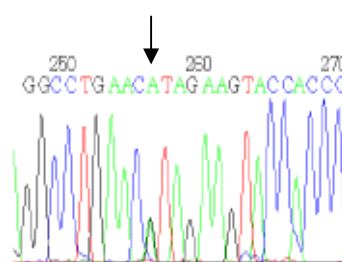


Şekil 3.3.1.6
(R)018C1E

019B1E nolu hasta 2145C→T mutasyonunu heterozigot olarak taşımaktadır.

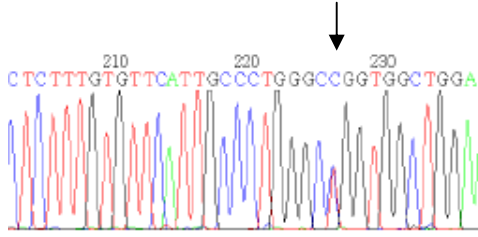


Şekil 3.3.1.7
(F)019B1E

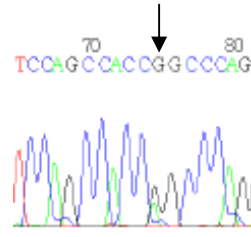


Şekil 3.3.1.8
(R)019B1E

020C1E nolu hasta R778W mutasyonunu heterozigot olarak taşımaktadır.

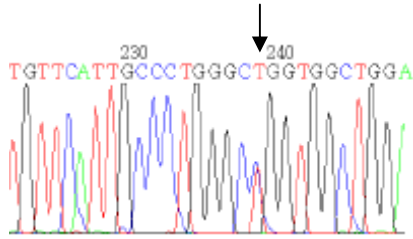


Şekil 3.3.1.9
(F)020C1E

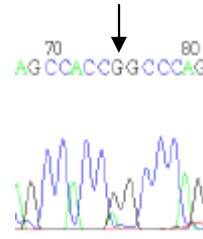


Şekil 3.3.1.10
(R)020C1E

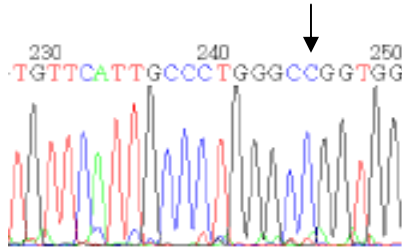
020C1E nolu hastanın babası 020E1E, R778W mutasyonunu heterozigot olarak taşımaktadır. Hastanın annesi 020E1K, bu mutasyon açısından normaldir.



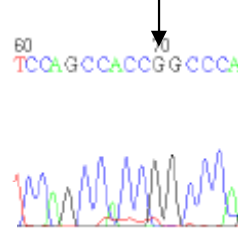
Şekil 3.3.1.11
(F)020E1E



Şekil 3.3.1.12
(R)020E1E

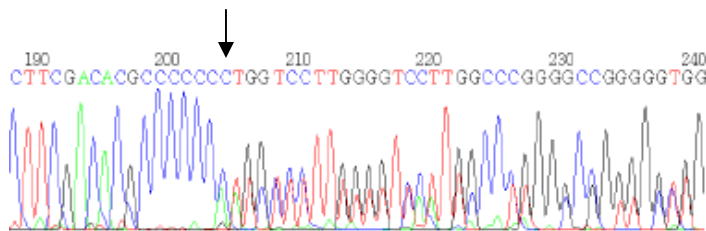


Şekil 3.3.1.13
(F)020E1K

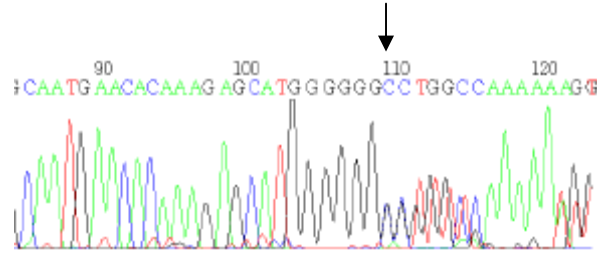


Şekil 3.3.1.14
(R)020E1K

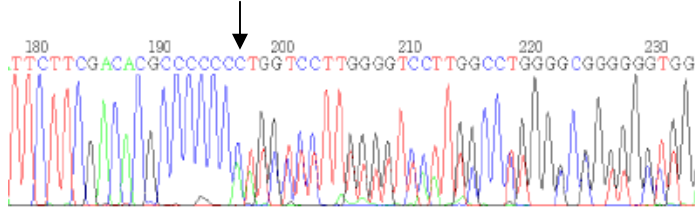
022C1E nolu hasta 2298-2299insC mutasyonunu heterozigot olarak taşımaktadır, hastanın kardeşi 022C2E de 2298-2299insC mutasyonunu heterozigot olarak taşımaktadır.



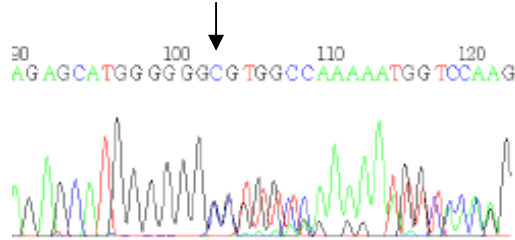
Şekil 3.3.1.15
(F)022C1E



Şekil3.3.1.16
(R)022C1E



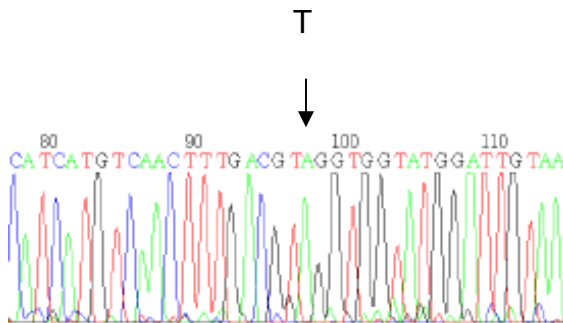
Şekil3.3.1.17
(F)022C2E



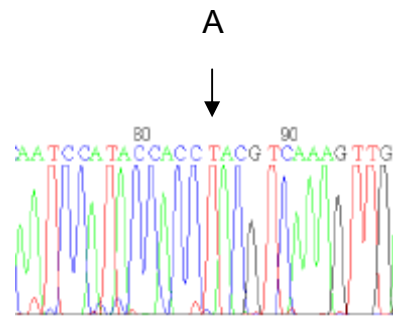
Şekil3.3.1.18
(R)022C2E

Şekil 3.3.2 :12.Ekzonda mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları:

007C1E nolu hastada L936X mutasyonu homozigot olarak saptanmıştır.

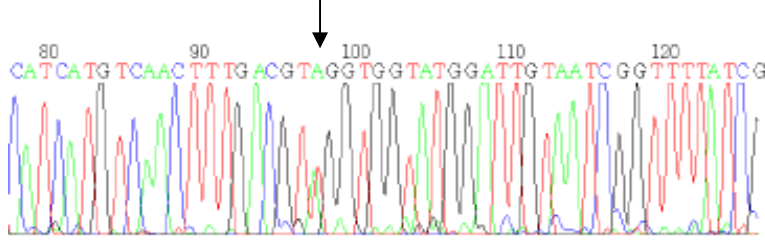


Şekil 3.3.2.1
(F)007C1E

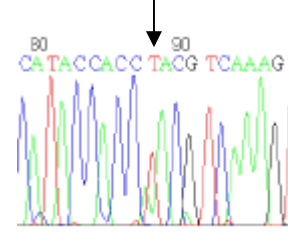


Şekil 3.3.2.2
(R)007C1E

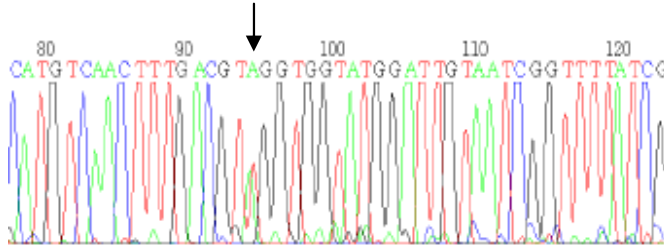
007C1E nolu hastanın annesi 007E1K ve babası 007E1E L936X mutasyonunu heterozigot olarak taşımaktadırlar.



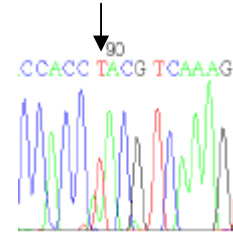
Şekil 3.3.2.3
(F)007E1K



Şekil 3.3.2.4
(R)007E1K



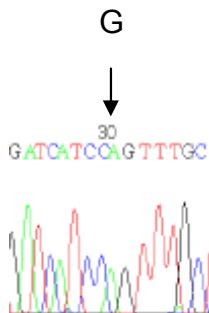
Şekil 3.3.2.5
(F)007E1E



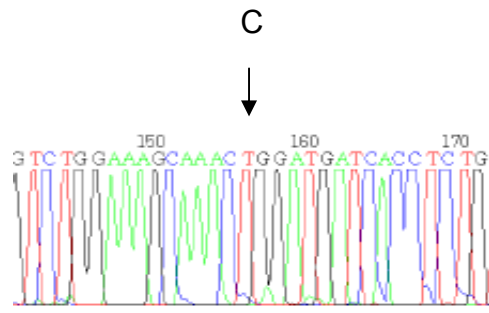
Şekil 3.3.2.6
(R)007E1E

Şekil 3.3.3 :13.Ekzonda mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları:

021C1K nolu hastada R969Q mutasyonu homozigot olarak saptanmıştır.

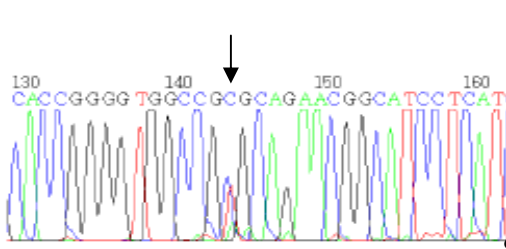


Şekil 3.3.3.1
(F)021C1K

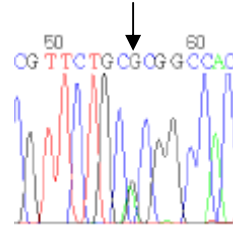


Şekil 3.3.3.2
(R)021C1K

015B1K nolu hastada A1003V mutasyonu heterozigot olarak taşınmaktadır.



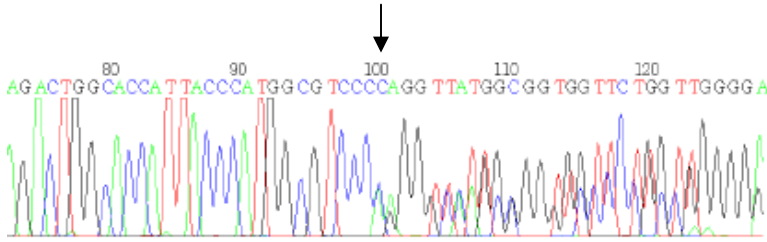
Şekil 3.3.3.3
(F)015B1K



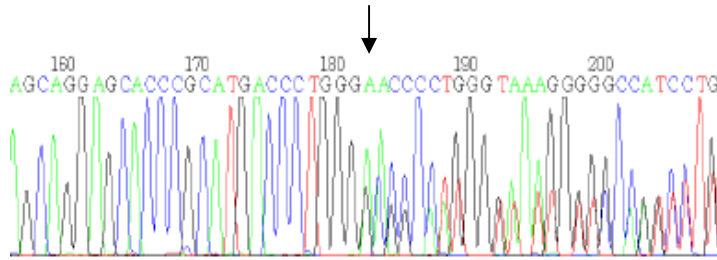
Şekil 3.3.3.4
(R)015B1K

Şekil 3.3.4:14.Ekzonda mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları:

020C1E nolu hastada 3108delC mutasyonu heterozigot olarak saptanmıştır.

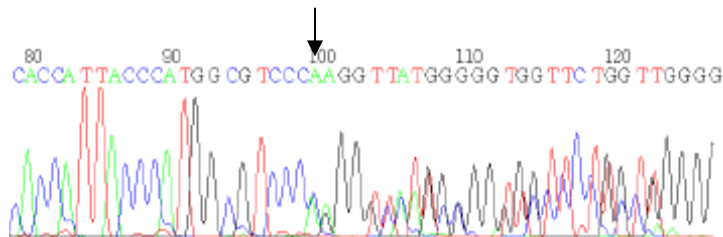


Şekil 3.3.4.1
(F)020C1E

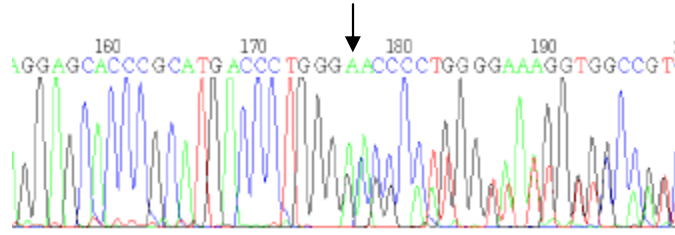


Şekil 3.3.4.2
(R)020C1E

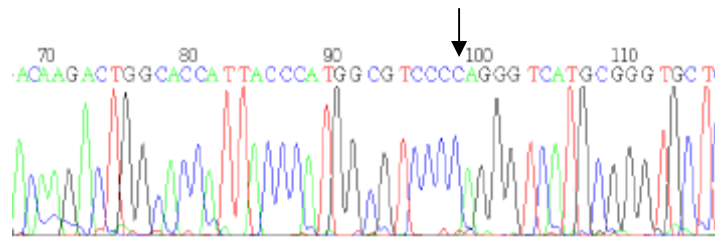
020C1E nolu hastanın annesi 020E1K mutasyonu heterozigot olarak taşıırken babası 020E1E bu değişim açısından normaldir.



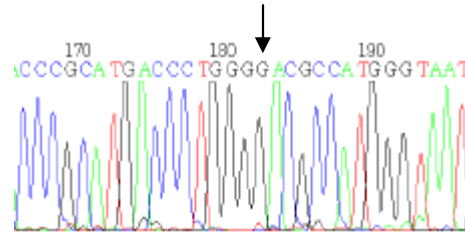
Şekil 3.3.4.3
(F)020E1K



Şekil 3.3.4.4
(R)020E1K

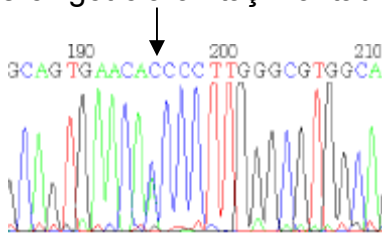


Şekil 3.3.4.5
(F)020E1E

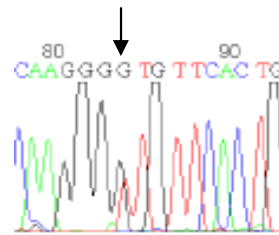


Şekil 3.3.4.6
(R)020E1E

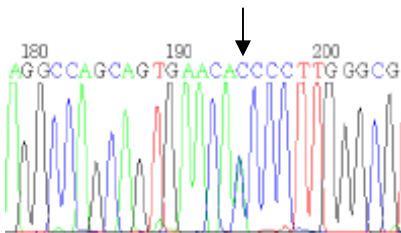
006C1K ve 006C2E nolu kardeş hastaların ikisinde H1069Q mutasyonunu heterozigot olarak taşımaktadır.



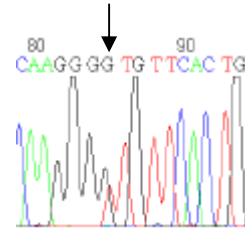
Şekil 3.3.4.7
(F)006C1K



Şekil 3.3.4.8
(R)006C1K

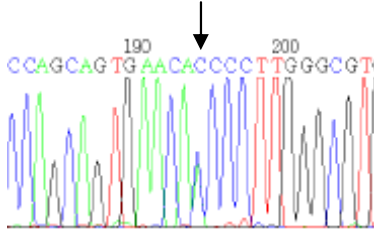


Şekil 3.3.4.9
(F)006C2E

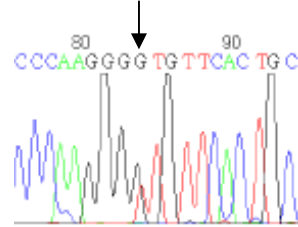


Şekil 3.3.4.10
(R)006C2E

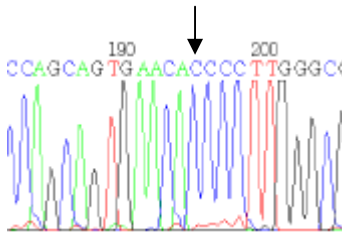
006C1K ve 006C2E nolu kardeş hastaların annesi 006E1K H1069Q mutasyonunu heterozigot olarak taşıırken, hastaların babası 006E1E mutasyonu taşımamaktadır.



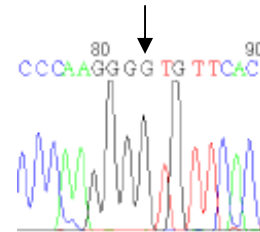
Şekil 3.3.4.11
(F)006E1K



Şekil 3.3.4.12
(R)006E1K

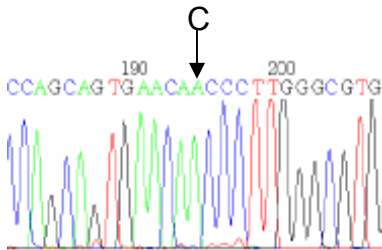


Şekil 3.3.4.13
(F)006E1E

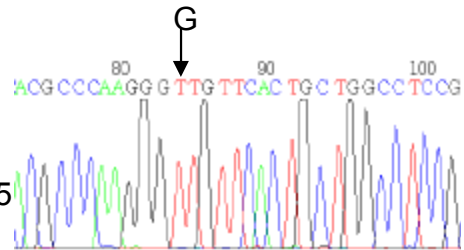


Şekil 3.3.4.14
(R)006E1E

013B1K nolu hastada H1069Q mutasyonu homozigot olarak saptanmıştır.

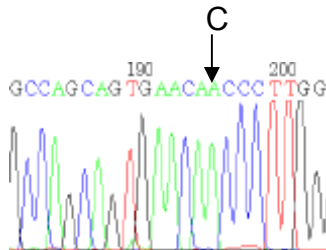


Şekil 3.3.4.15
(F)013B1K

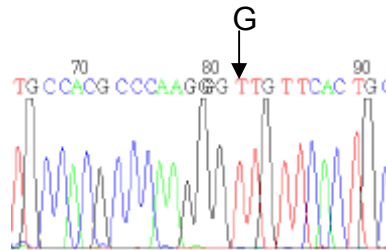


Şekil 3.3.4.16
(R)013B1K

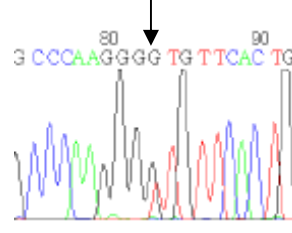
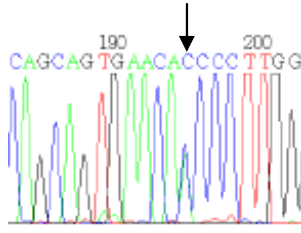
014C1E nolu hastada H1069Q mutasyonu homozigot olarak saptanırken, hastanın WH tanılı olmayan kardeşinde 014C2E, H1069Q mutasyonu heterozigot olarak saptanmıştır.



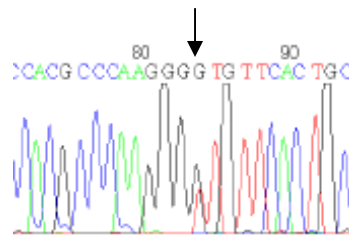
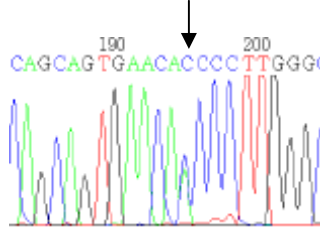
Şekil 3.3.4.17
(F)014C1E



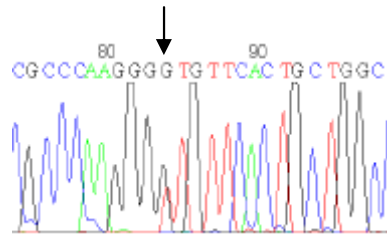
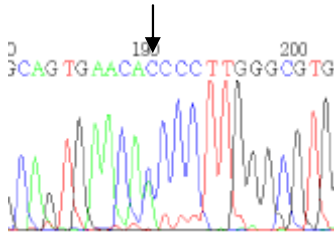
Şekil 3.3.4.18
(R)014C1E



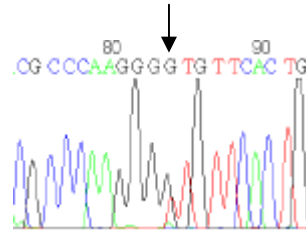
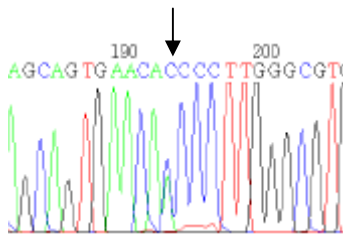
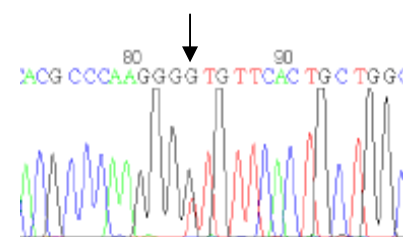
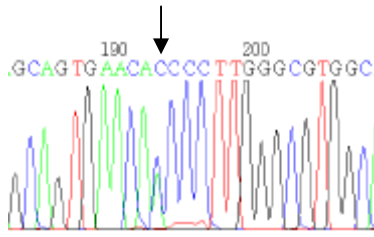
018C1E nolu hastada H1069Q mutasyonu heterozigot olarak saptanmıştır.



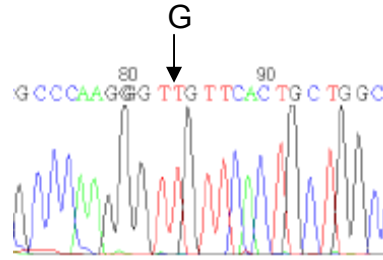
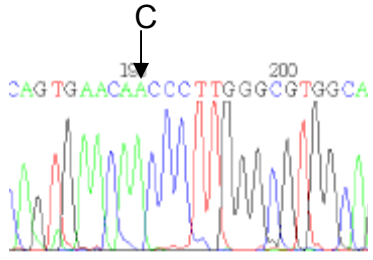
019B1E nolu hastada H1069Q mutasyonu heterozigot olarak saptanmıştır.



022C1E ve 022C2E kardeş hastaların ikisinde H1069Q mutasyonunu heterozigot olarak taşımaktadır.

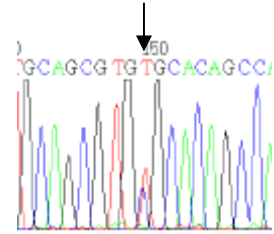
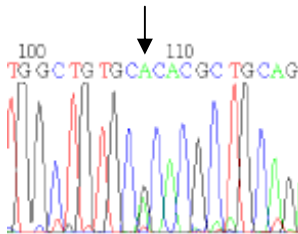
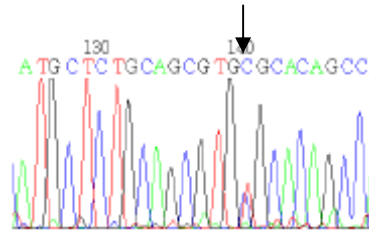
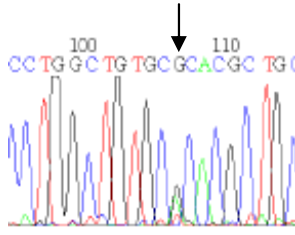
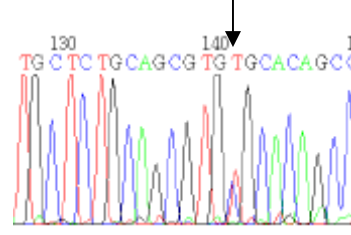
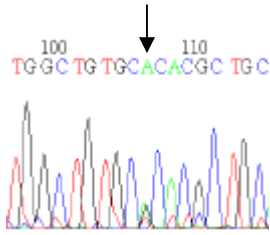


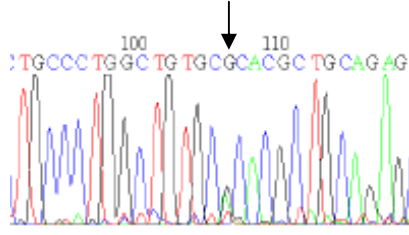
024B1E nolu hastada H1069Q mutasyonu homozigot olarak saptanmıştır.



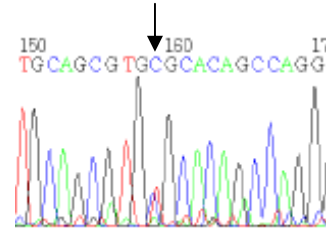
Şekil 3.3.5 17.Ekzonda mutasyon saptanan hastaların sekans sonuçları:

008C1E ve 008C2E nolu kardeş hastalarda 3620A→G mutasyonu heterozigot olarak saptanmıştır. Hastaların yaşları küçük olması nedeniyle klinik incelemeleri yapılamayan iki kardeşlerinde 008C3K ve 008C4E 3620A→G mutasyonu heterozigot olarak saptanmıştır. Hastaların annesinde 008E1K 3620A→G mutasyonu heterozigot olarak saptarken, hastaların babası 008E1E bu değişim bakımından normaldir.

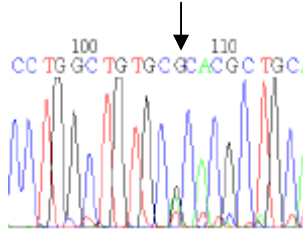




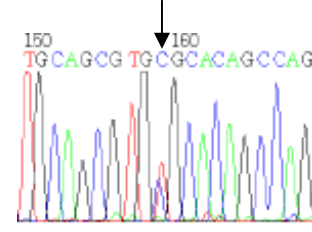
Şekil 3.3.5.7
(F) 008C4E



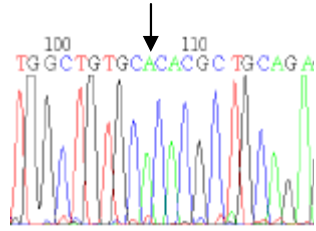
Şekil 3.3.5.8
(R) 008C4E



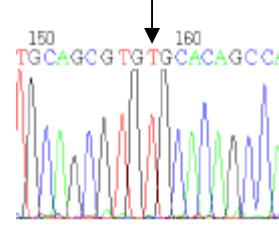
Şekil 3.3.5.9
(F) 008E1K



Şekil 3.3.5.10
(R) 008E1K



Şekil 3.3.5.11
(F) 008E1E



Şekil 3.3.5.12
(R) 008E1E

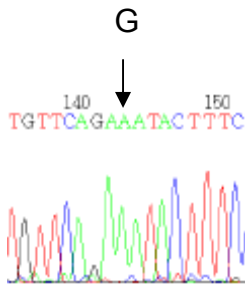
DNA Dizi Analiziyle Saptanan SNP Sonuçları:

12.ekzondaki K952R değişimi, 16 hastada homozigot (%61.5), 7 hastada heterozigot (%26.9) 'tur.

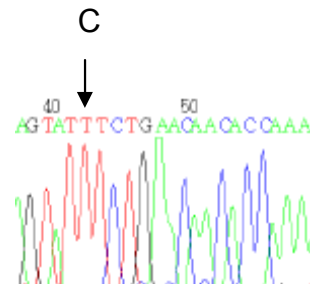
13.ekzondaki T991T değişimi, 2 hastada heterozigot (%7.69)'tur. A1003A değişimi, 1 hastada homozigot (%3.84), 2 hastada heterozigot (%7.69)'tur. L1015L değişimi, 1 hastada homozigot (%3.84), 1 hastada da heterozigottur (%3.84)'tur.

Şekil 3.4.1:12.ekzonda saptanan SNP sonuçları

K952R değişimi 001B1K nolu hastada homozigottur.

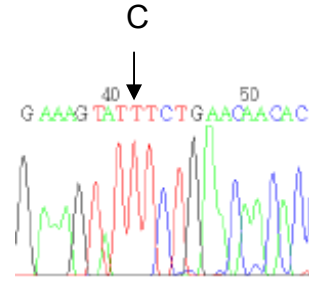
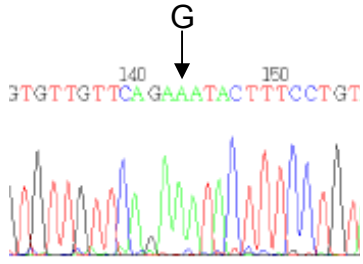


Şekil 3.4.1.1
(F)001B1K

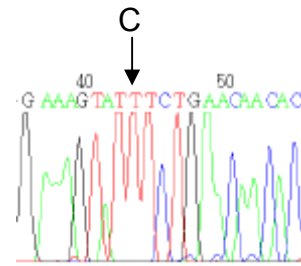
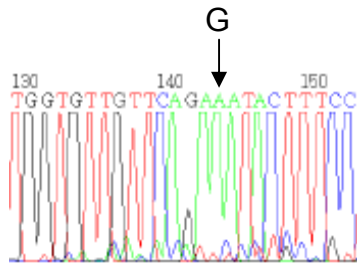


Şekil 3.4.1.2
(R)001B1K

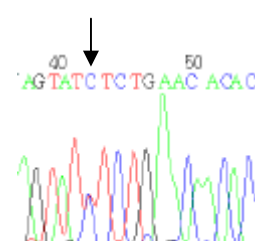
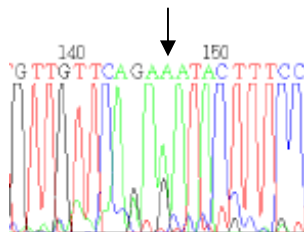
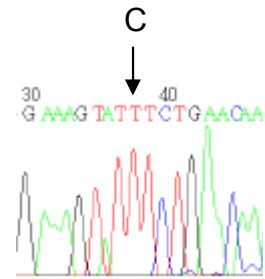
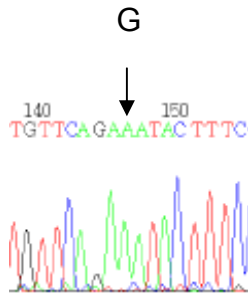
K952R değişimi 002C1K nolu hastada homozigottur.



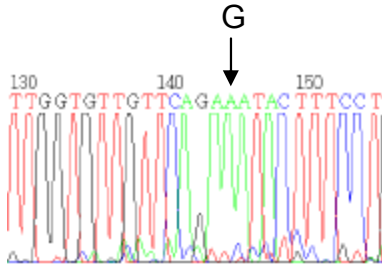
K952R değişimi 003C1K nolu hastada homozigottur.



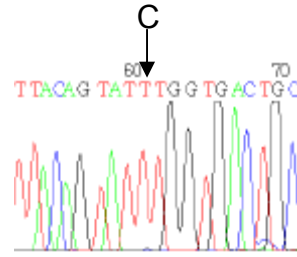
K952R değişimi 004C1E nolu hastada homozigottur. Hastanın annesi 004E1K ise heterozigottur.



K952R değişimi 005C1E nolu hastada homozigottur.

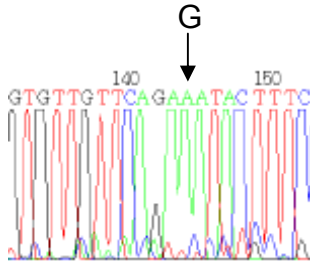


şekil 3.4.1.11
(F)005C1E

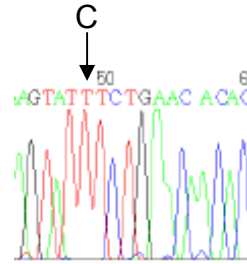


şekil 3.4.1.12
(R)005C1E

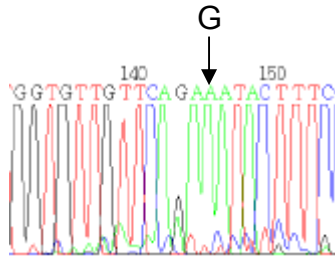
K952R değişimi 006C1K, 006C2E nolu hastalarda homozigottur, hastaların annesi 006E1K ve babası 006E1E homozigottur.



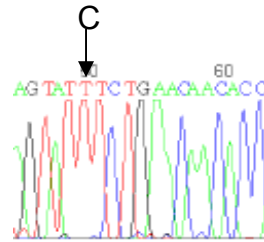
şekil 3.4.1.13
(F)006C1E



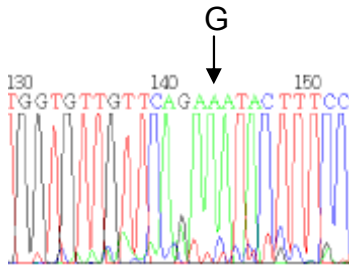
şekil 3.4.1.14
(R)006C1E



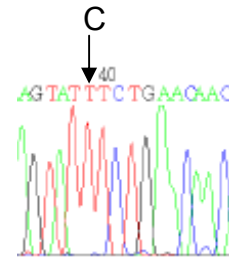
şekil 3.4.1.15
(F)006C2E



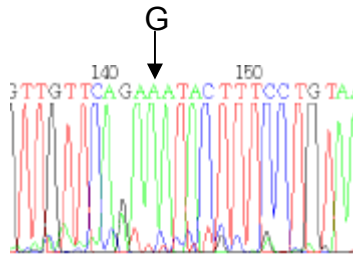
şekil 3.4.1.16
(R)006C2E



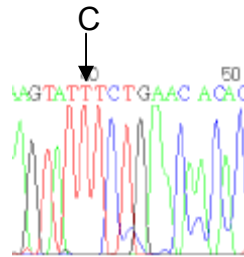
şekil 3.4.1.17
(F)006E1E



şekil 3.4.1.18
(R)006E1E

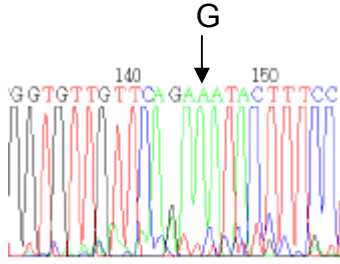


şekil 3.4.1.19
(F)006E1K

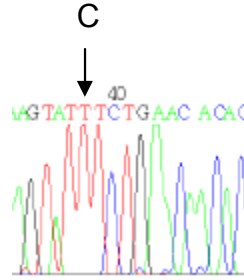


şekil 3.4.1.20
(R)006E1K

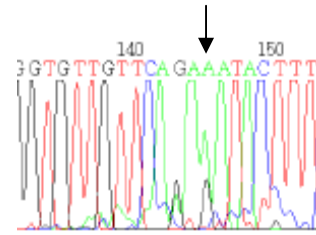
K952R değişimi 007C1E nolu hastada ve hastanın babasında 007E1E homozigot iken hastanın annesinde 007E1K heterozigottur.



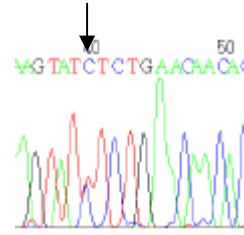
şekil 3.4.1.21
(F)007C1E



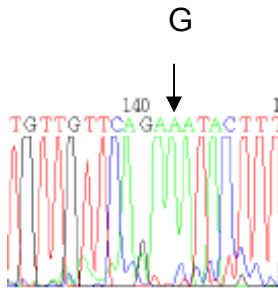
şekil 3.4.1.22
(R)007C1E



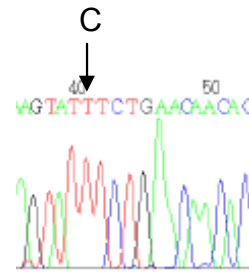
şekil 3.4.1.23
(F)007E1K



şekil 3.4.1.24
(R)007E1K

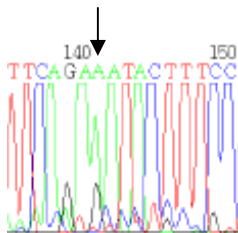


şekil 3.4.1.25
(F)007E1E

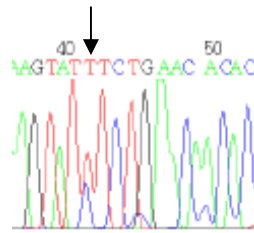


şekil 3.4.1.26
(R)007E1E

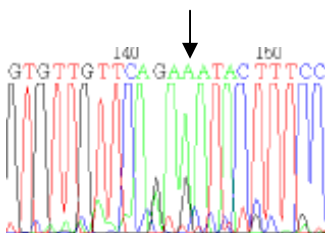
K952R değişimi 008C1E, 008C2E, 008C3K, 008C4E heterozigotken ve anneleri 008E1K homozigottur, babaları 008E1E bu değişim bakımından normaldir.



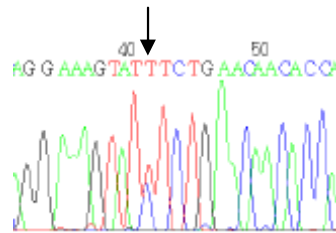
şekil 3.4.1.27
(F)008C1E



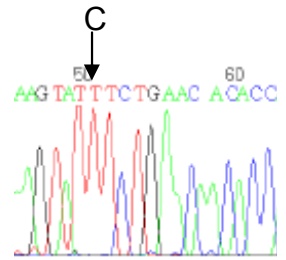
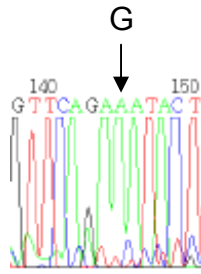
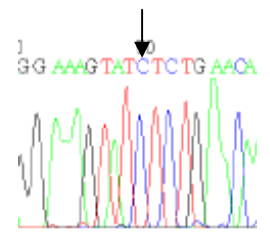
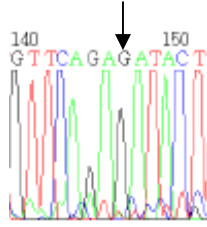
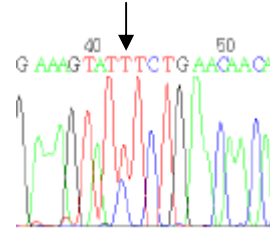
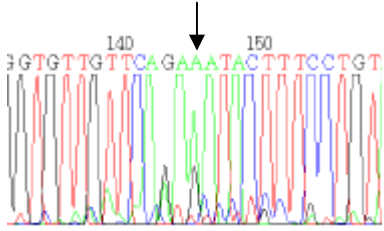
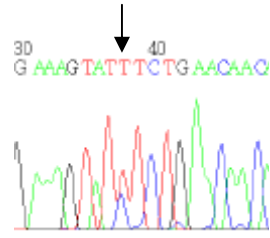
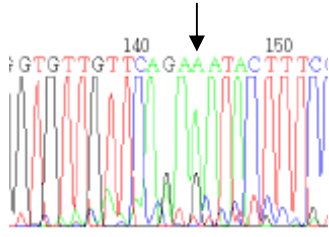
şekil 3.4.1.28
(R)008C1E



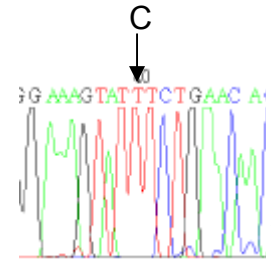
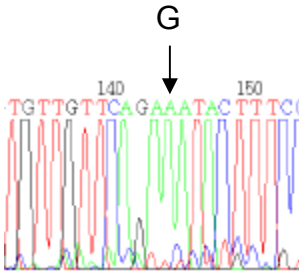
şekil 3.4.1.29
(F)008C2E



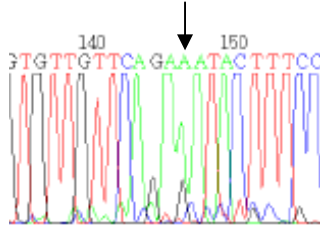
şekil 3.4.1.30
(R)008C2E



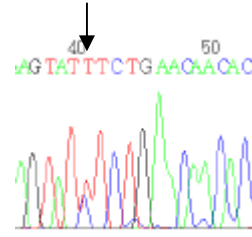
K952R değişimi 010C1K nolu hastada homozigottur.



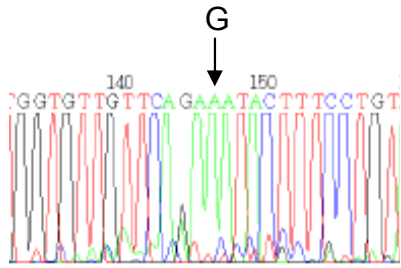
K952R değişimi 011C1K nolu hastada ve annesinde 011E1K heterozigotken, babasında 011E1E homozigottur.



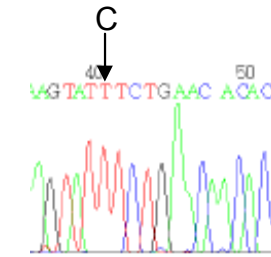
şekil 3.4.1.41
(F)011C1K



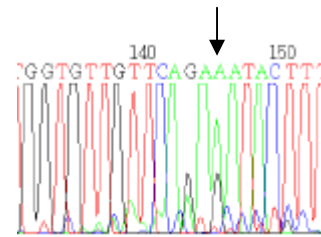
şekil 3.4.1.42
(R)011C1K



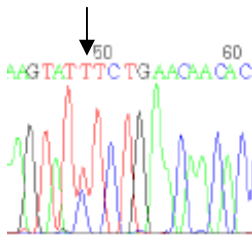
şekil 3.4.1.43
(F)011E1E



şekil 3.4.1.44
(R)011E1E

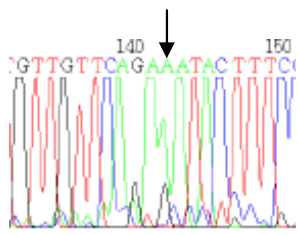


şekil 3.4.1.45
(F)011E1K

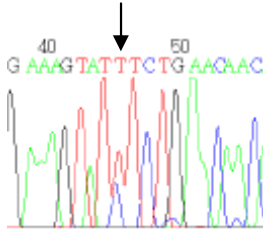


şekil 3.4.1.46
(R)011E1K

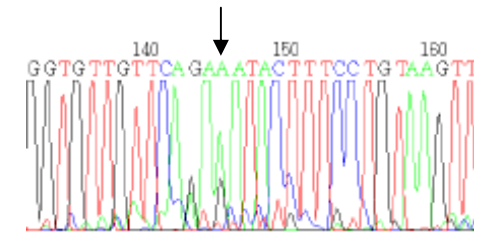
K952R değişimi 012C1K nolu hastada heterozigottur hastanın tanılı olmayan kardeşi 012C2K, annesi 012E1K ve babası 012E1E heterozigottur.



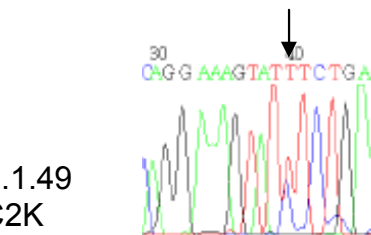
şekil 3.4.1.47
(F)012C1K



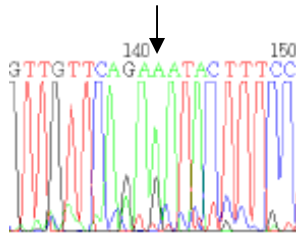
şekil 3.4.1.48
(R)012C1K



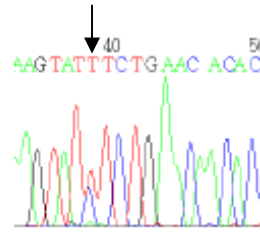
şekil 3.4.1.49
(F)012C2K



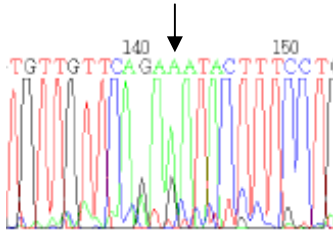
şekil 3.4.1.50
(R)012C2K



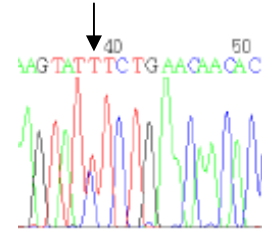
Şekil 3.4.1.51
(F)012E1E



Şekil 3.4.1.52
(R)012E1E

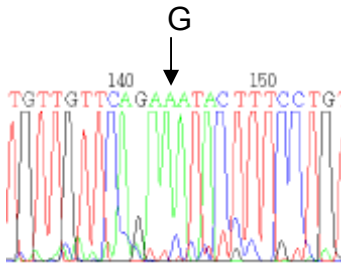


Şekil 3.4.1.53
(F)012E1K

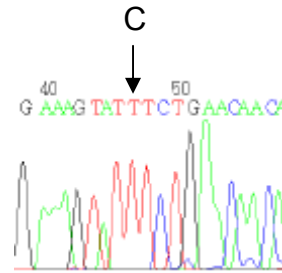


Şekil 3.4.1.54
(R)012E1K

K952R değişimi 013B1K nolu hastada homozigottur.

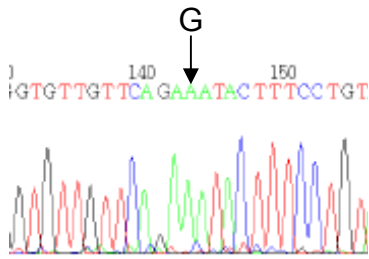


Şekil 3.4.1.55
(F)013B1K

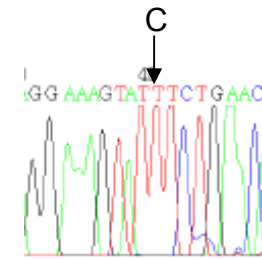


Şekil 3.4.1.56
(R)013B1K

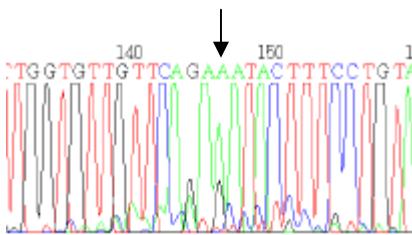
K952R değişimi 014C1E nolu hastada homozigottur. Hastanın tanıli olmayan kardeşi 014C2E heterozigottur.



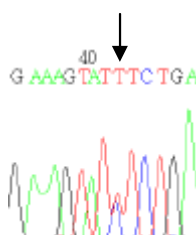
Şekil 3.4.1.57
(F)014C1E



Şekil 3.4.1.58
(R)014C1E

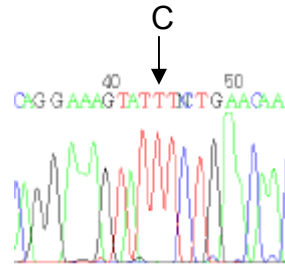
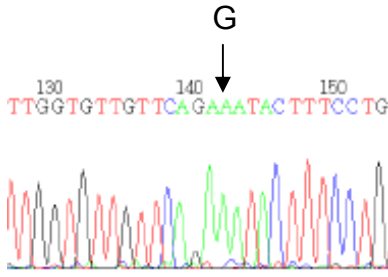


Şekil 3.4.1.59
(F)014C2E

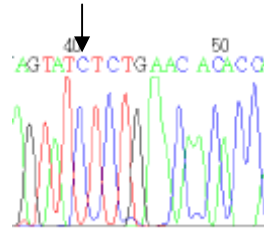
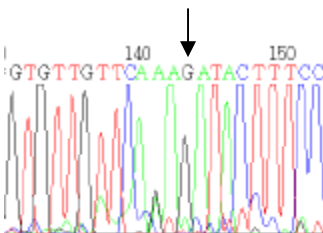
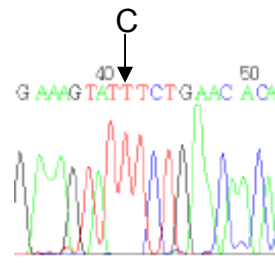
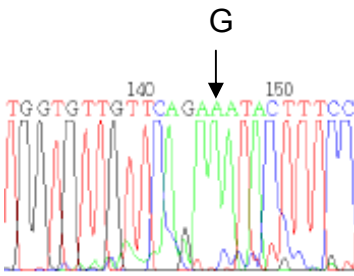
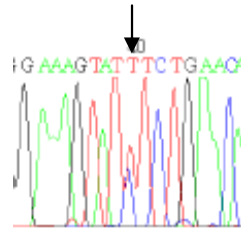
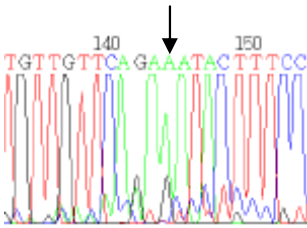
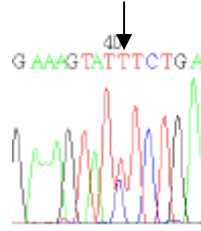
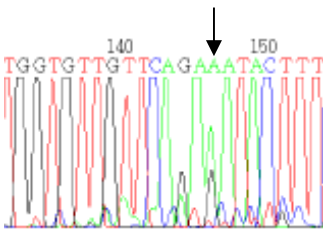


Şekil 3.4.1.60
(R)014C2E

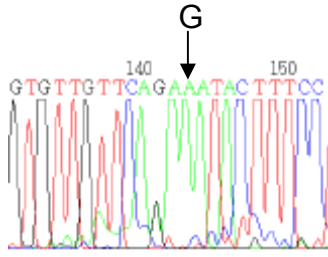
K952R değişimi 015B1K nolu hastada homozigottur.



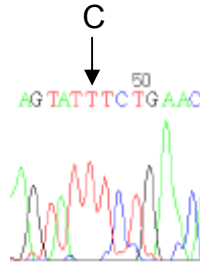
K952R değişimi 016C1E ve 016C2E nolu hastalarda heterozigotken, babaları 016E1E homozigottur. Anneleri ise bu değişim bakımından normaldir.



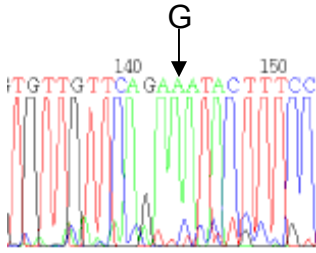
K952R değişimi 017C1E ve 017C2E nolu hastalarda homozigottur.



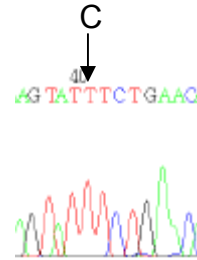
şekil 3.4.1.71
(F)017C1E



şekil 3.4.1.72
(R)017C1E

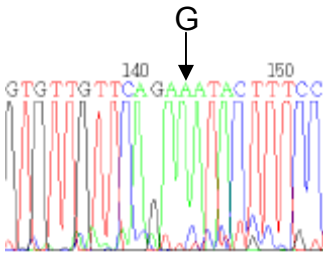


şekil 3.4.1.73
(F)017C2E

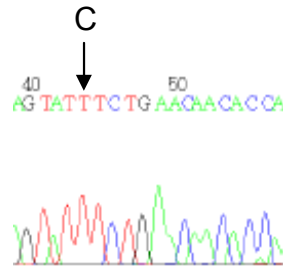


şekil 3.4.1.74
(R)017C2E

K952R değişimi 018C1E nolu hastada homozigottur.

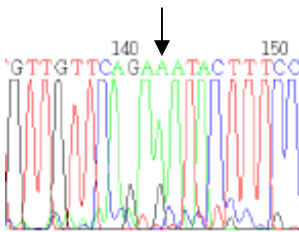


şekil 3.4.1.75
(F)018C1E

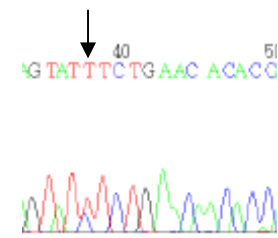


şekil 3.4.1.76
(R)018C1E

K952R değişimi 019B1E nolu hastada heterozigottur.

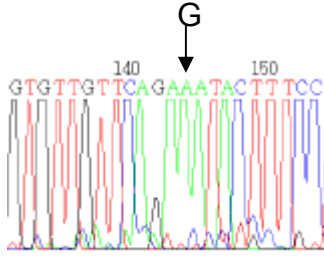


şekil 3.4.1.77
(F)019B1E

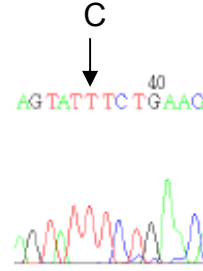


şekil 3.4.1.78
(R)019B1E

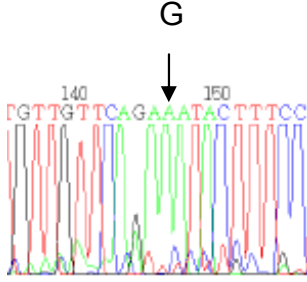
K952R değişimi 022C1E ve 022C2E nolu hastalardada homozigottur.



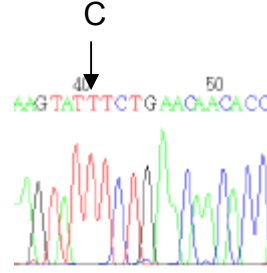
şekil 3.4.1.79
(F)022C1E



şekil 3.4.1.80
(R)022C1E

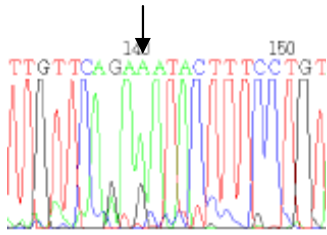


şekil 3.4.1.81
(F)022C2E

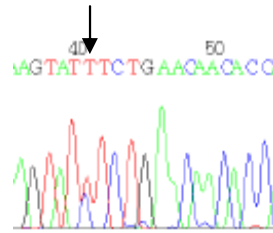


şekil 3.4.1.82
(R)022C2E

K952R değişimi 023B1E nolu hastada heterozigottur.

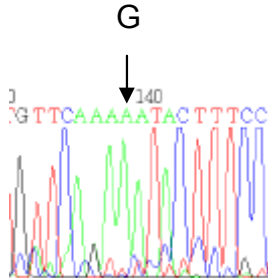


şekil 3.4.1.83
(F)023B1E

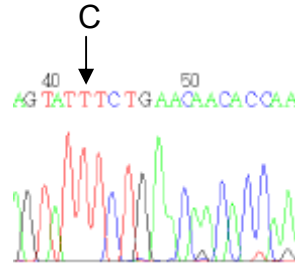


şekil 3.4.1.84
(R)023B1E

K952R değişimi 024B1E nolu hastada homozigottur.

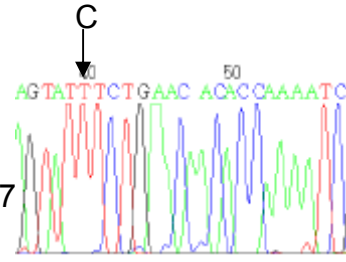
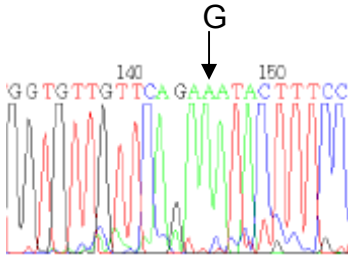


şekil 3.4.1.85
(F)024B1E

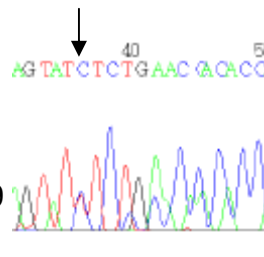
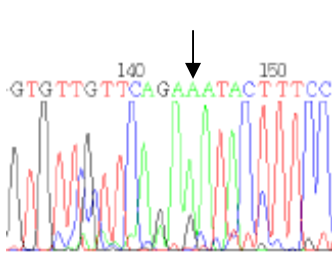


şekil 3.4.1.86
(R)024B1E

K952R değişimi 025B1K nolu hastada homozigottur.

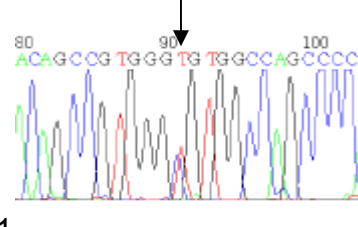
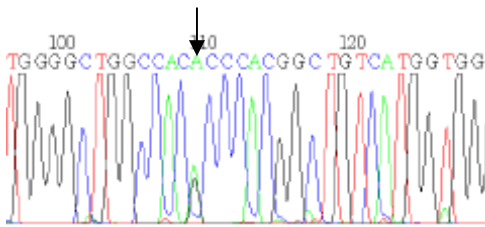


K952R değişimi 026C1K nolu hastada heterozigottur.

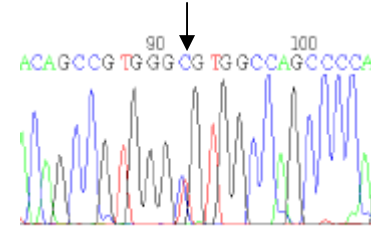
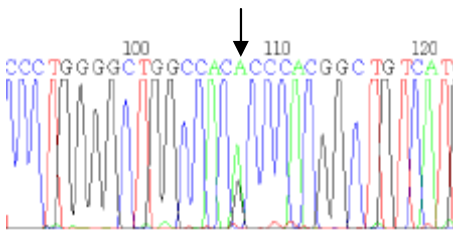


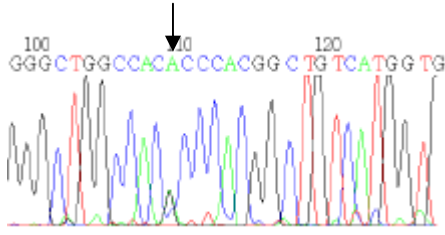
Şekil 3.4.2: 13.ekzonda saptanan SNP sonuçları

T991T değişimi 014C2E nolu tanıli olmayan kardeşte heterozigottur.

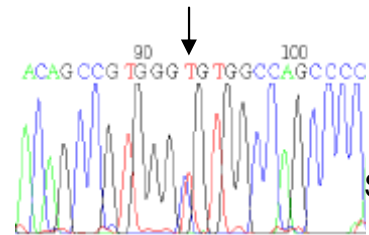


T991T değişimi 020C1E nolu hastada ve babasında 020E1E heterozigotken, annesi 020E1K bu değişim bakımından normaldir.

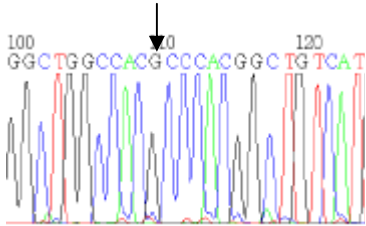




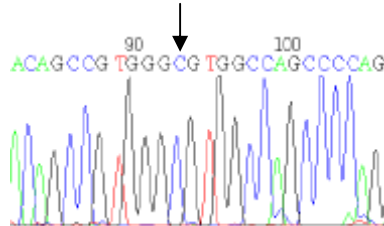
Şekil 3.4.2.5
(F)020E1E



Şekil 3.4.2.6
(R)020E1E

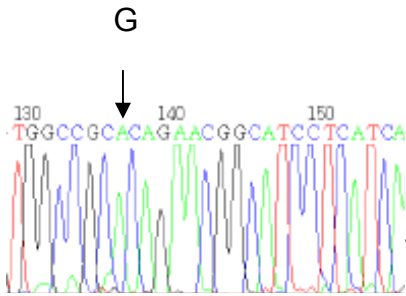


Şekil 3.4.2.7
(F)020E1K

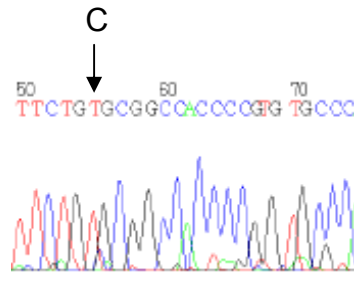


Şekil 3.4.2.8
(R)020E1K

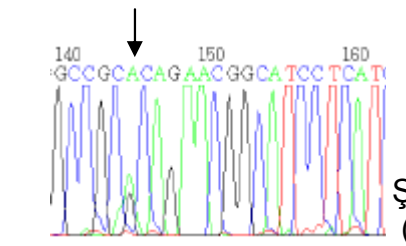
A1003A değişimi 004C1E nolu hastada homozigot iken annesi 004E1K heterozigottur.



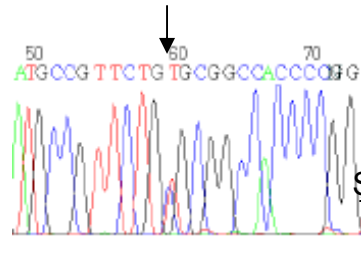
Şekil 3.4.2.9
(F)004C1E



Şekil 3.4.2.10
(R)004C1E

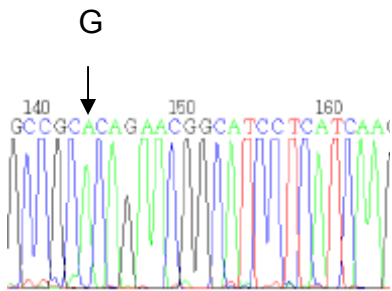


Şekil 3.4.2.11
(F)004E1K

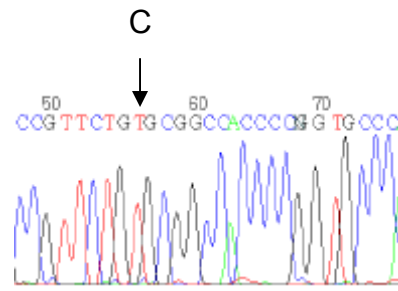


Şekil 3.4.2.12
(R)004E1K

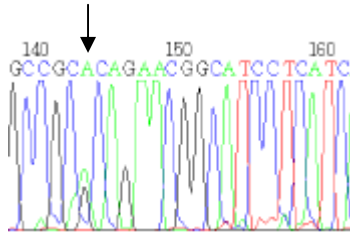
A1003A değişimi 007C1E nolu hastada homozigot iken annesi 007E1K ve babası 007E1E heterozigottur.



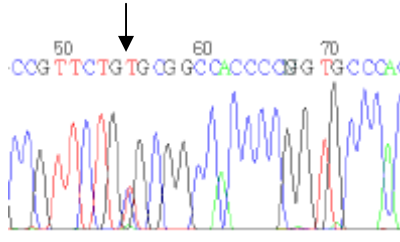
Şekil 3.4.2.13
(F)007C1E



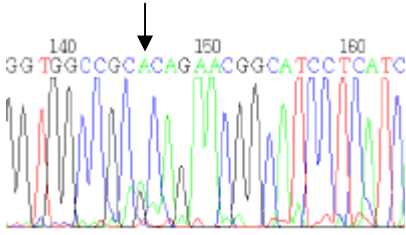
Şekil 3.4.2.14
(R)007C1E



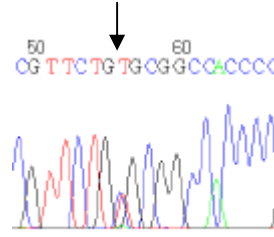
Şekil 3.4.2.15
(F)007E1E



Şekil 3.4.2.16
(R)007E1E

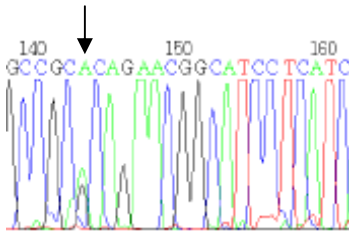


Şekil 3.4.2.17
(F)007E1K

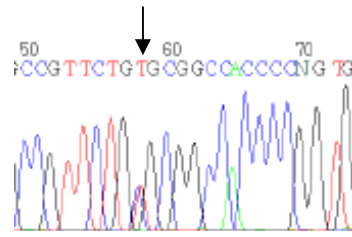


Şekil 3.4.2.18
(R)007E1K

A1003A değişimi 023B1E nolu hastada heterozigottur.



Şekil 3.4.2.19
(F)007E1K



Şekil 3.4.2.20
(R)023B1E

Tüm hastaların iki yönlü DNA dizi analizi sonuçları değerlendirilerek saptanan değişimler tablo 3.2'da özetlenmiştir. Mutasyonların tipi, değişen nükleotidler, değişen aminoasitler, proteinin hangi domaininde olduğu ve değişimlerin literatürde tanımlı olup olmadığı tablo üzerinde gösterilmiştir.

Tablo 3.2:Çalışmaya dahil edilen 26 ailenin,ATP7B geninin 8,12,13,14 ve 17 nolu ekzonlarına ait DNA dizi analizi sonuçları

| HASTA NO | HASTANE | 8.EKZON | | | | 12.EKZON | | | | 13.EKZON | | | | 14.EKZON | | 17.EKZON |
|----------|---------|--|-------------------|-----------------------------------|--|--|---|-------------------|---|-------------------|--|-------------------|-------------------|-----------------------------|--|-------------------|
| | | 2128G--A GGT--AGT | 2145C--T ACG--ATG | 2298_2299insC | 2332C--T CGG--TGG | 2332C--G CGG--GGG | 2807T--A TTT--TAG | 2855G--A AGA--AAA | 2906G--A CGG--CAG | 2973G--A ACG--ACA | 3008C--T GCG--GTG | 3009G--A CGC--CAC | 3045G--A CTG--CTA | 3108delC | 3207C--A CAC--CAA | 3620A--G CAC--CGC |
| | | G710Smisense Tm2
(Tanımlı mutasyon) | | P767Pfs Tm4
(tanımlı mutasyon) | R778W missense Tm4
(tanımlı mutasyon) | R778G missense Tm4
(tanımlı mutasyon) | L936X nonsenseTm5
(tanımlı mutasyon) | K952R
(SNP) | R969QmissenseCh/Tm6
(tanımlı mutasyon) | T991T
(SNP) | A1003V missenseTm6
(tanımlı mutasyon) | A1003A
(SNP) | L1015L
(SNP) | delesyon
(TANIMLI DEĞİL) | H1069Q missenseATPloop
(tanımlı mutasyon) | |
| 001B1K | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | |
| 002C1K | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | |
| 003C1K | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | |
| 004C1E | SSK | + | | | | | | + | | | | + | | | | |
| 004E1K | SSK | + | | | | | | + | | | | + | | | | |
| 005C1E | DEU | | | | | | | + | | | | | | | | |
| 006C1K | SSK | | | | | | | + | | | | | | | + | |
| 006C2E | SSK | | | | | | | + | | | | | | | + | |
| 008E1K | SSK | | | | | | | + | | | | | | | + | |
| 008E1E | SSK | | | | | | | + | | | | | | | + | |
| 007C1E | SSK | | | | | | + | + | | | + | | | | | |
| 007E1E | SSK | | | | | | + | + | | | + | | | | | |
| 007E1K | SSK | | | | | | + | + | | | + | | | | | |
| 008C1E | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | + |
| 008C2E | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | + |
| 008C3K | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | + |
| 008C4E | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | + |
| 008E1K | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | + |
| 008E1E | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | + |
| 009C1K | SSK | | | | | | | | | | | | | | | |
| 010C1K | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | |
| 011C1K | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | |
| 011E1K | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | |
| 011E1E | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | |
| 012C1K | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | |
| 012E1K | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | |
| 012E1E | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | |
| 012C2K | SSK | | | | | | | + | | | | | | | | |
| 013B1K | DEU | | | | | | | + | | | | | | | + | |
| 014C1E | DEU | | | | | | | + | | | | | | | + | |
| 014C2E | DEU | | | | | | | + | + | | | | | | + | |
| 015B1K | DEU | | | | | | | + | | | | + | | | | |
| 016C1E | SSK | | | | | | | + | | | | | | + | | |
| 016C2E | SSK | | | | | | | + | | | | | | + | | |
| 016E1E | SSK | | | | | | | + | | | | | | + | | |
| 016E1K | SSK | | | | | | | + | | | | | | + | | |
| 017C1E | BUÇ | | | | | | | + | | | | | | + | | |
| 017C2E | BUÇ | | | | | | | + | | | | | | + | | |
| 018C1E | BUÇ | | | | | + | | + | | | | | | | + | |
| 019B1E | DEU | | + | | | | | + | | | | | | | + | |
| 020C1E | SSK | | | | | | | | | + | | | | | + | |
| 020E1K | SSK | | | | | | | | | + | | | | | + | |
| 020E1E | SSK | | | | | | | | | + | | | | | + | |
| 021C1K | BUÇ | | | | | | | | | + | | | | | | |
| 022C1E | BUÇ | | | | | + | | + | | | | | | | + | |
| 022C2E | BUÇ | | | | | + | | + | | | | | | | + | |
| 023B1E | YDH | | | | | | | + | | | | | + | | | |
| 024B1E | YDH | | | | | | | + | | | | | | | + | |
| 025B1K | YDH | | | | | | | + | | | | | | | | |
| 026C1K | YDH | | | | | | | + | | | | | | | | |

BÖLÜM 4 :
TARTIŞMA

4. TARTIŞMA

WH, vücuttaki fazla bakırın atılamayıp karaciğer, böbrek, beyin gibi birçok organlarda birikerek hasar meydana getirmesi yoluyla oluşur. Kandaki seruloplazmin değeri, idarardaki bakır miktarı WH tanısı için birer kriter olsa da yalancı pozitiflik riski yüksektir. Wilson hastalığı tanısının konması, uzun yıllar boyunca bakırın karaciğer ve sinir sisteminde birikmesinden sonra olmaktadır. Bu sorunun giderilmesi amacıyla 2003 yılında Ferenci ve arkadaşları WH tanısı için bir skorlama sistemi (tablo1.1) oluşturmuşlardır. Bu skorlamada, hastalığa neden olan mutasyonların her iki kromozomda görülmesini dört, bir kromozomda görülmesini bir puan olarak belirlemişlerdir(26).

Wilson Hastalarında hastalıkla ilişkilendirilen *ATP7B* geninde mutasyon analizinin yapılmasıyla, WH tanılı bireyin ailesindeki ve akrabalarındaki genç bireylerde hastalık belirtileri oluşmadan ve/veya hastalık ilerlemeden erken tanı konması sağlanabilecektir. Bireylere uygun diyet uygulanması, ilaç tedavisi veya ikisinin beraber uygulanması ile karaciğer sirozu oluşmadan veya nörolojik bozukluklar meydana gelmeden hastaların tedavi edilmeleri mümkün olabilecektir. Ayrıca erken teşhis konmasıyla ve tedaviye başlanmasıyla; hastalığın ilerlemesi engellenerek, hastalara karaciğer nakli yapılmasına gerek kalmadan yaşamlarını sürdürebilmeleri öngörülmektedir.

Anadolu, sahip olduğu coğrafik konum gereği, tarihteki önemli ticaret yollarının ve göçlerin merkezlerinden biri olmuştur. Bu nedenle birçok etnik kökenden insanın yaşadığı bir yerdir. Yaşadığımız ülkenin bu özelliğini dikkate alarak Avrupada ve Asyada Wilson Hastalarında *ATP7B* genindeki mutasyonların tarandığı çalışmalar literatür ışığında değerlendirilmiştir.

http://www.uofa_medical_genetics.org/wilson/index.php'de belirlenen mutasyon veri tabanı incelenerek Wilson Hastalarında *ATP7B* geninin 8. ve 14. ekzonlarındaki mutasyonların sıklığının yüksekliği ve bu ekzonlarda mutasyon sayısının fazla oluşu, bu bölgelerin öncelikle çalışılmasını düşündürmüştür. Hasta popülasyonumuzun Ege

Bölgesinden oluşu ve bölgemizin İtalya gibi Akdeniz ülkelerine yakınlığı bu bölgeye yönelik çalışmaları öncelikle değerlendirmemizi sağlamıştır. Loudianos ve arkadaşlarının 1998 yılında 9 Türk Hastayı dahil ettikleri çalışmalarında, bu hastalarda *ATP7B* geninin 12., 13. ve 17. ekzonlarında mutasyon saptamışlardır (47). Tüm bu veriler sıklıkla gözlenen mutasyonların genin 8.,12.,13.,14. ve 17. nolu ekzonlarında olduğunu göstermiştir, bu nedenlerle çalışmaya öncelikli bu beş ekzonla başlamaya karar verilmiştir (tablo 1.2-1.6).

DNA eldesi için literatürde birçok yöntem bulunmaktadır. DEÜ TFAUH Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında Maniatis (65,66) 'in modifiye edilerek standardize edilmiş fenol kloroform izoamilalkol kullanılarak yapılan DNA ekstraksiyon metodu kullanıldı (67,68). Böylece uluslararası standartlara uygun, kaliteli, saf, intakt DNA elde edilmesi sağlandı.

WH'de *ATP7B* gen mutasyonlarının tarandığı çalışmalar, literatür ışığında değerlendirildiğinde PCR için Loudianos ve arkadaşlarının 1998 (48), Thomas ve arkadaşlarının 1995 (30), Petruchin ve arkadaşlarının 1994 (14) ve Waldenstrom ve arkadaşlarının 1996'daki (1) çalışmalarında kullandıkları primerlerin diğer araştırmacılar tarafından da tercih edildiği gözlemlendi. *ATP7B* geninin NCBI'daki gen dizisinde(Ek1) seçtiğimiz beş ekzon bulunarak primerlerin doğru bölgeye hibridize olup olmadığı kontrol edildi. Primerlerin diziyile bire bir eşleşmesi ve dizi analizinde kaliteli sonuçların elde edilebilmesi için, primerlerin ekzonun başladığı (ileri primer için) ve ekzonun bittiği (geri primer için) nükleotidlere 20-30 nükleotid uzaklıkta olması ve amplifiye edilen bölgenin 200bp-400bp arasında olması kriterleri göz önüne alındığında; ekzon 8, 12, 14 ve 17 nolu ekzonlar için Petruchin ve arkadaşlarının, ekzon 13 nolu ekzon için Waldenstrom ve arkadaşlarının kullandıkları primerlerin kullanılmasının uygun olduğuna karar verildi.

Mutasyon taraması, restriksiyon enzim kesimleme, Single nucleotide Conformational polymorphism (SSCP), DNA dizi analizi gibi birçok yöntemle yapılabilmektedir.

Restriksiyon enzim kesimleme yöntemi belirli bir bölgede, tanımlı, spesifik bir mutasyonun saptanabilmesi yönünden kullanılabilir bir yöntemdir ancak DNA dizi analiziyle tanımlı mutasyonların saptanabilmesinin yanısıra, hastalarımıza spesifik yeni mutasyonların ve/veya SNP'lerin saptanabilir olması; DNA dizi analizinin tercih edilmesinde çok önemli bir avantajdır.

Günümüz koşullarında, SSCP yöntemi DNA dizi analizine göre daha pahalı bir yöntemdir. SSCP ile konformasyonel değişimler saptanabilmektedir, bu yöntemle direk DNA dizisindeki değişim saptanamamaktadır ve DNA dizi analizine ihtiyaç duyulmaktadır. İki yöntemi birlikte uygulayıp maliyeti artırmak yerine macrogen firmasıyla işbirliği içinde sadece dizi analizinin yapılması daha hesaplı olduğundan tercih edilmiştir. Hem maliyet açısından hem de DNA dizisindeki değişimleri saptayabilmek açısından dizi analizi daha avantajlı bir yöntemdir.

Yaptığımız maliyet hesabıyla, günümüz koşullarında macrogen firmasıyla işbirliği içinde DNA dizi analizinin yapılmasının örnek başına %1.5 daha karlı olduğu anlaşılmıştır. Bununla beraber zaman açısından değerlendirildiğinde örnek başına %60 daha kısa sürede sonuç elde edilmektedir.

Tüm bu nedenlerden ötürü seçtiğimiz beş ekzonda DNA dizi analizi yöntemiyle mutasyonların taranmasına karar verilmiştir.

Bulgular bölümünde tablo 3.2'de belirttiğimiz, çalışmamızda saptadığımız mutasyonların, diğer ülkelerdeki dağılımı ve sıklığını ekzonlara göre belirten tablolar aşağıda sunulmuştur (tablo 4.1-4.4) :

Tablo 4.1: *ATP7B* geninin 8.ekzonunda saptadığımız mutasyonların ülkelere göre dağılımı ve görülme sıklığı.

| Mutasyon | Ülke | Hst s | mut gzl hst s | kro s | mut gzl kro s | %mut gzl | Referans | Yıl |
|---------------|------------|-------|---------------|-------|---------------|----------|-----------------|------|
| 2298-2299insC | D.Alm | | | 164 | 6 | %3.7 | Caca et al | 2001 |
| 2298-2299insC | D.Alm | | | | 6 | | Thomas et al | 1995 |
| 2298-2299insC | Yug | | | 28 | 2 | %7.1 | Firneizs et al | 2002 |
| 2298-2299insC | İsp | 64 | 1 | | | | Thomas et al | 1995 |
| 2298-2299insC | Bul | 89 | 9 | | | | | |
| 2298-2299insC | Çek C-Slo | 200 | 5 | | | | Vrabelova et al | 2005 |
| 2298-2299insC | Çin | | | 2 | | | Gu et al | 2003 |
| 2298-2299insC | Avustralya | | | 174 | 8 | %4.6 | Maier et al | 1997 |
| | | | | | | | | |
| G710S | D.Alm | | | 164 | 1 | %0.6 | Caca et al | 2001 |
| G710S | Mac | | | 84 | 1 | %1.4 | Firneisz et al | 2002 |
| G710S | Çek C-Slo | 200 | 8 | | | | Vrabelova et al | 2005 |
| G710S | Avustralya | | | 174 | 10 | %5.7 | Maier et al | 1997 |
| | | | | | | | | |
| R778G | Bul | 89 | 1 | | | | | |
| | Yun | | | 1 | | %2 | Figus et al | 1995 |
| | Çek C-Slo | 200 | 4 | | | | Vrabelova et al | 2005 |
| | Tur | | | | | | Figus et al | 1995 |
| | | | | | | | | |
| R778L | Çin | | | 27 | | | Gu et al | 2003 |
| | Çin | | | | | %37.70 | Wu et al | 2001 |
| | Kore | | | | | %37.50 | Kim et al | 1998 |
| | Japonya | | | | | %13-27.7 | Okada et al | 2000 |
| | | | | | | | | |
| R778G | Tayvan | | | | | %27 | Chuang et al | 1996 |

Kısaltmalar:

Hst s.:hasta sayısı

mut:mutasyon

gzl:gözlenen

kro s:kromozom sayısı

D.Alm:Doğu Almanya

İsp:İspanya

Yug:Yugoslavya

Bul:Bulgaristan

Mac:Macaristan

Yun:Yunanistan

Tur:Türkiye

% :yüzde

Tablo 4.2: *ATP7B* geninin 12.ekzonunda saptadığımız mutasyonların ülkelere göre dağılımı ve görülme sıklığı.

| mutasyon | ülke | Hst s. | mut.gzl.hst s | kro s | mut.gzl. kro.s | %mut gzl | Referans | Yıl |
|----------|-----------|--------|---------------|-------|----------------|----------|-----------------|------|
| L936X | Yun | 26 | 3 | | | | Butler et al | 2001 |
| L936X | Bul | 89 | 1 | | | 0.63 | | |
| L936X | Yun | 106 | | | 6 | 12 | Loudianos et al | 1998 |
| L936X | Yun,S.Arb | 58 | 3 | | | | Thomas et al | 1995 |

Kısaltmalar:

Mut:mutasyon %:yüzde Yun:Yunanistan
gzl:gözlenen s:sayı kro:kromozom
Hst:hasta Bul:Bulgaristan S.Arb:Sudiarabistan

Tablo 4.3: *ATP7B* geninin 13.ekzonunda saptadığımız mutasyonların ülkelere göre dağılımı ve görülme sıklığı.

| mutasyon | ülke | Hst s. | mut.gzl. hst s | kro s | mut.gzl. kro.s | %mut gzl | Referans | Yıl |
|----------|-----------|--------|----------------|-------|----------------|----------|-----------------|------|
| R969Q | D.Alm | | | 164 | 1 | %0.6 | Caca et al | 2001 |
| R969Q | Yun | | 9 | | | 18% | Loudianos et al | 1999 |
| R969Q | Mac | | | 84 | 2 | %2.4 | Firneisz et al | 2002 |
| R969Q | Çek C-Slo | 200 | 2 | | | | Vrabelova et al | 2005 |
| R969Q | Avu | | | 174 | 5 | %2.8 | Maier et al | 1997 |
| R969Q | Bul | 89 | 1 | | | | | |
| A1003V | Tur | | | | 1 | 1 | Loudianos et al | 1999 |

Kısaltmalar:

mut:mutasyon %:yüzde kro:kromozom
gzl:gözlenen Yun:Yunanistan C:Cumhuriyeti
D.Alm:doğu almanya Mac:Macaristan Hst:hasta
Tur:Türkiye Avu:avustralya s:sayı

Tablo 4.4: *ATP7B* geninin 14.ekzonunda saptadığımız mutasyonların ülkelere göre dağılımı ve görülme sıklığı.

| mutasyon | ülke | Hst s. | mut.gzl.hst s | kro s | mut.gzl.kro.s | %mut gzl | Referans | Yıl |
|----------|-------------|--------|---------------|-------|---------------|----------|-------------------|------|
| H1069Q | Pol | | | 170 | 124 | % 73 | Czlonkowska et al | 1997 |
| H1069Q | D.Alm | | | 164 | 103 | %62.8 | Caca et al | 2001 |
| H1069Q | D.Alm | | | 50 | 39 | | Thomas et al | 1995 |
| H1069Q | B.Alm | | | 66 | 28 | %42.4 | Ha-Hao et al | 1998 |
| H1069Q | Yun | | | 52 | 25 | | Butler et al | 2001 |
| H1069Q | Yun | | 13 | | | % 26 | Loudianos et al | 1999 |
| H1069Q | Yun | | | 98 | 28 | | Loudianos et al | 2000 |
| H1069Q | Mac | | | 84 | 36 | %42.9 | Firneisz et al | 2002 |
| H1069Q | İsv | | | 42 | 16 | % 38 | Shah et al | 1997 |
| H1069Q | Hol | | | 76 | 26 | %34.2 | Houwen et al | 1995 |
| H1069Q | İng | | | 84 | 14 | %16.6 | Curtis et al | 1999 |
| H1069Q | Akd Sar.(-) | | | 176 | 23 | % 13 | Figus et al | 1995 |
| H1069Q | İsp | 64 | 5 | | | | Tanzi et al | 1995 |
| H1069Q | Çek C-Slo | 200 | 114 | | | | Vrabelova et al | 2005 |
| H1069Q | Avu | | | 174 | 68 | %39.1 | Maier et al | 1997 |
| H1069Q | Bul | 89 | 47 | | | | | |

Kısaltmalar:

mut:mutasyon

:%yüzde

Avu:avustralya

Sar:Sardinya

gzl:gözlener

Yun:Yunanistan

kro:kromozom

Akd:akdeniz

D.Alm:doğu almanya

Mac:Macaristan

Pol:Polonya

C:Cumhuriyeti

B.Alm:Batı Almanya

Hol:Hollanda

İsv:İsviçre

Slo:Slovakya

Hst:hasta

İng:İngiltere

İsp:İspanya

s:sayı

(-):hariç

ATP7B geninin 14.ekzonundaki bir missense mutasyon olan H1069Q , Avrupanın merkezinde ve doğusunda en sık gözlenen mutasyondur. Avrupanın batısına doğru gidildikçe sıklığı düşmektedir (61). Buna karşılık Asyadaki (Japonya ve Çin) Wilson hastalarında H1069Q mutasyonu gözlenmemiştir (24,32,37,61).

Bulgulardaki tablo 3.2'deki, 8.ekzonda gözlenen 2145C →T değişimi, 14.ekzondaki 3108delC değişimi ve 17.ekzondaki 3620A → G değişimi literatürde tanımlanmamıştır, bu açıdan önem taşımaktadır. Bunların bölgemizdeki Wilson hastalarına spesifik önemli mutasyonlar olabileceği öngörülmektedir.

Bunların dışında bulgular tablo3.2'de belirttiğimiz, literatürde SNP olarak tanımlanan değişimler bizim hastalarımızda yüksek oranda gözlenmesi bakımından hastalığa spesifik değişimler olabilir. Hastalara tanı koyan klinisyenlerle yaptığımız görüşmelerde özellikle 12.ekzondaki K952R değişiminin klinik tablosu ağır olan birçok hastamızda gözlenmesi sebebiyle önemli olabileceği görüşüne varıldı.

Wilson hastalığının patogenezinin anlaşılmasında genotip fenotip korelasyonunun araştırılması önemlidir (32).

Tablo 4.5'te hastalardaki serum seruloplazmin değeri, serum bakır miktarı, hepatik bakır miktarı, üriner bakır miktarı, karaciğer biyopsisi yapılıp yapılmaması, Kayser Fleischer halkası bulunup bulunmaması, karaciğer şekil özellikleri, hastalığın tutulum yeri, hasta yaşı gibi fenotipik özelliklerle; saptanan mutasyon, mutasyonun homozigot veya heterozigot taşınması gibi genotipik özellikler arasındaki ilişki gösterilmeye çalışılmıştır.

Tablo 4.5, Wilson hastalığında genotip fenotip korelasyonunun kurulmaya çalışıldığı makaleler incelenerek oluşturulmuştur (3,32,34,35,37,39,52,53,61,64,69-75).

Tablo 4.5: WH'de genotip-fenotip ilişkisinin kurulmasına yönelik yapılan çalışmalar

| Mut.tipi | Ref | E | Hm | Ht | Etn.K | Hst S | Tut.Y | Yaş | KFR | K.bio | S.Ser | S.Cu | h.Cu | U.Cu | K/B
ş.ö |
|----------|----------------------|----|-----------------------|--------------------------|-------|-------------------|------------------------------|----------|------------------------------|-------|------------------|-------------|---|---|------------|
| R778L | Liu et al(2004) | 8 | | | Çin | 66 | H(49) | | | | + | | | + | + |
| R778G | Gromadzka (2005) | 8 | 1 | 1 | pol | 142 | n(71),h(41)
h-n(4),as(26) | 26±9 | | | 26mg/l
IQR:34 | 0.4±0.2mg/l | | 133µg/24h
IQR:137 | |
| H1069Q | Caca et al(2001) | 14 | 27 | 34 | D.Aim | 72 | n(46) h(22) | 19.5±7.7 | | 46 | 31/44(%SR) | <20mg/dl | >250µg/g
k.a | >1.5µmol/24h(b)
>2.5µmol/24h
o.D-pen m. | |
| H1069Q | Firneisz et al(2002) | 14 | np4/9,h2/9
h-np3/9 | np7/18,h8/18
h-np3/18 | Mac | | | | 8/9(hm),12/17(ht)
7/15(-) | | <0.2g/l | | >100µg/24h(b) | | |
| H1069Q | Stapelbroeke(2004) | 14 | n(10),N(6) | n(6),N(8) | Hol | 59'da30 | n,h | | +(n-1),-h(<1/2 h) | | + | + | + | | |
| H1069Q | Caprai et al(2006) | 14 | 1 | 0 | | 1 | | 7 | - | + | 23mg/dl | - | 45mg/24h(b)
1300µg/24h
o.D-pen m. | | |
| H1069Q | Gromadzka(2005) | 14 | 73 | 57 | pol | 142 | n(71),h(41)
h-n(4),as(26) | 26±9 | | | 26mg/l
IQR:34 | 0.4±0.2mg/l | 133µg/24h
IQR:137 | | |
| H1069Q | Butler et al(2002) | 14 | n(6),h-n(1) | h(6),n(3)ps(2) | Yun | 26 | n(9),h(6)ps(2)
h-n(1) | 8-36 | + | + | + | + | + | | |
| S744P | Jumah et al(2004) | 8 | | | S.ara | 56'da 9 | n(4),h(1)
h-n(1) | 15-52 | | | <200mg/l | | >0.55mmol/24h
x10 | + | |
| 2298insC | Gu et al(2003) | 8 | | | çin | 39(Han)
1(Hui) | n | | + | | + | + | + | | |
| 3029insT | Gu et al(2003) | 13 | | | çin | 39(Han)
1(Hui) | h | | + | | + | + | + | | |
| P992L | Gu et al(2003) | 13 | | | çin | 39(Han)
1(Hui) | n,h | | + | | + | + | + | | |
| T977M | Gromadzka(2005) | 13 | 2 | 2 | pol | 142 | n(71),h(41)
h-n(4),as(26) | 26±9 | | | 26mg/l
IQR:34 | 0.4±0.2mg/l | 133µg/24h
IQR:137 | | |
| W779X | Gromadzka(2005) | 8 | 0 | 3 | pol | 142 | n(71),h(41)
h-n(4),as(26) | 26±9 | | | 26mg/l
IQR:34 | 0.4±0.2mg/l | 133µg/24h
IQR:137 | | |
| G988R | Gromadzka(2005) | 13 | 0 | 3 | pol | 142 | n(71),h(41)
h-n(4),as(26) | 26±9 | | | 26mg/l
IQR:34 | 0.4±0.2mg/l | 133µg/24h
IQR:137 | | |
| T1220M | Gromadzka(2005) | 17 | 0 | 3 | pol | 142 | n(71),h(41)
h-n(4),as(26) | 26±9 | | | 26mg/l
IQR:34 | 0.4±0.2mg/l | 133µg/24h
IQR:137 | | |
| D1047fs | Gromadzka(2005) | 14 | 0 | 2 | pol | 142 | n(71),h(41)
h-n(4),as(26) | 26±9 | | | 26mg/l
IQR:34 | 0.4±0.2mg/l | 133µg/24h
IQR:137 | | |
| M769fs | Gromadzka(2005) | 8 | 0 | 2 | pol | 142 | n(71),h(41)
h-n(4),as(26) | 26±9 | | | 26mg/l
IQR:34 | 0.4±0.2mg/l | 133µg/24h
IQR:137 | | |
| L776P | Gromadzka(2005) | 8 | 0 | 2 | pol | 142 | n(71),h(41)
h-n(4),as(26) | 26±9 | | | 26mg/l
IQR:34 | 0.4±0.2mg/l | 133µg/24h
IQR:137 | | |
| M996fs | Gromadzka(2005) | 13 | 0 | 1 | pol | 142 | n(71),h(41)
h-n(4),as(26) | 26±9 | | | 26mg/l
IQR:34 | 0.4±0.2mg/l | 133µg/24h
IQR:137 | | |
| P992L | Gromadzka(2005) | 13 | 0 | 1 | pol | 142 | n(71),h(41)
h-n(4),as(26) | 26±9 | | | 26mg/l
IQR:34 | 0.4±0.2mg/l | 133µg/24h
IQR:137 | | |
| D756N | Gromadzka 2005 | 8 | 0 | 1 | pol | 142 | n(71),h(41)
h-n(4),as(26) | 26±9 | | | 26mg/l
IQR:34 | 0.4±0.2mg/l | 133µg/24h
IQR:137 | | |
| G771R | Caprai et al(2006) | 8 | 0 | 1 | | 1 | | 7 | - | + | 21mg/dl | 50µg/g | 76mg/24h
854µg/24h
o.D-pen m. | | |
| A756V | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| T1232P | Pardo et al(2004) | 17 | 8 | 0 | | 6 | h(1),ps(5)
n(5) | | 6(+),2003te5(-) | | <200mg/l | <10µmol/l | >2µmol/24h | + | |
| L936X | Butler et al(2001) | 12 | 0 | n(5) | yun | 26 | n(5) | 9-18 | + | + | + | + | + | | |
| 2302insC | Butler et al(2001) | 8 | h(1) | 0 | yun | 26 | h(1) | 8 | + | + | + | + | + | | |
| A1003T | Butler et al(2001) | 12 | 0 | h-n(1) | yun | 26 | h-n(1) | 20 | + | + | + | + | + | | |

Kısaltmalar:
mutasyon tipi: Mut.tipi
Referanslar: ref
Ekzon: E
Homozigot: hm
Heterozigot: ht
mutasyon taşımayan: (-)
Nörolojik: n
hepatik: h
Nöropsikiyatrik: np
doğu almanya: D.A
macaristan: mac
hollanda: hol
sudi arabistan: S.ara
hasta sayısı: hst S
tutulmuş yeri: Tut Y
etnik köken: Etn.K
Kayser Fleischer Ring: KFR
karaciğer biyopsisi: K:Bio
siroz: SR
serum seoloplazmin: S.Ser
serum bakır: S.Cu
hepatik bakır: h.Cu
üriner bakır: U.Cu
karaciğer ve/veya beyin şekil özellikleri: K/B ş.ö
kuru ağırlık: k.a
bazal: b
oral D-penisilamin muamelesi: o.D-pen m.
polonya: pol
asemptomatik: as
psikiyatrik semptom: ps
yunanistan: yun
preseptomatik: ps

Sonuç olarak yürütülen çalışmayla, 26 hastanın 25'inde *ATP7B* geninin 21 ekzonu arasından seçilen beş ekzonda saptanan değişimlerin %96.15 oranla saptanması isabetli bir öngöründe bulunulduğunu göstermektedir. Yöntem olarak DNA dizi analizinin yapılmasıyla verilerin erken elde edilmesi sağlanırken, bütçeden tasarruf edilmiştir. Yine DNA dizi analizinin yapılmasıyla tanımlı mutasyonların dışında değişimler saptanarak literatüre katkıda bulunulmuştur. Elde edilen verilerin klinisyenlerle paylaşılmasıyla, hasta yakınları bilgilendirilmiştir. WH tanılı kişilerin ailelerinin taranmasıyla, küçük yaşta tanı konması zor olan kardeşlerin, takip ve tedavilerinin yapılması için veri sağlanmıştır. Böylece bu kişilere, erken teşhis konularak hastalığın ilerlemesinin engellenebileceği öngörülmektedir.

BÖLÜM 5 :

EKLER

(**Ek1:***ATP7B* geninin 8,12,13,14,17 nolu ekzonlarının dizisi

Ek2:DEÜ Tıp Fakültesi Araştırma ve uygulama Hastanesi Klinik ve Araştırmaları Etik Kurulunun tez projesi hakkındaki kararı.

Ek3:Etik kurulun onayladığı Gönüllü Bilgilendirme Formu)

8.Ekzon

.....

52851 AAAGCTAGAG GCTTTGCCAT CCCCAGGGCC CTTGGCCCTG TGTCGCTCAT
TTTCGATCTC CGAAACGGTA GGGGTCCCGG GAACCGGGAC ACAGCGAGTA

52901 TGAACTCTCC TCCCTACTTG CTGGCAGCCT TCACTGTCCT TGTCTTTCAG
ACTTGAGAGG AGGGATGAAC GACCGTCGGA AGTGACAGGA ACAGAAAGTC

52951 CTCCTCGGTG GGTGGTACTT CTACGTTTCT GCCTACAAAT CTCTGAGACA
GAGGAGCCAC CCACCATGAA GATGCAAGTC CGGATGTTTA GAGACTCTGT

53001 CAGGTCAGCC AACATGGACG TGCTCATCGT CCTGGCCACA AGCATTGCTT
GTCCAGTCGG TTGTACCTGC ACGAGTAGCA GGACCGGTGT TCGTAACGAA

53051 ATGTTTATTC TCTGGTCATC CTGGTGGTTG CTGTGGCTGA GAAGGCGGAG
TACAAATAAG AGACCAGTAG GACCACCAAC GACACCGACT CTTCCGCCTC

53101 AGGAGCCCTG TGACATTCTT CGACACGCC CCCATGCTCT TTGTGTTTCT
TCCTCGGGAC ACTGTAAGAA GCTGTGCGGG GGTACGAGA AACACAAGTA

53151 TGCCCTGGGC CGGTGGCTGG AACACTTGGC AAAGGTAACA GCAGCTTCAG
ACGGGACCCG GCCACCGACC TTGTGAACCG TTTCATTGT CGTCGAAGTC

53201 GTTCAGAAAA GAGCTGCTCC TTCAGTAAAC AAATCTCACT TCCTCTGAAC
CAAGTCTTTT CTCGACGAGG AAGTCATTTG TTTAGAGTGA AGGAGACTTG

12.Ekzon

.....

61601 TAAATGAAGG AGATTATCCC AATCTTTATC CATGCTTGTG GTGTTTTTATT
ATTTACTTCC TCTAATAGGG TTAGAAATAG GTACGAACAC CACAAAATAA
NcoI
~~~~~

61651 TCTTCATAGG TTGTAATTTT CCATGGTCTT GGTGTTTTTAT TTTCATAGGC  
AGAAGTATCC AACATTAAAG GGTACCAGAA CCACAAAATA AAAGTATCCG

61701 ACCCATTCAG CAGCTGGCTG ACCGGTTTATG TGGATATTTT GTCCCATTTA  
TGGGTAAGTC GTCGACCGAC TGGCCAAATC ACCTATAAAA CAGGGTAAAT

61751 TCATCATCAT GTCAACTTTG ACGTTGGTGG TATGGATTGT AATCGGTTTT  
AGTAGTAGTA CAGTTGAAAC TGCAACCACC ATACCTAACA TTAGCCAAAA  
ClaI  
~~~~~

61801 ATCGATTTTG GTGTTGTTCA GAGATACTTT CCTGTAAGTT GAATGCCTTG
TAGCTAAAAC CACAACAAGT CTCATATGAAA GGACATTCAA CTTACGGAAC

.....

13.Ekzon

.....

64951 TGATTAGAGT TCTGGGAGCT TCCTTATTGA ACTCTCAACC TGCCTCTGAC
ACTAATCTCA AGACCCTCGA AGGAATAACT TGAGAGTTGG ACGGAGACTG

65001 TCTGTCCTGT TTTCAGAAACC CCAACAAGCA CATCTCCCAG ACAGAGGTGA
AGACAGGACA AAAGTCTTGG GGTGTTTCGT GTAGAGGGTC TGTCTCCACT

65051 TCATCCGGTT TGCTTTCCAG ACGTCCATCA CGGTGCTGTG CATTGCCTGC
AGTAGGCCAA ACGAAAGGTC TGCAGGTAGT GCCACGACAC GTAACGGACG

65101 CCCTGCTCCC TGGGGCTGGC CACGCCACG GCTGTCATGG TGGGCACCGG
GGGACGAGGG ACCCCGACCG GTGCGGGTGC CGACAGTACC ACCCGTGGCC

65151 GGTGGCCGCG CAGAACGGCA TCCTCATCAA GGGAGGCAAG CCCCTGGAGA
CCACCGGCGC GTCTTGCCGT AGGAGTAGTT CCCTCCGTTT GGGGACCTCT

65201 TGGCGCACAA GGTCAGCCTG TAGCACGGCT TTCCCCATCC TGAGAGATGA
ACCGCGTGTT CCAGTCGGAC ATCGTGCCGA AAGGGGTAGG ACTCTCTACT

.....

14.Ekzon

.....

67101 TTTCCTGTCT GAGGCAGGTT GGGTGAAGTT CTGCCTCAGG AGTGTGACTA
AAAGGACAGA CTCCGTCCAA CCCACTTCAA GACGGAGTCC TCACACTGAT

67151 TGGAAGCCCC TCCATCTGTA TTGTGGTCAG TGAGTTGTGG TTGTTTTTGG
ACCTTCGGGG AGGTAGACAT AACACCAGTC ACTCAACACC AACAAAAACC
NcoI
~~~~~

67201 CAGATAAAGA CTGTGATGTT TGACAAGACT GGCACCATTA CCCATGGCGT  
GTCATTTTCT GACACTACAA ACTGTTCTGA CCGTGGTAAT GGGTACCGCA

67251 CCCAGGGTC ATGCGGGTGC TCCTGCTGGG GGATGTGGCC AACTGCCCC  
GGGGTCCCAG TACGCCACG AGGACGACCC CCTACACCGG TGTGACGGGG

67301 TCAGGAAGGT TCTGGCTGTG GTGGGGACTG CGGAGGCCAG CAGTGAACAC  
AGTCCTTCCA AGACCGACAC CACCCCTGAC GCCTCCGGTC GTCACTTGTG

67351 CCCTTGGGCG TGGCAGTCAC CAAATACTGT AAAGAGGTAC GTGGACTTGG  
GGGAACCCGC ACCGTCAGTG GTTTATGACA TTTCTCCATG CACCTGAACC

67401 GCGTGGCCCT GCCCTCCCCG CCAATGCTCT TTTATTCCCTC ACCATGTCCT  
CGCACC GGGA CGGGAGGGGC GGTACGAGA AAATAAGGAG TGGTACAGGA  
AvaI  
~~~~~

67451 TCTCTCCTAG CTGCCCTCGA GGAGCCTTCT CTGTGTGGTC TGGAAAACCA
AGAGAGGATC GACGGGAGCT CCTCGGAAGA GACACACCAG ACCTTTTGGT

17.Ekzon

```
.....  
.....  
72201 TTTTGCACAT AATATTATAT GATGAGAACA TTGCAAGTGT GGTATCTTGG  
      AAAACGTGTA TTATAATATA CTA CTACTCTTGT AACG TTCACA CCATAGAACC  
  
72251 TGC GGGGTGC CCCAACTTGT GTAGCTGCTG ATGCTGGCTG GTTCGCTCCA  
      ACGCCCCACG GGGTTGAACA CATCGACGAC TACGACCGAC CAAGCGAGGT  
  
72301 GGTGTGCTCT GTGGGATGAT CGCAATCGCA GACGCTGTCA AGCAGGAGGC  
      CCACACGAGA CACCCTACTA GCGTTAGCGT CTGCGACAGT TCGTCCTCCG  
              ApaLI      PstI  
              ~~~~~~      ~~~~~~  
  
72351 TGCCCTGGCT GTGCACACGC TGCAGAGCAT GGGTGTGGAC GTGGTTCTGA  
      ACGGGACCGA CACGTGTGCG ACGTCTCGTA CCCACACCTG CACCAAGACT  
  
72401 TCACGGGGGA CAACCGGAAG ACAGCCAGAG CTATTGCCAC CCAGGTACAG  
      AGTGCCCCCT GTTGGCCTTC TGTCGGTCTC GATAACGGTG GGTC CATGTC  
  
72451 CCCTTTAATG TTGCAAACCTG TGTAAGCTC ATAAAAGCAG TTAGAGACAA  
      GGGAAATTAC AACGTTTGAC ACATTTTCGAG TATTTTCGTC AATCTCTGTT  
  
72501 AAGTAAGCAC CAGTTGGCCC AGCACTGAGC TGTACTCCTG CTCTTTCTCC  
      TTCATTCGTG GTCAACCGGG TCGTGACTCG ACATGAGGAC GAGAAAGAGG  
.....
```

Ek1: *ATP7B* geninin 8,12,13,14,17 nolu ekzonlarının dizisi.



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
Tarih ve Sayı: 18.01.2005/21

Etik Kurul Üyeleri

Prof. Dr. Mehmet ALAKAVUKLAR
Doç. Dr. Cem Şeref BEDİZ
Doç. Dr. Uğur MÜNGAN
Doç. Dr. Hüray İŞLEKEL
Doç. Dr. Arzu SAYINER
Doç. Dr. Özgül SAĞOL
Doç. Dr. Görsev YENER
Doç. Dr. Mehmet Ali KOÇDOR
Doç. Dr. Kamer UYSAL
Doç. Dr. Mustafa SEÇİL
Yard. Doç. Dr. Ayşe KARCI

Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Mehmet ALAKAVUKLAR

Etik Kurul Sekreteri
Yonca YILDIRIM

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 18 Ocak 2005 tarih ve 10/02/05 no.lu toplantısında, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Orhan TÜRZİOĞLU'nun sorumlu olduğu 03 protokol no.lu "Wilson Hastalarında ATP7B Geninin 8,12,13,14 ve 17 no'lu ekzonlarında DNA dizisi analizi ile mutasyonların taranması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr. Mehmet ALAKAVUKLAR
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

Tel: 0232 412 22 54

EK2:DEÜ Tıp Fakültesi Araştırma ve uygulama Hastanesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulunun tez projesi hakkındaki kararı.

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

Wilson hastalığı, vücutta bakırın birikimiyle oluşan, kalıtsal olarak geçen bir hastalıktır. Kanda taşınan fazla bakırın farklı organlarda artarak birikmesi, yaş ilerledikçe ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Wilson hastalarında ve onların aile üyelerinde hastalıkla ilgili genetik değişikliklerin saptanması erken yaşlarda önlemlerin alınmasını sağlar. Böylece ileri yaşlarda karşılaşılabilecek sağlık sorunları önlenir.

Bu araştırma Yüksek Lisans tez çalışması olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Prof. Dr. Orhan Terzioğlu danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Özlenen Şimşek tarafından yürütülecektir. Bu çalışmada Wilson hastalığına neden olan ilgilenilen beş gen bölgesindeki kalıtsal değişikliklerin saptanması, uluslararası standartlara uygun olarak yapılacaktır. Çalışmaya gönüllü olarak katılmak isteyen hastalardan hiçbir ücret talep edilmeyecektir.

'Wilson Hastalarında *ATP7B* Geninin 8,12,13,14 ve 17 nolu ekzonlarında DNA dizi analizi ile mutasyonların taranması' isimli genetik çalışma için sizden alınacak kan örneği sadece bu hastalıkla ilgili mutasyonların taraması amacıyla kullanılacaktır. Başka amaçlarla kullanılmayacaktır.

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

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

Yukarıdaki 'Wilson Hastalarında *ATP7B* Geninin 8, 12, 13, 14 ve 17 nolu ekzonlarında DNA dizi analizi ile mutasyonların taranması' isimli genetik çalışma için gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Bunlar hakkında bana açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya 5ml kan vererek, kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün ;

Adı:

İmzası:

Adresi:

Varsa telefon no, faks no :

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasiinin;

Adı:

İmzası:

Adresi:

Varsa telefon no, faks no :

Açıklamaları yapan kişinin;

Adı:

İmzası:

Görevi:

Ek3: Etik kurulun onayladığı Gönüllü Bilgilendirme Formu.

BÖLÜM 6 :

KAYNAKLAR

6.KAYNAKLAR:

1. Waldenstrom E.,Lagerkvist A.,Dahlman T.,Westermarck K and Landegren A.U. **Efficient Detection of Mutations in Wilson Disease by Manifold Sequencing.**Genomics 1996;37:303-309.
2. Langner C.,Denk H.**Wilson Disease.**Virchows Arch 2004;445:111-118.
3. Butler P.,McIntyre N.,Mistry P.K.**Molecular Diagnosis of Wilson Disease.** Molecular Genetics and metabolism 2001;72:223-230.
4. Youssef M.**Wilson Disease.** Mayo Clin Proc 2003;78:1126-1136.
5. Figus A et al.**Molecular pathology and haplotype analysis of Wilson Disease in Mediterranean populations.** Am. J. Hum. Genet. 1995;57:1318-1324.
6. Harada M.**Wilson disease.**Med Electron Microsc 2002;35:61-66.
7. Ferenci P.**Review article:diagnosis and current therapy of Wilson's disease .**Aliment Pharmacol Ther 2004;19:157-165
8. Danks D.M.**Disorders of Copper Transport** The metabolic and molecular basis of inherited disease 7.baskı,bölüm 68.
9. Wijmenga C.,Klomp W.J.**Molecular regulation of copper excretion in the Liver.**Proceedings of the Nutrition Society 2004;63:31-39.
- 10.Lutsenko S. et al.**Human copper-Transporting ATPase ATP7B (The Wilson's Disease Protein):Biochemical Properties and Regulation.**2002 ;J of Bioenergetics And Biomembranes.2002;34:5-17.
- 11.Hsi G.,Cullen L.M.,Glerum D.M.,Cox D.W. **Functional assessment of the carboxy-terminus of the Wilson disease copper-transporting ATPase, ATP7B.**Genomics 2004;83:473-481.
- 12.Terada K.,Schilsky M.L.,Miura N.,Sugiyama T.**ATP7B(WND) protein.**The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 1998;30:1063-1067.
- 13.Barnes N et al.**The copper transporting ATPases, Menkes and Wilson Disease proteins, have distinct roles in adult and developing cerebellum.**J.Bio Chem 2005;280:9640-9645.

14. Petrukhin K et al. **Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions.** Human Molecular Genetics 1994;3:1647-1656.
15. Safaei R, Howell S.B. **Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs.** Oncology Hematology 2005;53:13-23.
16. Mercer F.B., Lianos R.M. **Molecular and cellular aspects of copper transport in developing mammals.** J. Nutr. 2003;133:1481-1484.
17. Ferenci P et al. **Hepatic transport systems.** J. of Gast and Hepatology 2002;17:105-112.
18. Mercer J. And Lianos R. **Molecular and Cellular aspects of copper transport in developing mammals.** American Society for nutritional Sciences. 2003;133:1481S-1484S.
19. Petrukhin K., Fischer S.G. et al. **Mapping cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene.** Nature genetics 1993;5.
20. Deguti M. et al. **Wilson Disease: Novel mutations in the ATP7B gene and clinical correlation in Brazilian patients.** Human mutation 2004;698.
21. Portman R., Solioz M. **Purification and functional reconstitution of the human Wilson copper ATPase, ATP7B.** FEBS letters 2005.
22. Harada M et al. **Wilson disease protein ATP7B is localized in the late endosomes in a polarized human hepatocyte cell line.** Int. J. Mol. Med 2003;11:293-298.
23. Tao Ty., Liu F. Et al. **The copper toxicosis gene product Murr1 directly interacts with the Wilson disease protein.** J. Biol. Chem. 2003;278:41593-41596.
24. Wu Z.Y., Zhao G.X. et al. **Mutation analysis of 218 Chinese patients with Wilson disease revealed no correlation between the canine copper toxicosis gene MURR1 and Wilson disease.** J. Mol. Med. 2005;10.1007:109-114.

25. Cox D.W., Moore S.D.P. **Copper transporting P-type ATPases and Human Disease.** Journal of Bioenergetics and biomembranes 2002;34:5
26. Ferenci F., Caca K. et al. **Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease.** Liver International 2003;23:139-142.
27. Roberts E. And Schilsky M. **A Practice Guideline on Wilson Disease.** 2003
Ferenci P. **Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing.** Hum Genet 2006;10.1007:439.
28. Cullen LM, Prat L, Cox DW. **Genetic variation in the promoter and 5'UTR of the copper transporter, ATP7B, in patients with Wilson disease.** Clin Genet 2003;64:429-432.
29. Thomas G.R, Forbes J.R, Roberts E.A, Walshe J.M, Cox D.W. **The Wilson Disease gene: spectrum of mutations and their consequences.** Nature Genetics 1995;9:210-217.
30. Loudianos G. et al. **Further delineation of the molecular pathology of Wilson Disease in the mediterranean population.** Human Mutation 1998;12:89-94.
31. Caca K., Ferenci P., Kühn H.J., Polli C., Willgerodt H., Kunath B., Hermann W., Mössner J., Berr F. **High prevalence of the H1069Q mutation in east German patients with Wilson disease: rapid detection of mutations by limited sequencing and phenotype –genotype analysis.** Journal of Hepatology 2001;35:575-581.
32. Loudianos G. et al. **Mutation analysis in patients of mediterranean descent with Wilson Disease: identification of 19 novel mutations.** J Med Genet 1999;36:833-836.
33. Jumah M., Majumdar R. et al. **A clinical and genetic study of 56 Saudi Wilson disease patients: identification of Saudi-specific mutations** European Journal Neurology 2004;11:121-124.
34. Gromadzka G., Schmidt H. et al. **Frameshift and nonsense mutations in the gene for ATPase7B are associated with severe impairment of copper metabolism and with an early clinical manifestation of Wilson's disease** Clin Genet 2005;68.524-532.

35. Margarit E., Bach G. et al. **Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population-identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene** Clin Genet 2005.
36. Gu Y-H., Kodama H., Du S-L., Gu Q-J., Sun H-J., Ushijima H. **Mutation spectrum and polymorphisms in ATP7B identified on direct sequencing of all exons in Chinese Han and Hui ethnic patients with Wilson's disease.** Clin Genet 2003;64:479-484.
37. Schmidt H.H.J. **Commentary for MGM05-49.** Molecular Genetics and Metabolism. 2005.
38. Caprai S., Loudianos G. Et al. **Direct diagnosis of Wilson Disease by molecular genetics.** The Jou. of Pediatrics 2006;148:138-140.
39. Battisti C, Dotti M et al. **Wilson's Disease with Leu492Ser mutation and arylsulfatase a pseudodeficiency: just a coincidence?** Neurol Sci 2004
40. Dedoussis G., Genschel J. et al. **Wilson Disease: High Prevalence in a Mountaineous Area of Crete.** University College London 2005;69:1-7.
41. Dobersberger et al. **Detection of the His1069Gln Mutation in Wilson Disease by Rapid Polymerase Chain Reaction.** 1997 ;127:21-26.
42. Cox D.W. Prat L. et al. **Twenty-four novel mutations in Wilson disease patients of predominantly european ancestry** Human Mutation 2005;26:280.
43. Cox D. **Wilson disease mutation database** 2003
44. Cox D. **Wilson disease mutation database** 2005
45. Cox D. **Wilson disease mutation database** 2006 v1.15.2b.
46. Loudianos G. et al. **Wilson disease mutations associated with uncommon haplotypes in mediterranean patients.** Hum Genet 1996;98:640-642.
47. Loudianos G. et al. **Haplotype and mutation analysis in greek patients with Wilson Disease.** Euro. J. of Hum. Genetics 1998;6:487-491.
48. Loudianos G., Lovicu M., Dessi V., Tzetis M., Kanavakis E., Zancan L., Zelante L., Galvez C.G., Cao A. **Abnormal mRNA splicing resulting from consensus sequence splicing mutations of ATP7B.** Human mutation 2002;20:260-266.

49. Yusin F. ,Long Y. Et al.**Identification of a mutation hotspot in exon 8 of Wilson Disease gene by cycle sequencing.**Chinese Medical journal 2000;113;172-174.
50. Curtis D.,Durkie M. et al.**A Study of Wilson Disease Mutations in Britain.**Human Mutation 1999;14:304-311.
51. Gromadzka G.,Schmidt H. et al. **pH1069Q mutation in ATP7B and biochemical parameters of copper metabolism and clinical manifestation of Wilson's disease** 2005.
52. Moller L.,Ott P et al.**Homozygosity for a Gross Partial Gene Deletion of the C-Terminal End of ATP7B in a Wilson Patient with Hepatic and no Neurological manifestations.**American Journal of medical genetics 2005;138A:340-343.
53. Tarnacka B.,Gromadzka G.,Rodo M.,Mierzejewski P.,Czilonkowska A.**Frequency of His1069Gln and Gly1267Lys mutations in Polish Wilson's Disease population.** European Journal of Neurology 2000;7:495-498.
54. Shimizu N.et al.**Molecular analysis and diagnosis in Japanese patients with Wilson's disease.**Pediatrics International 1999;41:409-413.
55. Schmidt H.et al.**Wilson disease:High prevalence in a Mountaineous area of crete.**Annals of Human Genet 2005;69:1-7.
56. Letter to the Editor **Identification and molecular characterization of 18 novel mutations in the ATP7B gene from Indian Wilson disease patents: genotype.** Clin.Genet. 2005;67:443-445.
57. Schilsky M.et al.**Wilson disease in Septuagenarian siblings:Raising the bar for diagnosis.**Hepatology 2005;41:3.
58. Ballesta F.et al.**Mutation analysis of Wilson disease in the Spanish population-identification of a prevalent substitution and eight novel mutations in the ATP7B gene.**Clin Genet.2005;10:1111.
59. Orru S et al.**24bp Deletion and Ala₁₂₇₈ to Val Mutation of the ATP7B Gene in a Sardinian Family with Wilson Disease.**Human Mutation 1997;10:84-85.

60. Vrabelova S., Letocha O. et al. **Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease** Molecular Genetics and Metabolism 2005.
61. Loudianos G., Dessi V. et al. **Molecular Characterization of Wilson Disease in the Sardinian Population-Evidence of a Founder Effect.** Human Mutation 1999;14:294-303.
62. Yuxin F., Long Y et al. **Identification of a mutation hotspot in exon8 of Wilson disease gene by cycle sequencing.** Chinese Med. Journal 2000;113:172-174.
63. Stapelbroek J., Bollen C. et al. **The H1069Q mutation in ATP7B is associated with late and neurologic presentation in Wilson disease :results of a meta-analysis** Journal of Hepatology 2004:1-6.
64. Sambrook J. Fritsch and Maniatis T. **Molecular Cloning:A laboratory manual.** 2nd edition Vol.3. Cold Spring Harbor lab. Press New York. 1989
65. Sambrook J. Fritsch, Russell D.W. **Molecular Cloning:A laboratory manual.** 3rd edition Vol.2. Cold Spring Harbor lab. Press New York. 2001.
66. Çam S. **Hipertrofik Kardiyomyopatiye yol açan beta-miyozin ağır zinciri gen bölgesinde Arg403Gln, Arg453Cys, Arg719Trp ve Arg719Gln mutasyonlarının aile düzeyinde saptanması** 2000. DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, İzmir.
67. Demirci T. **Transferrin-demir doygunluğu %45'in üzerinde olan bireylerde Hemokromatoz riskini belirlemek üzere HFE geninde C282Y ve H63D mutasyonlarının taranması** 2002. DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
68. Liu X. Et al. **Correlation of ATP7B genotype with phenotype in Chinese patients with Wilson disease.** World Journal of Gastroenterology 2004;10(4):590-593.
69. Letter to the Editor. **Spectrum of mutation in the Wilson disease gene (ATP7B) in the Bulgarian population.** Clin Genet 2005;68:474-476.
70. Panagiotakaki E., Tzetis M et al. **Genotype-Phenotype Correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson Disease Gene (ATP7B).** American Jou. of med. Genetics 2004;131A:168-173.

71. Qing X, Zhang Y. et al. **Correlation of ATP7B genotype with phenotype in Chinese patients with Wilson disease.** 2004;10(4):590-593.
72. Gupta A. Aikath D. Et al. **Molecular pathogenesis of Wilson disease: haplotype analysis, detection of prevalent mutations and genotype-phenotype correlation in Indian patients.** Hum. Genet. 2005;118:49-57.
73. Firneisz G., Lakatos P.L., Szalay F., Polli C., Glant T.T., Ferenci P. **Common mutations of ATP7B in Wilson Disease patients from Hungary.** American Journal of Medical Genetics 2002;108:23-28.
74. Pardo C.V., Rio M.J.D. et al. **New mutation (T1232P) of the ATP7B gene associated with neurologic and neuropsychiatric dominance onset of Wilson's disease in three unrelated Colombian kindred.** Neuroscience letters 2004;367:360-364.