



EGE ÜNİVERSİTESİ

DOKTORA TEZİ

**TÜRKİYE’DEKİ KİSTİK FİBROZİSLİ HASTALARDA
CFTR GENİ DNA VARYANTLARININ
KARAKTERİZASYONU VE FENOTİPİK
ÖZELLİKLERİ İLE İLİŞKİSİ**

Atilla ÖZ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Afig BERDELİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi :10.07.2017

Bornova-İZMİR

2017

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**TÜRKİYE’DEKİ KİSTİK FİBROZİSLİ HASTALARDA
CFTR GENİ DNA VARYANTLARININ
KARAKTERİZASYONU VE FENOTİPİK
ÖZELLİKLERİ İLE İLİŞKİSİ**

Atilla ÖZ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Afif BERDELİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi :10.07.2017

Bornova-İZMİR

2017

Atilla ÖZ tarafından “Türkiye’ deki Kistik Fibrozisli Hastalarda CFTR Geni DNA Varyantlarının Karakterizasyonu ve Fenotipik Özellikleri ile İlişkisi” başlıklı bu çalışması EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 10.07.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ilebulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Afig BERDELİ

Raportör Üye : Prof. Dr. Yusuf BARAN

Üye : Prof. Dr. Fethi Sırrı ÇAM

Üye : Prof. Dr. Cemal ÜN

Üye : Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “‘Türkiye’ deki Kistik Fibrozisli Hastalarda CFTR Geni DNA Varyantlarının Karakterizasyonu ve Fenotipik Özellikleri ile İlişkisi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

10 / 07 / 2017



Atilla ÖZ

ÖZET**TÜRKİYE’DEKİ KİSTİK FİBROZİSLİ HASTALARDA CFTR GENİ
DNA VARYANTLARININ KARAKTERİZASYONU VE
FENOTİPİK ÖZELLİKLERİ İLE İLİŞKİSİ**

ÖZ, Atilla

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Afif BERDELİ

Temmuz 2017, 119 sayfa

Kistik fibrozis birçok vücut sistemini etkileyen otozomal resesif bir hastalıktır. Kistik fibrozis transmembran regülör (CFTR) geninde meydana gelen mutasyonlar, bu hastalığa neden olur. CFTR geni insanda kromozom 7 üzerinde lokalize olup 250000 nükleotidden meydana gelir. ABCC7 olarak bilinen CFTR proteini hücrede kanal proteini olarak görev yapar ve klor iyonlarının hücre içine ve dışına geçişini kontrol eder. CFTR genindeki mutasyonlar, CFTR proteininin yapısında değişikliğe neden olabilir.

Sağlıklı (control grup) 25 bireylerden ve kistik fibrozis şüphelisi 30 bireylerden genomik DNA örnekleri DNA sekans yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Tüm gen analizi ile CFTR genindeki mutasyonlar tespit edilmiştir.

Sağlıklı bireylerin hiç birinde hastalık yapıcı mutasyon gözlenmezken, buna karşın hasta grubunda, 26 farklı mutasyon gözlenmiştir. Hasta grubunda en yaygın gözlenen mutasyonlar ve görülme oranları sırasıyla, F508del (%13.3), F1052V (%13.3), I148T (%10), R297Q (%6.6), E92K (%6.6), E632X (%6.6), bunların yanında R74W (%3.3), G126D (%3.3), L183I (%3.3), G178R (%3.3), K174X (%3.3), R347P (%3.3), E379X (%3.3), T388M (%3.3), M472V (%3.3), G542X (%3.3), I807M (%3.3), I982I (%3.3), L1034F (%3.3), Y1092H (%3.3), K1165E (%3.3), T1220I (%3.3), S1235R (%3.3), W1282X (%3.3), S1426F (%3.3) mutasyon oranları saptanmıştır. Çalışmamızda veri tabanında yer almayan altı yeni mutasyon ilk olarak tanımlandı. Bu mutasyonlardan üçü misens (M472V, K1165E, L1034F) biri sinonim (I982I) ve iki tanesinde stop kodon (K174X, E632X) mutasyonlarıdır.

Anahtar sözcükler: Kistik Fibrozis, CF, CFTR, Mutasyon, DNA.

ABSTRACT**RELATION TO THE PHENOTYPIC FEATURES AND
CHARACTERIZATION OF THE CFTR GENOMIC DNA
VARIANTS IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS IN TURKEY**

ÖZ, Atilla

PhD in Biotechnology Department

Supervisor: Prof. Dr. Afig BERDELİ

July 2017, 119 pages

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease that affects many body systems. It is caused by mutations to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. The CFTR gene is located on chromosome 7 and consisted of 250.000 DNA nucleotids. The CFTR protein also known as ABCC7 acts as a channel protein which control transition of chloride ions to the inside and outside of the cells. The mutations in the CFTR gene can cause changes in the structure of the CFTR protein.

In this study, genomic DNA samples taken from healthy (control group=25) individuals were compared with the individuals with CF clinical pre-diagnosis (working group =30) via the using of DNA sequencing method. Mutations in the CFTR gene were detected by whole gene analysis.

None of the pathogenic mutations were observed in healthy individuals, however, in the patient group, 26 different mutations have been observed. The most common mutations observed in the patient group and the observation rates were F508del (13.3%), F1052V (13.3%), I148T (10%), R297Q (6.6%), E92K (6.6%) and E632X (6.6%), R74W (3.3%), G126D (3.3%), L183I (3.3%), G178R (3.3%), K174X (3.3%), R347P (3.3%), E379X (3.3%), K1165E (3.3%), T1220I (3.3%), S1235R (3.3%), I1270M (3.3%), I807M (3.3%), I982I 3.3%), W1282X (3.3%) and S1426F (3.3%). Also in our study, six novel mutations were first described which are three missense (M472V, K1165E, L1034F), one synonym (I982I) and two stop codons (K174X, E632X) mutations

Keywords: Cystic fibrosis, CF, CFTR, Mutation, DNA sequencing.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince hem maddi, hem de manevi desteklerini esirgemeyen, tez danışmanım, sayın Prof. Dr.Afig BERDELİ' hocama sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Tezim şekillenmesinde emeği geçen tez jüri üyelerim sayın Prof. Dr. Yusuf BARAN hocama, sayın Prof. Dr. Fethi Sırrı ÇAM hocama, sayın Prof. Dr. Cemal ÜN hocama ve sayın Prof. Dr. Cumhuriyet GÜNDÜZ hocama teşekkürlerimi sunarım.

Ege Üniversitesi Çocuk Hastanesi Moleküler Tıp Laboratuvarı çalışanı Demet TIĞLI ÖZKAN başta olmak üzere, tüm laboratuvar çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Manevi desteklerinden dolayı sayın Prof. Dr. Aydın İBRAHİMOV hocama teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin gerçekleşmesi için maddi desteklerinden dolayı Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimine'de teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bu günlere gelmemi sağlayan sevgili annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Tanım ve Tarihçe	3
2.2 Kistik Fibrozis	4
2.2.1 ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları	4
2.2.2 ABC proteinlerinin genel yapısı	5
2.2.3 Kistik fibrozis transmembran regülör (CFTR) geni	6
2.3 CFTR Proteini	8
2.3.1 CFTR proteininin topolojisi	12
2.3.2 CFTR UniProtKB kimliği	14

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.3.3 CFTR proteininin katlanma mekanizması	15
2.3.4 CFTR TMD2 topolojisi ve katlanmasının yeni mekanizmaları.....	19
2.3.5 CFTR Sitoplazmik Domain Katlanması ve $\Delta F508$ Eksikliği	20
2.3.6 CFTR domain –domain birleşmesi	22
2.4 Post Translasyonel Modifikasyon (PTM).....	23
2.4.1 CFTR’nin biyogenezi ve hücre içi trafiği	26
2.5 CFTR Genindeki Mutasyonlar ve Fenotip ile İlişkisi.....	31
2.5.1 CFTR genotipi ve toplam CFTR aktivitesi	35
2.5.2 Kompleks Alleller	39
2.5.3 Atipik CF bulguları ve ilişkili mutasyonlar	40
2.5.4 Epidemiyoloji ve genetik	42
3. MATERYAL VE YÖNTEM	48
3.1 Çalışma Grubu	48
3.2 Araştırma Parametreleri	48
3.3 Yöntem	48
3.3.1 Çalışmaya alınma kriterleri	49

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.3.2 Çalışmaya alınmama kriterleri.....	49
3.3.3 Gönüllülerin araştırmadan çıkarılma kriterleri	50
3.3.4 Çalışma tasarımı	50
3.3.5 DNA izolasyonu	50
3.3.6 DNA'nın kontrolü	52
3.3.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	52
3.3.8 PCR ürünlerinin purifikasyonu.....	54
3.3.9 DNA sekans analizi	55
4. BULGULAR.....	56
4.1 Çalışma Grubundaki Ham Verilerin Biyoinformatik Analizi	60
4.1.1 p.Arg74Trp aminoasid değişimi	60
4.1.2 p.Glu92Lys aminoasid değişimi	61
4.1.3 p.Gly126Asp aminoasid değişimi.....	62
4.1.4 p.Ile148Thr aminoasid değişimi	63
4.1.5 p.Lys174X aminoasid değişimi	64
4.1.6 p.Gly178Arg aminoasid değişimi.....	65

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.1.7 p.Leu183Ile aminoasid değişimi	66
4.1.8 p.Arg297Gln aminoasid değişimi	67
4.1.9 p.Arg347Pro aminoasid değişimi.....	68
4.1.10 p.Glu379 X aminoasid değişimi.....	69
4.1.11 p.Thr388Met aminoasid değişimi	70
4.1.12 p.Val470Met aminoasid değişimi	71
4.1.13 p.Met472Val aminoasid değişimi	72
4.1.14 p.Phe508del aminoasid değişimi.....	73
4.1.15 p.Gly542X aminoasid değişimi.....	74
4.1.16 p. Glu632 X aminoasid değişimi.....	75
4.1.17 p. Ile807Met aminoasid değişimi.....	76
4.1.18 p. Ile982Ile aminoasid değişimi	77
4.1.19 p. Leu1034Phe aminoasid değişimi	78
4.1.20 p. Phe1052Val aminoasid değişimi.....	79
4.1.21 p.Tyr1092His aminoasid değişimi	80
4.1.22 p. Lys1165Glu aminoasid değişimi	81

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.1.23 p. Thr1220Ile aminoasid değişimi	82
4.1.24 p. Ser1235Arg aminoasid değişimi.....	83
4.1.25 p. Trp1282X aminoasid değişimi	84
4.1.26 p. Ser1426Phe aminoasid değişimi.....	85
5. TARTIŞMA.....	86
6. SONUÇLAR	94
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	96
ÖZGEÇMİŞ.....	117
EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil

Sayfa

1.1.	Kromozom 7 ve kistik fibrozis geni.....	1
2.1.	ABC proteini ve NBD’lerdeki karakteristik aminoasid sekanslarının şematik gösterimi. (A) Çift katlı lipit bariyer gri renkte, Membran segment domainler (MSD) açık kahverengi ve Nükleotid bağlanma bölgeleri (NBD) mavi renkte temsil edilmiştir. (B) Walker A (X herhangi bir aminoasidi gösterir), C motifi ve Walker B(φ hidrofobik residüeleri) korunmuş karakteristik aminoasid sekanslarını temsil eder.....	6
2.2.	CFTR geni, transkripti ve mutasyon dağılımı. (A) Eski ve yeni ekzonların sınıflandırılması ve genel ekzon e intronların şematik gösterimi (B) Ekzonların koyu mavi aradaki kısımlar ise intronları temsil eder (C) Dikey sütunlar ise polymorfizmler ve mutasyonların dağılımını ifade eder.....	7
2.3.	CFTR genine ait ekzonların cDNA (NM_000492.3) üzerindeki yerleri. Kırmızı renkli rakamlar 27 ekzonlu CFTR geninin cDNA üzerindeki yerini ifade ederken, siyah renkli rakamlar 24 ekzonlu eski düzenlemeyi ifade eder	7
2.4.	CFTR proteininin transmembran topolojisi ve domain organizasyonu.....	8
2.5.	CFTR glikoproteininde yüklü R domain bölgesi ve iyon geçirgenliğini sağlayan transmembran bölgelerdeki aminoasitler	10
2.6	CFTR molekülündeki NBD1 ve NBD2 yapısının tersiyer yapısı	11

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 2.7. CFTR molekölü R bölgesi içindeki fosforilasyon alanları. PKC bağımlı fosforilasyon pozisyonları sırasıyla, T582, T604, S641, T682, S686, S707, S790, T791, ve S809; PKA bağımlı fosforilasyon pozisyonları sırasıyla, S660, S686, S700, S737, S753, S768, T788, S795, ve S813..... 12
- 2.8 Tahmini CFTR topolojisi ve çeşitli proteinler ile etkileşimleri..... 13
- 2.9 CFTR proteinine ait domain bölgeleri ve aminoasit lokalizasyonları..... 13
- 2.10. Poliotopik protein topolojisinin çeşitleri (A) ER hedeflemeye en basit kotranslasyonel topogenesis modeli, sinyal tanıma parçacığı (SRP), ortaya çıkan bir sinyal dizisini (TM) tanıdığında başlar, ER zarında reseptörünü (SR) bağlar ve RNC'yi (Ribosome-nascent chain complex) Sec61 translokona aktarır. TM topolojisi, ardışık olarak translokona poru açan ve kapayan dönüşümlü sinyal ve durdurma aktarma faaliyetleri vasıtasıyla başlatılır. Ribozom translokona bağlantısının dikkatli bir şekilde düzenlenmesi, çözünabilir alanların sitosol veya ER lümenine ulaşmasını ve TM'lerin iki tabakaya entegrasyonunu sağlar. (B) CFTR için, TM1 ve TM2'nin topolojisi, translokasyonun TM1 (sol) veya TM2 (sağ) ile başlatıldığı iki alternatif yolla oluşturulur. Yeni oluşmaya başlayan CFTR zinciri, TM2 takılması ile translokona TM1 sürüklediği bir posttranslasyonel mekanizma kullandı. (C) TM3 ve TM4 arasındaki kısa ilmek (beş aminoasitli) TM3 ve TM4'ün aynı anda sarmal bir saç tokası olarak translokona eklendiğini düşündürmektedir. TM5-6, TM9-10 ve TM11-12 için de benzer bir mekanizma önerilmiştir. (D) TM8'in stop-transfer aktivitesi, zarı kapsayan topolojiyi almadan önce, ER lümeninde TM8'in geçici olarak maruz kalmasıyla Asp924 tarafından zayıflatılır..... 17

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 2.11. (A) NBD1'in kristal yapısındaki alt domain ve kritik bölgelerin organizasyonu. (B) NBD1domaini içindeki baskılayıcı mutasyonların lokalizasyonları21
- 2.12. (A) CFTR ko-translasyonel katlanması ve post-translasyonel katlanması. (B) $\Delta F508$ mutasyonu, NBD1 yapısını destabilize eder, TMD1, TMD2 ve NBD2 katlanmasına müdahale eder ve NBD1 ve ICL4 arasındaki etkileşimi bozarak domain-domain birleşmesini zorlaştırır23
- 2.13. CFTR aminoasit dizileri içerisindeki post translasyonel modifikasyon (PTM) bölgeleri.....26
- 2.14. CFTR'nin ER kalite kontrolü (ERQC) için kontrol noktaları.. İlk kontrol noktasında, Hsc70 ve Hsp70, yeni ortaya çıkan CFTR'nin sitozolik alanlarıyla etkileşime girer, bu nokta F508del CFTR'yi tutmanın ve atmanın ana mekanizmasıdır. İkinci kontrol noktasında, normal tip CFTR, N-glikosil artıkları ile calnexin'in etkileşimi yoluyla katlanır yolak boyunca ilerler. Başarılı bir katlama yapıldığında, CFTR, hem salgı yolunda üçüncü kontrol noktası (AFTler gibi), hemde dördüncü kontrol noktası (di-asidik çıkış kodu/DAD gibi) içeren adımlarda ilerleyerek ER'den çıkar28
- 2.15. CFTR mutasyonlarının sınıflandırılması.....33
- 2.16. CFTR proteininin toplam aktivitesi ve CFTR ile ilişkili hastalıkların şiddeti. Gri renkli bölgeler, allellerden birinin yada ikisinde normal olduğunu ve CFTR aktivitesi yeterli olup, hastalığın olmadığını belirtir. Turuncu renkli bölgelerde ise her iki allelde mutasyon söz konusu olup CF ve CF ile ilişkili en az bir hastalık durumunun varlığına işaret eder35

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.17. CFTR genotipi ile CF klinik fenotip arasındaki ilişki	36
2.18. Bozulmuş CFTR miktarı ve fonksiyonunun toplam CFTR aktivitesi üzerine etkisi	37
2.19 Kistik Fibrozisin Dünya'daki insidansı	43
3.1. PCR sıcaklık döngüsü: (1) Çift iplikli DNA'nın ayrılması için sıcaklık yaklaşık 95°C' ye yükselmiştir, (2) primerin bağlanmasına izin verilmesi için sıcaklık primere göre düşürülmüştür, (3) sıcaklık 72°C' ye ayarlanarak polimeraz primerin uzaması sağlar	53
4.1. Çalışma grubuna ait mutasyon görülme oranlarının grafiği	58
4.2. A) p.Arg74Trp heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Arg74Trp aminoasid değişimine neden olan CGG>TGG nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri	60
4.3. A) p. Glu92Lys homozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Glu92Lys aminoasid değişimine neden olan GAA>AAA nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri	61

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.4. A) p.Gly126Asp heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Gly126Asp aminoasid değişimine neden olan GGC>GAC nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri62
- 4.5. A) p.Ile148Thr heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Ile148Thr aminoasid değişimine neden olan ATT>ACT nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.....63
- 4.6. A) p.Lys174X heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Ile174X aminoasid değişimine neden olan AAA>TAA nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.....64
- 4.7. A) p.Gly178Arg homozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak,Gly178Arg aminoasid değişimine neden olan GGA>AGA nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri65

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.8. A) p.Leu183Ile heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B). Leu183Ile aminoasid değişimine neden olan CTC>ATC nükleotid yerdiğişiminin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri 66
- 4.9. A) p.Arg 297Gln homozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Arg297Gln aminoasid değişimine neden olan CGG>CAC nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri 67
- 4.10 A) p.Arg347Pro heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, . Arg347Pro aminoasid değişimine neden olan CGC>CCC nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri 68
- 4.11. A) p.Glu379X aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Glu379X aminoasid değişimine neden olan GAA>TAA nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri 69
- 4.12. A) p.Thr388Met heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Thr388Met aminoasid değişimine neden olan ACG>ATG nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri 70

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.13. A) p.Val470Met heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Val470Met aminoasid değişimine neden olan GTG>ATG nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri71
- 4.14. A) p. Met472Val heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, .p. M472V aminoasid değişimine neden olan ATG>GTG nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri72
- 4.15. A) p.Phe508del heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Phe508del aminoasid değişimine neden olan nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.....73
- 4.16. A) p.Gly542X homozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Gly542X aminoasid değişimine neden olan GGA>TGA nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.....74

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.17. A) Glu632X heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Glu632X aminoasid değişimine neden olan GAA>TAA nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri 75
- 4.18. A) p.Ile807Met heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Ile807Met aminoasid değişimine neden olan ATA>ATG nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri 76
- 4.19. A) p.Ile982Ile heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Ile982Ile aminoasid değişimine neden olan ATT>ATC nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri 77
- 4.20. A) p.Leu1034Phe heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Leu1034Phe aminoasid değişimine neden olan CTC>TTC nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri 78

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.21. A) p.Phe1052Val heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, . Phe 1052 Val aminoasid değişimine neden olan TTC>GTC nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri79
- 4.22. A) p.Tyr1092His heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, p.Tyr1092His aminoasid değişimine neden olan TAC>CAC nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri80
- 4.23. A) p.Lys1165Glu heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, p.Lys1165Glu aminoasid değişimine neden olan AAG>GAG nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri81
- 4.24. A) p.Thr1220Ile heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, p.Thr1220Ile aminoasid değişimine neden olan ACA>ATA nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri82

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.25. A) p.Ser1235Arg heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, p.Ser1235Arg aminoasid değişimine neden olan AGT>AGG nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri 83
- 4.26. A) p.Trp1282X heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Trp1282X aminoasid değişimine neden olan TGG>TAG nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri 84
- 4.27. A) p.Ser1426Phe heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Ser1426Phe aminoasid değişimine neden olan TCC>TTC nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri 85

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 ABC alt ailesine ait proteinlerin sınıflandırılması.....	5
2.2 CFTR proteinine ait NBD1 ve NBD2 domainler içindeki motiflerin aminoasid sekans ve lokasyonları	9
2.3 CFTR proteini üzerindeki ATP bağlanma pozisyonları.....	14
2.4 CFTR proteini üzerindeki NBD bölgelerinin aminoasid pozisyonları	14
2.5 CFTR topolojisinin aminoasit lokalizasyonları	15
2.6 CFTR mutasyonlarının CF(<i>Kistik Fibrozis</i>) ile ilişkisi	34
2.7 Atipik (Hafif CF kliniğine sahip) hastalarda yaygın görülen CFTR fenotiplerinin mutasyonlar ile ilişkisi.....	41
2.8 Kistik Fibrozisin Dünyadaki İnsidansı	47
3.1 CFTR geninin her bir ekzonuna özgül olan oligonükleotid primerler	54
4.1 Aminoasid değişimlerinin fenotip skorlaması HGMD/dbSNP veri tabanlarına göre olası fenotipleri ve polarite değişimleri.....	56
4.2 Çalışma grubundaki mutasyonların görülme sıklığı	57
4.3 Sağlıklı (kontrol) grupta saptanan mutasyon ve polimorfizmler	58
4.4 Çalışma grubunda saptanan mutasyonlar	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

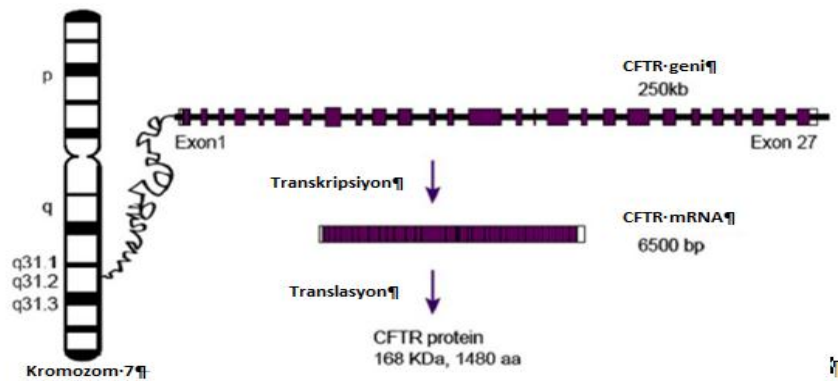
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ABC	ATP-Binding Cassette
ABCC	ATP-Binding Cassette, sub-family C
ATP	Adenozin Trifosfat
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
CBAVD	Congenital Absence of the Vas Deferens
CF	Cystic Fibrosis
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cGMP	Cyclic Guanosine Monophosphate
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ECL	Extra- Cellular Loops
ICL	Intra- Cellular Loops
kDa	Kilo Dalton
MBL	Mannoz Bağlayıcı Lektin
MSD	Membran Segment Domain
NBD	Nücleotide Binding Domain
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKA	Protein Kinaz A
PKC	Protein Kinaz C
PTM	Post Translasyonel Modifikasyon
RNA	Ribo Nükleik Asit
Taq	Thermus Aquaticus
TM	Transmembran

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Türkiyenin coğrafi konumu bakımından popülasyonların göç yolları üzerinde bulunması ve akraba evliliklerinin fazla olması gibi nedenlerden dolayı birçok genetik geçişli hastalıkları gösterme potansiyeline sahiptir. Ülkemizde görülen genetik geçişli hastalıklardan biride, “Kistik Fibrozis” (CF/Cystic fibrosis) (OMIM#291700) hastalığıdır. Kistik fibrozis otozomal resesif bir hastalık olup, beyaz ırkta, 1/2500’de görülme ve 1/25 taşıyıcılık insidansına sahiptir. Kistik fibrozis hastalığı, rinosinüzit, nazal polip, obstruktif akciğer hastalığı, rekürren pulmoner enfeksiyonlar, gastrointestinal sistem malabsorbsiyonu, yağ intoleransı, yağlı dışkı, karaciğer disfonksiyonu ve intestinal obstrüksiyon gibi kliniğe sahiptir. Kistik Fibrozis Transmembran Regulator proteinini kodlayan gende meydana gelen mutasyonlar sonucu Kistik Fibrozis hastalığı, oluşur. Litaratürde, Kistik Fibrozis Transmembran Regulator proteini ve bu proteinin oluşmasına neden olan gen kısaca CFTR olarak tanımlanır (Riordan et al., 1989). CFTR geni, 7. kromozomun 7q31.2 bandında lokalize olup yaklaşık 250 kb’ lık CFTR genini kodlar. CFTR geni ise 27 ekzon içermekte olup yaklaşık 6,5 kb’ lık mRNA transkriptini şifreler (Şekil1.1). Yapılan moleküler ve bağlantı analizleri ile kistik fibrozis hastalığına, 7. kromozom üzerindeki CFTR genindeki mutasyonların neden olduğu ve bu genin hastalıkla ilişkili majör bir gen olduğu araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Zielenski et al., 1991).



Şekil 1.1. Kromozom 7 ve kistik fibrozis geni (Sharma et al., 2013).

Kistik Fibrozisli hastalarda genotip-fenotip ilişkisi bilinmekle birlikte, aynı mutasyona sahip birçok hastanın klinik seyrinin birbirinden farklı olduğu, gösterilmiştir (Kerem, 2006). CFTR genindeki polimorfik ve mutasyon noktasının, genin hangi domanı üzerinde olduğunu belirlemek ve ilgili mutasyonların hastalığın fenotipiyle ilişkilendirilmesi hastalığın klinik seyrinin bilinmesi için kritik öneme sahiptir.

CF'nin klinik tanısını kesin anlamak için DNA dizileme yönteminin kullanılması önemlidir. Ancak bu yöntemin hem pahalı, hemde zaman alan bir yöntem olmasından dolayı, bunun yerine kolay, hızlı ve ucuz olması gibi nedenlerden ötürü, ticari olarak üretilen 20 mutasyonluk stripp testleri tercih nedeni olmaktadır. Ancak bu testler Dünyada insidansı fazla olan mutasyonların taranmasına olanak sağlamaktadır. CF'ye neden olan 1900 den fazla mutasyonun olması ve bu mutasyonların birçoğu'nun bireysel veya ailesel olması, hızlı sonuç veren bu gibi testlerin doğru sonuç vermesini kısıtlayabilmektedir. Bu durumdada bu mutasyonların dışında olası mutasyonların gözden kaçırılma ihtimali söz konusu olabilmektedir. Bu nedenerden ötürü, ülkemiz populasyonuna özgü CFTR mutasyonlarının sıklığının belirlenmesi, ileride klinik tanı için yapılacak bu gibi testlere ayrıca bir literatür katkısı sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında, laboratuvara kistik fibrozis moleküler tanısının yapılması için gönderilen bireylerden, CFTR geninin analizinin yapılması sonucu elde edilen mutasyon veya DNA varyantlarının protein yapısındaki rolünü belirleyerek fenotipe yansımaları araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışma grubu (30 birey) ve sağlıklı grub (25 birey) oluşturulmuştur. Her iki grupta CFTR geninin protein kodlayan ve intron-ekzon bağlantı bölgelerini içeren 100bp (baz çifti) bölgeleri DNA dizileme yöntemiyle analiz edilmiştir. Analiz sonucunda çalışma grubunu oluşturan 30 bireyden 4'ünde homozigot mutasyon, 26'sında ise heterozigot mutasyon bulunmuştur. Kistik fibrozis otozomal resesif bir kalıtım gösterdiğinden dolayı, homozigot 4 birey hasta, 26 birey ise taşıyıcı olarak saptanmıştır. Sağlıklı grupta ise çalışma grubunda saptanan patojenik etkisi olan mutasyonların hiç biri saptanmamıştır. Bu grupta 25 kişide sadece V470M amino grup asit yer değişimi saptanmış ve benin varyantlar olarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tanım ve Tarihçe

Kistik fibrozis (CF)(OMIM 291700), primer olarak solunum yollarının kronik obstrüksiyonu ve sindirim bozukluğu ile karakterize olmakla birlikte, çocuk ve genç erişkinlerde çoklu organ tutulumu gösteren kalıtsal bir hastalıktır. Hastalarda ter, tükürük bezleri, kalın bağırsak enfeksiyonları, havayolları, pankreasa ait egzokrin glandlardan anormal sekresyonlar, çomak parmak, erkeklerde ürogenital anomaliler'in oluşumu gibi klinik bulgulara sahiptir. Hastalığın başlıca klinik özellikleri ise kronik obstrüktif ve süpüratif akciğer hastalığı, egzokrin ve endokrin pankreas yetmezliği, terde yüksek sodyum ve klor kaybına bağlı gelişen Psödo-Bartter sendromu ile erkeklerde görülen infertilite olarak özetlenebilir (Anderson et al., 1938).

Kistik fibrozun ilk kapsamlı tanımı, 1938'de Anderson tarafından yapılmıştır. Anderson bu sendromu ilk olarak çok sık beslenmelerine rağmen gelişemeyen, gergin karınlı ve fazla miktarda soluk renkte kötü kokulu dışkı ile karakterize diyare atakları olan çocuklarda farkına varmıştır. Ancak hastaların önemli bir bölümü ikinci yaşlarını dolduramadan bronş ve akciğerlerde gelişen enfeksiyonlara bağlı ölümler meydana gelmiştir. Bu hastalarda yapılan otopsiler sonucunda hastalığı belirleyen iki önemli bulgu ortaya çıkmıştır. Bunlardan birincisi, enfeksiyonun akciğer parankimasından ziyade daha çok solunum yollarında ortaya çıkmış olması; ikincisi ise, solunum yollarının yoğun, yapışkan, yeşil-gri renkte, iltihaplı bir maddeyle tıkanmış olmasıdır. Anderson 'un bulguları kistik fibrozisli hastalarda karşılaşılan iki temel fizyopatolojik sorunu göstermiştir. Bu bulgulara göre, beslenme bozukluğuyla birlikte hastaların viskoz salgı üretmesine bağlı olarak pankreas yetmezliği ve solunum yolu enfeksiyonları görülmüştür (Anderson et al., 1938). Solunum yollarında üretilen bu viskoz salgılar ise çeşitli mikro-organizmaların, özellikle *Pseudomonas aeruginosa*' ın etken olduğu kronik enfeksiyonların ortaya çıkmasına neden olmuştur (Esterly et al., 1968; Sobonya et al., 1986)

1950 yıllarda, hastalığın, epitel hücrelerdeki tuz transportunda meydana gelen anormallikten kaynaklandığı saptanmıştır. Araştırmacılar 1953 yılında hasta çocukların terinde ileri derecede tuz kaybı olduğunu göstermişler (DiSant'Agnese et al., 1953). 1985 yılında ise hastalıktan sorumlu olan genin 7. kromozomun uzun kolunda yer aldığı tanımlanmış ve 1989 yılında ise mutasyona uğrayan gen ürününün “*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*” (CFTR) olduğu araştırmacılar tarafından bulunmuştur (Riordan et al., 1989).

2.2 Kistik Fibrozis

2.2.1 ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları

Hücrede taşımaya aracılık eden proteinler, ATP ile çalışan pompalar olup P, F, V ve ABC süper ailesi olarak 4 ana gruba ayrılır. P tipi ATP pompası Na^+ , K^+ Ca^{2+} ve H^+ pompası olarak görev yapar. F tipi ATP pompası ise hücre için ATP üretiminde kullanılan proton pompası olarak, özellikle de iç mitokondriyal zar da görev yapar. V tipi ATP pompası, lizozomların yüksek asiditelerini sağlamak üzere lizozomal vakuol zarlar arasındaki proton pompası olarak görev yapar. ABC taşıyıcı ailesi üyeleri, transmembran proteinleri olup enerjiye bağımlı olarak çalışırlar.

ABC süper ailesi, membran proteinleri içerisinde yer alan, en büyük protein ailesinden birisidir. ABC süper ailesi ATP bağlayıcı motif özelliklerine sahip olmasından dolayı hem ATP yi bağlayabilir hemde hidrolize edebilirler. Böylece ATP nin bağlanması ve hidrolizi sonucu oluşan enerjiyi kullanarak, yoğunlaşma farkına karşı maddelerin her iki yönde taşınmasını sağlayarak, sitoplazma ile hücre dışı arasında, madde taşınmasında görev yaparlar. ABC taşıyıcıları, ökaryotik hücrelerde filogenetik olarak A'dan G'ye kadar alt sınıflara ayrılmıştır. İnsan genomunda 49 gen ile temsil edilmekte olan bu üst aile, gen yapıları, domain sayıları ve aminoasid dizilimleri temel alınarak 7 alt gruba ayrılmıştır (Tablo 2.1) (Dean et al., 2001; Stavrovskaya et al., 2008).

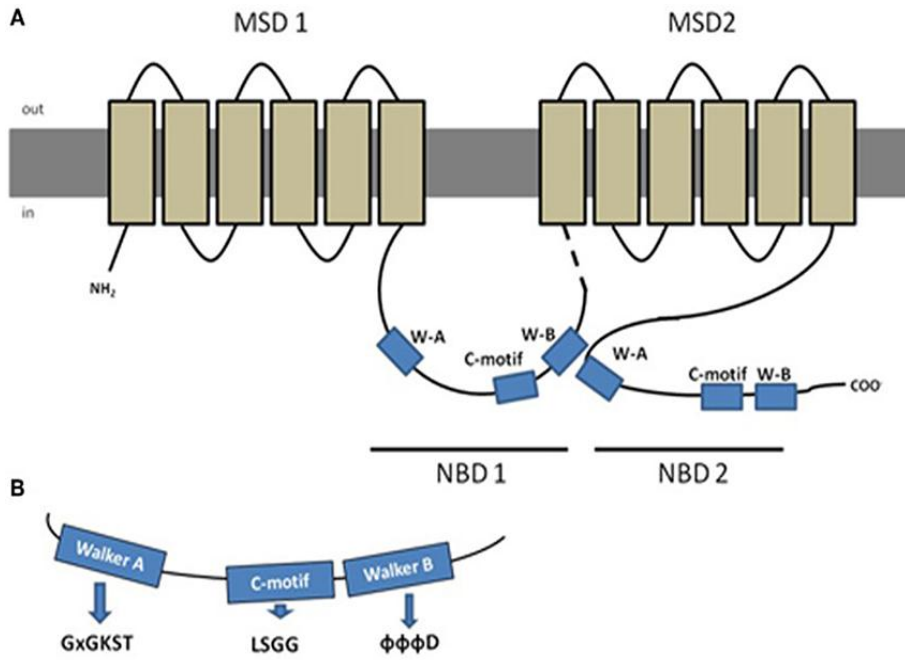
Çizelge 2.1. ABC alt ailesine ait proteinlerin sınıflandırılması

ALTERNATİF İSİM	ABC1	MDR	MRP	ALD	OABP	GCH20	WHITE
Alt-aile	ABCA	ABCB	ABCC	ABCD	ABCE	ABCF	ABCG
Protein sayısı	12	11	13	4	1	3	5

ABC protein ailesindeki mutasyonlar kistik fibrozis, stargardt hastalığı ve tangier gibi çeşitli hastalıklara neden olur (Rust et al., 1999).

2.2.2 ABC proteinlerinin genel yapısı

ABC taşıyıcıları MSD1 ve MSD2 olarak bilinen, iki tane membran segment domainlerinden oluşur. MSD'ler ise her biri, altı adet olan transmembran segmentten meydana gelir. MSD'lerin içerisinde ise ATP ile etkileşime giren nükleotidi bağlayan bölgeler olan NBD'ler bulunur. NBD'ler ise NBD1 ve NBD2 olarak ikiye ayrılır. (Bkz. Şekil 2.1) Sonuç olarak bir ABC taşıyıcı proteininde MSD1, MSD2 NBD1 ve NBD2 olmak üzere 4 ana domain bulunur. Membran segment domain'ler (MSD) heliks yapılar olup hidrofobik özellik gösterirler. Bu yapılar membran üzerinde iç ve dış çevre arasında beş ile on arası zikzak çizerek bir kanal yapısı meydana getirir, böylece aminoasit, peptid, vitamin, hormon, ilaç, toksik madde ve metal kompleksleri gibi farklı birçok maddenin seçici bir şekilde taşınmasını sağlamış olurlar. (Locher, 2004; Licht and .Schneider, 2011). NBD bölgeleri ise ABC proteinlerinin görev yapması için gerekli olan ATP'nin bağlandığı ve hidrolizinin gerçekleştiği yerdir. NBD'ler yaklaşık 200 aminoasitlik P-loop/Walker A ve Walker B motiflerine sahiptir (Şekil 2.1). Bu dizilerin arasında ise ABC taşıyıcı proteinlerinin imzası niteğinde olan C motifi (LSGGQ) yer alır. Walker A ve Walker B motifleri ATP hidrolizini gerçekleştiren proteinlerde bulunurken C motifi ise sadece ABC taşıyıcı proteinlerine özgüdür. Walker A motifi ATP 'nin α ve β fosfatlarına bağlanırken, Walker B motifinin sahip olduğu β katlanma Mg^{++} iyonlarını dengeleyerek ATP molekülünü sabitlet ve Walker B sonrasında bulunan glutamik asit ise ATP'nin hidrolizini gerçekleştirmiş olur (Higgins, 1992; Oswald et al., 2006; Dean et al., 2005).



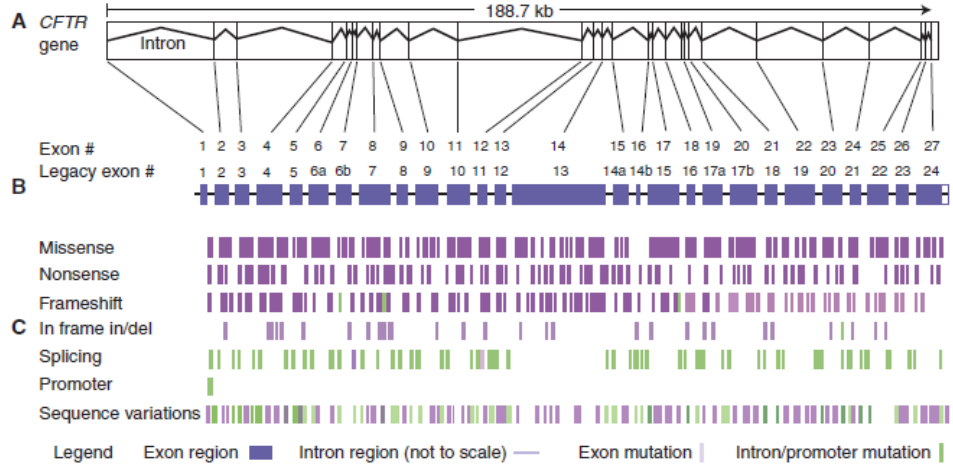
Şekil 2.1. ABC proteini ve NBD'lerdeki karakteristik aminoasid sekanslarının şematik gösterimi. **(A)** Çift katlı lipit bariyer gri renkte, Membran segment domainler (MSD) açık kahverengi ve Nükleotid bağlanma bölgeleri (NBD) mavi renkte temsil edilmiştir. **(B)** Walker A (X herhangi bir aminoasidi gösterir), C motifi ve Walker B(Φ hidrofobik residüelleri) korunmuş karakteristik aminoasid sekanslarını temsil eder (Dean et al., 2001).

2.2.3 Kistik fibrozis transmembran regülatör (CFTR) geni

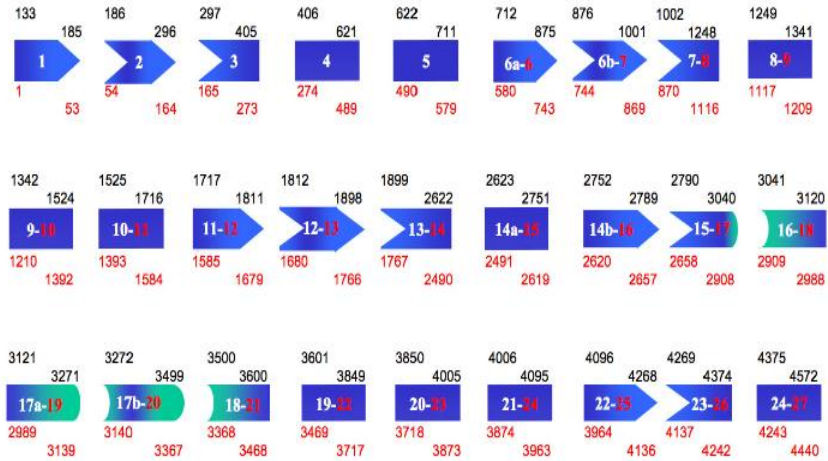
Kistik Fibrozis (CF) geni (OMIM#602421) ilk defa 1989 yılında, 7. kromozomun q31-2 bölgesinde lokalize olduğu bulunmuştur. CF geni literatürde ABC35, ABCC7, MRP7 gibi isimlerle karşımıza çıkar (NCBI, 2017). CF geni (NM_000492.3) 250 kDa uzunluğunda olup, 27 ekzon içeren 6132 bp cDNA'ya sahip büyük bir gendir (Bkz. Şekil 2.3). CF geninin ürünü 1480 aminoasitlik 168kDa moleküler ağırlığa sahip *Kistik Fibrozis Transmembran Regülatör* (CFTR)(NP_000483.3) proteindir (Riordan et al., 1989). CFTR proteinin ağırlığı *invivo* çalışmalarda yaklaşık 150 ile 180 kDa arasında saptanmıştır. Proteinin ağırlığındaki bu farklılık, proteinin glikozile olup olmaması ve *invivo* koşulların farklılığından kaynaklanmaktadır (Higgins, 1992).

CFTR proteini cAMP bağımlı çalışan, klor kanalı olarak görevi yapan ve salgı epitel hücrelerinde eksprese olan hücre membranında çapa şeklinde bir

integral proteindir (Riordan et al., 1989). Günümüze kadar bu gende 1900'den fazla mutasyon tanımlanmıştır (Şekil 2.2) (Cytic Fibrosis Mutation Database, 08.09.2015).



Şekil 2.2. CFTR geni, transkripti ve mutasyon dağılımı. (A) Eski ve yeni ekzonların sınıflandırılması ve genel ekzon e intronların şematik gösterimi (B) Ekzonların koyu mavi aradaki kısımlar ise intronları temsil eder (C) Dikey sütunlar ise polimorfizmler ve mutasyonların dağılımını ifade eder (Tsui et al., 2016).

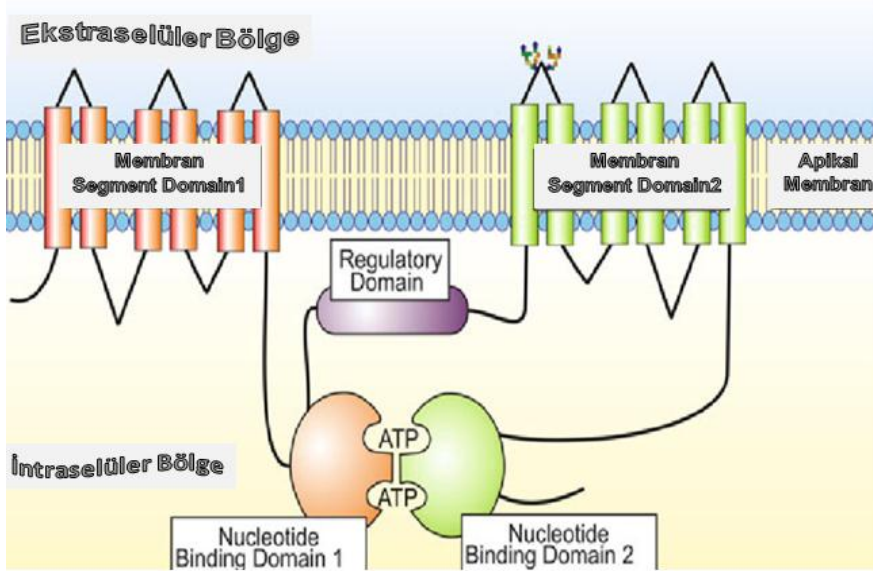


Şekil 2.3. CFTR genine ait ekzonların cDNA (NM_000492.3) üzerindeki yerleri. Kırmızı renkli rakamlar 27 ekzonlu CFTR geninin cDNA üzerindeki yerini ifade ederken, siyah renkli rakamlar 24 ekzonlu eski düzenlemeyi ifade eder (Universal Mutation Database, 2017).

2.3 CFTR Proteinini

CF gen ürünü, CFTR (Kistik Fibroz Transmembran Regulatorü) (NCBI Reference Sequence: NP_000483.3) proteini olarak bilinir. CF geni, 1480 aminoasidlik ve 6,5 kb'lık bir mRNA transkriptini şifreleyerek CFTR proteinini oluşturur (Riordan et al., 1989). CFTR proteini epitel hücrelerde klor (Cl^-) kanalı olarak işlev gören, aktif taşımada rol oynayan ABC (ATP-Binding Cassette/ATP- Bağlayıcı Bölge) protein ailesinin bir üyesidir. CFTR proteini, normal bir hücrede endoplazmik retikulumdan salgılanmakta, golgi cisimciğinde glikolize olmakta ve epitel hücresinin apikal membranına yerleşip cAMP ile aktive olan klor (Cl^-) kanalı işlevi görmektedir (Randak et al., 2003).

CFTR proteini, MSD1, MSD2, NBD1 NBD2 ve bir R bölgesi olmak üzere toplam beş domainden oluşur. Herbir MSD ise, hidrofobik heliks yapılarına sahip altı adet transmembran segmentten (TM1-TM2-TM3-TM4-TM5-TM6) oluşur. CFTR proteinini diğer ABC aile üyelerinden ayıran en önemli fark ise, CFTR'de bulunan R (Regulator/Düzenleyici) bölgesinin diğer üyelerde bulunmamasıdır (Kim and Skach, 2012; Collins et al., 1992). (Şekil 2.4) (Kim and Skach, 2012).



Şekil 2.4. CFTR proteininin transmembran topolojisi ve domain organizasyonu (Bradbury, 2016).

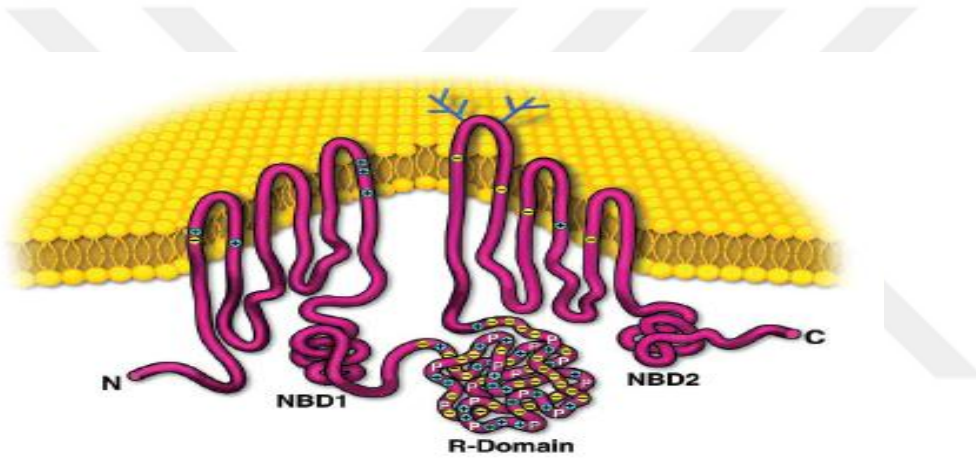
Nükleotid Binding Domain olarak bilinen NBD bölgeleri ise protein için gerekli olan ATP'nin bağlandığı ve hidrolizinin gerçekleştiği yerdir. NBD'ler P-loop/Walker A ve Walker B motiflerine sahiptir. Bu dizilerin, 548-552 aminoasid pozisyonları arasında ise ABC taşıyıcı proteinlerin imzası niteğinde olan C motifi (LSGGQ) yer alır. NBD 1'in Walker A (GSTGAGKT) motifi, protein üzerinde 458-465. aminoasid pozisyonları arasında lokalize olup, ATP 'nin α ve β fosfatlarına bağlanır. Walker B motifi ise (R-X-h-h-h-h-D) sahip olduğu β katlanma şekli ile Mg^{++} iyonlarını dengeleyerek ATP molekülünün sabitlenmesini sağlar. Walker B motifinin sonrasında bulunan glutamik asit ise ATP'nin hidrolizini gerçekleştirir. NBD 2'nin Walker A (GRTGSGKS) motifi ise 1244-1251 aminoasid pozisyonları arasında yer alır (Bkz. Tablo 2.2) (David et al.,1999, Sheppard and Welsh, 1999).

Çizelge 2.2 CFTR proteinine ait NBD1 ve NBD2 domainler içindeki motiflerin aminoasid sekans ve lokasyonları (Sheppard and Welsh, 1999)

Motif	Sekans	Aminoasid numarası
Waker A motif	GXXGXGKS/T	
CFTR NBD1	GSTGAGKT	465
CFTR NBD2	GRTGSGKS	1251
LSGGQ motif	LSGGGQ	
CFTR NBD1	LSGGGQ	552
CFTR NBD2	LSHGH	1350
WalkerB motif	RXhhhhD	
CFTR NBD1	RXLYLLD	572
CFTR NBD2	RXILLLD	1370

CFTR proteini epitel hücrelerindeki temel görevi, klor (Cl^-) kanalı olarak işlev görmesidir. CFTR proteininin diğer hücre kanal proteinlerinden ayıran belli başlı özellikleri bulunmaktadır. Bunların başında küçük, tek kanallı ileti sağlamaları; akım-voltaj ilişkisinin doğrusal olması; katyonlardan ziyade anyonlara özgü olmaları; anyon geçirgenliğinin $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$ sırasıyla olması, aktivitelerinin siklik adenozin monofosfata (cAMP) bağımlı fosforilasyon ve hücre içi nükleotidler tarafından düzenlenmesi yer almaktadır (Anderson et al., 1991). MSD'ler klorür iyonlarına özgü porların şekillenmesine, NBD'ler ise

transport için gerekli olan enerji kaynağını oluşturmak üzere ATP'nin kendisine bağlanıp hidrolize olmasına, R bölgesinin fosforillenmesi ise kanalların aktive olup regüle edilmesine katkı sağlar. Kistik fibrozis transmembran regülör proteininin işlev görebilmesi için öncelikle cAMP'nin, R bölgesindeki serin rezidülerini fosforillemek üzere protein kinaz A'yı uyarması gerekmektedir (Collins, 1992). CFTR'yi diğer ABCC üyelerinden ayıran en temel özellik, NBD1 sonrası uzun bir hidrofobik bölgenin varlığıdır. Bu bölge protein kinaz A (PKA) tarafından yapılan fosforilasyon için yüklü aminoasitler ve çok fazla dibazik ve monobazik ortak diziler içerir (Şekil 2.5). R (regülör) bölgesi adı verilen bu bölge, klor kanalı aktivitesi üzerinde kritik öneme sahiptir (Riordan et al., 1989).



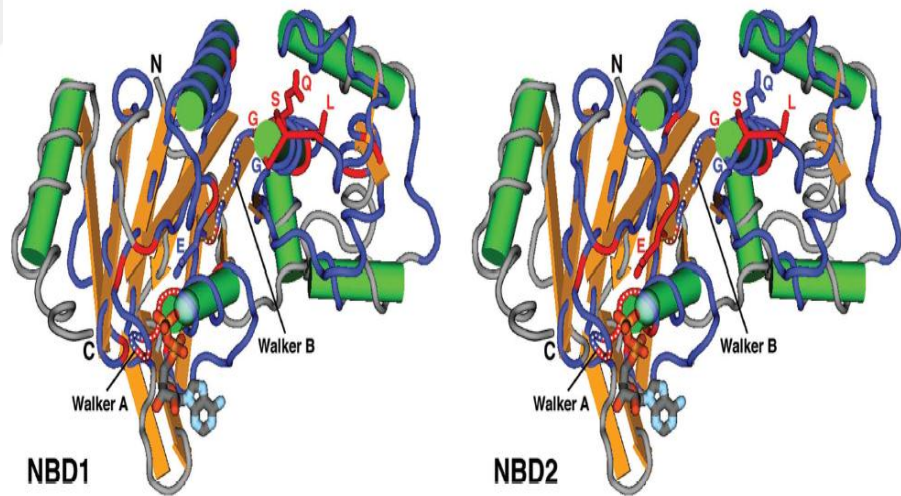
Şekil 2.5. CFTR glikoproteininde yüklü R domain bölgesi ve iyon geçirgenliğini sağlayan transmembran bölgelerdeki aminoasitler (Riordan et al, 1989).

ABC proteinleriyle CFTR arasındaki bir diğer belirgin fark ise transmembran sekansları içindeki, yüklü yan zincirlere sahip aminoasitlerin sayısının önemli ölçüde daha yüksek olmasıdır. Günümüzde membran içinde yüklü aminoasidlere sahip başka ABC proteinlerinde varlığıda tespit edilmiştir. Bununla birlikte, CFTR'nin transmembran dizileri içindeki bu aminoasitlerin birçoğu'nun, iyon kanalının özelliklerini etkilediği bulunmuştur. CFTR ile ABC proteinlerinin iki NBD sekansları benzer olmakla birlikte, NBD'nin özellikleri bakımından, ABCC alt üyesi ile daha çok benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

CFTR'nin NBD1 bölgesi, diğer ABC proteinin NBD'leri ve NBD2 'si ile kıyaslandığında, CFTR proteinin Walker A ve Walker B motifleri arasındaki

yaklaşık 13 aminoasid'in silinmiş olduğu gözlenmiştir. CFTR NBD1 sekansının diğer bir önemli özelliği ise Walker B aspartik asidi takip eden glutamik asit kalıntısının yerine serin aminoasid'inin gelmesidir (Şekil 2.6). Bu durumun önemi ise, glutamatin, ATP'nin hidrolizinde katalitik baz olarak işlev görmesidir (Deeley and Cole, 1997).

ABC proteinlerinin imzası niteliğinde olan LSGGQ motifi, NBD1'de iyi şekilde korunmasına karşın, NBD2'de oldukça bozulmuştur. NBD'ler içindeki diğer kısa aminoasid dizi motiflerinin önemi, diğer ABC proteinlerinin NBD'ler bakımından gruplandırılmasına fayda sağlamasıdır. Bu motiflerden bazıları, domainlerin ve proteinin bütünlüğüne katkı sağlarken, C- ucu yakınındaki dört aminoasidli hidrofobik motifler ise, proteinin olgunlaşmasına ve stabilitesine katkı sağlarken N terminaldeki diziler ise diğer proteinlerle etkileşimleri ve kanal geçirgenliğini sağladığı bulunmuştur (Naren et al., 1998; Gentzsch and Riordan, 2001).

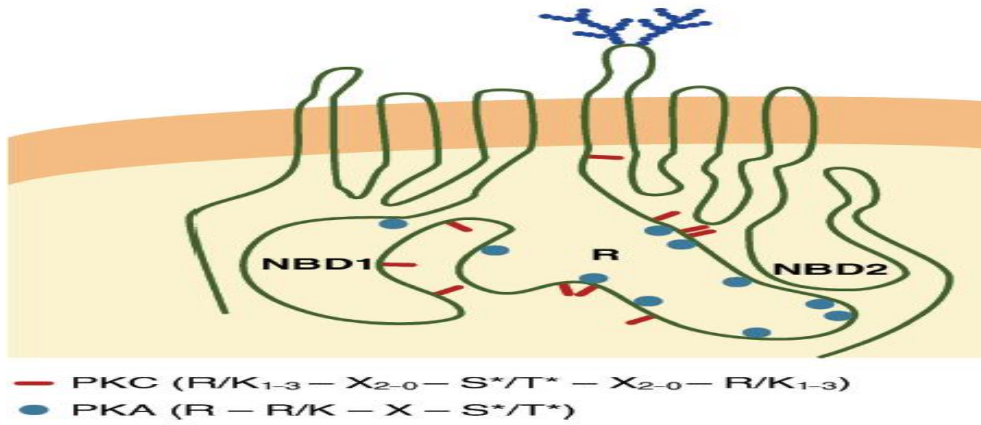


Şekil 2.6. CFTR molekülündeki NBD1 ve NBD2 yapısının tersiyer yapısı (Hanrahan et al., 2002).

CFTR proteinindeki 46-60'ıncı aminoasid'ler arasındaki aminoasid'ler, kanal geçirgenliğini etkilerken, N ucu yakınındaki başka kısa diziler ise anneksin denilen sinyal peptidi olarak görev yapan proteinler ile etkileşimi sağladığı bulunmuştur (Naren et al., 1999).

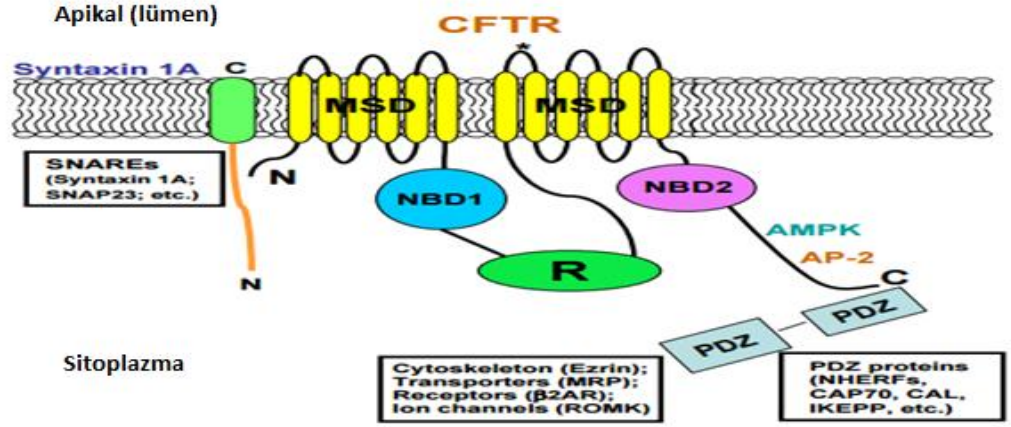
2.3.1 CFTR proteininin topolojisi

CFTR molekülü havayolu, bağırsak, üreme dokuları ve ekzokrin bezlerdeki (örn. Ter bezleri, ekzokrin pankreaslar ve tükürük bezleri) epitel hücrelerin apikal (lümenle yüzleşen) membranlarında lokaliz olmuştur. CFTR ekstra ve intraselüler sıvıdan iyon geçişini sağlayan ATP enerjisi kullanan simetrik politopik bir taransmembran proteini olup, 6'lı helikal transmembran (TM) yapıya sahip 2 hidrofobik membran- segment domain (MSD) ve nükleotid bağlanma bölgesi (NBD) olarakta bilinen ATP bağlanması için 2 sitoplazmik hidrofilik bölge içerir. Bu iki motif sitoplazmik düzenleyici (R) bölge ile bağlantılıdır. Düzenleyici bölge çok sayıda yüklü aminoasid ve PKA, PKC, cGMP-bağımlı protein kinase II [cGKII] gibi çoklu fosforilasyon bölgeleri içerir (Şekil 2.7) (Hanrahan et al., 2002).



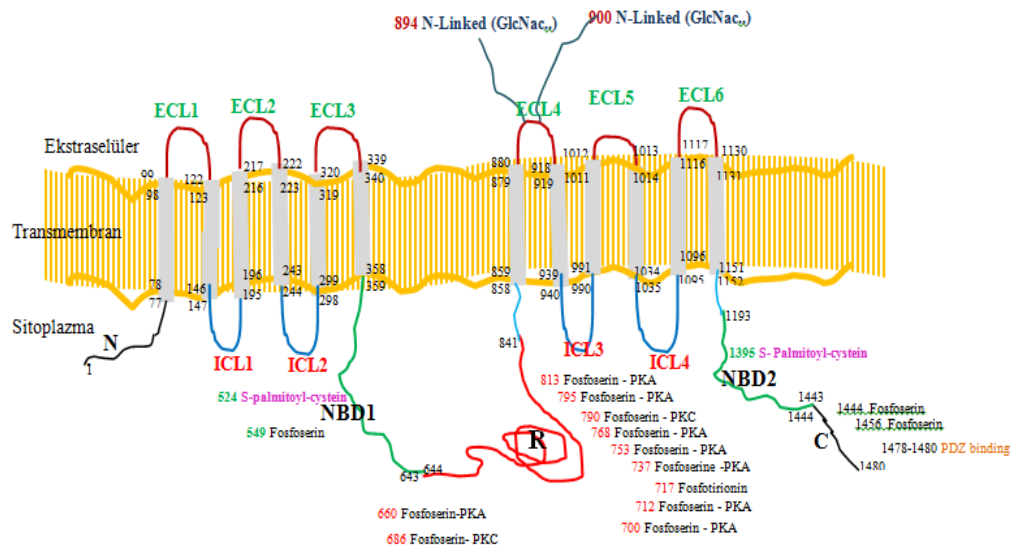
Şekil 2.7. CFTR molekülü R bölgesi içindeki fosforilasyon alanları. PKC bağımlı fosforilasyon pozisyonları sırasıyla, T582, T604, S641, T682, S686, S707, S790, T791, ve S809; PKA bağımlı fosforilasyon pozisyonları sırasıyla, S660, S686, S700, S737, S753, S768, T788, S795, ve S813 (Hanrahan et al., 2002).

CFTR proteinindeki N (amino) ve C (karboksi) terminal kuyrukları, sitoplazmik bölgede, Syntaxin 1A, PDZ gibi çeşitli bağlayıcı proteinler arasındaki etkileşime aracılık ederler (Bkz. Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Tahmini CFTR topolojisi ve çeşitli proteinler ile etkileşimleri (Li and Naren 2005).

CFTR proteininin bir kısmı ekstraselüler bölgede, bir kısmı helikal bölgede, bir kısmı ise sitoplazmik bölgede yer alır. Ekstra selüleler ve sitoplazmik bölgede kalan kısımları topolojik bölge (domain), taransmembran (TM) içerisinde yer alan bölge ise, helikal kısım olarak bilinir. CFTR proteinini oluşturan aminoasitlerin lokalizasyonuna baktığımızda, sırasıyla intraselüler (IC) trasnmembran (TM) ekstra selüler (EC) bölgeler şeklinde oluşan bir döngü, proteinin hücre zarında kıvrılarak ilmek (loop) oluşumunu sağlamasına neden olmuştur. CFTR ekstraselüler bölgede, (ECL1, ECL2, ECL3, ECL4, ECL5 ve ECL6) altı tane hidrofobik loop, intraselüler bölgede ise (ICL1, ICL2, ICL3 ve ICL4) dört tane hidrofilik loop oluşturmuştur (Ward and Kopito,1994) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 CFTR proteinine ait domain bölgeleri ve aminoasit lokalizasyonları.

2.3.2 CFTR UniProtKB kimliği

Protein: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulatör

Protein kısa adı: CFTR

UniProtKB Protein ID: P13569

Gen adı: CFTR

Gen sinonim adı: ABCC7

Organizma: Human

Moleküler fonksiyon: Klor kanalı, Hidroliz, İyon kanalı

Biyolojik proses: İyon taşıma, Taşıma

Ligand: ATP-bağlama, Cl, Nükleotid bağlama

Katalitik aktivitesi: $ATP + H_2O = ADP + \text{fosfat}$

Çizelge 2.3 CFTR proteini üzerindeki ATP bağlanma pozisyonları

ATP Bağlanma noktaları	
<u>Aminoasid pozisyonu</u>	<u>Tanımlama</u>
401	ATP1
434	ATP1
493	ATP1
1219	ATP2

Çizelge 2.4 CFTR proteini üzerindeki NBD bölgelerinin aminoasid pozisyonları

Nükleotid Binding Domain (NBD)	
<u>Aminoasid Pozisyonu</u>	<u>Tanımlama</u>
458-465	ATP1
1244-1251	ATP2

Çizelge 2.5 CFTR topolojisinin aminoasit lokalizasyonları

TOPOLOJİ		
Özellik	Pozisyon	Açıklama
Topolojik domain	1-77	Sitoplazmik
Transmembran	78-98	Helikal-1
Topolojik domain	99-122	Ekstraselüler
Transmembran	123-146	Helikal-2
Topolojik domain	147-195	Sitoplazmik
Transmembran	196-216	Helikal-3
Topolojik domain	217-222	Ekstraselüler
Transmembran	223-243	Helikal-4
Topolojik domain	244-298	Sitoplazmik
Transmembran	299-319	Helikal-5
Topolojik domain	320-339	Ekstraselüler
Transmembran	340-358	Helikal-6
Topolojik domain	359-858	Sitoplazmik
Transmembran	859-879	Helikal-7
Topolojik domain	880-918	Ekstraselüler
Transmembran	919-939	Helikal-8
Topolojik domain	940-990	Sitoplazmik
Transmembran	991-1011	Helikal-9
Topolojik domain	1012-1013	Ekstraselüler
Transmembran	1014-1034	Helikal-10
Topolojik domain	1035-1095	Sitoplazmik
Transmembran	1096-1116	Helikal-11
Topolojik domain	1117-1130	Ekstraselüler
Transmembran	1131-1151	Helikal-12
Topolojik domain	1152-1480	Sitoplazmik

(UniProt database, 2017)

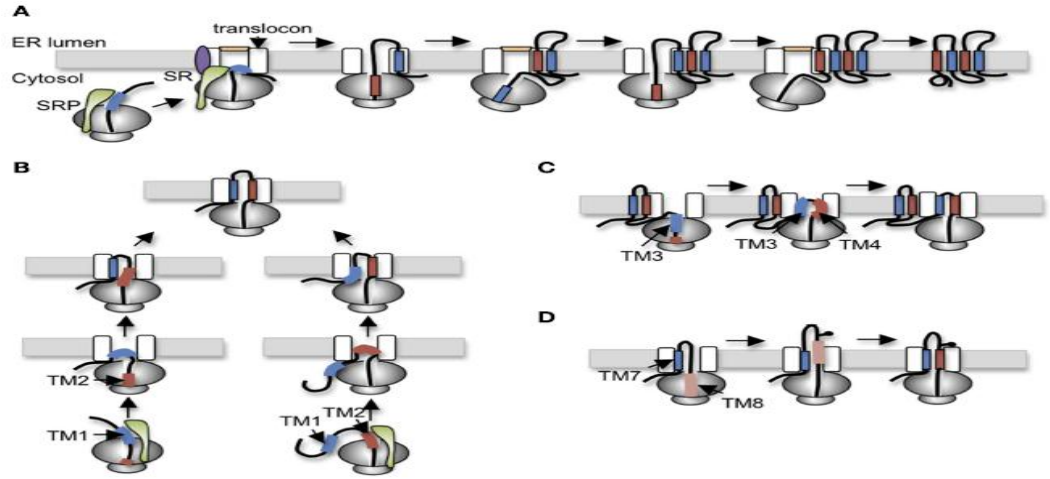
2.3.3 CFTR proteininin katlanma mekanizması

Homoloji modelleriyle, CFTR nin 1-2,9-12 ve 7-8,3-6 TM bölgelerinin iki tane altılı sarmal demet şeklinde, bir iyon ileten gözenek etrafında büküldüğü kompleks domain değiş-tokuş yapısı sergilediği tahmin edilmektedir. NBD1 ve NBD2 için bağlanma alanları oluşturan intraselüler lopların (ICL1-4)

oluşturduğu TM'lerin (Transmembran) sarmal uzantıları sitozol içinde yaklaşık 40 Å 'luk bir açıklık oluşturur.

Şimdiye kadar var olan bilgilere göre, iki NBD arasındaki ara yüzdeki ATP bağlanması ve hidrolizinin, ICL'ler (Intracellular loops) boyunca kanal kapanmalarını kontrol eden MSD'lere (Membran Segment Domain), bir alosterik konformasyonel değişim geçirttiğine inanılmaktadır. Bu yapıya, biyosentetik açıdan bakıldığında, birkaç önemli soru akla gelmektedir. Birincisi CFTR, TM'leri yönlendirildikleri ve endoplamik retikulum (ER) zarına entegre oldukları için uygun topolojisini nasıl elde edebildiği? İkincisi ise, TM'ler MSD kurulumu sırasında nasıl bir etkileşime giriyor? Üçüncü olarak da TM 7-8 ve TM 9-12 transmembran bölgelerinin sentezlenmesi süresince, TM1-2 ve TM3-6 gereken birkaç dakika için geçici olarak nerede bulunur? CFTR MSD'leri zar içinde muhtemelen, çok sayıda polar etkileşimler ağı oluşturan iyonize olabilen kalıntılar (4Arg, 2Lys, 3Glu, 1Asp ve 1His) ihtiva etmektedir. Ancak bu kalıntıların, lipid tabakasındaki TM'lerin entegrasyonunu geciktirdiği veya bozduğu tahmin edilmektedir (Hessa et al., 2005, Chen et al., 2004; Loo et al., 2008).

CFTR katlanması ilk tanımlanabilir özelliklerinden biri, TM'lerin ER zarına yönlendirilmesi ve integrasyonunu içerir. Yapılan çalışmalarla, TM1 ve TM2'nin ribozomdan ortaya çıkması, SRP'yi (Signal Recognition Particules / Sinyal Tanıma Taneciklerini) bağlaması ve iki alternatif katlanma yolunu içeren yeni bir mekanizma ile Sec61 translokona girmesi şeklinde, ER hedeflemesinin gerçekleştiği tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 2.10A) (Carlson et al., 2005, Lu et al., 1998). Dikkat çekici bir nokta ise MSD içindeki iki iyonize olabilen aminoasit, Glu92 ve Lys95'in varlığına bağlı olarak, TM1'in verimli bir SA (Sinyal çapa/Sinyal anchor) aktivitesinden yoksun olmasıdır. Sonuç olarak TM1, oluşmaya başlayan CFTR polipeptitlerinin yalnızca yaklaşık % 25'inde translokasyon başlattığı tespit edilmiş ve, zincirlerin geri kalan % 75'inde ise TM1-2 döngüsünün topolojisi TM2'nin tip I SA (Sinyal çapa/Sinyal anchor) aktivitesi tarafından oluşturulduğu bulunmuştur. Bu durumun, translokon içine TM2'nin yerleşme enerjisi ile ECL1'i (ekstraselüler loop1) ER lümenine çektiğini ve böylece TM1'in tip II topolojisinin kurulduğunu göstermiştir (Bkz. Şekil 2.10B).



Şekil.2.10. Polipeptik protein topolojisinin çeşitleri **(A)** ER hedeflemede en basit kotranslasyonel topogenesis modeli, sinyal tanıma parçacığı (SRP), ortaya çıkan bir sinyal dizisini (TM) tanıdığı anda başlar, ER zarında reseptörünü (SR) bağlar ve RNC'yi (Ribosome-nascent chain complex) Sec61 translokona aktarır. TM topolojisi, ardışık olarak translokon poru açan ve kapayan dönüşümlü sinyal ve durdurma aktarma faaliyetleri vasıtasıyla başlatılır. Ribozom translokon bağlantısının dikkatli bir şekilde düzenlenmesi, çözünabilir alanların sitosol veya ER lümenine ulaşmasını ve TM'lerin iki tabakaya entegrasyonunu sağlar. **(B)** CFTR için, TM1 ve TM2'nin topolojisi, translokasyonun TM1 (sol) veya TM2 (sağ) ile başlatıldığı iki alternatif yolla oluşturulur. Yeni oluşmaya başlayan CFTR zinciri, TM2 takılması ile translokona TM1 sürüklediği bir posttranslasyonel mekanizma kullandı. **(C)** TM3 ve TM4 arasındaki kısa ilmek (beş aminoasitli) TM3 ve TM4'ün aynı anda sarmal bir saç tokası olarak translokona eklendiğini düşündürmektedir. TM5-6, TM9-10 ve TM11-12 için de benzer bir mekanizma önerilmiştir. **(D)** TM8'in stop-transfer aktivitesi, zarı kapsayan topolojiyi almadan önce, ER lümeninde TM8'in geçici olarak maruz kalmasıyla Asp924 tarafından zayıflatılır (Kim and Skach, 2012).

Her iki yolun sonu da aynı olmakla birlikte, TM1, TM2'den sonra topolojiyi elde ettiğinden, basit yol gösterici modelden farklıdır. Böyle bir mekanizma, her iki TM'nin de translokon kanalının içinde ya da ona çok yakın bir yerde eş zamanlı yerleştirildiğini önermiştir. Bu topogenezik mekanizmanın önemli bir etkisinde, TM1'e ilave bir iyonlaşabilir aminoasit yerleşmesiyle sonuçlanan ve CF'ye neden olan G85E ve G91R mutasyonlarının varlığı ile aydınlatılmıştır. Her iki mutant da TM1'in sinyal çapa aktivitesini tamamen bloke eder, buna karşın TM1 domaini, TM2 tarafından membrana hala eklenebilir, çünkü bu durum MSD1 topolojisini etkilemez (Xiong et al., 1997). Bununla birlikte MSD1 doğru topolojiye ulaşılmasına rağmen, G85E ve G91R CFTR katlanmasını ve

fonksiyonelliğini bozmaktadır (Xiong et al., 1997; Patrick et al., 2011). TM1-2 topolojisinin analizi, CFTR'nin farklı bölgelerindeki hastalıkla ilgili mutasyonların ortak bir mekanizma yoluyla katlanmayı bozabileceği, daha yüksek dereceli üçüncül domain-domain etkileşimlerini önleyeceği tahminini ortaya çıkartmıştır (Xiong et al., 1997; Skach, 2000). TM1'e, fazladan bir polar aminoasid eklenmesinin, sarmal demetlerin düzenlenmesini ve bunun ardından sarmal uzantılar ile sitoplamik NBD'ler arasındaki etkileşimleri bozduğu ileri sürülmüştür (Xiong et al., 1997; Skach, 2000). Ayrıca TM3, araya giren hücre dışı döngü olan ECL2 yer değiştirmesi için TM4 ile birlikte çalışan etkisiz bir sinyal dizisini kodlar. ECL2 sadece beş aminoasid içerdiğinden, muhtemelen TM3 ve TM4 ile aynı anda sarmal bir saç tokası şeklinde translokun gözeneklerine yerleşir (Bkz. Şekil 2.9C). Benzer şekilde, sinyal çapa ve stop-transfer diziler olarak işlev gören TM5 ve TM6, yalnızca tek bir yüklü lizin aminoasidiyle ayrılır ve bu durum, topolojinin aynı anda ECL3 olarak ER lümeni içinde translokasyona girmesiyle birlikte kurulduğunu gösterir. Sipiral saç tokası görünümlü TM tarafından eş zamanlı translokasyonun bu özelliği, doğal politopik proteinlerin ortak bir özelliği (Sadlish et al., 2005) ve birbirine çok yakın aralıklı iki TM'nin tek bir fonksiyonel topojenik belirleyici faktör olduğunu, düşündürmektedir. Ayrıca, araştırmacılar, bu gibi belirleyicilerin, topoloji kurmak için translokun ile etkileşim mekanizmasını araştırmışlar. Bu sonuçlara göre, zayıf tip II SA (Sinyal anchor/ Sinyal çapa) (TM1) ve güçlü tip I SA (TM2) aktivitelerinin birlikte hareketleri ile TM1-2 topolojisinin kurulduğu bir model önerilmiştir. Daha sonra TM3-4 ve TM5-6, kısa ECL2 ve ECL3 loplalarının yerini değiştirmek için Sec61'e yerleştirilir. Dikkat çekici çözülmemiş bir soru ise, TM'lerin veya TM çiftlerinin, helikal paketleme sırasında Sec61 veya diğer translokun proteinleri ile birleşmiş kalmaları durumunda, küçük Sec61αβγ gözeneklerinden ikili tabaka içerisinde serbestçe ayrılıp ayrılmadığıdır. Bu soru özellikle TM1-2 ile TM9-12 ve TM3-6 ile TM7-8'in kümелendiği yerde domain yer değiştirmesi ışığında açıklanır. TM1, 2, 3 ve 6'daki iyonize olabilen aminoasid yaygınlığı göz önüne alındığında, nihai montaj, muhtemelen, çift katlı lipid tabakaya tam entegrasyon öncesinde, TM'lerin kesin olarak hizalanmasını zorunlu kılar. TM6 translokasyonu sonlandırdığında, NBD1 kotranslasyonel olarak ribozomdan sitoplazmaya geçer. CFTR'nin birkaç özelliği, bu işlem sırasında ribozomun sitoplazmik alanların katlanmasına izin vermek için, geçici olarak Sec61'den ayrıldığı düşüncesini akla getirmektedir. CFTR TMD1

sarmalarının membrandan 40-50 Å uzadığı tahmin edilmektedir. Bu uzantılar, TMD2 sentezinden önce NBD1 için bir ön yerleştirme yeri sağlamaktadır (Xiong et al., 1997; Kleizen et al., 2005; Du and Lukacs, 2009). Bu nedenle, NBD1 bağlı ilave TMD uzantısı, zar yüzeyinden yaklaşık 80 Å uzatır.

2.3.4 CFTR TMD2 topolojisi ve katlanmasının yeni mekanizmaları

Düzenleyici (R regulatory) bölge sentezinin tamamlanmasından sonra, TMD2 topolojisi, dönüşümlü sinyal (TM7,9 ve 11) ve stop-transfer (TM8, 10 ve 12) sekansları ile kotranslasyonel bir tarzda oluşturulur. TM7'den 31 aminoasitle ayrılan TM8, translokasyonu sonlandırır ve sitoplazmada ICL3'ü yeniden yönlendirir. İlginç olan şudur ki TM8, TM7 ile eşlendiğinde, etkin bir stop-transfer olarak işlev görür, ancak tersi bir durumda bu durum söz konusu değildir (Carveth et al., 2002; Enquist et al., 2009). TM7 ya TM8'in translokondaki stop transfer aktivitesini etkiler yada TM7'nin, ribozom çıkış tüneline TM8'in tanınmasını etkilediğini düşündürmektedir. Geri kalan TM9-10 ve TM11-12, her biri sinyal çapa dizilerini ve kısa hücre dışı döngüleri olan stop transfer dizilerini kodlar ve muhtemelen TM3-4 ve TM5-6'daki gibi sarmal döngüler olarak translokon içerisine girerler (Carveth et al., 2002). TMD2, birkaç olağandışı katlanma davranışı sergiler. N-bağlantılı glikosilasyon alanlarının, oligo sakkaril transferaz (OST)'a erişilebilmesi için lipid tabakasından en az 12-14 aminoasit uzakta olması gerekmektedir. (Popov et al., 1997; Nilsson and von Heijne, 2000). Buna karşın, CF ye neden olan T908N mutasyonu, TM8'in öngörülen N terminal bölgesinden sadece dört aminoasidlik mesafede meydana gelmesine rağmen, OST tarafından tanınan bir glikosilasyon bölgesi oluşturur. Eğer membran sınırları, homoloji modelleri ile doğru bir şekilde tahmin edilmiş ise, bu bulgu TM8'in CFTR sentezi sırasında geçici olarak ER lümenine kadar uzandığını ve daha sonra katlanma ve sarmal paketlenme sırasında zar içerisinde yeniden konumlandırıldığını ortaya koymaktadır (Hammerle et al, 2000; Carveth et al, 2002) (Bkz. Şekil.2D). Bu davranış, sentez sırasında TM8'i tanımayan translokon bileşenleri ile değiştirilmiş etkileşimlere, yada TM8 sarmal oluşumunun değiştirilmiş zamanlamasına veya her ikisine neden olabilir. İlginç bir şekilde, TM8'den bir aspartat amino asidinin uzaklaştırılması (D924V), geçici olarak

lümene maruz kalmayı önler ve aynı zamanda bağımlı stop transfer aktivitesi sağlar.

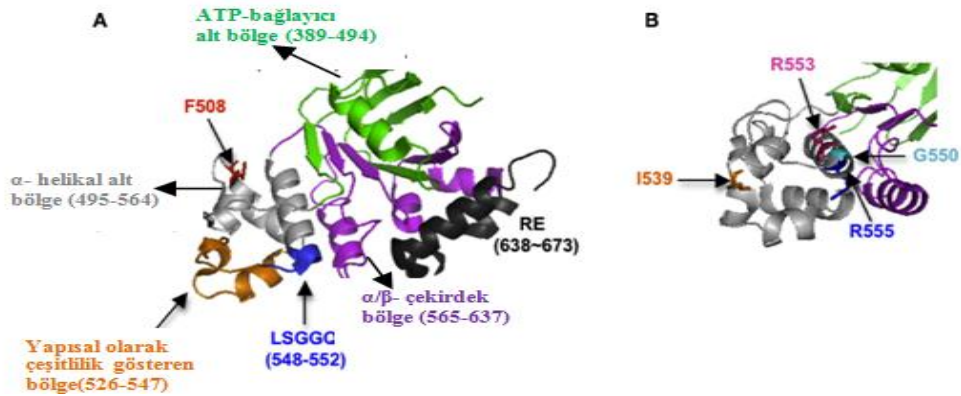
Özetle, CFTR'nin TMD biyogenezi, alternatif ko ve post translasyonel translokasyon yolları (TM1-2), helikal döngülerin yerleşim uyumu (TM3-4, TM5-6, TM9-10, TM11 -12), topojenik belirleyici fonksiyon (TM7-8) için eş güdüm ve ER zarı içinde düzenlenmiş entegrasyon gibi dönüşümlü topogenesis modelinden sapma gösteren çoklu mekanizmaları kullanır. Bu belirgin translokasyon mekanizmalarının altında yatan nedenler yeni anlaşılmaya başlanmıştır. Ortaya çıkan yeni kanıtlar, farklı katlanma yollarının işlevsel etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Örneğin, TM1'deki (E92A ve K95A) iyonlaşabilir aminoasitlerin değişmesi, TM1'i güçlü bir sinyal çapa (anchor) dizisine çevirir, böylece kotranslasyonel topogenezi destekler, ancak CFTR işlevini bozar (Lu et al, 1998; Patrick et al., 2011). Benzer şekilde, D924V mutasyonu TM8'i güçlü bir stop transfer dizisine dönüştürür ve translasyonel membran entegrasyonunu kolaylaştırır, ancak CFTR klorür iletkenliğini azaltır.

2.3.5 CFTR Sitoplazmik Domain Katlanması ve $\Delta F508$ Eksikliği

Yapılan çalışmalara göre, uygun domain eşleşmesi için CFTR'nin her bir domaininin doğru bir şekilde katlanmasının gerekli olduğu ve karşılıklı olarak uygun domain yerleştirmesinin domain katlanmasını etkilediği bilinmektedir. (Qu and Tomas, 1996; Younger et al., 2006; Loo et al., 2008; Du and Lukacs, 2009; Thibodeau et al., 2010). $\Delta F508$ mutasyonu NBD1 in katlanmasını ve mekanizmalarını bozmaktadır. Bu durum CFTR katlanması ve mekanizmalarının aydınlatılmasında araştırmacılar tarafından yoğun bir şekilde çalışılmıştır.

NBD1 üç tane alt bölgenin birleşmesinden oluşur: N-terminal alt bölgesi ATP bağlayıcı alan (aminoasit 389-494) içerir (Khushoo et al., 2011), α helikal alt bölgesi Phe 508 'i içerir ve merkez α/β çekirdek alt bölgesi ise F1 tip ATPaz'a benzer altı iplikten meydana gelen, paralel β tabakasından oluşur (Şekil 2.10). NBD1 ayrıca LSGGQ imza motifi (aminoasit 548-552), yapılandırılmamış düzenleyici ekleme bölgesi (aminoasit 404-436), yapısal olarak farklı bölge (aminoasit 526-547), ve C – terminal düzenleyici uzantı (RE, aminoasit 638-

673) bölgelerini içerir (Şekil 2.11A). CFTR katlanması üzerindeki derin etkisine bakıldığında, başlangıçta $\Delta F508$ mutasyonunun NBD1 kristal yapısı üzerinde çok az etkisi olduğu şaşırtıcıydı (Lewis ve diğ., 2004, 2005). Ancak yapılan son çalışmalar, $\Delta F508$ 'in, NBD1'in hem kinetik hem de termo dinamik stabilitesini önemli derecede bozduğu gibi, 507-511 aminoasid aralığında bölgesel omurganın dinamiklerini de önemli derecede bozduğu gösterilmiştir (Hoelen et al, 2010; Lewis et al., 2010; Wang et al., 2010; Rabeh et al., 2012). $\Delta F508$ ' den kaynaklanan spesifik katlanma kusurunun bir kısmı α helikal alt bölgesinde (Hoelen et al., 2010; Wang et al., 2010) bir kısımda C-terminal S9 ve S10 β -iplikleri içindedir (Hudson et al., 2012). $\Delta F508$, aynı zamanda kanal geçidi ve trafiği için gerekli olan NBD1 ve TMD2 arasındaki hidrofobik teması ortadan kaldırır (Serohijos et al., 2008). NBD1 çözünürlüğünü veya termodinamik stabiliteyi (I539T, G550E, R553Q ve diğerleri) artıran veya omurga esnekliğini azaltan bu mutasyonlar, hem NBD1 katlanma verimliliğini hem de tam uzunluktaki WT (wild type) ve $\Delta F508$ mutantı olan CFTR'nin de etkinliğini artırabilmektedir (Teem et al., 1993; De Carvalho et al., 2002; Pissarra et al., 2008; Hoelen et al., 2010) (Şekil 2.11 B).



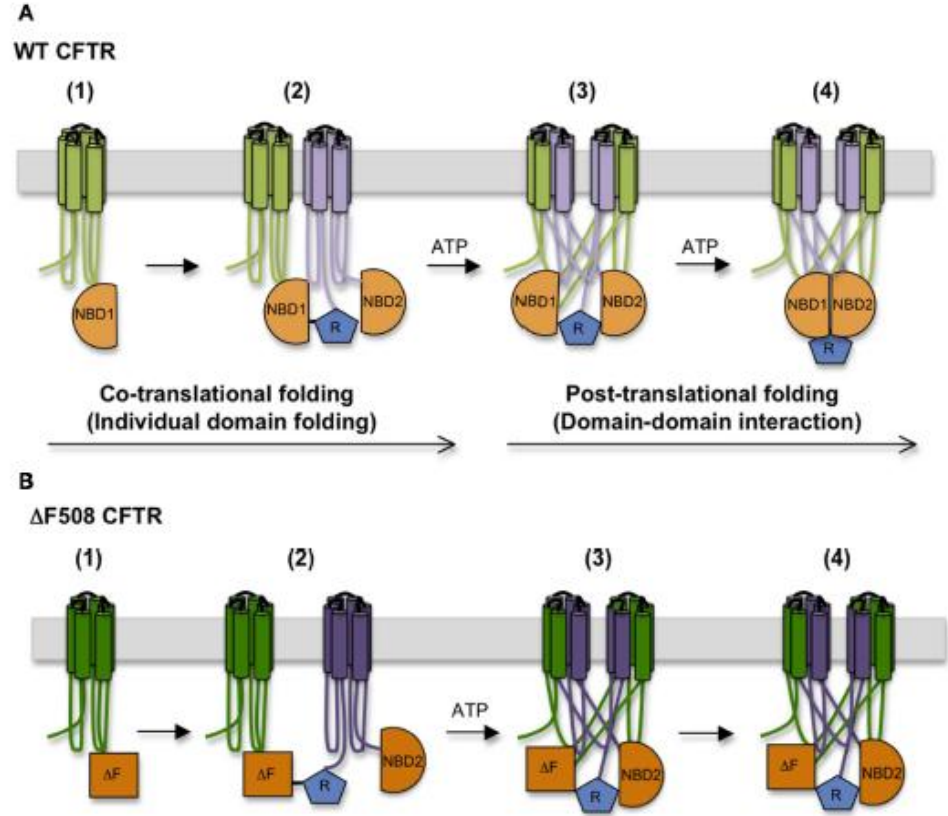
Şekil 2.11. (A) NBD1'in kristal yapısındaki alt domain ve kritik bölgelerin organizasyonu. (B) NBD1 domaini içindeki baskılayıcı mutasyonların lokalizasyonları (Kim and Skach, 2012).

ICL4 ve NBD1 içindeki mutasyonlar NBD1 ve TMD2 etkilişimini yeniden düzenlemekle birlikte, endoplazmik retikulum'dan dışarı salınımı ve klor kanal fonksiyonununuda geliştirir (Serohijos et al., 2008; He et al., 2010; Loo et al., 2010; Thibodeau et al., 2010; Aleksandrov et al., 2012). Ancak, hem NBD1

TMD2 ara yüzünün hem de NBD1'in termodinamik stabilitesinin düzeltilmesi, mutant $\Delta F508$ fonksiyonu'nun WT (wild type) seviyelere yakın olmasını sağlamak için gereklidir. Bu nedenle CF'deki temel hedeflerden biri, bu katlanma adımlarının her ikisinde de rol oynayan küçük moleküllerin tanımlanması yapmak ve CF hastalarındaki kanal işlevini arttırmaktır (Mendoza et al., 2012; Rabeh et al., 2012).

2.3.6 CFTR domain –domain birleşmesi

CFTR'nin ER'den çıkması için gereken zamana bağlı olarak, CFTR alan birleştirme işlemi 30-120 dakika sürer. Bu, alan katlamasının eş-dönüşümlü (co-translasyonel) olarak başladığı ve bunu alan-alan kontaklarıyla post-translasyonel olarak oluşturduğu hiyerarşik bir süreç olduğu önerilmektedir (Ostedgaard et al., 1997; Du et al., 2005; Cui et al., 2007) (Şekil 2.12). Bu süre zarfında CFTR, ATP gerektiren en az iki farklı katlanma olayına maruz kalır. Birincisi, Sec61 translokon kompleks (RTC) ve hücrel şaperonları ihtiva eden büyük bir biyosentetik kompleksten tam uzunluktaki CFTR salınımını içerir diğer ifadeyle CFTR'nin ER zarının iki katmanına entegrasyonu görülür (Meacham et al., 1999; Oberdorf et al., 2005). Hem wild type/ yabani tip (WT) hem de mutant $\Delta F508$ CFTR, bu adımı eşit verimlilikle gerçekleştirir (Oberdorf et al., 2005). Bu adımlarda ATP hidrolizinin membran entegrasyonunu nasıl kolaylaştırdığı bilinmemekle birlikte bilinen, translokon bileşenleri ATP'yi hidroliz etmemektedir. İkinci olgunlaşma aşaması ise, olgunlaşmamış ve tam katlanmamış CFTR'nin (tipik olarak band B olarak adlandırılan) ve ER ilişkili bir konformasyondan çıkarak, golgi işlemine tabi olgun Band C formuna uygun olan katlanmış bir dönüştürmeyi içerir. Er'den golgiye uzanan bu katlanma dönüşümlerine aynı zamanda sitozolik şaperonlarda dahil olmaktadır (Lukacs et al., 1994).



Şekil 2.12. (A) CFTR ko-translasyonel katlanması ve post-translasyonel katlanması. (B) ΔF508 mutasyonu, NBD1 yapısını destabilize eder, TMD1, TMD2 ve NBD2 katlanmasına müdahale eder ve NBD1 ve ICL4 arasındaki etkileşimi bozarak domain-domain birleşmesini zorlaştırır (Kim and Skach, 2012).

2.4 Post Translasyonel Modifikasyon (PTM)

Proteinlerin yapısal ve işlevsel özelliklerini kazanması için translasyon aşamasında ya da translasyon bittikten sonra bazı modifikasyonlara uğraması gerekmektedir. Polipeptidin sentezi fonksiyonel proteinin üretimine eşdeğer değildir. Proteinlerin kullanılabilir hale gelmesi için polipeptidin son üç boyutlu konformasyonuna katlanması ve birçok durumda da, fonksiyonel kompleksi oluşturmak üzere polipeptid zincirlerinin bir araya gelmeleri gerekir. Bu tip modifikasyonlar arasında örnek olarak fosfat ve metil gibi küçük moleküllerin ya da karbonhidrat ve lipid gibi büyük ve karmaşık moleküllerin kovalent olarak bağlanması sayılabilir.

PTM işlemleri hücrenin farklı organellerinde (örneğin çekirdek, sitoplazma, golgi vs.) gerçekleşebilir. PTM farklı hücresel işlemlerde farklı amaçlarda kullanılır. Bunlar arasında en bilinenleri enzim regülasyonu, proteinlerin hücre içi lokalizasyonu, protein-protein etkileşimi, hücre içi sinyal iletimi ve (hücre bölünmesi sayılabilir. PTM'ler arasında fosfat, metil ve hidroksil gibi kimyasal grupların eklenmesi, lipid ve şeker gibi daha kompleks grupların eklenmesi ve ubiquitin gibi küçük peptidlerin eklenmesi sayılabilir.

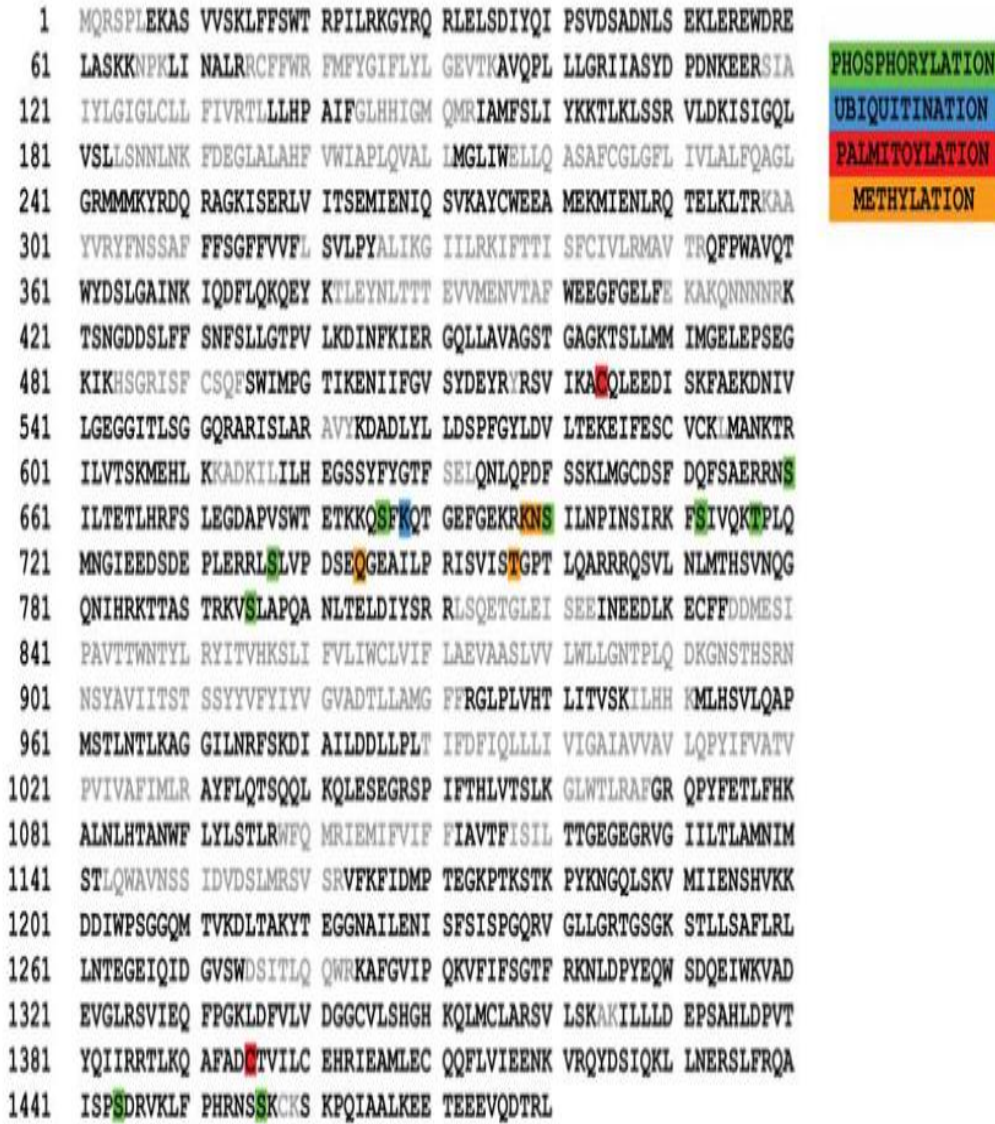
Kistik fibrozis, klorür ve bikarbonatın taşınmasından sorumlu bir iyon kanalı olan kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyicisinin (CFTR) mutasyonlarının neden olduğu bir hastalıktır. CFTR'nin ifadesi, akciğerler, bağırsak yolları, pankreaslar, karaciğer, ter bezleri ve vas deferens gibi çok sayıda ekzokrin dokunun düzgün işleyişi için kritik öneme sahiptir. Hastalığa neden olan en yaygın mutasyon, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Avrupa'da klinik CF'nin % 90 oranında bulunan mutasyon 508 konumundaki fenilalaninin (F508del) silinmesidir. Yabani tip (normal) CFTR, endoplazmik retikulumda N-glikozilasyona uğrar ve daha sonra kompleks glikan eklenmesinin meydana geldiği golgi aygıtı tarafından işlenir. Plazma membranında yapılan işlemlerinden sonra, tamamen glikozile edilmiş kanal proteini, endozomlar tarafından tanınır ve daha sonra hücre yüzeyine geri gönderilir veya lizozomal proteoliz için hedef haline getirilir (Glozman et al.,2009; Sharma et al., 2004). F508del mutasyonuna sahip CFTR ise ER'de yanlış katlanmış olarak kabul edilir ve ubiquitin-proteazom sistemi yoluyla ER'ye bağlı bozunma için kenetlenir (Sharma et al.,2004; Gelman et al.,2002). Bu işleme kusuru, düşük sıcaklıkta (~ 27 ° C) epitel hücrelerinin büyümesi veya F508del CFTR yüzey lokalizasyonu ile sonuçlanan küçük molekül düzelticiler ile muamele ile kısmen aşılr. ER ile ilişkili parçalanma ve trafik akışından hücre yüzeyine kaçan yanlış katlanmış CFTR, proteini hızla tanınır ve parçalanma için ubiquitin ile işaretlenmiş olmasına rağmen kısmi işlevini bir iyon taşıyıcı olarak korur ve böylece periferik yarılanma ömründe azalma meydana gelir (Sharma et al., 2004; Swiatecka et al., 2005; Lukacs et al., 1993).

Glikosilasyon ve fosforilasyon gibi kovalent modifikasyonlar, CFTR gibi membran proteinlerinin doğru biyogenezi ve fonksiyonu için çok önemlidir. Örneğin, N-glikosilasyon, CFTR'nin yüzey kararlılığını artırır (Glozman et

al.,2009; Chang et al., 2008). CFTR kanal kapısı, dimer ara yüzünde ATP bağlanması ve hidrolizi takiben NBD1-NBD2 (nükleotid bağlanma alanı) heterodimerizasyonunu teşvik etmek için PKA'ya bağlı fosforilasyonu kullanır (Mens et al., 2006; Cheng et al., 1991). Öte yandan CFTR düzenleyici alanındaki (Regulatör domain) spesifik serinlerde fosforilasyon kanal aktivitesini inhibe eder ve bu aminoasidlerin alanin ile ikame edilmesi, kanal iletkenliğini artırır (Wilkinson et al., 1997). CFTR'nin tüm bu kovalent modifikasyonları terapötik öneme sahip olabilir. Örneğin, düzenleyici alanın fosforilasyonunu arttırarak mutant CFTR aktivitesini arttıran küçük molekül güçlendiriciler tanımlanmıştır (Pyle et al., 2011).

Kütle spektrometrisi kullanarak yeni bir CFTR post-translasyonel modifikasyonu (PTM), olan S-palmitolasyon noktası tespit edildi (Bkz. Şekil 2.13) (McClure et al., 2012). PTM, sülfhidril gruplarındaki tiyoester bağlantısı yoluyla sistein aminoasidine, bir 16 karbonlu doymuş yağ asidi olan palmitatın kovalent bağlanması ile karakterize edildi. Diğer lipidasyon türlerinden farklı olarak, tiyoester ile bağlı palmitat modifikasyonu, proteinlerin S palmitolasyon ve depalmitilasyonun düzenlenmiş sikluslarından geçmesine izin vererek hızla geri döndürülebilir (Zhang et al., 2010; Resh et al., 2006). Çözünür substratlar için, palmitatın tutturulması, tipik olarak membrana birleşmesini teşvik eder ve çoğunlukla N miristoylasyon veya prenilasyon ile birlikte oluşur (Lin et al., 2009; Abrami et al., 2008; Qanbar et al., 2003)

Membran proteinlerinin palmitolasyonu, transmembran yönelimini değiştirerek protein protein etkileşimini düzenler, diğer yan zincir eklerini kontrol eder veya çeşitli hücresel bölmelere göre sıralama için bir sinyal görevi görür (Kinlough et al., 2006). Özellikle, protein lokalizasyonu, maturasyonel işleme ve çok sayıda iyon kanalı ve ABC taşıyıcı proteinlerinin işlevi bu şekilde düzenlenir.



Şekil 2.13. CFTR aminoasid dizileri içerisindeki post translayonel modifikasyon (PTM) bölgeleri (Michelle, 2011).

2.4.1 CFTR'nin biyogenezi ve hücre içi trafiği

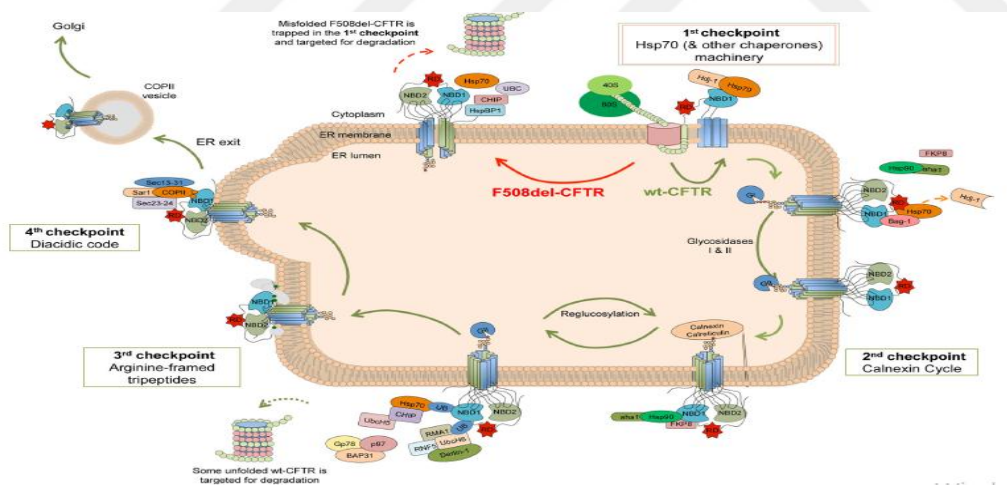
CFTR'nin biyogenezi, sinyal tanıma parçacığı yoluyla sinyal tanıma parçacığı reseptörü aracılığıyla ER membran translokunun (Sec61 kompleksi) hedeflenmesiyle, sitozolik ribozomlardan başlar. Ribozomdan ortaya çıkan CFTR polipeptit zinciri, translokondan sinyal transfer ve stop- transfer sinyallerinin sıralı ve koordineli hareketi yoluyla kotranslasyonel olarak ER'ye sokulur (Skach, 2000). ER lümenine çıkan yeni sentezlenen CFTR polipeptid zinciri, ER membrana yerleştirildikten hemen sonra, ister doğal isterse mutant (F508del) CFTR proteinini

,ICL4 de bulunan Asn894 ve Asn900'da bölgeleri üzerinde çekirdek-glikozilasyonuna uğrar. N-glikosilasyon, katlanma, ayırma ve hücre içi trafik gibi hücre içi süreçlerde önemli bir rol oynar. Genellikle bu oligosakaritler, hücrenin dışında, stabilizatörler olarak, yapışma ve bağışıklık tepki modülasyonunda, tanıma hedefleri olarak etki ederek görürler (Caremelo and Parodi, 2007). Bununla birlikte, glikozilasyon ER'de, salgı yoluna yönlendirilen proteinlerin katlanabilme durumunu değerlendiren kalite kontrol sürecinde önemli bir rol oynar. ER'de glikozilasyon, CFTR'nin lektin / şaperon kalneksin (calnexin) tarafından katlanmayı değerlendirmek için kullanılan (b bandı da denilen) proteinin glikosile edilmiş (olgunlaşmamış) formunu oluşturur. ER'da, doğal tipteki CFTR trafik işlemleri, golgi kompleksi vasıtasıyla gerçekleştirilir, burada çoklu golgi glikosiltransferazları tarafından işlenir ve tamamen olgun formda CFTR (aynı zamanda bant C olarak adlandırılır) oluşturulur (Cheng et al., 1990).

Yeni yapılan çalışmalar, iki yakın glikozilasyon bölgesinin çıkarılmasının translasyon sonrası üretken katlama işlemini durdurduğunu ve bu da mannozidaz ile yönlendirilen ER'ye bağlı parçalanma yolundan parçalanmaya maruz kalmış terminal olarak yanlış katlanmış mutantlarla sonuçlandığını ortaya koymuştur (Cioaca et al., 2011).

En sık görülen mutant protein olan F508del-CFTR, hatalı katlanma nedeniyle ER'de hemen hemen tamamen tutulur ve buradan ubiquitin-proteazom (UPP) yoluyla bozunur. ER' deki bu kontrol mekanizmasına ER kalite kontrolü kısaca 'ERQC' adı verilir (Vashist et al., 2004). ERQC üzerinde çok sayıda araştırmadan elde edilen büyük miktarda veriye rağmen, yerel bir protein konformasyonunun yanlışlıkla katlanmış bir protein konformasyondan nasıl ayırt edildiği hala netlik kazanabilmiş değildir. Bununla birlikte, proteinlerin katlanabilme durumunun hem birincil sekansı tarafından belirlenen iç yapısal motiflere ('protein otonom') hem de hücresel çevrede bulunan moleküler şaperonlar gibi ekstrinsik faktörlere ('protein-otonom olmayan') bağlı olduğu kabul edilmektedir (Amaral et al., 2013). Hsc70 / Hsp70 ve Hsp90 içeren şaperon kompleksleri iki temel sitozolik katlanma mekanizması olup yapılan çalışmalarda her iki şaperonunda CFTR'nin katlanmasına katıldığı bulunmuştur (Farinha et al., 2002; Zhang et al., 2001). Hsp70 normal ve F508del mutantı CFTR'nin ' ayırımını

yapan önemli bir şaperondur. Son veriler, F508del mutan t ı olan CFTR'nin, şaperon tuzağı olarak adlandırılan çekirdek ısı-şok proteinleri (Hsp40, Hsp70 ve Hsp90) ile stokiometrik ilişkide durgun katlanma aracı olarak mevcut olduğunu göstermiştir(Coopinger et al., 2012). İzole edilen mutant F508del- NBD1'i Hsc70'i, normal CFTR'nin NBD1'ine göre daha yüksek afinite ile bağladığı ve Hsp70'in -NBD1'e bağlanma afinitesinin ATP veya ADP ile azaltılabileceği bulunmuştur. Bununla birlikte, bu nükleotidler, mutant F508del-NBD1 ve doğal tip CFTR-NBD1 için Hsp70-bağlayıcı afiniteleri arasındaki farkı arttırmasına karşın küçük moleküllu CFTR düzelticileri, onu azaltabilir(Scot-Ward et al., 2009). Bu ve diğer bulgular, CFTR' nin ERQC'si için iki önemli kontrol noktasını tanımlayan daha önceki modeli tam olarak desteklemektedir. Bu modele göre, normal tip CFTR, Hsc70 aracılı ilk ERQC noktasından geçer, buna karşın F508del mutan t ı olan CFTR, kinetik olarak buraya sıkışır, çünkü mutant proteinin sentezlenen polipeptit zinciri, doğal yapıyı kazanamadığı için Hsp / Hsc70 mutant proteindeki hidrofobik kalıntılarını tanır ve kuvvetle bağlar (Farinha et al., 2005)(Şekil 2.14).



Şekil 2.14. CFTR'nin ER kalite kontrolü (ERQC) için kontrol noktaları.. İlk kontrol noktasında,

Hsc70 ve Hsp70, yeni ortaya çıkan CFTR'nin sitozolik alanlarıyla etkileşime girer, bu nokta F508del CFTR'yi tutmanın ve atmanın ana mekanizmasıdır. İkinci kontrol noktasında, normal tip CFTR, N-glikosil artıkları ile calnexin'in etkileşimi yoluyla katlanır yolak boyunca ilerler. Başarılı bir katlama yapıldığında, CFTR, hem salgı yolunda üçüncü kontrol noktası (AFTler gibi), hemde dördüncü kontrol noktası (di- asidik çıkış kodu/DAD gibi) içeren adımlarda ilerleyerek ER'den çıkar (Farinha, and Canato, 2017).

Phe508, NBD1'in dış yüzeyinde yerleşmiş bulunmasına karşın NBD1 domainindeki yüzey üzerinde büyük bir etki yaratmaz (Levis et al., 2005) Ancak tam uzunluktaki CFTR modelleme verilerindeki kanıtlara göre, katlama işlemlerinde, domain-domain etkileşimleri sırasında Phe 508 NBD1 üzerinde, kritik temas noktası oluşturmaktadır (Serohijos et al., 2008; Thibodeu et al., 2010). Yeni oluşan normal tip CFTR ile Hsc70-Hdj-2 komplekslerinin oluşumu RD'nin ekspresyonundan sonra büyük ölçüde azaltılır, Hdj2 / Hsc70 ile katalize edilen intramoleküler NBD1-RD etkileşiminin CFTR katlanma yolunda kritik bir adım olduğunu ve bu durumun F508del-CFTR'nin biyogenezinde bozuk olduğunu düşündürmektedir (Meacham et al., 2001). İkinci ERQC kontrol noktası (Bkz. Şekil 2), CFTR'nin çekirdek glikosilasyonunu ve kalneksin döngüsünü içerir (Hammond and Helenius, 1995). Çoğunlukla Hsp70 katlama kontrol noktasında UPP (ubikitin-proteazom)bozunması için muhafaza edilen F508del-CFTR'nin aksine, normal tip CFTR, bu döngü boyunca katlanma yolunda ilerlemekte olup, bu aşamada sırasıyla, deglikosilasyon, reglukosilasyon ve ER zar şaperon / lektin kalneksin kompleksine tekrar bağlanır (Farinha et al., 2005). Bu modele göre, katlanma formasyonuna geçemeyen bazı normal-tip CFTR ve ilk ERQC noktasında degradasyondan kaçan küçük bir miktar F508del- CFTR, ikinci kontrol noktada (kalneksin-bağlı) proleotik glican-aracılı endoplazmik retikulum ilişkili degradasyona uğrar.

Üçüncü bir ERQC kontrol noktası ise CFTR'nin ER çıkış yerlerinde oluşan kaplama proteini (COPII) kaplı veziküller yoluyla Golgi'ye nakledildiğinde oluşur (Roxo-Rosa et al., 2006). Bu noktada, yanlış katlanmış F508del-CFTR, ER tutma motifleri olan dört arginin çerçeveli (RXR) tripeptidlere (Arginine Framed Tripeptides /AFT) maruz kalmasından dolayı ER'den çıkamaz. Bu motifler, N-terminal kuyruğuda (Arg29-GlnArg31), NBD1'de (Arg516TyrArg518 ve Arg553Ala Arg555) ve RD'de (Arg764ArgArg766) bu dört motife sahiptir. F508del-CFTR, bu tür motiflerin ortaya çıkması nedeniyle ER'den çıkamıyor (Roxo-Rosa et al., 2006; Chang et al., 1999). Aslında, F508del-CFTR'deki dört AFT'nin eşzamanlı mutasyonunun, 29, 516, 555 ve 76 konumlarındaki Arg yerine lisin gelmesiyle (yani F508del-R29K-R516K-R555K-R766K-CFTR, yada kısaca F508del-4RK-CFTR), F508del-CFTR, ERQC'den kaçışını hızlandırdığı bildirilmiştir. Mutant F508 del CFTR'in kontrol noktasından kaçışı işlemi aslında

F508 del CFTR katlanmasını düzeltilmesi anlamına gelmez, sadece kontrol noktasının üstesinden gelme anlamı taşımaktadır. CFTR, ER çıkış bölgelerindeki kaplama proteini (COP) II kaplı veziküller içine paketlenildiğinde dördüncü bir kontrol noktası mevcut. Bu süreç, NBD1'de bulunan di-asidik çıkış kodunu (Asp565AlaAsp567-DAD) içeren özel bir çıkış motifine dayanıyor. DAD olarak bilinen bu motif NBD1'de yer alır (Bkz Şekil 2.14). Bu motif, Sec24 aracılı COPII paketlenmesi için gerekli ve bu kodun bozulması hem Sec24 CFTR birlikteliğini hem de ER'den çıkışı azaltır (Nishimura and Balch, 1997). Bu motif içindeki, ikinci Asp kalıntısının alanin ile yer değiştirmesi CFTR katlanmasını etkilemediği, ancak Sec24 ile ilişkisini azalttığı ve ER'den çıktığı gösterilmiştir (Wang et al., 2004). Bununla birlikte, her iki Asp artıklarının eş zamanlı mutasyonu CFTR işlemini tamamen ortadan kaldırdığı bildirilmiştir.

CFTR'nin ER çıkış yerlerinde oluşan kaplama proteini (COPII) kaplı veziküller yoluyla Golgi'ye nakledildiğinde oluşur (Roxo-Rosa et al., 2006). Bu noktada, yanlış katlanmış F508del-CFTR, ER tutma motifleri olan dört arginin çerçeveli (RXR) tripeptidlere (Arginine Framed Tripeptides /AFT) maruz kalmasından dolayı ER'den çıkamaz. Bu motifler, N-terminal kuyruğuda (Arg29-Gln30-Arg31), NBD1'de (Arg516-Tyr517-Arg518 ve Arg553-Ala554-Arg555) ve RD'de (Arg764-Arg765-Arg766) bu dört motife sahiptir. F508del-CFTR, bu motiflerden dolayı ER'den çıkamaz (Roxo-Rosa et al., 2006; Chang et al., 1999). Aslında, F508del-CFTR'deki dört AFT'nin eşzamanlı mutasyonunun, 29, 516, 555 ve 76 konumlarındaki Arg yerine lizin gelmesiyle (yani F508del-R29K-R516K-R555K-R766K-CFTR, yada kısaca F508del-4RK-CFTR), F508del-CFTR, ERQC'den kaçışını hızlandırdığı bildirilmiştir. Mutant F508 del CFTR'in kontrol noktasından kaçışı işlemi aslında F508 del CFTR katlanmasını düzeltilmesi anlamına gelmez, sadece kontrol noktasının üstesinden gelme anlamı taşımaktadır. CFTR, ER çıkış bölgelerindeki kaplama proteini (COP II) kaplı veziküller içine paketlenildiğinde dördüncü bir kontrol noktası mevcut. Bu süreç ise NBD1'de bulunan di-asidik çıkış kodunu (DAD) (Asp565-Ala566-Asp567) içeren özel bir çıkış motifine dayanıyor. DAD olarak bilinen bu motif NBD1'de yer alır. Bu motif, Sec24 aracılı COPII paketlenmesi için gerekli ve bu kodun bozulması hem Sec24-CFTR birlikteliğini hem de ER'den çıkışı azaltır (Nishimura and Balch, 1997). Bu motif içindeki, ikinci Asp kalıntısının alanin ile

yer değiştirmesi CFTR katlanmasını etkilemediği, ancak Sec24 ile ilişkisini azalttığı ve ER'den çıktığı gözlenmiştir (Wang et al., 2004). Buna karşın, her iki Asp artıklarının eş zamanlı mutasyonu CFTR işlemini tamamen ortadan kaldırdığı bildirilmiştir. Dört kontrol noktasından sonra, CFTR, Sar1 GTPase ve heterodimerik Sec23-24 ve Sec13-31 kompleksleri gibi genel trafik mekanizma proteinlerini içeren bir süreç ile Golgi yoluyla COPII vesiküllerine doldurulur.

2.5 CFTR Genindeki Mutasyonlar ve Fenotip ile İlişkisi

CFTR proteinin işlevselliği ve doğru çalışabilirliği CF genindeki mutasyonlarının gen üzerindeki yerine ve anlamlı olmasına bağlı olarak değişebilmektedir. CFTR proteininin işlevselliğine göre mutasyonlar, altı ana grupta toplanmıştır (Bkz. şekil 2.15)(Sheppard et al.,1993; Zielenski et al., 2000).

I.Grup mutasyonlar: CFTR geninde meydana gelen, insersiyon/delesyonlar soncunda çerçeve kayması mutasyonları oluşabilir veya çerçeve içinde tek nükleotid değişimleri gözlenebilir, bu durum CFTR geninde erken stop kodon (prematüre stop kodon) oluşmasına neden olur. Bunun sonucu olarak, klor kanal aktivitesini tamamen kaybetmiş yada kısmen aktivite gösteren CFTR proteini oluşur. p.Gly542X, p.Arg553X, p.Trp1282X ve bir çerçeve kayması mutasyonu (p.Phe316LeufsX12) sınıf I mutasyonlarına örnek verilebilir (Maquat, 1995). Bu sınıfta en sık görülen CF hastalarının yaklaşık %4 ünde, en az bir alleli etkileyen mutasyon ise p.Gly542X mutasyonudur. Diğer mutasyonlar, ise belirli populasyonlarda daha yüksek bir frekansa sahiptir. Örneğin İsrail'deki Ashkenazi Yahudilerindeki allellerin %48'inde p.Trp1282X mutasyonu görülürken, Fransız Reunion Adası'nda p.Tyr122X taşıyıcı oranı yaklaşık % 24'tür (Dugueperoux et al., 2004, Shoshani et al., 1992).

II. Grup mutasyonlar: Bu grupta yer alan mutasyonlar CFTR proteininin yanlış katlanmasına neden olurlar ve CFTR proteini, membranın apikal yüzeyine ulaşamadığı için klor kanalları oluşamamaktadır. Yanlış katlanan CFTR sentezlendikten sonra hücre içindeki trafiğinin bozulmasına neden olurlar. Yanlış katlanmış CFTR proteini geriye çağrılır ve E.R'da Ubikuitin/proteozomlar tarafından parçalanır. p.Phe508del, p.Ile507del, p.Asn1303Lys sınıf II

mutasyonlara örnektir. Bu sınıfın en sık rastlanan mutasyonu p.Phe508del NBD1 domaininde meydana gelir ve NBD1 ile dördüncü stoplazmik halka (ICL4) arasındaki etkileşimi değiştirir ve bunun sonucunda NBD'1 de enerjik ve kinetik karasızlık oluşur (Protasevich et al., 2010, Cui et al., 2007, He et al., 2010).

III. Grup mutasyonlar: Bu grupta yer alan mutasyonlar sıklıkla CFTR proteininin ATP bağlanma alanlarında (NBD1 ve NBD2) bulunur ve kapı mutasyonları olarak bilinirler. Üretilen protein normal seviyelerde membrana etkili bir şekilde yerleşir, ancak ATP bağlanma bölgelerinde oluşan mutasyonlar protein kinaz A (PKA) ile aktivasyona direnç gösterilmesine neden olur. Böylece proteinin kanal açıklığı değişir. Bu grup mutasyonların başında p.Gly551 Asp ve p.Gly970Arg gelir. P.Gly 551 Asp normal CFTR proteinin kanal açıklığına göre yaklaşık 100 kat daha dar kanal açıklığının oluşmasına neden olur. Dikkat çekici bir nokta da, p.Gly970Asp mutasyonudur. Bu mutasyon proteinin üçüncü sitoplazmik döngüsünde (ICL3) yer alır ve aminoasid ikamesinin lokalizasyonunun bilinmesi sonuçtaki CFTR yapısal ve işlevsel hatalarını öngörmek için yetersiz kaldığını vurgular. G178R, G551D, G551S, R560T, V520F, G970R, G1244E, S1255P, G1349D, bu grupta yer alan mutasyonlardır.(Anderson and Welsh, 1992; Seibert et al., 1996).

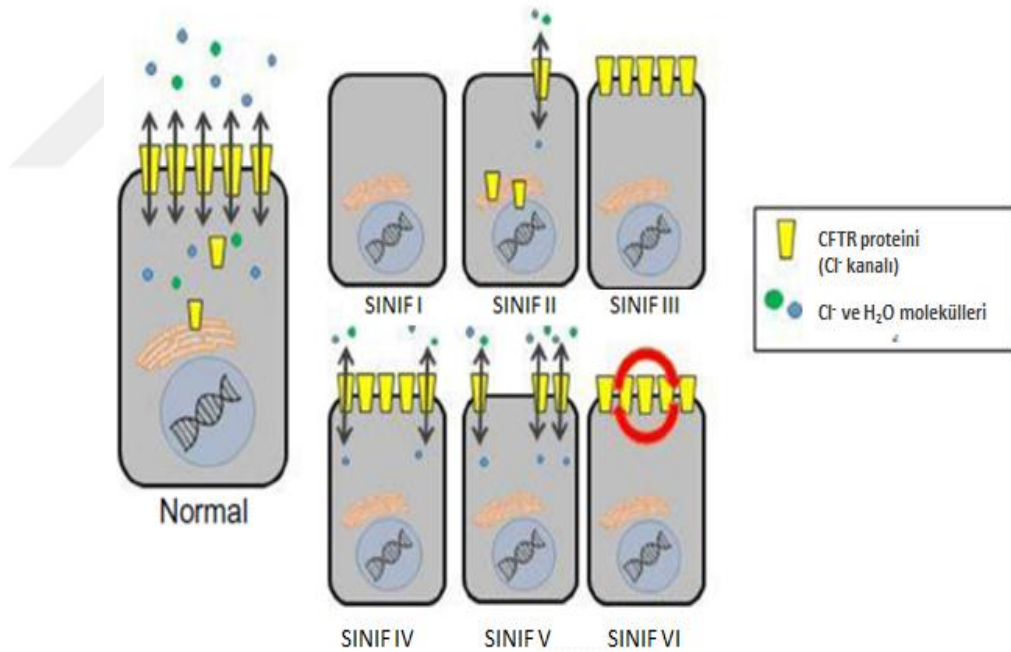
IV. Grup mutasyonlar: Bu mutasyonlar, çoğunlukla kanal gözenek oluşumunda rol oynayan membran spanning domain (MSD)'de bulunur. Bu bölgelerde bulunan missense mutasyonlar sonucunda, membrana yerleşmiş ve Cl⁻ kanal aktivitesini koruyan CFTR proteini üretilmesine karşın, proteinin kanal iletkenliği azaltılmıştır. Bu sınıftaki aleller genellikle hafif hastalık formuyla ilişkilidir. p.Arg117His mutasyonu, en iyi tanımlanmış sınıf IV mutasyonudur. Bu mutant siklik AMP ile düzenlenmiş apikal Cl akımları üretirken, patch-clamp analizi, hem kanal açılma olasılığını, hem de iletkenlikte bir azalma olduğunu gösterdi (Reddy and Quinton, 2001; Sheppard et al., 1993). Son zamanlarda yapılan çalışmalar göre, klorür iletkenliğini azaltmaksızın CFTR bikarbonat iletkenliği özelliğini etkileyen mutasyonlar için bir IVb alt sınıfı (bikarbonat için) önerilmiştir (Schneider et al., 2011). Günümüz itibariyle, p.Arg75Gln ve p.Ile148Thr gibi sadece birkaç mutant saptanmıştır. P.Ile148Thr, CF genine yakın

zararlı görünmesede (Claustres et al., 2004) p.Arg75Gln bazı çalışmalarda patojen etkisi bulunmuştur (Divac et al., 2004, Schneider et al., 2011).

V.Grup mutasyonlar: Azalmış CFTR kanal aktivitesine neden olmaktadır (c.1210-12T[5] (5T allele), c.3140-26A>G (3272-26A>G), c.3850-2477C>T (3849+10kbC>T)).

VI. Grup mutasyonları:

Bu mutasyonlar CFTR'nin düzenleyici özelliklerini etkileyen nükleotit değişikliklerini içine alır. Genin C terminalindeki 70- 98 aminoasit rezidüsünün kaybolması sonucunda gelişir. Bu değişiklik proteinin iyon kanalı fonksiyonunu etkilemez ancak proteinin stabilitesini olumsuz yönde etkiler. Protein daha hızlı yıkılır. Q1412X ve 279insA mutasyonları bu grupta yer almaktadır.



Şekil 2.15. CFTR mutasyonlarının sınıflandırılması (Arends and Pettit, 2015).

Sınıf I-III ve VI'ya ait mutasyonlar, apikal membranda ya çok az fonksiyonel CFTR aktivitesi gösterirler yada hiç göstermezler. Genellikle "ciddi" olarak kabul edilir ve akciğer hastalığı, ancak pankreas yetmezliği ile klasik bir CF fenotipine neden olurlar. Sınıf IV ve V'e ait mutasyonlar, hafif CFTR

aktivitesine sahiptir. En az “hafif” bir CF alleleline sahip hastalarda, CFTR fonksiyonu sindirim için yeterli ve akciğer hastalığı az şiddetlidir. CFTR mRNA seviyesi %10 dan fazla olan CFTR mutasyonlu bireyler, sadece bir semptom gösterebilir, Örneğin CF nin genital formu olan erkeklerde görülen CBAVD (Vas Deferens Konjenital Bilateral Yokluğu) bu duruma örnek verilebilir. CFTR mutasyonu bakımından heterozigot bazı bireyler, pankreatit, sinüzit ve allerjik bronkopulmoner aspergilloz gibi CFTR ile ilişkili hastalıklar bakımından yüksek risk altında olabilirler. CFTR mutasyonlu vakalarda genetik yatkınlık önemli bir faktör olmakla birlikte çevresel modifiye ediciler ilave katkı sağlayabilir (Castellani et al., 2008).

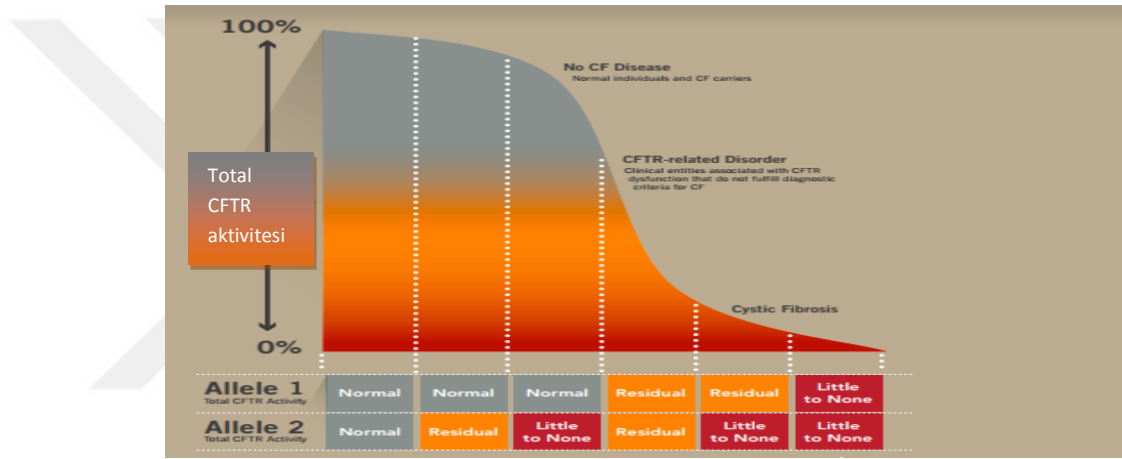
Farklı sınıflar içindeki mutasyonları sınıflamak fonksiyon bozukluğunu anlamak için yararlıdır, ancak birçok sekans varyasyonları nadir görüldüğü için patojenik özellikleri değerlendirmek için uygun olmamaktadır. Dahası tek nükleotid değişimi mutasyonları birden fazla anormallikler oluşturabilir ve değişken fenotip sağlayabilir (Welsh et al., 1993; Zielenski et al., 1995).

Çizelge 2.6 CFTR mutasyonlarının CF(*Kistik Fibrozis*) ile ilişkisi (Castellani et al 2008)

Mutasyon grubu	Örnekler
KF'neden olan mutasyonlar	F508del, R553X, R1162X, R1158X, 2184delA, 2184insA, 3120+1G>A, I507del, I677delTA, G542X, G551D, W1282X, N1303K, 621+1G>T, I717-1G>A, A455E, R560T, G85E, R334W, R347P, 711+1G>T, 711+3A>G,* I898+1G>A, S549N, 3849+10kbC>T, E822X, I078delT, 2789+5G>A, 3659delC, R117H-T5,* R117H-T7,* D1152H,* L206W,* TG13-T5*
KF ile ilgili hastalıklar ile ilişkili	R117H-T7,* TG12-T5,* R117H-T5,* D1152H,* TG13-T5,* S997F, R297Q,* L997F, M952I, D565G,* G576A,* TG11-T5,** R668C-G576A-D443Y, R74W-D1270N
Klinik bulgu veren yeniler	I148T, R75Q, 875+40A/G, M470V, E528E, T854T, P1290P, 2752-15G/C, I807M, I521F, F508C, I506V, TG11-T5**
Klinik belirtileri belirmeyenler	Ağırlıklı olarak <u>misens</u> mutasyonlar

2.5.1 CFTR genotipi ve toplam CFTR aktivitesi

CFTR geninde meydana gelen mutasyonlar genin, miktarını veya fonksiyonel özelliklerini değiştirir. Bu mutasyonlar tek bir allel (heterozigot) yada her iki allel (homozigot) olarak karşımıza çıkar. Mutasyonların çeşidine göre CFTR proteininde hem miktar hemde fonksiyon kaybı söz konusu olur. Bu durum CFTR nin toplam aktivitesinde çok daha fazla kayıplara neden olur. Böylece CFTR genindeki mutasyonların neden olduğu CF veya CF ile ilişkili hastalıkların seyrini, yani kısacası fenotipinin farklılaşmasını sağlar (Bkz. Şekil 2.16) (Zielenski, 2000).

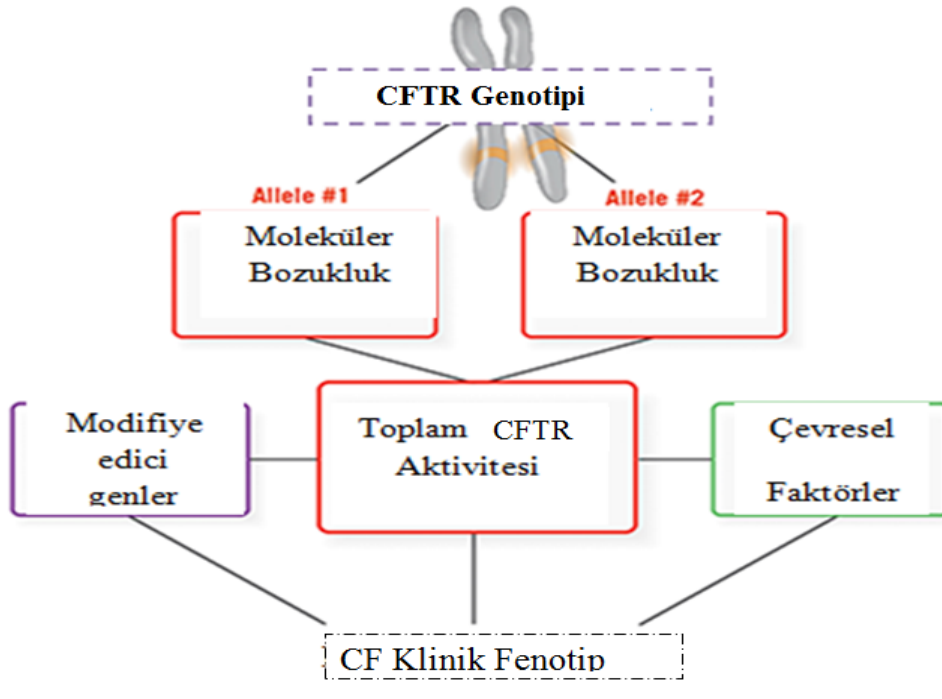


Şekil 2.16. CFTR proteininin toplam aktivitesi ve CFTR ile ilişkili hastalıkların şiddeti. Gri renkli bölgeler, allellerden birinin yada ikisinde normal olduğunu ve CFTR aktivitesi yeterli olup, hastalığın olmadığını belirtir. Turuncu renkli bölgelerde ise her iki allelde mutasyon söz konusu olup CF ve CF ile ilişkili en az bir hastalık durumunun varlığına işaret eder (cftrscience, 2017).

CFTR aktivitesinin kaybı CF'ye neden olsa bile, CF'li hastalarda çeşitli faktörler klinik bulguları etkiler. Bu faktörler, hastalardaki semptomların çeşitliliğine katkı sağlayabilir (Castellani et al., 2008; Sheppard et al., 1993). CFTR genotipi, hücre yüzeyindeki toplam CFTR aktivitesini belirleyen CFTR proteinin miktarını ve fonksiyonunu belirler. Genel olarak her iki CFTR alleli üzerinde CFTR aktivitesi olmayan ya da çok az olan mutasyonların varlığı hastalığın ilerlemesinde erken kanıt sunabilir ayrıca, kompleks allellerin varlığı, toplam CFTR aktivitesini azaltabilir. Örneğin Polytimin (Poly-T) bölgesinin

uzunluğu, CFTR aktivitesi olan R117H mutasyonunun etkisine nüfus eder (Zielenski, 2000).

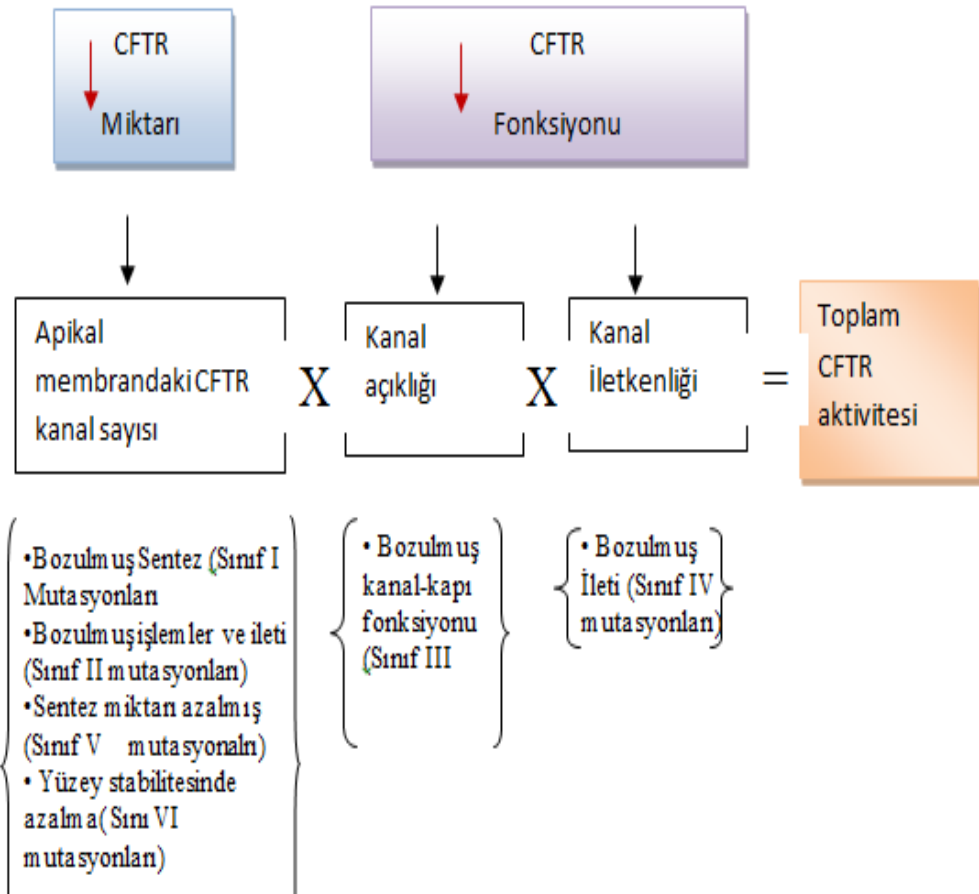
CF fenotipi, aynı CFTR mutasyonlarını taşıyan hastalarda, hatta kardeşler arasında bile, oldukça heterojeniteye sahiptir. Hastalık şiddetindeki bu farklı fenotipler, modifiye edici genleri içeren alternatif genomik lokus gibi diğer genetik faktörler ve ayrıca çevresel etkilerin katkısıyla belirlenmektedir (Bkz. Şekil 2.17). Fonksiyonel CFTR yokluğuna neden olan ciddi mutasyonları, pankreatik yetersizlik (vakaların %95'inden fazlası), karaciğer hastalığı (vakaların %3-5), erken tanı (1 yıl <), terde yüksek Cl^- seviyesi (>80 meq/l) mekonyum ileus (vakaların yaklaşık %20) vakalarıyla bağlantılıdır. Az miktarda CFTR aktivitesine sahip hafif mutasyonlar genellikle pankreatik yetersizlikle (vakaların %70-80'i), geç tanı (10 yıl >), terde düşük Cl^- seviyesi, mikonyum ileus yok, hafif düzey akciğer hastalığıyla ilişkilidir.



Şekil 2.17. CFTR genotipi ile CF klinik fenotip arasındaki ilişki (cftrscience, 2017).

CF'nin çeşitli klinik belirtileri, yalnızca pankreatik fonksiyonunun CFTR genotipi ile iyi korele olduğu gösterilmiştir. Pankreas yeterliliğine sahip hastalar en az bir hafif allele (sınıf IV ve sınıf I deki bir kısım missplicing mutasyonlar ya

da protein stabilitesini etkileyen mutasyonlar) sahiptir. Buna karşın pankreatik yetersizliği olan hastalarda, ciddi fenotipik etkileri olan mutasyonlar (örn; sınıf I, II veya III) bakımından homozigot ya da birleşik heterozigotluğa sahiptir. R117H R334W ve R437P mutasyonları genellikle daha az bozulmuş pankreatik yetersizlikle ilişkilidir (Bkz. Şekil 2.18) (Tsui, 1992). Aynı ailede bireyler arasında benzer pankreatik yetersizlik görülür iken akciğer hastalığında, aynı mutasyonlara sahip kardeşlerde bile çok farklı fenotipler gözlenebilmektedir. Nitekim bu durum, birleşik CFTR genotipi olan F508/1717-1G→A dizigotik (çift yumurta) ikizlerde pankreatik yetersizlik görülürken, akciğer hastalıklarının ise ikizlerin birinde Pseudomonas enfeksiyonunun kronik semptomları görülürken diğer ikizde anormal bir akciğer fonksiyonu gözlenmedi ve herhangi bir antibiyotiğe ihtiyaç duyulmadı (Borgo et al., 1993).



Şekil 2.18. Bozulmuş CFTR miktarı ve fonksiyonunun toplam CFTR aktivitesi üzerine etkisi (cftrscience, 2017).

Yapılan alışmalar gsterdiki, akciğer hastalığının şiddeti ile belirli mutasyonlar arasında bir ilişki olduğu saptandı. CFTR geninin intron 8 bölgesindeki 5T splicing varyantı, CF hastalığındaki eksik penetrans ile ilişkili olduğunu gösterdi. Nasal epitelden elde edilen normal (ekzon 9+) CFTR ekspresyon seviyesi ile akciğer hastalığının şiddeti arasında önemli bir ilişki gözlendi. Zorlu ekspiratuar volüm 1(FEV1) > %80 den fazla olan kişilerde ekspresyon seviyeleri % 25'den fazla olurken, FEV1<80 olan kişilerde ise bu oran %15'in altında görüldü. Ayrıca, konjenital bilateral vas deferens yokluğu olan dört infertil hastanın (CBAVD) analiz sonucu, % 6-24 aralığında normal CFTR ekspresyonuna sahip oldukları görüldü (Rave-Harel et al., 1997; Teng et al., 1997). Bu sonuçlar CF'li kişilerin splicing (ekleme) mekanizmalarındaki değişkenliğin hastalığın değişken fenotipi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Splicing (ekleme) mutasyonu 3849 + 10 kb C → T, CF akciğer fenotip ile normal CFTR ekspresyon miktarı arasında da korelasyon gösterir (Rave-Harel et al., 1997). 3849 + 10 kb C → T, intron 19'da, prematüre inframe stop kodonunu içeren yeni bir 84bp kriptik eksonun eklenmesine yol açan kısmen aktif bir ekleme bölgesi (splice site) oluşturulmasına neden olur; Böylece hem doğru birleştirilmiş hemde anormal kopyalar aynı anda retiler. Anormal şekilde birleştirilmiş CFTR transkriptlerinin seviyeleri % 3'ten daha düşük olduğunda, akciğer hastalığı olmayan normal fonksiyona sahip akciğer bireyler gözlenir buna karşı daha yüksek seviyelerde (%9-23) anormal transkriptler ise orta veya şiddetli akciğer hastalığına neden olur (Chiba-Falek et al., 1998). Aynı genotipi olan hastalar arasında CFTR mutasyonlarının sebep olduğu fenotiplerin doğasına uygun olarak, anormal eklenmiş CFTR mRNA'sı (transkripti), değişken seviyelerde bulunmuştur; bu durum CFTR lokusundaki cis elemanlarından ziyade ekleme faktörleri farklı fenotipler oluşturulmasında etkili olabileceğini göstermektedir. CFTR alleli ve pulmoner hastalık arasındaki korelasyona bir başka örnek ise A455E mutasyonudur. Quebec bölgesinde hafif akciğer ve pankreatik hastalık F508 homozigotlu olanlardan daha fazla A455E bileşik heterozigotlu olanlar ile ilişkilendirilmiştir. (De Braekeleer et al., 1997).

2.5.2 Kompleks Alleller

Kompleks alellerin (ilişkili iki mutasyonun bir kromozom üzerinde taşınması) birçoğu, bir hastalık yapan mutasyon ile hastlık yapmayan başka bir mutasyon ile ilişkili olduğu durumu göstermesine rağmen, ikinci mutasyonunun, esas mutasyonun etkisini azalttığı durumlarda vardır. Tanımlanan ilk kompleks allel 1991'de R553X mutasyonunu taşıyan CF'li bir hastanınin F508 mutasyonu ile aynı allel üzerinde bulunan R553Q mutasyonu olduğu durumdur. (Dork et al., 1991). Bu hasta pankreatik yetmezlik ve şiddetli akciğer hastalığı sergiledi ancak ter testi ile R553Q mutasyonunun F508 ile ilişkili CF hastalığının şiddetini modüle ettiğini düşündürmüştür. R553Q'nun işlevini anlamak için yapılan çalışmalarda ABC ailesi üyesi olan HisP (Histidin transport ATP-binding protein) nin kristal yapısının analizi, bu iki mutasyonun bitişik α -helikslerinde yer aldığı ve R553Q'nun protein katlanmasının bütünlüğü için gerekli olan bir bölgede bulunduğunu düşündürmüştür (Hung et al., 1998). Bu nedenle, 553'te bir glutamin kalıntısının yer değiştirmesinin, 508 pozisyonundaki fenilalaninin eksikliğini telafi edecek kadar protein katlanmasını geliştirmesi, daha işlevsel bir CFTR molekülü ve daha az şiddetli hastalık fenotipi oluşturmuştur.

Yapılan bağlantı analizlerinde 102T $\rightarrow$ A promotor mutasyonu, S549R (T $\rightarrow$ G) mutasyonu ile bağlantılı olarak bulunmuştur (Romey et al., 1999). Genotipleri 102T $\rightarrow$ A + S549R (T $\rightarrow$ G) / F508 ve 102T $\rightarrow$ A + S549R (T $\rightarrow$ G) / S945L kompleks mutasyonlara sahip olan iki bireyin pankreas fonksiyonları yeterli ve hafif CF bulguları vardır. Daha önceki verilere göre S549R mutasyonu pankreas yetersizliği ile ilişkili 'şiddetli' allel olarak tanımlandı, ancak S549R'nin diğer alleller ile birlikte bulunması, S549R nin klinik fenotipini hafiflettiğini düşündürmektedir. Yapılan in vitro analiz sonucuna göre, 102T $\rightarrow$ A mutasyonu, CFTR promotor (özendirici) bölgedeki bir Yin Yang 1 (Yin Yang 1 insanda YY1 geni tarafından şifrelenen transkripsiyonel represör proteini) transkripsiyon faktörü bağlama bölgesi oluşturduğu, böylece CFTR ekspresyonunda yukarıya yönlü bir regülasyona neden olduğunu göstermiştir (Romey et al., 2000).

Daha ağır fenotip ile sonuçlanan 'şiddetli' allellerin ilaveten, ılımlı fenotip sergileyen birden fazla tanımlanmış mutasyonun birlikte ortaya çıktığı ve daha

şiddetli bir CF fenotipinin olduğu birkaç kompleks alel tanımlanmıştır. Pankreas yeterliliği olan CF hastalarında ve CBAVD hastalarında sırasıyla tanımlanan iki hafif mutasyon (R347H-D979A) ile kompleks alel araştırılmıştır. R347H'nin orta derecede kusurlu Cl^- kanal aktivitesi ile ilişkili olduğu, buna karşılık D979A'nın CFTR'nin yanlış işlenmesine yol açtığı bulundu. R347H-D979A mutasyonlarının, çift mutant olduğu durumda ise Cl^- iletkenliğini önemli ölçüde azalır (Clain ve ark. 2001). D443Y, G576A ve R668C üç missens mutasyonun olduğu kompleks alleller tanımlanmış olup, mutasyonların her biri daha önce CF hastalarında ve CBAVD'den muzdarip olan hastalarda bağımsız olarak gözlemlenmiştir. Bu kompleks alellerden G576A-R668C mutasyonları normal bir ter testi olan bireyde bildirilmiştir, ancak bu kompleks allelden etkilenen aile üyeleri hafif bir CF fenotipi sergilemiştir. Bu durum gösteriyor ki, kompleks G576A-R668C allellerine D443T allellinde eklenmesiyle ılımlı CF fenotipinin ortaya çıktığını göstermiştir (Abramowicz et al., 2000).

R117H mutasyonu hafif derecede CF fenotipinden sorumludur. Bununla birlikte, bu mutasyon CFTR geninin intron 8'deki T7 alelinin varlığı ile modüle gibi görünüyor ayrıca CF fenotipi sadece R117H, T5 aleli mevcutsa ortaya çıkmaktadır. CBAVD'li sekiz birey ve bir asemptomatik bireyde (R117H / F508) R117H aleli T7 alel ile bağlantılı olarak bulunmuştur. Dahası, T7 aleli ekzon 9'un normal eklenmesi ile ilişkili ve normal seviyelerde CFTR mRNA ile sonuçlanmıştır. Bu yüzden, R117H / T7 bireyler, hafif CF fenotipi ile sonuçlanan, kısmen fonksiyonel olan CFTR proteinini normal seviyelerde üretilirken, buna karşın R117H/T5 allellerinin varlığı, tam uzunlukta CFTR mRNA miktarını azalmasına ve ciddi CF fonotiplerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Kiesewetter et al.,1993)

2.5.3 Atipik CF bulguları ve ilişkili mutasyonlar

CF'li hastaların yaklaşık %2'sinde CFTR proteini kısmen de olsa görev yapabildiğinden, bu hastaların klinikleri daha hafif ve bunlar “nonklasik” yada atipik CF olarak adlandırılır. Bu hastaların ter klorür düzeyleri normal veya hafif yüksek olup, genellikle pankreas fonksiyonları yeterlidir ve malabsorbsiyon bulguları yoktur. Akciğer tutulumları tipik CF'li hastalara göre daha hafiftir ve

daha geç başlar. Bunlar genellikle kronik sinüzit, bronşektazi, tekrarlayan pankreatit, fokal biliyer siroz, kolestaz, anormal glukoz toleransı, infertilite veya sıcak intoleransı nedeniyle başvuran hastalardır. Atipik CF tanısı; CF düşündür en az bir organ tutulumu olması ve normal veya sınırda ter testi düzeyleri ile birlikte iki mutasyonun gösterilmesi (Çizelge 2.7) yada anormal nazal potansiyel fark ölçümü sonucu ile konulur. (Boyle, 2003)

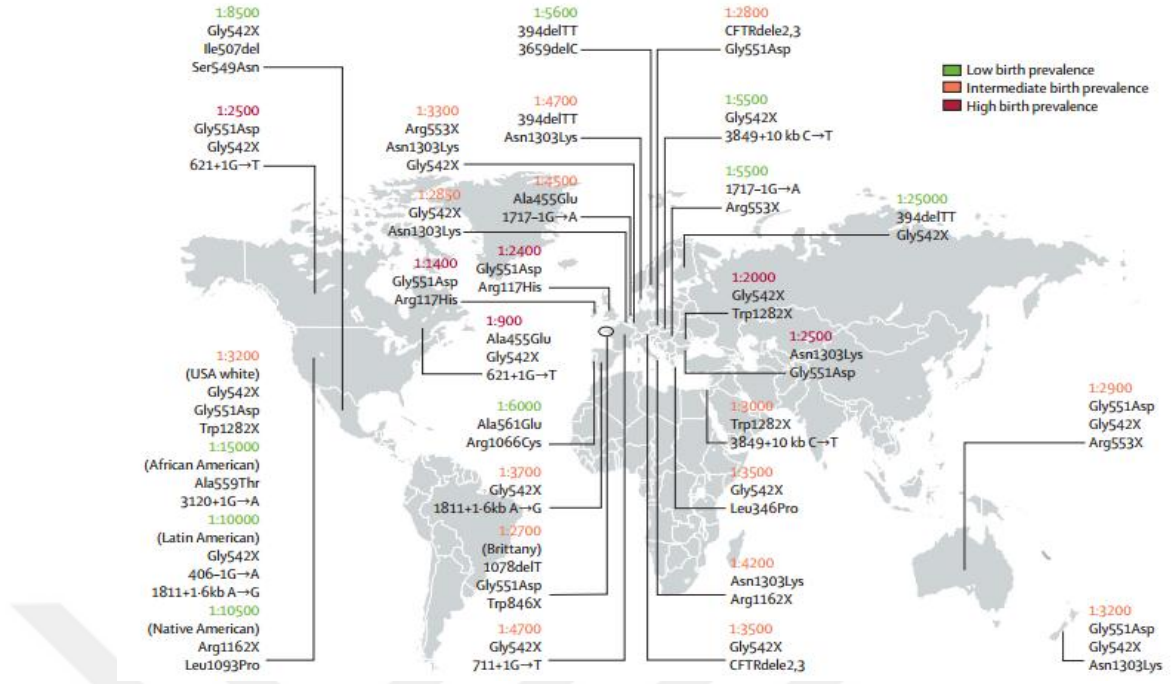
Çizelge 2.7 Atipik (Hafif CF kliniğine sahip) hastalarda yaygın görülen CFTR fenotiplerinin mutasyonlar ile ilişkisi (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/resource/Table3.html>)

Hastalık	KF hastlardaki yaygın bulgular	En az bir KFTR mutasyonu bulunan hastaların fraksiyonu(%)	Gözlenen Mutasyonlar
CBAVD	vas deferens yokluğu (bilateral)	73/102 (73%)	IVS8:5T
		51/68 (75%)	IVS8:5T
CUAVD	vas deferens yokluğu (unilateral)	6/14 (43%)	[[Delta]]F508, R117H, R75Q
Diffüz Bronşektazi	bronşlarda anormal dilatasyon	6/10 (60%)	NBD1 şifreleyen ekzonlardaki mutasyonlar
		6/48 (12.5%)	Sipisifik olmayan yaygın KFTR mutasyonları
		9/28 (32%)	IVS8:5T
Yüksek ter ile bronşektazi Cl-	anormal bronş dilatasyonu ve terde yüksek klorür seviyesi	5/16(31%)	[[Delta]]F508
Allerjik Bronkopulmoner aspergilloz	allergic asthma	6/11 (54%)	Sipisifik olmayan yaygın KFTR mutasyonları
	yapışkan balgam		
	mukus plakları		
Kronik Pseudomonas bronşit	Kronik sinüzit	2/10 (20%)	Sipisifik olmayan yaygın KFTR mutasyonları
	nasal polipler		
Kronik bronşiyal aşırı	anormal mukus salgılanması	6/65 (9.2%)	[[Delta]]F508

2.5.4 Epidemiyoloji ve genetik

Kistik Fibrozis (CF)'den sorumlu gen yaklaşık 25 yıl önce klonlama çalışmaları yapılarak tanımlanmış ve CF hastalığının diğer organlardaki fenotipinin aydınlanması sağlanmıştır. Ancak buna rağmen, hastalığın prognozu bakımından farklı etnik populasyonlarda farklılıklar görülmektedir. Dünyada hastalığın görülme sıklığı etnik gruplara göre farklılık göstermektedir. Hastalığın insidansı, beyaz ırkta ve Avrupa ırklarında daha çok görülmekle birlikte evlilik ve göç gibi çevresel etmenler sonucu diğer ırklardada düşük insidanslarda görülmektedir (Bkz. Şekil 2.19.) (Bkz. Çizelge 2.8) (Kerem, 2006).

CFTR Avrupadaki insidansı 1/2000-3000 dir. Populasyonlar nispeten homojen görünse bile yerel ve bölgesel farklılıklar olabilir. Örneğin Fransa'nın kuzaybatı bretonya bölgesinde CF yüksek insidans göstermekte ancak aynı bölgenin güneyinde CF daha düşük insidansa sahiptir (Claustres et al 2000). En sık görülen mutasyon tüm dünyada hastaların %66'sında bulunan delta(Δ)F508 mutasyonudur (Hull, 2003). Δ F508 CFTR polipeptidinin 508. pozisyonunda bir fenilalaninin kaybına neden olan 3 baz çiftinin silinmesiyle oluşan bir mutasyondur. Bu mutasyon etnik gruplara bağlı olarak değişiklik gösterir. Avrupa toplulukları arasında Δ F508 mutasyonu sıklığı farklılık gösterir. Kuzey Avrupa'lı hastalarda %70-80 arasında iken Güney Avrupa'lılarda %50-55 oranında görülür (Tablo 2.4) (Rowe et al., 2001). Δ F508 mutasyonu, dünya çapında CF'ye neden olan en yaygın mutasyon olsa da, Tunuslu hastalarda yalnızca %18 oranında görülür. Bizim ülkemizde yapılan çalışmalarda ise en sık görülen mutasyon Δ F508(%24,5) olup, bunun dışında diğer mutasyonlarda sırasıyla, 1677delTA (%4,1), 2789+5G>A (%3,9), 2181delA (%3,8), R347H (%3,6), N1303K (%2,9), 621+1G>T (%2,6), G542X (%2,6) mutasyonların takip ettiği bildirilmiştir (Yılmaz vd., 1995) Diğer CFTR mutasyonları çok nadirdir ve sıklıkları %1'in üstünde olan sadece 4 mutasyon (G542X, N1303K, G551D ve W1282X) bildirilmiştir.



Şeki 2.19 Kistik Fibrozisin Dünya'daki insidansı (O'Sullivan. and Freedman, 2009).

2.5.4.1 Avrupa

CFTR gen mutasyonları birçok Avrupa popülasyon'larında karakterize edilmiştir. Bazı batı Avrupa şehirlerinde CF hastalarından CFTR mutasyonlarının %95 den fazlası belirlenmiştir. Belirlenmiş bu mutasyonlardan Delta(Δ)F508 / F508del CF'ye neden olan en yaygın muastyondur. Δ F508 mutasyonun frekansı Danimarkanın Faroe adalarında %100 iken, kuzey, batı ve kuzey-doğu Avrupa da yaklaşık %70'dir. Türkiyede ise bu oran yaklaşık %20 dir. Δ F508'den başka CF'ye neden G542X, N1303K, ve G551D gibi CFTR mutasyonları %10-%15 arsında frekansa sahiptir. G542X ve N1303K Akdeniz ülkelerinde en yaygın görülen mutasyonlardır.

Bazı popülasyonlarda etnik belirli mutasyonlar gözlemlendi. Avrupa bölgesi için belirli etnik gruplara özgü mutasyonlar, İskandinav'da 394delTT, İsviçre'de 3905insT, Kuzeydoğu İtalya'da R1162X ve doğu slav ırklarında ise CFTRdele2,3(21kb) mutasyonları olup, geri kalan mutasyonlar ise heterojen,özel ve sınırlı sayıda kişilere özel mutasyonlardır (Claustres et al.,2000).

2.5.4.2 Afrika

Avrupada sık görülen $\Delta F508$, G542X ve N1303K mutasyonları, Afrikanın kuzey kıyı ülkeleri Cezayir ve Tunusta'da farklı frekanslarda gözlemlenmiştir. Ayrıca Afrika popülasyonuna özgü bazı mutasyonlarda tanımlanmıştır.

Sahra altı Afrika kökenli bireylerde CFTR mutasyonlarının tanımlanması CF nin Afrikada yaygın olduğuna kanıttır. Afrika kökenli Amerikalılar ile genç Amerikalılar arasında karşılaştırılmalı sistematik bir çalışma yapılmıştır. Bu iki grubun klinik belirtileri benzer olmasına karşın tek fark Afrika kökenlilerin kötü beslenme koşulları olmasıdır. Buna göre; Sahra altı Afrikalılardaki CFTR mutasyon profili 3120+1G→A Afrika bölgesine özgü yaygın bir mutasyon olarak gözlenmiştir. Bu bölgedeki CF hastalarında 3120+1G→A mutasyonu CFTR alleleri içinde %46 oranına sahiptir. Değişik oranlarda mutasyonlar bulunmuş olmasına karşın $\Delta F508$ mutasyonu tespit edilmemiştir. Güney Afrikada Sağlıklı Afikalılar ve Avrupa toplumu ile karışmış çok az Afrikaların CF insidansı istatistiki olarak 1/ 7056 olması beklenirken, 1/42 olarak tespit edilmiştir (Hamosh et al., 1998; Goldman et al., 2001).

2.5.4.3 Kuzey Amerika

CF'nin insidansı Kuzey Amerikada 1/35009. CFTR mutasyonları mevcut popülasyonların coğrafik orjinlerini güçlü bir ilişki ile Avrupayı yansıtır. CF'ye neden olan yaklaşık 10 CFTR mutasyonu, Amerikalı CF hastalarında %5 den daha fazla frekansa sahiptir. Bu 10 mutasyonun oranın %79.7 dir. Beyaz ırkın etnik katkısı ile ikinci en yaygın mutasyon $\Delta F508$ mutasyonudur. Afikalılarda görülen 3120+1G→A mutasyonu Afirka kökenli Amerikalılarda görülen en yaygın ikinci mutasyondur (Kosorok et al.,1996)

Kanadadaki mutasyonların çoğu, Avrupa kökenli beyaz ırk mutasyonlarıdır. Buradaki önemli farklılık İngiliz ve Fransız kökenli popülasyonlarda görülmektedir. Bu yüzden kanadının ilgili bölgelerinde bulunan mutasyonlar Fransız ve İngiliz soylarının frekansını yansıtır. $\Delta F508$ mutasyonunun frekansı doğudan batıya doğru gidildikçe artmaktadır. Bu durum muhtemelen, kanadanın

batısı ve merkezindeki populasyonlar'ın etnik çeşitliliğindeki artışıyla ilişkili, ayrıca bir kısım etnisiye özgü nadir görülen mutasyonlar da o toplumlarda sık görülmektedir. (Örneğin, Hutterites kolonisindeki M1101K mutasyonu)(Zielenski et al., 1993). Bu mutasyonlar bir kısım populasyonlarda korunmuş olduğundan yüksek frekansta olabilmektedir (Rozen et al., 1992). Kuzeydoğu Quebec bölgesi Saguenay-Lac St. Jean bölgesinde farklı bir mutasyon dağılımı gözlenmiştir. Bu bölgede CF hastalarından izole edilen CFTR genlerindeki mutasyonlarından sadece üç tanesi ($\Delta F508$, 58%; 621+1G $\rightarrow$ T, 23% ve A455E, 8%) bütün CFTR allelerinin %89'unu oluşturmaktadır (Collazo et al., 1995).

2.5.4.4. Latin Amerika

Latin Amerikanın etnik yapısı oldukça heterojendir. Özellikle Uruguay ve Arjantin gibi ülkeleri yaklaşık %90'ı beyaz ırk, buna karşın Meksika, Kolombiya ve Şili gibi ülkelerin ise yaklaşık %57 -%85 i beyaz ırk ve Kızılderili karışımı melezlerler oluşturmaktadır. Buna ilaveten Uruguay, Ekvador, Kolombiya Venezuela ve Brezilya 'da Afrika kökenliler de olmakla birlikte bunların oranı % 10'u geçmemektedir. Küba ve Meksikada yenidoğan CF hastalarının insidansı ise 1/3900 ile 1/8500 aralığındadır (Orozco et al., 2000).

Latin Amerika da $\Delta F508$ mutasyonu oldukça fazladır. Arjantin gibi beyaz ırkın fazla olduğu ülkelerde $\Delta F508$ mutasyonu yüksek frekansa sahipken Şili gibi beyaz ırk dağılımının düşük olduğu ülkelerde ise düşük $\Delta F508$ mutasyonu düşük frekansa sahiptir.

2.5.4.5 Orta Doğu

Orta Doğu'da CF'nin insidansı etnik kökene ve akrabalık derecelerine göre farklılık göstermektedir. Arab dünyasında %65 in üzerinde bir akrabalık görülmektedir. CF insidansı 1/2560 -1/15876 aralığındadır. $\Delta F508$, N1303K, W1282X ve 3120+1G>A gibi mutasyonlar Dünyanın birçok bölgesiyle benzer dağılıma sahiptir. Avrupada $\Delta F508$ mutasyonu Orta Doğu'dan daha sık gözlenmesine karşın, İsrail ve Lübnan ülkelerinde de oldukça yaygındır. Diğer yandan Afrika kökenlilerde görülen 3120+1G>A mutasyonu bu bölgelerde

oldukça yaygındır. Başka bölgelerde nadir görülen mutasyon tipleri Orta ve Yakın doğuda yaygın olarak görülmektedir. Yaygın görülen bu mutasyonlar etnik köken veya dinsel ortaklığı olan insanlara özgü olabilir. Örneğin bedevi kabilelerinde I1234V, Müslüman araplarda CFTRdele2(ins186), Hristiyan arablarda 4010delTAAT, Birleşik Arab Emirlikleri ve Umanlı bedevilerde S549R(T>G), Bahreyn de 548A>T ve Sudi Arabistan da ise 1548delG mutasyonları sıklıkla görülmektedir (El-Harith et al., 1997; Eskandarani et al.,2002).

2.5.4.6 Asya

Kistik Fibrozis(CF) vakası, Asyada normal oranlara sahip olduğunu gösterir birkaç rapor mevcuttur. Ancak gerçek insidans tam olarak bilinmemektedir. Fakat Birleşik Krallıkta yaşayan Asya kökenlilerin (Hindistan/Pakistan) tahmin edilen insidansları 1/10.000 iken USA de ise 1/40.000 dir(Powers et al 1996). Hindistanda tahmin edilen insidans ise 1/40.000 ile 1/100.000 aralığındadır (S. Kabra, 2002, unpublished). Japonyada hesaplanmış insidans canlı doğumda 1/100.000 ile 1/350.000 aralığındadır, ancak frekans öngörülenden daha yüksektir (Anzai et al., 2003).

Asya ülkelerindeki CF ‘nin insidansına ait bilgiler kısıtlıdır. Birleşik Krallık CF veritabanına göre 5274 çocuğun dışında, Hindistan alt kıtasına ait 88(%1.67) hasta mevcut, bunların 63’ü Pakistanlı, 12’si Hindistan kökenli,7’si Bangadeşli ve 6 sıda diğer Asya ülke vatandaşlarından oluşmaktadır (Walters and Mehta, 2007). Birleşik Krallıktaki bu sonuca göre, hint alt kıtasında CF kesinlike vardır, ancak muhtemelen Avrupadan daha az yaygındır.

Pakistanlı hastalarda delta(Δ)F508 mutasyonu görülme oranı yaklaşık %60 iken, bu oran Hindistan’lı hastalarda yaklaşık %20, Japon hastalarda ise yaklaşık %10 daha düşüktür. Birleşik Krallıktaki Asya kökenli 36 CF hastası (26 Güney Asyalı, 10’u ise Orta Asyalı) Δ F508 bakımından homozigottur (Callaghan et al.,2002).

Çizelge 2.8 Kistik Fibrozisin Dünyadaki İnsidansı

ÜLKE	İNSİDANS
Avrupa	
Finlandiya	1/25,000
Türkiye	1/<10,000
İsveç	1/7,300
Polonya	1/6,000
Kuzey İrlanda	1/5,350
Rusya	1/4,900
Danimarka	1/4,700
Estonya	1/4,500
Norveç	1/4,500
Hollanda	1/3,650
Yunanistan	1/3,500
İspanya	1/3,500
Almanya	1/3,300
Çek Cumhuriyeti	1/2,833
Birleşik Krallık	1/2,600
İtalya	1/2,438
Fransa	1/2,350
İsviçre	1/2000
İskoçya	1/1,984
İrlanda	1/1,800
USA	1/3,500
LATİN AMERİKA	
Meksika	1/8,500
Brezilya	1/6,902
Şili	1/4,000
Küba	1/3,900
ORTA DOĞU	
Birleşik Arap Emirlikleri	1/15,876
Bahrein	1/5,800
ASYA	
Hindistan	1/40,000-100,000
Japonya	1/100,000-350,000
AFRİKA	
Güney Afrika (Afrika Populasyonu)	1/7,056
AVUSTURALYA	1/2,500

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Çalışma Grubu

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na veya Moleküler Tıp Laboratuvarına başka merkezlerden Kistik Fibrozis şüphesiyle gönderilen 30 birey ve 25 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Kistik fibrozis şüphesi olan 30 birey üzerinden, bir çalışma grubu tasarlandı. Çalışma İzmir 1 nolu Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve çalışmada yer alan hastaların tümünün ebeveynleri genetik çalışmalar için bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalamışlardır (Ek 1).

3.2 Araştırma Parametreleri

Gen Mutasyon Analizi: DNA dizi analizi ilk kez 1975 yılında İngiltere'de F. Sanger ve A.R. Coulson tarafından zincir sonlandırma (chain termination) metodunun geliştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu metod günümüzde artık tamamıyla geliştirilmiş ve otomatize edilmiştir. Otomatize DNA sekanslama yönteminin kullanılmasıyla CFTR geni mutasyon analizleri, çalışma ve kontrol grubu arasında karşılaştırmalı olarak NCBI GenBank (NM_000492.3) cDNA sekans ve protein database referans diziler (NP_000483.3) ile karşılaştırılmış, mutant alleller, aminoasid mutasyonları veya nukleotit dizi değişimleri incelenmiştir. Ayrıca, mutasyonların, patojenite skorlamasını veren PolyPhen-2 veri tabanına göre aminoasid değişimlerinin skorlaması yapılmış ve HGMD biyoinformatik veri tabanında görede, hangi hastalıkla ilişkili olduğu saptanmıştır.

3.3 Yöntem

1.Adım: Çalışma Grubunun Oluşturulması

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran, CF (Cystics fibrosis) şüphesiyle başvuran hastalardan çalışmaya katılmayı kabul eden 30 kişi ile çalışma grubu oluşturulmuştur. Ayrıca, ailesinde

CF hikayesi olmayan ve çalışmaya katılmayı kabul eden 25 sağlıklı birey kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Gönüllülerin Çalışmaya Katılmasına İlişkin Düzenlemeler:

3.3.1 Çalışmaya alınma kriterleri

Çalışma grubu: 0-16 yaş arasında 30 bireyden oluşmuştur.

1.Bu hastalıktan şüphelenilmesi gereken, rinosinüzit, nazal polip, obstruktif akciğer hastalığı, rekurren pulmoner infeksiyonlar, gastrointestinal sistem malabsorbsiyonu, yağ intoleransı, yağlı dıskı, kolelityazis, karaciger disfonksiyonu, intestinal obstrüksiyon gibi klinik bulguları olanlar,

2. Başka bir amaçla yapılan ultrasonografi veya bilgisayarlı tomografi gibi görüntüleme tetkiki sırasında multiple kistler saptananlar.

3.Kistik fibrozis şüpheli klinik ön tanısı almış hastalar araştırmaya dahil edilmiştir.

Kontrol grubu:

25 kişilik 0-16 yaş grubunda ailesinde hiçbir kronik hastalığın olmaması, ayrıca ailelerde belirlenen herhangi bir akciğer hastalığının olmaması ve hasta grubunda belirtilen klinik bulgulardan hiçbirini taşımayan sağlıklı bireyler kontrol grubu olarak çalışm grubuna dahil edilmiştir.

3.3.2 Çalışmaya alınmama kriterleri

- Çalışmaya uyum sağlayamayan,
- 16 yaşından büyük olma,
- Diğer sistemik hastalığı olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Genetik Çalışmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Form'unu okuyup kabul ederek imzalayan katılımcı, bu kriterler dâhilinde çalışmamızda yer almıştır.

3.3.3 Gönüllülerin araştırmadan çıkarılma kriterleri

Çalışmaya uyum sağlayamama, 16 yaşından büyük olma, tıbbi kanıtlı başka hastalığının bulunması, noktasında bireyler çalışmada yer almamıştır.

Hastaların detaylı anamnezi, öz ve soygeçmişleri alınarak başvuru şikâyetleri ve muayene bulguları, analiz sonuçları ile 'olgu rapor form'unda yer almıştır.

3.3.4 Çalışma tasarımı

Çalışma kriterlerine uygun ve hasta gönüllü olur formunu imzalayan kişilerden 1 cc (ml) periferik venöz kan örnek materyali alınmıştır. Örneği alınan hastanın demografik, klinik patolojik ve laboratuvar bulguları kaydedilmiştir. Çalışma ve sağlıklı grup oluşturulduktan sonra biyolojik materyellerden DNA elde edildi daha sonra, CFTR geninin her ekzonuna özgü PCR yapılmıştır. PCR örneklerinden olası mutasyonlar direkt DNA dizi analizi ile yapıldı. Her hastada bunlar saptandıktan sonra mutasyon dağılımı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır ve ayrıca her mutasyonun fenotiple ilişkisi ortaya konulmuştur.

3.3.5 DNA İzolasyonu

Hastalardan EDTA'lı tüpe alınan 1 ml periferik kandan 200µl alınarak genomik DNA elde edildi. Bu yöntem için Invitrogen Purelink Genomic Blood DNA Purification (K1820-01) DNA izolasyon mini kiti kullanıldı. DNA eldesi işlemleri kit prospektüsüne göre yapıldı. Genomik DNA eldesinin aşamalarında kullanılan solüsyonların amaçları şu şekildedir:

Hücre lizis solüsyonu: Hücre zarının uzaklaştırılıp hücre içeriklerinin açığa çıkmasını, proteinaz K ile tüm hücrel ve nükleer histon proteinlerin ve RNA'nın uzaklaştırılmasını sağlar. Alkolle DNA'nın membranda presipitasyon basamağı

ile yıkaması gerçekleştirilir. Membrana bağlama basamakları sonucunda alkol, protein ve membran lipid kontaminasyonlarından uzaklaştırılmış halde en son uygulanan elüsyon basamağında DNA'nın saf olarak eldesi sağlanır. Elüsyon tampon çözeltisi ile membrana bağlı kalan nükleik asidin %85-100'ü elde edilir.

Invitrogen Purelink Genomic Blood DNA Purification (K1820-01) DNA izolasyon mini Kit prosedürü:

Hazırlama

- Su banyosu 55⁰C'ye ayarlanır.
- Her hasta için 1,5 ml'lik ependorf, spin ve kolon tüpler hazırlanır.
- Hastaların isimleri tüplerin üzerine ve kapaklarına yazılır.
- Etil alkol saf olması için yeni olarak hazırlanır (%95>).

Prosedür

- Steril bir ependorf tüpüne 200µl donmuş ya da taze kan örneği konulmuştur
- Üzerine 20 µl Proteinaz-K eklenmiştir.
- 20 µl Rnase A ekleyin ve vortekslenir, oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir.
- 200 µl Genomik/Lysis tamponundan eklenir ve homojen olana kadar vortekslenmiştir.
- Protein sindirimini hızlandırmak için 55⁰C'de 10 dk. su banyosunda inkübe edilmiştir.
- 200 µl %96-100'lük etil alkol eklenir, 5 saniye kadar vortekslenmiştir.

- Ependorftaki lizattan toplama tüplerine ~640 µl eklenmiştir.
- 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve kolonları atılmış ve temiz tüpe yerleştirilmiştir.
- 500 µl Wash Buffer 1 ilave edilmiştir.
- 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edin. Kolonları atılır ve temiz tüpe yerleştirilmiştir
- 500 µl Wash Buffer 2 ilave edilmiştir.
- 3 dakika maksimum hızda santrifüj edilir. Kolonları atılır ve temiz tüpe yerleştirilmiştir.
- 25-200 µl (ort. 100 µl) Elution Buffer (invitrogen) eklenmiştir,
- Maksimum hızda (14000 rpm) 1 dakika santrifüj edilir.
- Elde edilen DNA toplama tüpünde birikmiştir, burdan mikropipetle ependorfe aktarılarak +4°C'de ya da -20°C'de saklanmıştır.

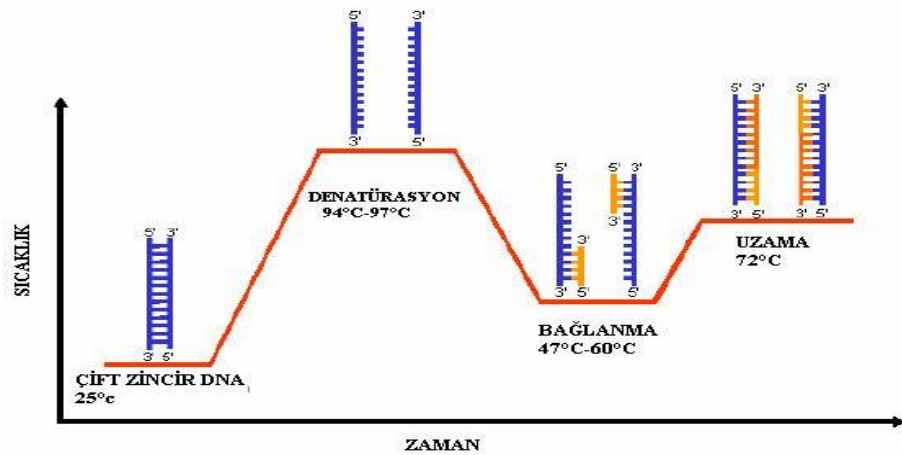
3.3.6 DNA'nın kontrolü

2 µl (100 ng) DNA çözeltisi %1'lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu. DNA saflığının ölçülmesi için, NanoDrop spektrofotometre cihazında 260/280 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Kontrolü tamamlanan DNA molekülleri, DNA sekans analizine başlamak üzere +4°C'de saklandı.

3.3.7 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); uzun çift iplikli bir DNA molekülü içinden 100 ve 600 baz içeren kısa DNA dizisini logaritmik amplifikasyonuna izin veren bir tekniktir. Bu yöntemde çoğaltılması (replikasyon) istenen DNA örneği, replikasyon için gereken maddelerle birlikte bir tüpe konarak, üç değişik ısıda bir

döngü (siklus) içerisinde tutulur. İlk basamak DNA'nın denatürasyonudur. 94-95°C'ye ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır (denatürasyon). İkinci basamak bağlanmadır (yapışma = annealing). Ortama konmuş ve sadece çoğaltılmak istenen DNA bölgesine özgül iki primer, sıcaklığın (50-70°C'ye) düşürülmesiyle, ilk basamakta ayrılmış olan kalıp DNA'nın özgül oldukları bölgelerine bağlanırlar. Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır (sentez = extension). Ortama konmuş ve optimum sentez sıcaklığı 72-74°C olan *Thermus aquaticus* (Taq) polimerazı (ya da ısıya dayanıklı başka polimerazlar) bu ısıda hedef DNA'ya yapışmış primerlerin 3' ucundan başlayarak istenen DNA bölgesinin sentezini yapar. Bu tekrarlanışında iki primer arasında kalan üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her özgül DNA parçası çoğaltılarak iki katına çıkarılmış olur. Yeni sentezlenen DNA da bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır ve bu DNA parçaları geometrik olarak artar. Teoride özgül DNA parçası; siklus sayısı (n) ve başlangıçtaki hedef sayısına (t) bağlı olarak yaklaşık $tx2^n$ sayısına ulaşır (Şekil 3.1). Hedef sayısı, enzim, dNTP, primer konsantrasyonu ve çoğaltılan bölgenin birikmesi gibi nedenlerle ürün miktarı formüldeki sayıya ulaşmaz. Fakat yinede milyonlarca kopyalık çok yüksek yoğunluğa ulaşan hedef DNA molekülünün PCR sonrası agaroz jel elektroforezi gibi bir yöntemle gösterilmesi oldukça kolaydır (Kubista et al., 2006).



Şekil 3.1. PCR sıcaklık döngüsü: (1) Çift iplikli DNA'nın ayrılması için sıcaklık yaklaşık 95°C'ye yükselmiştir, (2) primerin bağlanmasına izin verilmesi için sıcaklık primere göre düşürülmüştür, (3) sıcaklık 72°C'ye ayarlanarak polimeraz primerin uzaması sağlar.

CFTR geninin her bir ekzonuna özgül olan oligonükleotid primerler hazırlanmıştır (Çizelge 3.1). PCR işlemi için toplamda 12,5 µl olacak şekilde; içerisinde; 3µl genomic DNA, Buffer (15 mmol/l Tris-HCl, pH 8.0, 50 mmol/l KCl), 0,75 mmol MgSO₄ hazırlandı her birinden 50 µmol/l dGTP, dATP, dTTP ve dCTP, 2.5 pmol forward ve reverse primer ve 1.0U Ampli Taq Gold polimeraz eklendi. MyGene Gradient Thermal Cycler cihazında gradient programında PCR amplifikasyonu yapıldı

Çizelge 3.1. CFTR geninin her bir ekzonuna özgül olan oligonükleotid primerler

EKZON	FORWARD	REVERSE	
1	FGGCATTAGGAGCTTGAGCC	AAACCCAACCCATACACACG	185 bç
2	GTGCATAATTTTCATATGCC	GCCACCATACTTGGCTCC	338 bç
3	TTGTGTGAATCAAACATATGTTAAGG	TTACCCAGATTTCGTAGTCTTTTC	283 bç
4	TCTTGTGTGAAATTCACAGG	AAAACACACAGAGGCAGTTTACAG	525 bç
5	GAACCTGAGAAGATAGTAAGCTAGATG	GAAAACTCCGCCTTTCCAG	321 bç
6	TGATTGTAGTTTCTAGGGGTGG	TCCTGGTTTTACTAAAGTGGGC	304 bç
7	TGCCCCTCTGTTGAATAAAAG	TGCATGAATATTGACAGAACTTAAATG	384 bç
8	CTTCCATTCCAAGATCCCTG	TGAACATTCTAGTATTAGCTGGC	476 bç
9	TCCTAGTGCTTGGCAAATTAAC	GCACCTGGCCATTCTCTAC	446 bç
10	AGTTTCTGTCCCTGCTCTGG	GTCCACGAGCTCCAATTC	325 bç
11	GCAAGTGAATCCTGAGCGTG	TTTGGGTAGTGTGAAGGGTTC	309 bç
12	GGAAGATGTGCCTTTCAAATTC	CCCACTAGCCATAAAACCCC	301 bç
13	TGCATGTAGTGAACGTGTTAAGG	TGCAATCTATGATGGGACAG	225 bç
14_1	AAATGCTAAAATACGAGACATATTGC	TCTTCGATGCCATTCAATTG	485 bç
14_2	ACAGACTGGAGAGTTTGGGG	TTACATGCTACATATTGCATTCTACTC	500 bç
15	ACAATGGTGGCATGAAACTG	TTGAGCTTTGAATCTCTTAACC	548 bç
16	AATTTAGATGTGGGCATGGG	GGATTACAATACATACAAACATAGTGG	201 bç
17	GGGTGCATGCTCTTCTAATG	CAGGCCCTATTGATGGTGG	431 bç
18	TTCAGAGAAATTGGTCGTTACTTG	CTAAATGTGGGATTGCCTCAG	570 bç
19	AGTTTCTGTCCCTGCTCTGG	GTCCACGAGCTCCAATTC	325 bç
20	TCTATTCAAAGAATGGCACCAG	CAATGGAAATTCAAAGAAATCAC	549 bç
21	TGTGAATAAAGTCGTTACAGAAAG	CACAGTGACCCTCAATTTATCTG	310 bç
22	AAACTAATTGTGAAATTGTCTGCC	CATTGCTTCAGGCTACTGGG	380 bç
23	TGAATTATGTTTATGGCATGG	TTGAGAGTAATATGAATTTCTTGAG	317 bç
24	TGATGGTAAGTACATGGGTGTTTC	TCAGCCATTTGTGTTGGTATG	283 bç
25	TCAAATGGTGGCAGGTAGTG	GTGTCAACATGAAGCAGGC	385 bç
26	GGTTGAAAAGCTGATTGTGG	TGAGTAAAGCTGGATGGCTG	334 bç
27	TTTCTGTCCCTGCTCTGGTC	ATGAGGTGACTGTCCACG	334 bç

3.3.8 PCR ürünlerinin purifikasyonu

Elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiş pozitif PCR fragmanları Exo-SAP enzim karışımı (Amersham Life Science,UK) kullanarak purifiye edilmiştir (5:1 oranında). Saflaştırılmış PCR ürünleri yeniden agaroz jel elektroforezine tabi tutularak jelde görüntülenmiştir. Gerekli görüldüğü takdirde amplifikasyon ürünü Nanodrop Spektrofotometrede kantite edilmiştir syonu gerçekleştirilmiştir.

3.3.9 DNA sekans analizi

Saflaştırılmış PCR ürünleri BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems U.S.A) kiti kullanılarak DNA dizileme öncesi nükleotidlerin floresan işaretlemesi için ikinci PCR analizine (Cycle-Sequencing PCR) alınmıştır. Cycle-Sequencing PCR işleminden sonra elde edilecek olan 2. tur PCR ürünlerinin, BigDyeXT kiti (Applied Biosystems U.S.A) kullanılarak presipitasyonları yapılmıştır. Presipite edilerek yeniden saflaştırılmış PCR ürünleri ABI 3130XL Genetic Analyser otomatik DNA sekans sistemine yüklenerek nükleotid dizileri okunmuştur. Elde edilen diziler aynı sistemin kendi software ve SeqScape2.0 programı kullanılarak FASTA elektronik kütüphaneden elde edilen normal CFTR (NM_000492.3) gen dizisi ile karşılaştırıldı ve varolan nükleotid yerdeğişimleri ve uygun aminoasit mutasyonları kayıt edildi. Mutasyon sınıflaması Human Genome Variation Society yönetmeliğine göre yapıldı.

Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA' nın bulunduğu jelmatriks bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA' ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilmiş ve sonuçlar grafiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışma grubunda yer alan 30 birey ile yapılan CFTR geni analiz sonuçlarına göre, çalışma grubundaki bireylerde, fenotipe yansıyan yani, aminoasit değişimine neden olan 26 farklı mutasyon tespit edilmiştir. Çalışma grubundaki bireylerde, en az bir mutasyon saptanmıştır. 30 bireyde toplam mutasyon sayısı 36 olarak bulunmuştur. Bu mutasyonların 5 tanesi homozigot 31 tanesi heterozigot olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1) (Çizelge 4.2).

Analiz sonuçlarımızın fenotip skorlaması Polyphen-2 veri tabanına göre yapıldı. Bu sonuçlara göre 18 varyant patojen, 7 varyant non-patojen ve 1 varyant ise polimorfik olduğu görüldü. HGMD biyoinformatik veri tabanına göre, yapılan analizde ise aminoasit değişimlerinin hastalıklarla ilişkilendirilmesi yapılmıştır. Ayrıca aminoasit değişimlerinin polaritesi incelenmiş ve 8 tane aminoasit değişimi sonucunda polarite değişimi meydana geldiği görülmüştür (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Aminoasit değişimlerinin fenotip skorlaması HGMD/dbSNP veri tabanlarına göre olası fenotip ve polarite değişimleri

Mutasyon Nükleotid pozisyonu	Polyphen-2	HGMD/dbSNP	Olası Fenotip	Polarite	Hidrofobik/Hidrofilik
Arg74Trp	0.897	CF	patojen	polar/nonpolar	hidrofilik/hidrofobik
Glu92Lys	0.996	CF	patojen	polar/polar	hidrofilik/hidrofilik
Gly126Asp	1	CF	patojen	nonpolar/polar	hidrofobik/hidrofilik
Ile148Thr	0.29	Modifiye edici	zararsız	nonpolar/polar	hidrofobik/hidrofilik
Lys174X^a	kayıt yok	kayıt yok	patojen	polar/-	hidrofilik/-
Gly178Arg	1	CF	patojen	nonpolar/polar	hidrofobik/hidrofilik
Leu183Ile	0.184	CF	zararsız	nonpolar/nonpolar	hidrofobik/hidrofobik
Arg297Gln	0.132	CF	zararsız	polar/polar	hidrofilik/hidrofilik
Arg347Pro	1	CF (mild)	patojen	polar/nonpolar	hidrofilik/hidrofobik
Glu379X	kayıt yok	CF	patojen	polar/-	hidrofilik/-
Thr388Met	0.65	Astım	patojen	polar/nonpolar	hidrofilik/hidrofobik
Met470Val	0.0	Solunum/Pankreas hastalıkları ile ilişkili	polimorfik	nonpolar/nonpolar	hidrofobik/hidrofobik
Met472Val^a	0.029	kayıt yok	zararsız	nonpolar/nonpolar	hidrofobik/hidrofobik
Phe508del	kayıt yok	CF	patojen	nonpolar/-	hidrofobik/-

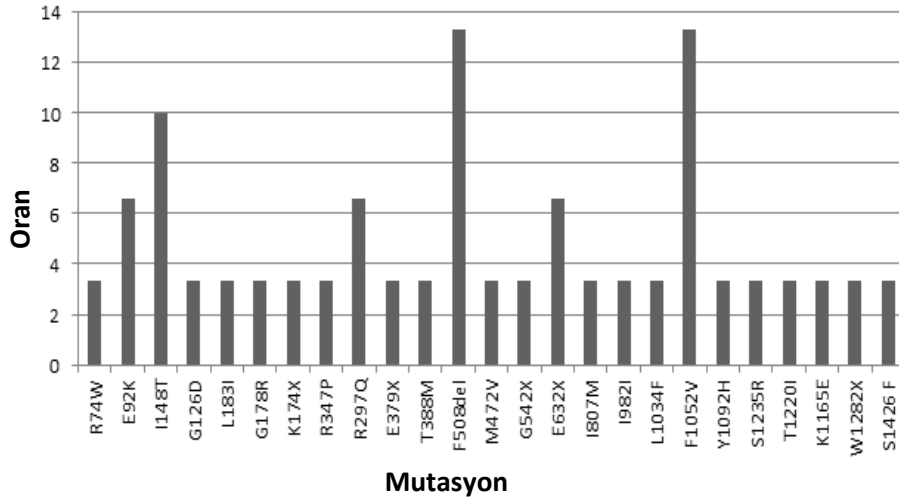
Çizelge 4.1 Aminoasid değişimlerinin fenotip skorlaması HGMD/dbSNP veri tabanlarına göre olası fenotipleri ve polarite değişimleri (devam)

Mutasyon Nükleotid pozisyonu	Polyphen-2	HGMD/dbSNP	Olası Fenotip	Polarite	Hidrofobik/Hidrofilik
Gly542X	kayıt yok	CF	patojen	nonpolar/-	hidrofilik/-
Glu632X^a	kayıt yok	kayıt yok	patojen	polar/-	hidrofilik/-
Ile807Met	0.996	polimorfizm	patojen	nonpolar/nonpolar	hidrofobik/hidrofobik
Ile982Ile^a	0	kayıt yok	zararsız	nonpolar/nonpolar	hidrofobik/hidrofobik
Leu1034Phe^a	1	kayıt yok	patojen	nonpolar/nonpolar	hidrofobik/hidrofobik
Phe1052Val	0.99	CF	patojen	nonpolar/nonpolar	hidrofobik/hidrofobik
Tyr1092His	1	CF	patojen	polar/polar	hidrofilik/hidrofilik
Lys1165Glu^a	0.859	kayıt yok	patojen	polar/polar	hidrofilik/hidrofilik
Ser1235Arg	0.41	CF	zararsız	polar/polar	hidrofilik/hidrofilik
Thr1220Ile	0	kayıt yok	zararsız	polar/nonpolar	hidrofilik/hidrofobik
Trp1282X	-	CF	patojen	nonpolar/-	hidrofobik/-
Ser1426 Phe	0.99	Obstruktif azosperm	patojen	polar/nonpolar	hidrofilik/hidrofobik

a. Yeni mutasyonlar (Lys174X, Met472Val, Glu632X, Ile982Ile, Leu1034Phe, Lys1165Glu)

Çizelge 4.2 Çalışma grubundaki mutasyonların görülme sıklığı

Mutasyonlar	Mutasyonların Görülme Sıklığı (%)	Hastaların sayısı	
		Homozigot	Heterozigot
R74W	3.3	0	1
E92K	6.6	1	1
I148T	10	0	3
G126D	3.3	0	1
L183I	3.3	0	1
G178R	3.3	1	0
K174X	3.3	0	1
R297Q	6.6	1	1
R347P	3.3	0	1
E379X	3.3	0	1
T388M	3.3	0	1
M472V	3.3	0	1
F508del	13.3	1	3
G542X	3.3	1	0
E632X	6.6	0	2
I807M	3.3	0	1
I982I	3.3	0	1
L1034F	3.3	0	1
F1052V	13.3	0	4
Y1092H	3.3	0	1
K1165E	3.3	0	1
T1220I	3.3	0	1
S1235R	3.3	0	1
W1282X	3.3	0	1
S1426 F	3.3	0	1
Toplam		5	31



Şekil 4.1. Çalışma grubuna ait mutasyon görülme oranlarının grafiği.

Sağlıklı grupta 25 birey analize dahil edildi. Çalışma grubunda gözlenen mutasyonlardan sadece p.Val470Met aminoasit değişimi sağlıklı grubun 12 bireyinde’de gözlemlendi ve geri kalan 13 bireyde ise hiçbir mutasyon gözlenmedi (çizelge 4.3). Bu yüzden p.Val470Met aminoasit değişiminin fenotipik bir anlamı olmayan polimorfik değişim olarak değerlendirildi.

Çizelge 4.3 Sağlıklı (kontrol) grupta saptanan mutasyon ve polimorfizmler

Ekzon	Amino asit /Nükleotid Değişimi	Normal																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
E.11	p.Val470Met c.1408A>G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

- :Mavi renk amino asit değişimi olmayan normal bireyi ifade eder
- :Yeşil renk aminoasit değişimi bakımından heterozigot normal bireyi ifade eder
- :Kırmızı renk amino asit değişimi bakımından homozigot normal bireyi ifade eder

Çalışma grubunda, p.V470M alleli hariç, toplam 36 mutasyon gözlenmiştir. Buna göre, 3.ekzonda 1 mutasyon, 4. ekzonda 6 mutasyon, 5. ekzonda 3 mutasyon, 8.ekzonda 3 mutasyon, 9. ekzonda 2 mutasyon, 11.ekzonda 5 mutasyon, 12. ekzonda 1 mutasyon, 14. ekzonda 2 mutasyon, 15.ekzonda 1 mutasyon, 18.ekzonda 1 mutasyon, 19.ekzonda 1 mutasyon, 20 ekzonda 5 mutasyon, 22 ekzonda 3 mutasyon 23. ekzonda 1 mutasyon 27.ekzonda 1 mutasyon saptanmıştır. Ayrıca 11.ekzonda p.V470M aminoasit değişimi 22 bireyde gözlenmiştir. (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Çalışma grubunda saptanan mutasyonlar

Ekzon	Amino Asit Değişimi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
E.3	Arg74Trp																															
E.4	Glu92Lys																															
	Gly126Asp																															
	Ile148Thr																															
E.5	Lys174X																															
	Gly178Arg																															
	Leu183Ile																															
E.8	Arg297Gln																															
	Arg347Pro																															
E.9	p.Glu379X																															
	p.Thr388Met																															
E.11	p.Val470Met																															
	p.Phe508del																															
	p.Met472Val																															
E.12	p.Gly542X																															
E.14	p.Glu632X																															
E.15	p.Ile807Met																															
E.18	p.Ile982Ile																															
E.19	p.Leu1034Phe																															
E.20	p.Phe1052Va																															
	p.Tyr1092His																															
E.22	p.Ser1235Arg																															
	p.Thr1220Ile																															
	p.Lys1165Glu																															
E.23	p.Trp1282X																															
E.27	p.Ser1426 Phe																															

 :Heterozigot amino asit değişimini ifade eder

 :Homozigot amino asit değişimini ifade eder

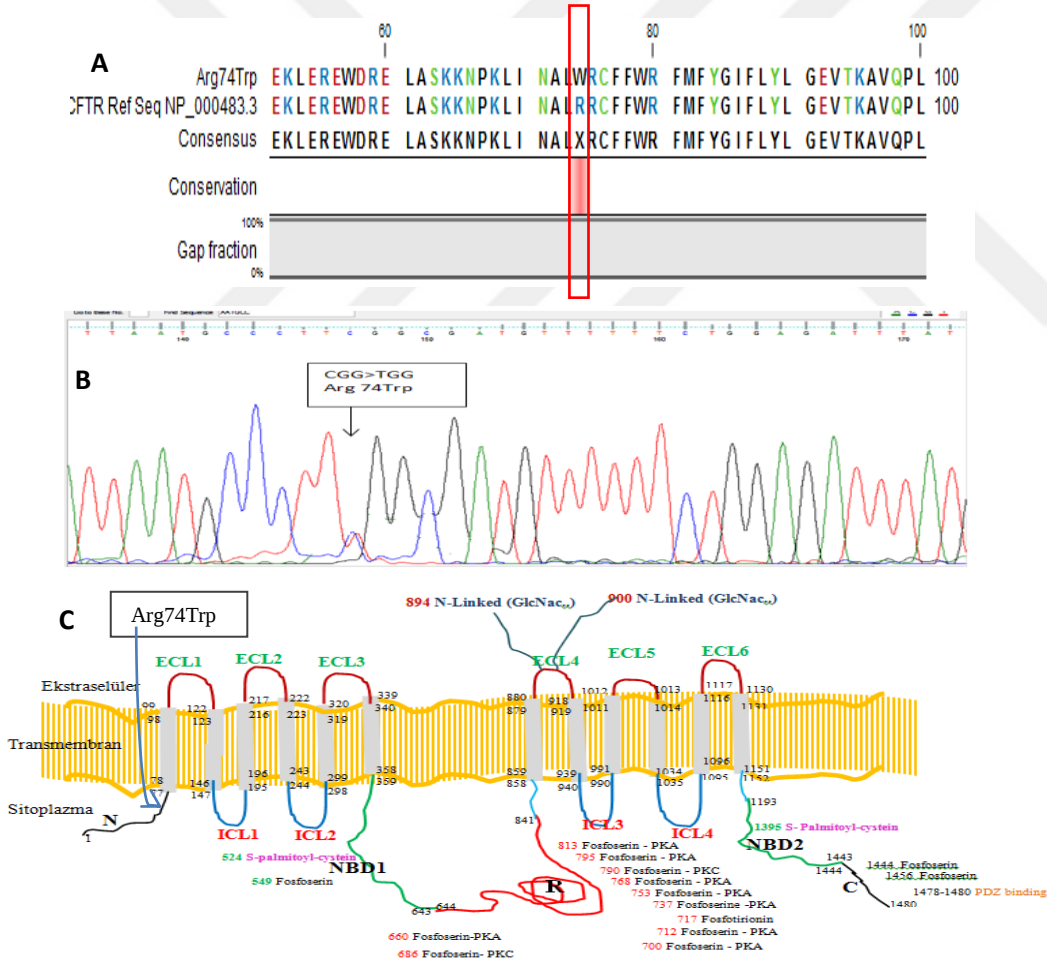
Çalışma grubunda saptanan ekzon 11’de buluna p.V470M mutasyonu sağlıklı grupta yüksek oranda saptandığı için polimorfizm olarak değerlendirildi. Bu aminoasit değişimi CFTR geninin MSD1 domaininde yer almaktadır. Ayrıca; K174X, M472V, E632X, I982I, L1034F, K1165E, mutasyonları, ilk defa bu çalışmayla tespit edilmiştir.

4.1 Çalışma Grubundaki Ham Verilerin Biyoinformatik Analizi

Ham veriler, CLC Genomics Workbench 9.5.3 DNA dizileme programı kullanılarak biyoinformatik anlızi yapıldı.

4.1.1 p.Arg74Trp aminoasid değışimi

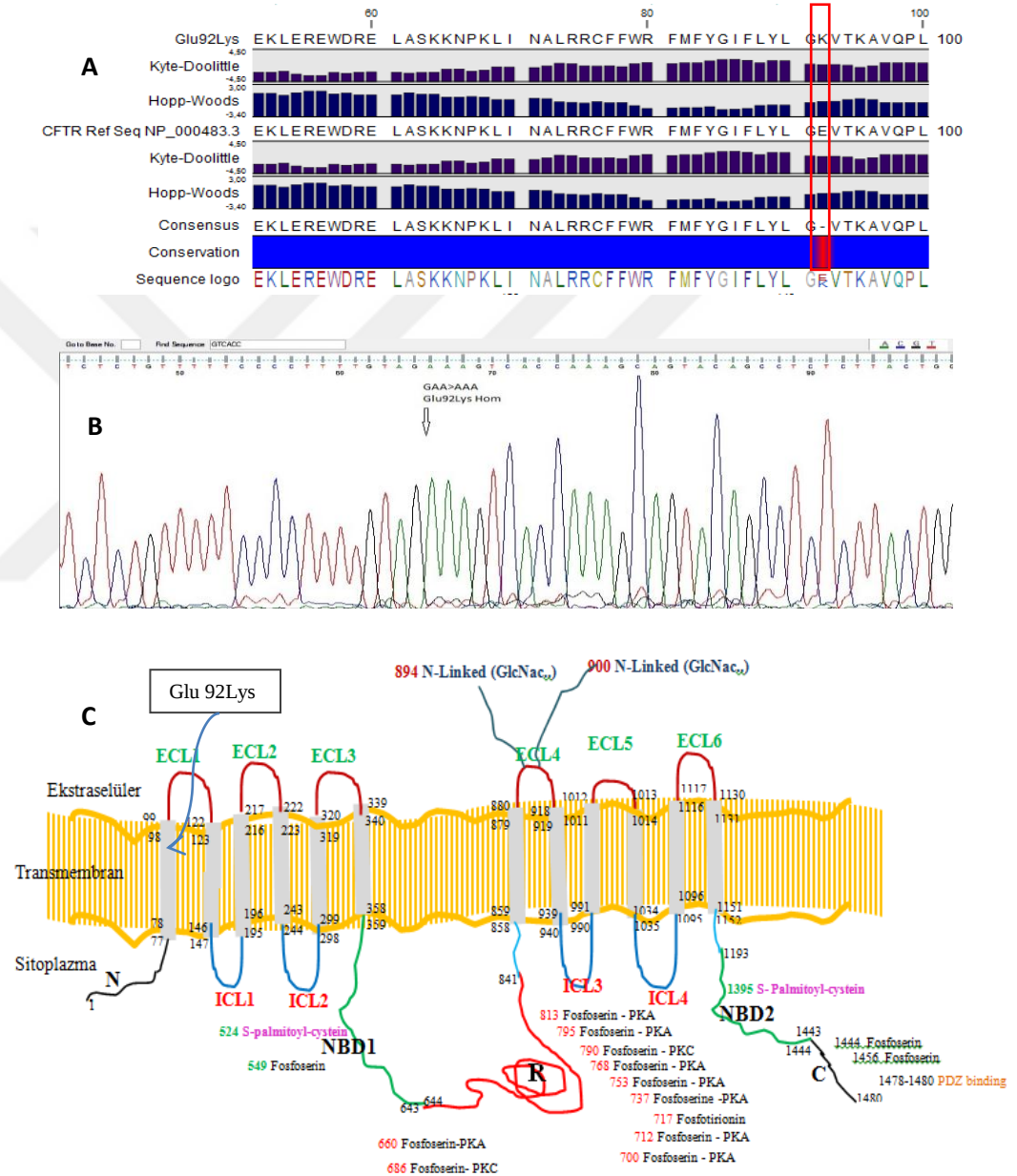
p.Arg74Trp aminoasid değışimi polyphen-2 veri tabanına göre 0,897 skorla olası patojeniteye sahiptir. HGMD veri tabanı kayıtlarında ise klinik bulgusu kayıtlı değildir. Ayrıca informatik analizlerimize göre, bu değışim bir poslar arginin aminoasid'nin nonpolar triptofan aminoasidine dönüşmesiyle polarite farklılığı yaratmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. A) p.Arg74Trp heterozigot aminoasid değışimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değışimleri. **B)** Chromas programı kullanarak, Arg74Trp aminoasid değışimine neden olan CGG>TGG nükleotid yerdışişimlerinin görüntüsü **C)** Aminoasit değışimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.2 p.Glu92Lys aminoasid değişimi

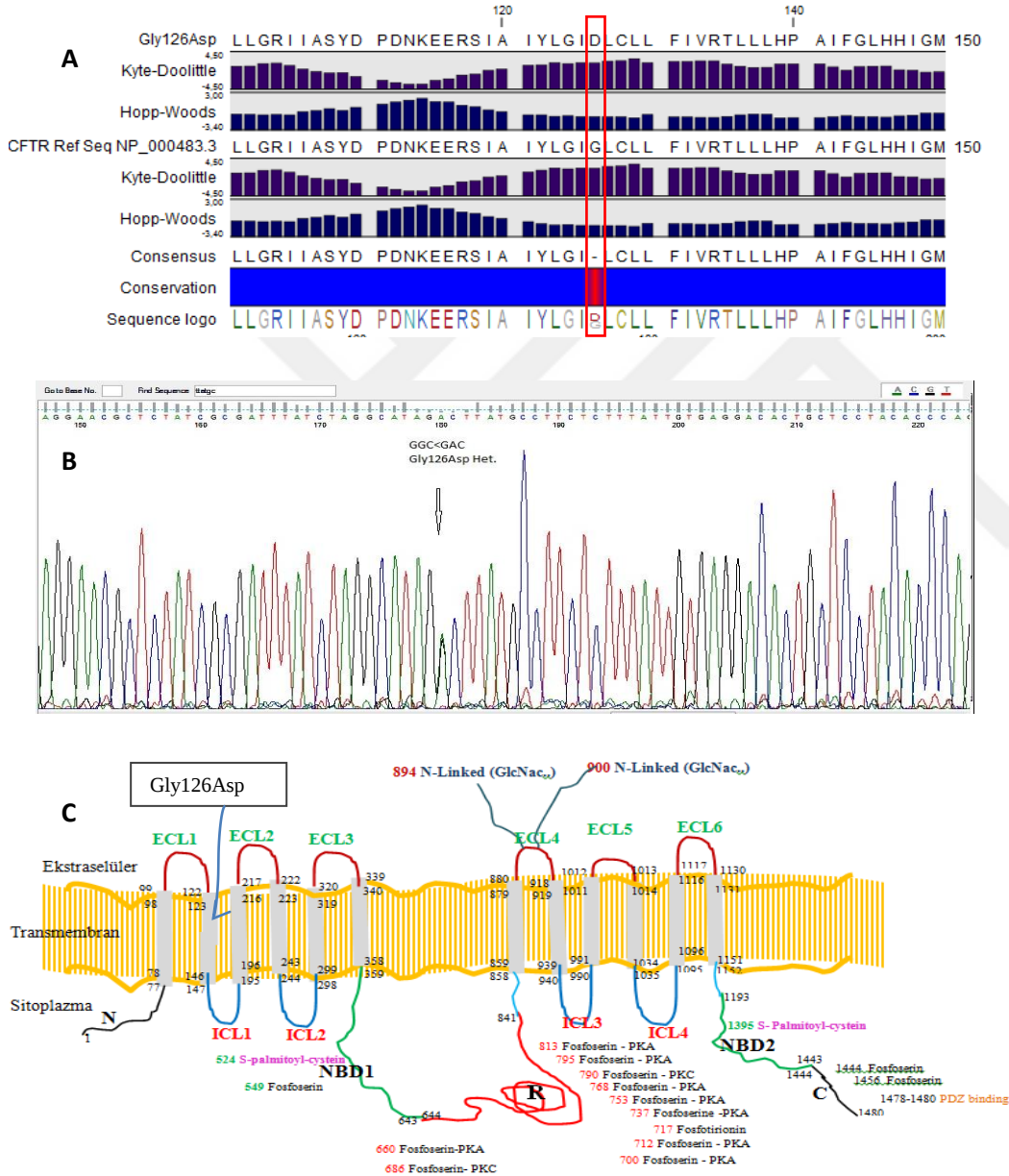
p.Glu92Lys aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 0,996 skorla olası patojeniteye sahiptir. HGMD veri tabanı kayıtlarında ise klinik bulgusu CF olarak belirtilmiştir. Ayrıca informatik analizlerimize göre, bu değişim herhangi bir polarite farklılığı yaratmamıştır (şekil 4.3).



şekil 4.3. A) p. Glu92Lys homozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hopp-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Glu92Lys aminoasid değişimine neden olan GAA>AAA nükleotid yerdęiřimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.3 p.Gly126Asp aminoasid değişimi

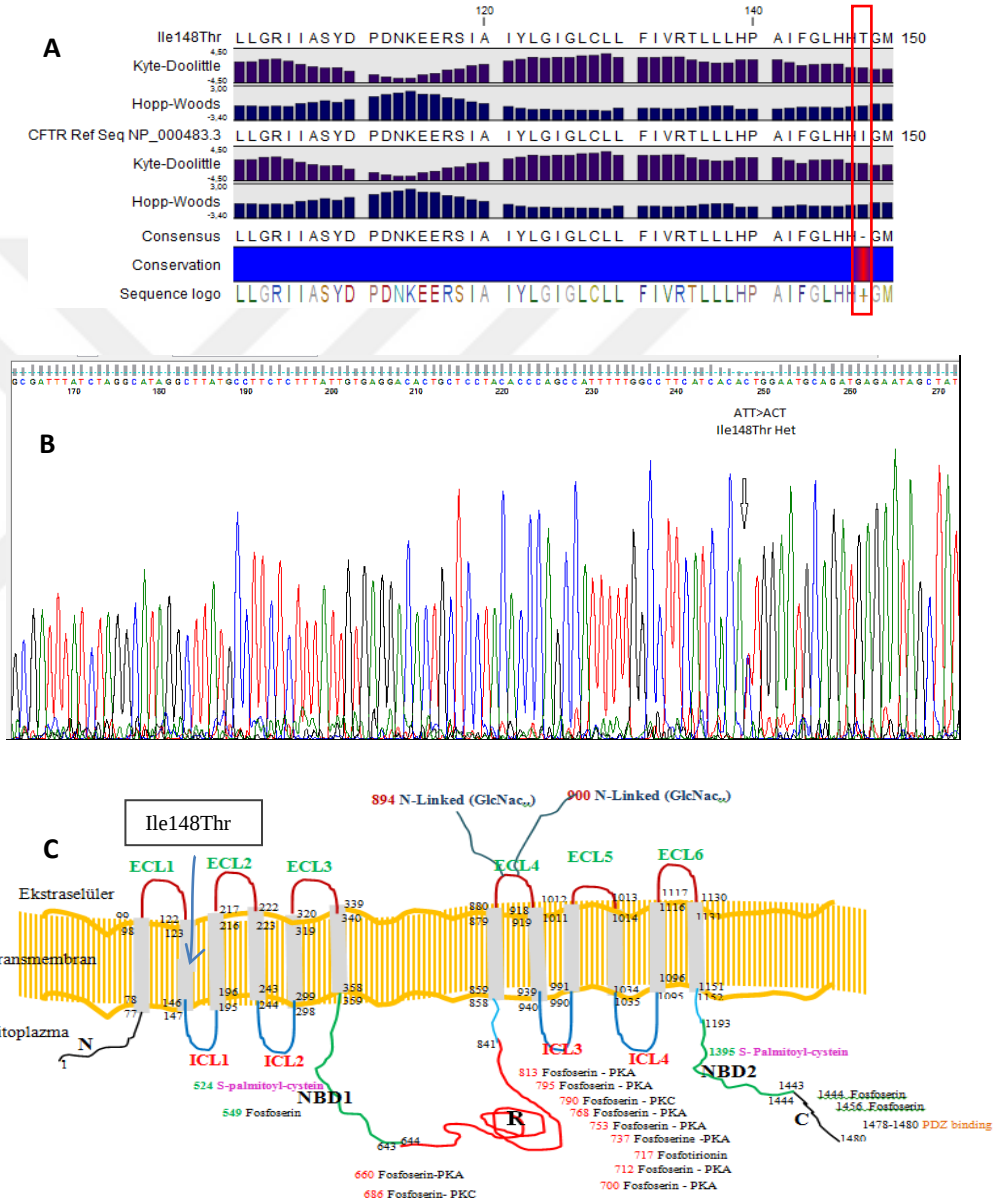
p.Gly126Asp aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 1.0 skorla olası patojeniteye sahiptir. HGMD veri tabanı kayıtlarında ise klinik bulgusu CF olarak belirtilmiştir. Ayrıca informatik analizlerimize göre bu değişim nonpolar > polar dönüşümü ile polarite değişimide yaratmıştır (şekil 4.4).



şekil 4.4. A) p.Gly126Asp heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. **B)** Chromas programı kullanılarak, Gly126Asp aminoasid değişimine neden olan GGC>GAC nükleotid yerdęiřimlerinin görüntüsü **C)** Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.4 p.Ile148Thr aminoasid değişimi

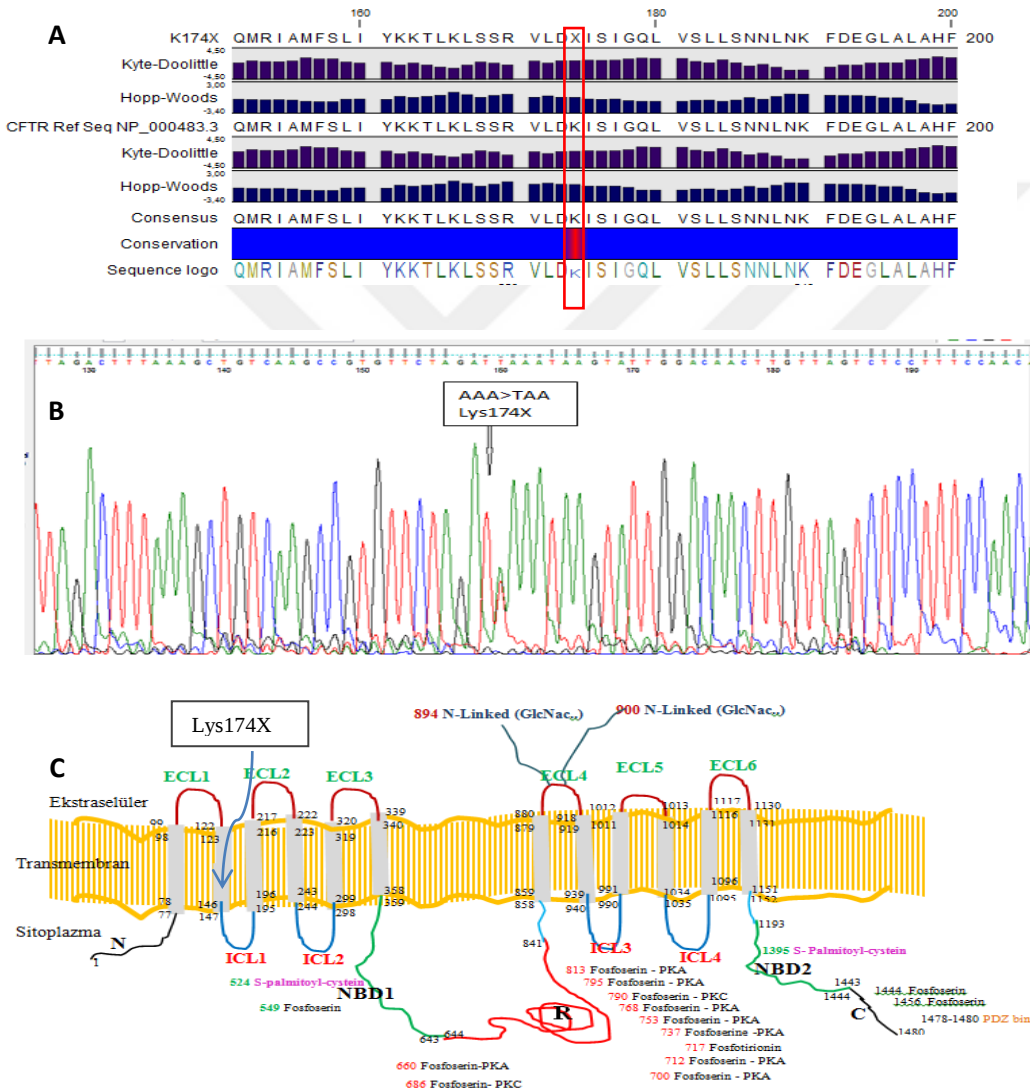
p.Ile148Thr aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 0,29 skorla olası zararsız fenotipik etkiye sahiptir. HGMD veri tabanı kayıtlarında ise klinik bulgusu modifiye edici olarak belirtilmiştir. Ayrıca informatik analizlerimize göre bu değişim nonpolar>polar dönüşümü ile polarite farklılığı yaratmıştır (şekil 4.5).



şekil 4.5. **A)** p.Ile148Thr heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. **B)** Chromas programı kullanarak, Ile148Thr aminoasid değişimine neden olan ATT>ACT nükleotid yerdşişimlerinin görüntüsü **C)** Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.5 p.Lys174X aminoasid değişimi

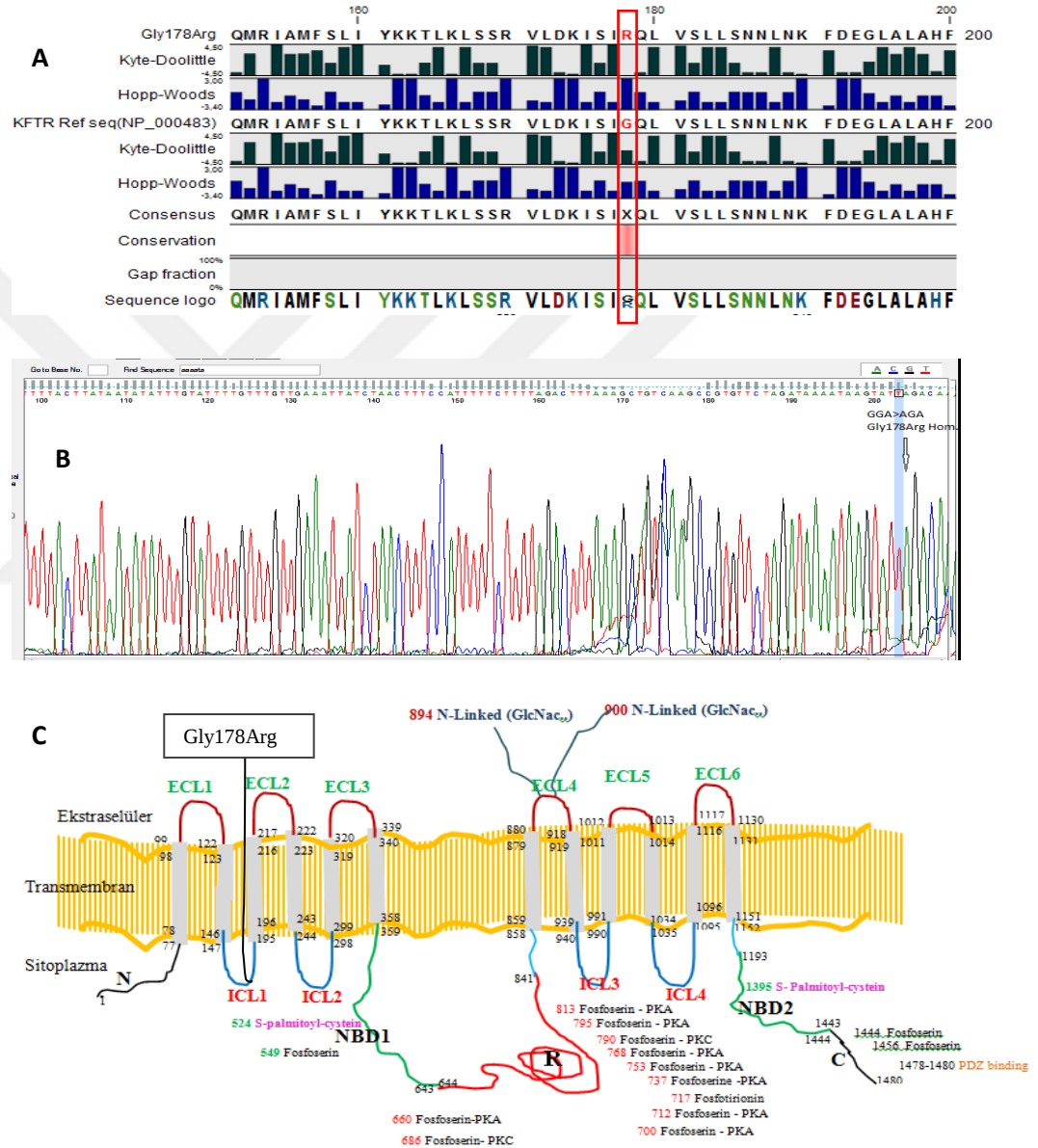
p.Lys174X aminoasid değişimi nonsense mutasyon olduğundan polyphen-2 veri tabanına göre skorlama göstermez. Ancak stop kodon mutasyonları prematüre CFTR proteini oluşturduğu için, poatojen etkiye sahiptir. Ayrıca bu mutasyon ilk kez bu tez çalışmasında saptandığı için, HGMD ve diğer CF veri tabanı kayıtlarında herhangi bir kayıt bulunmamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. A) p.Lys174X heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Ile174X aminoasid değişimine neden olan AAA>TAA nükleotid yerdğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.6 p.Gly178Arg aminoasid değişimi

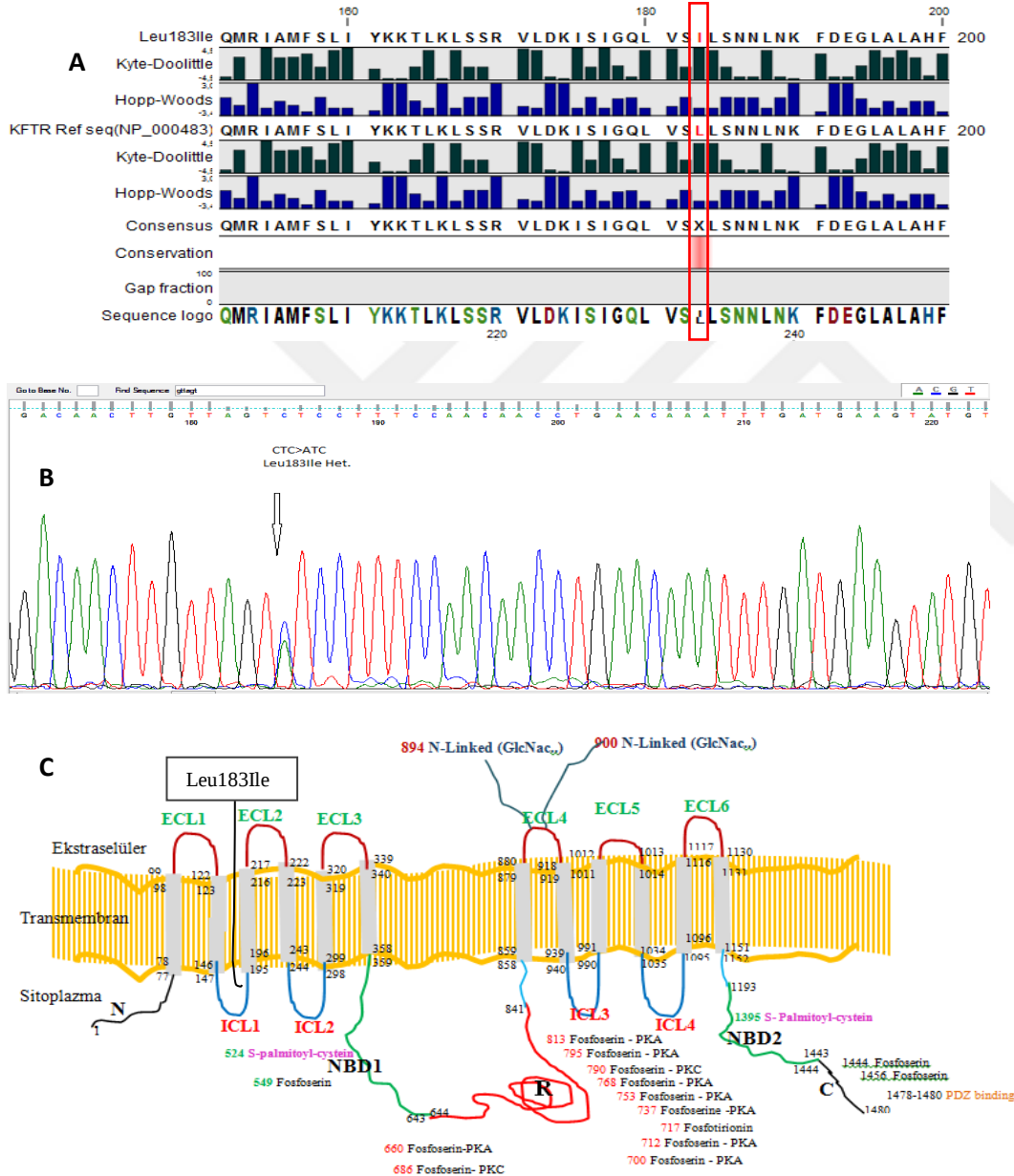
p.Gly178Arg aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 1,0 skorla olası olası patojen etkiye sahiptir. HGMD veri tabanı kayıtlarında ise, klinik bulgusu CF olarak belirtilmiştir. Ayrıca informatik analizlerimize göre, bu değişim nonpolar>polar dönüşüm ile polarite farklılığı yaratmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. A) p.Gly178Arg homozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hopp-Woods) değişimleri. **B)** Chromas programı kullanılarak, Gly178Arg aminoasid değişimine neden olan GGA>AGA nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü **C)** Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.7 p.Leu183Ile aminoasid değişimi

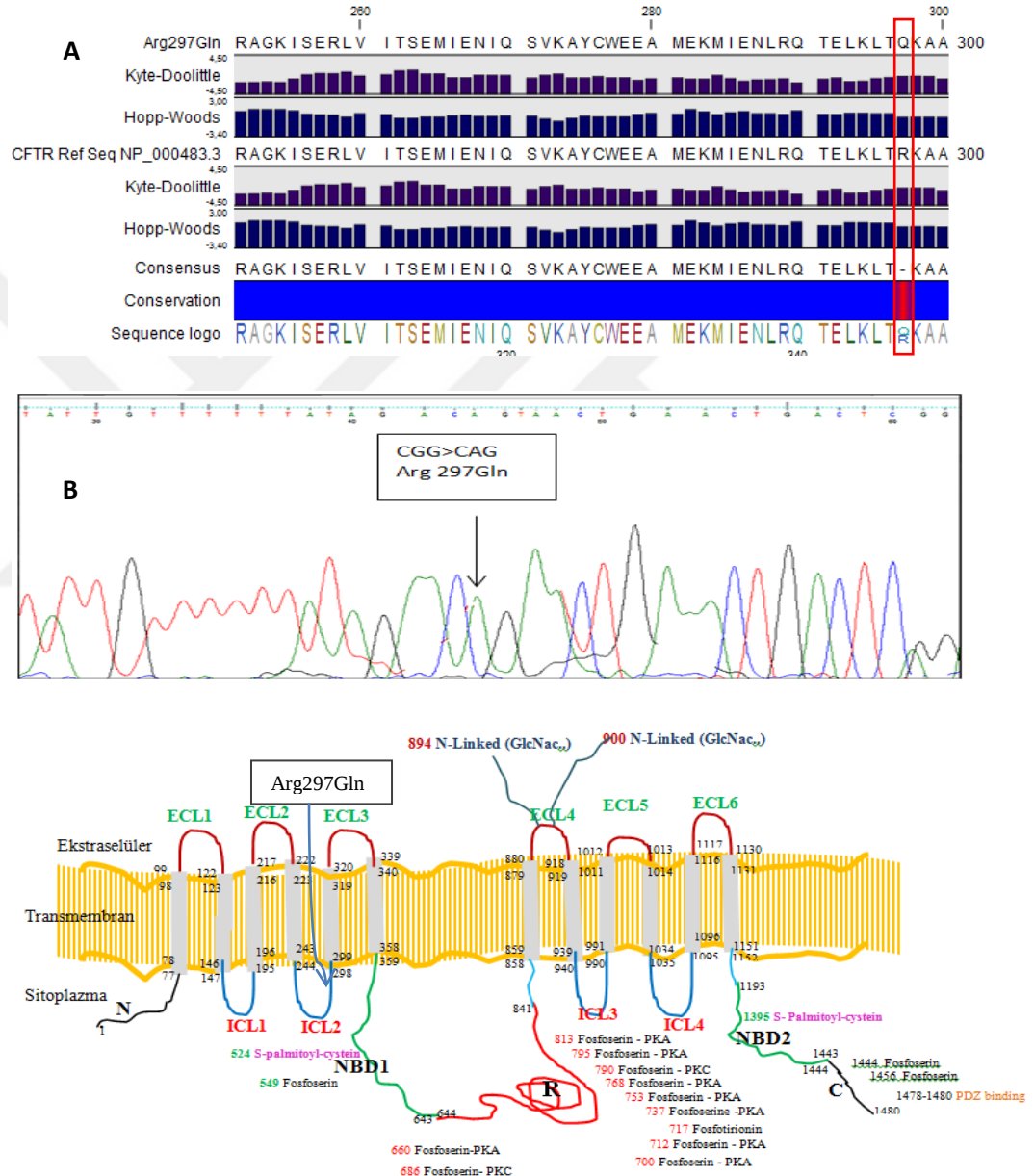
p.Leu183Ile aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 0,184 skorla olası zararsız fenotip etkiye sahiptir. Ancak HGMD veri tabanı kayıtlarında ise, klinik bulgusu CF olarak belirtilmiştir. Ayrıca informatik analizlerimize göre bu değişim polarite farklılığı yaratmamıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. A) p.Leu183Ile heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. **B).** Leu183Ile aminoasid değişimine neden olan CTC>ATC nükleotid yerdğişiminin görüntüsü **C)** Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.8 p.Arg297Gln aminoasid değişimi

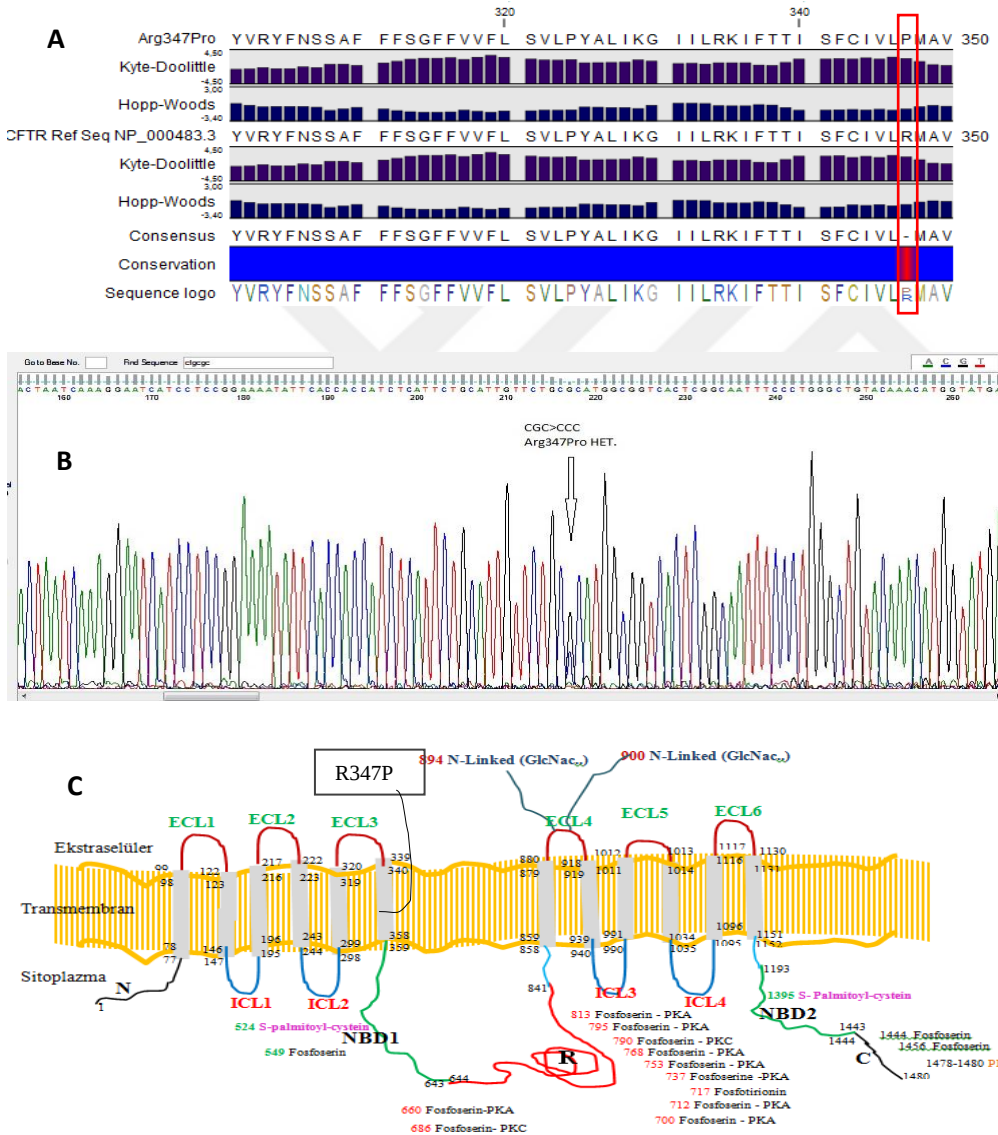
p.Arg297Gln aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 0,132 skorla olası zararsız fenotip etkiye sahiptir. Ancak HGMD veri tabanı kayıtlarında ise, klinik bulgusu CF olarak belirtilmiştir. Ayrıca informatik analizlerimize göre bu değişim polarite farklılığı yaratmamıştır (şekil 4.9).



şekil 4.9. A) p.Arg297Gln homozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Arg297Gln aminoasid değişimine neden olan CGG>CAC nükleotid yerd ğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.9 p.Arg347Pro aminoasid değişimi

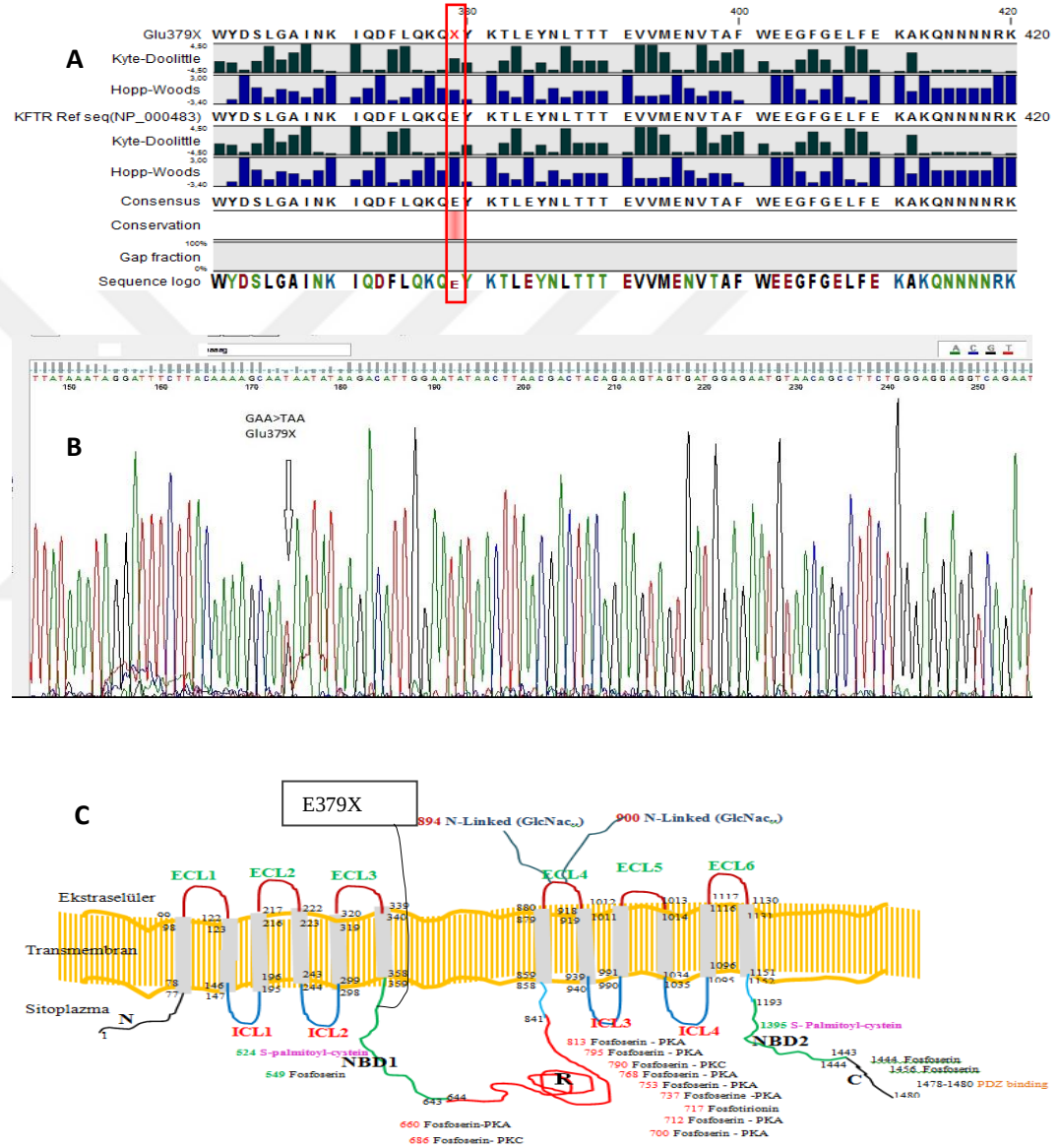
p.Arg347Pro aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 1,0 skorla olası patojen fenotip etkiye sahiptir. HGMD veri tabanı kayıtlarında ise, klinik bulgusu CF(mild) olarak belirtilmiştir. Ayrıca informatik analizlerimize göre, bu değişim polar>nonpolar polarite farklılığı yaratmıştır (şekil 4.10).



şekil 4.10 A) p.Arg347Pro heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, . Arg347Pro aminoasid değişimine neden olan CGC>CCC nükleotid yerdęiřimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.10 p.Glu379 X aminoasid değişimi

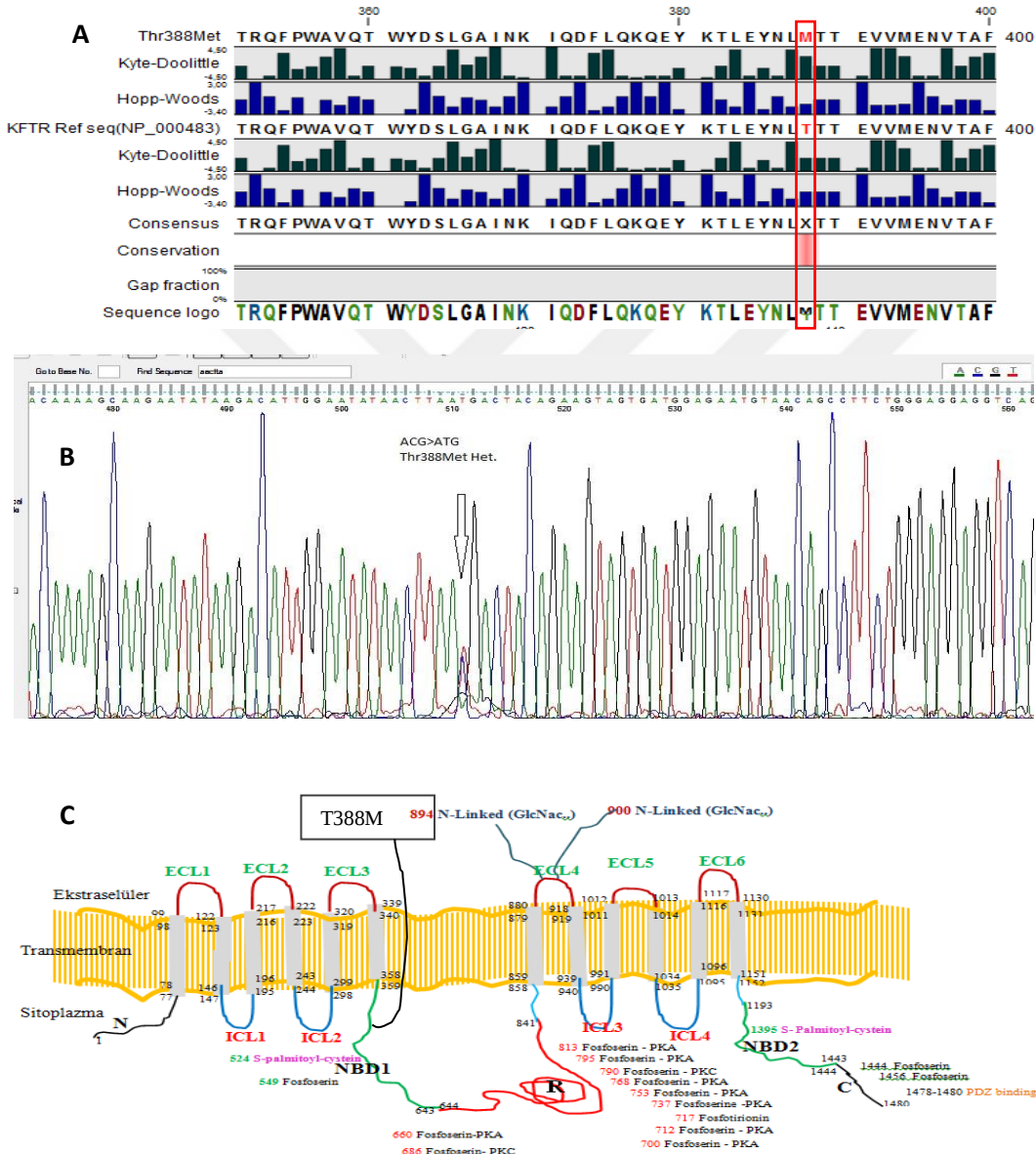
p.Glu379X aminoasid değişimi nonsense mutasyon olduğu için, polyphen-2 veri tabanına göre skorlama göstermez. Ancak stop kodon mutasyonları prematüre CFTR proteini oluşturduğu için, olası poatojen etkiye sahiptir. HGMD ve diğer CF veri tabanı kayıtlarında klinik bulgusu CF olarak belirtilmiştir (şekil 4.11).



şekil 4.11. A) p.Glu379X heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. **B)** Chromas programı kullanılarak, Glu379X aminoasid değişimine neden olan GAA>TAA nükleotid yerdiişimlerinin görüntüsü **C)** Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.11 p.Thr388Met aminoasid değişimi

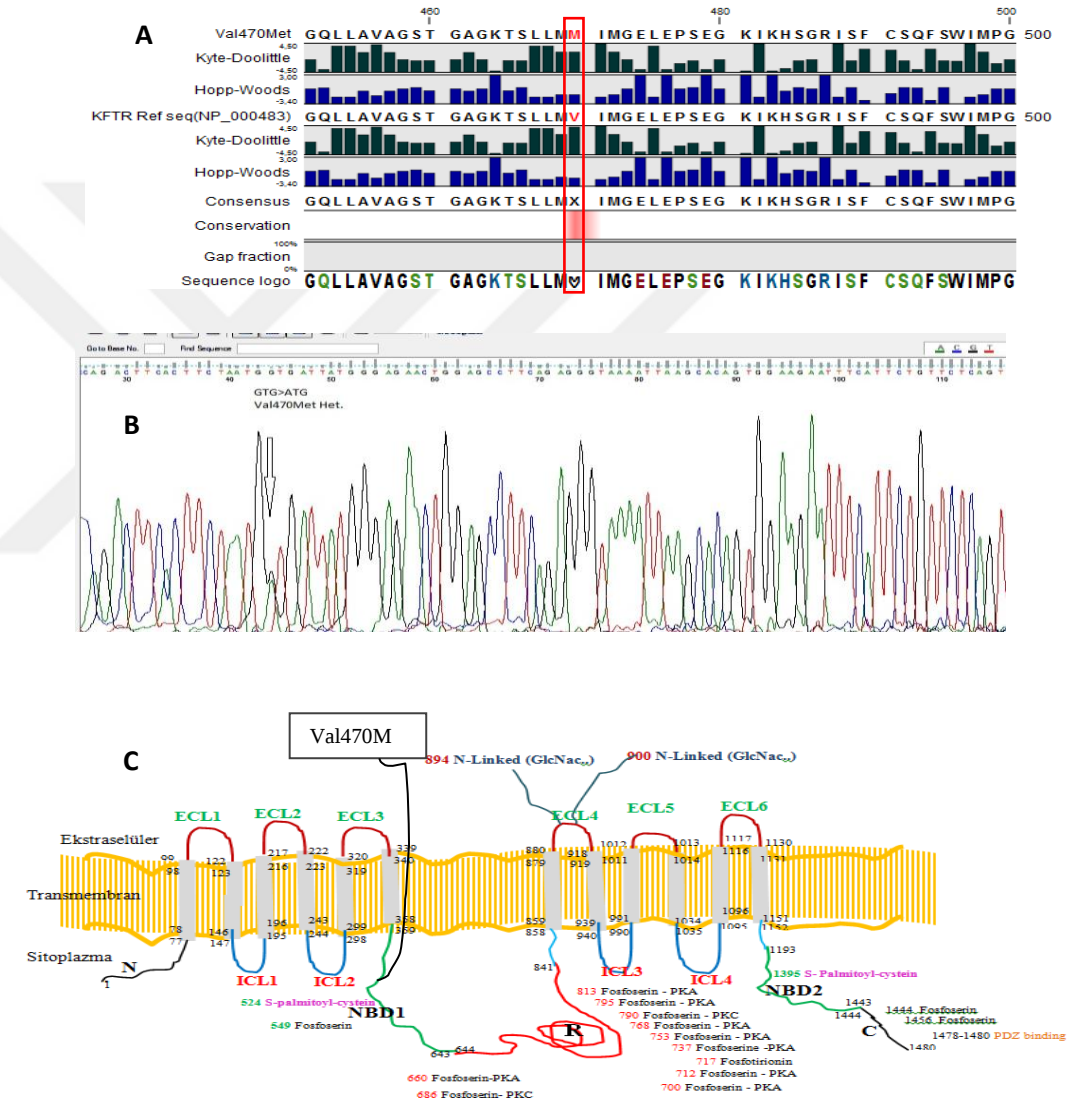
p.Thr388Met aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre, 0,65 skorla olası patojen fenotip etkiye sahiptir. HGMD veri tabanı kayıtlarında ise, klinik bulgusu astım olarak belirtilmiştir. Ayrıca informatik analizlerimize göre, bu değişim nonpolar>polar dönüşümüyle polarite farklılığı yaratmıştır (şekil 4.12).



şekil 4.12. A) p.Thr388Met heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, . Thr388Met aminoasid değişimine neden olan ACG>ATG nükleotid yerdğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.12 p.Val470Met aminoasid değişimi

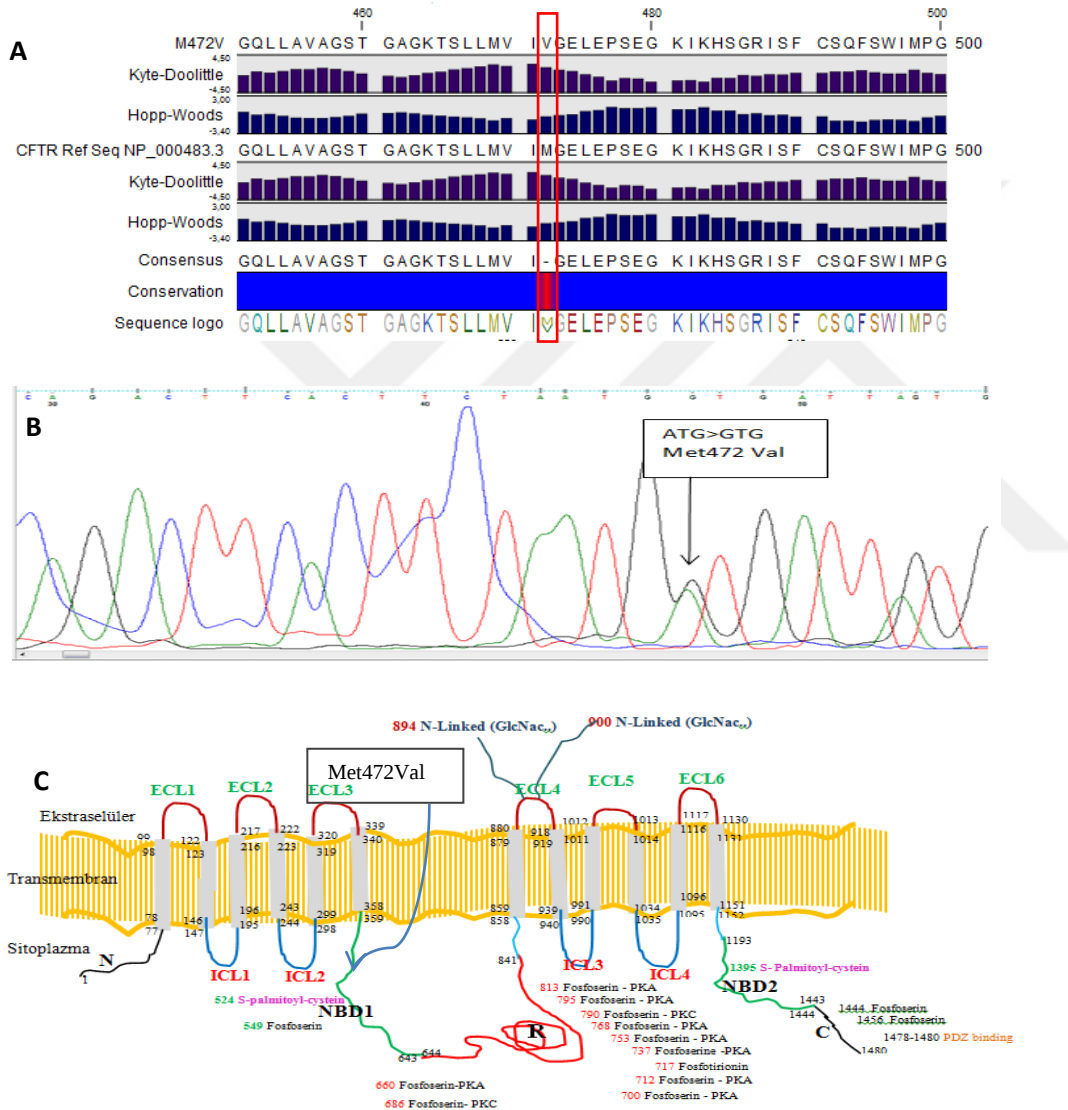
p.Val470Met aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 0,0 skorla polimorfik olduğu belirlenmiştir. Ancak HGMD veri tabanı kayıtlarında ise klinik bulgusu solunum ve pankreas hastalıkları ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca informatik analizlerimize göre bu değişim polarite farklılığı yaratmıştır (şekil 4.13).



Şekil 4.13. A) p.Val470Met heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Val470Met aminoasid değişimine neden olan GTG>ATG nükleotid yerdğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.13 p.Met472Val aminoasid değişimi

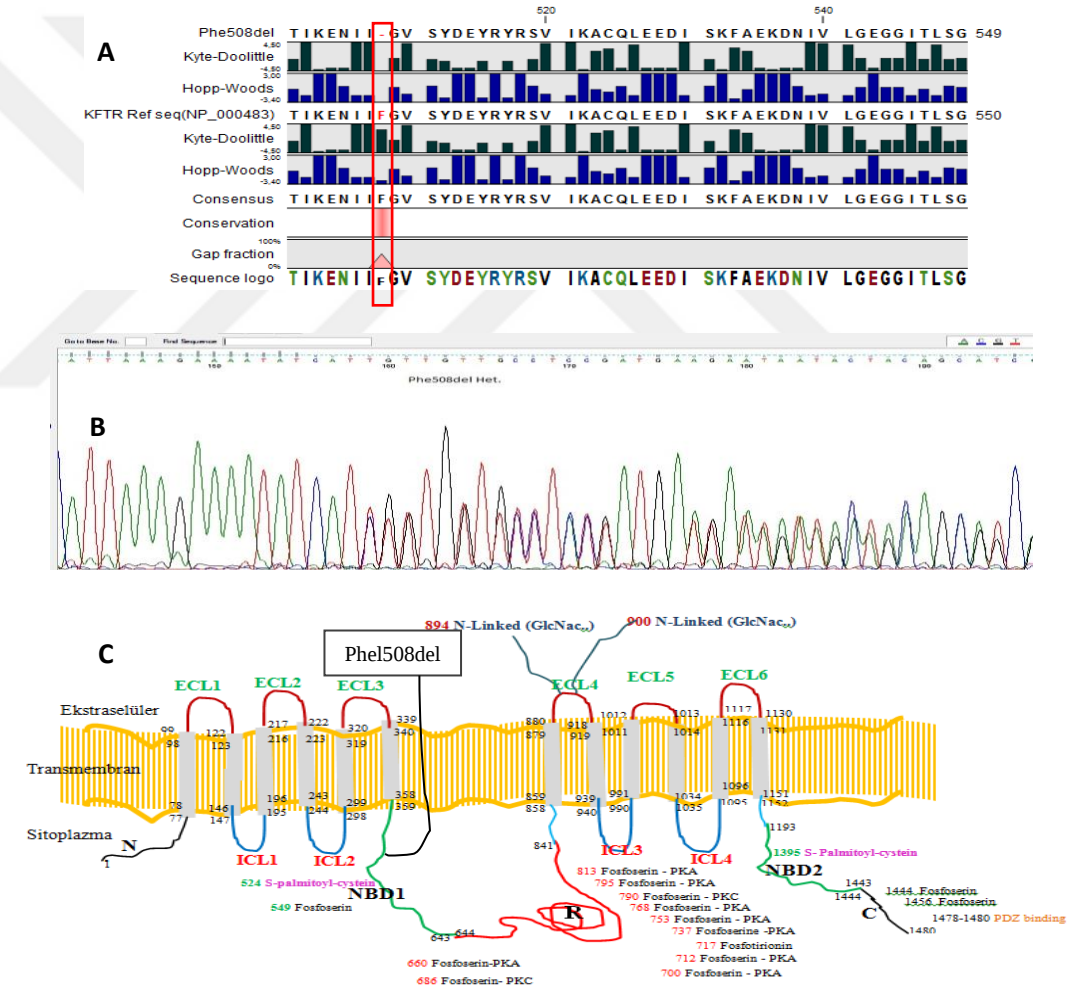
p.Val472Met bu aminoasid değişimi ilk kez bu çalışmada bulunduğu için, HGMD ve diğer CF veri tabanlarında, kayıt bulunmamıştır. Ancak bu aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 0,029 skorla olası zararsız fenotip etkiye sahiptir. Ayrıca informatik analizlerimize göre bu değişim polarite farklılığı yaratmamıştır (şekil 4.14).



şekil 4.14. A) p. Met472Val heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, .p. M472V aminoasid değişimine neden olan ATG>GTG nükleotid yerdėiřimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.14 p.Phe508del aminoasid değişimi

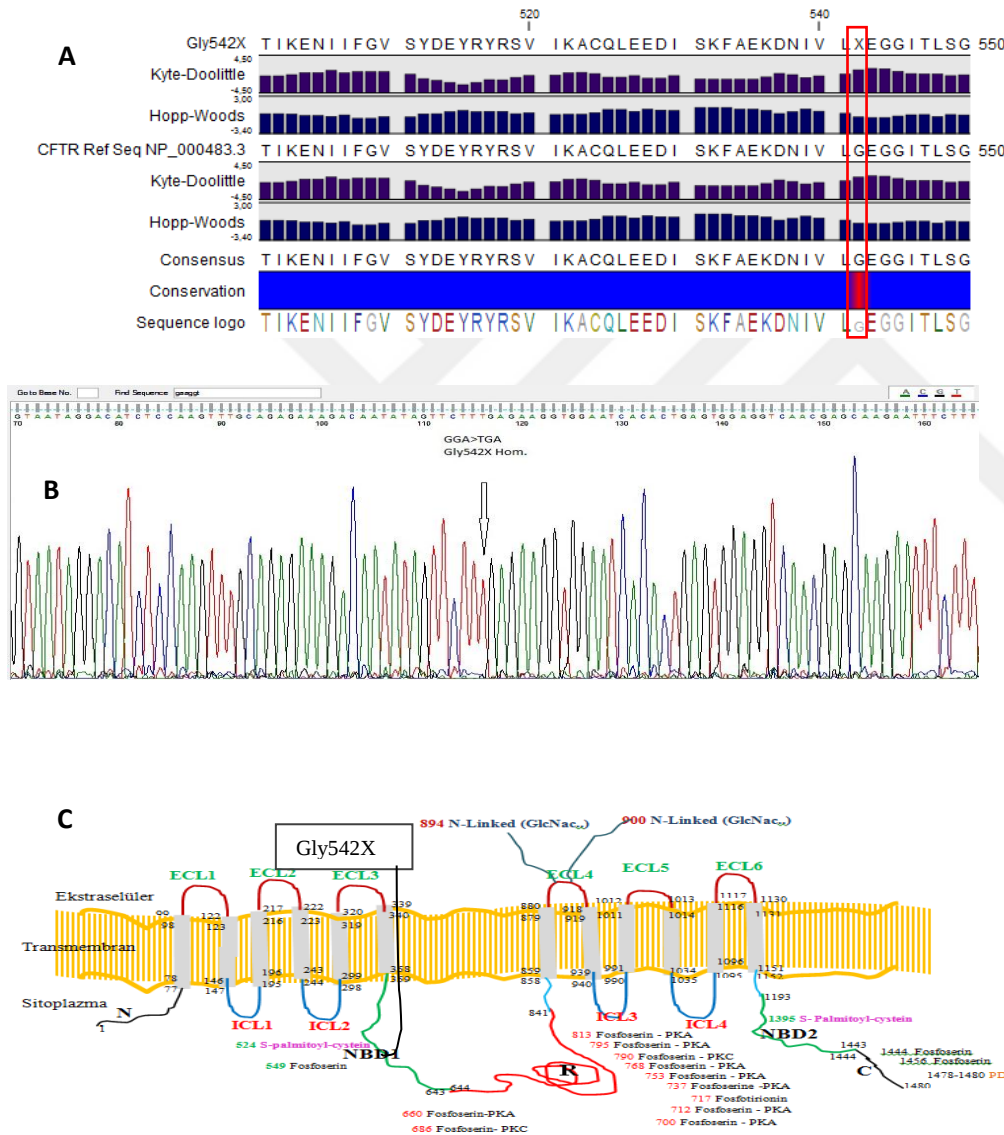
p.Phe508del aminoasid değişimi 508.pozisyonunda Phe (fenilalanin) aminoasidinin silinmesiyle sonuçlandığı için çerçeve kayması (frameshift) yaratmıştır. Bu değişim delesyonla sonuçlandığı için, Polyphen-2 veri tabanına göre fenotip skorlama göstermez. Ancak HGMD ve diğer CF veri tabanı kayıtlarına göre, ciddi CF kliniği göstermektedir. İnfomatik analizlerimize göre ise 508. Pozisyonadaki Phe aminoasidi NBD1'in α helikal alt bölgesinde lokalize olup nonpolar özellik göstermesine karşın, delesyon sonucu polarite değişimi gözlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. A) p.Phe508del heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hopp-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanılarak, Phe508del aminoasid değişimine neden olan nükleotid yerdışımlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.15 p.Gly542X aminoasid değişimi

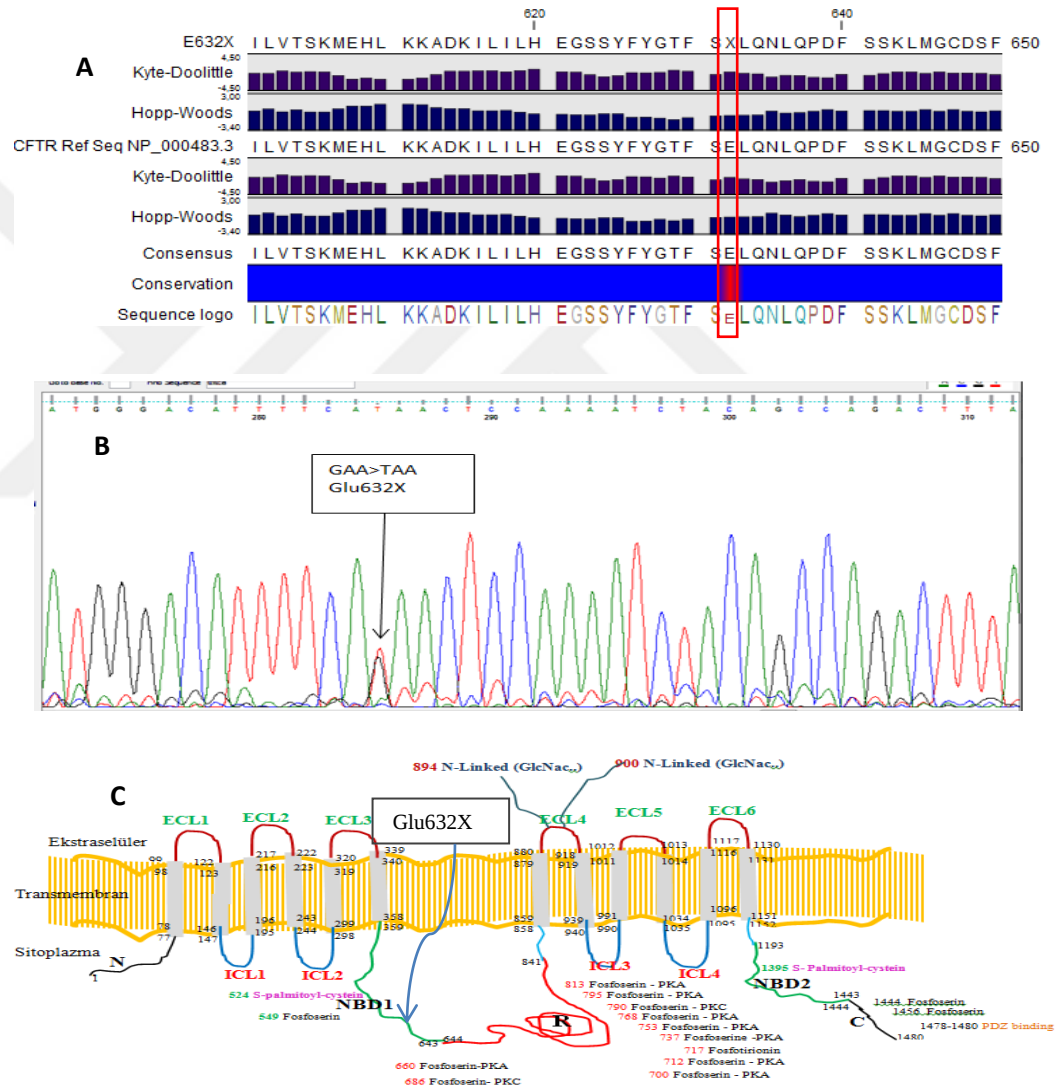
p.Gly542X aminoasid değişimi nonsense mutasyon olduğundan polyphen-2 veri tabanına göre skorlama göstermez. Ancak stop kodon mutasyonları prematüre CFTR proteini oluşturduğundan olası poatojen etkiye sahiptir. Ayrıca HGMD ve diğer CF veri tabanı kayıtlarına göre bu aminoasid değişimi CF kliniğinin oluşmasına neden olmaktadır (şekil 4.16).



şekil 4.16. A) p.Gly542X homozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Gly542X aminoasid değişimine neden olan GGA>TGA nükleotid yerdęiřimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.16 p. Glu632 X aminoasid değişimi

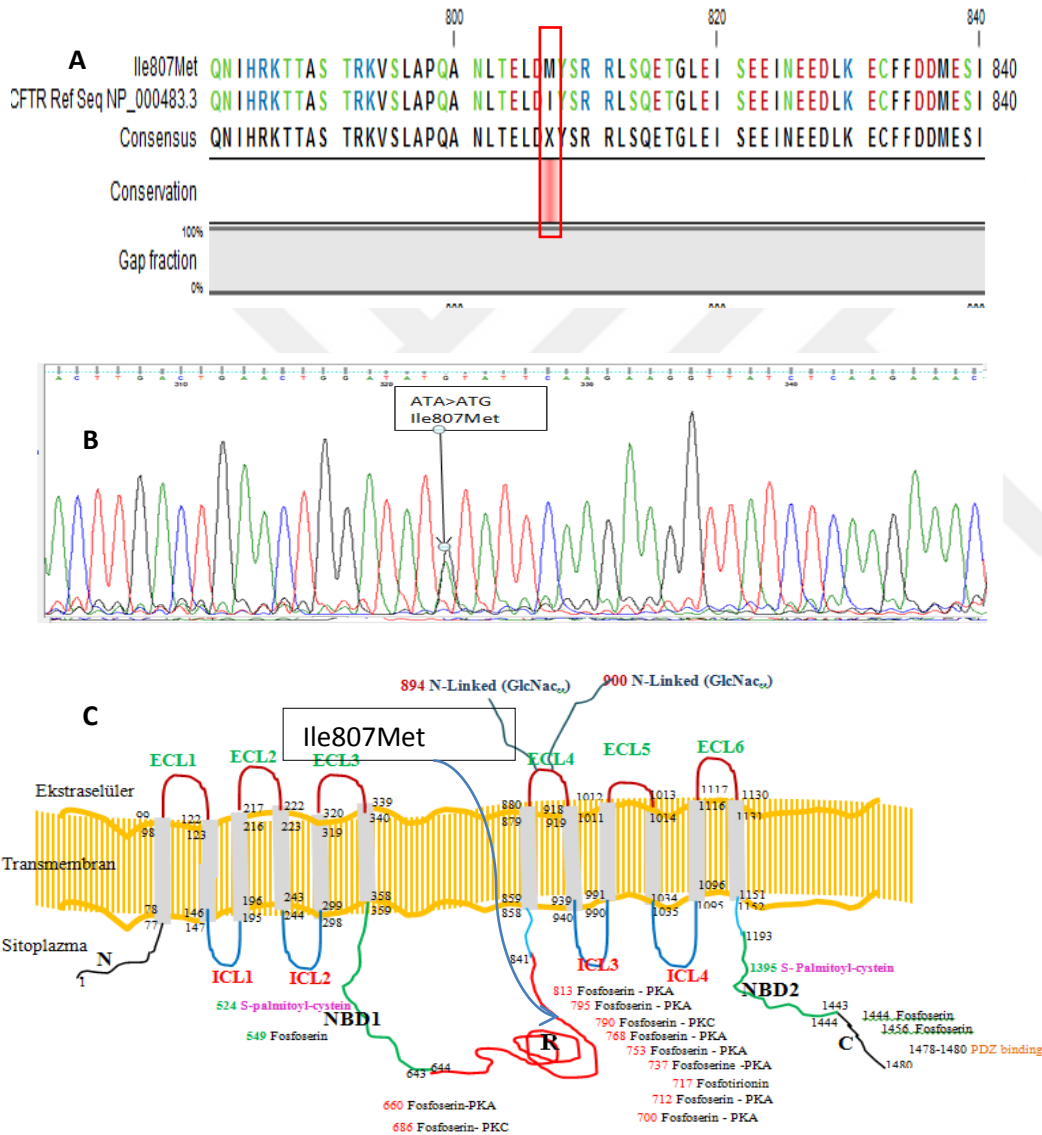
p.Glu632X aminoasid değişimi nonsense mutasyon olduğundan polyphen-2 veri tabanına göre skorlama göstermez. Ancak stop kodon mutasyonları prematüre CFTR proteini oluşturduğu için, olası patojen etkiye sahiptir. Ayrıca bu mutasyon ilk kez bu tez çalışmasında saptandığı için, HGMD ve diğer CF veri tabanlarında amino asid değişiminin kliniğini belirten herhangi bir kayıt bulunamamıştır (şekil 4.17).



şekil 4.17. A) Glu632X heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. **B)** Chromas programı kullanılarak, Glu632X aminoasid değişimine neden olan GAA>TAA nükleotid yerd ğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasid değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.17 p. Ile807Met aminoasid değişimi

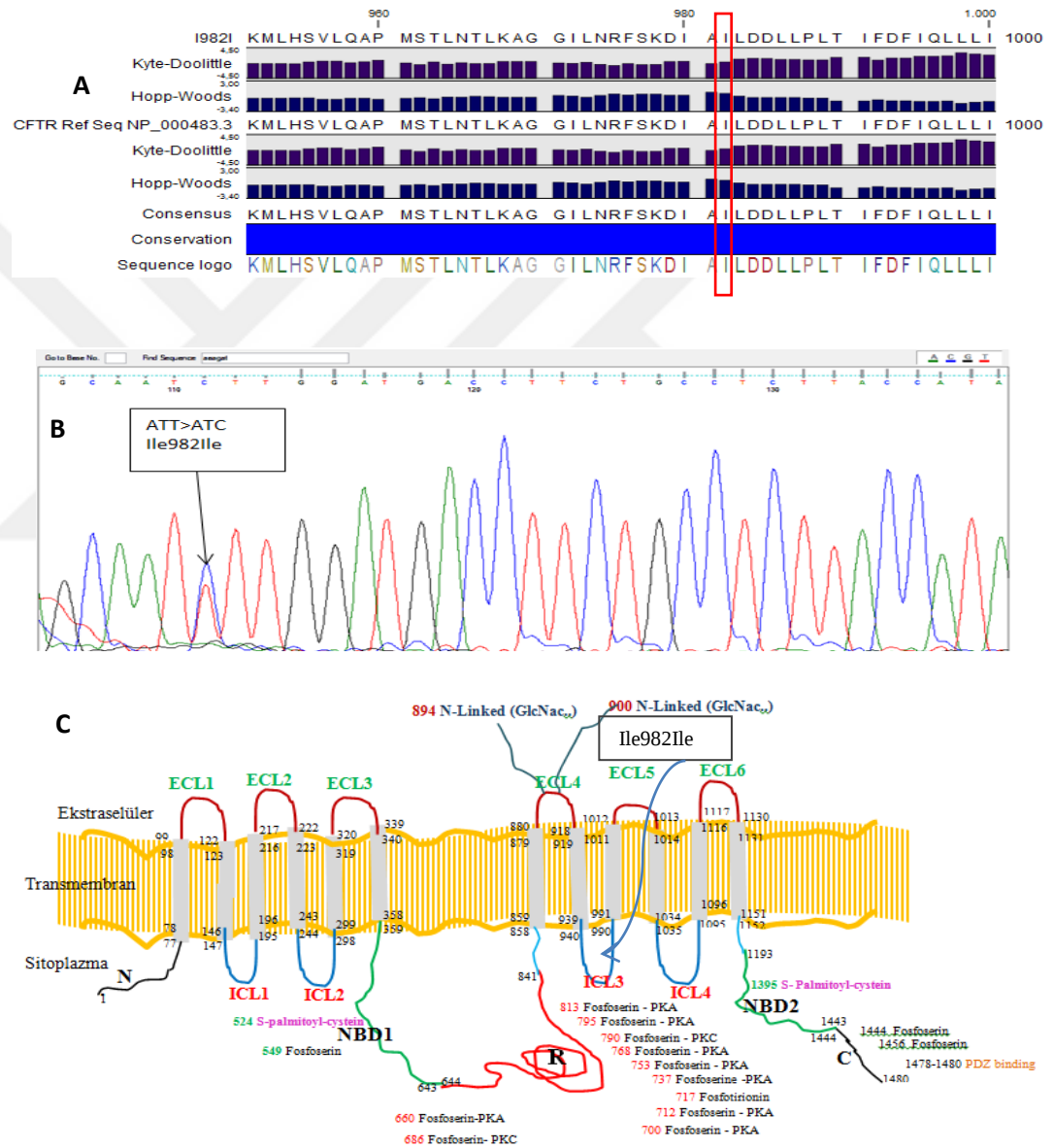
p.Ile807Met aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 0,996 skorla olası patojen olduğu belirlenmiştir. CF veri tabanında, herhangi bir klinik belirti göstermeyen polimorfizm olarak kayıtlanmıştır. Ayrıca informatik analizlerimize göre, bu değişim nonpolar/nonpolar dönüşümüyle polarite farklılığı yaratmamıştır (Şekil 4.18)(<http://www.genet.sickkids.on.ca/MutationDetailPage.external?sp=86>)



Şekil 4.18. A) p.Ile807Met heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. **B)** Chromas programı kullanarak, Ile807Met aminoasid değişimine neden olan ATA>ATG nükleotid yerdışişimlerinin görüntüsü **C)** Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.18 p. Ile982Ile aminoasid değişimi

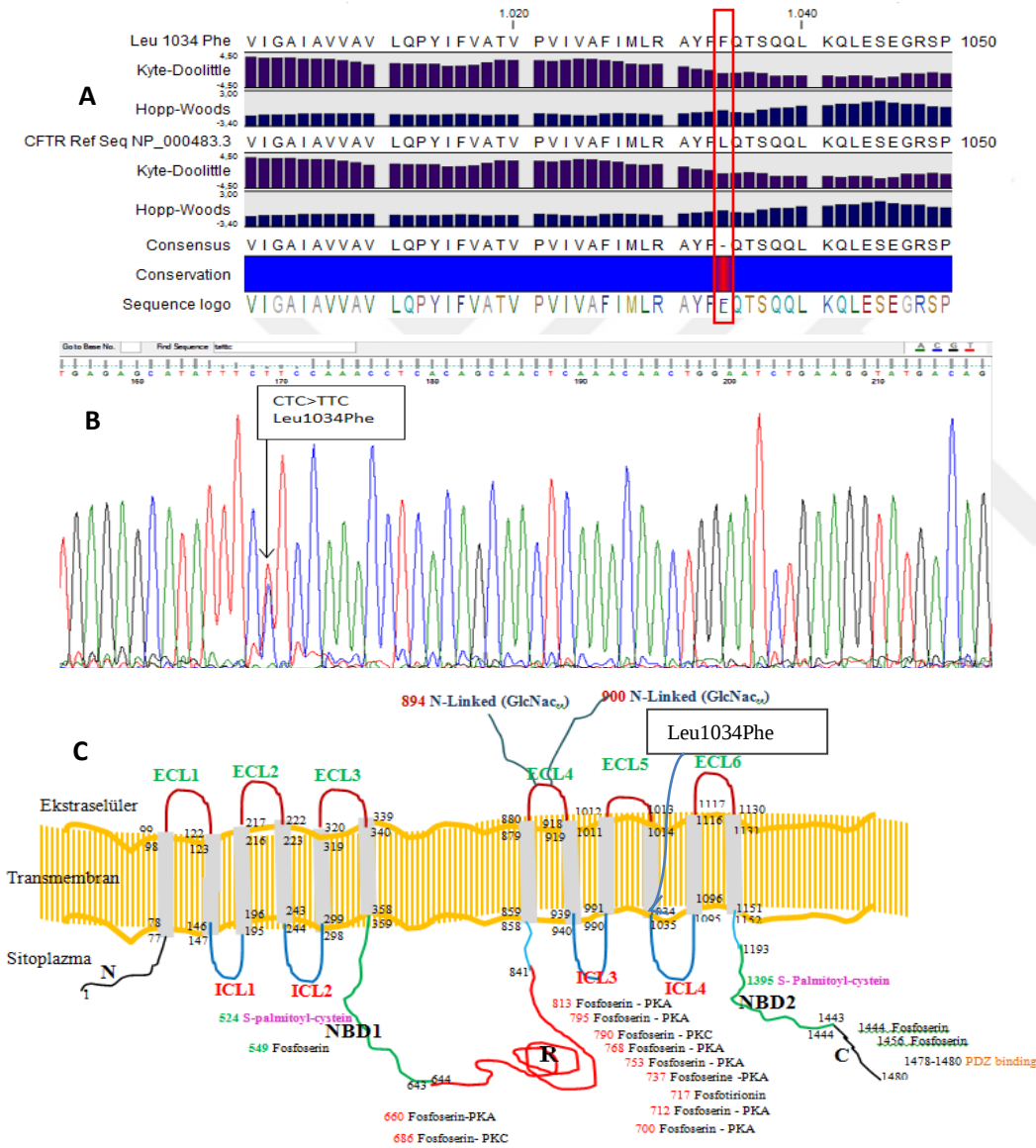
p.Ile982Ile sinonim aminoasid değişimi, ilk kez bu çalışmada bulunduğu için, HGMD ve diğer CF veri tabanlarında herhangi bir kayıt bulunmamıştır. Ancak bu aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 0,0 skorla olası zararsız fenotip etkiye sahiptir. Ayrıca informatik analizlerimize göre bu değişim polarite farklılığı yaratmamıştır (şekil 4.19).



şekil 4.19. A) p.Ile982Ile heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. **B)** Chromas programı kullanarak, Ile982Ile aminoasid değişimine neden olan ATT>ATC nükleotid yerdığişimlerinin görüntüsü **C)** Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.19 p. Leu1034Phe aminoasid değişimi

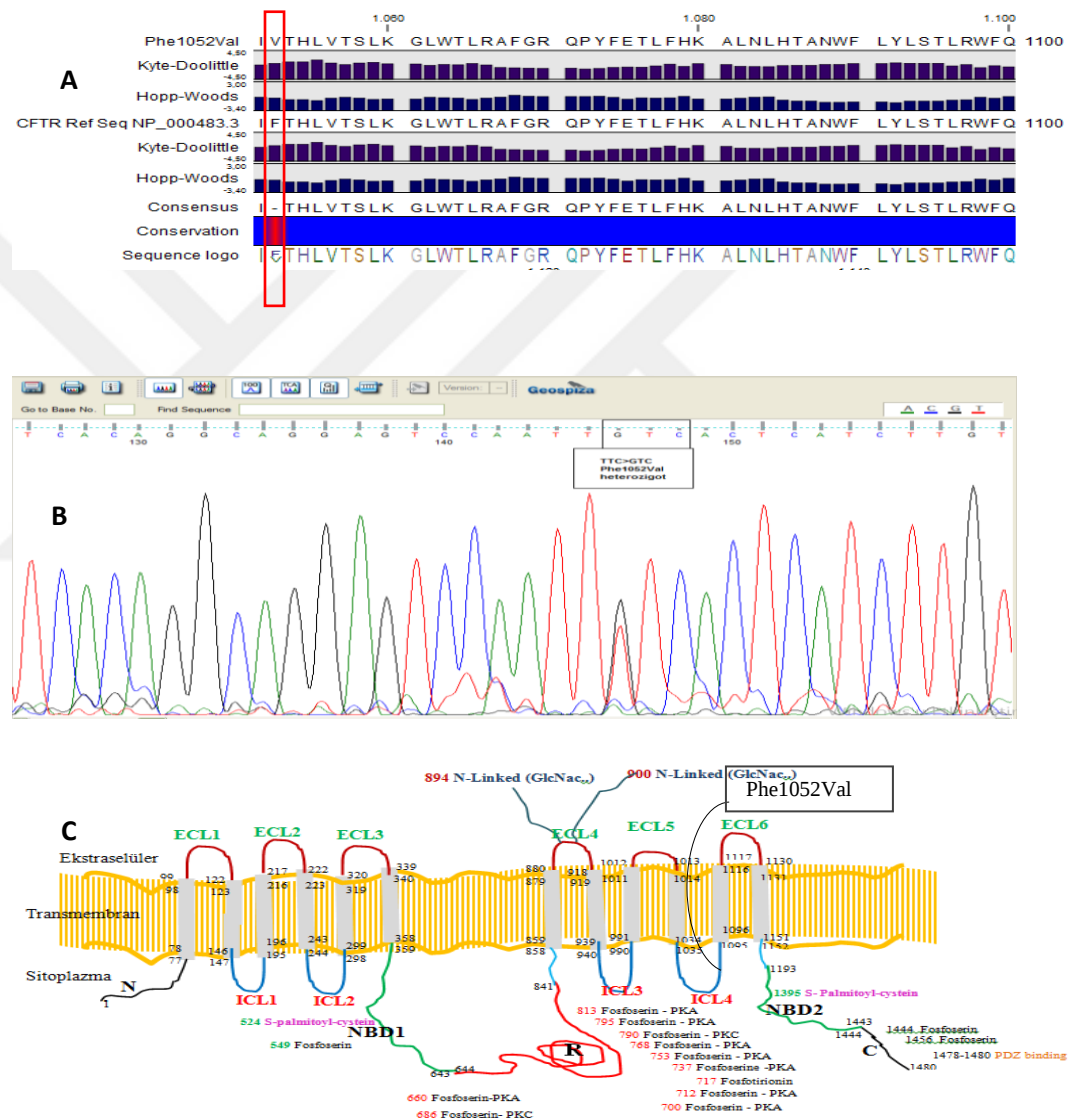
p.Leu1034Phe bu aminoasid değişimi ilk kez bu çalışmada bulunduğundan, HGMD ve diğer CF veri tabanlarında herhangi bir kayıt bulunmamıştır. Ancak bu aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 1.0 skorla olası patojen fenotip etkiye sahiptir. Ayrıca informatik analizlerimize göre bu değişim, nonpolar>nonpolar dönüşümüyle polarite farklılığı yaratmamıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. A) p.Leu1034Phe heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Leu1034Phe aminoasid değişimine neden olan CTC>TTC nükleotid yerdğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.20 p. Phe1052Val aminoasid değişimi

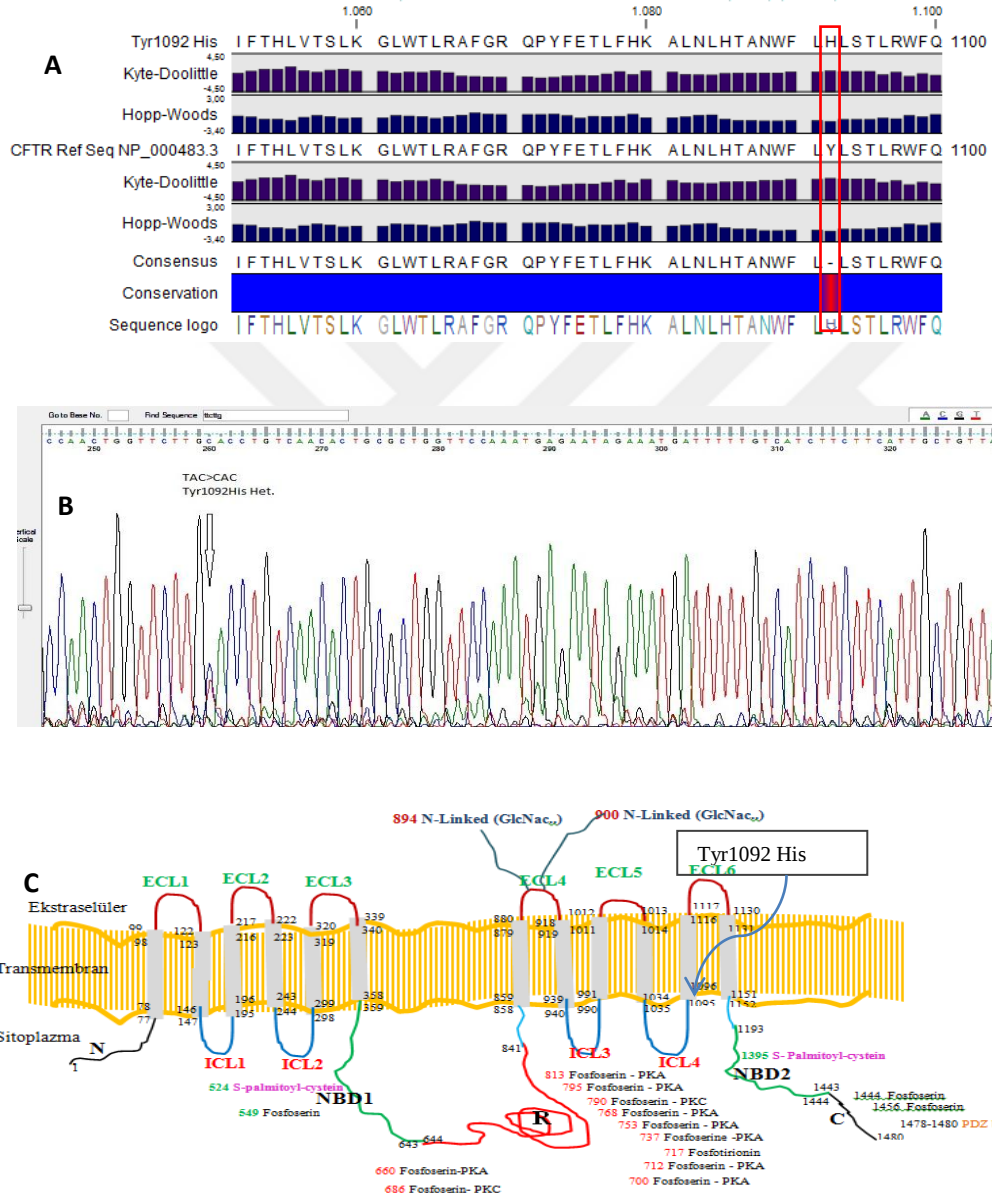
p.Phe1052Val aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 0,99 skorla olası patojen fenotipik etkiye sahiptir. HGMD ve CF veri tabanı kayıtlarında ise klinik bulgusu CF olarak belirtilmiştir. Ayrıca informatik analizlerimize göre bu değişim nonpolar>nonpolar dönüşümüyle polarite farklılığı yaratmamıştır (şekil 4.21).



Şekil 4.21. A) p.Phe1052Val heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. **B)** Chromas programı kullanarak, Phe 1052 Val aminoasid değişimine neden olan TTC>GTC nükleotid yer değişimlerinin görüntüsü **C)** Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.21 p.Tyr1092His aminoasid değişimi

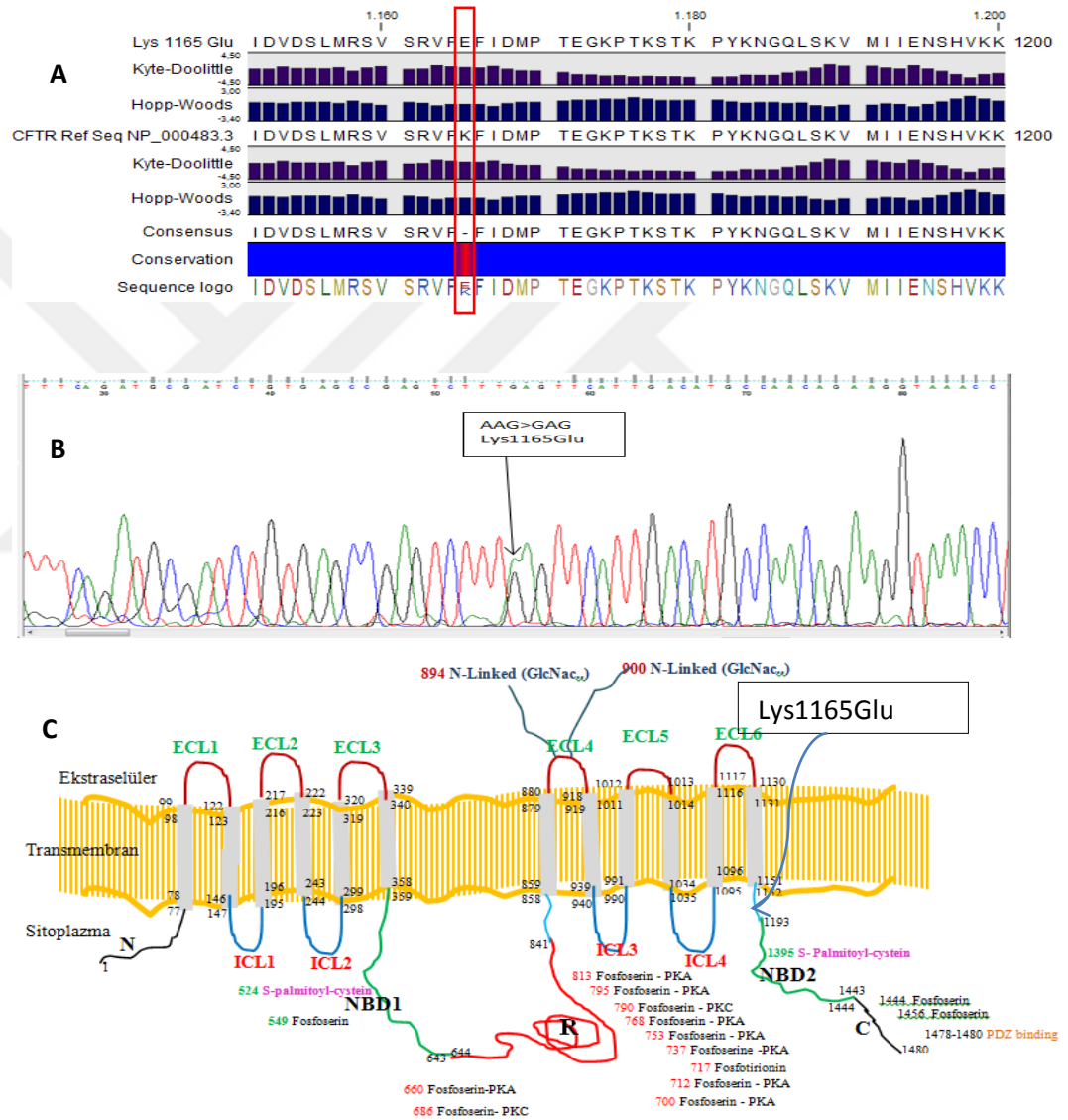
p.Tyr1092His aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 1,0 skorla olası patojen fenotipik etkiye sahiptir. HGMD veri tabanı kayıtlarında ise klinik bulgusu CF olarak belirtilmiştir. Ayrıca informatik analizlerimize göre bu değişim polar>polar dönüşümüyle polarite farklılığı yaratmamıştır (şekil 4.22).



şekil 4.22. A) p.Tyr1092His heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, p.Tyr1092His aminoasid değişimine neden olan TAC>CAC nükleotid yerdşişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.22 p. Lys1165Glu aminoasid değişimi

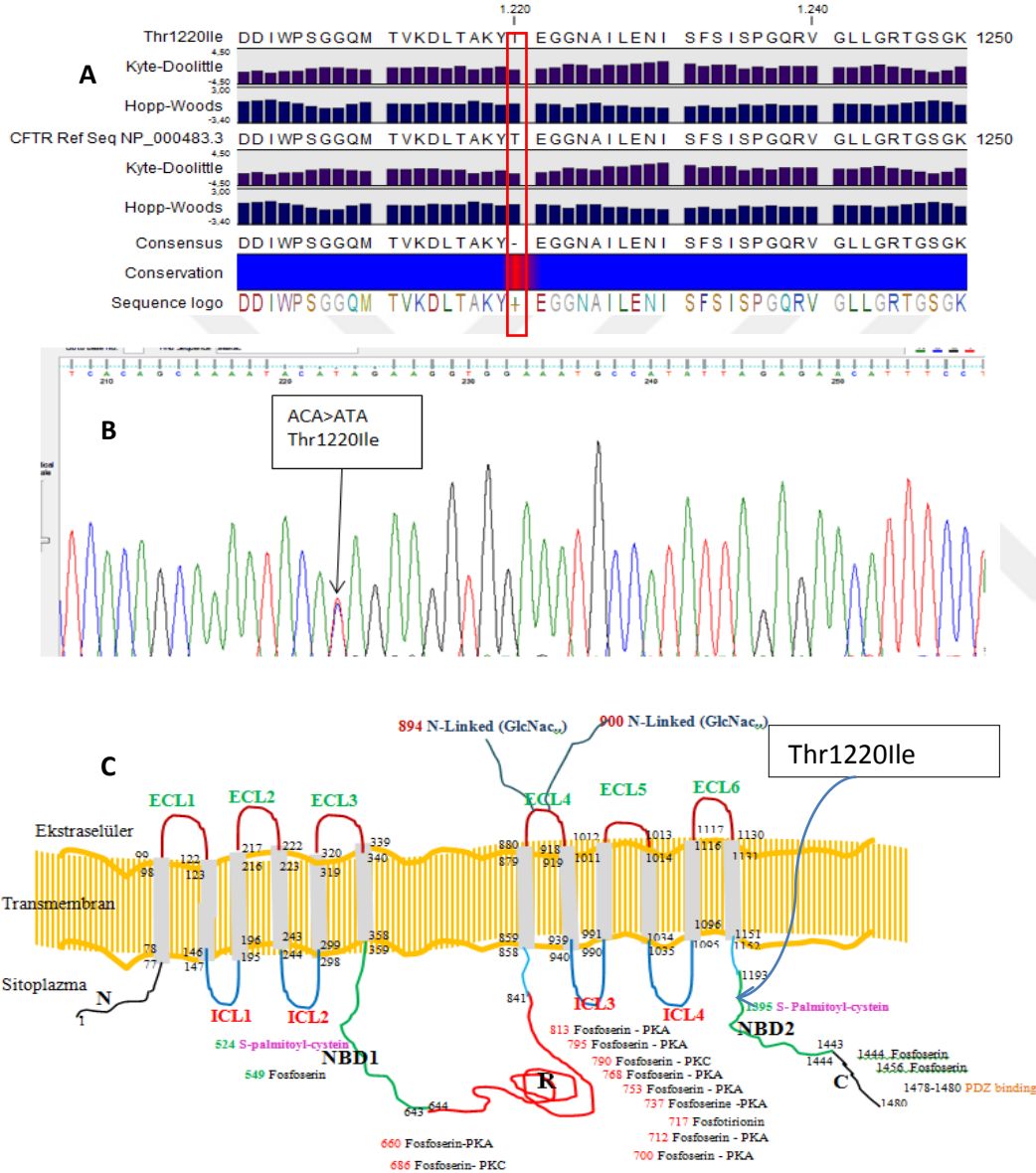
p.Lys1165Glu bu aminoasid değişimi ilk kez bu çalışmada bulunduğu için, HGMD ve diğer CF veri tabanlarında herhangi bir kayıt bulunmamıştır. Ancak bu aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre, 0,859 skorla olası patojen fenotip etkiye sahiptir. Ayrıca informatik analizlerimize göre, bu değişim polar>polar dönüşümlüyle polarite farklılığı yaratmamıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. A) p.Lys1165Glu heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, p.Lys1165Glu aminoasid değişimine neden olan AAG>GAG nükleotid yerdiğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.23 p. Thr1220Ile aminoasid değişimi

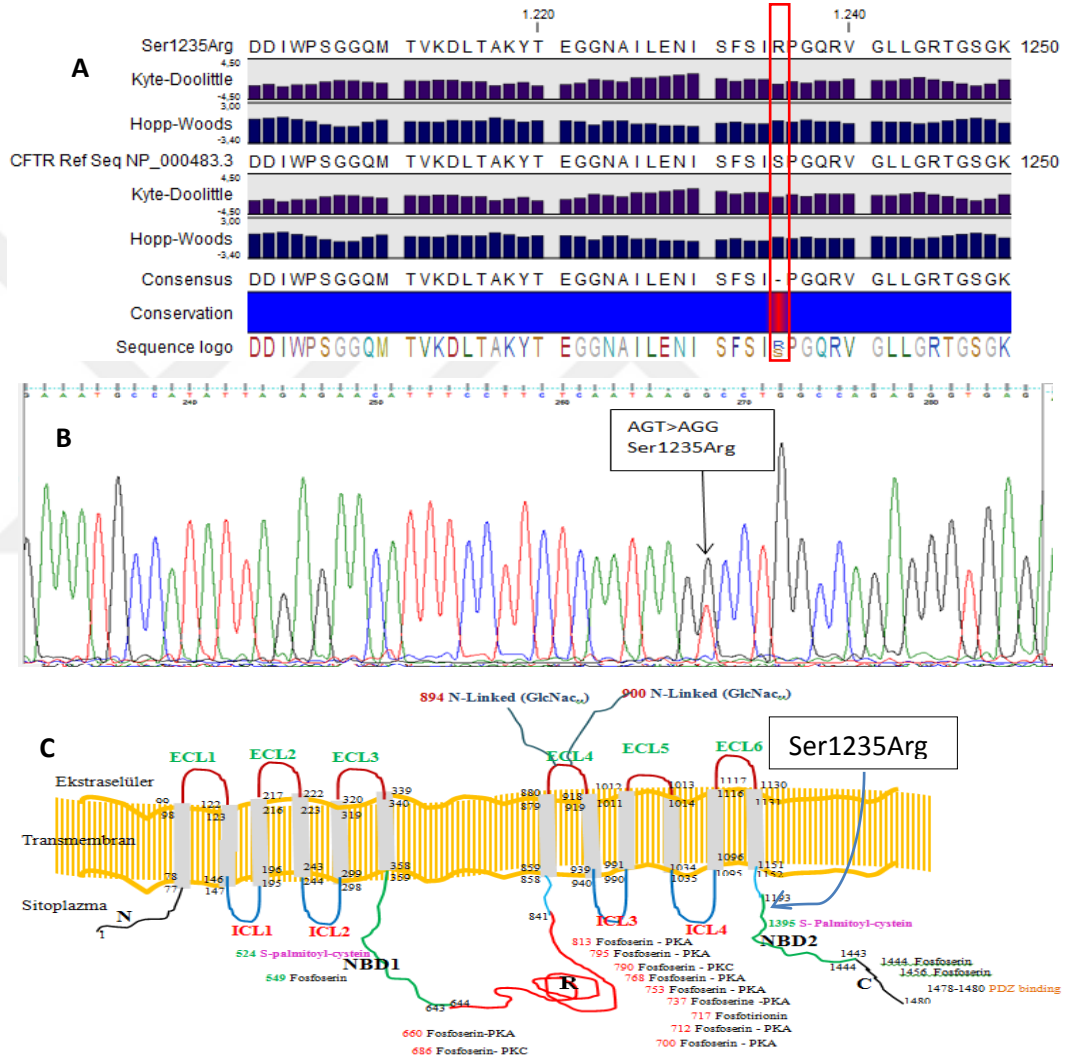
p.Thr1220Ile aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 0,0 skorla olası zararsız fenotip etkiye sahiptir. HGMD ve CF veri tabanı kayıtlarında ise klinik bulgusu bulunamıştır. Ayrıca informatik analizlerimize göre bu değişim polar>nonpolar dönüşümüyle polarite farklılığı yaratmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. A) p.Thr1220Ile heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hopp-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, p.Thr1220Ile aminoasid değişimine neden olan ACA>ATA nükleotid yer değişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.24 p. Ser1235Arg aminoasid değişimi

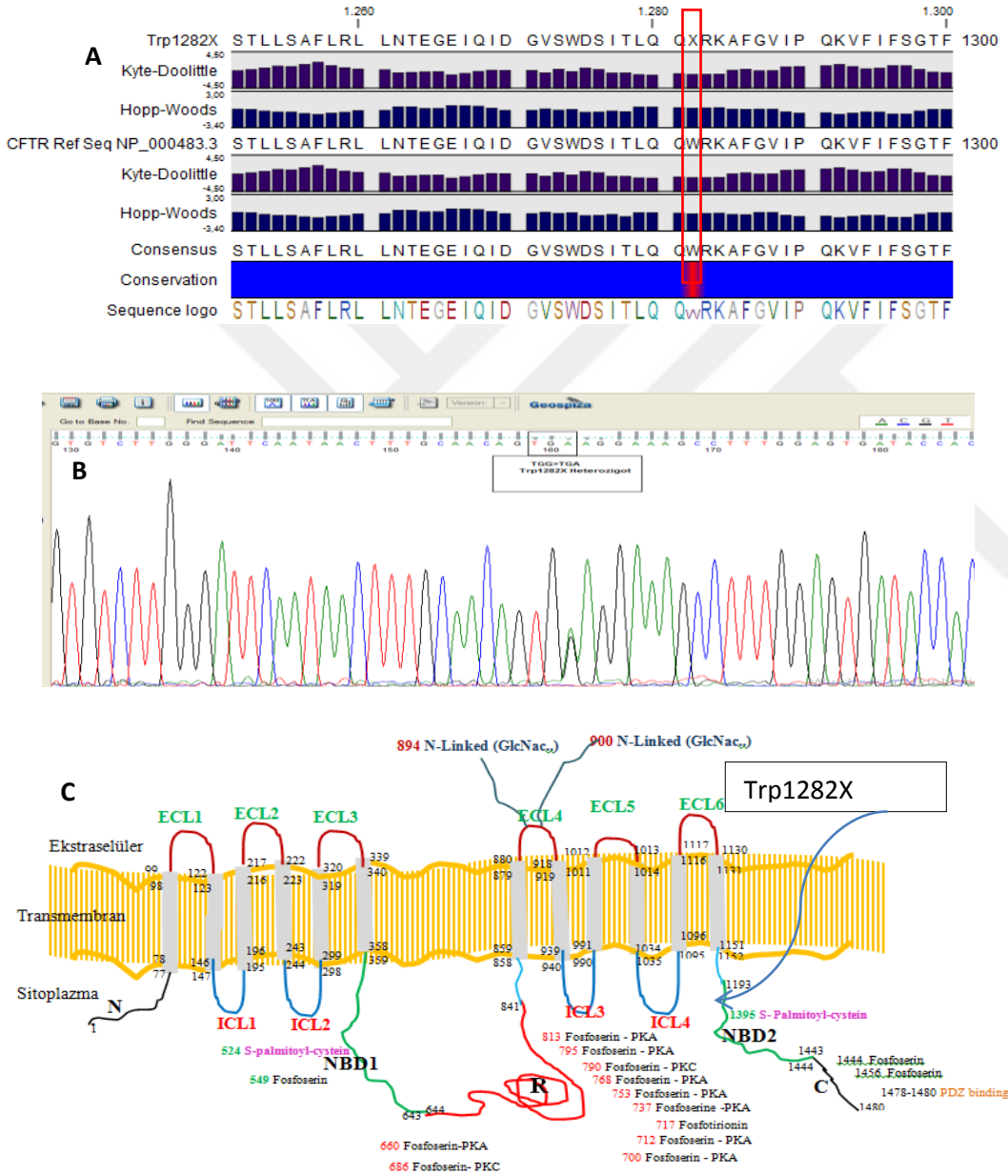
p.Ser1235Arg aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 0,41 skorla olası zararsız fenotipik etkiye sahiptir. Ancak HGMD ve CF veri tabanı kayıtlarında ise klinik bulgusu CF olarak bulunmuştur. Ayrıca informatik analizlerimize göre bu değişim polar>polar dönüşümüyle polarite farklılığı yaratmamıştır (şekil 4.25).



şekil 4.25. A) p.Ser1235Arg heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. **B)** Chromas programı kullanarak, p.Ser1235Arg aminoasid değişimine neden olan AGT>AGG nükleotid yerdğişimlerinin görüntüsü **C)** Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.25 p. Trp1282X aminoasid değişimi

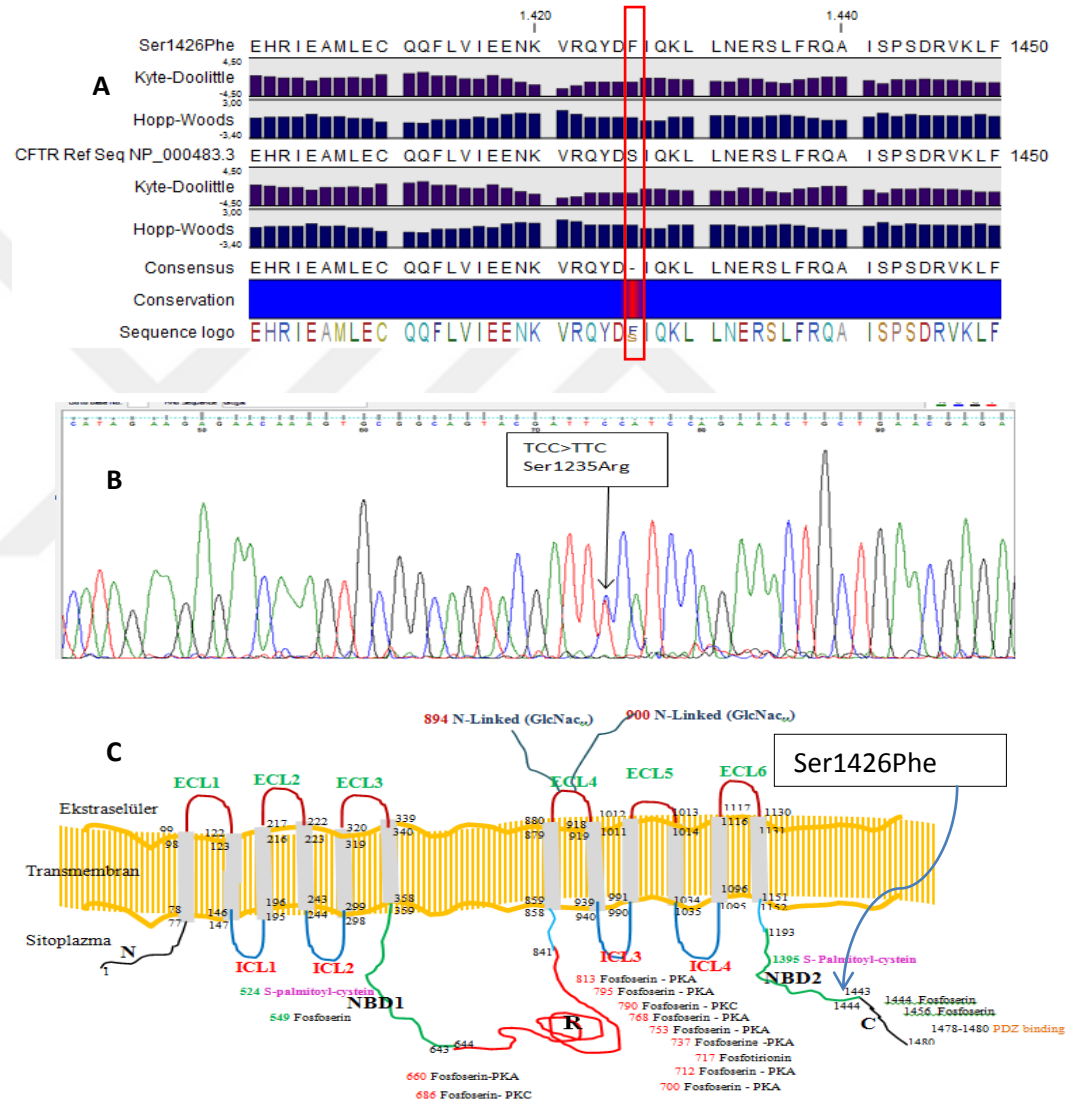
p.Trp1282X aminoasid değişimi nonsense mutasyon olduğundan polyphen-2 veri tabanına göre skorlama göstermez. HGMD ve CF veri tabanı kayıtlarında ise klinik bulgusu CF bulumuştur. Ayrıca informatik analizlerimize göre bu değişim nonpolar>- dönüşümüyle polarite farklılığı yaratmıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. A) p.Trp1282X heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanılarak, Trp1282X aminoasid değişimine neden olan TGG>TAG nükleotid yerdğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

4.1.26 p. Ser1426Phe aminoasid değişimi

p.Thr1220Ile aminoasid değişimi polyphen-2 veri tabanına göre 0,99 skorla olası patojen fenotipik etkiye sahiptir. Ancak HGMD ve CF veri tabanı kayıtlarında ise klinik bulgusu obstruktiv azosperm olarak bulunmuştur. Ayrıca informatik analizlerimize göre bu değişim polar>nonpolar dönüşümüyle polarite farklılığı yaratmıştır (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. A) p.Ser1426Phe heterozigot aminoasid değişimi ve Hidrofobik indeks (Kyte-Doolittle)/ Hidrofilik İndeks (Hoop-Woods) değişimleri. B) Chromas programı kullanarak, Ser1426Phe aminoasid değişimine neden olan TCC>TTC nükleotid yerdeğişimlerinin görüntüsü C) Aminoasit değişimlerinin CFTR domainleri üzerindeki yeri.

5. TARTIŞMA

Kistik Fibrozis (CF)'den sorumlu gen yaklaşık 25 yıl önce klonlama çalışmaları yapılarak tanımlanmış ve CF hastalığının diğer organlardaki fenotipin aydınlanması sağlanmıştır. Ancak buna rağmen, hastalığın prognozu bakımından farklı etnik populasyonlarda farklılıklar görülmektedir. Dünyada hastalığın görülme sıklığı etnik gruplara göre farklılık göstermektedir. Hastalığın insidansı, beyaz ırkta ve Avrupa ırklarında daha çok görülmekle birlikte evlilik ve göç gibi çevresel etmenler sonucu, diğer ırklarda düşük insidanslarda da görülmektedir.

Bizim araştırmamızda CF'ye neden olan mutasyonlar DNA sekans analizi yöntemiye belirlenmiş ülkemiz populasyonunda en sık rastlanan mutasyonlar sırasıyla, F508del (%13.3), F1052V (%13.3), I148T (%10), R297Q (%6.6), E92K (%6.6), E632X (%6.6) en yaygın mutasyonlar olarak gözlenirken, bunların yanında R74W (%3.3), G126D (%3.3), L183I (%3.3), G178R (%3.3), K174X (%3.3), R347P (%3.3), E379X (%3.3), T388M (%3.3), M472V (%3.3), G542X (%3.3), I807M(%3.3), I982I (%3.3), L1034F (%3.3), Y1092H (%3.3), K1165E (%3.3), T1220I (%3.3), S1235R (%3.3), W1282X (%3.3), S1426F (%3.3) mutasyon oranları gözlenmiştir. Polimorfik allel olarak kabul edilen V470M alleli çalışma grubunda %73.3 oranında bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda veri tabanlarına kayıtlı olmayan 6 farklı mutasyon ilk kez tanımlanmıştır. Bu mutasyonlardan, 3'ü missens (M472V, K1165E, L1034F), 1'i sinonim (I982I) ve 2'si stop kodon (K174X, E632X) mutasyonlarıdır.

CF ye neden olan Dünya'da en sık görülen mutasyon %66 sıklıkla delta(Δ)F508 mutasyonudur. Δ F508 mutasyonu %87,2 ile en yüksek Danimarka'da iken, Cezayir'de %26,3, Tunus'ta ise %18 oranında gözlenmiştir. Kuzey Avrupalı hastalarda %70-80 arasında iken Güney Avrupalılarda %50-55 oranında görülür. Avrupanın kuzeyinden güneye doğruya doğru inildikçe bu oran düşmektedir. Avrupa toplulukları arasında, Δ F508 (%66,8), G542X (%2,6), N1303K (%1,6), ve W1282X (%1,0) en yaygın CFTR mutasyonları olarak gözlemlenirken, bizim çalışmamızda G542X ve N1300K mutasyonları gözlenmemiştir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise 83 hastanın CFTR lokusu analiz edilmiş ve 166 CF kromozomun 125'inde 36 farklı mutasyon

belirlenmiştir. Yapılan çalışmada yaygın görülen bazı mutasyonlardan $\Delta F508$ del (%23,5), 1677delTA (%7.2), 2183AA>G (4.2), G542X (%3.6) F1052V (%3.0), W1282X (%3.0), E92K (%2.4) ve N1303K (%2.4) olarak gözlemlendi. Bununla birlikte; dört missens (K68E, Q493P, E608G ve V1147I , iki splice-site (406-3T>C ve 3849+5G>A) ve bir delesyon (CFTRdele17b,18) olmak üzere 7 yeni mutasyon tanımlanmıştır (Kılınç vd., 2002). Çukurova yöresindeki 63 hastanın DNA örnekleri 19 farklı CFTR mutasyonu açısından ters hibridizasyona dayalı “strip assay” yöntemi ile incelenmiştir. Kistik fibrozis tanısı almış hastaların 9’unda homozigot ve 10’unda heterozigot mutasyon olmak üzere toplam 19 hastada mutasyon saptanmıştır. $\Delta F508$ sıklığı %11.90, homozigotluk oranı ise %66.7 olarak bulunmuştur. W1282X mutasyon sıklığı %2.40 ve N1303K mutasyon sıklığı %4.80 bulunmuş olup homozigotluk oranları %50’ dir. I148T mutasyonu %3.20 olarak saptanmıştır ve hepsi heterozigottur. Taranan 19 mutasyon için hastaların toplam mutasyon oranı ise % 22.3 olarak bulunmuştur (Öztürk vd., 2013). Yılmaz vd (1995), yaptıkları çalışmada, kistik fibrozis ile ilişkisiz 67 hastada, CFTR geni, en yaygın görülen mutasyonlar bakımından taranmıştır. Analiz sonucunda tüm CF allellerinin% 34.6’sının tanımlanması yapılmıştır. En sık görülen mutasyon% 28.4 oranıyla delta F508 olmuştur. Diğer iki mutasyon olan R347H:% 3.0, N1303K:% 3.7 allellerin% 6.7’sini oluşturmuştur. 1677 delta, G542X, G551D, S549N / I, R553X, L558S, R334W ve R297Q saptanmamıştır.

Etnik popülasyonlara özgü mutasyonlardan, Avrupa bölgesi için, İskandinav’da 394delTT, İsviçre’de 3905insT, Kuzeydoğu İtalya’da R1162X ve doğu slav ırklarında ise CFTRdele2,3(21kb) , Afrika bölgesi için 3120+1G→A, Orta Doğu için bedevi kabilelerinde I1234V, Müslüman araplarda CFTRdele2(ins186), Hristiyan araplarda 4010delTAAT, Birleşik Arab Emirlikleri ve Umanlı bedevilerde S549R(T>G), Bahreyn de 548A>T ve Sudi Arabistan da ise 1548delG mutasyonları popülasyona özgü olarak gözlemlenirken bu mutasyonların hiç biri, bizim araştırmamızda gözlenmemiştir.

Human Genom Mutasyon Database (HGMD) verilerine göre; kayıtlı CFTR geni mutasyonların tipleri ve sayıları sırasıyla şöyledir. Missense/nonsense mutasyonu 903 varyant, splicing mutasyonu 208 varyant, regülatör tip 18 varyant,

küçük delesyonlar 215 varyant, küçük insersiyonlar 80 varyant, küçük insersiyon/delesyonlar (indels) 27 varyant, büyük delesyonlar 76 varyant, büyük insersiyon/dublikasyonlar 18 varyant, kompleks 30 varyant, tekrarlı varyasyonlar 11 varyant, olarak kayıtlara geçmiştir. (HGMD, erişim tarihi: 3/02/2017). Bizim analiz sonuçlarımızda ise 26 varyant tespit edildi. Bu varyantlardan 19'i missens, 5'i stop kodon, 1'i delesyon ve 1'i sinonim olarak belirlendi. Belirlenen bu mutasyonlardan, M472V, L1034F, K1165E missens, K174X E632X stop kodon oluşumu ve I982I sinonim mutasyonları HGMD veri tabanına kayıtlı değildir.

CFTR geni üzerinde 1900 den fazla mutasyon oluşması ve bu mutasyonların fenotipe yansıma derecelerinin bilinmesi önemlidir. Bu nedenle meydana gelen mutasyonların proteinin hangi domainleri üzerinde meydana geldiğini bilmek gereklidir. CFTR domainlerinden MSD'ler, klorür iyonlarına özgü porların şekillenmesine, NBD'ler transport için gerekli olan enerji kaynağını oluşturmak üzere ATP'nin kendisine bağlanıp hidrolize olmasına, R bölgesinin fosforillenmesi ise kanalların aktive olup regüle edilmesine katkıda bulunmaktadır. Nükleotid Binding Domain olarak bilinen NBD'ler P-loop/Walker A ve Walker B motiflerine sahiptir. Bu dizilerin arasında, 548-552 aminoasit pozisyonları arasında ise ABC taşıyıcı proteinlerinin imzası niteğinde olan C motifi (LSGGQ) yer alır. NBD 1'in Walker A (GSTGAGKT) motifi 458-465. aminoasit pozisyonlarında yer alır ve ATP 'nin α ve β fosfatlarına bağlanır, Walker B motifi ise alır (R-X-h-h-h-h-D) 566-572. aminoasit pozisyonları arasında yer alır ve β katlanma ile Mg^{++} iyonlarını dengeleyerek ATP molekülünü sabitler. Walker B sonrasında bulunan glutamik asit ise ATP'nin hidrolizini gerçekleştirir. NBD 2'nin Walker A (GRTGSGKS) motifi ise 1244-1251. aminoasit pozisyonları arasında yer alır. Ayrıca NBD1 üç tane alt bölgenin birleşmesinden oluşur : N –terminal alt bölgesi (389-494) ATP bağlayıcı alan içerir (Khushoo et al., 2011), α helikal alt bölgesi (495-564) Phe 508 'i içerir ve merkez α/β çekirdek alt bölgesi(565-637) ise F1 tip ATPaz'a benzer altı iplikten meydana gelen paralel β tabakasından oluşur. NBD1 ayrıca yapılandırılmamış düzenleyici ekleme bölgesi (404-436), yapısal olarak farklı bölge (526-547), ve C terminal düzenleyici uzantı (RE, aminoasit 638-673) alt bölgelerine ayrılır. Dünyada çok yaygın gözlenen ve α helikal alt bölgesinde meydana gelen $\Delta F508$ mutasyonu, NBD1 in katlanmasını ve mekanizmalarını bozmaktadır.

CFTR ER' den çıkarken çeşitli kontrol noktalarına maruz kalır. Bunlardan biride üçüncü kontrol noktası olarak bilinir. CFTR'nin ER çıkış yerlerinde oluşan kaplama proteini (COPII) kaplı veziküller yoluyla golgi'ye nakledildiğinde oluşur (Roxo-Rosa et al., 2006). Bu noktada, yanlış katlanmış F508del-CFTR, ER tutma motifleri olan dört arginin çerçevesi (RXR) tripeptidlere (Arginine Framed Tripeptides /AFT) maruz kalmasından dolayı ER'den çıkamaz. Bu motifler, CFTR'nin N-terminal kuyruğunda (Arg29-Gln30-Arg31), NBD1'de (Arg516-Tyr517-Arg518 ve Arg553-Ala554- Arg555) ve RD'de (Arg764-Arg765-Arg766) bu dört motife sahiptir. F508del-CFTR, bu motiflerden dolayı ER' den çıkamaz (Roxo-Rosa et al., 2006; Chang et al., 1999). Aslında, F508del-CFTR'deki dört AFT'nin eşzamanlı mutasyonunun, 29. 51. 555. ve 76. konumlarındaki Arg yerine lizin gelmesiyle (yani F508del-R29K-R516K-R555K-R766K-CFTR, yada kısaca F508del-4RK-CFTR), F508del-CFTR, ERQC'den kaçışını hızlandırdığı bildirilmiştir. Mutant F508 del CFTR'in kontrol noktasından kaçışı işlemi aslında F508 del CFTR katlanmasını düzeltilmesi anlamına gelmez, sadece kontrol noktasının üstesinden gelme anlamı taşımaktadır. CFTR, ER çıkış bölgelerindeki kaplama proteini (COP II) kaplı veziküller içine paketlenildiğinde dördüncü bir kontrol noktası mevcut. Bu süreç ise NBD1'de bulunan di-asidik çıkış kodunu(DAD) (Asp565-Ala566-Asp567) içeren özel bir çıkış motifine dayanıyor. DAD olarak bilinen bu motif NBD1'de yer alır. Bu motif, Sec24 aracılı COPII paketlenmesi için gerekli ve bu kodun bozulması hem Sec24-CFTR birlikteliğini hem de ER'den çıkışı azaltır (Nishimura and Balch, 1997). Bu motif içindeki, ikinci Asp kalıntısının alanin ile yer değiştirmesi CFTR katlanmasını etkilemediği, ancak Sec24 ile ilişkisini azalttığı ve ER'den çıktığı gözlenmiştir (Wang et al., 2004). Buna karşın, her iki Asp artıklarının eş zamanlı mutasyonu CFTR işlemini tamamen ortadan kaldırdığı bildirilmiştir.

Sınıf III mutasyonları olarak bilinen mutasyonlar sıklıkla CFTR proteininin ATP bağlanma alanlarında (NBD1 ve NBD2) bulunur ve kapı mutasyonları olarakta bilinirler. Bu gruptaki mutasyonlar sonucunda, üretilen protein normal seviyelerde membrana etkili bir şekilde yerleşir, ancak ATP bağlanma bölgelerinde oluşan mutasyonlar protein kinaz A (PKA) ile aktivasyona direnç gösterilmesine neden olur. Böylece proteinin kanal açıklığı değişir. Bu grup mutasyonların başında p.Gly551Asp gelir. Bu mutasyon normal CFTR proteinin

kanal açıklığına göre yaklaşık 100 kat daha dar kanal açıklığının oluşmasına neden olur. G551D, G551S, R560T, V520F, G970R, G1244E, S1255P, G1349D bu grupta yer alan mutasyonlardır. (Fanen et al., 2014). Araştırmamızda gözlenen 26 varyanttan 5 tanesi NBD1 bölgesi içinde 4 tanesi ise NBD2 bölgesi içinde yer alır. V470M, M472V, G542X, Δ F508 ve E632X mutasyonları NBD1 bölgesi içerisinde yer almakta, ancak lokalizasyon olarak, V470M ve M472V NBD1'in ATP bağlayıcı alt bölgesinde yer alırken, G542X ve Δ F508 NBD1 'in α helikal alt bölgesi içinde yer alır. G542X ve E632X mutasyonu lokalizasyon olarak NBD1 içinde yer almasına karşın stop kodon oluşturmamasından dolayı sınıf I mutasyonu içinde sınıflandırılır. Bu mutasyon intra selüler stoplazmik halka 4 (ICL4) arasındaki etkileşimi değiştirir ve bunun sonucunda da NBD'1 de enerjik ve kinetik kararsızlık oluşturur. Δ F508, G542X, G551S, R560T ve V520F NBD1'in α helikal alt bölgesi içinde yer alan ve ciddi klinik CF fenotipi sergileyen mutasyonlardır. NBD1'in α helikal bölgesi, ERQC (endoplazmik retikulum kontrol noktası) üçüncü kontrol noktasında görev alan R-X-R arjinin çerçevesi tripeptidleri içeren özel amino asit motiflerini ihtiva etmektedir. Eğer bu çerçeveyi bozacak bir mutasyonun oluşması durumunda ise mutant CFTR proteinin ERden çıkışı kolaylaşır. Tüm bu sonuçlar ışığında, CF fenotipinin değerlendirilmesi noktasında, NBD1 bölgesinin α helikal alt bölgesindeki mutasyonların ayrı bir önem düzeyinde değerlendirilmesi fayda olacaktır. NBD 2 bölgesinde ise T1220I, S1235R, W1282X, S1426F mutasyonları saptandı, ancak W1282X mutasyonunu stop kodon oluşturmamasından dolayı Sınıf I mutasyonları içerisinde yer alır. T1220I mutasyonu ise veri tabanına kayıtlı olmayıp ilke bu tez çalışmada saptandı. T1220I NBD2 bölgesi içerisinde yer almasına rağmen, polyphene-2 veri tabanı kayıtlarına göre non-patojen fenotipe sahiptir. Ayrıca S1235R mutasyonu polyphene-2 veri tabanına göre 0.415 skorlama derecesine sahip ve non-patojen fenotip göstermekte, Buna karşın NBD2 bölgesi içinde oluşan W1282X stop kodon mutasyonu polyphene-2 veritabanına göre olası patojen olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca NBD2 bölgesi içinde meydana gelen S1426F mutasyonu ise 0.997 fenotip skorlaması sahip ve olası patojen mutasyonlar olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar, NBD2 içerisinde meydana gelen W1282X, S1426F mutasyonları, anlamlı düzeyde CF fenotipini

sergilediğini, T1220I ve S1235R mutasyonlarında non patojen olması, NBD2 içerisinde bazı kritik bölgelerinin varlığını akla getirmektedir.

CFTR proteininin amino (N) ve karboksil (C) terminal kuyrukları, sitoplazmik bölgede yer alır. N terminaldeki diziler diğer proteinlerle etkileşimleri ve kanal geçirgenliğini etkiler. Amfipatik asidik aminoasit sarmalının bir yüzü üzerindeki 46 ile 60 arasındaki aminoasitler, kanal geçirgenliğini etkilerken (Naren et al., 1999). N ucu yakınındaki başka kısa diziler anneksin ve Syntaxin 1A denilen sinyal peptidi olarak görev alan protein ailesi ile etkileşimi sağlamaktadır. CFTR'nin, C terminal ucu ise PDZ gibi çeşitli bağlayıcı proteinler arasındaki etkileşime aracılık ederler (Naren et al., 1998).

CFTR transmembran (TM) domainleri zar içinde, çok sayıda polar etkileşimler ağı oluşturan iyonize olabilen kalıntılar (4Arg, 2Lys, 3Glu, 1Asp ve 1His) ihtiva etmektedir. Ancak bu kalıntıların, lipid tabakasındaki TM'lerin entegrasyonunu geciktirdiği veya bozduğu tahmin edilmektedir (Hessa et al., 2005). TM1'e, fazladan bir polar aminoasit eklenmesinin, sarmal demetlerin düzenlenmesini ve bunun ardından sarmal uzantılar ile sitoplazmik NBD'ler arasındaki etkileşimlerin bozulduğu ileri sürülmüştür (Xiong et al., 1997; Skach, 2000). Bu topogenezik mekanizmanın önemli bir etkisi, her biri TM1'e ilave bir iyonlaşabilir aminoasit yerleşmesiyle sonuçlanan ve CF'ye neden olan iki mutasyon G85E ve G91R ile aydınlatılmıştır. Her iki mutant da TM1 sinyal çapa aktivitesini tamamen bloke etmesine karşın, TM1 domaini, TM2 tarafından membrana eklenebilir olmakta ve bu durum TMD1 topolojisini etkilemez, ancak TMD1 doğru topolojiye ulaşılmasına rağmen, G85E ve G91R CFTR'nin fonksiyonelliğini bozmuştur. (Xiongetal., 1997; Patricketal., 2011). TM1-2 topolojisinin analizi, CFTR'nin farklı bölgelerindeki hastalıkla ilgili mutasyonların ortak bir mekanizma yoluyla katlanmayı bozabileceği, daha yüksek dereceli üçüncül domain-domain etkileşimlerini önleyeceği tahminini ortaya çıkarmıştır (Xiong et al., 1997; Skach, 2000). TM1'e, fazladan bir polar aminoasit eklenmesinin, sarmal demetlerin düzenlenmesini ve bunun ardından sarmal uzantılar ile sitoplazmik NBD'ler arasındaki etkileşimlerin bozulduğu ileri sürülmüştür (Xiongetal., 1997; Skach, 2000). Tüm bu çalışmalar, CFTR proteinin doğru katlanması ve fonksiyonellik kazanmasında aminoasit polaritesinin önemli

bir yerinin olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda gözlenen 16 patojen mutasyondan sadece 8 tanesinde polarite değişimi olmuştur. Buna göre Gly 126 Asp aminoasid değişimi TM2 domaini üzerinde yer alır. Bu değişim sonucu nonpolar/polar değişim meydana gelmiş ve bu mutasyon patojen etki göstermiştir. Ile 148 Thr aminoasid değişimi ICL1 bölgesinde yer almakta olup bu değişim sonucunda ise nonpolar/polar değişim meydana gelmiş ve bu mutasyon veri tabanı kayıtlarına göre, modifiye edici etki olarak yansımıştır. Arg 347 Pro aminoasid değişimi TM6 bölgesi içinde lokalize olup, polar/ nonpolar değişime neden olmuş ve bu mutasyon veri tabanı kayıtlarına göre fenotipe patojen ılımlı CF olarak yansımıştır. Thr 388 Met aminoasid değişimi NBD1' in N-terminal bölgesi içinde yer almakla olup, N-terminal alt bölgesi olan ATP bağlayıcı alanın (aminoasid 389-494) yanı başında lokalizedir. Bu mutasyon, polar/nonpolar değişim meydana getirmiş ve veri tabanı kayıtlarına göre fenotipe astım hastalığı olarak yansımıştır. Arştırmamızda elde edilen varyantlardan stop kodon oluşturan mutasyonlar hariç 26 varyantın 13' ünde herhangi bir polarite değişimi olmamıştır. Ancak polarite değişimi olmayan 13 varyantın 7 tanesi, PolyPhen-2 veri tabanı skorlamasına göre, olası patojen fenotip skorlamasında sahip iken 6 tanesi ise olası non-patojen fenotip skorlaması sergilemektedir. Ayrıca Thr1220Ile aminoasid değişimi polar/nonpolar değişim meydana getirmiş ve bu mutasyon veri tabanı kayıtlarına non-patojen olarak yansımış olup bu durumun polarite değişiminden ziyade Thr1220Ile lokalizasyonunun kritik bir öneminin olmadığını düşündürmektedir. Ser 1426 Phe aminoasid değişimi ise polar/nonpolar değişim meydana getirmiş ve bu mutasyon veri tabanı kayıtlarına göre fenotipe obstruktiv azosperm hastalığı olarak yansımıştır. Litaratür bilgilerine göre, aminoasid değişimleri söz konusu olduğunda CFTR proteinin yapısal ve fonksiyonelliği açısından, polarite değişimlerinin, CF'nin fenotipi bakımından bir anlam ifade edemeyeceği, fakat polarite değişimlerinin diğer parametrelerle birlikte bir anlam kazanabileceğini düşündürmektedir.

CFTR'nin MSD/TMD biyogenezi, alternatif ko ve post translasyonel translokasyon yolları (TM1-2), helikal döngülerin yerleşim uyumu (TM3-4, TM5-6, TM9-10, TM11 -12), topojenik belirleyici fonksiyon (TM7-8) için eş güdüm ve ER zarı içinde düzenlenmiş entegrasyon gibi dönüşümlü topogenesis modelinden sapma gösteren çoklu mekanizmaları kullanır. Ortaya çıkan yeni

kanıtlar, farklı katlanma yollarının işlevsel etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Örneğin, TM1'deki (E92A ve K95A) iyonlaşabilir aminoasidlerin değişmesi, TM1'i güçlü bir sinyal çapa (anchor) dizisine çevirir, böylece kotranslasyonel topogenezi destekler, ancak CFTR işlevini bozar (Lu et al, 1998; Patrick et al., 2011). Benzer şekilde, D924V mutasyonu TM8'i güçlü bir stop transfer dizisine dönüştürür ve translasyonel membran entegrasyonunu kolaylaştırır, ancak CFTR klorür iletkenliğini azaltır. Sonuç olarak domainlerin etkileşimi CFTR porteininin 3 boyutlu yapısını etkilemekte, kritik domainler üzerinde meydana gelen anlamsız aminoasid değişimleri olsa bile göz ardı edilmeden domain-domain etkileşimlerini farklılaştırabileceği olasıdır. CFTR geni üzerinde 1900'den fazla mutasyon tanımlanmış olup bu mutasyonların patogenezlerinin değerlendirilmesi noktasında, mutasyonların lokalizasyonuna bakmak yeterli olmayıp ayrıca mutasyonun bulunduğu domainin, başka hangi domain ile ilişkili olduğu ayrıca değerlendirilmesi yararlı olacaktır.

6. SONUÇLAR

- Bireylerde mutasyon gözlenme oranları sırasıyla, F508del (%13.3), F1052V (%13.3), I148T (%10), R297Q (%6.6), E92K (%6.6), E632X (%6.6), R74W (%3.3), G126D (%3.3), L183I (%3.3), G178R (%3.3), K174X (%3.3), R347P (%3.3), E379X (%3.3), T388M (%3.3), M472V (%3.3), G542X (%3.3), I807M(%3.3), I982I (%3.3), L1034F (%3.3), Y1092H (%3.3), K1165E (%3.3), T1220I (%3.3), S1235R (%3.3), W1282X (%3.3), S1426F (%3.3) mutasyon oranları saptanmıştır.
- En sık rastlanan mutasyonlar F508del (%13.3), F1052V (%13.3), I148T (%10), R297Q (%6.6), E92K (%6.6), E632X (%6.6) olarak gözlenmiştir.
- Sağlıklı bireylerde gözlenen V470M amino asit değişiminin hastalıkla ilişkisi yoktur.
- İlk defa bu çalışmada veri tabanlarına kayıtlı olmayan 6 farklı mutasyon ilk kez tanımlanmıştır. Bu mutasyonlardan, 3'ü missens (M472V, K1165E, L1034F), 1'i sinonim (I982I) ve 2'si stop kodon (K174X, E632X) mutasyonlarıdır.
- Mutasyonların CFTR üzerindeki lokalizasyonları, Arg74Trp amino asit değişimi N terminal bölgede, Glu92Lys aminoasid değişimi TM1 domaininde, Gly126Asp aminoasid değişimi TM2 domininde, Ile148Thr amino asid değişimi TM2 domininde, Ile 174X aminoasid değişimi TM2 domaninde, Gly178Arg amino asid değişimi ICL1 bölgesinde, Leu183Ile amino asid değişimi ICL1 bölgesinde, Arg297Gln aminoasid değişimi ICL2 bölgesinde, Arg347Pro amino asid değişimi TM6 domaininde, Glu379X aminoasid değişimi NBD1'in N- terminal bölgesinde, Thr388Met NBD1'in N-terminal bölgesinde, Val 470 Met NBD1'in N- terminal alt bölgesinde, Met472Val aminoasid değişimi NBD1'in N-terminal alt bölgesinde, Phe508 del aminoasid değişimi NBD'1 α helikal alt bölgesinde, Gly542X aminoasid değişimi NBD1'in

yapısal olarak çeşitlilik gösteren bölgesinde, Gly632X amino asid değişimi NBD1'in α/β çekirdek alt bölgesinde, Ile807Met aminoasid değişimi regülatör domainde, Ile982Ile aminoasid değişimi ICL3 bölgesinde, Leu1034Phe aminoasid değişimi TM10 üzerinde, Phe1052Val amino asid değişimi ICL4 bölgesinde, Tyr1092His amino asid değişimi ICL4 bölgesinde, Lys1165Glu aminoasid değişimi NBD2'in N-terminal bölgesinde, Thr1220Ile aminoasid değişimi NBD2 domaininde, Ser1235Arg aminoasid değişimi NBD2 domaininde, Trp1282X aminoasid değişimi NBD2 bölgesinde Ser1426Phe aminoasid değişimi NBD2 domaininde saptanmıştır.

- Mutasyonların polarite değişimleri ve lokalizasyonları saptanmıştır
- CFTR domainleri üzerinde proteine özgü motiflerin, mutasyonlar bakımından ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir.
- CFTR geninin, Kistik fibrozis hastalığından sorumlu major bir gen olması ve proteinin herbir noktasında olası mutasyonların potansiyel CF'ye neden olması muhtemel olduğundan, CF bakımından CFTR geninin tüm gen analizine tabi tutulması uygun olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abrami, L., Kunz, B., Iacovache, I. and van der Goot, F.G.,** 2008, Palmitoylation and ubiquitination regulate exit of the Wnt signaling protein LRP6 from the endoplasmic reticulum, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*; 105:5384–5389.
- Abramowicz, M.J., Dessars, B., Sevens, C., Goossens, M. and Girodon-Boulandet, E.,** 2000, Fetal bowel hyperechogenicity may indicate mild atypical cystic fibrosis: A case associated with a complex CFTR allele. *J Med Genet.*;37:E15.
- Aleksandrov, A. A., Kota, P., Cui, L., Jensen, T., Alekseev, A. E. and Reyes S., et al.,** 2012, Allosteric modulation balances thermodynamic stability and restores function of deltaF508 CFTR. *J. Mol. Biol.* 419, 41–6010.1016/j.jmb.2012.03.001.
- Amaral, M.D. and Farinha, C.M.,** 2013, Rescuing mutant CFTR: a multi-task approach to a better outcome in treating cystic fibrosis. *Curr Pharm Des* 19, 3497–3508.
- Anderson, D.H.,** 1938, Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study, *Am J Dis Child*, 56: 344-99.
- Anderson, M.P. and Welsh, M.J.,** 1992, Regulation by ATP and ADP of CFTR chloride channels that contain mutant nucleotide-binding domains, *Science.*;257:1701-4.
- Anderson, M.P., Rich, D.P., Gregory, R. J., Smith, A. E., and M. J. Welsh,** 1991, Generation of cAMP-activated chloride currents by channel allows application of the powerful patch-clamp expression of CFTR. *Science* 251: 679–682, 1991.
- Anzai, C., Morokawa, N., Okada, H., Kamidono, S., Eto, Y. and Yoshimura, K.,** 2003, CFTR gene mutations in Japanese individuals with congenital bilateral absence of the vas deferens. *J Cyst Fibros* 2: 14–18.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Arends, A.M. and Pettit, R.S.,** 2015, Profile of lumacaftor/ivacaftor combination: potential in the treatment of cystic fibrosis, Orphan Drugs: Research and Reviews, August 2015 Volume 2015:5 Pages 61—68
- Borgo, G., Cabrini, G., Mastella, G., Ronchetto, P., Devoto, M. and Romeo, G.,** 1993, Phenotypic intrafamilial heterogeneity in cystic fibrosis. Clin Genet 44, 48–9.
- Boyle, M.P.,** 2003, Nonclassic cystic fibrosis and CFTR-related diseases, Curr Opin in Pulm Med, 9: 498-503.
- Bradbury, N.A.,** 2016, Ion channels and transporters of epithelia in health and disease, physiology in health and disease, DOI 10.1007/978-1-4939-3366-2_24
- Callaghan, B.D., Carr, S., Balfour-Lynn, I. and Dinwiddie, R.,** 2002, Do asian cystic fibrosis patients have more severe disease than their caucasian peers in childhood? Pediat Pulm sp.24, 329-329
- Caramelo, J.J. and Parodi, A.J.,** 2007, How sugars convey information on protein conformation in the endoplasmic reticulum. Semin Cell Dev Biol 18, 732–742.
- Carlson, E., Bays, N., David, L. and Skach, W.R.,** 2005, Reticulocyte lysate as a model system to study endoplasmic reticulum membrane protein degradation. Methods Mol Biol. 301:185–205.
- Carveth, K., Buck, T., Anthony, V. and Skach, W.,** 2002, Cooperativity and flexibility of cytsic fibrosis transmembrane conductance regulator transmembrane segments participate in membrane localization of a charged residue. J. Biol. Chem, 277:39507–39514
- Castellani, C., Cuppens, H., Macek, M. Jr, and et al.,** 2008, Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. J Cyst Fibros, 7(3):179–196.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Castellani, C., Cuppens, H., Macek, M.Jr., Cassiman, J.J., Kerem, E. and Durie, P., et al.,** 2008, Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros.*7:179-96.
- CFTR SCİENCE** “CFTR Activity and Phenotype: Both alleles contribute to total CFTR activity” <https://www.cftrscience.com/?q=CFTR-activity-and-phenotype> (Erişim tarihi, 3 Mart 2017)
- Chang, X., Cui, L., Hou, Y., Jensen, T.J., Aleksandrov, A.A., Mengos, A. and Riordan, J.R.,** 1999, Removal of multiple arginine-framed trafficking signals overcomes misprocessing of delta F508 CFTR present in most patients with cystic fibrosis. *Mol Cell* 4, 137–142.
- Chang, X.B., Mengos, A., Hou, Y.X., Cui, L., Jensen, T.J., Aleksandrov, A., Riordan, J.R. and Gentzsch M.,** 2008, Role of N-linked oligosaccharides in the biosynthetic processing of the cystic fibrosis membrane conductance regulator, *J. Cell Sci*, 121:2814–2823. [PubMed: 18682497.
- Chen, E.Y., Bartlett, M.C., Loo, T.W. and Clarke,D.M.,** 2004, The Delta F508 mutation disrupts packing of the Transmembrane segments Of the Cystic fibrosis Transmembrane Conductance regulator, *J. Biol.Chem*, 279, 39620–39627.
- Cheng, S.H., Gregory, R.J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D.W., White, G.A., O’Riordan, C.R. and Smith, A.E.,** 1990, Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63, 827–834.
- Cheng, S.H., Rich, D.P., Marshall, J., Gregory, R.J., Welsh, M.J. and Smith, A.E.,** 1997, Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel, *Cell* 66:1027–1036.
- Chiba-Falek, O., Kerem, E., Shoshani, T., Aviram, M., Augarten, A., Bentur, L., Tal, A., Tullis, E., Rahat, A. and Kerem, B.,** 1998, The molecular basis of disease variability among cystic fibrosis patients carrying the 3849+10 kb C → T mutation. *Genomics* 53, 276–83.]

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cioaca, D., Ghenea, S., Spiridon, L.N., Marin, M., Petrescu, A.J. and Petrescu, S.M.,** 2011, C-terminus glycans with critical functional role in the maturation of secretory glycoproteins. PLoS ONE 6, e19979.
- Clain, J., Fritsch, J., Lehmann-Che, J., Bali, M., Arous, N., Goossens, M., Edelman, A. and Fanen P.,** 2001, Two mild cystic fibrosis-associated mutations result in severe cystic fibrosis when combined in cis and reveal a residue important for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing and function. J Biol Chem. 2001;276:9045–9049.
- Claustres, M., Altieri, J.P., Guittard, C., Templin, C., Chevalier-Porst, F. and Des Georges, M.,** 2004, Are p.I148T, p.R74W and p.D1270N cystic fibrosis causing mutations? BMC Med Genet.;5:19.
- Claustres, M., Guittard, C., Bozon, D., Chevalier, F., Verlingue, C., Ferec, C., Girodon, E., Cazeneuve, C., Bienvenu, T., Lalau, G., Dumur, V., Feldmann, D., Bieth, E., Blayau, M., Clavel, C., Creveaux, I., Malinge, M.C., Monnier, N., Malzac, P., Mitre, H., Chomel, J.C., Bonnefont, J.P., Iron, A., Chery, M. and Georges, M.D.,** 2000, Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. Hum Mutat 16, 143 156.
- Collazo, T., Magarino, C., Chavez, R., Suardiaz, B., Gispert, S., Gomez, M., Rojo, M., and Heredero, L.,** 1995, Frequency of delta-F508 mutation and XV2C/KM19 haplotypes in Cuban cystic fibrosis families. Hum Hered 45, 55-57.
- Collins, F.S.,** 1992, Cystic fibrosis: Molecular biology and therapeutic implications. Science, 256: 774-9.
- Coppinger, J.A., Hutt, D.M., Razvi, A., Koulov, A.V., Pankow, S., Yates, J.R. and Balch, W.E.,** 2012, A chaperone trap contributes to the onset of Cystic fibrosis. PLoS ONE 7, e37682.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cui, L., Aleksandrov L., Chang, X. B., Hou Y. X., He, L., Hegedus, T., Gentzsch, M., Aleksandrov, A., Balch, W. E., Riordan, J. R.,** 2007, Domain interdependence in the biosynthetic assembly of CFTR. *J. Mol. Biol.* 365, 981–994. [10.1016/j.jmb.2006.10.086](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.086)
- Cytic Fibrosis Mutation Database,** 2016 <http://www.genet.sickkids.on.ca/app>, (Erişim tarihi: 8 Eylül 2016).
- Dawson, D.C., Smith, S.S. and Mansoura, M.K.,** 1999, CFTR: Mechanism of Anion Conduction *Physiol. Rev.* 79, S47–S75
- De Braekeleer, M., Allard, C., Leblanc, J. P., Simard, F. and Aubin, G.,** 1997, Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients compound heterozygous for the A455E mutation. *Hum Genet* 101, 208–11.
- Dean, M. and Annilo, T.,** 2005, Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter Super family in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6, 123–142. doi: 10.1146/annurev.genom.6.080604.162122
- Dean, M., Rzhetsky A. and Allikmets R.,** 2001, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*, 11(7):1156-1166.
- DeCarvalho, A.C., Gansheroff, L.J. and Teem, J. L.,** 2002, Mutations in the nucleotide binding domain 1 signature motif region rescue processing and functional defects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator delta F508. *J. Biol. Chem.* 277, 35896–35905. [10.1074/jbc.M205644200](https://doi.org/10.1074/jbc.M205644200)
- Deeley, R.G. and Cole S.P.,** 1997, Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin. Cancer Biol.* 8(3), 193–204.
- DiSant’Agnese, P.A., Darling, R.C., Perera, G.A. and Shea, E.,** 1953, Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics*, 12, 549-563.
- Divac, A., Nikolic, A., Mitic-Milikic, M., Nagorni-Obradovic, L., Petrovic-Stanojevic N., DopudjaPantic, V., Nadaskic, R., Savic, A. and Radojkovic, D.,** 2004, High frequency of the R75Q CFTR variation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Cyst Fibros*, 3:189-91.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dork, T., Wulbrand, U., Richter, T., Neumann, T., Wolfes, H., Wulf, B., Maass, G. and Tummler, B.,** 1991, Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Genet* 87, 441–6.
- Du, K. and Lukacs, G. L.,** 2009, Cooperative assembly and misfolding of CFTR domains in vivo. *Mol. Biol. Cell* 20, 1903–1915 10.1091/mbc.E08-09-0950
- Du, K., Sharma, M. and Lukacs, G.L.,** 2005, The deltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 17–25 10.1038/nsmb882
- Dugueperoux, I., Bellis, G., Lesure, J.F., Renouil, M., Flodrops, H. and De Braekeleer, M.,** 2004, Cystic fibrosis at the Reunion Island (France): spectrum of mutations and genotype-phenotype for the Y122X mutation. *J Cyst Fibros*, 3:185-8.
- El-Harith, E.A., Dork, T., Stuhmann, M., Abu-Srair, H., al-Shahri, A., Keller, K.M., Lentze, M.J. and Schmidtke, J.,** 1997, Novel and characteristic CFTR mutations in Saudi Arab children with severe cystic fibrosis. *J Med Genet* 34, 996-999.
- Enquist, K., Fransson, M., Boekel, C., Bengtsson, I., Geiger, K. and Lang, L., Pettersson, A., Johansson, S., von Heijne, G. and Nilsson, I.,** 2009, Membrane-integration characteristics of two ABC transporters, CFTR and P-glycoprotein. *J. Mol. Biol.* 387, 1153–1164 10.1016/j.jmb.2009.02.035
- Eskandarani, H.A.,** 2002, Cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations in Bahrain. *J Trop Pediatr* 48, 348-350.
- Esterly, J.R. and Oppenheimer, E.H.,** 1968, Cystic fibrosis of the pancreas: structural changes in peripheral airways. *Thorax*, 23: 670-5.
- Farinha, C.M. and Amaral, M.D.,** 2005, Most F508del- CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin. *Mol Cell Biol* 25, 5242–5252.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Farinha, C.M., Nogueira, P., Mendes, F., Penque, D. and Amaral, M.D.,** 2002, The human DnaJ homologue (Hdj)-1/heat-shock protein (Hsp) 40 co-chaperone is required for the in vivo stabilization of the Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by Hsp70. *Biochem J* 366, 797–806.
- Farinha, M.C. and Canato, S.,** 2017, From the endoplasmic reticulum to the plasma membrane: mechanisms of CFTR folding and trafficking, *Cell. Mol. Life Sci.* 74:39
- Gelman, M.S., Kannegaard, E.S. and Kopito, R.R.,** 2002, A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* 277:11709–11714. [PubMed: 11812794]
- Gentsch, M. and Riordan J.R.,** 2001, Localization of sequences within the C-terminal domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator which impact maturation and stability. *J. Biol. Chem.* 276(2), 1291–1298.
- Glozman, R., Okiyoneda, T., Mulvihill, C.M., Rini, J.M., Barriere, H. and Lukacs, G.L.,** 2009, N-glycans are direct determinants of CFTR folding and stability in secretory and endocytic membrane traffic. *J. Cell. Biol.* 184:847–862.
- Goldman, A., Labrum, R., Claustres, M., Desgeorges, M., Guittard, C., Wallace, A. and Ramsay, M.,** 2001, The molecular basis of cystic fibrosis in South Africa. *Clin Genet* 59, 37-41.
- Hammerle M.M., Aleksandrov A.A., Chang X.B. and Riordan J.R.,** 2000, A novel CFTR disease-associated mutation causes addition of an extra N-linked oligosaccharide. *Glycoconj. J.* 17, 807–813. 10.1023/A:1010992827511
- Hammond, C. and Helenius, A.,** 1995, Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7, 523–529.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hamosh, A., Fitz-Simmons, S.C., Macek, M.J., Knowles, M.R., Rosenstein, B.J. and Cutting, G.R.,** 1998, Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J Pediatr* 132, 255-259.
- Hanrahan, J.W., Gentzsch, M. and Riordan, J.R.,** 2002, The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (ABCC7), ABC Proteins: From Bacteria to Man ISBN 0-12-352551-9
- He, L., Aleksandrov, L. A., Cui, L., Jensen, T. J., Nesbitt, K. L. and Riordan, J.R.,** 2010, Restoration of domain folding and interdomain assembly by second-site suppressors of the deltaF508 mutation in CFTR. *FASEB J.* 24, 3103–3112. [10.1096/fj.09-141788](https://doi.org/10.1096/fj.09-141788)
- Higgins, C.F.,** 1992, ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annual Review of Cell Biology* 8 (1): 67-113
- Hoelen, H., Kleizen, B., Schmidt, A., Richardson, J., Charitou, P. and Thomas, P.J. and Braakman, I.,** 2010, The primary folding defect and rescue of deltaF508 CFTR emerge during translation of the mutant domain. *PLoS ONE* 5:e15458. [10.1371/journal.pone.0015458](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015458)
- Hudson, R., Chong, A. A., Protasevich, I. I., Vernon, R., Noy, E. and Bihler, H., and An, J.L., Kalid, O., Sela-Culang, I., Mense, M., Senderowitz, H., Brouillette, C.G. and Forman-Kay, J.D.,** 2012, Conformational changes relevant to channel activity and folding within the first nucleotide binding domain of CFTR. *J. Biol. Chem.* 287, 28480–28494. [10.1074/jbc.M112.371138](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.371138)
- Hull, J.,** 2003, Basic Science of Cystic Fibrosis. *Current Pediatrics.* 2003;13: 253-258.
- Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F. and Kim, S.H.,** 1998, Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter *Nature* 396, 703–7
- Kerem, E.,** 2006, Mutation specific therapy in CF. *Paed Respir Rev.* 7:166-9.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Khushoo, A., Yang, Z., Johnson A. E. and Skach W.R.**, 2011, Ligand-driven vectorial folding of ribosome-bound human CFTR NBD1. *Mol. Cell* 41, 682–692. doi:10.1016/j.molcel.2011.02.027
- Kılınç, M.O., Ninis, V.N., Dağlı, E., Demirkol, M., Ozkinay, F., Arikan, Z., Coğulu, O., Hüner, G., Karakoç, F. and Tolun, A.**, 2002, Highest heterogeneity for cystic fibrosis: 36 mutations account for 75% of all CF chromosomes in Turkish patients. *Am J Med Genet.* 2002 Dec 1;113(3):250-7.
- Kiesewetter, S., Macek, M., Davis, C., Jr., Curristin, S., M., Chu, C.S., Graham, C., Shrimpton, A. E., Cashman, S.M., Tsui, L.C. and Mickle, J., and et al.**, 1993, A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet* 5, 274–8.
- Kim, S.J. and Skach, W.R.**, 2012, Mechanisms of CFTR folding at the endoplasmic reticulum. *Front Pharmacol* 3:201. doi:10.3389/fphar.2012.00201
- Kinlough, C.L., McMahan, R.J., Poland, P.A., Bruns, J.B., Harkleroad, K.L., Strempel, R.J, Kashlan, O.B., Weixel, K.M., Weisz, O.A. and Hughey, R.P.**, 2006, Recycling of MUC1 is dependent on its palmitoylation, *J. Biol. Chem.* 281:12112–12122.
- Kleizen, B., van Vlijmen, T., de Jonge, H.R. and Braakman, I.**, 2005, Folding of CFTR is predominantly cotranslational. *Mol Cell.* 20:277–287.
- Kosorok, M.R., Wei, W.H. and Farrell, P.M.**, 1996, The incidence of cystic fibrosis. *Stat Med* 15, 449-462.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahlberg, A. and Zoric, N.**, 2006, The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* Apr-Jun;27(2-3):95-125. Epub 2006 Feb 3.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lewis, H. A., Wang, C., Zhao, X., Hamuro, Y., Connors, K. and Kearins, M.C., Lu, F., Sauder, J.M., Molnar, K.S., Coales, S.J., Maloney, P.C., Guggino, W.B., Wetmore, D.R., Weber, P.C. and Hunt, J.F., 2010,** Structure and dynamics of NBD1 from CFTR characterized using crystallography and hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J. Mol. Biol.* 396, 406–430.10.1016/j.jmb.2009.11.051
- Lewis, H. A., Zhao X., Wang, C., Sauder, J. M., Rooney, I., Noland, B.W., Lorimer, D., Kearins, M.C., Connors, K., Condon, B., Maloney, P.C., Guggino, W.B., Hunt, J.F. and Emtage, S., 2005,** Impact of the deltaF508 mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure. *J. Biol. Chem.* 280, 1346–1353.10.1074/jbc.M410968200
- Lewis, H.A., Zhao, X., Wang, C., Sauder, J.M., Rooney, I., Noland, B.W., Lorimer, D., Kearins, M.C., Connors, K., Condon, B., Maloney, P.C., Guggino, W.B., Hunt, J.F. and Emtage, S., 2005,** Impact of the deltaF508 mutation in first nucleotide-binding domain of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on domain folding and structure. *J Biol Chem* 280, 1346–1353.
- Li, C. and Naren, A.P., 2005,** Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacol. Ther.* 108, 208-223. Reviews macromolecular-complex regulation of CFTR
- Licht, A. and Schneider, E., 2011,** ATP binding cassette systems: structures, mechanisms, and functions. *Central European Journal of Biology* 6(5):785-801
- Lin, D.T., Makino, Y., Sharma, K., Hayashi, T., Neve, R., Takamiya, K. and Huganir, R.L., 2009,** Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation. *Nat. Neurosci.* 12:879–887.
- Locher, K.P., 2004,** Structure and mechanism of ABC transporters. *Current Opinion in Structural Biology* 14(4):426-431

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Loo, M.A., Jensen, T.J., Cui, L., Hou, Y., Chang, X.B. and Riordan, J.R.,** 1998, Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J.* 17, 6879–6887. [10.1093/emboj/17.23.6879](https://doi.org/10.1093/emboj/17.23.6879)
- Loo, T.W., Bartlett, M.C. and Clarke, D.M.,** 2008, Correctors promote folding of the CFTR in the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 413: 29–36
- Loo, T.W., Bartlett, M.C. and Clarke, D.M.,** 2010, The V510D suppressor mutation stabilizes deltaF508-CFTR at the cell surface. *Biochemistry* 49, 6352–6357. [10.1021/bi100807h](https://doi.org/10.1021/bi100807h)
- Lu, Y., Xiong, X., Helm, A., Kimani, K., Bragin, A. and Skach, W.R.,** 1998, Co- and Post translational mechanisms direct CFTR N-terminus transmembrane assembly. *J. Biol. Chem.* 273:568–576.
- Lukacs, G.L., Chang, X.B., Bear, C., Kartner, N., Mohamed, A., Riordan, J.R. and Grinstein, S.,** 1993, The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells, *J Biol Chem.* Oct 15;268(29):21592-8.
- Maquat, L.E.,** 1995, When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA.* Jul;1(5):453–465.
- McClure, M., DeLucas, L.J., Wilson, L., Ray, M., Rowe, S.M., Wu, X., Dai, Q., Hong, J.S., Sorscher, E.J., Kappes, J.C. and Barnes, S.,** 2012, Purification of CFTR for mass spectrometry analysis: identification of palmitoylation and other post-translational modifications. *Protein Eng. Des. Sel.* 25:7–14.
- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M. and Cyr, D.M.,** 2001, The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* 3, 100–105.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M. and Cyr, D.M.,** 2001, The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.* 3, 100–105.1038/35070137.
- Mendoza, J.L., Schmidt, A., Li, Q., Nuvaga, E., Barrett, T. and Bridges, R.J., Feranchak, A.P., Brautigam, C.A. and Thomas, P.J.,** 2012, Requirements for efficient correction of deltaF508 CFTR revealed by analyses of evolved sequences. *Cell* 148, 164–174.10.1016/j.cell.2011.11.023.
- Mense, M., Vergani, P., White, D.M., Altberg, G., Nairn, A.C. and Gadsby, D.C.,** 2006, In vivo phosphorylation of CFTR promotes formation of a nucleotide-binding domain heterodimer. *EMBO J.* 25:4728 – 4739.
- Naren, A.P., Cormet-Boyaka, E., Fu, J., Villain, M., Blalock, J.E., Quick, M.W. and Kirk, K.L.,** 1999, CFTR chloride channel regulation by an inter domain interaction. *Science* 286(5439), 544–548.
- Naren, A.P., Quick, M.W., Collawn, J.F., Nelson, D.J. and Kirk, K.L.,** 1998, Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein–protein interactions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95(18), 10972–10977
- NCBI** (National Center for Biotechnology Information) <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CFTR#synonyms>, (Erişim tarihi 20 Şubat 2017).
- Nilsson, I., and von Heijne, G.,** 2000, Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. *J. Biol. Chem.* 275, 17338–17343.10.1074/jbc.M002317200
- Nishimura, N. and Balch, W.E.,** 1997, A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* 277, 556–558.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Oberdorf, J., Pitonzo, D. and Skach, W.R.,** 2005, An energy-dependent maturation step is required for release of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from early endoplasmic reticulum biosynthetic machinery. *J. Biol. Chem.* 280, 38193–38202.10.1074/jbc.M504200200.
- Orozco, L., Velazquez, R., Zielenski, J., Tsui, L.C., Chavez, M., Lezana, J.L., Saldana, Y., Hernandez, E. and Carnevale, A.,** 2000, Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846delT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G-->A). *Hum Genet* 106, 360-365.
- Ostedgaard, L.S., Rich, D.P., DeBerg, L.G. and Welsh, M.J.,** 1997, Association of domains within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry* 36, 1287–1294.10.1021/bi962174s
- O'Sullivan, B.P. and Freedman, S.D.,** 2009, Cystic fibrosis, *The Lancet* Volume 373, Issue 9678, Pages 1891-1904
- Oswald, C., Holland, I.B. and Schmitt, L.,** 2006, The motor domains of ABC – transporters. *Naunyn- Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 372 (6):385-399.
- Öztürk, G.Ö., Kibar, F., Karaçor, E.D., Çetiner, S., Şahin, G. and Akgün.,Y.,** 2013, Adana İlinde CFTR Gen Mutasyonlarının Değerlendirilmesi, *Cilt 38, Sayı: 2,*
- Patrick, A.E., Karamyshev, A.L., Millen, L. and Thomas, P.J.,** 2011, Alteration of CFTR transmembrane span integration by disease-causing mutations. *Mol. Biol. Cell* 22, 4461–4471.10.1091/mbc.E11-05-0396
- Pissarra, L.S., Farinha, C.M., Xu, Z., Schmidt, A., Thibodeau, P.H. and Cai, Z., Thomas, P.J., Sheppard, D.N. and Amaral, M.D.,** 2008, Solubilizing mutations used to crystallize one CFTR domain attenuate the trafficking and channel defects caused by the major cystic fibrosis mutation. *Chem. Biol.* 15, 62–69.10.1016/j.chembiol.2007.11.012

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Popov, M., Tam, L.Y., Li, J. and Reithmeier, R.A.,** 1997, Mapping the ends of transmembrane segments in a polytopic membrane protein. Scanning N-glycosylation mutagenesis of extracytosolic loops in the anion exchanger, band 3. J. Biol. Chem. 272, 18325–18332.10.1074/jbc.272.29.18325
- Powers, C.A., Potter, E.M., Wessel, H.U. and Lloyd-Still, J.D.,** 1996, Cystic fibrosis in Asian Indians. Arch Pediatr Adolesc Med 150, 554-555.
- Protasevich, I., Yang, Z., Wang, C., Atwell, S., Zhao, X. and Emtag Wetmore D, Hunt, J.F. and Brouillette, C.G.,** 2010, Thermal unfolding studies show the disease causing F508del mutation in CFTR thermodynamically destabilizes nucleotide-binding domain 1. Protein Sci. 2010;19:1917-31.
- Pyle, L.C., Ehrhardt, A., Mitchell, L.H., Fan, L., Ren, A., Naren, A.P., Li, Y., Clancy, J.P., Bolger, G.B., Sorscher, E.J. and Rowe, S.M.,** 2011, Regulatory domain phosphorylation to distinguish the mechanistic basis underlying acute CFTR modulators. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 301:L587– 597.
- Qanbar, R. and Bouvier, M.,** 2003, Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. Pharmacol. Ther. 97:1–33.
- Qu, B.H. and Thomas, P.J.,** 1996, Alteration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator folding pathway. J. Biol. Chem. 271, 7261–17264.10.1074/jbc.271.18.10577
- Rabeh, W. M., Bossard, F., Xu, H., Okiyoneda, T., Bagdany, M., and Mulvihill C. M., Du, K., di Bernardo, S., Liu, Y., Konermann, L., Roldan, A. and Lukacs, G.L.,** 2012, Correction of both NBD1 energetics and domain interface is required to restore deltaF508 CFTR folding and function. Cell 148, 150–163.10.1016/j.cell.2011.11.024
- Randak, C. and Welsh, M.J.,** 2003, An intrinsic adenylate kinase activity regulates gating of the ABC transporter CFTR. Cell, 115: 837-50.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rave-Harel, N., Kerem, E., Nissim-Rafinia, M., Madjar, I., Goshen, R., Augarten, A., Rahat, A., Hurwitz, A., Darvasi, A. and Kerem, B.,** 1997, The molecular basis of partial penetrance of splicing mutations in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 60, 87–94.
- Reddy, M.M. and Quinton, P.M.,** 2001, Selective activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ and HCO₃⁻ conductances. *JOP*. 2:212-8.
- Resh, M.D.,** 2006, Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Sci. STKE*. 2006:re14.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R. and Grzelczak, Z.,** 1989, Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066–73.
- Romey, M. C., Guittard, C., Carles, S., Demaille, J., Claustres, M. and Ramsay, M.,** 1999, First putative sequence alterations in the minimal CFTR promoter region [letter]. *J Med Genet* 36, 263–4.
- Romey, M. C., Pallares-Ruiz, N., Mange, A., Mettling, C., Peytavi, R., Demaille, J. and Claustres, M.,** 2000, A naturally occurring sequence variation that creates a YY1 element is associated with increased cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene expression. *J Biol Chem* 275, 3561–7.
- Rowe, S.M., Miller, S. and Sorscher, E.J.,** 2005, Mechanisms of Disease: Cystic Fibrosis. *N Engl J Med*. 352: 1992-2001.
- Roxo-Rosa, M., Xu, Z., Schmidt, A., Neto, M., Cai, Z. and Soares, C. M., Sheppard, D.N. and Amaral, M.D.,** 2000, Revertant mutants G550E and 4RK rescue cystic fibrosis mutants in the first nucleotide-binding domain of CFTR by different mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 17891–17896. [10.1073/pnas.0608312103](https://doi.org/10.1073/pnas.0608312103).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Roxo-Rosa, M., Xu, Z., Schmidt, A., Neto, M., Cai, Z., Soares, C.M., Sheppard, D.N. and Amaral, M.D.,** 2006, Revertant mutants G550E and 4RK rescue Cystic fibrosis mutants in the first nucleotide-binding domain of CFTR by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 17891–17896.
- Rozen, R., De Braekeleer, M., Daigneault, J., Ferreira-Rajabi, L., Gerdes, M., Lamoureux, L., Aubin, G., Simard, F., Fujiwara, T.M. and Morgan, K.,** 1992, Cystic fibrosis mutations in French Canadians: three CFTR mutations are relatively frequent in a Quebec population with an elevated incidence of cystic fibrosis. *Am J Med Genet* 42, 360-364.
- Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z. and Piette, J.C., Deleuze, J.F., Brewer, H.B., Duverger, N., Denèfle, P. and Assmann, G.,** 1999, Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 22:352–5.
- Sadlish, H., Pitonzo, D., Johnson, A.E. and Skach, W.R.,** 2005, Sequential triage of transmembrane segments by Sec61 α during biogenesis of a native multispinning membrane protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:870–878. [PubMed]
- Schneider, A., Larusch, J., Sun, X., Aloe, A., Lamb, J. and Hawes R, Cotton, P., Brand, R.E., Anderson, M.A., Money, M.E., Banks, P.A., Lewis, M.D., Baillie, J., Sherman, S., Disario, J., Burton, F.R., Gardner, T.B., Amann, S.T., Gelrud, A., George, R., Rockacy, M.J., Kassabian, S., Martinson, J., Slivka, A., Yadav, D., Oruc, N., Barmada, M.M., Frizzell, R., Whitcomb, D.C.,** 2011, Combined bicarbonate conductance-impairing variants in CFTR and SPINK1 variants are associated with chronic pancreatitis in patients without cystic fibrosis. *Gastroenterology*.140:162-71.
- Scott-Ward, T.S. and Amaral, M.D.,** 2009, Deletion of Phe508 in the first nucleotide-binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator increases its affinity for the heat shock cognate 70 chaperone. *FEBS J* 276, 7097–7109.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Seibert, F.S., Linsdell, P., Loo, T.W., Hanrahan, J.W., Riordan, J.R. and Clarke, D.M.,** 1996, Cytoplasmic loop three of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator contributes to regulation of chloride channel activity. *J Biol Chem.* 1996 Nov 1;271(44):27493-9.
- Serohijos, A. W., Hegedus, T., Aleksandrov, A. A., He L., Cui L., and Dokholyan N. V. and Riordan, J.R.,** 2008, Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 3256–3261. 10.1073/pnas.0800254105
- Sharma, M., Pampinella, F., Nemes, C., Benharouga, M., So, J., Du, K., Bache, K.G., Papsin, B., Zerangue, N., Stenmark, H. and Lukacs, G.L.,** 2004, Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J. Cell. Biol.* 164:923–933.
- Sharma, N., Sharma, H., Sharma, U and Prasad R.,** 2013, Biochemistry, molecular biology and molecular genetics of cystic fibrosis. *Biochemistry, Molecular Biology and Molecular Genetics of Genetic Disorders*, 63-82 ISBN: 978-81-7895-609-1
- Sheppard D.N., Rich, D.P., Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith A.E. and Welsh, M.J,** 1993, Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature.* 362(6416):160-164.
- Sheppard, D.N. and Welsh, M. J.,** 1999, Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiological Reviews* Vol. 79, Suppl., No. 1, Printed in U.S.A.
- Shoshani, T., Augarten, A., Gazit, E., Bashan, N., Yahav, Y. and Rivlin, Y., Tal, A., Seret, H., Yaar, L., Kerem, E., et al.,** 1992, Association of a nonsense mutation (W1282X), the most common mutation in the Ashkenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease. *Am J Hum Genet.* 50:222-8.
- Skach, W.R,** 2009, Cellular mechanisms of membrane protein folding. *Nat Struct Mol Biol.* 16:606–612.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Skach, W.R.**, 2000, Defects in processing and trafficking of the cystic fibrosis transmembrane Conductance regulator. *Kidney Int* 57, 825–831.
- Sobonya, R.E. and Taussig, L.M.**, 1986, Quantitative aspects of lung pathology in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis*, 134: 290-5.
- Stavrovskaya, A.A. and Stromskaya, T.P.**, 2008, Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)*, 73:592-604
- Swiatecka-Urban, A., Brown, A., Moreau-Marquis, S., Renuka, J., Coutermarsh, B., Barnaby, R., Karlson, K.H., Flotte, T.R., Fukuda, M., Langford, G.M. and Stanton, B.A.**, 2005, The short apical membrane half-life of rescued Δ F508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) results from accelerated endocytosis of Δ F508-CFTR in polarized human airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 280:36762–36772.
- Teem, J.L., Berger, H.A., Ostedgaard, L.S., Rich, D.P., Tsui, L.C. and Welsh M.J.**, 1993, Identification of revertants for the cystic fibrosis delta F508 mutation using STE6-CFTR chimeras in yeast. *Cell* 73, 335–346.1016/0092-8674(93)90233-G
- Teng, H., Jorissen, M., Van Poppel, H., Legius, E., Cassiman, J.J. and Cuppens, H.**, 1997, Increased proportion of exon 9 alternatively spliced CFTR transcripts in vas deferens compared with nasal epithelial cells. *Hum. Molec. Genet.* 6: 85-90, 1997.
- Thibodeau, P.H., Richardson, J.M., Wang, W., Millen, L., Watson, J. and Mendoza, J.L., Du, K., Fischman, S., Senderowitz, H., Lukacs, G.L., Kirk, K. and Thomas, P.J.**, 2010, The cystic fibrosis-causing mutation Δ F508 affects multiple steps in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator biogenesis. *J. Biol. Chem.* 285, 35825–35835.1074/jbc.M110.131623.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Thibodeau, P.H., Richardson, J.M., Wang, W., Millen, L., Watson, J.M., Mendoza, J.L., Du, K., Fischman, S., Senderowitz, H. and Lukacs, G.L.,** 2010, The Cystic fibrosis-causing mutation deltaF508 affects multiple steps in cystic fibrosis transmembrane Conductance regulator biogenesis. *J Biol Chem* 285, 35825–35835.
- Tsui, L.C. and Dorfman, R.,** 2016, The Cystic Fibrosis Gene: A Molecular Genetic Perspective *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a009472
- Tsui, L.C.,** 1992, The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends Genet.* 1992 Nov;8(11):392-8..
- UniProt database,** 2017, <http://www.uniprot.org/uniprot/P13569> (Erişim tarihi: 20 Şubat 2017)
- Universal Mutation Database,** http://www.umd.be/CFTR/W_CFTR/gene.html (Erişim tarihi: 30 Mart 2017)
- Vashist, S. and Ng, D.T.,** 2004, Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* 165, 41–52.
- Walters, S. and Mehta, A.,** 2007, Epidemiology of cystic fibrosis. In: Hodson M, Geddes DM, Bush A, eds. *Cystic fibrosis*, 3rd ed. London: Edward Arnold Ltd, pp. 21–45, ISBN 10: 0340742089
- Wang, C., Protasevich, I., Yang, Z., Seehausen, D., Skalak, T. and Zhao, X., e Atwell, S., Spencer Emtage, J., Wetmore, D.R., Brouillette, C.G. and Hunt, J.F.,** 2010, Integrated biophysical studies implicate partial unfolding of NBD1 of CFTR in the molecular pathogenesis of F508del cystic fibrosis. *Protein Sci.* 19, 1932–1947 10.1002/pro.480
- Wang, X., Matteson, J., An, Y., Moyer, B., Yoo, J.S., Bannykh, S., Wilson, I.A., Riordan, J.R. and Balch, W.E.,** 2004, COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. *J Cell Biol* 167, 65–74.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ward, C.L. and Kopito, R.R.,** 1994, Intracellular turnover of cystic fibrosis Transmembrane Conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 25710–25718.
- Welsh, M.J. and Smith, A.E.,** 1993, Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73(7):1251-4. PMID: 7686820.
- Wilkinson, D.J., Strong, T.V., Mansoura, M.K., Wood, D.L., Smith, S.S., Collins, F.S. and Dawson, D.C.,** 1997, CFTR activation: additive effects of stimulatory and inhibitory phosphorylation sites in the R domain. *Am. J. Physiol.* 273:L127–133. [PubMed: 9252549]
- Xiong, X., Bragin, A., Widdicombe, J.H., Cohn, J. and Skach, W.R.,** 1997, Structural cues involved in endoplasmic reticulum degradation of G85E and G91R mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest.* 100:1079–1088.
- Yilmaz, E., Erdem, H., Özgüç, M., Coşkun, T., Özçelik, U., Göçmen, A and Özalp, I.,** 1995, Study of 12 mutations in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Hered.* May-Jun;45(3):175-7.
- Younger, J.M., Chen, L., Ren, H.Y., Rosser, M.F., Turnbull, E.L. and Fan C.Y., Patterson C. and Cyr D.,M.** 2006, Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell* 126, 571–582. 10.1016/j.cell.2006.06.041
- Zhang, M.M., Tsou, L.K., Charron, G., Raghavan, A.S. and Hang, H.C.,** 2010, Tandem fluorescence imaging of dynamic S-acylation and protein turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:8627–8632. [PubMed: 20421494]
- Zhang, Y., Nijbroek, G., Sullivan, M.L., McCracken, A.A., Watkins, S.C., Michaelis, S. and Brodsky, J.L.,** 2001, Hsp70 molecular chaperone facilitates endoplasmic reticulum-associated protein degradation of Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast. *Mol Biol Cell* 12, 1303–1314.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zielenski, J.**, 2000, Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*. 67(2):117-133.
- Zielenski, J., Fujiwara, T.M., Markiewicz, D., Paradis, A.J., Anacleto, A.I., Richards, B., Schwartz, R.H., Klinger, K.W., Tsui, L.C. and Morgan, K.**, 1993, Identification of the M1101K mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene and complete detection of cystic fibrosis mutations in the Hutterite population. *Am J Hum Genet* 52, 609-615.
- Zielenski, J., Patrizio, P., Corey, M., Handelin, B., Markiewicz, D., Asch, R. and Tsui, L.C.**, 1995, CFTR gene variant for patients with congenital absence of vas deferens. *Am J Hum Genet* 57(4):958-60. PMID: 7573058.
- Zielenski, J., Rozmahel, R., Bozon, D., Kerem, B., Grzelczak, Z., Riordan, J. R., Rommens, J. and Tsui, L.C.**, 1991, Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis Transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 10, 214–28.

ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı:** Atilla ÖZ
2. **Doğum Tarihi:** 10.09.1978
3. **Doğum Yeri :** Gaziantep / Nizip
4. **Öğrenim Durumu:** Doktora
5. **Lisans Genel Not Ortalaması:** 71,72
6. **Yüksek Lisans Genel Not Ortalaması:** 3,41
7. **Doktora Genel Not Ortalaması:** 3,67
- 8

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Fen Bilgisi Öğretmenliği	İnönü Üniversitesi	2002-2006
Y. Lisans	Biyoteknoloji A.B.D	Çukurova Üniversitesi	2006-2009
Doktora	Biyoteknoloji A.B.D	Ege Üniversitesi	2011- Devam ediyor

9. Yürütülen Tez Çalışması

Yüksek Lisans Tezi

OZ, A., 2009, Yerli Sığır Irklarında *Myostatin* Gen Polimorfizminin Araştırılması Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji A.B.D., ADANA

Doktora Tezi

OZ, A., 2017, Türkiye’deki Kistik Fibrozisli Hastalarda CFTR Geni DNA Varyantlarının Karakterizasyonu ve Fenotipik Özellikleri ile İlişkisi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji A.B.D., İZMİR

10. Yayınlar

SCI, SSCI, AHCI

Tosun Tasar, P., Sahin, S., Karaman, E., Oz, A., Ulusoy, M.G., Duman, S., Berdeli, A. And Akcicek, F., 2015, Myostatin Gene Polymorphism in an Elderly Sarcopenic Turkish Population. Genet Test Mol Biomarkers. Aug;19(8):457-60. Epub 2015 Jun 5.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Berdeli, A., Sözeri, B., Gerceker Türk, B., Oz, A., Mir, S., 2015, Turkish DIRA patient with

novel IL1RN gene Mutation, Pediatric Rheumatology 2015, 13(Suppl 1):P181, 8th

International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Auto-Inflammatory

Diseases which was held in Dresden, Germany from September 30 – October 3, 2015

Berdeli,A., Mukhtarova, G., Oz, A., Musayev, S., 2015, MEFV gene mutation distrubution in Azerbaijan population, Pediatric Rheumatology 2015, 13(Suppl 1):P127 8th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Auto-Inflammatory Diseases which was held in Dresden, Germany from September 30 – October 3, 2015

Berdeli, A., Talay, G., Guriş, C., Oz, A., Treatment of familial mediterranean fever with canakinumab in patiens unresponsive to colchicine 2016 : P 211 9th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Auto-Inflammatory Diseases.” The meeting will take place in Northern Cyprus, Turkish Republic on May 4th-7th, 2017.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Özcan, N., Öz, A., Özcan, B.D., Yerli Sığır Irklarında Myostatin Genine Ait III.Ekzon Bölgesinin G→T Polimorfizmi Bakımından Karşılaştırılması.6.Ulusal Zootehni Bilim Kongresi, 79- 84, ERZURUM.

ÖZ, A., Özcan, N., Yerli Sığır Irklarında Myostatin Genine Ait III.Ekzon Bölgesinin Nt 821 (del11) Polimorfizmi Bakımından Karşılaştırılması .Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yıl:2010 Cilt:22-2

11. Projeler (Proje Asistanı Olarak Görev Aldığı Projeler)

β-1,3-Glukanaz Geninin *Lactobacillus plantarum*'da Klonlanması İle Silajda Aerobik Bozulmayı Önleyen Rekombinant Silaj İnokülantının Geliştirilmesi, Tübitak Projesi, TÜBİTAK TOVAG, Proje NO: 108T919, (2009).

Yerli Sığır Irklarında Myostatin Çift Kaslılık Geninin Ekzon-3 Bölgesindeki Del 11 Mutasyonlarının Belirlenmesi, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu Projesi, ZF2008 BAP16, (2008).

12. Katıldığı Eğitimler

Moleküler Genetik Teknikleri: Yönlendirilmiş Mutasyon, DNA ve Protein Uygulamaları, TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü,(28 Mayıs-1Haziran 2007).

İletişim :

E mail: attillaoz@gmail.com

EKLER

Ek 1. Araştırma Başvurusu Onay Belgesi





T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : 70198063-050.06.04
Konu : Kararlar 16-8.1/58

Prof. Dr. Afig BERDELİ
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Kurulumuza başvurusunu yaptığınız "**Türkiye'deki Kistik Fibrozisli Hastalarda CFTR Geni DNA Varyantlarının Karakterizasyonu Ve Fenotipik Özellikleri İle İlişkisi.**" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmaktadır.

Ayrıca ilgili mevzuat gereği araştırmaya başlama bildiriminin, bir yıllık süreyi aşması durumunda Yıllık Bildirimlerin, Ciddi Advers Olay Bildirimlerinin, bitirme tarihinin ve Sonuç Raporunun Kurulumuza sunulması ve her türlü yazışmanın araştırma tam adı/kodu, karar tarih ve sayısı bildirilerek (Etik Kurul Bilgilendirme Formu ekinde) yapılması gerekmektedir.

Başvuru dosyası kapsamında, araştırma giderlerinin Bilimsel Araştırmalar fonu tarafından karşılanacağına ilişkin sunulmuş bulunan belge doğrultusunda, araştırmanızın desteklendiğine dair belgenin alınmasından sonra çalışmaya başlanması ve süreç içinde bu belgenin Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir.

Yazımızın bir örneğinin diğer araştırma merkezlerine ve destekleyiciye iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Aysenur OKTAY
Kurul Başkanı

EK: İlgili Etik Kurul Kararı



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Türkiye'deki Kistik Fibrozisli Hastalarda CFTR Geni DNA Varyantlarının Karakterizasyonu Ve Fenotipik Özellikleri İle İlişkisi			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Afif BERDELİ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	Bilimsel Araştırma Fonu			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐ FAZ 2 ☐ FAZ 3 ☐ FAZ 4 ☐ Gözetimsel İlaç Çalışması ☐ Tıbbi Cihaz Klinik Araştırması ☐ In Vitro Tıbbi Tanı Cihazları İle Yapılan Performans Değerlendirme Çalışmaları ☐ İlaç Dışı Klinik Araştırma ☒ Diğer ise belirtiniz			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐ ULUSAL ☒ ULUSLARARASI ☐				
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	30.06.2016	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU 6-12, 12-18 Yaş Grubunda Çocuklar İçin	30.06.2016	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU	-	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	SİGORTA	☐			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐			
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 16-8.1/58	Tarih: 29.12.2016			
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödenmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.				
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU					
ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği			
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. Ayşenur OKTAY			
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**) İmza
Prof. Dr. Ayşenur OKTAY Başkan	Radyodiagnostik	EÜ. Tıp Fakültesi Radyoloji AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H
Prof. Dr. Aytül ÖNAL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H
Prof. Dr. Suna TOKSAVUL Üye	Protetik Diş Tedavisi	E.Ü. Diş Hek. Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD.	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu : 16- 8.1/58				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Sarenur GÖKBEN Üye	Çocuk Nörolojisi	EÜ. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	<i>S. Gökbek</i>
Prof. Dr. Abdullah SAYINER Üye	Göğüs Hastalıkları	EÜ. Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	<i>A. Sayiner</i>
Prof. Dr. Bülent SEMERCİ Üye	Üroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD.	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Süheyla ALTUĞ ÖZSOY Üye	Halk Sağlığı Hemşireliği	EÜ. Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Murat PEHLİVAN Üye	Biyofizik	E.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	<i>M. Pehlivan</i>
Prof. Dr. Çağatay ÜSTÜN Üye	Tıp Tarihi ve Etik	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Şafak TANER Üye	Halk Sağlığı	E. Ü. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	<i>S. Taner</i>
Doç. Dr. Ayşe EROL Üye	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	<i>A. Erol</i>
Yard. Doç. Dr. Gülsün AYGÖRMEZ UGURLUBAY Üye	Ceza Hukuku	Serbest	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Uzm. Ecz. Ebru BEDİR Üye	Eczacı	E.U. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	<i>E. Bedir</i>
Uzm. Dr. Özlem EKER Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Serbest	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	<i>O. Eker</i>
Fatma BÜYÜKAKKUŞ Üye	Ziraat Mühendisi	Emekli	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	<i>F. Büyükkuş</i>

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

ASLI GİBİDİR
Sumru FESİCİOĞLU
EÜTF Klinik Araştırmaları
Etik Kurulu Sekreteri

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşenur OKTAY	İMZA <i>A. Oktay</i>	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05	Sayfa 2/2
--	-------------------------	----------------------------------	------------------	---------------------------------------	--------------