

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**WILSON HASTALIĞINA YOL AÇAN ATP7B
GENİNDEKİ MUTASYONLARIN BAKIR
TAŞINMASINDAKİ ETKİLERİNİN
SACCHAROMYCES CEREVISIAE MODEL
SİSTEMİNDE ARAŞTIRILMASI**

ÖZLENEN ŞİMŞEK PAPUR

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2012

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2006970121

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**WILSON HASTALIĞINA YOL AÇAN ATP7B
GENİNDEKİ MUTASYONLARIN BAKIR
TAŞINMASINDAKİ ETKİLERİNİN
SACCHAROMYCES CEREVISIAE MODEL
SİSTEMİNDE ARAŞTIRILMASI**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
DOKTORA TEZİ**

ÖZLENEN ŞİMŞEK PAPUR

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Orhan Terzioğlu

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından proje no: 2005.KB.SAG.024 ve 2010.KB.SAG.003 ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2006970121

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Doktora programı öğrencisi Özlenen Şimşek Papur '**WILSON HASTALIĞINA YOL AÇAN ATP7B GENİNDEKİ MUTASYONLARIN BAKIR TAŞINMASINDAKİ ETKİLERİNİN SACCHAROMYCES CEREVISIAE MODEL SİSTEMİNDE ARAŞTIRILMASI**' konulu Doktora tezini 12.12.2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

Prof.Dr.Orhan Terzioğlu



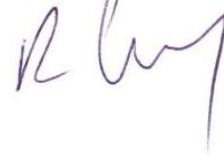
ÜYE

Prof.Dr.S.Neşe Atabey



ÜYE

Prof.Dr.Raif Çakmur



ÜYE

Doç.Dr.Ahmet Koç



ÜYE

Doç.Dr.H.Ogün Sercan



YEDEK ÜYE

Prof.Dr.Meral Sakızlı

YEDEK ÜYE

Doç.Dr.Selim Uzunoğlu

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ	i
ŞEKİL DİZİNİ	ii
KISALTMALAR	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	3
1.2. Araştırmanın Amacı	3
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	4
2. GENEL BİLGİLER	5
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. Araştırmanın tipi	14
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı	14
3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme	14
3.4. Çalışma materyali	14
3.5. Araştırmanın değişkenleri	14
3.6. Veri toplama araçları	15
3.7. Araştırma planı	38
3.8. Verilerin değerlendirilmesi	39
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları	39
3.10. Etik Kurul Onayı	39
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA	80
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
7. KAYNAKLAR	86
8. EKLER	90

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1	9
Tablo 2	18
Tablo 3	19-20
Tablo 4	30
Tablo 5	32
Tablo 6	41
Tablo 7	42
Tablo 8	43
Tablo 9	44
Tablo 10	44
Tablo 11	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1	7
Şekil 2	10
Şekil 3	11
Şekil 4	12
Şekil 5	15-16
Şekil 6	25
Şekil 7	26
Şekil 8	26
Şekil 9	27
Şekil 10	27
Şekil 11	46
Şekil 12	46
Şekil 13	47
Şekil 14	48
Şekil 15	49
Şekil 16	50
Şekil 17	51-63
Şekil 18	64
Şekil 19	65
Şekil 20	65
Şekil 21	66
Şekil 22	67
Şekil 23	67
Şekil 24	68
Şekil 25	69
Şekil 26	70
Şekil 27	71
Şekil 28	72
Şekil 29	73
Şekil 30	74
Şekil 31	75
Şekil 32	75
Şekil 33	76
Şekil 34	76
Şekil 35	76
Şekil 36	77
Şekil 37	77
Şekil 38	77
Şekil 39	78
Şekil 40	78

KISALTMALAR

WH : Wilson Hastalığı

ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer-İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometre

ILM : Iron Limited Medium-Demir sınırlı ortam

ISM : Iron Supplemented Medium -Demir zengin ortam

CSM : Copper Supplemented Medium -Bakır zengin ortam

ISCM : Iron+copper Supplemented Medium- Demir bakır zengin ortam

ISCM-F : Iron+copper Supplemented Medium without ferrozine –Demir bakır zengin ortam ferrozinsiz

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının maddi desteklenmesi ve sağladıkları olanaklardan dolayı Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü'ne,

Sundukları tüm olanaklar ve yardımlarından ötürü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne ve tüm çalışanları'na,

Tezin tüm aşamalarındaki bilimsel katkıları; bana olan inancı, güveni ve manevi desteği için tez danışmanım Prof.Dr.Orhan Terzioğlu'na,

Tezin çalışma ve kontrol grubunun oluşumunda katkı sağlayan Prof.Dr.Raif Çakmur, Doç.Dr.Sezin Aşık Akman'a; çalışmaya katılmaya gönüllü olan kişilere ve yakınlarına,

Sağladığı laboratuvar olanakları, malzeme desteği ve tezin gelişimine katkıları için Doç. Dr.Ahmet Koç'a,

Teknik ve malzeme desteği için Prof.Dr.S.Neşe Atabey'e, Doç.Dr.H.Ogün Sercan'a, Doç.Dr.Sefa Kızıldağ'a,

Tezin gelişimine katkılarından dolayı doktora tez izleme komitesi üyeleri Prof.Dr.Orhan Terzioğlu'na, Prof.Dr.S.Neşe Atabey'e, Prof.Dr. Raif Çakmur'a, Prof.Dr.Meral Sakızlı'ya,

Manevi desteklerinden ötürü Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD'daki ve İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Maya Laboratuvarındaki çalışma arkadaşlarıma,

Tezin yazımındaki, düzenlenmesindeki katkıları ve manevi desteği için eşim Kıvanç Papur'a,

Tüm eğitim ve öğrenim hayatım boyunca maddi, manevi desteklerinden ötürü babam Ali Şimşek, annem Gül Şimşek ve tüm aileme,

ve emeği geçen, desteklerini esirgemeyen herkese sonsuz teşekkür ederim...

Wilson Hastalığına Yol Açan ATP7B Genindeki Mutasyonların Bakır Taşınmasındaki Etkilerinin *Saccharomyces cerevisiae* Model Sisteminde Araştırılması
Özlenen Şimşek Papur,Tıp Fakültesi,
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık yerleşkesi Temel Tıp Bilimleri binası,Tıbbi biyoloji ve Genetik
AD 3.kat, 35340 İnciraltı,İzmir

ÖZET

Amaç : Klinik bulguları farklı Wilson Hastalarında saptanan ATP7B genindeki T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 mutasyonları ve yaban tip ATP7B geni, yaban tip BY4741 (MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0) suşundan elde edilmiş CCC2 geni mutant olan (BY4741 Δ CCC2) *Saccharomyces cerevisiae* suşuna transformasyonu ile bakır miktarındaki değişimin saptanması amaçlandı.

Yöntem : Hepatoselüler karsinoma hücre dizisi HepG2'den total RNA izolasyonu yapıp cDNA elde edildi. Yaban tip ATP7B genine özgül primerler kullanılarak ATP7B geni PCR ile çoğaltıldı, plazmid DNA'sına klonlandı.Yaban tip ATP7B'yi içeren plazmid DNA'sında bölge yönlendirilmiş mutagenез 'site directed mutagenesis' yöntemi ile T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 mutasyonları elde edildi. DNA dizi analizi ile yaban tip ATP7B, T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 mutant hücrelerden elde edilen plazmid DNA'larının dizileri doğrulandı. Yaban tip ATP7B, T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 mutantları *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741 Δ CCC2) transforme edildi. Konvansiyonel PCR ve real time PCR yapıldı. Komplementasyon deneyi yapılarak ICP MS analizi ile farklı ortam şartlarında, ortamdaki ve hücre pelletlerindeki bakır ve demir miktarı ölçüldü.

Bulgular : BY4741 Δ CCC2 suşunda , ATP7B geninin mayadaki CCC2 genini komplemente ettiği ve işlevsel olduğu gösterildi. Demir sınırlı ortamda, yaban tip ATP7B'ye göre T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 mutantlarında hücre kültür ortamındaki bakır miktarının azaldığı ve hücre pelletlerindeki bakırın arttığı gösterildi. Kontrol ortamlarında hem ortam hem de hücre pelletlerinde bakır miktarında fark saptanmadı. Aynı deney şartlarında, yaban tip ATP7B'ye göre mutantlarda hem ortam hem de pelletlerde ölçülen demir miktarında fark saptanmadı.

Sonuç : Demir sınırlı ortamda yaban tip ATP7B'ye göre T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 mutasyonlarında hücre kültür ortamındaki bakırın azaldığı, hücre pelletlerindeki bakırın arttığı gösterildi. ICP-MS ile yapılan ölçümlerde yaban tip ATP7B ile üç mutant arasında bakır taşınımında fark saptandı, hipotezimiz doğrulandı. BY4741 Δ CCC2 genetik özelliğindeki mutant maya suşuna ilk kez insan bakır taşıyıcı geni ATP7B transforme edildi ve komplementasyon gösterildi. Farklı klinik özelliklere sahip Wilson hastalarındaki mutasyonlara ait model sistem kurulmuş oldu.

Anahtar Sözcükler : Wilson hastalığı, bakır, ATP7B , mutasyon, CCC2 , maya

Searching the Effect of Mutations on ATP7B Gene that Caused Wilson Disease to the Copper Transport on *Saccharomyces cerevisiae* Model System

Özlenen Şimşek Papur, Faculty of Medicine,

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık yerleşkesi Temel Tıp Bilimleri binası, Tıbbi biyoloji ve Genetik

AD 3.kat, 35340 İnciraltı, İzmir

ABSTRACT

Objective : It was aimed to detect the change amount of copper by transforming wild type ATP7B gene and T788I, V1036I and R1038G-fsX83 mutations in ATP7B gene which detected on Wilson Disease patients that has different clinical findings to *Saccharomyces cerevisiae* that has mutant CCC2 gene (BY4741ΔCCC2) which obtained from wild type BY4741 (MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0) strain.

Method : Total RNA was isolated from HepG2 cell line that belongs to hepatocellular carcinoma and cDNA synthesis reaction was performed. ATP7B gene was amplified with specific primers by PCR and it was cloned into plasmid DNA. T788I, V1036I and R1038G-fsX83 mutations were obtained by site directed mutagenesis on wild type ATP7B plasmid DNA. Plasmid DNAs that have wild type ATP7B; T788I, V1036I and R1038G-fsX83 mutations were verified by DNA sequencing. Wild type ATP7B, T788I, V1036I and R1038G-fsX83 mutants were transformed to *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741ΔCCC2). Conventional and real time PCR was performed. Complementation assay was performed. In different medium condition copper and iron were measured in supernatant and pellet by ICM MS analysis.

Results : In BY4741ΔCCC2 strain, ATP7B gene complemented CCC2 gene in yeast and it has been demonstrated that it is functional. On iron limited medium it has been demonstrated that T788I, V1036I and R1038G-fsX83 mutants have decreased copper in supernatant and increased copper in cell pellet comparing with wild type ATP7B. In control media, no difference was detected on amount of copper both in supernatants and pellets. On the same experiment conditions, comparing with wild type ATP7B and mutants, no difference was found on amount of iron that has been measured in both supernatants and pellets.

Conclusion: In iron limited medium it has been demonstrated that T788I, V1036I and R1038G-fsX83 mutants have decreased copper in supernatant and increased copper in cell pellet comparing with wild type ATP7B. The difference of copper transport between wild type ATP7B and three mutants were detected by ICP-MS and the hypothesis was confirmed. ATP7B gene was transformed to BY4741ΔCCC2 background yeast strain for the first time and complementation was shown. A model system was established for the mutations that belong to Wilson Disease patients that have different clinical findings.

Key Words : Wilson disease, copper, ATP7B , mutation, CCC2, yeast

1. Giriş ve Amaç

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Wilson hastalığı-WH (Wilson disease-WD, MIM 277900), doğal gereksinimi karşılayacak bakırın fazlasının, karaciğerde işlenerek safra yoluyla atılamaması sonucu çeşitli organlarda birikimiyle ortaya çıkar. Wilson Hastalarında bakır, başta karaciğer olmak üzere, beyinde, böbrekte, korneada (Kayser-Fleisher halkası) ve dalakta birikir. WH, Çocukluk çağında genellikle karaciğer hasarıyla başlayan, yaş ilerledikçe erken yaşlarda tedavi edilmezse ölümcül olabilen, ailesel geçişli, otozomal resesif kalıtmı bir hastalıktır. Yapılan çalışmalar, WH'nin dünya genelinde yaklaşık 1/30 000 oranında bulunduğunu ve taşıyıcılık sıklığının 1/90 olduğunu göstermektedir.

Hastalığın moleküler temeline yönelik araştırmalarda, insanda hepatositte, bakırın gerekli olan miktarının düzenlenmesinde ve ihtiyaçtan fazla olan bakırın atılmasında kromozomal yerleşimi 13q14.3 olarak belirlenen *ATP7B* geni ürünü, ATP7B proteininin kritik bir işlevi olduğu saptandı.

Bu protein katyon taşıyıcı P-tipi ATPaz ailesinin üyesidir. ATP7B proteini, altı bakır bağlama bölgesi, sekiz transmembran segment, ATP'nin hidroliziyle oluşan enerjinin katyon taşınmasında kullanılmasından sorumlu bir domain, bir fosforilasyon bölgesi, bir transmembran katyon kanalı, bir ATP bağlanma domaini olmak üzere toplam altı özelleşmiş bölgeden oluşmuştur.

Saccharomyces cerevisiae'da bakırın taşınmasında ve atılmasında sorumlu olan ve insandaki *ATP7B* geninin ortoloğu CCC2 geni olup ürünü Ccc2p proteindir. ATP7B proteininin farklı bölümlerinin, bu bölümlerde yer alan amino asitlerin, *ATP7B* geninde WH'ye yol açan farklı mutasyonların protein işlevindeki etkilerinin araştırılmasında *Saccharomyces cerevisiae* model sistem olarak kullanılmaktadır.

1.2. Araştırmanın Amacı

Klinik bulguları farklı Wilson Hastalarında saptanan T788I (hem karaciğer tutulumu hem nörolojik bozukluk), V1036I (sadece nörolojik bozukluk) ve R1038G-fsX83 (sadece karaciğer tutulumu) mutasyonlarının bakır taşınımındaki etkilerini saptamak üzere *ATP7B* geni ve mutantları (T788I, V1036I ve R1038G-fsX83), CCC2 geni çıkarılmış *Saccharomyces cerevisiae*'ya transformasyonlarının yapılarak model sistemin kurulması ve bakır miktarındaki değişimin saptanması amaçlanmaktadır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 mutasyonlarında yaban tip *ATP7B*'ye göre kültür ortamındaki bakır miktarında azalma olacağı; buna bağlı olarak hücre pelletlerinde mutasyonları taşıyan *ATP7B*'de yaban tip *ATP7B*'ye göre bakırın artacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte mutasyonlar arasında da kendi içinde bakır taşınımı açısından farklılık beklenmektedir.

2. Genel Bilgiler

2.1 Wilson Hastalığının Tarihçesi

1912’de İngiliz nörolog Samuel Alexander Kinnier Wilson, 7 hastada karaciğer sirozuyla bağlantılı nörolojik ailesel bozukluğu rapor etti ve buna ‘İlerlemiş Lentikular Dejenerasyon’ dendi (1). Aynı yıl, Fleischer WH’nin korneal pigmentasyonun, nöropsikiyatrik semptomun ve karaciğer sirozunun bir kombinasyonu olduğunu tanımladı (2). Bu bulgular, şu anda Wilson Hastalığı olarak bilinen bozukluktan bahseden ilk yayınlardır. 1948’de Cumings, hastaların karaciğerinde ve beyin dokusunda bakırın fazla miktarını saptayarak WH’nin patogeneğinde bakırın rolünü tanımladı (3). Scheinberg ve Gitlin, 4 yıl sonra Wilson hastalarında serum seruloplazmin defektini rapor ettiler bu da günümüzde yaygın olarak kullanılan tanısal testlerden birinin temelini oluşturmaktadır (4).

1960 yılında, Bearn WH’nin otozomal resesif kalıtıldığını gösterdi (5). 1985’te Frydman ve arkadaşları WH geninin linkage ile 13q14.3 bölgesinde bulunduğunu saptadılar (6). 1993’te WH ile ilgili proteini kodlayan gen klonlandı ve katyon taşıyıcı p-tipi ATPaz ailesinin yeni bir üyesi olduğu gösterildi (7). Aynı yıl Bull ve arkadaşları (7), Tanzi ve arkadaşları (8) WH ile ilgili genin *ATP7B* geni olduğunu gösterdiler. 1995’te Thomas ve arkadaşları (9), Figus ve arkadaşları (10) *ATP7B* geninde gözlenen mutasyonları ve bunların klinik yansımalarını tanımlamışlardır.

2.2 Wilson Hastalığının tanımı, ATP7B geni işlevi, Wilson Hastalığı ile ilişkisi

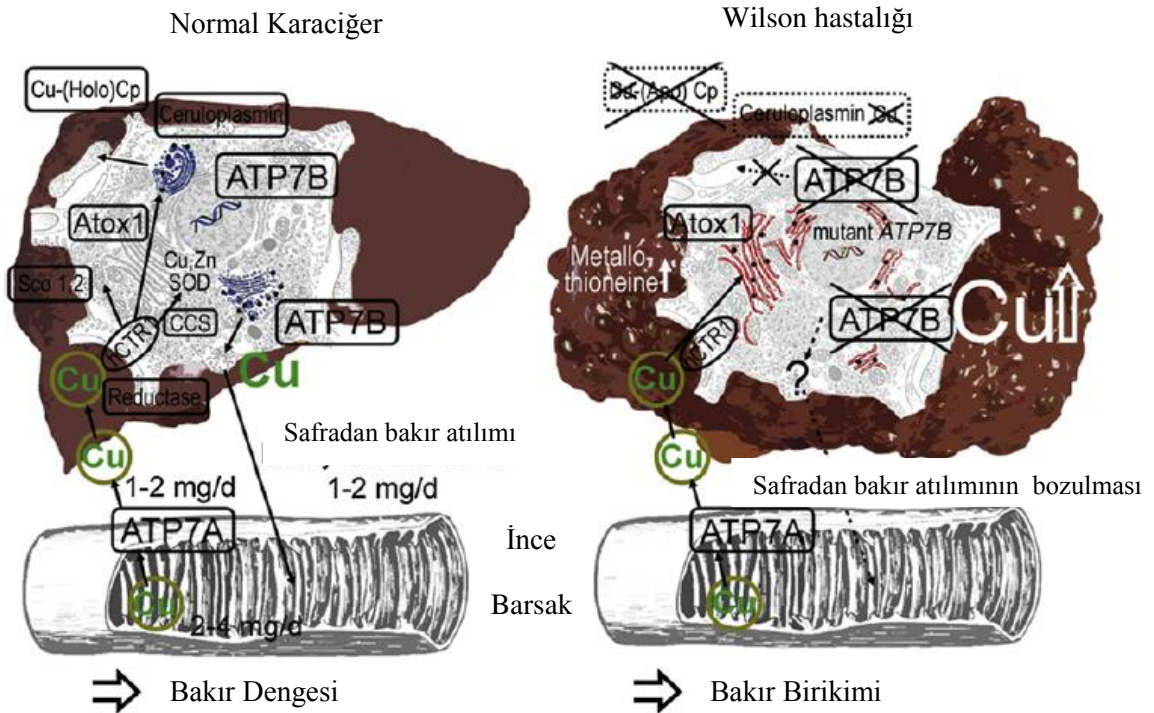
WH (MIM 277900) bakır artışına bağlı olarak tutulum gösterdiği organda bakır birikimine yol açan otozomal resesif kalıtım gösteren bir hastalıktır. WH'nin dünya genelinde prevalansı bazı toplumlarda daha yüksek olsa da yaklaşık olarak 1/30000, taşıyıcılığı 1/90'dır (11). WH, doğal gereksinimi karşılayacak bakırın fazlasının, karaciğerde işlenerek safra yoluyla atılamaması sonucu çeşitli organlarda birikimiyle ortaya çıkar. Bu bozukluk değişken düzeyde karaciğer hasarına ve nörolojik bozukluklara neden olur. Bakırın başta karaciğer olmak üzere, beyinde, böbrekte, korneada (Kayser-Fleischer halkası) ve dalakta birikmesine bağlı olarak; çocukluk çağında genellikle karaciğer hasarıyla başlayan, yaş ilerledikçe nörolojik bozuklukların gözlemlendiği erken yaşlarda tedavi edilmezse ölümcül olabilen, ailesel geçişli WH bulguları ortaya çıkmaktadır (12,13-22).

Yeryüzündeki bütün organizmaların bakıra gereksinimi vardır (10,15). Canlıda elektron transfer reaksiyonlarında ve birçok metabolik olayda yer alan enzimlerin yapısında kofaktör olarak rol almasına bağlı olarak bakır, yaşamsal bir moleküldür (10,12). Sağlıklı beslenen bir kişide günlük gastroentestinal sistemden alınan bakır ortalama 1-2 mg arasındadır (11).

Vücuttaki bakır dengesi, gastroentestinal sistemden emilim, gereken yapılarda kullanım ve fazlasının safradan atılımı arasındaki koordinasyonla korunur. Bakırın yapısında yer aldığı enzimler arasında Sitokrom-c oksidaz (Mitokondrial enerji üretimi), Ferroksidaz (Demir homeostasisi), Mn^{+2}/Cu^{+2} süperoksit dismutaz (Serbest radikal detoksifikasyonu), Tirosinaz (Melanin oluşumu) Dopamin-b hidrolaz (Nörotransmitter sentezi) yer almaktadır (12,10-18). Bakır yokluğunun birçok ciddi sonuçları vardır ve bu X kromozomuna bağlı Menkes Hastalığıyla ilişkilendirilmiştir. Bu hastalık bağ dokusu bozukluğuyla, ağır nörodejenerasyon ve erken ölümle karakterizedir. *ATP7A* genindeki mutasyonlar bu genetik bozukluğa neden olur. *ATP7A* proteini *ATP7B* ile homoloji gösterir, kardeş molekül olarak adlandırılırlar. *ATP7A* bağırsak ve mide gibi karaciğer hariç birçok doku da eksprese edilir. İnsanda bakır metabolizmasında bozulmaya yol açan genetik temelli Menkes ve Wilson hastalıkları tanımlanmıştır. Menkes hastalığında organizma yeterli bakırı bulunduramamaktadır. Hastalıkla ilgili genetik değişiklik taşıyan fetusun gelişiminde bakır nakli gereğince başarısız olduğundan, bakır bağımlı enzimlerin aktiviteleri azalmakta, ciddi mental gerilik, bağ dokusu anormallikleri oluşmakta ve 3 yaş civarında hasta kaybedilebilmektedir (12,14,19).

Bakır insan organizması için gerekli bir iz elementtir. Birçok proteinler arası kompleks ve hassas etkileşimin devam ettirilebilmesi için hücre içi bakır dengesi gereklidir. Karaciğer, insan organizmasında bakırın alımı, dağılımı ve atılımında önemli rol oynar. ATP7B, bakır taşıyıcı P-tipi ATPaz (WH proteini), hepatik bakır metabolizmasında merkezi düzenleyicidir. *ATP7B* genindeki mutasyonların sebep olduğu ATP7B proteininin işlev bozukluğu WH'ye yol açar (11,19).

Bakırın serbest hali redoks özelliğinden dolayı hücre için zararlıdır; membran, enzimler veya DNA gibi hücresel bileşenlere saldırır. Bu nedenle spesifik proteinler hücreyi yüksek bakır aktivitesinden korur. Bakır şaperonları olarak adlandırılan bu moleküller bakıra bağlanır ve farklı hücre bölümlerine gidişte veya enzimlere aktarımda bakırı yönlendirirler. Hücresel bakır artışı durumunda koruma sistemi başarısız olursa artan bakır redoks potansiyeliyle oksidatif strese neden olur; bu da hücre bütünlüğünün ve fonksiyonunun bozulmasıyla sonuçlanır. Bundan dolayı bakır dengesinin optimum düzeyde olması önemlidir. Bakır homeostazında majör düzenleyici protein olan ATP7B hepatositte genellikle trans-golgi ağında yer alır. Bu büyük membran proteini bakırı seruloplazmin molekülüne taşır. Eğer sitozolik bakır artarsa, ATP7B safradan bakır atılımını sağlar (11).



Şekil 1 : Normal ve Wilson Hastalığındaki karaciğerde bakır homeostasisi (11)

ATP7B genindeki çeşitli mutasyonlar, aminoasit değişimine neden olarak proteinin yapı ve fonksiyonunu farklı düzeylerde değiştirir, bunu karaciğerde bakır birikimi izler. Hücre içerisinde olması gereken miktardan fazla bakır bulunması toksik etki yaratır; karaciğer hastalıklarına ve beyinde bakır toksisitesine bağlı nörolojik ve psikiyatrik bozukluklara neden olur. Beyinde bakır birikiminin ve toksisitenin detaylı mekanizması bilinmemektedir. Fazla miktarda serbest bakırın kan dolaşımına verilmesini takiben nöronlarda bakır birikmesi olası mekanizmadır ancak bu varsayım için deneysel bulgu azdır (11).

WH'de, genç hastaların yaşamlarının birinci ve ikinci on yılında hepatik bozukluk, mutasyonun yerine ve etkisine bağlı olarak ilerleyen yaşlarda geç ikinci ve üçüncü on yılında nörolojik veya psikiyatrik semptomlar gözlenir. Hastaların az bir kısmında ilk bulgular yaşamlarının geç döneminde ortaya çıkar. Tedavi (D-penicilamin, trientin çinko gibi) ile semptomatik hastalarda hastalığın ilerlemesi önlenir ve durdurulabilir; eğer hastada bulgular oluşmadan tedavi başlanırsa semptomların gelişimi engellenir. Mevcut klinik ve biyokimyasal testler WH tanısı konmasında yeterli olsa da karaciğer ve nörolojik bulguların çok geniş aralıkta fenotipik özellikler göstermeleri klinisyenlere tanı koymada zorluk yaşatmaktadır (23). Tanı konmasındaki bu zorlukların ortadan kaldırılması için klinik, biyokimyasal, patolojik bulgular ve moleküler testlerden oluşan bir skorelama sistemi 2003 yılında Ferenci ve arkadaşları tarafından oluşturuldu (Tablo 1).

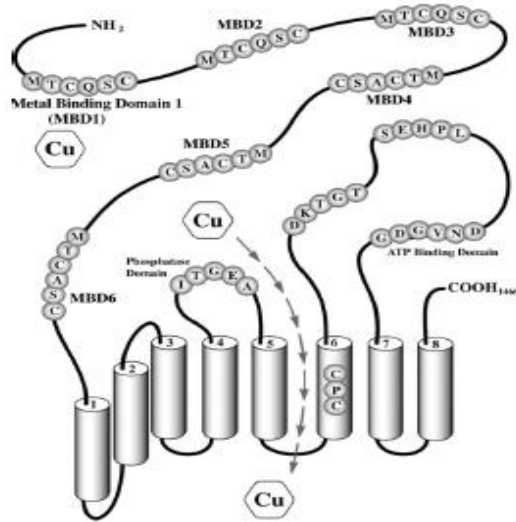
Tablo 1 incelendiğinde hastalığa neden olan mutasyonların her iki kromozomda görülmesinin skor 4 , bir kromozomda görülmesinin skor 1 olarak belirlenmesi ve Wilson Hastalığı tanısında skor 4 ve üstünün tanı konması için yeterli olduğu göz önüne alındığında, mutasyon analizinin önemi ve gerekliliği ön plana çıkmaktadır (24).

Tablo1:Wilson hastalığının tanısı için skorlama sistemi (24)

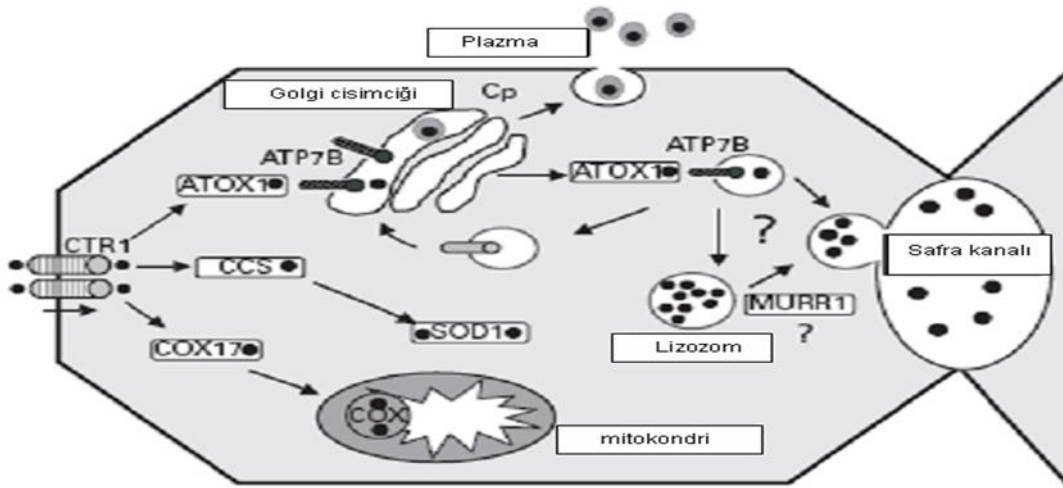
Semptomlar	Skor
-KF-halkası	()
Var	2
Yok	0
-WD'yi gösteren nöropsikatrik semptomlar	()
(veya tipik beyin MRI *)	
var	2
yok	0
-Coombs negatif hemolitik anemi(+yüksek serum bakır)	()
var	1
yok	0
-Laboratuar testleri	
Üriner bakır(akut hepatitis yokken)	()
Normal	0
1-2X NÜL	1
>2X NÜL	2
Normal Fakat bir 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-seroloplazmin oksidaz tayini ile ölçüldüğü zaman diğer değerlere başvurulur. NÜL:Normalin üst limiti, KF:Kayser-Fleischer.

Hastalığın moleküler temeline yönelik araştırmalarda, insanda hepatositte, bakırın gerekli olan miktarının düzenlenmesinde ve ihtiyaçtan fazla olan bakırın atılmasında kromozomal yerleşimi 13q14.3 olarak belirlenen *ATP7B* geni ürünü, ATP7B proteininin kritik bir işlevi olduğu saptandı (12,19-21). Bu protein katyon taşıyıcı P-tipi ATPaz ailesinin üyesidir. ATP7B proteini, altı bakır bağlama bölgesi, sekiz transmembran segment, ATP'nin hidroliziyle oluşan enerjinin katyon taşınmasında kullanılmasından sorumlu bir transduction domain, bir fosforilasyon bölgesi, bir transmembran katyon kanalı, bir ATP bağlama domaininden oluşmuştur (12-18,22,25). Bu domainlerin bakırın hücre içinde taşınmasında ve fazlasının atılmasında önemli rolleri vardır. Proteinin bu domainlerinin şifrelendiği DNA dizisinde meydana gelen mutasyonlar, proteinin üç boyutlu yapısında değişimler meydana getirerek işlevini yerine getirememesine neden olabilmektedir (26-30).



Şekil 2: ATP7B proteinin şematik gösterimi (31).



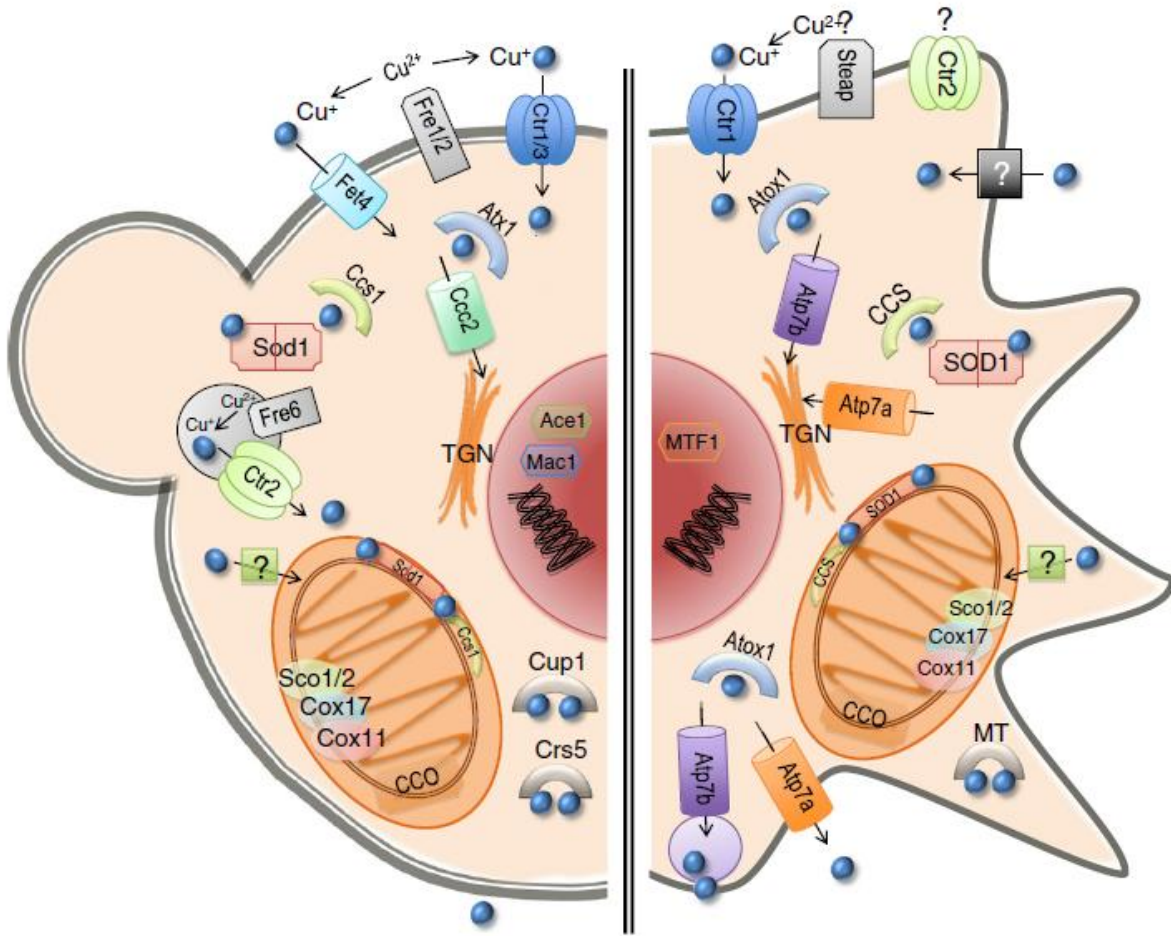
Şekil 3: Hepatositte bakır taşınımını şematik şekli (32)

Hücre içerisinde bakırın yönlendirilmesinde rol oynayan ATP7B düşük düzeyde bakır olması durumunda trans-Golgi membranına yerleşip apo-seruloplazmine bakır bağlanmasını sağlayarak seruloplazminin oluşmasını sağlar ve bakır kan dolaşımına taşınmaktadır. Ancak gereğinden fazla bakır bulunduğunda ATP7B sitoplazmik membran keseciklerine yerleşerek, aşırı bakırın hepatositte safra kanalına atılımını yönlendirmektedir.

Saccharomyces cerevisiae'da bakırın taşınmasından ve atılmasından sorumlu olan ve insandaki ATP7B geninin ortoloğu CCC2 geni olup ürünü Ccc2p proteindir. ATP7B proteininin farklı bölümlerinin, bu bölümlerde yer alan amino asitlerin, ATP7B geninde Wilson hastalığına yol açan farklı mutasyonların protein işlevinde etkilerinin fonksiyonel analiz kapsamında araştırılmasında *Saccharomyces cerevisiae* model sistem olarak kullanılmaktadır (20-22,25,28-30,33-36,37,38). Ayrıca farklı hücre kültürlerinde bakır taşınımında normal ve mutant ATP7B gen ürünü proteinin etkileri değerlendirilmektedir (39,40). Bu çalışmalara ek olarak hayvan model sistemleri de kullanılmaktadır (41-43). ATP7B geninin işlevi ve aktarımlarından elde edilen deneyimlerle, gen nakliyle Wilson hastalığının hayvan modelinde sağaltımı da denenmiştir (43).

Model ökaryot olarak *Saccharomyces cerevisiae*'nın, mayadan memeliye korunmuş hücre biyolojisinin temel yönlerinin anlaşılmasında önemli bir araç olduğu kanıtlanmıştır. Bu bağlamda maya bakır metabolizmasında yer alan proteinlerin ve ligandların tanımlanmasındaki gelişmeler memeli hücrelerindeki benzer görevi yürüten ortolog

moleküllerin, yapıların tanımlanmasında ve işlevlerinin belirlenmesi aşamalarında kritik veriler sağlamıştır (44).



Şekil 4: Ökaryotlarda bakır homeostasisi: Bakırın algılanması, alınması, hücre içi dağılımı ve hareketinde görevli olan ökaryotik proteinler. Soldaki model, *Saccharomyces cerevisiae*'de, sağdaki ise genel olarak memeli hücrelerindeki bakır homeostasisini göstermektedir (44).

Sürdürülen değişik araştırmalarda *ATP7B* geninde hastalıkla ilişkilendirelen 300'den fazla mutasyon tanımlanmıştır ve bunlar uluslararası veri tabanlarında 'Wilson Disease Mutation Database' ve 'Non-Disease Causing Variant Database' olarak Dr.Diane W.Cox tarafından yayınlanmaktadır (45).

Yüksek lisans tez çalışmasıyla (DEU BAP 2005.KB.SAG.024) başlanan (26 Wilson hastasında *ATP7B* geninin 8, 12, 13, 14 ve 17 nolu ekzonlarında DNA dizi analizi yöntemiyle mutasyonlar tarandı) ve doktora tez çalışmasıyla (DEU BAP 2010.KB.SAG.003) gelinen noktada genin 21 ekzonunun optimizasyonu tamamlandı ve 46 akraba olmayan ailede 5 yeni

mutasyon ve 1 yeni SNP tanımlandı. Saptanan mutasyonlar kontrol grubu (52 birey 104 kromozom) ile birlikte değerlendirilerek, 2009 yılında güncellenen uluslararası Wilson Hastalığı veri tabanında saptadığımız 5 yeni mutasyon ve 1 yeni SNP, adımıza 141.referans olarak kayıtlanıp Türk Hastalarında tanımlı DNA dizi değişiklikleri olarak kayıtlara girmiş oldu (45).

Güncellenen veri tabanında mutasyonların değerlendirilmesinde fonksiyonel analizin yapılmasının bir standart olarak yer aldığı gösterilmiştir.

Uluslararası veri tabanına bildirilen 5 yeni mutasyondan klinik bulgularına göre ve sadece karaciğer tutulumu, sadece nörolojik tutulum veya her ikisinin bulunmasına göre değerlendirilen farklı 3 mutasyon T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 deney modelinde bakır taşınımındaki farklılıkların test edilmesi amacıyla belirlendi.

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Araştırmanın tipi:

Deneysel nitelikte araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Araştırma 2006-2012 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD ve İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yapılmıştır.

3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme:

46 Türk Wilson Hastasında tanımladığımız ve 104 normal kromozomda (kontrol grubu) saptamadığımız, literatürde bulunmayan ve klinik bulgularındaki farklılığa göre seçilen T788I, V1036I, R1038G-fsX83 mutasyonlarının, hastalıkla ilişkili ATP7B geninin yaban tip formunun, pAG426 maya ekspresyon vektörünün (boş vektör) *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0) suşundan elde edilmiş CCC2 geni mutant BY4741 Δ CCC2(YDR270w) maya suşuna aktarılması ile araştırma evreni oluşturulmuştur.

3.4. Çalışma materyali:

Araştırmada kullanılan tüm kimyasal maddeler Applichem ve Sigma marka; moleküler çalışmalara uygun standarttır.

Atasal HepG2 hücre hattından izole edilen total RNA kalıp kullanılarak cDNA elde edildi ve ATP7B geni (4459bp) bu cDNA kullanılarak PCR ile çoğaltıldı (DEU Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD Prof.Dr.Neşe Atabey'den alınarak kullanıldı).

Saccharomyces cerevisiae BY4741 Δ CCC2 mutant maya suşu transformasyon deneylerinde kullanıldı (IYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik AD'dan Doç. Dr. Ahmet Koç'tan alınarak kullanıldı).

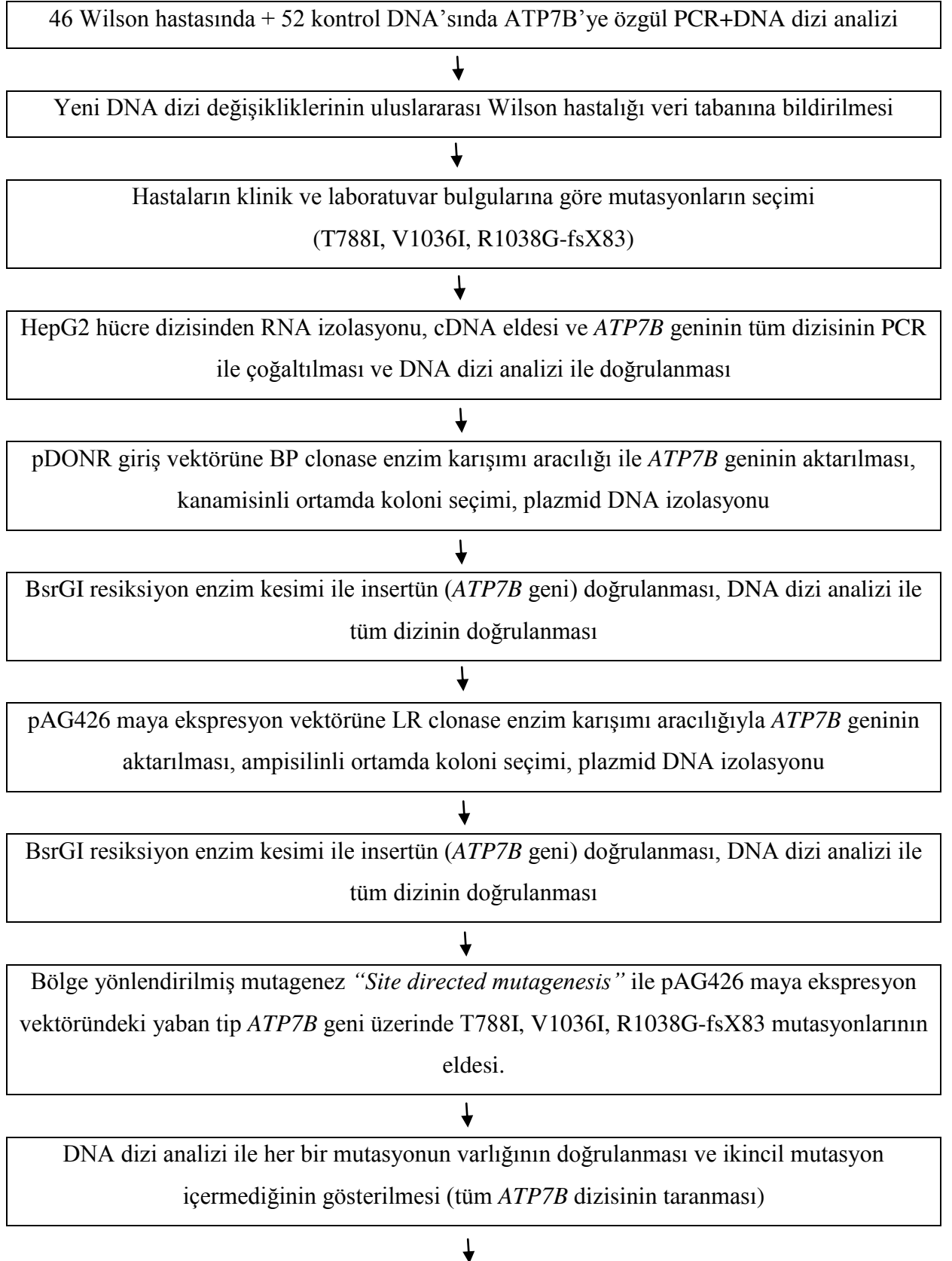
3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

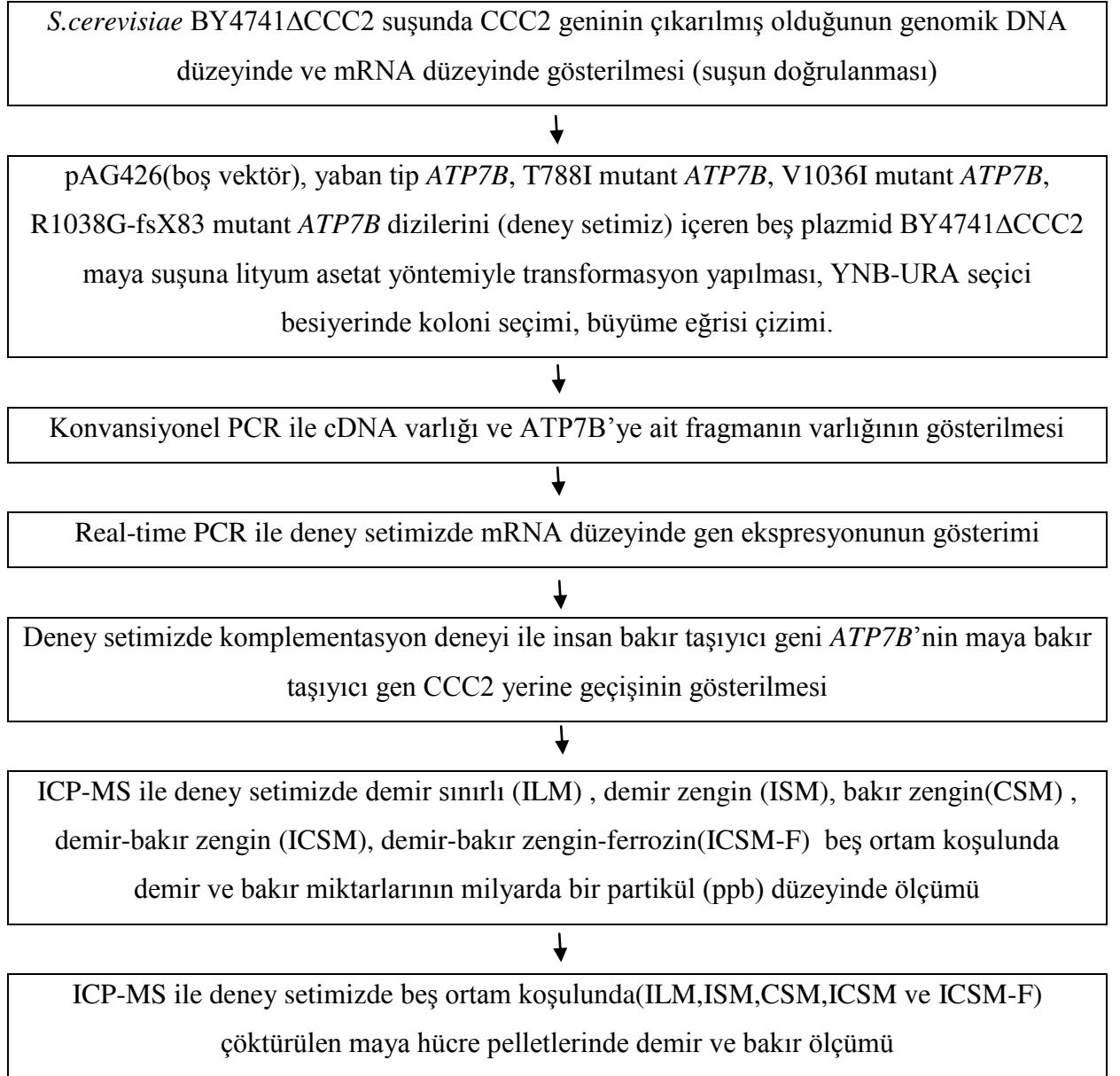
Kontrol değişkeni: Yaban tip ATP7B (pozitif kontrol), pAG426 maya ekspresyon vektörü (negatif kontrol).

Bağımsız değişken: ATP7B genindeki T788I, V1036I, R1038G-fsX83 mutasyonları

3.6. Veri toplama araçları

Deneylerin Akış Şeması





Şekil 5: Araştırmadaki deneylerin akış planı

3.6.1 Wilson Hastalarında *ATP7B* geninde mutasyonların tanımlanması

46 akraba olmayan Wilson Hastasından ve 52 sağlıklı bireyden elde edilen DNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak *ATP7B* geni 21 ekzonuna özgül primerler ile PCR reaksiyonu aşağıda belirtilen profil kullanılarak Tablo 2’de belirtilen koşullarda optimize edildi.

PCR profili:

95 °C	5dk	32-36 döngü
94 °C	1dk	
55-62 °C	1dk	
72 °C	1dk	
72 °C	5dk	
4 °C	24saat	

Tablo 2 : *ATP7B* geni 21 ekzon PCR optimizasyon koşulları

<i>ATP7B</i> Geni Ekzon Numarası	T _m (°C)	Döngü sayısı	Fragman uzunluğu(bp)	Referans Numarası
1.ekzon	60	34	262	46
2.ekzon	55	34	1381	46
3.ekzon	60	34	426	46
4.ekzon	60	34	269	46
5.ekzon	60	34	365	46
6.ekzon	55	34	217	46
7.ekzon	56	33	317	46
8. ekzon	59	36	365	46
9.ekzon	55	34	265	46
10.ekzon	61	32	296	46
11.ekzon	55	34	295	46
12.ekzon	55	36	246	46
13.ekzon	59	36	255	13
14.ekzon	62	36	337	46
15.ekzon	56	33	270	46
16.ekzon	55	34	296	46
17.ekzon	62	36	306	46
18.ekzon	55	34	366	46
19. ekzon	56	33	205	46
20. ekzon	56	33	253	9
21. ekzon	60	34	361	9

ATP7B genini 15 parçaya ayıran primerler ve klonlamada kullanılacak primerler tarafımızca dizayn edildi (Oligos primer analysis software v.6). Tablo 3’te tüm primerlere ait diziler gösterildi.

Tablo 3: *ATP7B* geni primerleri

K1F	5' CCGACCAGGTGACCTTTTGCTCTG 3'
K1R	5' AATGCTGGCCTCGAAGCCCAT 3'
K2F	5' GTGAAGTCCATTGAGGACAGGATTTC 3'
K2R	5' TGGGTTAGTGCTTTGTAACCGCT 3'
K3F	5' CTCCGGAAACTGCAAGGAGTAGTG 3'
K3R	5' GGCTCCATCAGGAAGAGAACTTTA 3'
K4F	5' AATATTGAAGAAAATATTGGCCAG 3'
K4R	5' AAATCCCATGTCTTCTATAGCAGC 3'
K5F	5' GTCCATTCCATTGAAGGCATGATCT 3'
K5R	5' AGGCAACCAACACGGAGAGAACAC 3'
K6F	5' CCCC GGACATCTTGGCAAAGTC 3'
K6R	5' AGGGCAACGGAGGCATAAGTGAT 3'
K7F	5' TATGACCCAGAGGTCATCCAGCC 3'
K7R	5' ATGACAGGGATGCCAAACACCAG 3'
K8F	5' TTGTTAAGTTTGACCCGGAAATTAT 3'
K8R	5' TGCTTGTGGCCAGGACGATGAG 3'
K9F	5' TCCAGGACTGTCCATTCTAAATCTCAT 3'
K9R	5' CCTTCCAGGACTTTCCCATCCA 3'
K10F	5' TCAGAAGCCCTGGCTAAACTCAT 3'
K10R	5' CAAAATCGATAAAACCGATTACAAT 3'
K11F	5' GGCAATGACACCACTTTGGGCTC 3'
K11R	5' CTCCGCAGTCCCCACCACAG 3'
K12F	5' ATCCTCATCAAGGGAGGCAAGC 3'
K12R	5' CATCGCTAGAAATGGTTAAACCGT 3'
K13F	5' TCACCTGAATGAGGCTGGCAGCCTT 3'
K13R	5' ACGACGTCGGCTGCCTCGATGG 3'
K14F	5' AGAGGTGCTGCCTTCGCACAA 3'
K14R	5' GATGCCGTCAGGGGCTTCAT 3'
K15F	5' GTGTCTTCATGCCCATCGGCATTG 3'
K15R1	5' TTGTGGTGAGTGGAGGCAAGTCCCT 3'

K15R2	5' GAGTCCAAGACAAAGCCCATGCTGAC 3'
BP1F	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCGACCAGGTGACCT TTTGCTCTG 3'*
BP1R	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTGTTGGTGAGTGGAGGC AAGTCCCT 3'**
BP2F	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCCTGAGCAGGAGA GACAGATCAC 3'*
BP2R	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGATGTACTGCTCCTCA TCCCT 3'**

*Gateway primerlerinde, siyah renkli nükleotidler attB1 ait diziyi, kırmızı renkli nükleotidler *ATP7B* genine ait bölgeyi içerir.

** Gateway primerlerinde, siyah renkli nükleotidler attB2 ait diziyi, kırmızı renkli nükleotidler *ATP7B* genine ait bölgeyi içerir.

Hepatoselüler karsinoma hücre dizisi atasal HepG2 hücre hattından hücre lizatı hazırlandı. RNA izolasyon kiti ile (Qiagen RNeasy Mini kit Cat no:74104) HepG2 hücre lizatından total RNA izole edildi. Total RNA kullanılarak cDNA sentez kiti ile cDNA elde edildi.(Invitrogen Superscript II cDNA sentez kiti kat no: 11904-018).

RNA izolasyonun ve cDNA'nın varlığının kontrolü için beta aktin genine özgül primer çifti kullanılarak ile PCR reaksiyonu kuruldu (Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD Dr.Ogün Sercan'nın izniyle kullanıldı).

Primer dizileri:

Beta-aktin (F) : 5' ATCATGTTTGAGACCTTCAA 3'

Beta-aktin (R) :5' CATCTCCTGCTCGAAGTCCA 3'

3.6.2 *ATP7B* geni PCR optimizasyonu

Reaksiyon Bileşenleri

dH ₂ O	34 µl
5X Phusion HF buffer	10 µl
MgCl ₂ (50mM)	0.5 µl
dNTPmix(10mM)	1 µl
K1F (10pmol)	1 µl
K15R1 (10pmol)	1 µl
HepG2 cDNA	2 µl
Phusion High Fidelity DNA polimeraz (Finnzyme F-530S)	0.5 µl
	50 µl

PCR Profili:

98 °C	30sn	35 döngü
98 °C	10sn	
74 °C	30sn	
72 °C	3dk 30sn	
72 °C	5dk	
4 °C	24saat	

ATP7B'ye ait 4459bp'lik fragman jelden UV altında kesildi jel ekstraksiyon kiti kullanılarak fragman jelden izole edildi (Qiagen MinElute Gel Extraction kit kat no:28604).

3.6.3 Klonlama:

Besiyerlerinin tanımlanması

LB Agar

10g tripton

5g maya özütü(yeast extract)

5g NaCl

NaOH ile pH 7.0 yapıldı, distile su ile 1000ml'ye tamamlandı.

Ampisilinli LB plate

15g agar 1 litre LB ortamına eklendi, 121°C'de 15 dakika otoklavlandı, ortam 50 °C'ye soğutuldu, son konsantrasyonu 100µg/ml olacak şekilde ampisilin eklendi, petri kaplarına döküldü +4 °C'de saklandı.

Kanamisinli LB plate

15g agar 1 litre LB ortamına eklendi, 121°C'de 15 dakika otoklavlandı, ortam 50 °C'ye soğutuldu, son konsantrasyonu 50µg/ml olacak şekilde kanamisin eklendi, petri kaplarına döküldü +4 °C'de saklandı.

Maya Üreme Ortamları:

YPD(Zengin Besiyeri)

10g Bacto maya özütü(yeast extract) (%1)

20g Bacto pepton (%2)

20g Glukoz (%2)

Distile suyla 1000ml'e tamamlandı.

20g Bacto agar (%2) katı besiyerine eklendi.

YNB-URA (Seçici besiyeri)

Hartwell's complete (HC) medium (1000ml)

100ml %20 Glukoz

100ml 10X YNB

100ml 10X HC

- urasil

20ml adenin

12ml lysine

8ml triptofan

4ml lösin

2ml histidin

Katibesiyeri hazırlamak için 20g agar 1L için eklendi, 121°C'de 15 dakika otoklavlandı, 50 °C'ye soğutulup petri kaplarına döküldü.

10X HC (6 dropout aminoacid liquid)

0.8g metionin

2.4g tirozin

3.2g izolösin

2.0g fenilalanin

4.0g glutamik asit

8.0g treonin

4.0g aspartik asit

6.0g valin

16.0g serine

0.8g arjinin

4 litreye distile su ile tamamlandı, 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

10X YNB

58g yeast nitrogen base (aminoasitsiz ve amonyum slfatsız)

200g amonyum sülfat

4 litreye distile su ile tamamlandı, 121°C'de 15 dakika otoklavlandı.

Aminoasit solüsyonları

1g/L urasil

1g/L adenin

10g/L lizin

10g/L triptofan

20g/L lösin

10g/L histidin

Her bir solüsyon 121°C’de 15 dakika otoklavlandı. Triptofan koyu renkli şişede saklandı.

Gateway Sisteminin Temel Prensipleri (Invitrogen Gateway clonase sistemi):

Bakteriyofaj λ ’nın bölgeye özgül rekombinasyon sistemi temeline dayanır. λ temelli rekombinasyon 2 temel komponent içerir:

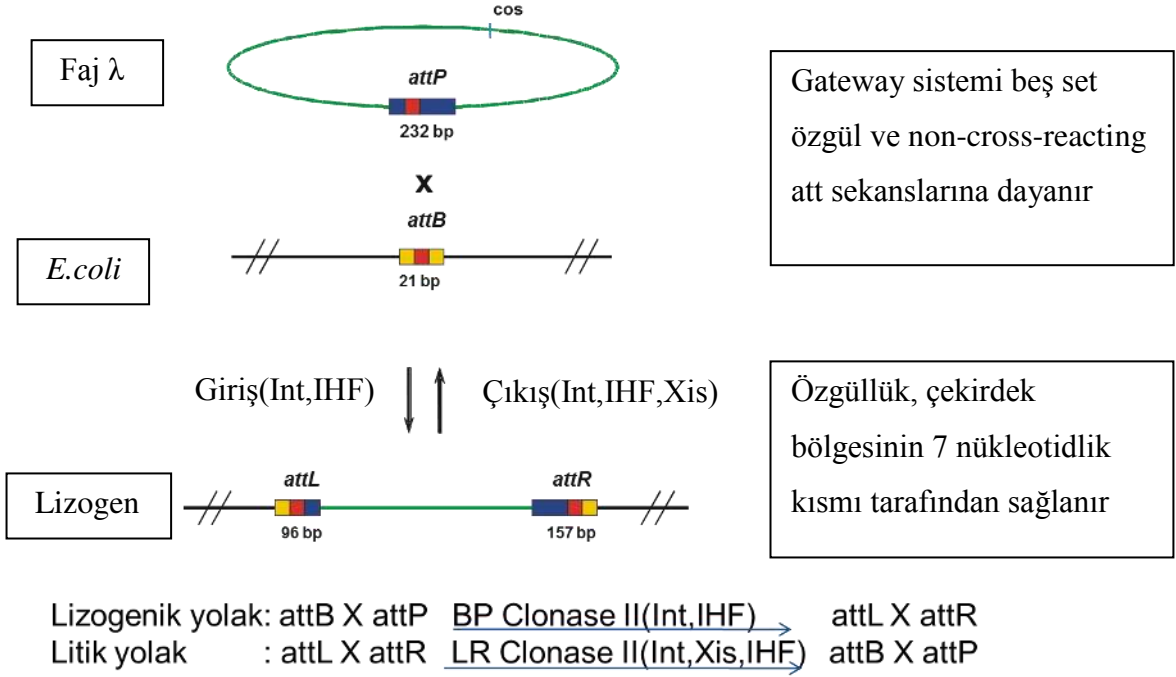
- DNA rekombinasyon sekansları (att bölgeleri)
- Rekombinasyona aracılık eden proteinler (Clonase II enzim karışımları)

Bakteriofaj lambda’da att bölge rekombinasyonu iyi tanımlanmış bir fenomendir.

Bakteride, *attB* (B bakteriyi temsil eder) ve fajda *attP* (P fajı temsil eder) adı verilen DNA bölgeleri bulunur. Faj bir bakteriyi enfekte ettiğinde, lambda DNA’sı girişe özgül enzimlerin varlığında att bölgeleri aracılığıyla bakteri DNA’sına rekombinasyon olur. Bir *attB* bölgesi ile *attP* bölgesi arasında rekombinasyon olduğunda, faj DNA’sı bakteri genomuna girer.

Eğer faj litik faza girerse, faj DNA’sı kendini bakteri DNA’sından çıkarabilir. Farklı rekombinasyon setlerinin ve çıkış enzimlerinin varlığında *attL*(L sol) bölgesi *attR*(R sağ) bölgesi ile rekombinasyon olur ve bu durum faj DNA’sının bakteri genomundan ayrılmasıyla sonuçlanır. Bu rekombinasyon reaksiyonları (“LR” and “BP”) Gateway® Klonlama sisteminin temellerini oluşturur.

E.coli'de Faj lambda rekombinasyonu

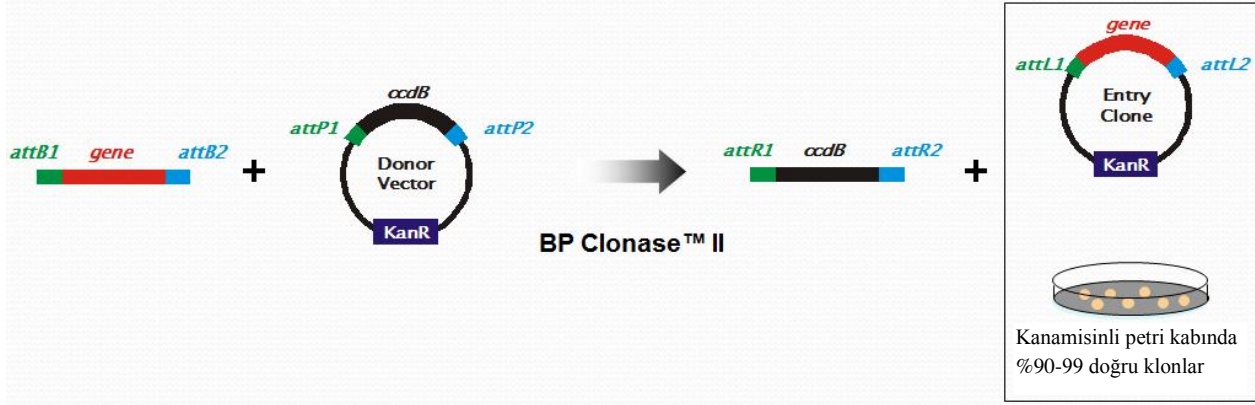


Şekil 6: Gateway sisteminin şematik gösterimi

The Gateway[®] *in vitro* rekombinasyon sistemi 5 yapay ortogonal att sekansları temeline dayanır. Bunlar attP, B, L, and R sekanslarıdır ve paralel çalışırlar. Özgüllük, att sekansları boyunca minimal çapraz reaksiyon yapılmasını sağlayan tek 7bp'lik çekirdek sekans tarafından belirlenir.

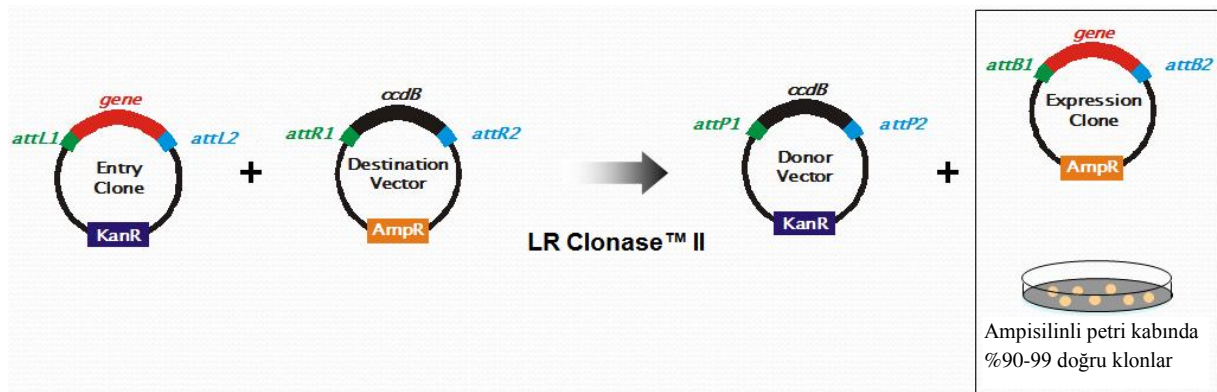
BP reaksiyonunda, attB ile attP reaksiyona girerek attL ve attR bölgelerini oluşturacak yapıyı sağlarlar. Giriş klonunu oluşturmak için, yapay kısa attB sekansları (attB1 ve attB2) amplifiye edilmesi istenen gene özgül primerlere eklenmelidir. DNA fragmanı attP1 ve attP2 sekanslarını ve counterselectable marker, ccdB'yi içeren bir donör vektörle birlikte. BP Clonase[™] enzim karışımının eklenmesiyle giriş vektörü ve beraberinde ccdB'yi içeren fragman ürün olarak oluşur. Donör vektördeki kanamisin (Kan) direnç geni oluşuna bağlı olarak giriş klonu kanamisinli platelerde seçilir.

BP rekombinasyon işlemi yüksek etkinliktedir, genellikle reaksiyon başına 10,000'den fazla koloni oluşur. Elde edilen toplam koloni sayısının %90'ından fazlasının, doğru yönde yerleşmiş ilgilenilen genle birlikte giriş klonunu içermesi beklenmektedir.



Şekil 7: Gateway sisteminde BP Clonase II reaksiyonunun şemataik gösterimi

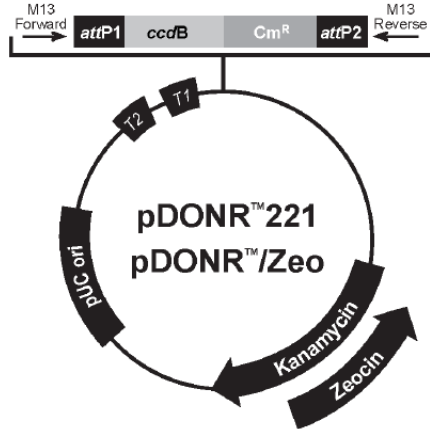
Benzer şekilde ekspresyon klonu, *attR1* ve *attR2* sekanslarını ve aynı counterselectable marker *ccdB*'yi içeren spesifik bir destination vektör ile giriş klonunun rekombinasyonu yoluyla oluşur. LR Clonase™ enzim karışımının eklenmesiyle ekspresyon klonu ve beraberinde *ccdB*'yi içeren plasmid ürün oluşur. Destination vektördeki ampisilin direnç geninin varlığına bağlı olarak, ekspresyon klonları ampisilin (Amp) içeren platelerde seçilir.



Şekil 8: Gateway sisteminde LR Clonase II reaksiyonunun şematik gösterimi

Çalışmada Kullanılan Giriş Vektörü:

pDONR 221 giriş vektörü olarak kullanılmıştır. Kanamisin direnç geni içerir, kanamisinli ortamda koloni oluşumu saptanır, bu özelliğiyle koloni seçimi yapılır.

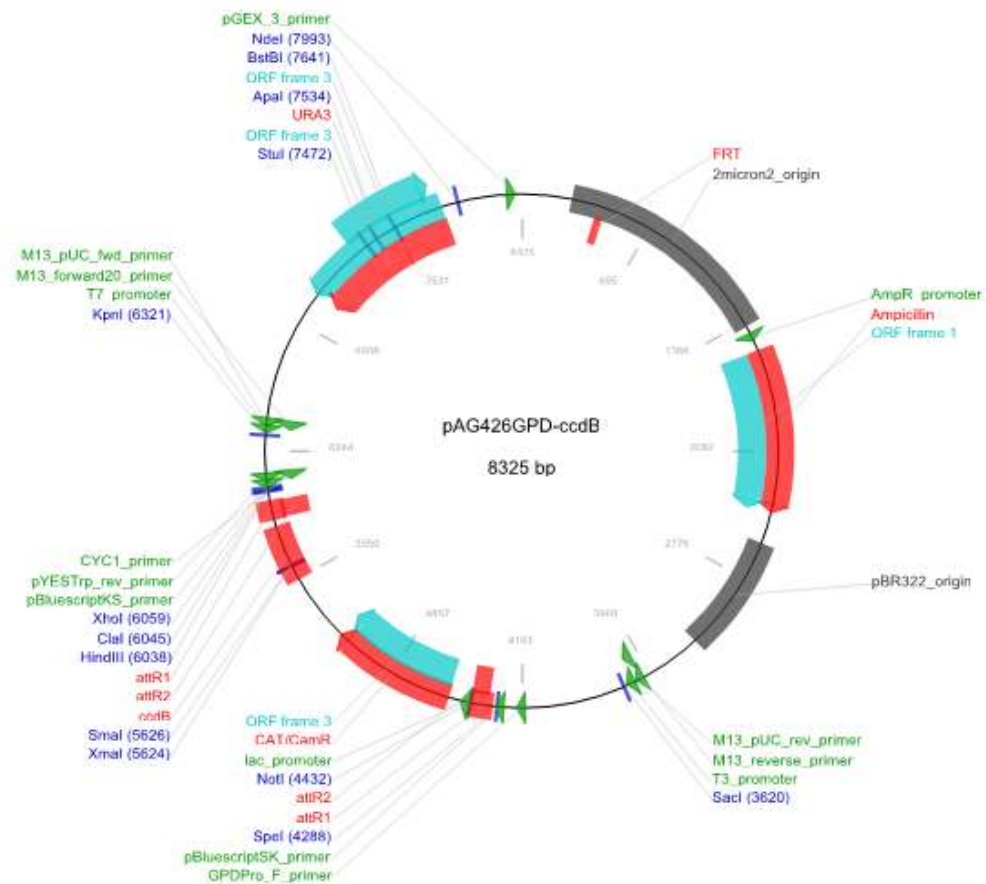


Şekil 9: pDONR vektörün (giriş vektörünün) şematik gösterimi

Çalışmada Kullanılan Maya Ekspresyon Vektörü:

pAG426 maya ekspresyon vektörü olarak kullanıldı. Ampisilin direnç geni içerir, ampisilinli ortamda koloni oluşumu saptandı, bu özelliğiyle koloni seçimi yapıldı.

URA3 geni içerir, üreme ortamına urasil konmadan besiyeri hazırlandı maya hücreleri ekildi, vektörü içeren koloniler urasil sentezi yaptıklarından koloni seçimi bu özellikten faydalanılarak yapıldı.



Şekil 10: pAG426 maya ekspresyon vektörünün haritası

BP Clonase reaksiyonu kitteki yönergeye uygun olarak aşağıdaki şekilde yapıldı
(Invitrogen kat no: 11789-020).

ATP7B PCR ürünü (120ng/ µl)	8 µl
pDONR vektör (150ng/ µl)	1 µl
BP Clonase II enzim mix	2 µl
Tris EDTA(TE pH=8)	1 µl

25°C 18 saat inkübe edildi, ertesi gün 1 µl proteinaz K (2ug/ µl) ile reaksiyon sonlandırıldı.

37°C 10dk
70°C 10dk inkübe edildi.

Omni Max2T1 kimyasal kompetan hücreye 4.5 µl BP reaksiyon karışımı eklendi, 30dk buzda inkübe edildi, 42°C'de su banyosunda 30sn, buzda 2dk ısı-şokuna maruz bırakıldı, 250 µl oda ısısındaki SOC medium eklenerek 225rpm'de 37°C 1 saat inkübe edilip, LB agar kanamisinli (50mg/ml) besiyerine yayma tekniği ile ekim yapıldı. 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

Bu petri kaplarında oluşan kolonilerden rasgele seçilen koloniler sıvı LB kanamisinli ortama ekilerek 37°C 180rpm'de bir gece inkübe edildi.

Miniprep plasmid purifikasyon kit (invitrogen Pure Link Plamid Miniprep kit kat no:K2100-10) ile plasmid DNA izolasyonu yapıldı. Nanodrop ND-1000 V3.60 cihazı ile plazmid DNA konsantrasyonu ölçüldü.

BsrGI(Bsp1407I) restriksiyon enzimi (Thermo Scientific kat no:ER0931) ile aşağıda belirtilen diziden enzim kesimi yapıldı.

5'....T ^GTACA....3'

3'....ACATG^T....5'

dH2O	12.8 µl
plasmid DNA(0.5-1ug/ µl)	5 µl
10X Tango Buffer	2 µl
BsrGI enzim (0.5-2 µl)	0.2 µl
	20 µl

37°C'de 2 saat 30dk inkübe edildi. %0.9'luk agaroz jelde 95V'ta 40dk yürütüldü.

LR Clonase reaksiyonu aşağıdaki şekilde optimize edildi (Invitrogen kat no:11791-020).

Plasmid DNA(entry clone)	(75ng/ µl)	1 µl
pAG426(destination vektör)	(75ng/ µl)	1 µl
LR Clonase II enzim mix		1 µl
Tris EDTA(TE, pH=8)		3 µl
		6 µl

25⁰C 18 saat inkübe edildi, ertesi gün 0.5 µl proteinazK(2ug/ µl) ile reaksiyon sonlandırıldı.

37⁰C 10dk

70⁰C 10dk inkübe edildi.

Omni Max2T1 kimyasal kompetan hücreye 4.5 µl LR reaksiyon mix eklendi, 30dk buzda inkübasyon 42⁰C'de su banyosunda 30 saniye, buzda 2dk ısı şokuna maruz bırakıldı , 250 µl oda ısısındaki SOC medium eklenerek 225rpm'de 37⁰C 1 saat inkübe edildi. LB agar ampisilin (100mg/ml) besiyerine yayma tekniği ile ekim yapıldı. 37⁰C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

Oluşan kolonilerden rasgele seçilen koloniler sıvı LB ampisilinli ortama ekilerek 37⁰C 180rpm'de bir gece inkübe edildi.

Miniprep plasmid purifikasyon kit ile plasmid DNA izolasyonu yapıldı. Nanodropta konsantrasyon ölçüldü .

BsrGI(Bsp1407I) restriksiyon enzimi ile enzim kesimi yapıldı.

dH2O	12.8 µl
plasmid DNA(0.5-1ug/ µl)	5 µl
10X Tango Buffer	2 µl
BsrGI enzim (0.5-2 µl)	0.2 µl
	20 µl

37⁰C'de 2 saat 30dk inkübe edildi, %0.9'luk agaroz jelde 95V'ta 40dk yürütüldü.

LR reaksiyonu sonucu elde edilen plazmid DNA'lar 100ng olacak şekilde hazırlandı, ATP7B genine özgül tarafımızca dizayn edilen primerler kullanılarak DNA dizi analizi yapıldı (Hizmet alımı-Macrogen Avrupa Laboratuvarı, Hollanda).

3.6.4 Bölge Yönlendirilmiş Mutagenез 'Site Directed Mutagenesis'

pAG426 ekspresyon vektörüne aktarılmış ATP7B genini içeren plazmid DNA'sı üzerinde seçilen 3 mutasyonun eldesinin optimizasyonu yapıldı. (Stratagene Quickchange site directed mutagenesis kit kat no: 200518) (Tablo 4).

Tablo 4: Mutasyonlara özgül primer dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi
T788I-F	5' ACA CTT GGC AAA GAG CAA AAT CTC AGA AGC CCT G 3'
T788I-R	5' CAG GGC TTC TGA GAT TTT GCT CTT TGC CAA GTG T 3'
V1036I-F	5' CCA TTA CCC ATG GCA TCC CCA GGG TCA TG 3'
V1036I-R	5' CAT GAC CCT GGG GAT GCC ATG GGT AAT GG 3'
R1038G-fsX83-F	5' CAT GGC GTC CCA GGG TCA TGC GGG 3'
R1038G-fsX83-R	5' CCC GCA TGA CCC TGG GAC GCC ATG 3'

Not: Kırmızı renk, mutasyonun olduğu nükleotidi göstermektedir.

Reaksiyonların Hazırlanışı

- 1.Kontrol
- 2.T788I mutant
- 3.V1036I mutant
- 4.R1038G-fsX83 mutant

Kontrol reaksiyonu:

ddH ₂ O	39.5 µl
10x reaction buffer	5 µl
dNTPmix	1 µl
pwhitescript kontrol plazmid	2 µl
kontrol primer1(125ng)	1.25 µl
kontrol primer2(125ng)	1.25 µl
Pfu turbo DNA polimeraz (2.5u/ µl)	1 µl

Mutantların reaksiyonu:

ddH ₂ O	41 µl
10x reaction buffer	5 µl
dNTPmix	1 µl

K16-2 plazmid DNA (ds DNA 50ng)	2 µl
primer1(125ng)	1.25 µl
primer2(125ng)	1.25 µl

Pfu turbo DNA polimeraz
(2.5u/ µl) 1 µl

Profil:

95°C	30sn	} 18 döngü
95°C	30sn	
55°C	1dk	
68°C	10dk	

Buzda 2dk

4 µl her birinden alikat alınıp jelde yürütüldü.

Kalan 47 µl üzerine 1 µl DpnI restriksiyon enzimi eklendi, 37°C 1 saat inkübe edildi.

Kalan örneklerden 10 µl alındı, kontrol olarak 1 µl pUC18 kullanılarak her bir örnek 50 µl blue süper kompetent hücreye eklendi, 42°C 45sn ısıtıldı, 2 dakika buzda bekletildi. 500 µl NZY Broth (42°C’de , kit içeriğinde belirtilen şekilde hazırlandı) eklendi, 37 °C 250rpm’de 1 saat çalkalandı. 1.5 ml tüpe alındı, çöktürüldü, sıvı 150 µl kalacak şekilde atıldı kalan örnek pipetaj yapıp alevde LB agar ampisilin (100mg/ µl) plate’e yayma yöntemiyle ekildi. Plate’ler 37 °C inkübe edildi, koloni oluşumu gözlenene kadar beklendi.

Mutant kolonilerden seçilip sıvı LB ampisilinli ortama ekildi, plazmid DNA’ları elde edildi.

Yaban tip *ATP7B* ve T788I, V1036I, R1038G-fsX83 mutasyonlarını içeren *ATP7B* örneklerinden elde edilen plazmid DNA’ları 100ng/ µl olacak şekilde hazırlandı, diziye özgül primerler kullanılarak DNA dizi analizi yapıldı (Hizmet alımı-Macrogen Avrupa laboratuvarı, Hollanda).

BY4741 suşun Δ CCC2 olduğunun gösterilmesi için *S.cerevisiae* CCC2 geni genomik DNA ve mRNA dizisine özgül 2 çift primer tarafımızca dizayn edildi (Tablo 5). Tm=58°C PCR optimizasyonu yapıldı, agaroz jel elektroforezi ile görüntü alındı.

Tablo 5: *S.cerevisiae* CCC2 geni genomik DNA ve mRNA dizisine özgül primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Kalıp
gCCC2-F1	5' tga gag aag tga tac ttg ctg tac at 3'	Genomik DNA
gCCC2-R1	5' ctt atg gct gta att tca gaa tct 3'	Genomik DNA
gCCC-F2	5' agt gat cta ggt att gcc att t 3'	Genomik DNA
gCCC-R2	5' tta caa gac ttc ttc gtt tga ca 3'	Genomik DNA
mCCC-F1	5' aat gac atg cag cgc ctg tac ta 3'	mRNA
mCCC-R1	5' ttc aat cat ttc tct ggc ggt t 3'	mRNA
mCCC-F2	5' tga tga agt taa aca tga ttc tta c 3'	mRNA
mCCC-R2	5' aca gta taa caa tat cag ctg ctt 3'	mRNA

3.6.5 Maya Transformasyonu:

Yaban tip *ATP7B*, pAG426(maya ekspresyon vektörü-boş vektör), negatif kontrol dH₂O, R1038G-fsX83 mutant, V1036I mutant ve T788I mutant plazmid DNA'ları LiAc metoduyla BY4741 ΔCCC2 maya suşuna transformasyon yapıldı.

1. Kültür tüpüne 3ml YPD(zengin besiyeri) konup öze ucu ile alınan BY4741ΔCCC2 maya suşu beç alevinde besiyerine ekildi.
2. 30°C'deki yatay çalkalayıcı da 180 rpm'de gece boyu inkübe edildi.
3. Sabah kültürden 1ml alınıp 4ml YPD eklenerek seyreltildi, 30°C 2 saat çalkalayıcıda inkübe edildi.
4. 2500rpm'de 5dk santrifüj edildi.
5. 3ml dH₂O ile resuspense edilerek vortekslendi, 2500rpm'de 5dk santrifüj edilerek YPD uzaklaştırıldı(2 kez tekrarlandı).
6. 1ml 0.1M LiAc ile resuspense edilip sıvı 1.5ml'lik santrifüj tüpüne alındı,yüksek devirde 5sn santrifüj edildi.
7. Süpernatant atıldı, pellete 500 µl 0.1M LiAc eklendi resuspense edildi, düşük hızda vortekslendi. Kaç örnek transforme edilecekse her biri için 150 µl santrifüj tüpüne alındı.
8. Yüksek devirde 5sn santrifüj edildi.
9. ssDNA(salmon sperm DNA) 5dk kaynatıldı, buza alındı.
10. Her tüpe;
 - i. 240 µl polietilen glikol(PEG %50)
 - ii. 36 µl 1M LiAc
 - iii. 5 µl ssDNA(2mg/ml)
 - iv. 20 µl 0.3M dithiothreitol(DTT)
 - v. 20 µl dH₂O
 - vi. 10 µl plazmid DNA (700ng/ µl) (negatif kontrolde dH₂O)
11. Tüm tüpler vortekslendi.
12. 30 °C'deki çalkalayıcıda 160rpm'de 30 dakika inkübe edildi.
13. 42 °C'deki su banyosunda 25 dakika inkübe edildi.
14. 4000rpm'de 10-15 saniye santrifüj edildi, resuspense edildi ve yaklaşık 115 µl yaban tip *ATP7B*, pAG426 boş vektör, T888I mutant *ATP7B*, V1036I mutant *ATP7B*, R1038G-fsX83 mutant *ATP7B*'nin her birinden ayrı ayrı alınarak, isimlendirilmeleri yapılmış kendilerine ait platelere alevde yayma tekniği ile ekim yapıldı.

15. Platelere 30°C'deki etüvde gece boyu inkübe edildi (47).

3.6.6 Optik Dansiteye göre büyüme eğrisi çizimi

Seçici besiyerinde üretilen maya hücrelerinin yaklaşık sayısı 600nm'deki optik dansite değerine göre belirlenir (47). 600nm'de 0,100 optik dansite değeri yaklaşık $1,2 \times 10^6$ hücreye denk gelir. Farklı zaman aralıklarında optik dansiteler ölçüldü ve bunlardan dilüsyonlar hazırlandı, YNB-URA seçici besiyerinin bulunduğu petri kaplarına ekim yapılarak koloni oluşumları takip edildi. Ölçülen optik dansite değerine göre büyüme eğrisi çizildi.

3.6.7 Maya plazmid izolasyonu optimizasyonu ve eldesi

1. Gece boyu 5ml YNB-URA'da kültüre edilen hücreler sabah seyreltilti.
2. 4000rpm'de 5dk santrifüjle çöktürüldü.
3. Besiyeri uzaklaştırıldı, 10 µl litikaz (5u/ µl) eklenerek pipetaj yapıldı, vortekslendi.
4. 30 °C'de 250rpm'de 30dk çalkalayıcıda inkübe edildi.
5. 10 µl %20'lik SDS eklendi, ¼ hacim cam küre eklenek 1dk vortekslendi.
6. -80 °C'de örnek bekletildi, 30sn vortekslendi.
7. 6000rpm'de 1dk çöktürüldü.
8. Sıvı yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı.
9. Invitrogen Pure Link Quick Plasmid miniprep kiti ile plazmid izolasyonu tamamlandı.

3.6.8 Mayadan RNA izolasyonu optimizasyonu ve eldesi

1. Gece boyu 5ml YNB-URA'da kültüre edilen hücreler sabah seyreltilti.
2. 4000rpm'de 5dk santrifüjle çöktürüldü.
3. Besiyeri uzaklaştırıldı, 1M sorbitol, 0,1M EDTA ,%0.1 beta merkaptotanol 10, litikaz (50u / 10^7 maya hücresi) eklendi.
4. 30 °C'de 20dk hafif çalkalandı(spheroplast oluşumu sağlandı).
5. 1200rpm'de 5dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
6. Qiagen RNeasy mini kit ile RNA izole edildi.

Her bir örnek için 1.5µg cDNA olacak şekilde RNA kullanılarak cDNA reaksiyonu invitrogen superscript cDNA sentez kiti ile yapıldı.

3.6.9 Gen ekspresyonunun mRNA düzeyinde gösterilmesi

a.Konvansiyonel PCR

ATP7B genine özgül K9F K9R primerleri kullanılarak, yaban tip *ATP7B*'ye, T788I mutant *ATP7B*'ye, V1036I mutant *ATP7B*'ye ve R1038G-fsX83 mutant *ATP7B*'te yönelik hazırlanan cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak konvansiyonel yöntemle PCR kuruldu. cDNA varlığının gösterimi için maya housekeeping gen olan aktin genine özgül primerler kullanılarak PCR kuruldu. Agaroz jel elektroforezi sonrasında PCR ürünleri görüntülendi.

Src-Aktin (F) 5'ACG TTC CAG CCT TCT ACG TTT CCA 3'

Src-Aktin (R) 5'ACG TGA GTA ACA CCA TCA CCG GAA 3'

b.Real Time PCR Optimizasyonu

Real time PCR, BioRADiQ5 multicolor real time PCR detection system cihazında, kit kullanılarak aşağıdaki şekilde optimizasyonu gerçekleştirildi. (Fermentas Maxima SYBR Green/ROX qPCR master mix kat no:K0221).

Reaksiyon içeriği:

dH2O	10 µl
Reaction mix	12.5 µl
cDNA	2 µl
P(F)	0.5 µl
P(R)	0.5 µl
	25,5 µl

Döngü programı:

95°C	5 dk	
94 °C	30 sn	} 40 döngü
58 °C	1 dk	
72 °C	30 sn	

Yaban tip *ATP7B*, pAG426 ekspresyon vektörü (boş vektör), T788I mutant *ATP7B*, V1036I mutant *ATP7B* ve R1038G-fsX83 mutant *ATP7B* örneklerinin aktarıldığı BY4741 ΔCCC2, maya suşlarının her birinden RNA izolasyonu yapıldı. Bu örneklerden elde edilen cDNA'lar kalıp kullanılarak, *ATP7B* genine özgül K9F-K9R primerleri ve *S.cerevisiae* aktin genine (housekeeping gen) özgül primerlerle PCR kuruldu. Sonuçlar Pfahl Metoduna göre *ATP7B* geni ct değerleri aktin geni ct değerlerine göre normalize edilerek her bir PCR örneği için değerlendirildi.

3.6.10 Komplemantasyon deneyi:

Yaban tip *ATP7B*, pAG426 maya ekspresyon vektörü (boş vektör), T788I mutant *ATP7B*, V1036I mutant *ATP7B* ve R1038G-fsX83 mutant *ATP7B* demir sınırlı ortamda ve kontrol ortamı olarak bakır yeterli ve demir yeterli ortamlarda komplemantasyon testi yapıldı.

Demir sınırlı, demir zengin, bakır zengin, demir-bakır zengin ve demir bakır zengin ferrozinsiz (demir inhibitörü) ortamda üremeleri takip edildi, 0, 3, 6, 12, 24.'ü saatlerde 600nm'de optik dansite (OD₆₀₀) değerleri ölçülerek grafik çizildi. Aynı ortamların agarlı YNB-URA'da hazırlanan besiyerlerine ekim yapılarak koloni oluşumları gösterildi.

Demir Sınırlı Ortam (Iron Limited Medium - ILM) (48)

YNB-URA

50mM MES

1µM Ferrozine

50µM Ferroz amonyum sülfat

1µM bakır sülfat

Demir zengin ortam (Iron Supplemented Medium - ISM) (48)

YNB-URA

50mM MES

1µM Ferrozine

350µM Ferroz amonyum sülfat

1µM bakır sülfat

Bakır zengin ortam (Copper Supplemented Medium – CSM) (48)

YNB-URA

50mM MES

1µM Ferrozine

50µM Ferroz amonyum sülfat

500µM bakır sülfat

Demir+Bakır zengin ortam (Iron+copper Supplemented Medium – ISCM)

YNB-URA

50mM MES

1µM Ferrozine

350µM Ferroz amonyum sülfat

500µM bakır sülfat

Demir+Bakır zengin ortam ferrozinsiz (Iron+copper Supplemented Medium without ferrozine – ISCM-F)

YNB-URA

50mM MES

350µM Ferroz amonyum sülfat

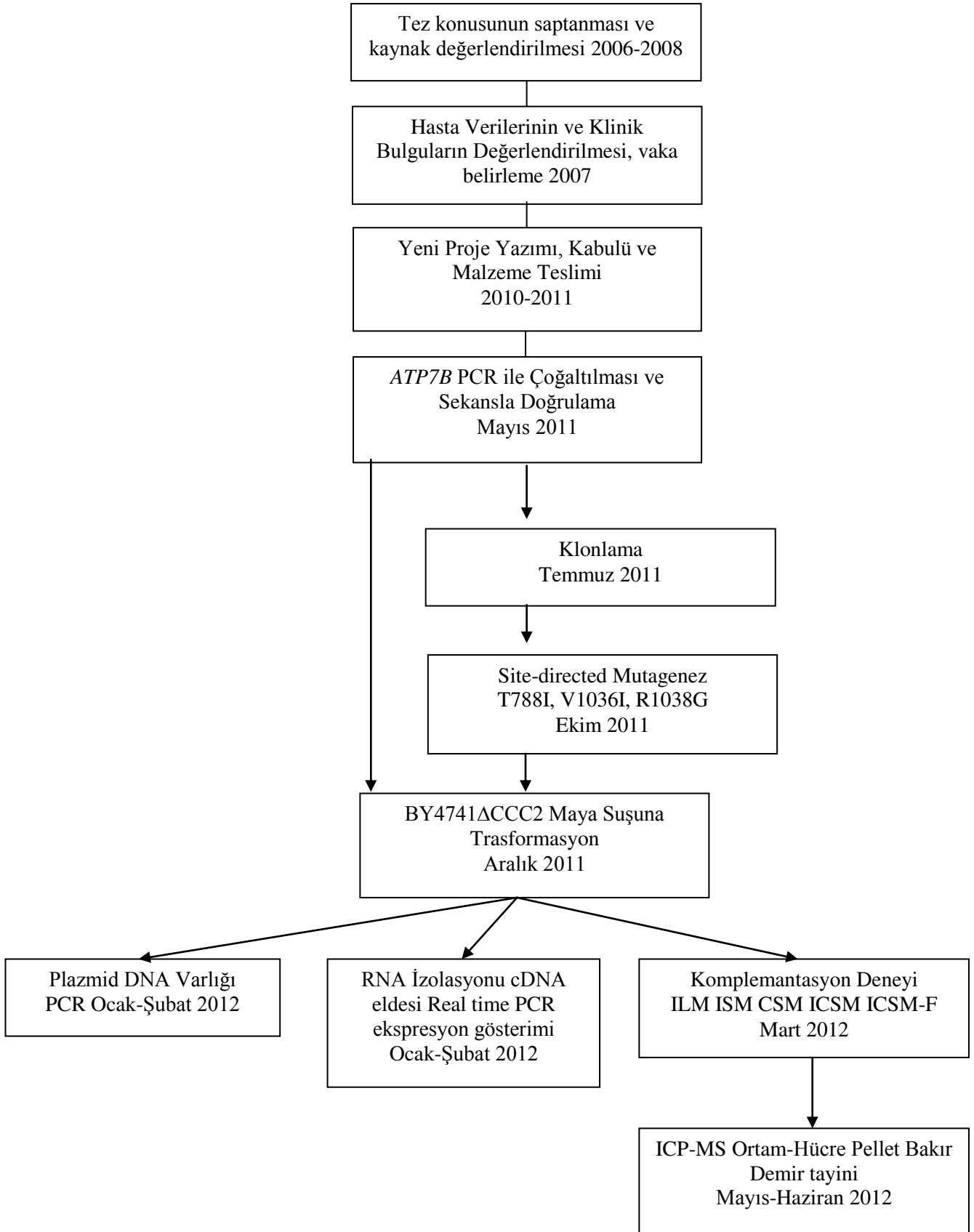
500µM bakır sülfat

3.6.11 ICP MS bakır demir tayini:

İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometre Cihazı (ICP-MS)'da bakır ve demir ölçüm standartlarını belirlemek üzere ön deneyler yapılarak optimizasyon gerçekleştirildi. Bu amaçla dH₂O, YNB-URA (besiyeri), besiyerine değişen miktarlarda maya hücresi konarak bakır ve demir ölçümleri yapıldı. Farklı optik dansitelerde hücre eklenerek hem ön işlem mikrodalga bozundurma yapılarak hem de ön işlemsiz direk olarak ICP-MS cihazı ile ölçümler yapıldı. Bakırın farklı konsantrasyonlarında (25µM, 50µM, 100µM, 200µM) bakır ve demir miktarları ölçüldü. 50µM, 100µM CuSO₄ konsantrasyonlarında ve t=0, t=15 dakika, t=2 saat, t=24 saat sonunda hücreler santrifüjle çöktürölüp ortam ICP-MS bakır miktarları ölçüldü. Optimizasyon deneyleri sonrasında komplemantasyon deneyindeki ortam koşullarındaki ölçümlere geçildi.

Komplemantasyon deneyindeki 5 ortam koşulunda (ILM, ISM, CSM, ICSM ve ICSM-F) sıvı besiyerinde üretilen maya hücreleri 24 saatin sonunda 5000rpm'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücre kültür ortamları (sadece ICP-MS) ve çöktürülen hücre pelletleri (mikrodalga bozundurma ve ICP-MS) İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometre Cihazı ICP-MS ile bakır ve demir ölçüm analizleri yapıldı (Hizmet alımı-IYTE Çevre ARGE ICP-MS Agilent 7500ce). Bakır ve demir miktarı ppb (parts per billion) milyarda bir partikül olarak saptandı.

3.7. Araştırma planı ve takvimi



3.8. Verilerin değerlendirilmesi

Hücre kültür ortamlarında ve hücre pelletlerinde ICP-MS ile ölçülen bakır ve demir miktarlarının yaban tip *ATP7B*'ye göre T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 mutantlarındaki sonuçlarının değerlendirilmesi için Mann-Whitney U test (SPSS Statistics v20 2012) ile istatistiksel analiz yapıldı.

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları:

Araştırma *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 susundan elde edilmiş CCC2 mutant BY4741 Δ CCC2 suşunun sahip olduğu genetik bilgiyi, *ATP7B* geni ve mutantlarının DNA dizisini, ekspresyon düzeyini kapsayacak şekilde sınırlandırıldı.

3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Tarih ve Sayı: 18.01.2005/21 ve 10/02/2005 no.lu toplantı, 03 protokol numaralı proje. Tarih ve Sayı: 08.06.2007/203 ve 08/15/2007 no.lu toplantı, 03/2005 protokol numaralı proje. Tarih ve Sayı: 14.09.2006/206 ve 16/18/2006 no.lu toplantı, 189 protokol numaralı proje.

4. Bulgular

4.1. Wilson Hastalarında Saptanan Mutasyonlar ve Tek Nükleotid Polimorfizmler (Single nucleotide polymorphism-SNP)

ATP7B genindeki mutasyonlar 46 Wilson Hastasının 30'unda saptandı. Wilson Hastalarındaki mutasyon saptama oranı %60.74'dür. *ATP7B* geninde 24 farklı mutasyon saptandı. Yirmi dört mutasyonun dağılımı : 17 missense-anlamlı, 3 nonsense-anlamsız, 1 silent- sessiz, 3 frameshift-çerçeve kayması (1 insersiyon, 2 delesyon). Beş yeni mutasyon yeni olarak tanımlandı bunlardan dördü anlamlı (c.2363C>T, c.3106G>A, c.3451C>T, c.3733C>A) ve biri delesyondur (c.3111delC) (Tablo 6). Bu mutasyonların hiçbiri kontrol grubundaki 104 allelde saptanmadı. Mutasyonlar, uluslararası Wilson Hastalığı veri tabanına Türk hastalarında saptanan yeni mutasyonlar olarak kabul edildi (45).

11 adet tek nükleotid polimorfizm (SNP) saptandı (Tablo 7). Bu SNP'lerden biri intronik bölgede (c.3903+6C>T) ve 10 tanesi ekzonlarda saptandı (c.1216T>G, c.1366G>C, c.2495A>G, c.2855G>A, c.2973G>A, c.3009G>A, c.3045G>A, c.3419T>C, c.3620A>G, c.3727G>A). Bu SNP'lerden biri c.3727G>A daha önce uluslararası veri tabanında tanımlanmamıştır, yeni SNP olarak veri tabanına kabul edilmiştir .

ATP7B geninde mutasyon saptanan hastalara ait klinik bulgular Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 6: *ATP7B* geninde saptanan mutasyonların dağılımı ve sıklığı

Ekzon	Nükleotid Değişimi	Nükleotid Sekansı	Kodon Değişimi	Protein Bölgesi	Tipi	Mutasyon	Sıklığı (%)
3	c.1369C>T	<u>C</u> AG- <u>T</u> AG	p.G457X	Cu4/Cu5	nonsense	Bilinen	4.34
8	c.2128G>A	<u>G</u> GT - <u>A</u> GT	p.G710S	TM 2	missense	Bilinen	5.43
8	c.2145C>T	TAC- <u>TAT</u>	p.Y715Y	TM3	silent	Bilinen	1.08
8	c.2332C>G	<u>C</u> GG - <u>G</u> GG	p.R778G	TM 4	missense	Bilinen	1.08
8	c.2332C>T	<u>C</u> GG - <u>T</u> GG	p.R778W	TM 4	missense	Bilinen	1.08
8	c.2293G>A	<u>G</u> AC - <u>A</u> AC	p.D765N	TM 4	missense	Bilinen	2.17
8	c.2298-2299insC	ACG <u>C</u> CCCCCA	p.P767R-fsX28	TM 4	frameshift	Bilinen	1.08
9	c.2363C>T	<u>A</u> CC - <u>A</u> TC	p.T788I	TM 4	missense	YENİ*	2.17
10	c.2532delA	GAAAGTC	p.V845S-fsX28	Td	frameshift	Bilinen	1.08
11	c.2621C>T	<u>G</u> CG- <u>G</u> TG	p.A874V	Td/TM5	missense	Bilinen	2.17
12	c.2755C>T	<u>C</u> GG- <u>T</u> GG	p.R919W	TM5	missense	Bilinen	2.17
12	c.2807T>A	<u>T</u> TG - <u>T</u> AG	p.L936X	TM5	nonsense	Bilinen	2.17
12	c.2827G>A	<u>G</u> GT- <u>G</u> AT	p.G943D	TM5	missense	Bilinen	1.08
13	c.2906G>A	<u>C</u> GG - <u>C</u> AG	p.R969Q	Ch/TM 6	missense	Bilinen	2.17
13	c.3007G>A	<u>G</u> CG- <u>A</u> CG	p.A1003T	Ch/TM6	missense	Bilinen	2.17
13	c.3008C>T	<u>G</u> CG- <u>G</u> TG	p.A1003V	Ch/TM6	missense	Bilinen	1.08
14	c.3106G>A	<u>G</u> TC - <u>A</u> TC	p.V1036I	ATP loop	missense	YENİ*	2.17
14	c.3111delC	TCCCC <u>C</u> AGGG	p.R1038G-fsX83	ATP loop	frameshift	YENİ*	1.08
14	c.3121C>T	<u>C</u> GG- <u>T</u> GG	p.R1041W	ATP loop	missense	Bilinen	2.17
14	c.3207C>A	<u>C</u> AC - <u>C</u> AA	p.H1069Q	ATP loop	missense	Bilinen	17.39
16	c.3451C>T	<u>C</u> GT - <u>T</u> GT	p.R1151C	ATP loop	missense	YENİ*	1.08
18	c.3733C>A	<u>C</u> CT - <u>A</u> CT	p.P1245T	ATP hinge	missense	YENİ*	2.17
18	c.3809A>G	<u>A</u> AT - <u>A</u> GT	p.N1270S	ATP hinge	missense	Bilinen	1.08
19	c.3955C>T	<u>C</u> GA- <u>T</u> GA	p.A1319X	ATP hinge/TM7	nonsense	Bilinen	1.08

Notlar: Genbankası numarası NM_000053.

ATG translasyon kodonunun ilk nükleotidi nt +1 olarak değerlendirildi.

*104 normal kromozomda saptanmayan ve Wilson Hastalığı Mutasyon veri tabanına tarafımızca bildirilen değişimler

Tablo 7 : *ATP7B* geninde saptanan SNP'lerin dağılımı ve sıklığı

Ekzon/ Intron	Nükleotid değişimi	Nükleotid sekansı	Kodon değişimi	Protein bölgesi	Tipi	SNP
2	c.1216T>G	<u>T</u> CT- <u>G</u> CT	p.S406A	Cu4	missense	Bilinen
3	c.1366G>C	<u>G</u> TG- <u>C</u> TG	p.V446L	Cu4/Cu5	missense	Bilinen
10	c.2495A>G	A <u>A</u> G-A <u>G</u> G	p.K832R	TM 4/Td	missense	Bilinen
12	c.2855G>A	A <u>G</u> A-A <u>A</u> A	p.R952K	Tm5	missense	Bilinen
13	c.2973G>A	AC <u>G</u> -AC <u>A</u>	p.T991T	Ch/Tm6	silent	Bilinen
13	c.3009G>A	G <u>C</u> G-GC <u>A</u>	p.A1003A	Ch/Tm6	silent	Bilinen
13	c.3045G>A	CT <u>G</u> -CT <u>A</u>	p.L1015L	Ph	silent	Bilinen
16	c.3419T>C	G <u>T</u> C-G <u>C</u> C	p.A1140V	ATPloop	missense	Bilinen
17	c.3620A>G	C <u>A</u> C-C <u>G</u> C	p.H1207R	ATPloop	missense	Bilinen
18	c.3727G>C	<u>G</u> TG- <u>C</u> TG	p.V1243L	ATPhinge	missense	YENİ*
intron18	c.3903+6C>T	GAG <u>C</u> G-GAG <u>T</u> G	—	—	—	Bilinen

Notlar: Genbankası numarası NM_000053.

ATG translasyon kodonunun ilk nükleotidi nt +1 olarak değerlendirildi.

*Bu çalışmada saptanan yeni SNP'ler veri tabanına tarafımızca bildirildi

Tablo 8: Mutasyon taşıyan Wilson Hastalarının klinik ve laboratuvar bulguları

Hasta	Tanı Yaşı	Cinsiyet	Mutasyon		Etkilenen Organ			Laboratuvar Bulguları	
			Nücleotid Değişimi	Ekzon	Karaciğer	Beyin (Nörolojik bozukluklar)	Göz (Kayser Fleischer Halkası)	Serum seruloplazmin (mg/dL)	İdrar Bakır (µg/gün)
1.	12	Kadın	c.2621C>T	11	+	-	+	3.1	1600
2.	15	Kadın	c.2532delA/c.3451C>T*	10 / 16	+	+	+	3.1	1340
4.	7	Erkek	c.2128G>A	8	+	-	+	12.0	1260
6.	12	Erkek	c.2621C>T/c.3207C>A	11 / 14	+	-	+	5.0	1380
7.	6	Erkek	c.2807 T>A	12	+	-	+	5.0	1280
9.	9	Erkek	c.2363 C>T*	9	+	+	+	15.0	796
10.	12	Kadın	c.1369 C>T	3	+	+	+	4.0	466
12.	8	Erkek	c.3955 C>T	19	+	+	-	5.0	1590
13.	32	Kadın	c.3207 C>A	14	-	+	+	7.1	52
14.	4,5	Erkek	c.3207 C>A	14	+	-	+	22.0	220
15.	31	Kadın	c.3008 C>T	13	-	+	+	10.37	396
18.	7	Erkek	c.2332C>G/ c.3207C>A	8 / 14	+	-	+	6.0	1200
19.	34	Erkek	c.2145C>T/c.3207C>A	8 / 14	-	+	+	6.93	43
20.	5	Erkek	c.2332C>T/c.3111delC*	8 / 14	+	-	-	5.0	1900
21.	11	Kadın	c.2906 C>A	13	+	-	-	6.22	1100
22.	10	Erkek	c.2299insC/c.3207C>A	8 / 14	+	-	+	5.34	1250
24.	23	Erkek	c.3207 C>A	14	-	+	+	6.9	135
29.	12	Kadın	c.2293 G>A	8	+	-	-	4.3	1060
32.	31	Erkek	c.3207 C>A	14	-	+	+	<1.0	ND
33.	9	Erkek	c.1369 C>T	3	+	+	+	23.0	622
34.	24	Erkek	c.2755 C>T	12	-	+	-	6.70	395
35.	25	Kadın	c.3007G>A/c.3106G>A*	13 / 14	-	+	+	10.52	301
36.	22	Erkek	c.3809 A>G	18	-	+	+	<1.0	806
39.	14	Kadın	c.2128 G>A	8	-	+	+	6.33	395
40.	44	Erkek	c.3121 C>T	14	-	+	-	10.5	129
42.	12	Kadın	c.3207 C>A	14	+	-	-	11.0	4017
43.	14	Kadın	c.2128 G>A	8	+	+	-	5.0	880
45.	22	Kadın	c.3207 C>A	14	-	+	+	4,96	778
46.	22	Erkek	c.2827 G>A/c.3207 C>A	12 / 14	-	+	+	<1.0	ND
49.	10	Erkek	c.3733 C>A*	18	+	+	-	4,0	886

Notlar: Gen Bankası numarası NM_000053.

ATG translasyon kodonunun ilk nükleotidi nt +1 olarak değerlendirildi.

Serum CP immunoturbidmetrik test ile ölçüldü. Serum CP normal değerleri 20-80 mg/dl'dir.

İdrar bakır için normal değer 35 µg/gün'den azdır.

ND (no data-veri yok).

* Bu çalışmada saptanan yeni mutasyonlar.

4.2 Uluslararası Wilson Hastalığı Veri tabanına Kabul Edilen Verilerimiz

Tablo 9: Cox ve arkadaşları tarafından yayınlanan temmuz 2009’da güncellenen ‘<http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/database.aspdatabase>’ veri tabanındaki adımıza kayıtlı 6 veri. (141: Papur, Ozlenen Simsek, *submitted*, May 14, 2009; DV: Disease variant , NDV:Non-disease variant, 1:deletion,insertion,non-sense , 4:control data) (45).

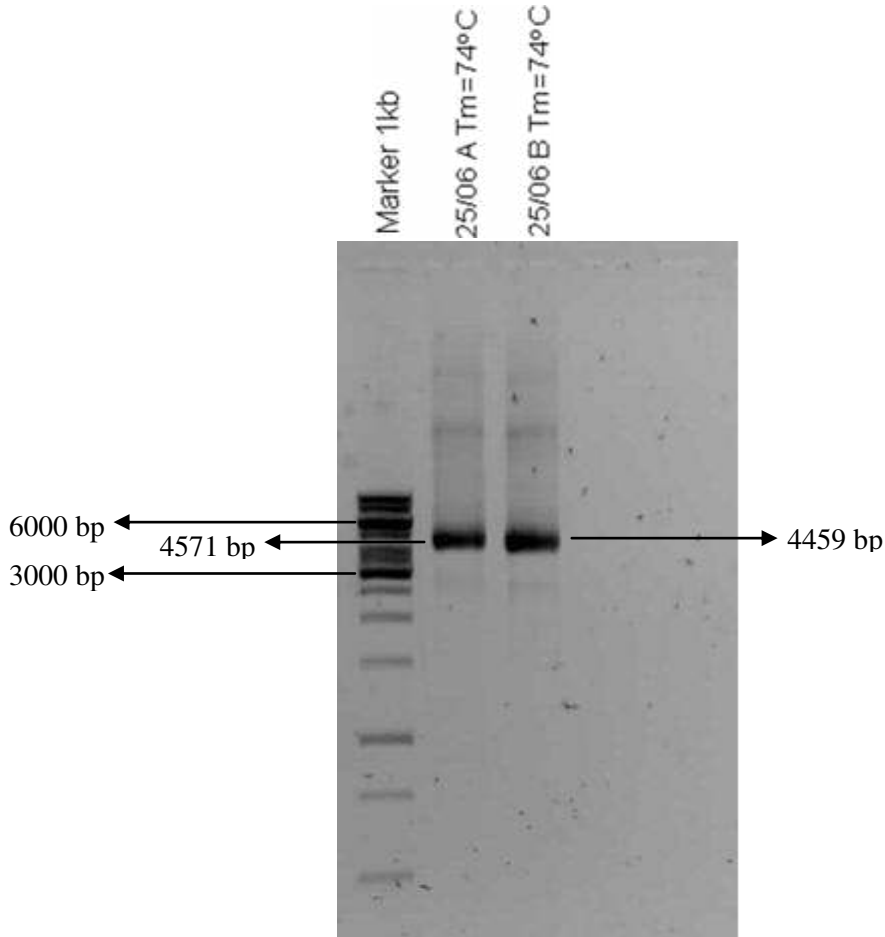
Reported Status	Exon	Variant Name (nucleotide)	Variant Type	Amino Acid Change	Result of Change	Support of Variant	Area of Protein	Ethnic Group	Nucleotide Sequence	Number of Controls Tested	Comments	Reference
NDV	18	c.3727G>A	substitution	p.Val1243Met	missense	4	ATP hinge	Turkish	GTG-ATG	104		141
DV	18	c.3733C>A	substitution	p.Pro1245Thr	missense	4	ATP hinge	Turkish	CCT-ACT	104		141
DV	16	c.3451C>T	substitution	p.Arg1151Cys	missense	4	ATP loop	Turkish	CGT-TGT	104		141
DV	14	c.3106G>A	substitution	p.Val1036Ile	missense	4	ATP loop	Turkish	GTC-ATC	104		141
DV	9	c.2868C>T	substitution	p.Thr788Ile	missense	4	DET Tm4/Td	Turkish	ACC-ATC	104		141
DV	14	c.3111delC	deletion	p.Arg1038GlyfsX83	prestop	1	ATP loop	Turkish	TCCCAGG	104		141

4.3 Seçilen 3 Mutasyonun Bulunduğu Hastalara Ait Klinik Bulgular

Sırasıyla T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 mutasyonlarını taşıyan 009C1E, 035B1K ve 020C1E nolu hastalara ait klinik bulgular Tablo10’da özetlenmiştir.

Tablo 10: T788I, V1036I ve R1038G mutasyonlarını taşıyan Wilson Hastalarına ait klinik ve laboratuvar bulguları

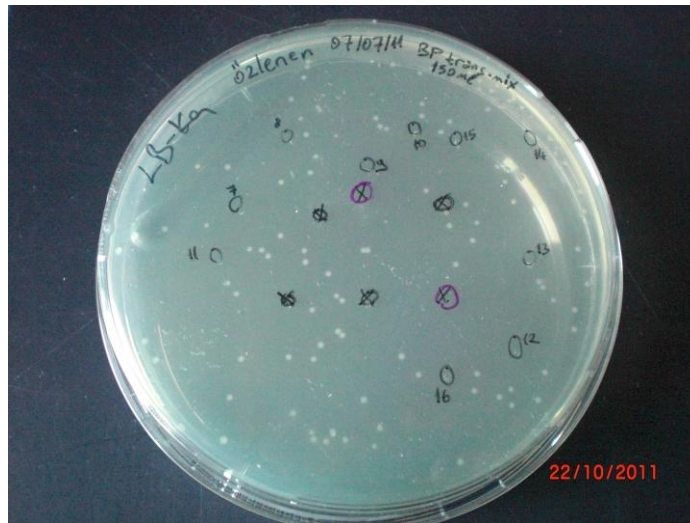
Hasta numarası	Bulguların saptandığı yaş	Primer tutulum		Serum seruloplazmin (>20mg/dl)	Kayser Fleischer Halkası	Üriner bakır (40µg/gün)	Karaciğer biyopsisi (<50µg/g)
		Karaciğer	Nörolojik bozukluklar				
009C1E	9	+	+	15.0	+	796	+(>250µg/g)
020C1E	5	+	-	5.0	-	1900	+(>250µg/g)
035B1K	25	-	+	10.52	+	301	-



Şekil 11: %1'lik agaroz jel, 120V 44dk; 25/06 A BP1F BP1R (4571bp) primerleri, 25/06 B BP2F BP2R (4459bp) primerleri ile 2ul HepG2 cDNA kalıp PCR

4.6 Klonlama

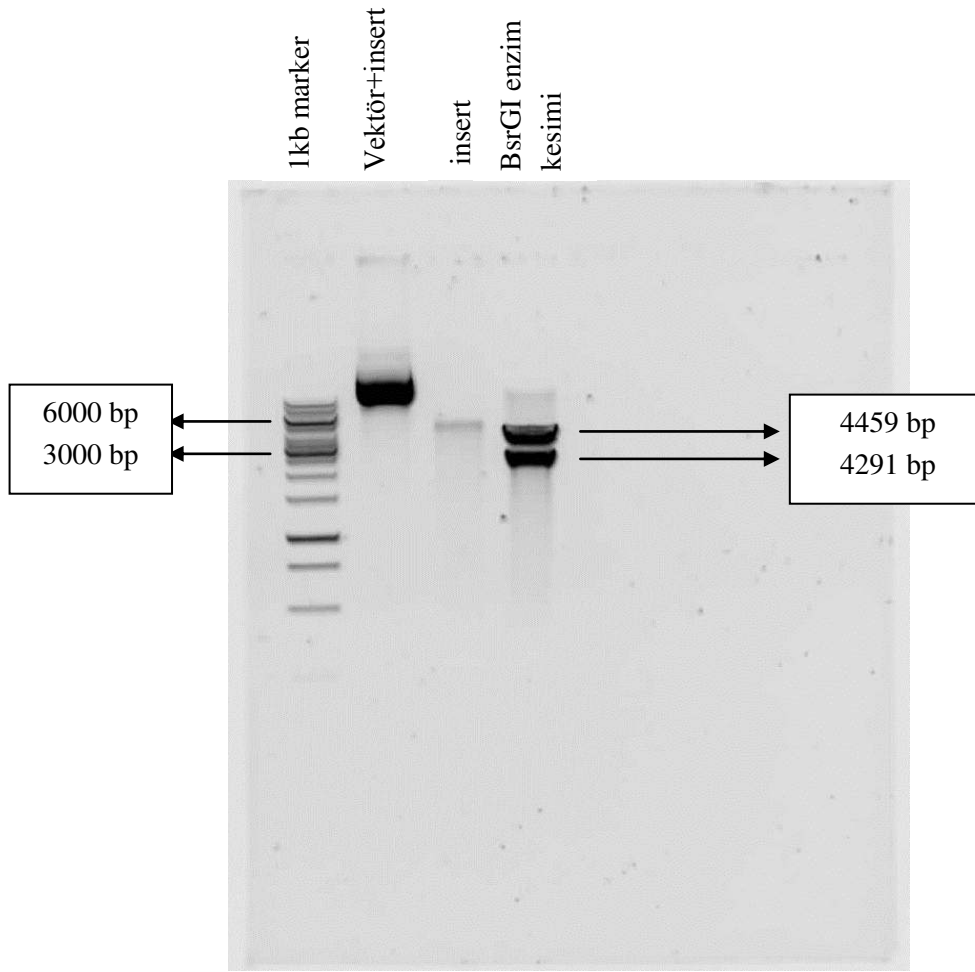
Gateway primerleri ile elde edilen 4459bp'lik *ATP7B* genine ait PCR ürünü BP Clonase enzim karışımı ile kurulan reaksiyon sonucu pDONR vektöre (giriş vektörü) aktarıldı. LB Kanamisinli ortamda koloni oluşumu saptandı (Şekil 12).



Şekil 12: LB agar kanamisinli besiyerinde oluşan koloniler

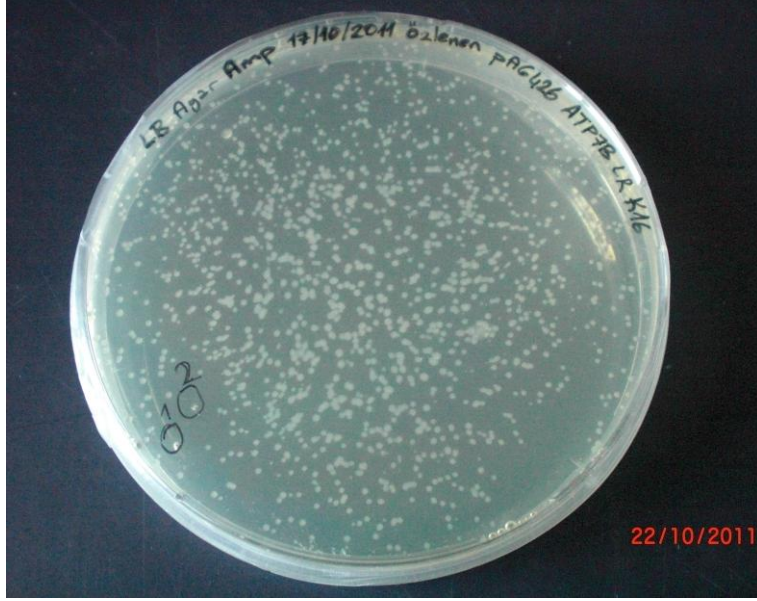
Seçilen koloniden elde edilen plazmid DNA'sında *ATP7B*'ye ait fragmanın varlığı BsrGI enzim kesimi reaksiyonu sonucunda belirlendi.

ATP7B geninin kendisi (insert), pDONR vektör ve *ATP7B* PCR ürünü birlikte ve BsrGI enzim kesimi sonucu elde edilen örnekler aynı jelde yürütölerek görüntölendi. Enzim kesimi sonucunda 4459bp'lik insert ve 4291bp'lik pDONR vektöre ait fragmanlar gösterildi (Şekil 13).



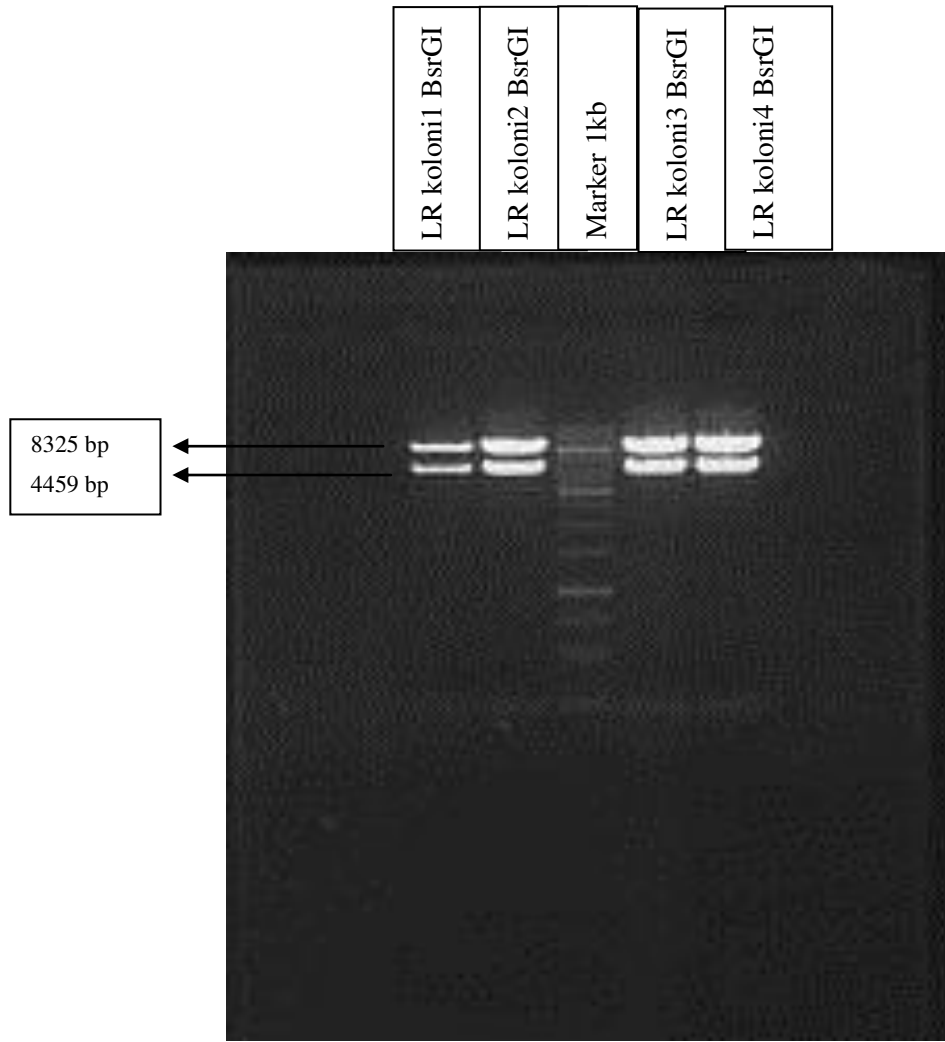
Şekil 13: %0.9'luk agaroz jel görüntüsü

pDONR vektöre aktarılmış olan *ATP7B* PCR ürünü LR clonase enzimi varlığında kurulan reaksiyonla pAG426 maya ekspresyon vektörüne aktarıldı. Koloni oluşumu LB agar ampisilinli ortamda saptandı (Şekil 14).



Şekil 14 : LB agar ampisilinli besiyerinde oluşan koloniler

LB Agar ampisilinli besiyerinde oluşan kolonilerden seçilerek plazmid DNA izolasyonu yapıldı. BsrGI enzim kesimiyle plazmid DNA'ları kesildi, %0.9'luk agaroz jelde enzim kesim sonuçları görüntülendi (Şekil 15).

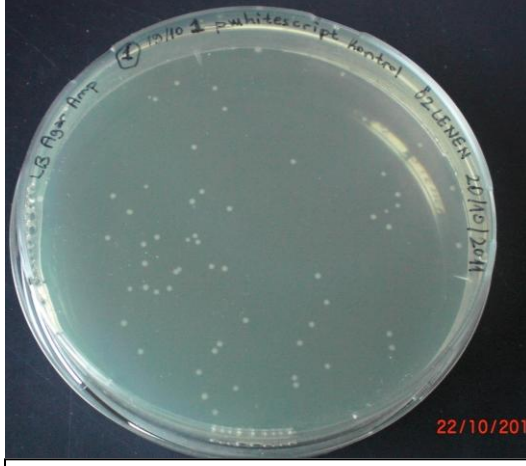


Şekil 15 : %0.9'luk agaroz jel görüntüsü

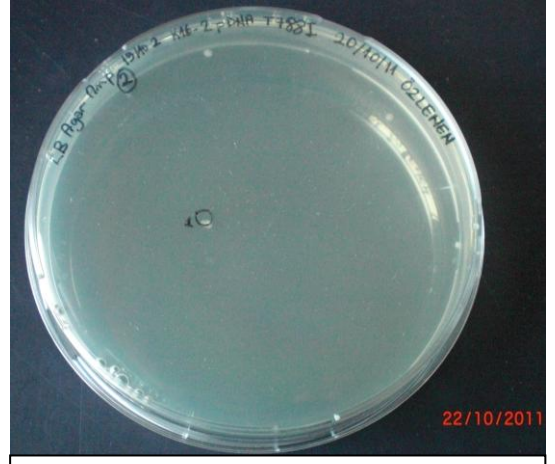
4.7 Bölge Yönlendirilmiş Mutagenез 'Site Directed Mutagenesis' ile *ATP7B* Geninde T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 Mutasyonlarının Eldesi

Her bir mutasyon için dizayn ettiğimiz primerler (Tablo 4) kullanılarak mutagenез reaksiyonu ve kontrol primerleri, kontrol plazmidi (pUC18) varlığında kontrol reaksiyonu kurularak blue süper kompetent hücreye transformasyonları yapılan örnekler LB agar ampicilinli ortama ekilerek koloni oluşumları saptandı (Şekil 16).

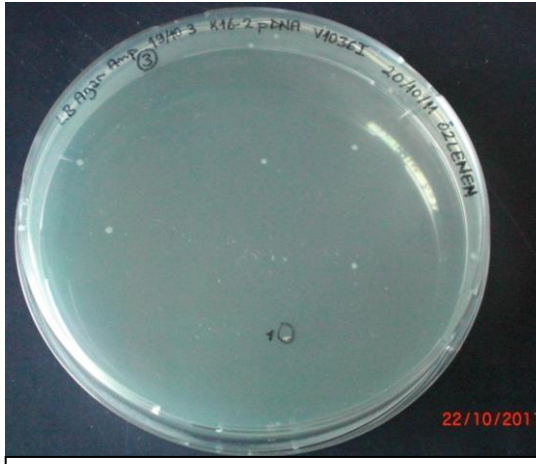
Oluşan her bir koloniden plazmid DNA'sı elde edilerek, DNA dizi analizi yapılmak üzere gönderildi (Hizmet alımı-Macrogen Avrupa Laboratuvarı).



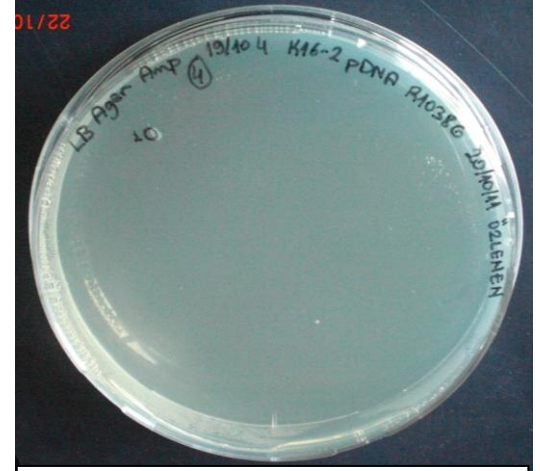
a.PCR kontrolü



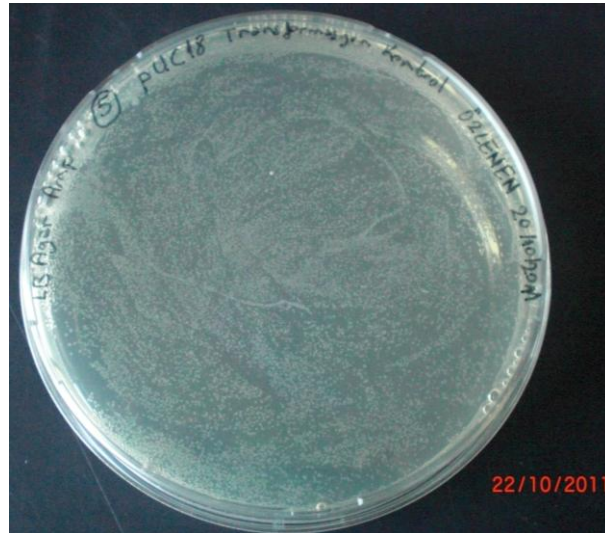
b.T788I 3 koloni saptandı.



c.V1036I 10 koloni saptandı.



d.R1038G 1 koloni saptandı.

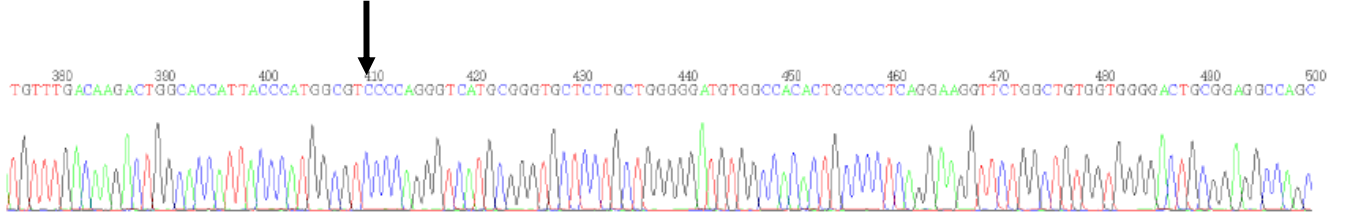


e.pUC18>250 koloni transformasyon etkinliği yüksek

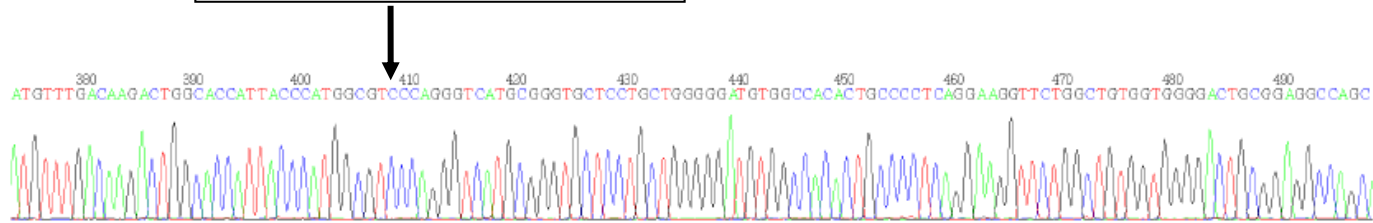
Şekil 16: Bölge Yönlendirilmiş Mutagenез 'Site directed mutagenesis' sonuçları

4.8 DNA Dizi Analizi Sonuçları

Yaban tip *ATP7B* (K11F)



3111delC -R1038G mutant (K11F)



Homo sapiens ATPase, Cu⁺⁺ transporting, beta polypeptide, mRNA (cDNA clone MGC:177511 IMAGE:9052494), complete cds
Length = 4398

Query: 77 ccatttatcatcatcatgtcaactttgacgttggtggtatggattgtaatcggtttttatc
136

Sbjct: 2706 ccatttatcatcatcatgtcaactttgacgttggtggtatggattgtaatcggtttttatc
2765

Query: 137 gattttggtggttgttcagagatactttcctaacccaacaagcacatctcccagacagag
196

Sbjct: 2766 gattttggtggttgttcagagatactttcctaacccaacaagcacatctcccagacagag
2825

Query: 197 gtgatcatccggtttgctttccagacgtccatcacggtgctgtgcattgcctgcccctgc
256

Sbjct: 2826 gtgatcatccggtttgctttccagacgtccatcacggtgctgtgcattgcctgcccctgc
2885

Query: 257 tccctggggctggccacgcccacggctgtcatggtgggcaccgggggtggccgcgcagaac
316

Sbjct: 2886 tccctggggctggccacgcccacggctgtcatggtgggcaccgggggtggccgcgcagaac
2945

```

Query: 317  ggcatcctcatcaagggagggaagcccctggagatggcgcacagataaagactgtgatg
376
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 2946 ggcatcctcatcaagggagggaagcccctggagatggcgcacagataaagactgtgatg
3005

      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Query: 377  tttgacaagactggcaccattacccatggcgtccc-agggtcatgcgggtgctcctgctg
435
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3006 tttgacaagactggcaccattacccatggcgtccccagggtcatgcgggtgctcctgctg
3065

      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Query: 436  ggggatgtggccacactgcccctcaggaaggttctggctgtggtggggactgcggaggcc
495
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3066 ggggatgtggccacactgcccctcaggaaggttctggctgtggtggggactgcggaggcc
3125

      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Query: 496  agcagtgaacacccccttgggcgtggcagtcaccaaatactgtaaagaggaacttggaaca
555
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3126 agcagtgaacacccccttgggcgtggcagtcaccaaatactgtaaagaggaacttggaaca
3185

      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Query: 556  gagaccttgggatactgcacggacttccaggcagtgccaggctgtggaattgggtgcaaa
615
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3186 gagaccttgggatactgcacggacttccaggcagtgccaggctgtggaattgggtgcaaa
3245

      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Query: 616  gtcagcaacgtggaaggcatcctggcccacagtgagcgccctttgagtgcaccggccagt
675
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3246 gtcagcaacgtggaaggcatcctggcccacagtgagcgccctttgagtgcaccggccagt
3305

      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Query: 676  cacctgaatgaggctggcagccttcccgcagaaaaagatgcagtcccccagaccttctct
735
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3306 cacctgaatgaggctggcagccttcccgcagaaaaagatgcagtcccccagaccttctct
3365

      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Query: 736  gtgctgattggaaaccgtgagtggctgaggcgcaacggtttaaccatttctagcgatgtc
795
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3366 gtgctgattggaaaccgtgagtggctgaggcgcaacggtttaaccatttctagcgatgtc
3425

      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Query: 796  agtgacgctatgacagaccacgagatgaaaggacagacagccatcctgggtggctattgac
855
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 3426 agtgacgctatgacagaccacgagatgaaaggacagacagccatcctgggtggctattgac
3485

```

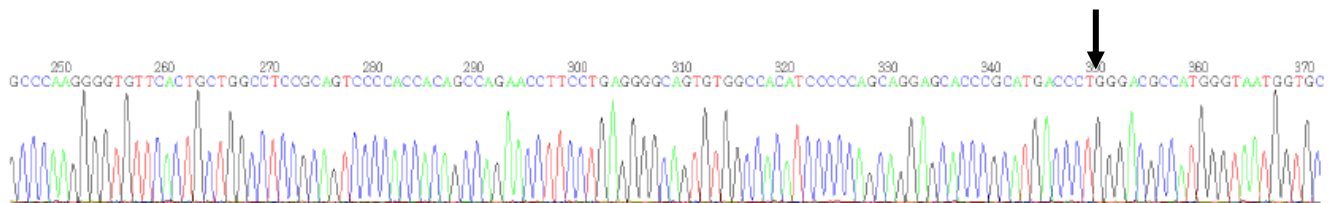
Query: 856 ggtgtgctctgtgggatgatcgcaatcgcacgctgtcaagcaggaggctgccctggct
915

Sbjct: 3486 ggtgtgctctgtgggatgatcgcaatcgcacgctgtcaagcaggaggctgccctggct
3545

Query: 916 gtgcacacgctgcagagcatgggtgtggacgtg 948

Sbjct: 3546 gtgcacacgctgcagagcatgggtgtggacgtg 3578

3111delC -R1038G mutant (K12R)



Homo sapiens ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide, mRNA (cDNA clone MGC:177511 IMAGE:9052494), complete cds
Length = 4398

Query: 19 atcagcacagagaaggctctgggggactgcatctttttctgcggaaggctgccagcctca

Sbjct: 3373 atcagcacagagaaggctctgggggactgcatctttttctgcggaaggctgccagcctca
3314

Query: 79 ttcaggtgactggccggtgcaactcaaagggcgctcactgtgggccaggatgccttccacg
138

Sbjct: 3313 ttcaggtgactggccggtgcaactcaaagggcgctcactgtgggccaggatgccttccacg
3254

Query: 139 ttgctgactttgcacccaattccacagcctggcactgcctggaagtccgtgcagtatccc
198

Sbjct: 3253 ttgctgactttgcacccaattccacagcctggcactgcctggaagtccgtgcagtatccc
3194

Query: 199 aaggctctctgttccaagttcctctttacagtatttggtgactgccacgcccgaaggggtgt
258

Sbjct: 3193 aaggctctctgttccaagttcctctttacagtatttggtgactgccacgcccgaaggggtgt
313

Query: 259 tcactgctggcctccgcagtcaccacagccagaaccttcctgaggggcagtgtggcc
318

Sbjct: 3133 tcactgctggcctccgcagtcaccacagccagaaccttcctgaggggcagtgtggcc
3074

↓

```

Query: 319  acatccccagcaggagcaccgcgatgaccctggg-acgccatgggtaatggcgccagtc
377
          |||
Sbjct: 3073 acatccccagcaggagcaccgcgatgaccctggggacgccatgggtaatggcgccagtc
3014

Query: 378  ttgtcaaacatcacagtctttatcttgtgcgccatctccaggggcttgccctcccttgatg
437
          |||
Sbjct: 3013 ttgtcaaacatcacagtctttatcttgtgcgccatctccaggggcttgccctcccttgatg
2954

Query: 438  aggatgccgttctgcgcggccaccccggtgccaccatgacagccgtgggcgtggccagc
497
          |||
Sbjct: 2953 aggatgccgttctgcgcggccaccccggtgccaccatgacagccgtgggcgtggccagc
2894

Query: 498  cccagggagcaggggcaggcaatgcacagcaccgtgatggacgtctggaaagcaaaccgg
557
          |||
Sbjct: 2893 cccagggagcaggggcaggcaatgcacagcaccgtgatggacgtctggaaagcaaaccgg
2834

Query: 558  atgatcacctctgtctgggagatgtgcttgttggggttaggaaagtatctctgaacaaca
617
          |||
Sbjct: 2833 atgatcacctctgtctgggagatgtgcttgttggggttaggaaagtatctctgaacaaca
2774

Query: 618  ccaaaatcgataaaaccgattacaatccataaccaccaacgtcaaagttgacatgatgatg
677
          |||
Sbjct: 2773 ccaaaatcgataaaaccgattacaatccataaccaccaacgtcaaagttgacatgatgatg
2714

Query: 678  ataaatgggacaaaaatatccactaaaccggtcagccagctgctgaatgggtgcctttgac
737
          |||
Sbjct: 2713 ataaatgggacaaaaatatccactaaaccggtcagccagctgctgaatgggtgcctttgac
2654

Query: 738  atctgagcctcttccaccagtttcacaatctgagccaaagtgggtgcattgcccacgtgg
797
          |||
Sbjct: 2653 atctgagcctcttccaccagtttcacaatctgagccaaagtgggtgcattgcccacgtgg
2594

Query: 798  gtagctttaatgagcacagagccatgtgcatttatagaccccgcaattacagtgccttcg
857
          |||
Sbjct: 2593 gtagctttaatgagcacagagccatgtgcatttatagaccccgcaattacagtgccttcg
2534

```

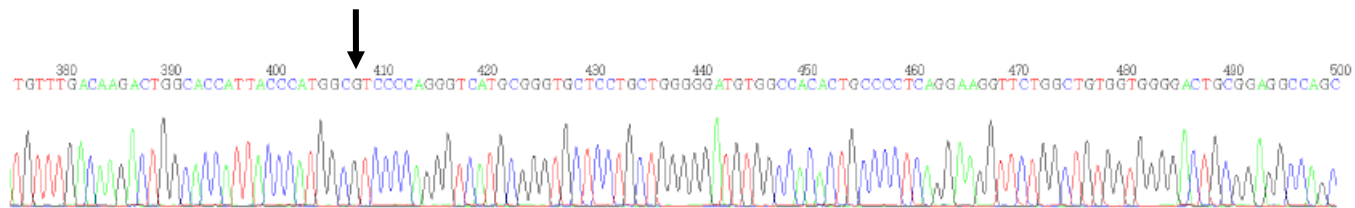
Query: 858 ggtttcttagtgactggcatggcttctcctgtgatgagggactcatcagccatgggtattg
917

Sbjct: 2533 ggtttcttagtgactggcatggcttctcctgtgatgagggactcatcagccatgggtattg
2474

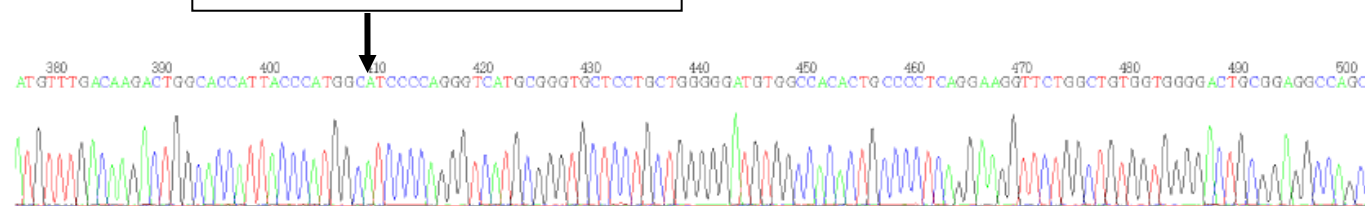
Query: 918 ccttccaggactttcccatccactggaaactttccccagggg 960

Sbjct: 2473 ccttccaggactttcccatccactggaaactttccccagggg 2431

Yaban tip *ATP7B* (K11F)



3106 G>A – V1036I (K11F)



Homo sapiens ATPase, Cu⁺⁺ transporting, beta polypeptide, mRNA (cDNA clone MGC:177511 IMAGE:9052494), complete cds

Length = 4398

Query: 80 ccatttatcatcatcatgtcaactttgacgttggtggtatggattgtaatcggttttattc
139

Sbjct: 2706 ccatttatcatcatcatgtcaactttgacgttggtggtatggattgtaatcggttttattc
2765

Query: 140 gatttttggtggttgttcagagatactttcctaaccccaacaagcacatctccagacagag
199

Sbjct: 2766 gatttttggtggttgttcagagatactttcctaaccccaacaagcacatctccagacagag
2825

Query: 200 gtgatcatccggtttgctttccagacgtccatcacggtgctgtgcattgcctgcccctgc
259

Sbjct: 2826 gtgatcatccggtttgctttccagacgtccatcacggtgctgtgcattgcctgcccctgc
2885

Query: 260 tccctggggctggccacgcccacggctgtcatggtgggcaccggggtggccgcgcagaac
319
|||||
Sbjct: 2886 tccctggggctggccacgcccacggctgtcatggtgggcaccggggtggccgcgcagaac
2945

Query: 320 ggcacacctcatcaaggaggcaagcccctggagatggcgacacaagataaagactgtgatg
379
|||||
Sbjct: 2946 ggcacacctcatcaaggaggcaagcccctggagatggcgacacaagataaagactgtgatg
3005

↓

Query: 380 tttgacaagactggcaccattacccatggcatccccagggtcatgcgggtgctcctgctg
439
|||||
Sbjct: 3006 tttgacaagactggcaccattacccatggcgtccccagggtcatgcgggtgctcctgctg
3065

Query: 440 ggggatgtggccacactgcccctcaggaaggttctggctgtggtggggactgcggaggcc
499
|||||
Sbjct: 3066 ggggatgtggccacactgcccctcaggaaggttctggctgtggtggggactgcggaggcc
3125

Query: 500 agcagtgaacacccccttgggcgtggcagtcaccaaatactgtaaagaggaacttgaaca
559
|||||
Sbjct: 3126 agcagtgaacacccccttgggcgtggcagtcaccaaatactgtaaagaggaacttgaaca
3185

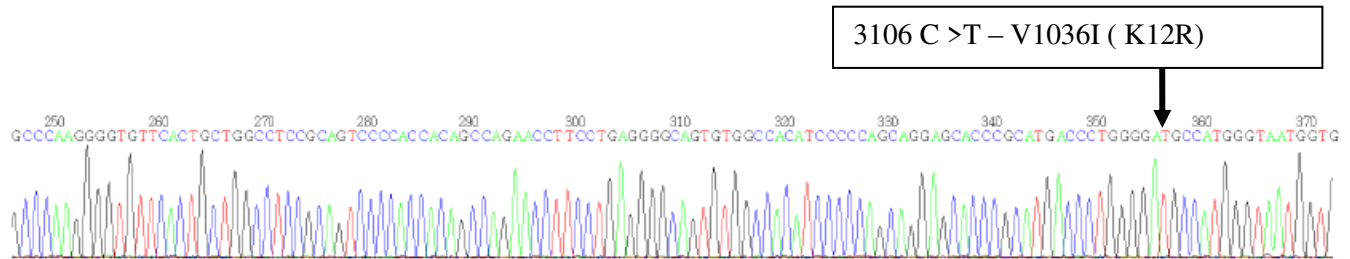
Query: 560 gagaccttgggatactgcacggacttccaggcagtgccaggctgtggaattgggtgcaaa
619
|||||
Sbjct: 3186 gagaccttgggatactgcacggacttccaggcagtgccaggctgtggaattgggtgcaaa
3245

Query: 620 gtcagcaacgtggaaggcatcctggcccacagtgagcgccctttgagtgcaccggccagt
679
|||||
Sbjct: 3246 gtcagcaacgtggaaggcatcctggcccacagtgagcgccctttgagtgcaccggccagt
3305

Query: 680 cacctgaatgaggctggcagccttcccgagaaaaagatgcagtccccagaccttctct
739
|||||
Sbjct: 3306 cacctgaatgaggctggcagccttcccgagaaaaagatgcagtccccagaccttctct
3365

Query: 740 gtgctgattggaaaccgtgagtggctgaggcgcaacggtttaaccatttctagcgatgtc
799
|||||
Sbjct: 3366 gtgctgattggaaaccgtgagtggctgaggcgcaacggtttaaccatttctagcgatgtc
3425

Query: 800 agtgacgctatgacagaccacgagatgaaaggacagacagccatcctgggtggctattgac
859
Sbjct: 3426 agtgacgctatgacagaccacgagatgaaaggacagacagccatcctgggtggctattgac



Homo sapiens ATPase, Cu⁺⁺ transporting, beta polypeptide, mRNA (cDNA clone MGC:177511 IMAGE:9052494), complete cds
Length = 4398

Query: 80 ttcaggtgactggccggtgcactcaaagggcgctcactgtgggccaggatgccttccacg
139
Sbjct: 3313 ttcaggtgactggccggtgcactcaaagggcgctcactgtgggccaggatgccttccacg
3254

Query: 140 ttgctgactttgcaccaattccacagcctggcactgcctggaagtccgtgcagtatccc
199
Sbjct: 3253 ttgctgactttgcaccaattccacagcctggcactgcctggaagtccgtgcagtatccc
3194

Query: 200 aaggtctctgttccaagttcctctttacagtatttggtgactgccacgccaaggggtgt
259
Sbjct: 3193 aaggtctctgttccaagttcctctttacagtatttggtgactgccacgccaaggggtgt
313

Query: 260 tcaactgctggcctccgcagtcaccacacagccagaaccttctgaggggcagtgtggcc
319
Sbjct: 3133 tcaactgctggcctccgcagtcaccacacagccagaaccttctgaggggcagtgtggcc
3074

↓

Query: 320 acatccccccagcaggagcaccgcgatgacctggggatgccatgggtaatgggtgccagtc
379
Sbjct: 3073 acatccccccagcaggagcaccgcgatgacctggggacgccatgggtaatgggtgccagtc
3014

Query: 380 ttgtcaaacatcacagtctttatcttgtgcgccatctccaggggcttgccctcccttgatg
439
Sbjct: 3013 ttgtcaaacatcacagtctttatcttgtgcgccatctccaggggcttgccctcccttgatg
2954

Query: 440 aggatgccgttctgcgcgccaccccggtgccaccatgacagccgtgggctggccagc
499
|||||
Sbjct: 2953 aggatgccgttctgcgcgccaccccggtgccaccatgacagccgtgggctggccagc
2894

Query: 500 cccagggagcaggggcaggcaatgcacagcaccgtgatggacgtctggaaagcaaaccgg
559
|||||
Sbjct: 2893 cccagggagcaggggcaggcaatgcacagcaccgtgatggacgtctggaaagcaaaccgg
2834

Query: 560 atgatcacctctgtctgggagatgtgcttgttggggttaggaaagtatctctgaacaaca
619
|||||
Sbjct: 2833 atgatcacctctgtctgggagatgtgcttgttggggttaggaaagtatctctgaacaaca
2774

Query: 620 ccaaaatcgataaaaccgattacaatccataccaccaacgtcaaagttgacatgatgatg
679
|||||
Sbjct: 2773 ccaaaatcgataaaaccgattacaatccataccaccaacgtcaaagttgacatgatgatg
2714

Query: 680 ataaatgggacaaaatatccactaaaccggtcagccagctgctgaatgggtgcctttgac
739
|||||
Sbjct: 2713 ataaatgggacaaaatatccactaaaccggtcagccagctgctgaatgggtgcctttgac
2654

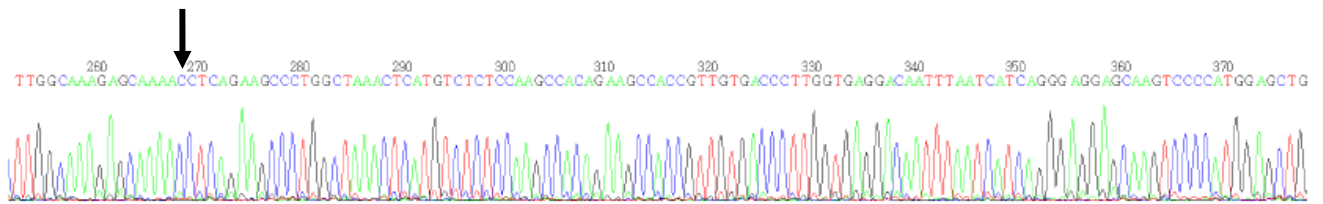
Query: 740 atctgagcctcttccaccagtttcacaatctgagccaaagtgggtgtcattgccacgtgg
799
|||||
Sbjct: 2653 atctgagcctcttccaccagtttcacaatctgagccaaagtgggtgtcattgccacgtgg
2594

Query: 800 gtagctttaatgagcacagagccatgtgcatttatagaccccgcaattacagtgttccg
859
|||||
Sbjct: 2593 gtagctttaatgagcacagagccatgtgcatttatagaccccgcaattacagtgttccg
2534

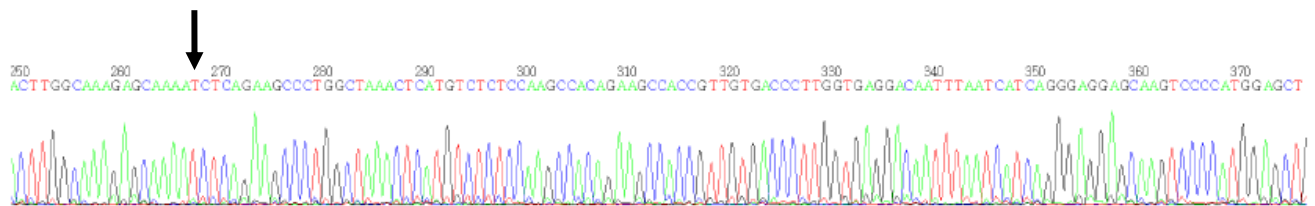
Query: 860 ggtttcttagtgactggcatggcttctcctgtgatgagggactcatcagccatggtattg
919
|||||
Sbjct: 2533 ggtttcttagtgactggcatggcttctcctgtgatgagggactcatcagccatggtattg
2474

Query: 920 ccttccaggactttcccatccactggaaactttccccagggaccaccttgacgatatcg
979
|||||
Sbjct: 2473 ccttccaggactttcccatccactggaaactttccccagggaccaccttgacgatatcg
2414

Yaban Tip *ATP7B* (K9F)



2363 C > T – T788I (K9F)



Homo sapiens ATPase, Cu⁺⁺ transporting, beta polypeptide (*ATP7B*), transcript variant 1, mRNA

Length = 6644

Query: 24 cagctcctcggtgggtggtacttctacgttcaggcctacaaatctctgagacacaggtca 83
 |||||
 Sbjct: 2276 cagctcctcggtgggtggtacttctacgttcaggcctacaaatctctgagacacaggtca
 2335

Query: 84 gccaacatggacgtgctcatcgctcctggccacaagcattgcttatgtttattctctggtc 143
 |||||
 Sbjct: 2336 gccaacatggacgtgctcatcgctcctggccacaagcattgcttatgtttattctctggtc
 2395

Query: 144 atcctggtggttgctgtggctgagaaggcggagaggagccctgtgacattcttcgacacg 203
 |||||
 Sbjct: 2396 atcctggtggttgctgtggctgagaaggcggagaggagccctgtgacattcttcgacacg
 2455

Query: 204 ccccccattgctctttgtgttcattgccctgggcccgtggctggaacacttggaagagc 263
 |||||
 Sbjct: 2456 ccccccattgctctttgtgttcattgccctgggcccgtggctggaacacttggaagagc
 2515

Query: 264 aaaatctcagaagccctggctaaactcatgtctctccaagccacagaagccaccgttggtg 323
 |||||
 Sbjct: 2516 aaaacctcagaagccctggctaaactcatgtctctccaagccacagaagccaccgttggtg
 2575

Query: 324 acccttggtgaggacaattttaatcatcagggaggagcaagtcccatggagctggtgcag
383
|||||
Sbjct: 2576 acccttggtgaggacaattttaatcatcagggaggagcaagtcccatggagctggtgcag
2635

Query: 384 cggggcgatatcgtcaaggtggtccctgggggaaagtttccagtggatgggaaagtcctg
443
|||||
Sbjct: 2636 cggggcgatatcgtcaaggtggtccctgggggaaagtttccagtggatgggaaagtcctg
2695

Query: 444 gaaggcaataccatggctgatgagtcctcatcacaggagaagccatgccagtcactaag
503
|||||
Sbjct: 2696 gaaggcaataccatggctgatgagtcctcatcacaggagaagccatgccagtcactaag
2755

Query: 504 aaacccggaagcactgtaattgcggggtctataaatgcacatggctctgtgctcattaaa
563
|||||
Sbjct: 2756 aaacccggaagcactgtaattgcggggtctataaatgcacatggctctgtgctcattaaa
281

Query: 564 gctaccacgtgggcaatgacaccactttggctcagattgtgaaactggtggaagaggct
623
|||||
Sbjct: 2816 gctaccacgtgggcaatgacaccactttggctcagattgtgaaactggtggaagaggct
2875

Query: 624 cagatgtcaaaggcaccattcagcagctggctgaccggttagtgatattttgtccca
683
|||||
Sbjct: 2876 cagatgtcaaaggcaccattcagcagctggctgaccggttagtgatattttgtccca
2935

Query: 684 tttatcatcatcatgtcaactttgacgttggtggtatggattgtaatcggttttatcgat
743
|||||
Sbjct: 2936 tttatcatcatcatgtcaactttgacgttggtggtatggattgtaatcggttttatcgat
2995

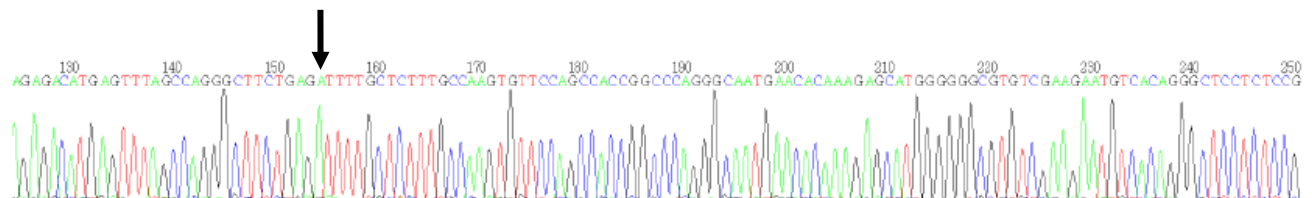
Query: 744 tttggtgttggtcagagatactttcctaaccccaacaagcacatctccagacagagggtg
803
|||||
Sbjct: 2996 tttggtgttggtcagagatactttcctaaccccaacaagcacatctccagacagagggtg
3055

Query: 804 atcatccggtttgctttccagacgtccatcacgggtgctgtgcattgcctgcccctgctcc
863
|||||
Sbjct: 3056 atcatccggtttgctttccagacgtccatcacgggtgctgtgcattgcctgcccctgctcc
3115

Query: 864 ctggggctggccacgcccacggctgtcatggtgggcaccggggtggccgcgagaacggc
923
|||||
Sbjct: 3116 ctggggctggccacgcccacggctgtcatggtgggcaccggggtggccgcgagaacggc
3175

Query: 924 atcctcatcaagggagggaagcccctggagatggcgacacaagataaagactgtgatgtt 982
 |||||
 Sbjct: 3176 atcctcatcaagggagggaagcccctggagatggcgacacaagataaagactgtgatgtt
 3234

2363 G >A – T788I K9R



Homo sapiens ATPase, Cu⁺⁺ transporting, beta polypeptide (ATP7B),
 transcript variant 1, mRNA
 Length = 6644

Query: 19 caccttgacgatatcgccccgctgcaccagctccatggggacttgctcctccctgatgat 78
 |||||
 Sbjct: 2656 caccttgacgatatcgccccgctgcaccagctccatggggacttgctcctccctgatgat
 2597

Query: 79 taaattgtcctcaccaagggtcacaacggtggcttctgtggcttgagagacatgagttt
 138
 |||||
 Sbjct: 2596 taaattgtcctcaccaagggtcacaacggtggcttctgtggcttgagagacatgagttt
 2537

Query: 139 agccagggcttctgagatTTTtTgctctttgccaagtgttccagccaccggcccagggcaat
 198
 |||||
 Sbjct: 2536 agccagggcttctgaggtTTTtTgctctttgccaagtgttccagccaccggcccagggcaat
 2477

Query: 199 gaacacaaagagcatggggggcggtgtcgaagaatgtcacagggctcctctccgccttctc
 258
 |||||
 Sbjct: 2476 gaacacaaagagcatggggggcggtgtcgaagaatgtcacagggctcctctccgccttctc
 2417

Query: 259 agccacagcaaccaccaggatgaccagagaataaacataagcaatgcttgtggccaggac
 318
 |||||
 Sbjct: 2416 agccacagcaaccaccaggatgaccagagaataaacataagcaatgcttgtggccaggac
 2357

Query: 319 gatgagcacgtccatggttggtgacctgtgtctcagagatttgtaggcctgaacgtagaa
 378
 |||||
 Sbjct: 2356 gatgagcacgtccatggttggtgacctgtgtctcagagatttgtaggcctgaacgtagaa
 2297

Query: 379 gtaccacccaccgaggagctggacaaaggtacacaagataaagaagatgagatttagaat
438
|||||
Sbjct: 2296 gtaccacccaccgaggagctggacaaaggtacacaagataaagaagatgagatttagaat
2237

Query: 439 ggacagtcctggaatgatgttggtccaggaccatggactggtggggctcgttgctggg
498
|||||
Sbjct: 2236 ggacagtcctggaatgatgttggtccaggaccatggactggtggggctcgttgctggg
2177

Query: 499 tatcagcatatagatcattaaggccatgacagggatgccaaacaccaggctgcacaggaa
558
|||||
Sbjct: 2176 tatcagcatatagatcattaaggccatgacagggatgccaaacaccaggctgcacaggaa
2117

Query: 559 agacttcttccactgctttatttccatcttggtggtccaagtgatgagcgttggggtttct
618
|||||
Sbjct: 2116 agacttcttccactgctttatttccatcttggtggtccaagtgatgagcgttggggtttct
2057

Query: 619 ctgggccagggaagcatgaaagccaatttcctcaataattttgataatatcccgtaggacc
678
|||||
Sbjct: 2056 ctgggccagggaagcatgaaagccaatttcctcaataattttgataatatcccgtaggacc
1997

Query: 679 gataatttccgggtcaaacttaacaagggctttgctggtggcaagggcaacggaggcata
738
|||||
Sbjct: 1996 gataatttccgggtcaaacttaacaagggctttgctggtggcaagggcaacggaggcata
1937

Query: 739 agtgatgccatttgtcctcgtgagtttgactctatggttggtgacacaggacgcgcaggt
798
|||||
Sbjct: 1936 agtgatgccatttgtcctcgtgagtttgactctatggttggtgacacaggacgcgcaggt
1877

Query: 799 catccctgtgattgtcagctcaatggtgccatcggagcctgcgtagtcctccatgactgc
858
|||||
Sbjct: 1876 catccctgtgattgtcagctcaatggtgccatcggagcctgcgtagtcctccatgactgc
1817

Query: 859 tgcctcaaaacccaggctcctggatgaactgagctatctcgaggggctggatgacctctgg
918
|||||
Sbjct: 1816 tgcctcaaaacccaggctcctggatgaactgagctatctcgaggggctggatgacctctgg
1757

```

Query: 919  gtcatacttgatctctgccttttctgcatcaaggcaaccaacacggagagaacaccagc
978
          |||
Sbjct: 1756  gtcatacttgatctctgccttttctgcatcaaggcaaccaacacggagagaacaccagc
1697

Query: 979  ttcttttctgc 988
          |||
Sbjct: 1696  ttcttttctgc 1687

```

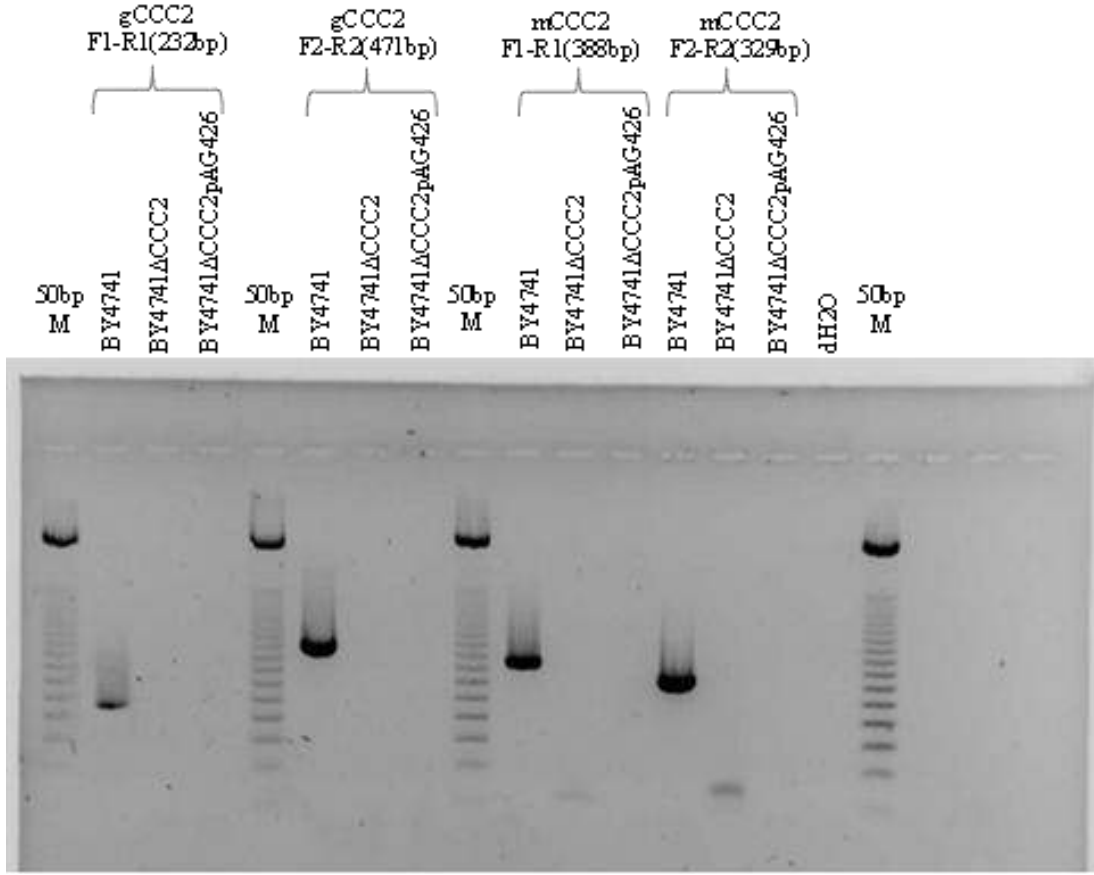
Şekil 17 : Yaban tip *ATP7B* ve T788I, V1036I, R1038G mutasyonlarına ait DNA dizi analizi sonuçları

Elde edilen dizi analizi sonuçları karşılaştırılarak değerlendirildiğinde, yaban tip *ATP7B*'yi içeren plazmid DNA'sındaki DNA dizisinin genin normal sekansı (NM_000053) uyumlu olduğu saptandı. Seçilen üç mutasyonunun her birini ayrı olarak içeren plazmid DNA'sında yapılan iki yönlü DNA dizi analizi sonucunda sadece istenen T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 mutasyonlarının varlığı saptandı. Her bir mutasyonu içeren plazmid DNA'da sadece istenen mutasyonların bulunduğu, ikincil mutasyonlar içermedikleri gösterildi. Her bir plazmid DNA'sında *ATP7B* geni ileri ve geri primerler yardımıyla tüm dizi (4459bp) taranarak, yaban tip *ATP7B*, T788I mutant *ATP7B*, V1036I mutant *ATP7B* ve R1038G-fsX83 mutant *ATP7B*'nin bulunduğu gösterildi.

4.9 *S.cerevisiae* BY4741 suşunda CCC2 geninin çıkarılmış olduğunun doğrulanması

S.cerevisiae bakır taşınımında görevli CCC2 geninin çıkarılmış olduğu BY4741 suşundan elde edilen genomik DNA ve cDNA ile BY4741 yaban tip suşundan elde edilen genomik DNA ve cDNA kalıp kullanılarak; *S.cerevisiae*'nin genomik DNA'sına spesifik dizayn ettiğimiz 2 çift primer ve cDNA'sına spesifik dizayn ettiğimiz 2 çift primer kullanılarak optimize edilen PCR reaksiyonu sonucu elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülüp görüntülendi.

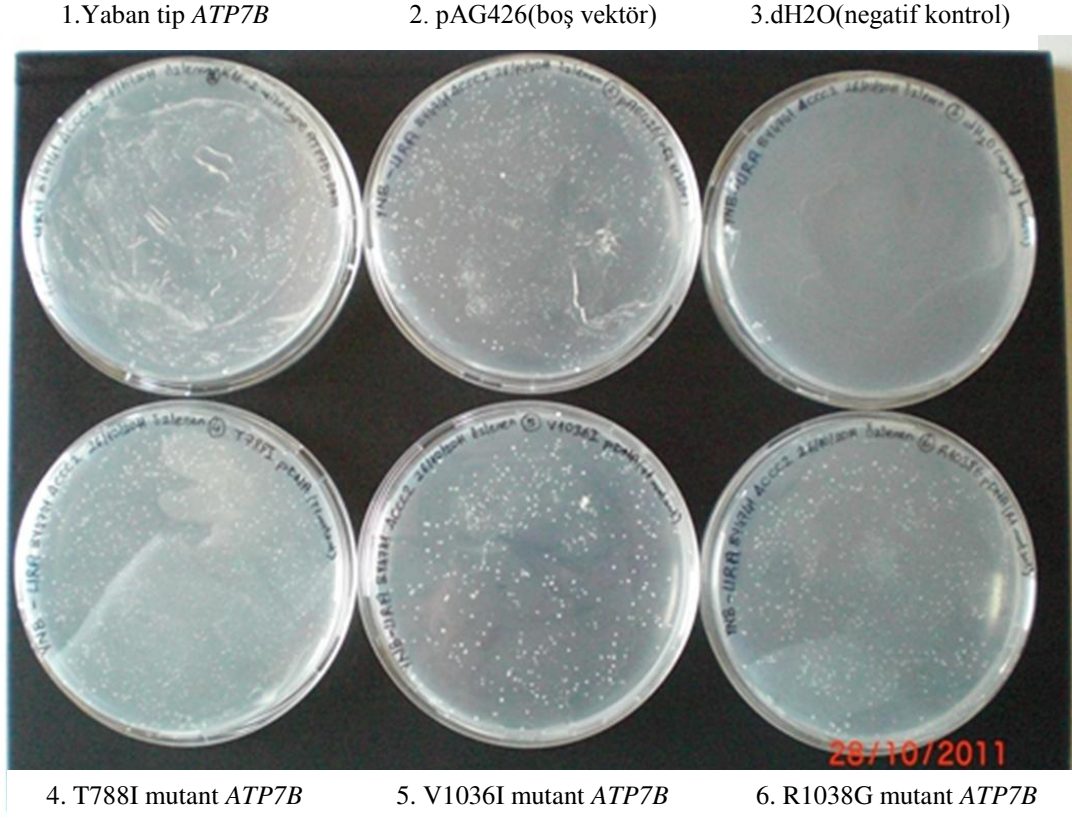
BY4741 yaban tip suşta hem DNA hem de cDNA düzeyinde beklenen büyüklükte bant saptanırken, BY4741'den CCC2 geni çıkarılmış suştan elde edilen DNA ve cDNA'da bant saptanmadı. Buna ilave olarak BY4741 ΔCCC2 suşuna boş vektörün transformasyonundan sonra elde edilen DNA ve cDNA'da PCR bandı saptanmadı. Böylece deneyde kullanılacak suş doğrulanmış oldu ve kullanılan maya ekspresyon vektörünün kendisinde bakır taşınımıyla ilgili genetik bilginin bulunmadığı doğrulandı (Şekil 18).



Şekil 18 : *S.cerevisiae* CCC2 geni genomik DNA'sına özgül dizayn ettiğimiz 2 primer çifti (gCCC2 F1-R1, gCCC2 F2-R2) ve mRNA'sına özgül dizayn ettiğimiz 2 primer çifti (mCCC2 F1-R1, mCCC2 F2-R2) ile BY4741 (yaban tip suş), BY4741ΔCCC2 (mutant suş) ve BY4741ΔCCC2 pAG426 (mutant şuşa boş vektör transforme edilmiş) suşlarından elde edilen genomik DNA ve mRNA kalıp kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu sonuçlarının %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü

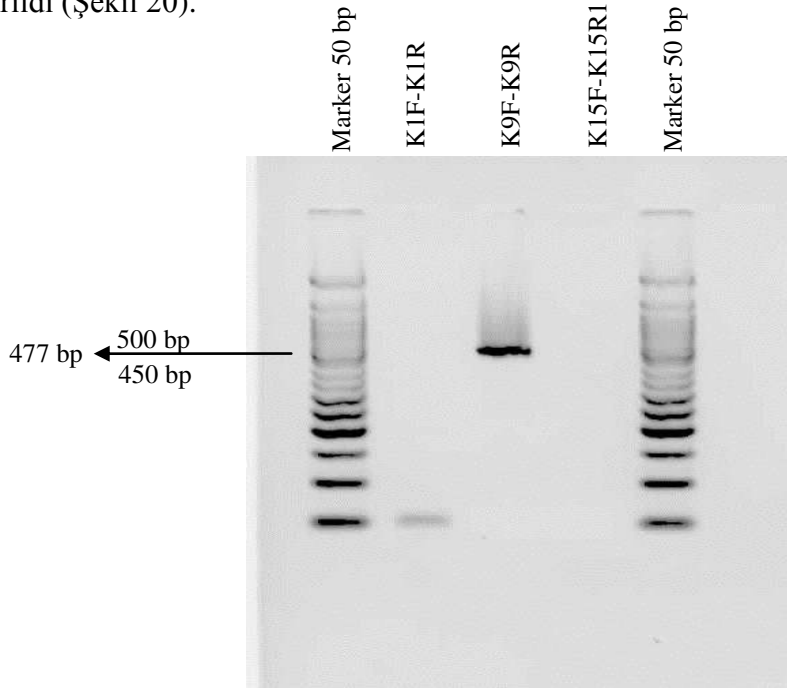
4.10 Maya Transformasyon Sonuçları

Yaban tip *ATP7B* içeren plazmid DNA, pAG426(baş vektör), T788I mutant plazmid DNA, V1036I mutant plazmid DNA ve R1038G-fsX83 mutant plazmid DNA LiAc metoduyla , *Saccharomyces cerevisiae* BY4741ΔCCC2 mutant maya suşuna her biri ayrı olarak aktarıldı. Seçici besiyerine ,YNB ortamına urasil yokluğunda ekim yapılarak pAG426 maya ekspresyon vektörünü içeren koloniler seçildi (Şekil 19).



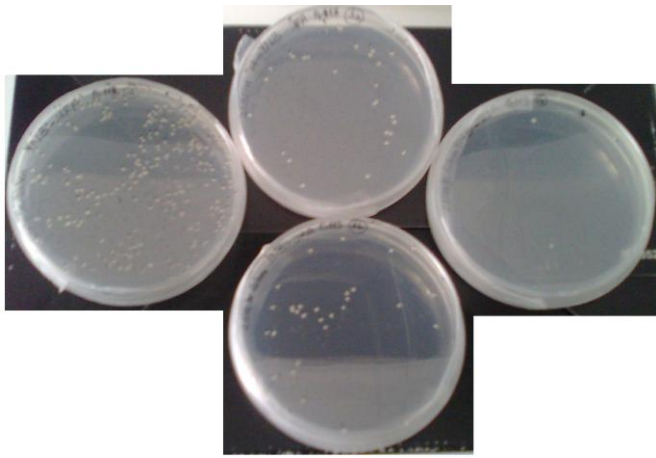
Şekil 19: Maya transformasyon deneyi sonuçları

Elde edilen maya kolonilerinden plazmid DNA izole edildi ve *ATP7B*'ye özgül primerler ile PCR kurulup agaroz jelde yürütülerek, *ATP7B*'nin plazmid DNA'daki varlığı gösterildi (Şekil 20).

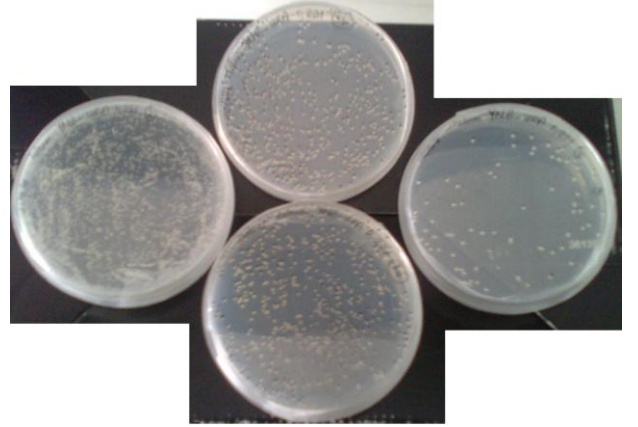


Şekil 20 : Maya plazmid DNA'sı ile *ATP7B* geninin gösterilmesi

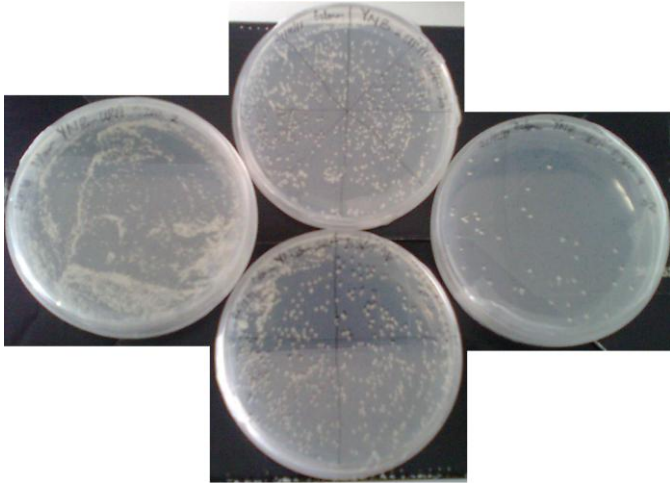
4.11 Optik Dansiteye Göre Hücre Sayısı Optimizasyonu ve Büyüme Eğrisi Çizimi



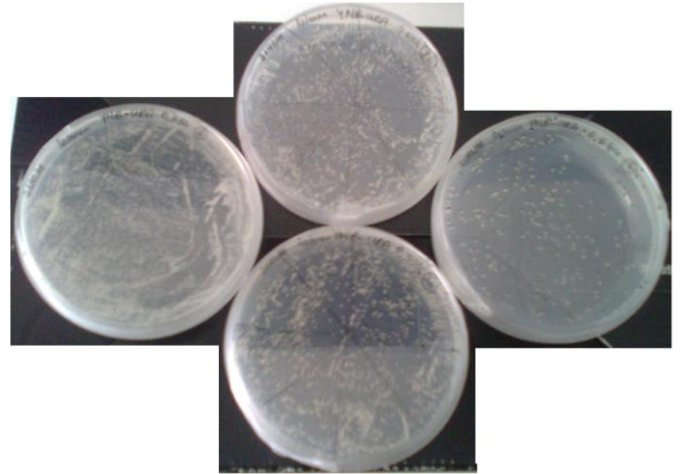
a. $OD_{600}=0,113$



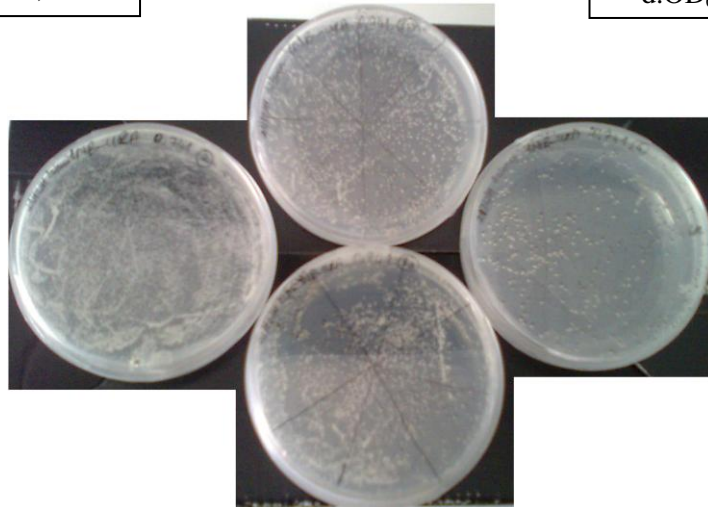
b. $OD_{600}=0,221$



c. $OD_{600}=0,360$

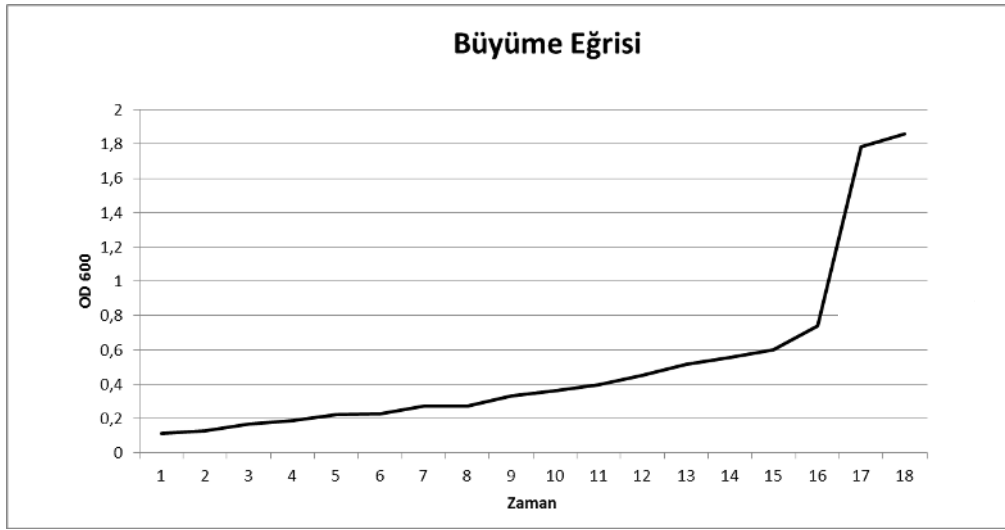


d. $OD_{600}=0,554$



e. $OD_{600}=0,741$

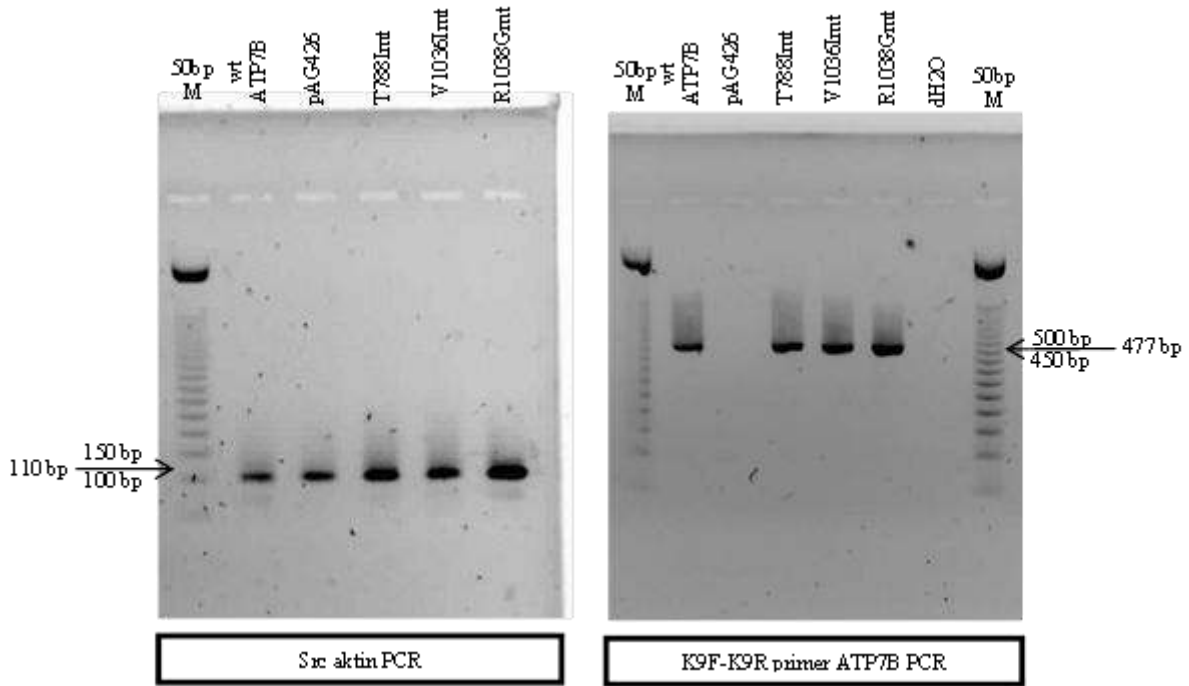
Şekil 21: Dilüsyonlardan yapılan ekimler sonucu üreyen koloniler



Şekil 22: Büyüme eğrisi optimizasyon deney sonuçları

4.12 Gen Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde Gösterilmesi

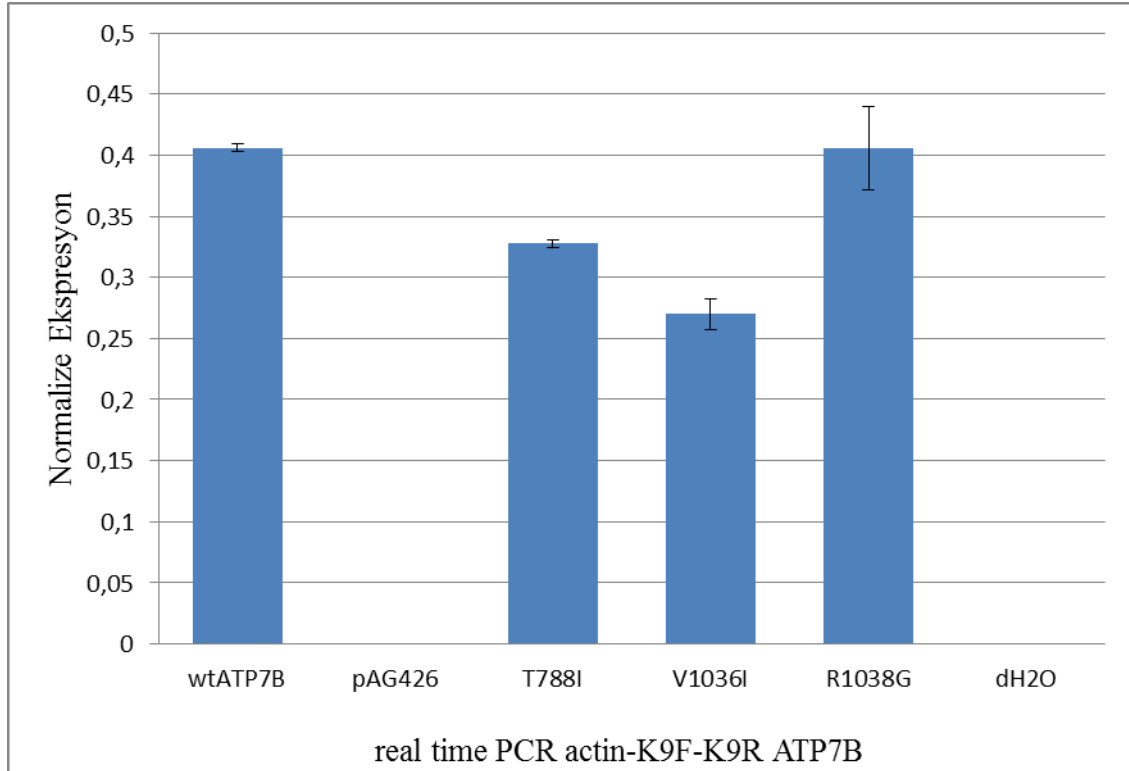
4.12a Konvansiyonel PCR Sonuçları



Şekil 23: Src aktin ve K9F K9R ATP7B konvansiyonel PCR örneklerinin %2'lik agaroz jel elektroforez sonucu

S.cerevisiae aktin genine özgül primerlerle cDNA varlığı gösterildi. *ATP7B* genine özgül K9F-K9R primerleriyle yapılan PCR sonucunda yaban tip *ATP7B*, T788I mutant, V1036I mutant ve R1038G-fsX83 mutant dizilerin eksprese olduğu gösterildi. pAG426 boş vektör ve PCR'ın kontrolü dH₂O (negatif kontrol)'da bant saptanmadı (Şekil 23).

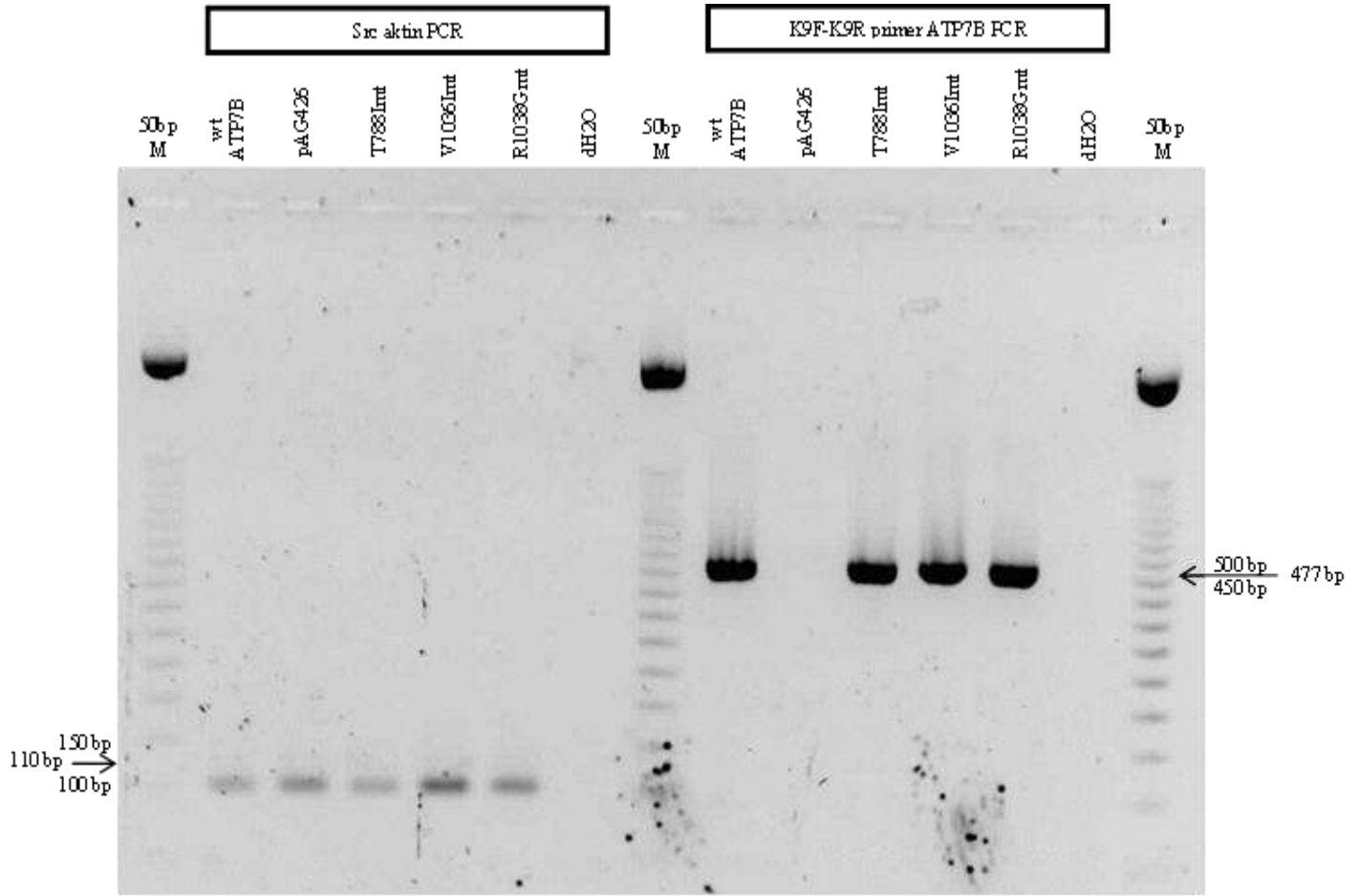
4.12b Real Time PCR sonuçları



Şekil 24: Real time PCR sonucu

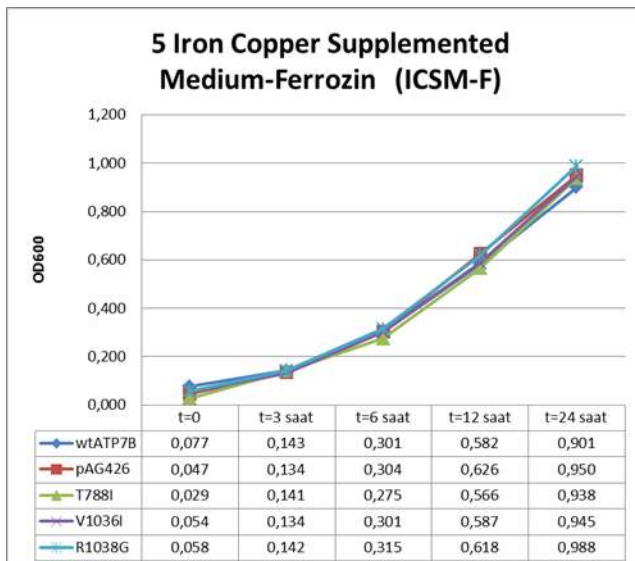
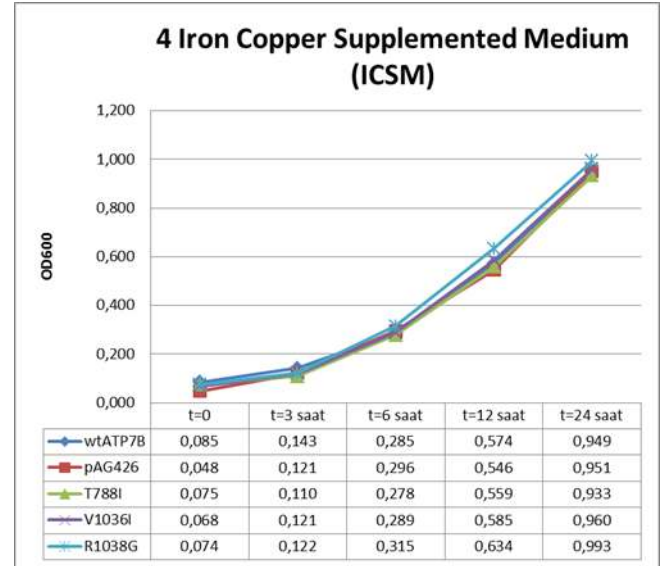
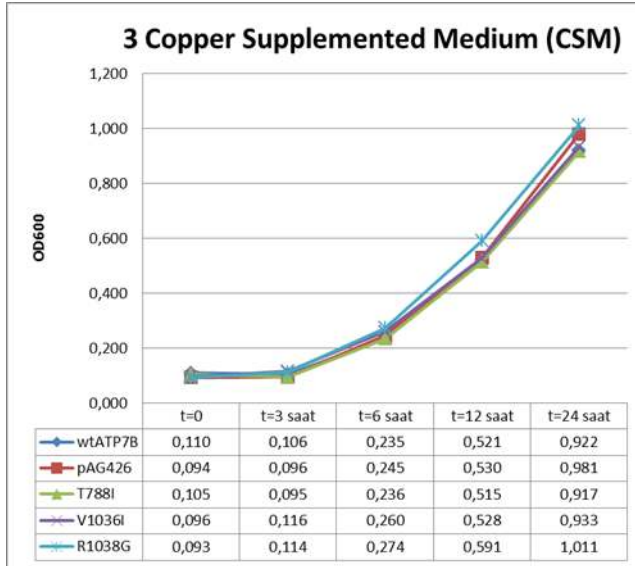
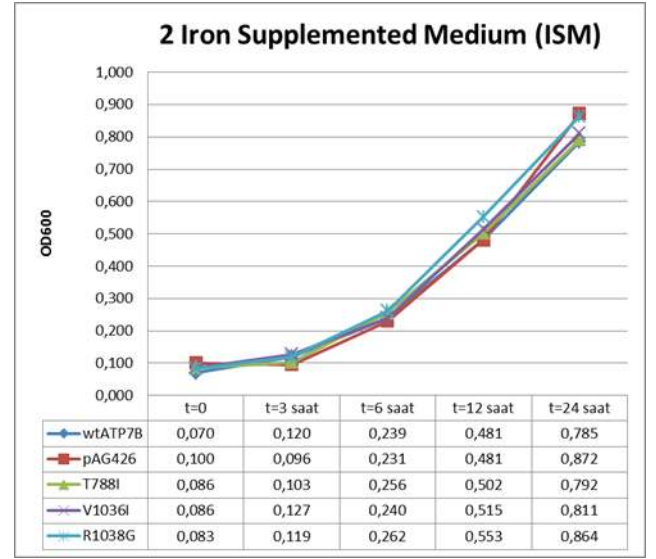
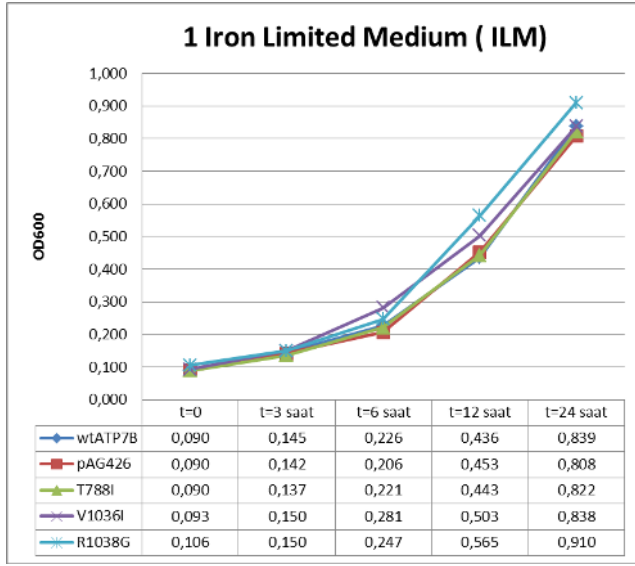
Yaban tip *ATP7B*, pAG426 (boş vektör), T788I mutant *ATP7B*, V1036I mutant *ATP7B* ve R1038G-fsX83 mutant *ATP7B*'yi içeren maya suşlarından elde edilen cDNA kalıp kullanılarak; *ATP7B* genine özgül K9F-K9R primerleri ile aktin genine özgül primerler varlığında kurulan real-time PCR reaksiyonu sonucunda ; yaban tip *ATP7B*, T788I mutant, V1036I mutant ve R1038G-fsX83 mutant örneklerin eksprese olduğu gösterildi. pAG426 boş vektör ve PCR'ın kontrolü dH₂O (negatif kontrol)'da ekspresyon saptanmadı (Şekil 24).

PCR örneklerinin agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen PCR ürünlerinin beklenen büyüklükte 477bp ve 110bp'lik fragmanlar olduğu gösterildi (Şekil 25).

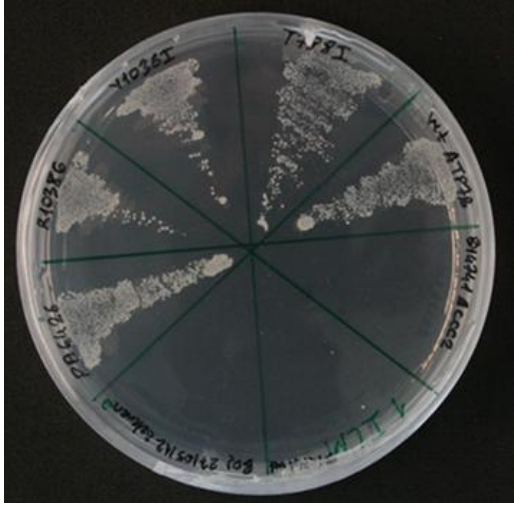


Şekil 25: Src aktin ve K9F K9R *ATP7B* real time PCR örneklerinin %2'lik agaroz elektroforez sonucu

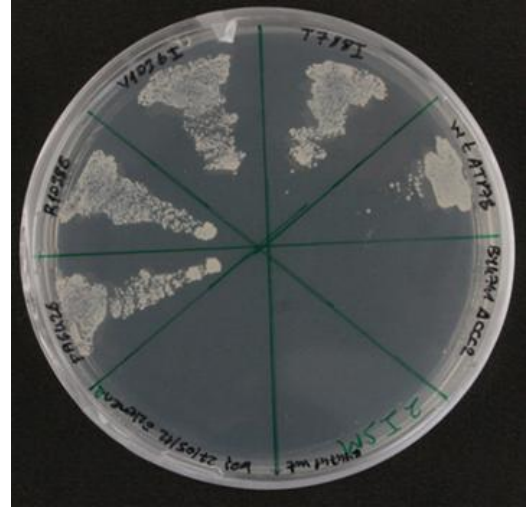
4.13 Komplementasyon Deneyi



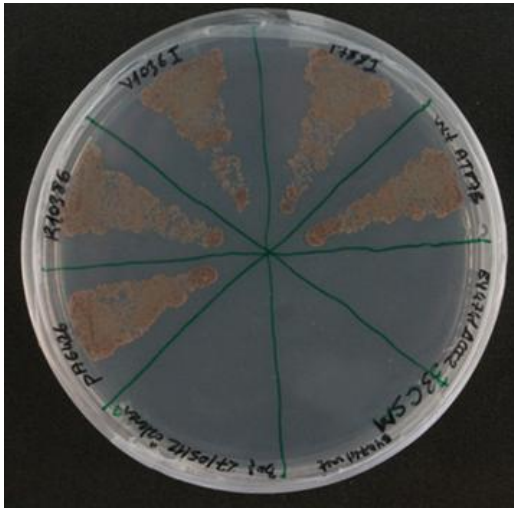
Şekil 26: ILM, ISM, CSM, ICSM, ICSM-F ortam koşullarında zamana karşı 600nm'deki optik dansite grafiği ile büyümenin takibi



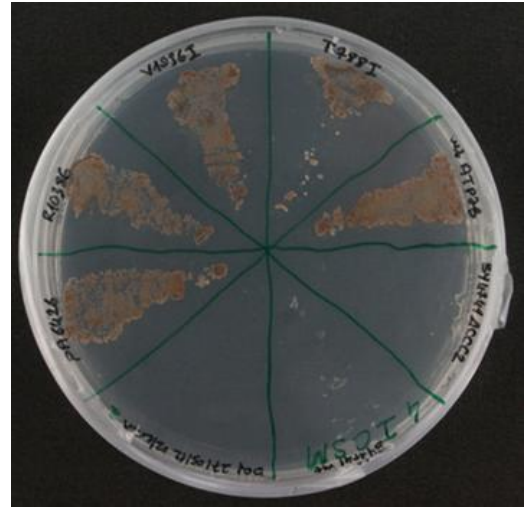
1.ILM



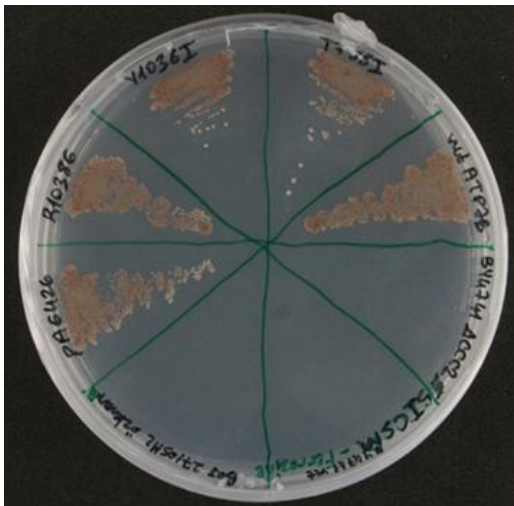
2.ISM



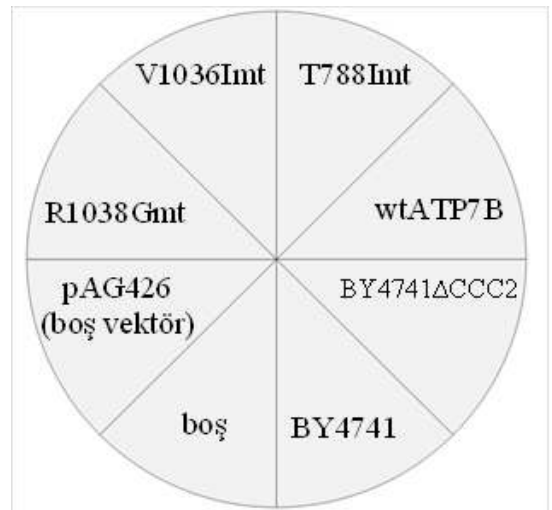
3.CSM



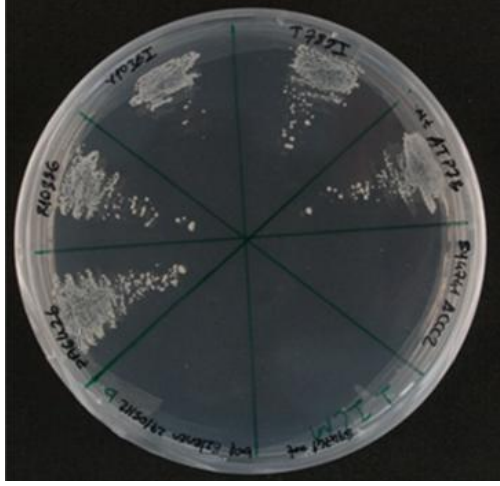
4.ICSM



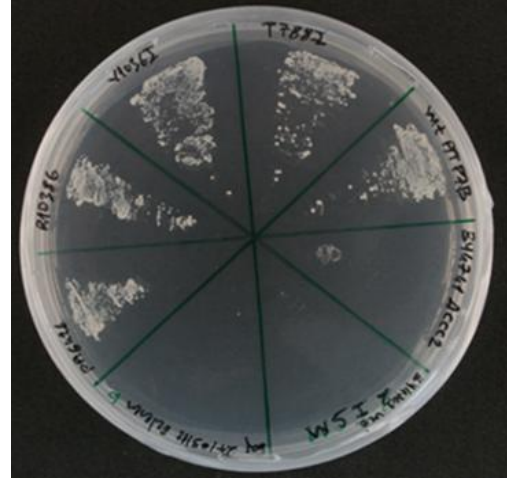
5.ICSM-F



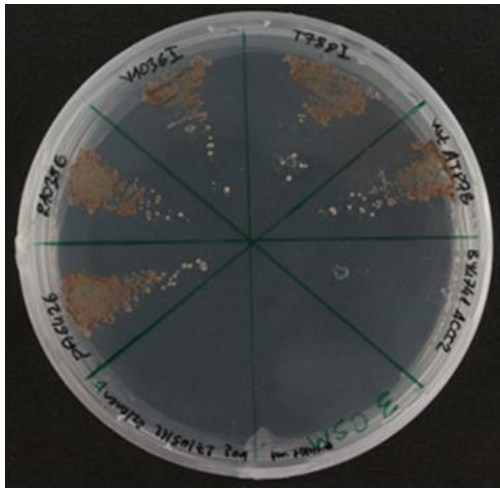
Şekil 27: Komplementasyon deneyi 1.ekim sonuçları: wtATP7B, pAG426, T788Imt, V1036Imt, R1038Gmt, BY4741, BY4741ΔCCC2, YNB-URA ILM, ISM, CSM, ICSM, ICSM-F ortama ekilip 48 saat sonra görüntülenmesi (her bölme OD600=0,1 'den 5µl ekildi)



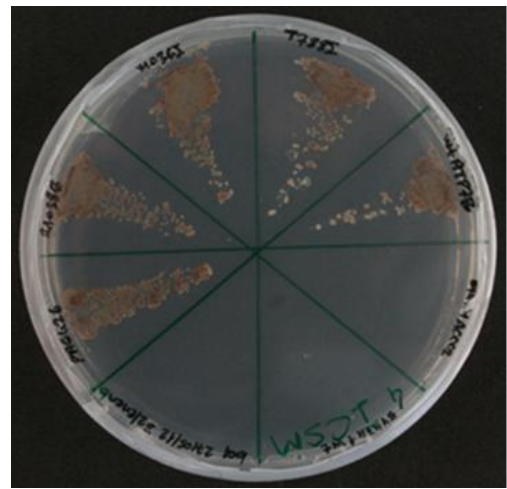
1.ILM



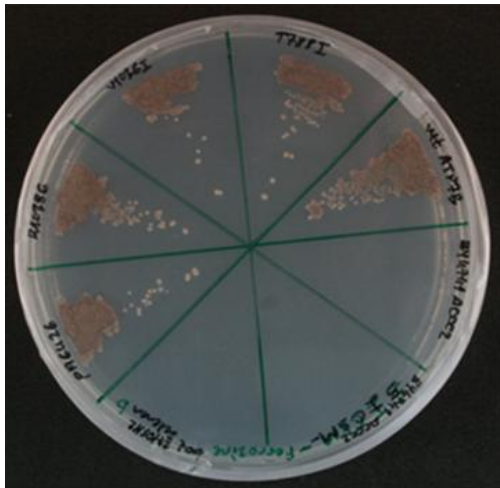
2.ISM



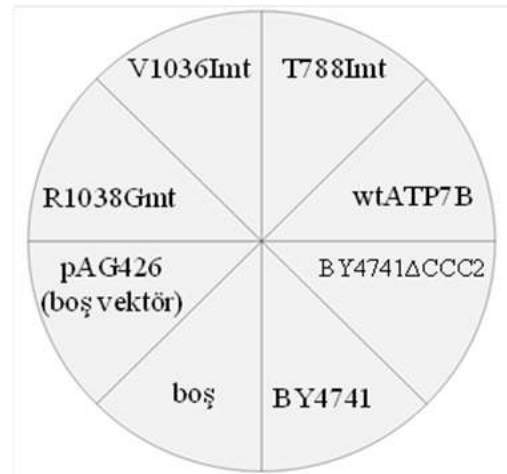
3.CSM



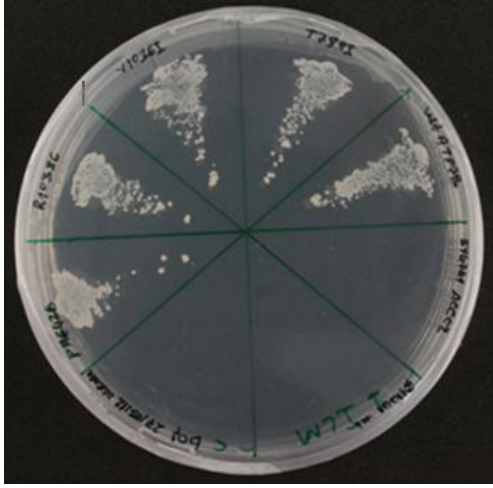
4.ICSM



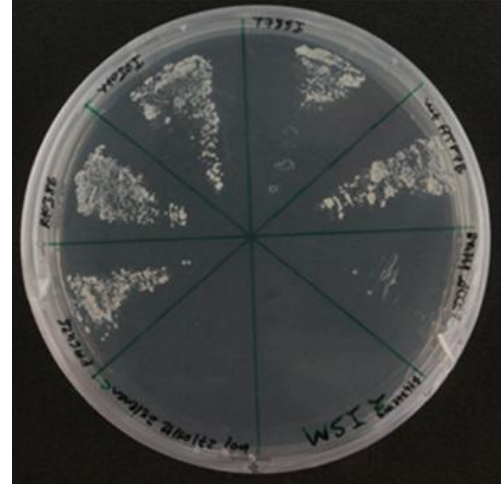
5.ICSM-F



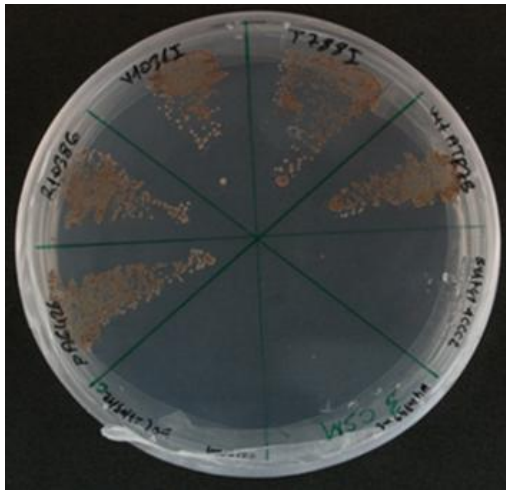
Şekil 28: Komplementasyon deneyi 2.ekim sonuçları: wtATP7B, pAG426, T788Imt, V1036Imt, R1038Gmt, BY4741, BY4741ΔCCC2, YNB-URA ILM, ISM, CSM, ICSM, ICSM-F ortama ekilip 48 saat sonra görüntülenmesi (her bölme OD600=0,1 'den 5µl ekildi)



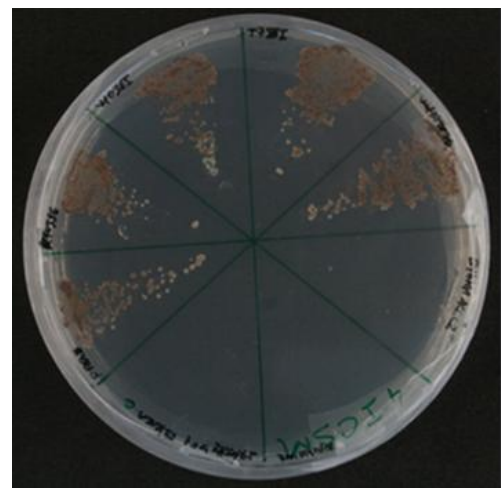
1.ILM



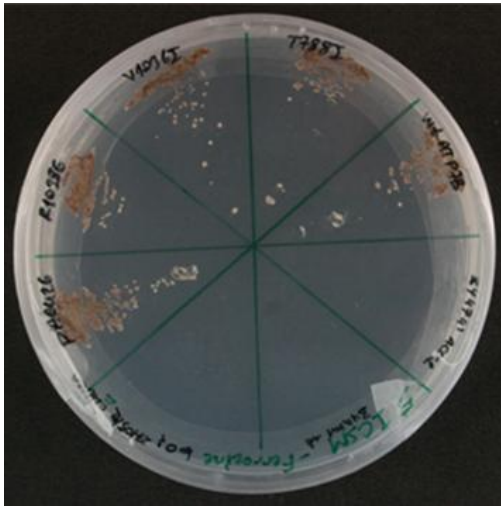
2.ISM



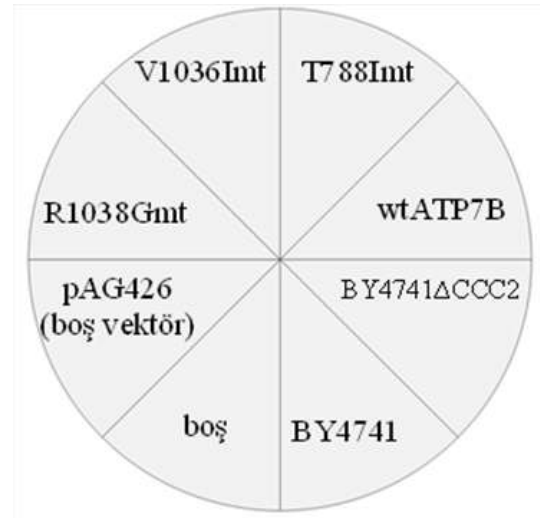
3.CSM



4.ICSM



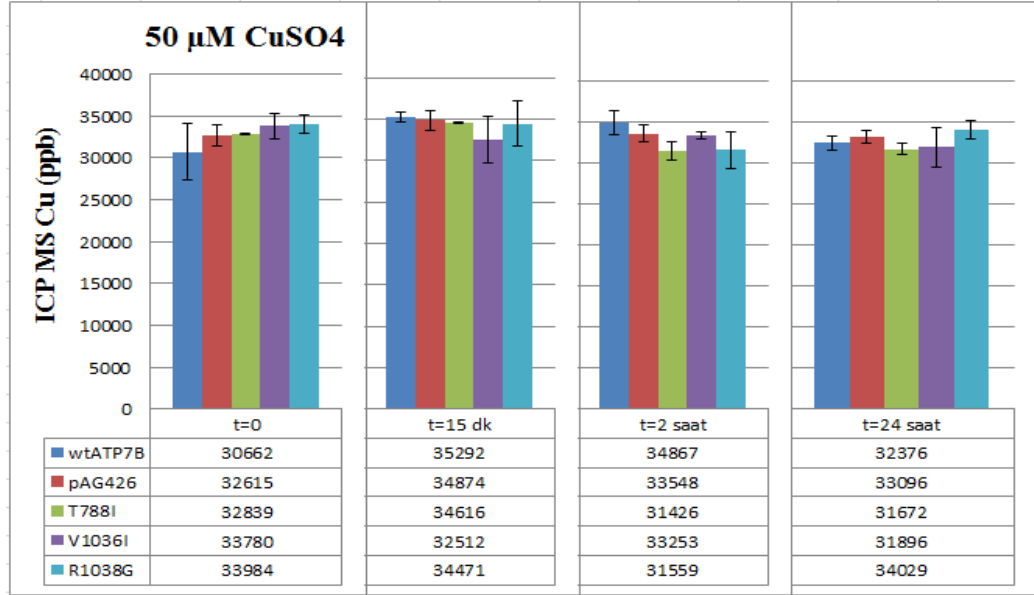
5.ICSM-F



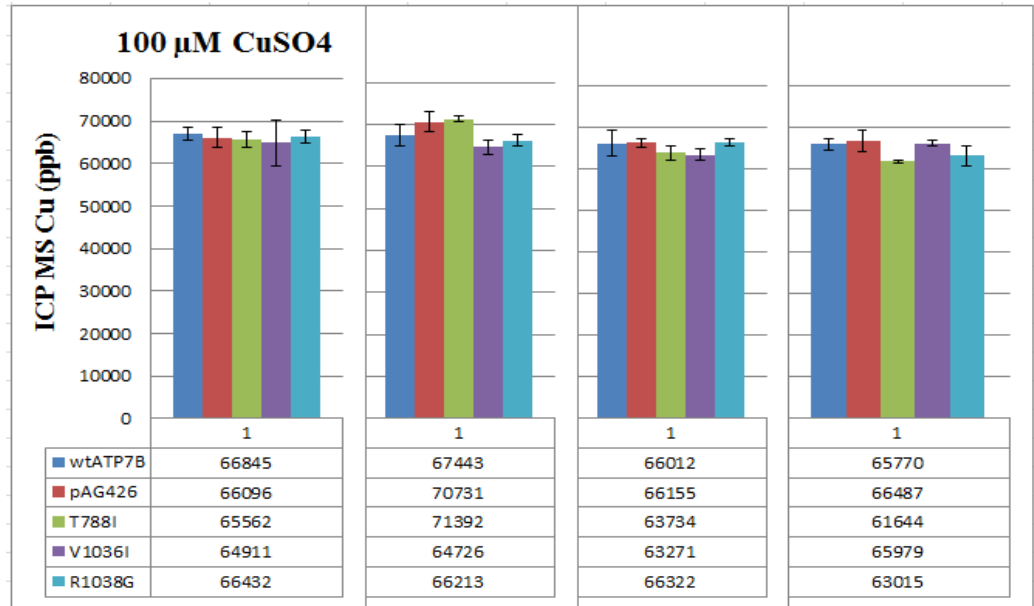
Şekil 29: Komplementasyon deneyi 3.ekim sonuçları: wtATP7B, pAG426, T788Int, V1036Int, R1038Gmt, BY4741, BY4741ΔCCC2, YNB-URA ILM, ISM, CSM, ICSM, ICSM-F ortama ekilip 48 saat sonra görüntülenmesi (her bölme OD600=0,1 'den 5µl ekildi)

4.14 ICP MS Sonuçları

ICP MS ile 50µM ve 100 µM bakır sülfat eklenmiş YNB-URA besiyerinde zamana bağlı olarak bakır miktarı ölçüm optimizasyon deneyleri yapılmıştır.



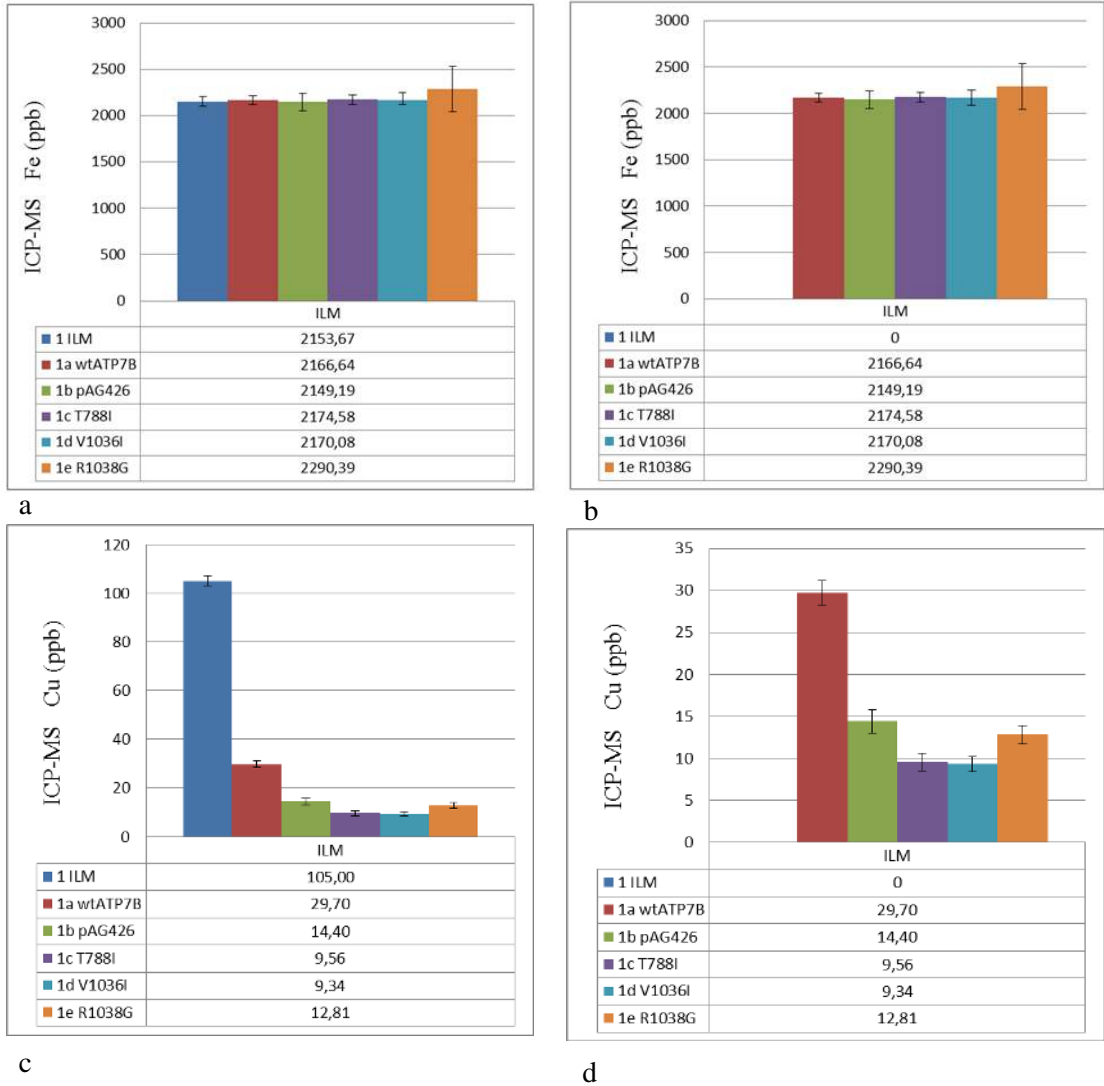
a



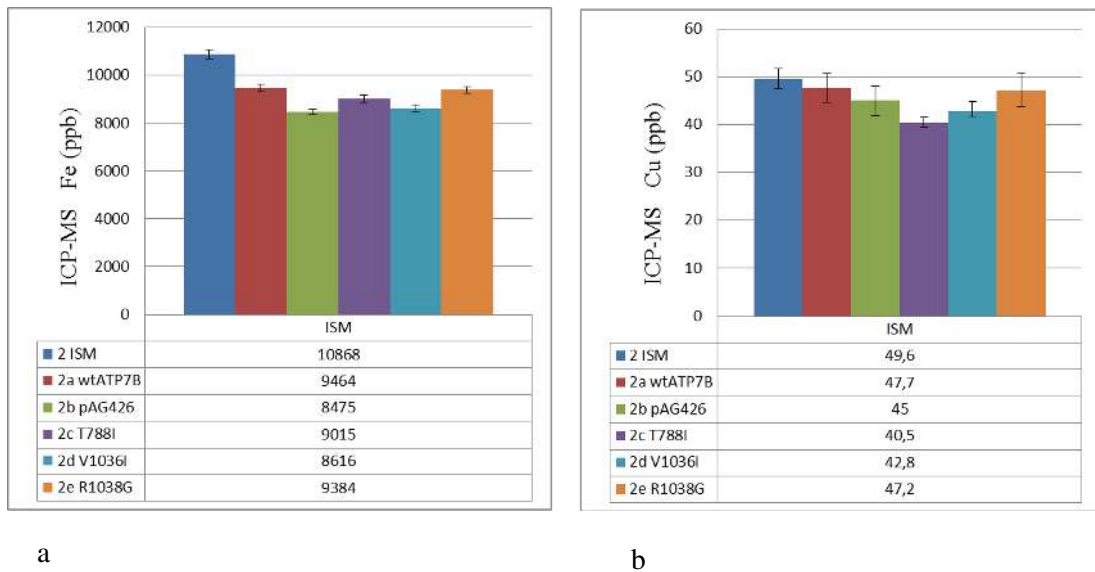
b

Şekil 30: ICP-MS bakır ölçümü optimizasyon grafikleri

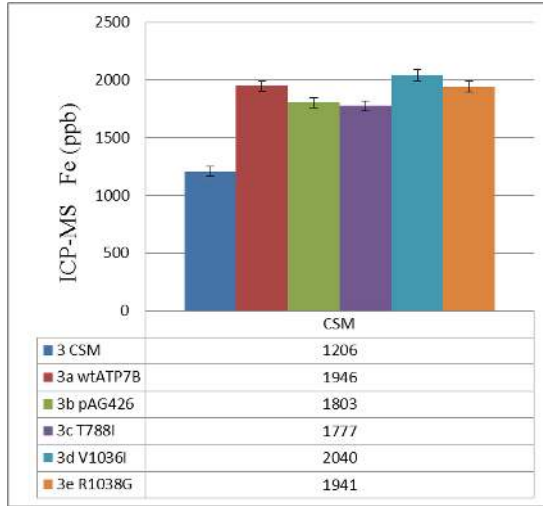
4.15 Komplementasyon Deneyi ortam bakır ve demir ICP MS Sonuçları:



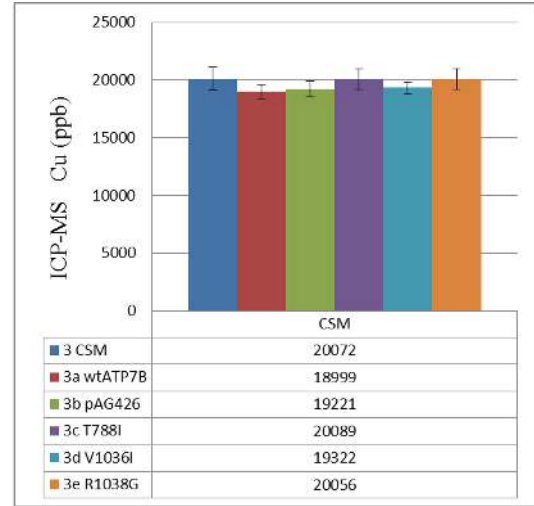
Şekil 31: ILM'de komplementasyon deneyi ortam ICP-MS demir ve bakır ölçümü grafiği



Şekil 32 : ISM'de komplementasyon deneyi ortam ICP-MS demir ve bakır ölçümü grafiği

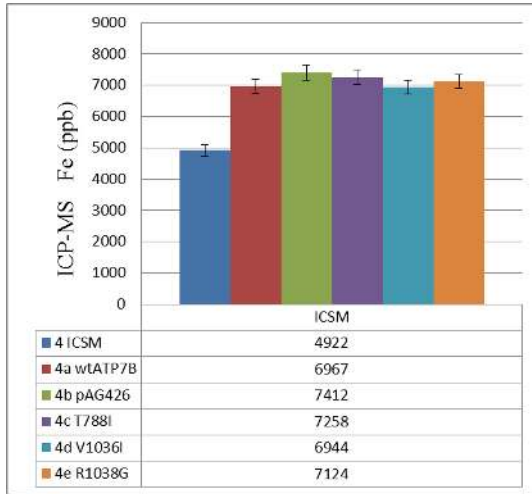


a

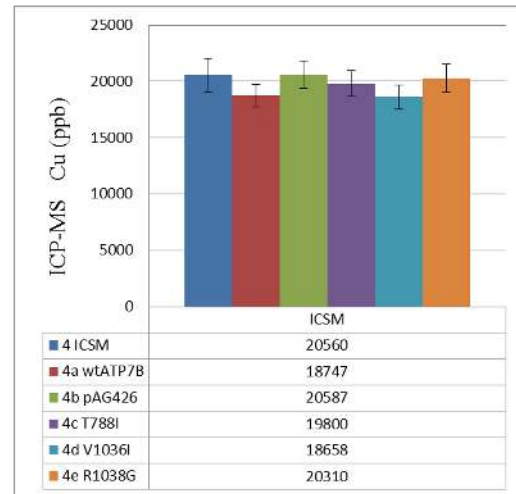


b

Şekil 33 : CSM’de komplementasyon deneyi ortam ICP-MS demir ve bakır ölçümü grafiği

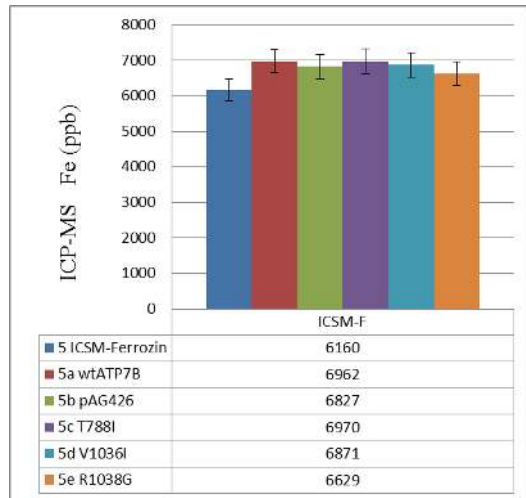


a

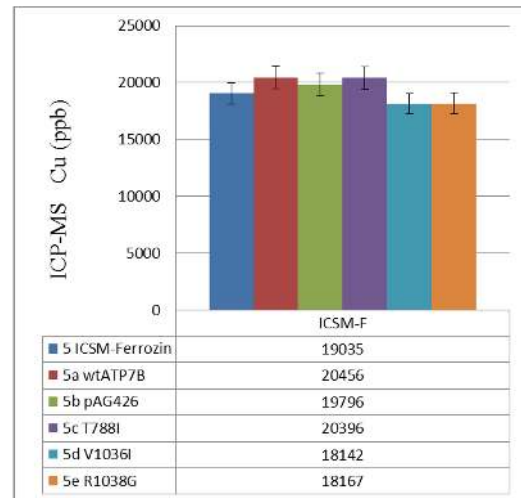


b

Şekil 34: ICSM’de komplementasyon deneyi ortam ICP-MS demir ve bakır ölçümü grafiği



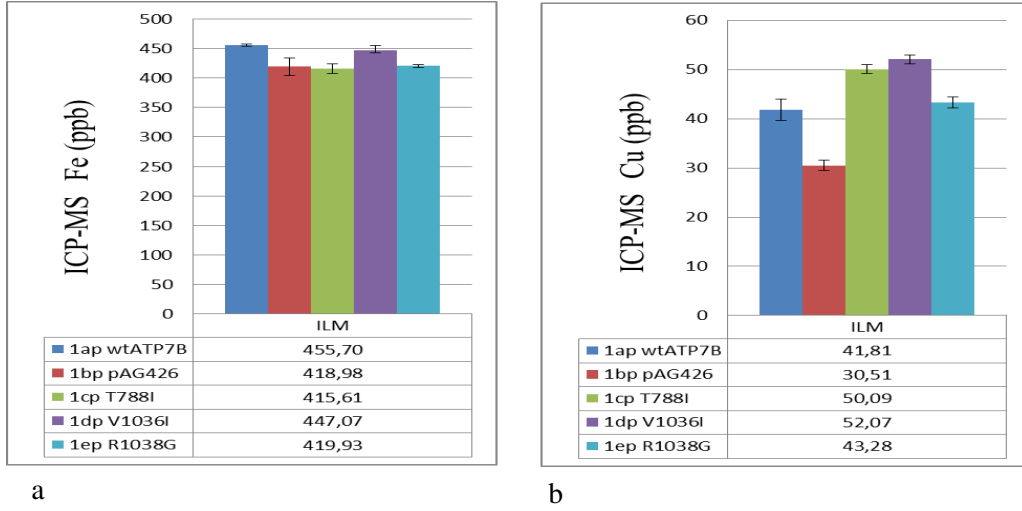
a



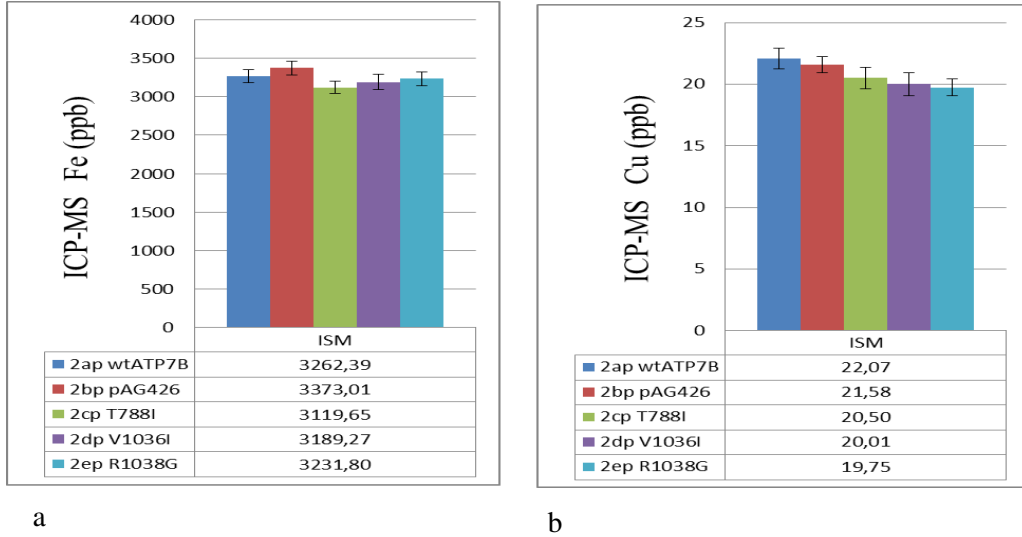
b

Şekil 35: ICSM-F’de komplementasyon deneyi ortam ICP-MS demir ve bakır ölçümü grafiği

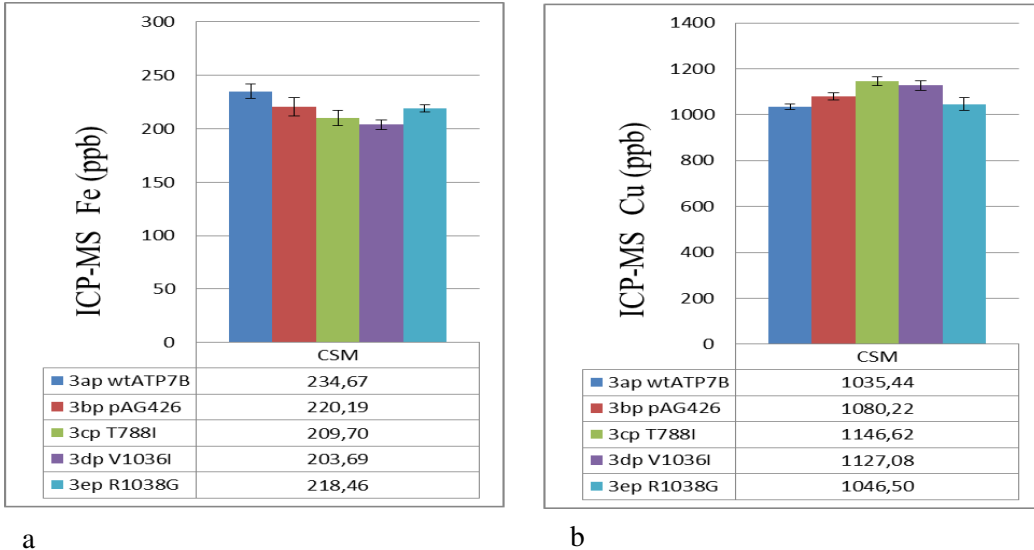
4.16 Komplementasyon Deneyi hücre pelleti bakır ve demir ICP MS Sonuçları:



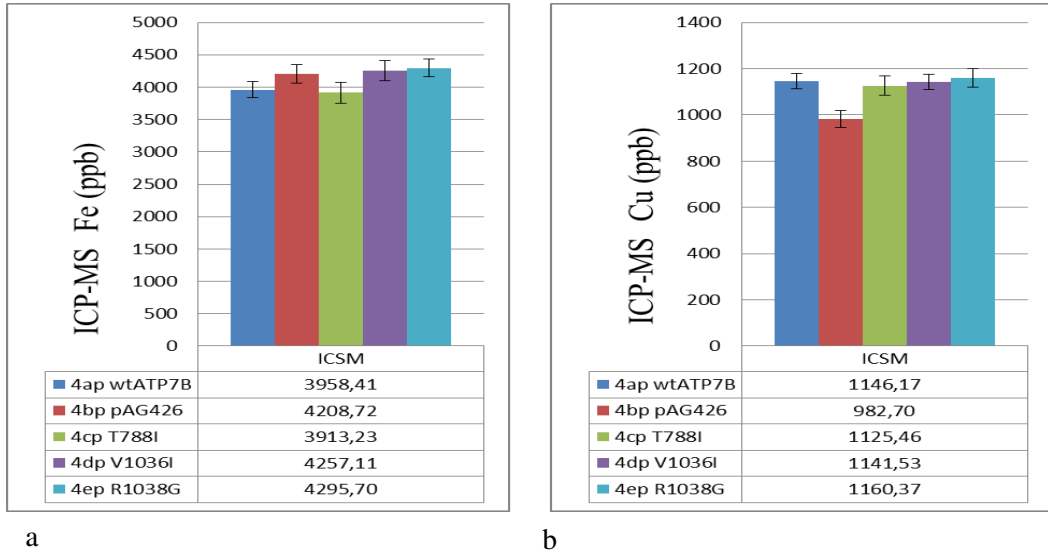
Şekil 36 : ILM'de komplementasyon deneyi pellet ICP-MS demir ve bakır ölçümü grafiği



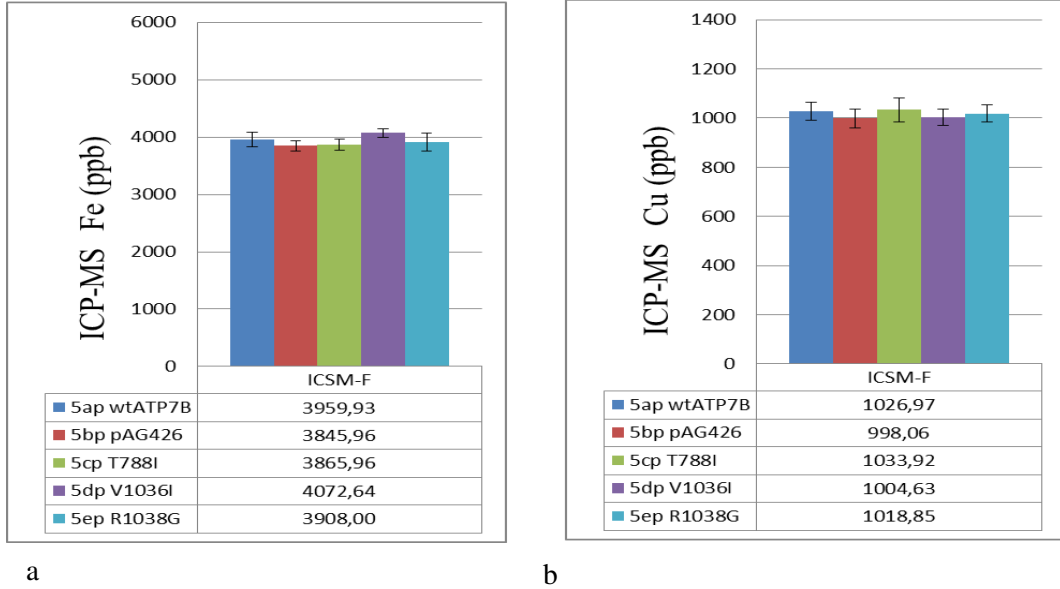
Şekil 37 : ISM'de komplementasyon deneyi pellet ICP-MS demir ve bakır ölçümü grafiği



Şekil 38 : CSM'de komplementasyon deneyi pellet ICP-MS demir ve bakır ölçümü grafiği



Şekil 39 : ICSM’de komplementasyon deneyi pellet ICP-MS demir ve bakır ölçümü grafiği



Şekil 40 : ICSM-F’de komplementasyon deneyi pellet ICP-MS demir ve bakır ölçümü grafiği

Ortam ICP-MS bakır miktarı ölçümü sonucunda, demir sınırlı ortamda (ILM) yaban tip *ATP7B*’ye göre T788I mutant, V1036I mutant ve R1038G-fsX83 mutant *ATP7B*’yi taşıyan hücrelerde üreme ortamındaki bakır miktarı azalmıştır. ILM’de ortam demir miktarı ölçüm sonucunda yaban tip *ATP7B* ile mutantlar arasında fark saptanmamıştır. Kontrol ortamlarında (ISM, CSM, ICSM, ICSM-F) tüm hücrelerde yaklaşık aynı düzeyde bakır ve demir saptanmıştır.

Mann-Whitney U test (SPSS Statistics v20 2012) ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda demir sınırlı ortamda (ILM) maya hücreleri üreme ortamlarında ölçülen bakır miktarı yaban tip *ATP7B*'ye göre T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 mutantlarında azaldığı saptandı. Bu azalmanın $p=0,029$ $p<0,05$ olduğundan istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi. Yaban tip *ATP7B*'ye göre mutantlarda istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gösterildi (şekil 31).

Diğer dört kontrol ortamında (ISM, CSM, ICSM, ICSM-F) bakır ve beş ortamda (ILM, ISM, CSM, ICSM, ICSM-F) demir için yapılan analizlerde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (şekil 31-35).

Hücre pelletindeki ICP-MS bakır miktarı ölçümü sonucunda, demir sınırlı ortamda (ILM) yaban tip *ATP7B*'ye göre T788I mutant, V1036I mutant ve R1038G-fsX83 mutant *ATP7B*'yi taşıyan hücre pelletlerinde bakır miktarının arttığı saptandı. ILM'de hücre pelletlerindeki demir miktarı ölçüm sonucunda yaban tip *ATP7B* ile mutantlar arasında fark saptanmadı. Kontrol ortamlarında (ISM, CSM, ICSM, ICSM-F) tüm hücrelerde yaklaşık aynı düzeyde bakır ve demir saptanmıştır.

Mann-Whitney U test ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda demir sınırlı ortamdan çöktürülen hücre pelletlerinde ölçülen bakır miktarında yaban tip *ATP7B*'ye göre T788I ve V1036I $p=0,029$ $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı artış saptanırken, R1038G-fsX83'de anlamlı fark saptanmadı. Hücre pelletlerinde yaban tip *ATP7B*'ye göre T788I ve V1036I mutantlarda istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı (şekil 36).

Diğer dört kontrol ortamında (ISM, CSM, ICSM, ICSM-F) bakır ve beş ortamda (ILM, ISM, CSM, ICSM, ICSM-F) demir için yapılan analizlerde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (şekil 36-40).

5.Tartışma

Wilson Hastalığı vücuttaki fazla bakırın atılamayıp karaciğer,böbrek, beyin gibi birçok organda birikerek hasar meydana getirmesi yoluyla oluşur. Hücre içerisindeki bakır dengesinin korunmasında ATP7B proteini önemli rol üstlenmekte olup, *ATP7B* genindeki mutasyonlar Wilson hastalığı ile ilişkilendirilmektedir. İnsanda hepatosite alınan bakır kanda bulunan seruloplazmin molekülüne ATP7B aracılığıyla aktarılır. Bu sayede seruloplazmin aktif formuna dönüşerek ferrokسيداز aktivitesi kazanır. Fazla bakırın hepatositte safra kanalına yönlendirilmesine ATP7B aracılık eder. *ATP7B* geninin mutant olduğu durumda bu iki önemli fonksiyon yerine getirilemez ve buna bağlı olarak artan bakır nedeniyle dokularda hasar meydana gelir (11). Mutasyonun yerine bağlı olarak protein fonksiyonu değişik düzeylerde etkileneceğinden hastalığın şiddeti ve klinik bulgular değişkenlik gösterir. *S.cerevisiae*'da bakır taşınması Ccc2p proteini aracılığıyla yapılır ve insandaki *ATP7B* geninin ortoloğudur. Ayrıca maya hücresi içerisinde artan bakır miktarının dengelenmesini bakırı hücre dışına aktarmak suretiyle Ccc2p sağlar. Bakır, Ccc2p aracılığıyla maya hücresinin dışına aktarılarak Fet3p (seruloplazmin ortoloğu)'nin aktivite göstermesine (ferrokسيداز) neden olur (44).

46 Wilson hastası ve 52 kontrol DNA'sından oluşan gruplarda ilk kez bu çalışma ile Türk Hastalarında ve Türk kontrol grubunda Wilson hastalığı ile ilişkili *ATP7B* genindeki genetik değişimler saptandı (Tablo 6, 7). Literatürde Türk hastalarına ait çalışmalarda daha az sayıdaki Wilson hastasına ait genetik bilgi elde edilmiştir ancak bu çalışmalarda kontrol grubu olarak Türk kökenli bireyler kullanılmamış kendi popülasyonlarından elde ettikleri kontrol DNA'ları kullanılarak verilerin analizi yapılmıştır (10,49,52,53). Bu çalışma ile *ATP7B* geninde toplamda 24 farklı mutasyon (Tablo 6) ve 11 SNP (Tablo 7) saptandı. Literatürde bulunmayan yeni 5 mutasyon ve 1 SNP tarafımızca uluslararası Wilson hastalığı mutasyon veritabanına bildirildi ve 141 nolu referans olarak adımıza kayıtlıdır. Mutasyon saptanan hastalara ait klinik ve laboratuvar bulguları tarafımızca değerlendirildi (Tablo 8). 5 yeni mutasyon arasından 3 tanesi (T788I, V1036I ve R1038G-fsX83) klinik ve laboratuvar bulguları dikkate alınarak belirlendi; sadece karaciğer tutulumu, sadece nörolojik bulguların varlığı ve her ikisinin bir arada bulunduğu fenotipik bulgularla yeni mutasyonların eşleştiği bireylere ait genetik bilginin deney sisteminde test edilmesine karar verildi. Yaban tip *ATP7B* ile mutasyonlar arasında bakır taşınımındaki farklılığın saptanması amaçlandı.

Çalışmamızda 4459bp gibi büyük bir gen bölgesi PCR ile başarıyla çoğaltıldı. Genin çoğaltılması için farklı marka modelde yüksek doğrulukta Taq polimerazlar ve farklı PCR şartları denendi. Bu çalışmaların sonunda 'Phusion High Fidelity DNA polimeraz' ile 4459bp'lik *ATP7B* geninin tamamını içeren fragman elde edildi. PCR ürünüde DNA dizi analizi yapıldı ve *ATP7B* geninin NCBI'da tanımlanan NM-000053 nolu referans sekansı ile uyumlu olduğu gösterildi.

Literatürde bazı mutasyonların test edilmesinde Terada ve arkadaşları (51) tarafından elde edilen *ATP7B* klonu kullanılırken (20,28,29,37,38,48); çalışmamızda *ATP7B* geni tarafımızca gateway sistemi kullanılarak klonlanmıştır. *ATP7B*'nin tüm dizisi hem ileri hem de geri yönde dizayn ettiğimiz ve birbiri içinden en az 100bp'lik kesişen bölgeler içeren primerler kullanılarak her iki yönde DNA dizi analizi yapılarak doğrulanan, her hangi bir dizi değişimi saptanmayan referans sekansla uyumlu (NCBI NM-000053) plazmid DNA ile çalışmaya devam edildi. Bu aşamada referans sekansla uyumlu olmayan plazmid DNA'ları çalışma dışı bırakıldı.

T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 mutasyonları, bölge yönlendirilmiş mutagenез 'site directed mutagenesis' yöntemi ile kit kullanarak, DNA dizisi doğrulanmış yaban tip *ATP7B* aktarılmış plazmid DNA ve mutasyonlara spesifik olarak tarafımızca dizayn edilen primerler kullanılarak ilk kez bu çalışmada elde edildi. DNA dizi analizi ile her bir mutasyonu içeren plazmid DNA'sının sekansları bu aşama sonrasında doğrulandı; ikincil mutasyonların bulunmadığının gösterilmesi için *ATP7B* geninin mutasyon içeren bölgelerinin dışında kalan tüm dizisi DNA dizi analiziyle tarandı. İkincil mutasyonlar içeren plazmid DNA'lar çalışma dışı bırakıldı, başka kolonilerden plazmid DNA eldesine geçildi. Bu yolla her bir mutasyonu içeren ve genin diğer bölgelerinde ikincil mutasyonlar içermeyen plazmid DNA'ları DNA dizi analizi ile her iki yönde (ileri – geri) taranarak belirlendi. Böylelikle bu doğrulama deneylerinden sonra deney setimiz oluşturulmuş oldu. Bu aşamadan sonraki tüm deneylerde, dizisi NCBI'da tanımlı referans sekansla uyumlu yaban tip *ATP7B* içeren ve sadece T788I mutant *ATP7B*'yi, V1036I mutant *ATP7B*'yi, R1038G-fsX83 mutant *ATP7B*'yi içeren plazmid DNA'lar kullanıldı.

DNA dizi analizinde kendi dizayn ettiğimiz *ATP7B* genine özgül primerler dışında, gateway sistemine özgül ileri ve geri primerler kullanılarak vektöre ait dizinin varlığı genin 5' ve 3' uçlarında gösterildi. Böylelikle genin doğru yönde yerleşimi de kontrol edilmiş olundu.

BY4741 Δ CCC2 suşu maya transformasyonundan önce CCC2 geninin çıkarıldığının gösterilmesi için hem genomik DNA hem de mRNA düzeyinde kontrol edildi. Bunun için tarafımızca dizayn edilen primerler kullanıldı. Suшта CCC2 geninin bulunmadığı doğrulandıktan sonra transformasyon deneyine geçildi.

BY4741 Δ CCC2 maya suşuna yaban tip *ATP7B*, T788I V1036I R1038G-fsX83 mutasyonları ve pAG426 (boş vektör) transforme edildi. Plazmid DNA düzeyinde genin varlığı ve mRNA düzeyinde genin eksprese olduğu doğrulandı. Real time PCR ile *ATP7B* geni (K9F-K9R primerleri kullanılarak) aktin genine göre normalize edilen veriler, konvansiyonel PCR sonuçlarını doğruladı; yaban tip *ATP7B*, T788I mutant, V1036I mutant ve R1038G-fsX83 mutant dizilerin eksprese olduğu gösterildi. pAG426 boş vektör ve PCR'ın kontrolü dH₂O (negatif kontrol)'da beklendiği gibi bant saptanmadı.

Literatürde farklı mutasyonların analizi için *S.cerevisiae*'nin değişik suşlarıyla yapılan çalışmalar bulunmaktadır (20,21,28,29,37,38,48,50) ancak ilk kez bu çalışma ile BY4741 Δ CCC2 mutant maya suşuna insan *ATP7B* geni ve mutantlarının transformasyonu uluslararası standartlara uygun olarak gerçekleştirildi. Literatürde kullanılan farklı suş ve plazmidler kullanılması sebebiyle bu çalışmada seçici besiyeri olarak vektörle uyum açısından YNB-URA kullanılmıştır ve koloni seçimi urasilin bulunmadığı ortam şartlarında yapılmıştır. Oluşan koloniler, pAG426 vektörünü dolayısıyla *ATP7B*'yi içeren ve vektör üzerinde urasil sentez genini içermesi sebebiyle üreyen kolonilerdir. Seçici besiyerinde (YNB-URA) ekilen hücrelerin üremesi *ATP7B* içeren kolonilerle çalıştığımızı, 600nm'de ölçülen optik dansite değerinin yanında petri kabında koloni oluşması ise canlı hücrelerin bulunduğunu gösteren bir veridir. Bizim çalışmamızda kullandığımız vektörde urasil sentez geni bulunduğundan seçim urasil auxotrophy'sine göre yapıldı. Literatürde de koloni seçimi kullanılan vektöre uygun olarak amino asit auxotrophy'ye göre yapılmıştır (20,21,28,29,37,38,48,50).

İlk kez bu çalışmada ICP-MS ile kültür ortamında ve hücre pelletinde bakır ve demir ölçümü gerçekleştirilerek kantitatif sonuç elde edildi. Literatürdeki benzer çalışmalarda mutasyonların yaban tipe göre karşılaştırılması sadece koloni oluşturma sayılarına bakılarak veya Fet3p enzim aktivitesi varlığı/yokluğuna göre kalitatif olarak gösterilmiştir (28,29,38,48,50).

Bulgular şekil 21’de zaman bağımlı yapılan bakır ölçümlerinde 50µM ve 100 µM’da mutantlarla yaban tip *ATP7B* arasında fark saptanmadığı gösterildi. Ancak ICP-MS ölçümleri açısından sonuçlar değerlendirilebilir sınırlarda ve uyumlu olduğu saptandı. Ayrıca yapılan ön deneylerde hücre kültür ortamında mikrodalga bozundurma yapmanın sonucu değiştirmedığı saptandı. Bu standardizasyon çalışmalarını takiben deney setindeki değişik ortam şartlarında bakır ve demir ölçümlerine geçildi.

ICP-MS bakır ve demir ölçümlerinde kullanılan ortam şartları Cox ve arkadaşlarının 2010 yılındaki çalışmalarında komplementasyon deneyi için kullandıkları ortam şartlarıyla (ILM, ISM, CSM) paralellik göstermektedir (48). Ek olarak bakır ve demirin yüksek konsantrasyonda bulunduğu ICSM ve bu ortamdan demir inhibitörünün çıkarıldığı ICSM-F koşulları tarafımızca deneye dahil edildi.

Ortam ICP-MS bakır miktarı ölçümü sonucunda, demir sınırlı ortamda (ILM) yaban tip *ATP7B*’ye göre T788I mutant, V1036I mutant ve R1038G-fsX83 mutant *ATP7B*’yi taşıyan hücrelerde üreme ortamındaki bakır miktarı azalmıştır. ILM’de ortam demir miktarı ölçüm sonucunda yaban tip *ATP7B* ile mutantlar arasında fark saptanmamıştır. Kontrol ortamlarında (ISM, CSM, ICSM, ICSM-F) tüm hücrelerde yaklaşık aynı düzeyde bakır ve demir saptanmıştır.

ILM’de maya hücreleri üreme ortamlarında ölçülen bakır miktarı yaban tip *ATP7B*’ye göre T788I, V1036I ve R1038G-fsX83 mutantlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (şekil 31). Diğer dört kontrol ortamında (ISM, CSM, ICSM, ICSM-F) bakır ve beş ortamda (ILM, ISM, CSM, ICSM, ICSM-F) demir için yapılan analizlerde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (şekil 31-35).

Hücre pelletindeki ICP-MS bakır miktarı ölçümü sonucunda, demir sınırlı ortamda (ILM) yaban tip *ATP7B*'ye göre T788I mutant, V1036I mutant ve R1038G-fsX83 mutant *ATP7B*'yi taşıyan hücre pelletlerinde bakır miktarının arttığı saptandı. ILM'de hücre pelletlerindeki demir miktarı ölçüm sonucunda yaban tip *ATP7B* ile mutantlar arasında fark saptanmadı. Kontrol ortamlarında (ISM, CSM, ICSM, ICSM-F) tüm hücrelerde yaklaşık aynı düzeyde bakır ve demir saptanmıştır.

ILM'de hücre pelletlerinde ölçülen bakır miktarında yaban tip *ATP7B*'ye göre T788I ve V1036I mutasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış saptanırken, R1038G-fsX83'de anlamlı fark saptanmadı (şekil 36). Diğer dört kontrol ortamında (ISM, CSM, ICSM, ICSM-F) bakır ve beş ortamda (ILM, ISM, CSM, ICSM, ICSM-F) demir için yapılan analizlerde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (şekil 36-40).

ILM'de ortamdaki bakır miktarı T788I ve V1036I mutantlarında yaban tip *ATP7B*'ye göre azalma saptanırken pellet ölçümlerinde bu iki mutantta bakır miktarının arttığı saptandı. Bu veri bu iki mutasyonu taşıyan hücrelerde proteinin yaban tip *ATP7B* proteinine göre bakırı hücre dışına taşıyamadığını ve hücre içinde biriktiğini gösterdi. R1038G-fsX83 mutantında ise ortam bakır miktarındaki fark diğer mutantlara oranla daha azdı; hücre pellet bakır miktarı yaban tip *ATP7B* ile yaklaşık aynıydı. Kontrol ortamlarında beklendiği gibi yaban tip *ATP7B* ve mutantları arasında fark saptanmadı.

ILM'de besiyerinin kendisindeki demir ve bakır miktarı kontrol ortamlarına göre düşüktür ve bu sınırlama hücreye bakırın ctr1 üzererinden alınıp, trans golgide bir bakır şaperonu olan atox'a aktararak, Ccc2p'ye aktarılmasını ve buradan fet3p'ye verilmesini sağlayan yolağı aktive eder (48). Kurulan bu deney modelinde literatüre uygun olarak ILM'deki sınırlama nedeniyle bakırın CCC2 ortoloğu *ATP7B* üzerinden taşındığı gösterildi.

Demir sınırlı ortamda (demir ve bakır miktarının diğer ortamlara göre düşük olduğu şartta), hücre kültür ortamında T788I mutant (karaciğer ve beyin tutulumu) ve V1036I mutant (sadece beyin tutulumu) yaban tip *ATP7B* ve R1038G-fsX83 (sadece karaciğer tutulumu) mutanta göre bakır azalmıştır; pelletlerde ise T788I mutant ve V1036I mutant yaban tip *ATP7B* ve R1038G-fsX83 mutant göre bakır artmıştır. Bakır ölçüm deneyi sonucu elde edilen bu veriler, beyin tutulumu gösteren mutasyonların işlev kaybının sadece karaciğer tutulumu

gösterenlere göre daha fazla olduğunu göstermektedir. Bunun moleküler mekanizmasının nasıl gerçekleştiğinin araştırılması için bu alanda daha fazla çalışmaya gereksinim vardır. Bu çalışma ile yapılması planlanan araştırmalara yön verebilecek öncül veriler elde edilmiş olundu.

Bu çalışmayla, CCC2 geni çıkarılmış BY4741 maya suşuna *ATP7B* geni, T788I mutant *ATP7B*, V1036I mutant *ATP7B* ve R1038G-fsX83 mutant *ATP7B* transformasyonu bu çalışmada gerçekleştirilerek model sistem kurulmuş oldu. Aktarılan insan *ATP7B* geninin ve mutantlarının (T788I, V1036I ve R1038G-fsX83) mayada ekspresyonu mRNA düzeyinde gösterildi. Yaban tip *ATP7B* ile mutantlar arasında bakır taşınımındaki farklılık saptanarak, Wilson hastalığı ile ilişkili farklı *ATP7B* mutasyonlarının bakır taşınımı açısından test edilebileceği deney sistemi oluşturuldu.

6. Sonuç ve Öneriler

1. HepG2 hücre hattından elde edilen yaban tip *ATP7B* geni PCR ile çoğaltılıp klonlandı. DNA dizi analizi ile sekansı doğrulandı.
2. T788I V1036I ve R1038G-fsX83 mutasyonları bölge yönlendirilmiş mutagenез ‘*site directed mutagenesis*’ yöntemiyle dizayn ettiğimiz primerlerle elde edildi. Sekansları DNA dizi analizi ile doğrulandı, ikincil mutasyon içermedikleri gösterildi. Maya transformasyonları yapıldı.
3. BY4741 Δ CCC2 genetik özelliğindeki mutant maya suşuna ilk kez insan bakır taşıyıcı geni *ATP7B* transforme edildi, DNA ve mRNA düzeyinde genin varlığı ve ürün verdiği saptandı.
4. Yaban tip *ATP7B* insan geni mayadaki homoloğu olan CCC2 genini komplemente ettiği gösterildi.
5. ILM’de yaban tip *ATP7B* ile üç mutant arasında bakır taşınmasında ICP-MS ile fark saptandı. Bu veri hipotezimizi doğruladı.
7. BY4741 Δ CCC2 maya suşunda bakır taşınımıyla ilgili deney seti kurulmuş oldu.
8. Farklı klinik özelliklere sahip Wilson hastalarındaki mutasyonlara ait deney modeli kurulmuş oldu. Çalışılan üç mutasyon dışında bizim saptadığımız veya literatürde tanımlanan farklı mutasyonlar bu deney modelinde fonksiyonel analizleri yapılabilir duruma gelindi.
9. İlk kez Wilson hastalığı veri tabanına tarafımızca bildirilmiş olan üç mutasyonun fonksiyonel analiz deneyleri de bildirilerek literatüre katkı yapılacak duruma gelindi.
10. Kurulan deney modelinde klinikte kullanılan ilaçlar ve dozları test edilebilir duruma gelindi.
11. Çalışmamızda kullanılan maya deney sistemi başka insan genleri aktarımıyla farklı genetik hastalıkların moleküler mekanizmalarının araştırılmasında kullanılabilecek bir model sistem olduğu gösterildi.
12. Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD laboratuvarında maya deney modeli tüm standartları ve doğrulamalarıyla kullanılabilecek duruma gelindi.

7. Kaynaklar

1. Wilson S.A.K. **Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver.** Brain 1912;34:295–507
2. Fleischer B. **ber eine der “Pseudosclerose” nahestehende bisher unbekannte Krankheit.** Dtsch Z Nervenheilk 1912;44:179–201
3. Cumings J.N. **Copper and iron content of brain and liver in normal and in hepatolenticular degeneration.** Brain 1948;71:410–415
4. Scheinberg I.H. et al. **Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson’s disease).** Science 1952;116:484–485
5. Bearn A.G. **A genetical analysis of 30 families with Wilson’s disease (hepatolenticular degeneration).** Ann Hum Genet 1960;24:33–43
6. Frydman M. et al. **Assignment of the gene for Wilson’s disease to chromosome 13: linkage to the esterase D locus.** Proc Natl Acad Sci U S A 1985;82:1819–1821
7. Bull P.C. et al. **The Wilson’s disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene.** Nat Genet 1993;5:327–337
8. Tanzi R.E et al. **The Wilson’s disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene.** Nat Genet 1993;5:344–350
9. Thomas G.R et al. **The Wilson Disease gene: spectrum of mutations and their consequences.** Nature Genetics 1995;9:210-217.
10. Figus A. et al. **Molecular pathology and haplotype analysis of Wilson Disease in Mediterranean populations.** Am. J. Hum. Genet. 1995;57:1318-1324.
11. Huster D. **Wilson Disease.** Best Practice and Research Clinical Gastroenterology 2010;24:531-539.
12. Langner C. et al. **Wilson Disease.** Virchows Arch 2004;445:111-118.
13. Waldenstrom E. et al. **Efficient Detection of Mutations in Wilson Disease by Manifold Sequencing.** Genomics 1996;37:303-309.
14. Youssef M. **Wilson Disease.** Mayo Clin Proc 2003;78:1126-1136.
15. Harada M. **Wilson disease.** Med Electron Microsc 2002;35:61-66.
16. Ferenci P. **Review article: diagnosis and current therapy of Wilson’s disease** .Aliment Pharmacol Ther 2004;19:157-165.

17. Lutsenko S. et al. **Human copper-Transporting ATPase ATP7B(The Wilson's Disease Protein):Biochemical Properties and Regulation.** J of Bioenergetics And Biomembranes 2002;34:5-17.
18. 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.
19. Ferenci P. et al. **Hepatic transport systems.** J.of Gast and Hepatology 2002;17:105-112.
20. Cater M.A. et al. **Copper binding to the N-terminal metal binding site sor the CPC motif is not essential for copper induced trafficking of the Human Wilson Protein(ATP7B).** Biochemical Journal 2006;10:55.
21. Mercer J.F.B. et al. **Copper inducing trafficking of the Cu-ATPases:A Key mechanism for copper homeositis.** BioMetals.2003;16:175-184.
22. Bunce J. et al. **Copper transfer studies between the N-terminal copper binding domain sone and four of human Wilson protein.** Biochemica et Biophysica Acta 2006;1760:907-912.
23. Schilsky M.L. **Wilson Disease: Current status and the future.** Biochimie 2009;91:1278-1281.
24. Ferenci P. et al. **Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease.** Liver International 2003;23:139-142.
25. Terada K. et al. **ATP7B (WND) protein.**The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 1998;30:1063-1067.
26. Guo Y. et al. **NH2-terminal signals in ATP7B Cu-ATPase mediate its Cu-dependent anterograde traffic in polarized hepatic cells.**Am.J Physiol Gastrointest Liver Physiol.2005;289:904-916.
27. Portman R. et al. **Purification and functional reconstitution of the human Wilson copper ATPase, ATP7B** FEBS Letters 2005;1-7
28. Yatsunyk L.A. et al. **Copper(I) binding and transfer by the N-terminus of the Wilson disease protein.** 2007 JBC Papers in press.Published on Jenuary.1-20
29. Hsi G. et al. **Functional assessment of the carboxy-terminus of the Wilson disease copper-transporting ATPase, ATP7B.** Genomics 2004;83:473-481.

30. Hung I. et al. **Biochemical Characterization of the Wilson disease Protein and Functional Expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** J.Bio.Chem 1997;272:461-466.
31. Wernimont A.K. et al. **Binding of Copper(I) by the Wilson Disease Protein and Its Copper Chaperone.** J.of Bio.Chem 2004;279,13:12269-12276.
32. Wijmenga C. et al. **Molecular regulation of copper excretion in the Liver.**Proceedings of the Nutrition Society 2004;63:31-39.
33. Forbes J. et al. **.Functional Characterization of Missense Mutations in ATP7B:Wilson Disease Mutation or normal variant?** Am.J.Hum.Genet 1998;63:1663-1674.
34. Yuan D.S. et al. **The Menkes/Wilson Disease gene Homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake.** Proc.Natl.Acad.Sci USA.1995;92:2632-2636.
35. Sikorski R.S. et al. **A System Shuttle Vektors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manuplation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*.** Genetics 1989;122:19-27.
36. Freitas J.D. et al. **Yeast, a model organism for iron and copper metabolism Studies.** Biometals 2003;16:185-197.
37. Park S. et al. **Identification of Novel ATP7B Gene Mutations and Their Functional Roles in Korean Patients.** Human Mutation. 2007;0:1-6
38. Hsi G. et al. **Sequence Variation in the ATP-binding Domain of the Wilson Disease Transporter, ATP7B, Affects Copper Transport in a Yeast Model System.** Human Mutation 2008;29(4):491-501.
39. Tsivkovskii R. et al. **The role of invariant His-1069 in Folding and function of the Wilson's disease protein ,the human copper-transporting.** J Biol Chemist.2003;278:13302-13308
40. Huster D. et al. **Defective cellular localization of mutant ATP7B in Wison's disease patient and hepatoma cell lines.** Gastroenterology.2003;124:335-345.
41. Rutherford J.C. et al. **Metal-Responsive Transcription Factors That regulate Iron, Zinc and Copper homeostasis in Eukaryotic Cells.** Eukaryotic Cell 2004;3:1

42. Allen K.J. et al. **Chronological changes in tissue copper, zinc and iron in the toxic milk mouse and effects of copper loading.** *Biometals*.2006;19:555-564.
43. Merle U. et al. **Lentiviral gene transfer ameliorates disease progression in Long-Evans cinnamon rats:An animal model for Wilson disease.** *Scandinavian J Gastroenterology*.2006;41:974-982.
44. Nevitt T. **Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals.** *Biochemica et Biophysica Acta*. 2012 in press
45. Cox et al. **Wilson Disease mutation database.** University of Alberta,Canada. <http://www.wilsonsdisease.med.ualberta.ca/database.asp>
46. Petrukhin K.. et al. **Mapping cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene.** *Nature genetics*1993;5.
47. Amberg D.C. et al. **Methods in yeast genetics.** A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual 2005.
48. Cox et al. **Functional analysis of mutations in the ATP loop of the Wilson disease copper transporter,ATP7B.** *Human mutation* 2010;31:569-577.
49. Ferenci P. et al. **Regional distribution of mutations of the ATP7B gene in patients with Wilson disease: impact on genetic testing.** *Hum.Genet* 2006;120:151-159
50. Forbes J.R. et al. **Role of copper-binding domain in the copper transport function of ATP7B, the P-type ATPase defective in Wilson disease.** *J.of Biological Chemistry* 1999;274:12408-12413
51. Lida M. et al. **Analysis of functional domains of Wilson disease protein (ATP7B) in *Saccharomyces cerevisiae*** *Febs Lett*. 1998;428:281-285.
52. Curtis D. et al. **A study of Wilson disease mutations in Britain.** *Hum Mutat*. 1999; 14: 304-311.
53. 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.

8. Ekler

Etik Kurul Raporları



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 TERZİOĞLU'nun sorumlu olduğu 03 protokol no.lu "Wilson Hastalarında ATP7B Geninin 8,12,13,14 ve 17 no'lu ekzonlarında DNA dizi 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

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

Tarih ve Sayı: 08.06.2007/ 203

Etik Kurul Üyeleri

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Mustafa SEÇİL
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus KARSLI

Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

Etik Kurul Sekreteri
Hatice İĞCİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 07 Haziran 2007 tarih ve 08/15/2007 no.lu toplantısında, 03/2005 Protokol numaralı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU'nun sorumlu olduğu "Wilson Hastalarında ATP7B Geninin 8,12,13,14 ve 17 no'lu ekzonlarında DNA dizi analizi ile mutasyonların taranması" isimli projede; çalışmaya yeni hasta eklenmesi ve buna istinaden düzenlenen Bilgilendirilmiş Olur Formu uygun bulunmuştur.

Katılanların oy birliği ile karara verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



Prof. Dr.Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
Tarih ve Sayı: 14.09.2006/206

Etik Kurul Üyeleri

Prof. Dr. Taner ÇAMSARI
Prof. Dr. Cem Şeref BEDİZ
Prof. Dr. Uğur MÜNGAN
Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL
Doç. Dr. Arzu SAYINER
Prof. Dr. Özgül SAĞOL
Prof. Dr. Görsev YENER
Doç. Dr. Mustafa SEÇİL
Yrd. Doç. Dr. Cenk ERDAL
Yunus KARSLI

Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Taner ÇAMSARI

Etik Kurul Sekreteri
Hatice İĞÇİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 14 Eylül 2006 tarih ve 16/18/2006 no.lu toplantısında, 189 Protokol numaralı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Orhan TERZİOĞLU'nun sorumlu olduğu "Wilson hastalığına yol açan mutant ATP7B proteinlerinin bakır taşınmasındaki etkilerinin bakteri ve maya modellerinde araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



Prof. Dr. Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

Tel: 0232 412 22 54

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 önlenabilir.

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

‘Wilson Hastalarında *ATP7B* Geninin 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 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 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:

ÖZGEÇMİŞ

Araştırma Görevlisi ÖZLENEN ŞİMŞEK PAPUR

TC Kimlik No / Pasaport No :	39889619744
Doğum Yılı :	1980
Yazışma Adresi :	DEU Tıp Fakültesi Temel Bilimler Binası Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD İnciraltı İzmir, Türkiye
Telefon :	05057874360 , 05323106833
Faks :	-
e-posta :	ozlenen.simsek@deu.edu.tr , simsekozlenen@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ankara Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2003
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji ve genetik	Yüksek Lisans	2006

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Tıbbi Biyoloji ve genetik	Araştırma Görevlisi	2004-2012

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Tıbbi Biyoloji ve Genetik

Tezden Oluřturulan Yayın:

08.01.2013 tarihinde ‘European Journal of Medical Genetics’ dergisinde yayına kabul edilmiştir, basım aşamasındadır.

Date: Jan 08, 2013
To: "Orhan Terzioglu" terzioglu@hotmail.com
cc: g.gillessen@uksh.de
From: "European Journal of Medical Genetics" ejmg.editor@rdb.aphp.fr
Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: EJMG-D-12-00035R1

Title: Mutation analysis of ATP7B gene in Turkish Wilson disease patients: identification of five novel mutations

European Journal of Medical Genetics

Dear Orhan,

I am pleased to confirm that your paper "Mutation analysis of ATP7B gene in Turkish Wilson disease patients: identification of five novel mutations" has been accepted for publication in European Journal of Medical Genetics.

Thank you for submitting your work to EJMG. Now that the manuscript has been accepted, it will become available online within a few days, as an article in press, through Science Direct at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/17697212>

The proofs will be sent to you for correction and approval within 4 weeks. We expect that your manuscript will be cited in PUBMED within two weeks of receiving your proof corrections.

You will shortly receive a confirmation email from Elsevier with details on how to track your manuscript and who to contact for further information.

Please proceed to the following link to update your personal classifications and keywords, if necessary:

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

With kind regards,

Alain Verloes, MD, PhD
Editor- in -Chief
European Journal of Medical Genetics