

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**BRUTON HASTALIĞINDA BTK GEN MUTASYONLARININ
PROTEİN FONKSİYONLARINA ETKİSİ VE GENOTİP VE
FENOTİP İLİŞKİSİ**

Sona YAQUBOVA

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Afig BERDELİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 01.03.2018

Bornova-İZMİR

2018

YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAVI JÜRİ TUTANAĞI

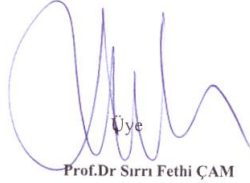
Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoteknoloji** Anabilim Dalı'nda Prof.Dr. Afig BERDELİ Danışmanlığında Sona YAQUBOVA tarafından hazırlanan "BRUTON HASTALIĞINDA BTK GEN MUTASYONLARININ PROTEİN FONKSİYONLARINA ETKİSİ VE GENOTİP VE FENOTİP İLİŞKİSİ" adlı yüksek lisans tezini değerlendirmek ve adayı tez savunmasına tabi tutmak üzere, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nca oluşturulan jüri 01/03/2018 tarihinde saat 11.00'de **Biyoteknoloji** Anabilim Dalı'nda Prof.Dr. Afig BERDELİ Başkanlığında toplanmıştır.

Jüri üyeleri tarafından hazırlanan ve ekte sunulan kişisel raporlar ayrıntılı şekilde tartışılmış, intihal yazılım programında belirlenen benzerlik oranları incelenmiş ve aday tez savunma sınavına alınmıştır. Sonuçta tez oybirliği/oyçokluğu ile **başarılı bulunarak kabul edilmiştir/ başarısız bulunarak red edilmiştir/ düzeltme yapılmasına karar verilmiştir.**



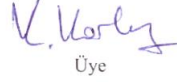
Jüri Başkanı (*)

Prof.Dr Afig BERDELİ



Üye

Prof.Dr Sırrı Fethi ÇAM



Üye

Prof.Dr K.Sami KORKMAZ

* Lisansüstü tez savunma sınavlarında danışman öğretim üyesi jüri başkanı olabileceği gibi jürinin kendi arasında seçeceği bir üye de başkan olabilir.

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “BRUTON HASTALIĞINDA BTK GEN MUTASYONLARININ PROTEİN FONKSİYONLARINA ETKİSİ VE GENOTİP VE FENOTİP İLİŞKİSİ” 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.

01/03/2018

Sona YAQUBOVA

ÖZET**BRUTON HASTALIĞINDA BTK GEN MUTASYONLARININ
PROTEİN FONKSİYONLARINA ETKİSİ VE GENOTİP VE
FENOTİP İLİŞKİSİ**

YAQUBOVA, Sona

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Afig BERDELİ

Mart 2018, 67 sayfa

BTK geni tarafından kodlanan protein, B hücresi gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu genin mutasyonları, Xbağlantılı agammaglobulinemi'e neden olur, bu immün yetmezliği, olgun B lenfositleri üretememe ile karakterizedir ve Ig ağır zincir yeniden düzenlenmesinin başarısızlığı ile ilişkilidir. Tec ailesinin tirozin kinazı olan Bruton tirozin kinaz (BTK), B hücrelerinin fonksiyonu için şarttır. X-bağlantılı agammaglobulinemi adlandırılan bu genetik hastalığına muzdarip kalan insanların çoğu, az miktarda olgun B-hücresine sahiptirler ve bakteriyel enfeksiyonlara son derece duyarlıdırlar. Hastalığa, B hücresi gelişiminde rol oynayan BTK genindeki mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. BTK geninin etki alanındaki tek tek mutasyonların rolü incelenmekte olup ve tekabül eden mutasyonların yapısı belirlenmektedir. Bu yapıda, nokta mutasyonlar BTK'yi nasıl inaktive edebileceğini ve daha sonra XLA'ya neden olacağı tartışmamızı sağlamaktadır. Mutasyonları BTK geninin genomik organizasyonu ve bireylerin hastalık seyri açısından yorumlanmaktadır. saptanan BTK'daki XLA'ya neden olan mutasyonlar BTKbaz ve HGMD veritabanında rapor edilmiştir.

Anahtar sözcükler: BTK ,GEN, B Hücresi, X-Bağlantılı
Agammaglobulinemi, Genetik, Tec ailesi.XLA



ABSTRACT**THE EFFECT OF BTK GENE MUTATIONS ON PROTEIN
FUNCTION AND RELATION WITH GENOTYPE AND
PHENOTYPE AT BRUTON DISEASE**

YAQUBOVA, Sona

MSc in Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Afig BERDELI

March 2018, 67 pages

The protein encoded by BTK gene plays a crucial role in B-cell development. Mutations in this gene cause X-linked agammaglobulinemia , which is an immunodeficiency characterized by the failure to produce mature B lymphocytes, and associated with a failure of Ig heavy chain rearrangement. Bruton's tyrosine kinase (Btk), a Tec-family tyrosine kinase, is essential for B-cell function. People suffering from a genetic disease called X-linked agammaglobulinemia have fewer fully mature B-cells than most people and are extremely susceptible to bacterial infections. The disease is caused by mutations in the gene (Btk), which is involved in B-cell development. We have studied the roles of individual mutations in the domains of BTK gene and determined the structure of the mutations. This structure allows us to discuss how the point mutations may inactivate BTK and subsequently cause XLA. The mutations is interpreted in terms of the genomic organization of the BTK gene and the disease course in individual patients. The database of XLA-causing identified mutations in Btk, the BTKbase and HGMD It has been reported.

Keywords: BTK ,GENE, B-Cell , X-linked agammaglobulinemia , Genetic, Tec-family.XLA



TEŞEKKÜR

Bu alıŐma sűresince gerekli verilerin sađlanmasında kolaylık gűsteren tez danıŐmanıma , sayın Prof.Dr.Afig BERDELİ'ye teŐekkűrű bir borç bilirim. Őzellikle kıymetli gűrűŐlerinden yararlandıđım ve yakın ilgisini esirgemeyen sayın Demet Tıđlı,Merve Atan'a ve tezin biçimlenmesinde deđerli katkılarını aldıđım bűlűm arkadaŐım Sajjad MAHBOUB'a teŐekkűrű bir borç bilirim. Her zaman maddi ve manevi fedakarlıktan kaçınmayan ve bu gűnlere gelmemi sađlayan sevgili aileme ve bana çalıŐmamın her aŐamasında destek olan ve bana gű veren eŐım EMİN YAQUBOV'a sonsuz teŐekkűr ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	x
İÇİNDEKİLER(DEVAM).....	x
İÇİNDEKİLER(DEVAM).....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Agammaglobulinemi (XLA)	1
1.1.2 XLA'nın önemli belirtileri	2
1.1.3 Hastalığın nedeni	2
1.2 B Hücre İmmün Yetmezliği :	2
2. TERMİNOLOJİ.....	3
2.1 Epidemiyoloji	3
2.2 Etiyoloji	3
2.3 Tanı Yöntemleri.....	4
2.3.1 Ayrıcı Tanı	4
2.3.2 Antenatal Tanı	4
2.4 Genetik Danışma	5
2.5 Prognoz.....	5
2.6 X'e Bağımlı Agammaglobulinemi	5
2.7 Klinik Tanımlama.....	6
2.7.1 Teşhis / Test.....	6

İÇİNDEKİLER(DEVAM)

2.7.2 Öngörülen Bulgular	6
2.7.3 Klinik geçmiş	6
2.7.4 Laboratuvar bulguları	7
2.8 Teşhisin Kurulması.....	7
2.8.1 Moleküler Genetik Test Yaklaşımları	8
2.9 Yönetim Ve Tedavi	9
3.GENOTİP-FENOTİP KORELASYONU	10
3.1 Genetik İlgili Bozukluklar	10
3.1.2 Fenotip Serileri	11
3.3 X Bağlantılı Defektler	12
3.4 Akriba Risklerinin Değerlendirilmesi.....	12
3.5 Aile Üyeleri İçin Riskler.....	13
3.5.1 Bir Ebeveyn Probandı;	13
3.5.2 Bir Sib Probandı	13
3.5.3 Bir Probandın Çocuklarında	14
3.6 Germline mozaikliği gözlenme durumu	14
4. MOLEKÜLER GENETİK	15
4.1 BTK	16
4.1.1 BTK Gen yapısı	17
4.2 BTK Domainleri	18
4.2.1 PH domaini:	18
4.2.2 TH domaini ;	19
4.2.3 SH3 domaini;	19
4.2.4 SH2 domaini;	19
4.2.5 Kinaz domaini;	20

İÇİNDEKİLER(DEVAM)

4.3 Tam Boy BTK Kompozit Modeli.....	21
4.4 BTK domain sekansı	24
4.5 BTK cDNA sekansı.....	25
4.6 BTK Sinyal Yolağı.....	31
5.Y KULLANILAN YÖNTEM	33
5.1.Dna Eldesi	33
5.1.1.Invitrogen Purelink Genomic Blood DNA Purification	33
5.1.2.Hazırlama	34
5.1.3.Prosedür	34
5.2.DNA'nın kontrolü:	35
5.2.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):	35
5.3.DNA Dizileme:.....	38
5.4.İstatistiksel Analiz:	39
6. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	40
6.1. SONUÇLAR.....	46
6.2 Kontrol grubunda.....	57
7. BULGULAR.....	58
8. KAYNAKLAR.....	60
8. KAYNAKLAR(DEVAM).....	606
8. KAYNAKLAR(DEVAM).....	607
8. KAYNAKLAR(DEVAM).....	608
8. KAYNAKLAR.....	609
8. KAYNAKLAR	60
8. KAYNAKLAR.....	61
KATKI BELİRTME	67



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.2 BTK geninin etyoloji diyagramı.....	4
4.1 Bruton tirozin kinazı yapısı.	16
4.1.1 Diyagramda BTK substratları ve inhibitörleri.....	17
4.1.2 BTK fosforilasyon sitesi.	18
4.1.2 BTK-PH domaininin membran etkileşimi.....	18
4.2.2 TH domain’de bulunan N-terminal BTK motifi.....	19
Şekil : 74.2.4 SH2 domani içeren genler	20
4.2.5 Kinaz domaininin aktivasyon lopu	21
4.3 BTK geninin kompozit modeli.....	22
4.3.1 BTK bileşik modeli.	23
4.5 BTK sinyal yolağı.....	31
7.1.1 BTK geninde saptanan varyantların gösterilmektedir.	59



ÇİZELGELER DİZİNİTabloSayfa

1: Tablo Varyasyon oranı	8
3.2 : Agammaglobulinemi - 10 Kayıt.....	11
4.1: X-Bağlı Agammaglobulinemi: Genler ve Veritabanları	15
4.2:X-Bağlı Agammaglobulinemi için OMIM Yazıları.	15
4.3:Gen-fenotip ilişkileri	16



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
BTK	Bruton Tyrosine Kinase
XLA	X-Linked Agammaglobulinemia
PH	Pleckstrin Homolojisi
TH	Tec Homolojisi
SH3	Src Homoloji 3
SH2	Src Homoloji 2
SH 1 / TK	Src Homoloji 1 / Tirozin Kinaz
HGMD	Human Gene Mutation Database
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
TAQ	Termo Stabil Polimeraz Enzimi
SNP	Single Nucleotide Polymorphism”Ler



1.GİRİŞ

İmmün yetmezliği, bağışıklık sisteminin defonksiyon anlamına gelmektedir. Böylece insanlar çeşitli enfeksiyonlara yatkındırlar. İmmün yetersizliliği Primer ve ya sekonder (adventif) olmaktadır. Primer immün yetersizliği konjenital genetik bozukluklar nedeniyle oluşur , adventif immün yetersizliği ise hastalıklar takibinde oluşmaktadır.

En tanınmış ikincil immün yetmezliği AIDS hastalığıdır.

Antikorlar (antikor) eksikliği Primer immün yetmezliğinde en sık görülen tipdir. Antikor eksikliği olan hastalar, bakteriyel enfeksiyonlara muztarip kalma kabiliyeti çok yüksektir. Bu breyler , gerektiğinde düzenli ve devamlı olarak intravenöz immunoglobulin ve antibiyotik alma zorundadırlar.

B Lenfositlerinin yeterli antikorlar salgılamaması ve ya kalitesiz antikorların salgılanması bu hastalık grubunda patolojik temeldir.Aslında, kemik iliğindeki ve periferal lenfoid dokulardaki B lenfositlerinin temayüz eksikliği, patolojik temelinin ana nedenidir. En yaygın antikor eksikliği hastalıklarında “Seçici IgA” eksikliği gözlenmektedir . Çoğu insanların uzun bir süre kendi rahatsızlıklarından habersizdirler ve sık sık soğuk algınlığı ve Synvzythay nedeniyle her yıl birkaç kez doktora müracaat etmektedirler. Bu hastalığın temel nedeni ve tedavisi şimdiye kadar bilinmemektedir.

1.1 Agammaglobulinemi (XLA)

Yaygın değişken immün yetmezliği adı verilen ve kısaca CVID olarak da tanımlanan, Primer Antikor eksikliğinin bir formu ve sadece erkeklerde

gözükmekte olan bu hastalık ‘‘Bruton tirozin kinaz eksikliği’’ de adlandırılır ve cinsiyete bağlı Agammaglobulinemi ve ya XLA’da denilmektedir.

1.1.2 XLA’nın önemli belirtileri

Rekürren Bakteri enfeksiyonları , kandakı B lenfositlerinin eksikliği ve Serum antikorunun ciddi azalması önemli belirtileri’dir.

1.1.3 Hastalığın nedeni

X kromozomu üzerinde yer alan Bruton Tirozin Kinaz (BTK) kodlayan Gende meydana gelen defektler, bu hastalığa neden olmaktadır.

1.2 B Hücre İmmün Yetmezliği :

İmmün yetmezliğinin ortaya çıkmasında rolü olan her basamağın primer immün yetmezliği hastalıklarına, potansiyel yaratmaktadır. X’e bağlı ilk primer immün yetmezliği , hipogammaglobulinemi (Bruton hastalığı)’nın tanımlandığı yani 1952’den bu yana yaklaşık 130 primer immün yetmezlik hastalığı tanımlanmıştır. Özellikle son 8 yıl içerisinde, bu hastalıkların moleküler temelini anlaşıması ve elde edilen gelişmeler sayesinde, 25 yeni gen defektinin immün yetmezliğine yol açtığı belirlenmiştir.

2. TERMİNOLOJİ

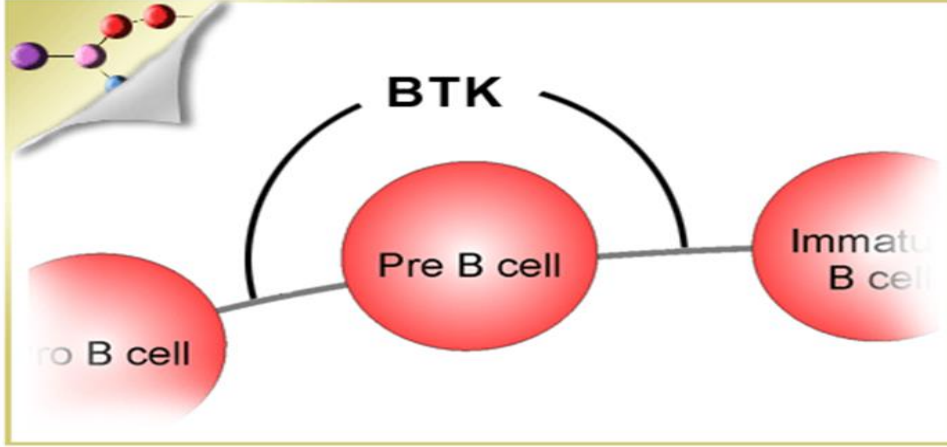
Bruton, ilk kez 1952'de "agammaglobulinemia" olarak tanımlandı ve X bağlantılı kalıtım kalıbı, tanımlandığı zamandan kısa süre sonra kaydedildi. Bu hastalığa bazen konjenital agammaglobulinemi, ailesel hipogammaglobulinemi veya infantil agammaglobulinemi ya sadece agammaglobulinemi denilmektedir .

2.1 Epidemiyoloji

Tahmini prevalans 1 / 350,000 ila 1 / 700,000'dir. Yıllık insidansı bilinmemektedir. Kalıtsal gen defektlerine bağlı immün sistemin işlevinde ortaya çıkan bozukluklar ile karakterize olan tüm primer immün yetmezliklerini göz önüne aldığımızda bu hastalıklığın insidansı 1/2.000 - 1/10.000 canlı doğum olarak bildirilmektedir. Ayrıca popülasyondaki genel prevalansları ise 1/10.000 ile 9/10.000 arasında değişmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yeni doğan 500 bebekten 1'inde immün sisteminin bir komponentinde bozukluk ile dünyaya geldiği vurgulanmıştır. Dünya çapında tüm ırk ve çeşitli etnik gruplarda gözükmekte olup sadece erkekler etkilenir ve dişiler asemptomatik taşıyıcılarıdır (Lovering ve ark 1994).

2.2 Etiyoloji

XLA, B lenfositlerinin farklılaşması ve olgunlaşması ile ilişkili olan, BTK geninin mutasyon sonucudur.



Şekil : 2.2 BTK geninin etyoloji diyagramı.

2.3 Tanı Yöntemleri

Tekrarlayan veya devam eden bakteriyel enfeksiyonlar bulunan hastalarda XLA tanısı düşünülmelidir. X'e bağlı transmisyon ile uyumlu bir aile öyküsü bu tanıya işaret etmektedir. Düşük serum Ig gösteren kan testleri ve önemli ölçüde azaltılmış B lenfosit sayımları ile teyit edilebilir. Moleküler genetik testleri , tanıyı oluşturmak veya doğrulamak için kullanılmalıdır (Vorechovsky ve ark 1994).

2.3.1 Ayrıcı Tanı

Otozomal resesif veya dominant geçişli agamaglobulinemi , yaygın değişken immün yetmezliği(CVID) , Hiper IgM sendromu ve şiddetli kombine immün yetmezliği(SCID) ayrıcı tanı olarak kullanılmaktadır.

2.3.2 Antenatal Tanı

Ailede hastalığa neden olan mutasyonun saptanması daha sonra prenatal tanıyı sağlamaktadır.

2.4 Genetik Danışma

XLA, adından anlaşılacağı gibi, kalıtımda X'e bağlı bir yol izlemektedir. Vakanın yaklaşık% 50'si ailevi, geri kalanı **de novo** mutasyonlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Etkilenen aile üyelerine genetik danışma yapılmalıdır.

2.5 Prognoz

XLA hastalarının çoğunda normal bir yaşam gözlenmektedir. Fakat bazı hastalarda ciddi enfeksiyonlar ve komplikasyonlar, gelişmesi nedeniyle yaşam beklentisi azalmaktadır. Erken tedavi önlemler ve tedavi uyumu önemli prognostik faktörlerdir.

XLA'lı bireylerin prognozu, daha erken teşhis, liberal antibiyotik kullanımı ve serum IgG konsantrasyonlarının normal olarak elde edilmesine olanak tanıyan gamaglobulin preparatlarının geliştirilmesi ve gamaglobulin süstitüsyon tedavisinde son 35 yılda belirgin şekilde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Çoğu birey, normal bir hayat sürdürür. Bununla birlikte, uygun tedaviye rağmen yaklaşık% 10 oranında bireylerde önemli enfeksiyonlar geliştiği ve kronik pulmoner değişiklikler gözlenmektedir (Kerner ve ark 1995).

2.6 X'e Bağımlı Agammaglobulinemi

X kromozomuna bağlı konjenital immün yetmezliği resesif geçişli olup ve B lenfositlerinin olgunlaşmasında bozukluklara yol açmaktadır. Ayrıca 6-9 ayları arasında anneden çocuğa geçen IgG antikolarının kaybolması ve üretilememesi sonucunda enfeksiyonlara yatkınlı ile hastalıklar ortaya çıkmaktadır.

2.7 Klinik Tanımlama

Etkilenen bireyler, kalan maternal immüoglobülinler nedeniyle doğun sonrası birkaç ay genellikle sağlıklıdırlar. Hastalarda seyrek vitiligo, eritematöz döküntü veya alopesi totalis olduğu bildirilmektedir. Büyüme ve gelişme genelliği normaldir, klinik belirtileri bazı hastalarda az şiddetli olup ve 10 yaşından ve sonrasına kadar immünodeficient görülmektedir. XLA komplikasyonları arasında progresif akciğer hastalığı, iltihaplı bağırsak hastalığı, artrit ve nörolojik değişiklikler bu hastalığın klinik tanıtımını desteklemektedir.

2.7.1 Teşhis / Test.

Serum immüoglobülinlerinin tümünde belirgin azalma görülmesi veya B hücrelerinin bulunmaması (CD19 + hücreleri) XLA'nın teşhisini sağlamaktadır. Ayrıca B hücrelerinin sayısındaki azalma en tutarlı ve belirgin özelliktir.

Not ; B hücrelerinden yoksun amcası veya erkek kuzeni olması tanıya sahip erkeklerde hemizigot BTK patojenik varyantını ve dişilerde ise heterozigot BTK patojenik varyantının saptanmasını neredeyse kesin kılmaktadır.

2.7.2 Öngörülen Bulgular

Aşağıdaki bulunan klinik öyküsü, laboratuvar bulguları ve aile öyküsü olan bireylerde XLA'dan şüphelenmelidir.

2.7.3 Klinik geçmiş.

Aşağıdakilerden herhangi biri:

- Beş yaşından önce başlayan nükseden otitis, pnömoni, sinüzit ve konjunktivit

- Sepsis, menenjit, selülit veya ampiyem gibi hayatı tehdit eden ciddi bir bakteri enfeksiyonu
- Lenfoid dokunun (küçük adenoidler, bademcikler ve lenf nodlarının fizik muayenesinde) eksikliği

2.7.4 Laboratuvar bulguları

Serum immünoglobulinlerin tüm sınıflarında belirgin azalma

- A. Serum IgG konsantrasyonu tipik olarak <200 mg / dL (2 g / L) 'dir. XLA'lı bireylerin çoğu, ölçülebilir serum IgG'si genellikle 100 ila 200 mg / dL arasında olup, bireylerin yaklaşık % 10'unda serum IgG konsantrasyonu > 200 mg / dL'dir.
- B. IgM ve IgA serum konsantrasyonları tipik olarak <20 mg / dL'dir. Serum IgM konsantrasyonuna özel dikkat gösterilmeli. IgG ve IgA serum konsantrasyonunda azalma, immünoglobülin oluşumunda gecikme yaşayan çocuklarda görülebilmese rağmen, düşük serum IgM konsantrasyonu her zaman bağışıklık yetersizliği ile ilişkilidir.

2.8 Teşhisin Kurulması

Erkek Probandı; XLA'nın teşhisi klinik ve laboratuvar bulgular ile saptanır ve moleküler genetik testi ile BTK'da hemizygoz patojenik bir varyantın saptanması sağlanmalıdır (bkz. Tablo 2.8).

Heterozigot Dişiler; XLA'lı tek bir kadın rapor edilmiştir. Babası XLA'lı ve gen analizinin sonucundan , paternal olarak türetilen X kromozomu aktif X olduğu saptanmıştır.

2.8.1 Moleküler Genetik Test Yaklaşımları

Tek gen testi , Çoklu gen paneli kullanımı ve daha kapsamlı Genomik testi içermektedir .

A. Tek Gen Testi;Önce BTK'nın dizi analizi yapılır ve bunu takiben patojen olmayan varyantın gen hedefli silme / duplikasyon analizi bulunur. Patojenik varyantı olan bireylerin yaklaşık % 3-5'inde BTK geninin tümü veya bir kısmı ve BTK ile bağlantılı olan TIMM8A geninde büyük silinmeler saptanmaktadır. Sonuc olarak XLA'ya ve sağırılık-distoni-optik nöropati sendromuna (DDS; Mohr-Tranebjaerg sendromu olarak da adlandırılır) neden olmaktadır.Ayrıca kromozomal mikroarray (CMA) ile ek testler yapılmaktadır.XLA ve DDS'in klinik özelliklerine doğru yaklaşım için bireylerde önce CMA testinin yapılması önerilmektedir.

B. BTK İle Bağlantılı Diğer Genleri İçeren Çoklu Gen Paneli; Panelde yer alan genler ve her gen için kullanılan testlerin tanısal duyarlılığı, laboratuvar ve zamana göre değişmektedir. Bir panelde kullanılan yöntemler, dizi analizi, silme / çoğaltma analizi ve / veya sekans'a dayalı olmayan diğer testleri içerebilir.

C. Daha Kapsamlı Genomik Testleri; exome dizileme ve genom dizileme dahil olmak üzere XLA belirtilerine sahip bir kişide, tanıyı teyit etmek için kabul edilebilir yöntemdir. Ayrıca bu tür testler, daha önce düşünülmeyen bir teşhisi (örneğin benzer bir klinik sunumla sonuçlanan farklı bir genin veya genlerin mutasyonu) sağlamakta olup veya önermiş olabilmektedir.

Gen	Test Metodu	Bu Yöntemle Tespit Edilebilir Bir Patojenik Varyansa Sahip Proband Oranı
BTK	Sekans analizi	%92
	Gen hedefli silme / çoğaltma analizi	%8
	CMA	%3-5

Tablo 2.8 varyans oranı.

2.9 Yönetim Ve Tedavi

XLA'nın küratif tedavisi bulunmamaktadır ancak hastalık kontrolü, tutarlı gammaglobulin terapisi ile başarılabilir. Gammaglobulin terapisi damardan (400-600 mg / kg her 3-4 haftada) veya subkutan olarak (100 mg / kg her hafta) verilebilir. Tedavi mümkün olduğunca erken başlatılmalıdır.

Bazı immünologlar göre kronik profilaktik antibiyotiklerin kullanılması, akut enfeksiyonların tedavisinin uzaması ve antibiyotik dozlarının maksimum da uygulanması tedavi yöntemleridir. Ayrıca bu hastalık grubunun tedavisinde kullanılan immunoglobulin enjeksiyonu , çok dikkat gerektirmekte olup ve birçok durumda yapılmamalıdır .

3.GENOTİP-FENOTİP KORELASYONU

Spesifik BTK patojenik varyantı ile hastalığın ciddiyeti arasında güçlü bir korelasyon gözlenmemiştir; Bununla birlikte, korunan yerlerde meydana gelen amino asit değişimleri veya splice defektlerine sahip kişilerde, teşhis anında daha yaşlı olma eğilimi gösterirler ve serum IgM konsantrasyonlarında ve periferik dolaşımında biraz daha fazla B hücresine sahip oldukları saptanılmaktadır (Aghamohammadi ve ark 2007).

3.1 Genetik İlgili Bozukluklar

A-GeneReview; tartışılan fenotiplerin dışındaki saptanan patojenik varyantların BTK ile ilişkili olduğunu göstermektedir.Patojenik varyantına sahip bireylerde, BTK ile yakın ilişkili olan ve geni kapsayan TIMM8A , bazen TAF7L ve DRP2’de geniş bir silinme varyasyonu, ortaya çıkmaktadır. Bu multi gen silinme varyasyonuna sahip kişilerde, XLA ve sağırılık-distoni-optik nöropati sendromu gözükmemektedir (Arai ve ark 2011).

XLA benzeri fenotipe sahip dişilerin çoğunda ve XLA fenotipi olan, ama BTK patojenik varyantına sahip olmayan erkeklerde , B hücrelerinin gelişimi için gerekli olan diğer genlerin kusurlu olması muhtemeldir (bkz. Tablo 3.2).

3.1.2 Fenotip Serileri

TABLO 3.2 : Agammaglobulinemi - 10 Kayıt

LOKASYON	FENOTİP	MİRAS	Fenotip OMIM numarası	Gen / Lokus
5q13.1	?Agammaglobulinemia 7, autosomal recessive	AR	615214	PIK3R1
9q34.11	?Agammaglobulinemia 5	AD	613506	LRRC8A
10q24.1	Agammaglobulinemia 4	AR	613502	BLNK
14q32.33	Agammaglobulinemia 1	AR	601495	IGHM
17q23.3	Agammaglobulinemia 6	AR	612692	CD79B
19p13.3	Agammaglobulinemia 8, autosomal dominant	AD	616941	TCF3
19q13.2	Agammaglobulinemia 3	AR	613501	CD79A
22q11.23	Agammaglobulinemia 2	AR	613500	IGLL1
Xp22	Agammaglobulinemia, X-linked 2	XL	300310	AGMX2
Xq22.1	Agammaglobulinemia, X-linked 1	XLR	300755	BTK

OMIM’de agammaglobulinemi fenotipi ile ilişkili genlerin listesi.

B-IGHM'de (Ig μ zincir C bölgesini kodlayan) 20'den fazla farklı patojen varyantı olan en az otuz kişi bildirilmektedir. Bu kişiler erken yaşta tıbbi müdahale eğilimindedirler ve XLA'lı bireyler ile kıyaslandığında, hayatı tehdit eden enfeksiyonlara yakalanma olasılığı daha yüksek olup ve klinik belirtileri aşırı örtüşme göstermektedir.

Ig α (CD79A), Ig β (CD79B), λ 5 (IGLL1), BLNK veya PIK3R1'deki Defektlerin her biri beşten az kişide bildirilmiştir. Bu beş genetik defekt'ten herhangi birine sahip kişiler, XLA'lı bireyler'den, rutin klinik veya laboratuvar testleri ile ayırt edilemezler.

3.3 X Bağlantılı Defektler

Serum immünoglobülinlerin, düşük konsantrasyonlarında aşağıdaki X bağlantılı bozukluklar görülebilmektedir:

- X bağlantılı hiper IgM sendromu (CD40 ligand eksikliği olarak da bilinir)
- X bağlantılı şiddetli kombine immün yetmezliği.
- X bağlantılı lenfoproliferatif hastalık.

3.4 Akraba Risklerinin Değerlendirilmesi.

Riskli erkek akrabalarında doğumdan sonra, gamma globülin substitüsyon tedavisi derhal başlatılmalı ve viral aşılardan kaçınılmamalı ve mümkün olduğunca değerlendirilmesi tavsiye edilmektedir. Değerlendirmeler aşağıdakıları içerebilir:

- Spesifik BTK patojenik varyantı bilinen aile için moleküler genetik testi ;

- Periferik dolaşımdaki B hücrelerinin yüzdesinin analizi.

Not: Annenin IgG'si plasentayı geçtiği için serum immunoglobulinlerinin yeni doğan bebeklerde değerlendirilmesi yararlı olmayacaktır.

3.5 Aile Üyeleri İçin Riskler

3.5.1 Bir Ebeveyn Probandı;

Etkilenen erkeğin babası bu bozukluğa sahip değilse, BTK patojenik varyantı için homozigot olmayacaktır; Bu nedenle, daha fazla değerlendirme / test yapmaya ihtiyacı duyulmaz.

Birden fazla etkilenen bireyin bulunduğu bir ailede, etkilenen bir erkeğin annesi zorunlu bir heterozigottur (taşıyıcı).

Bir kadının birden fazla etkilenen çocuğu varsa ama diğer etkilenen akrabaları yoksa ve eğer BTK patojenik varyantı onun lökosit DNA'sında bulunamazsa, germ hat mozaikçiliğine sahiptir (Gonad mozaizizm) .

Etkilenen tek erkek aile üyesiye (etkilenen erkeklerin% 50'si simpleks vakalarını temsil eder), iki olasılık gözlenmektedir:

- Anne bir taşıyıcıdır (vakaların% 80-85'i)
- Etkilenen erkek, de novo patojenik bir varyanta sahiptir ve bu durumda anne taşıyıcı değildir (vakaların % 15-20 si)

3.5.2 Bir Sib Probandı

Kardeşler için risk, annenin genetik durumuna bağlıdır. Annenin taşıyıcı olması durumunda, her gebelikte patojenik varyantın gözükme olasılığı % 50'dir. Patojenik varyantın miras kalması erkekleri

etkilemektedir, Patojenik varyantı miras alan dişiler ise taşıyıcıdırlar ve etkilenme olasılığı çok dūřüktür.

3.5.3 Bir Probandın Çocuklarında

Etkilenen erkekler'de BTK patojenik varyantının aktarılması: Tüm kızları taşıyıcı olacak ve muhtemelen etkilenmeyecekler. Oğullarının hiçbirinde gözükmemektedir.

3.6 Germline mozaikliği gözlenme durumu

Böylece, etkilenen bir erkek bir ailede tek bir vakayı temsil ediyorsa ve annesinin lökosit DNA'sında BTK patojenik varyantı tespit edilemezse, erkek kardeşlerinin etkilenme riski (<5%) oranlarında bulunmaktadır.

4. MOLEKÜLER GENETİK

Moleküler Genetik; **OMIM** tablolarındaki bilgilere ve **GeneReview**'ın bilgilerine dayalı yazılmaktadır. Veriler aşağıdaki standart referanslardan derlenmiştir: **HGNC** geni; Kromozom lokusu, lokus adı, kritik bölge, **OMIM**'den, **UniProt**'tan gelen protein bağlantılarının sağlandığı veritabanlarına dayalı elde edilmektedir.

Gen	Kromozom Locus	Protein	Lokusa Özgü	HGMD
BTK	Xq22 .1	Tirosin-protein kinaz BTK	BTK@LOVD BTK tabanı:X bağlantılı agammaglobulinemi için mutasyon kayıt veritabanı	BTK

Tablo 4.1: X-Bağlı Agammaglobulinemi: Genler ve Veritabanları

300300	BRUTON AGAMMAGLOBULINEMIA KINASE; BTK	TYROSINE
300755	AGAMMAGLOBULINEMIA, X-LINKED; XLA	

Tablo 4.2: X-Bağlı Agammaglobulinemi için OMIM Yazıları.

Yer	Fenotip	Fenotip MIM numarası	Miras
Xq22.1	Agammaglobulinemi ve izole hormon eksikliği	30.7.200	XLR
	Agammaglobulinemi, X bağlantılı 1	300755	XLR

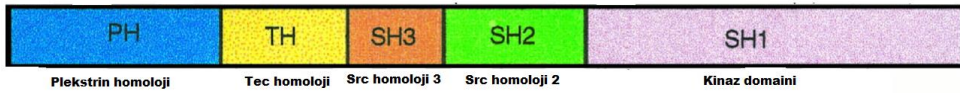
Tablo 4.3:Gen-fenotip ilişkileri

4.1 BTK

Gene_sinonim="AGMX1; AT; ATK; BPK; IMD1; PSCTK1; XLA"

Yaklaşık 40 yıl önce agammaglobulinemi olan ailelerde tirozin kinazlara benzerlik gösteren bir gen klonlanmış ve Bruton tirozin kinaz (BTK) olarak adlandırılmaktadır. Xq21.3-Xq22'de lokalizedir ve 19 ekson içermektedir , 37.5 kb'yi kapsamaktadır. BTK, sitoplazma ve çekirdek arasında harekette olduğu bilinmektedir. BTK, NF-kB sinyallemesini aktive eder ve aynı zamanda bu yolağada promoteru vasıtasıyla düzenlenmektedir.

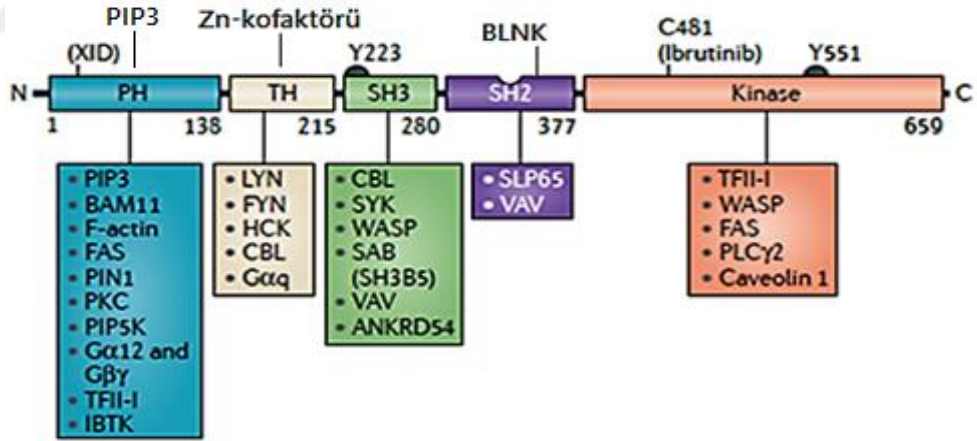
BTK proteini, TEC, ITK / TSK / EMT tarafından oluşturulan reseptör olmayan tirozin kinazların alt ailesinin bir üyesidir , ve farklı fonksiyonlara sahip olan beş domain'dan oluşmaktadır (Smaith ve ark 1998).



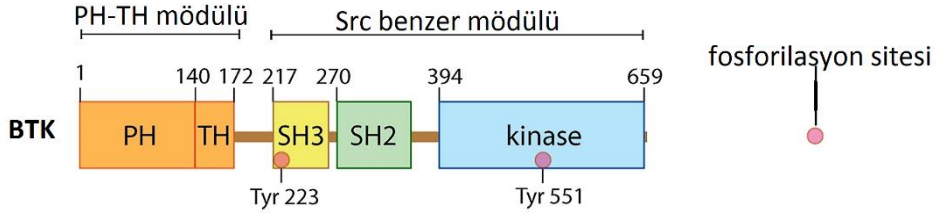
Şekil : 4.1 Bruton tirozin kinaz yapısı.

4.1.1 BTK Gen yapısı

Bruton tirozin kinaz (BTK)'ın, beş farklı domaini Şekil 4.1.1 gösterilmektedir. 1 ila 138 amino asit PH domainini, 139 ila 215 amino asidi TH domainini, 216 ila 280 amino asit SH3 domainini, 281 ila 377 amino asitleri SH2 domainini ve 378 ila 659 amino asitleri SH1/TK domainini yaratmaktadır. PH (pleckstrin homolojisi), TH (Tec homolojisi), SH3 (Src homoloji 3) SH2 (Src homoloji 2) ve SH 1 / TK (Src homoloji1 / Tirozin Kinaz) domainlerini temsil etmektedir. İki tirozin fosforilasyon (Y) bölgesi ve ibrutinibin bağlanma yeri konumu gösterilmekte olup ve her domain için sinyal etkileşim molekülleri gösterilmektedir. Buna ek olarak MYD88, IRAK, TIR ve TLR lerin BTK'ya bağlandığı saptanmaktadır, ancak etkileşim alanları bilinmemektedir (Satterthwaite ve ark 1998).



Şekil: 4.1.1 Diyagramda BTK substratları, inhibitörleri ve upstream moleküllerinin bağlanma alanları farklı renklerde gösterilmektedir.



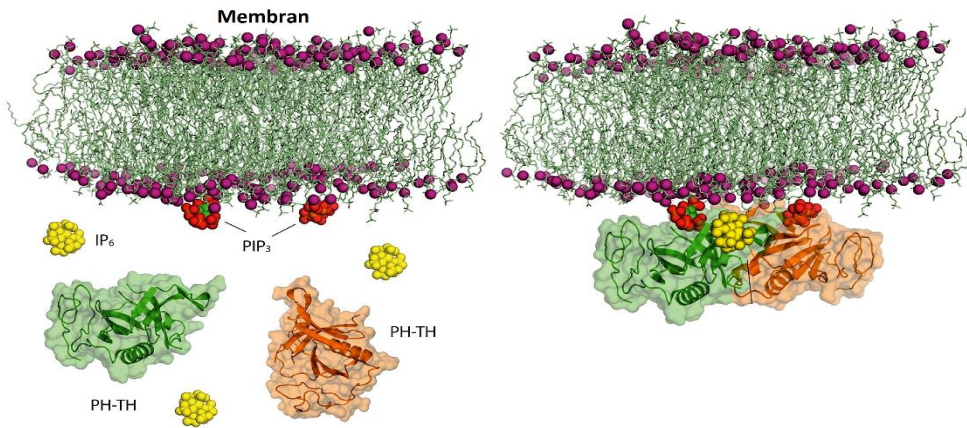
Şekil : 4.1.2 BTK fosforilasyon sitesi.

4.2 BTK Domainleri

4.2.1 PH domaini:

GTPaz aktive edici protein, fosfolipaz ve sitoskeletal proteine sahip , küçük modülerdir. Ayrıca sinyal proteini olarak tanımlanmaktadır.

BTK-PH domaini ; üçlü bir fonksiyona sahiptir : heterotrimerik G-proteinlerinin bağlanması, protein kinaz C'nin bağlanması ve pleckstrinin korunmuş lizin parçaları vasıtasıyla hücre zarındaki fosfoinozitlere bağlanmasını sağlamaktadır. Ayrıca PH domainindeki mutasyonların, fenotipik belirtilerle ilişkilidir (Hyvonen ve Saraste 1997).



Şekil : 4.1.2 BTK-PH domaininin membran etkileşimi (Desiderio 1997).

4.2.2 TH domaini ;

Son derece korunmuş , BTK motifi içeren ve prolin açısından zengin bölgedir. Bu domain'de bulunan N-terminal BTK motifi, PH alanının C-terminal bölgesinde yer alan G-proteinlerinin $\beta\gamma$ alt birimlerine bağlanmak için gereklidir (Schnute ve ark 2012).



Şekil : 4.2.2 TH domain'de bulunan N-terminal BTK motifi (Gustafsson ve ark 2017).

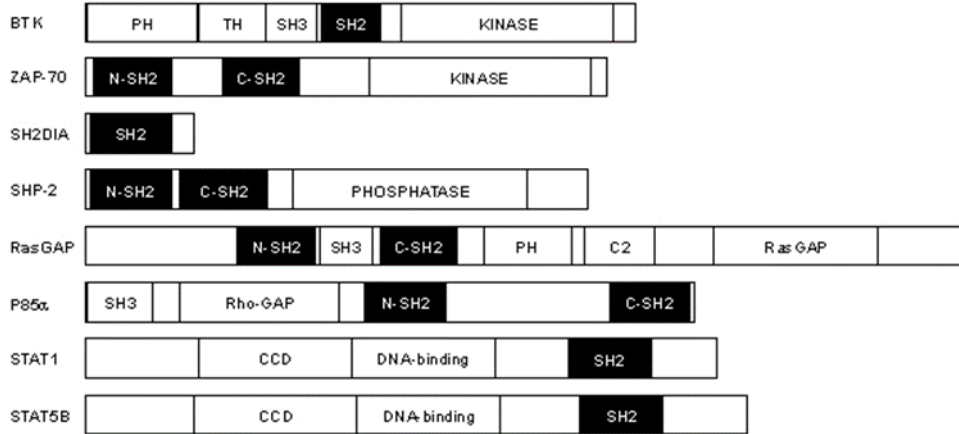
4.2.3 SH3 domaini;

prolin açısından zengin bölgeyi , src aile üyesi (Fyn, Lyn ve HCK) ve proteini tirozin kinazlar bu domain tarafından tanımlanmaktadır. Ayrıca SH3 domaini poliprolin tip II helix'ine bağlanmaktadır (Roskoski 2016).

4.2.4 SH2 domaini;

Hücrel sinyal dalgalarını algılayan fosfotirozin kalıntılarını tanımlamaktadır.

Src homoloji 2 (SH2); Yaklaşık 100'den fazla farklı insan SH2 alanı öngörülmüştür. SH2 domainleri, fosforile tirozin (pY) kalıntılarına bağlanarak, molekül içi ve moleküller arası (protein-protein) iletişime aracılık etmektedir. Genellikle multidomain proteinlerde SH3 , fosfotirozin-bağlama alanı (PTB) ve pleckstrin homolojisi (PH) alanları gibi protein bağlama modülleri ile birlikte görülmektedirler. SH2 domaininde hastalıklara neden olan varyasyonların taranması sonucunda sekiz gende SH2 domaininin olduğu ortaya çıkmıştır: BTK , SH2D1A , RasGAP, Zap-70 , SHP-2 , p85 α altbirimi(PI3-K), STAT1 ve STAT5B aktivatörü. Bu genlerde ortaya çıkan varyasyonlar, dokuz farklı klinik fenotipine neden olmaktadır. Varyasyon türleri, tüm gen veya büyük çaplı delesyondan tek nükleotid varyantına kadar değişmektedir. Amino asit insersiyonu, SH2 domaininde en yaygın mutasyon olarak görülmektedir. SH2 domaini hücrel sinyal yolağında ana domain olmamasına rağmen, hücre gelişim süreci boyunca önemli role sahiptir ve çoklu sinyalleme basamaklarını düzenlemektedir (Sharma ve ark 2016).

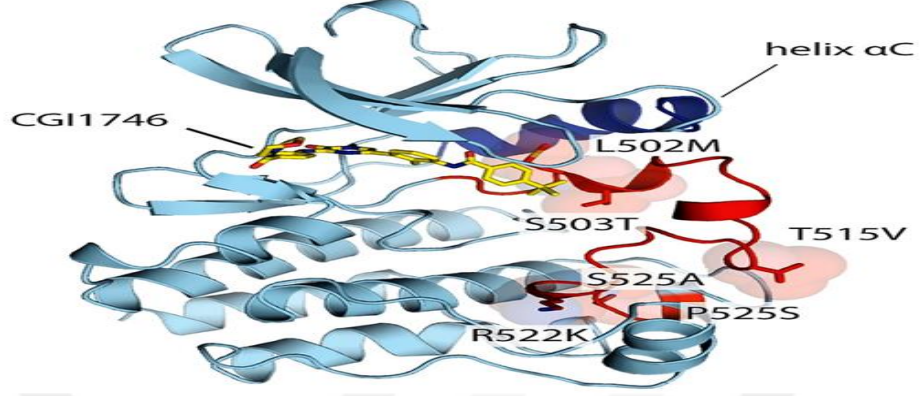


Şekil : 4.2.4 SH2 domani içeren genler (Tzeng ve ark 2000).

4.2.5 Kinaz domaini(TK);

BTK proteininin en büyük domainidir. Substrat spesifitesini, aktivasyon mekanizmasını, altbirimlerin kompozisyonunu ve subselüler

lokalisasyonunu , katalitik alanı , tirozin artıklarının fosforilasyonunu ve fosfat grubuna ATP bağlama lobunu sağlamaktadır (Hashimoto ve ark 1996).

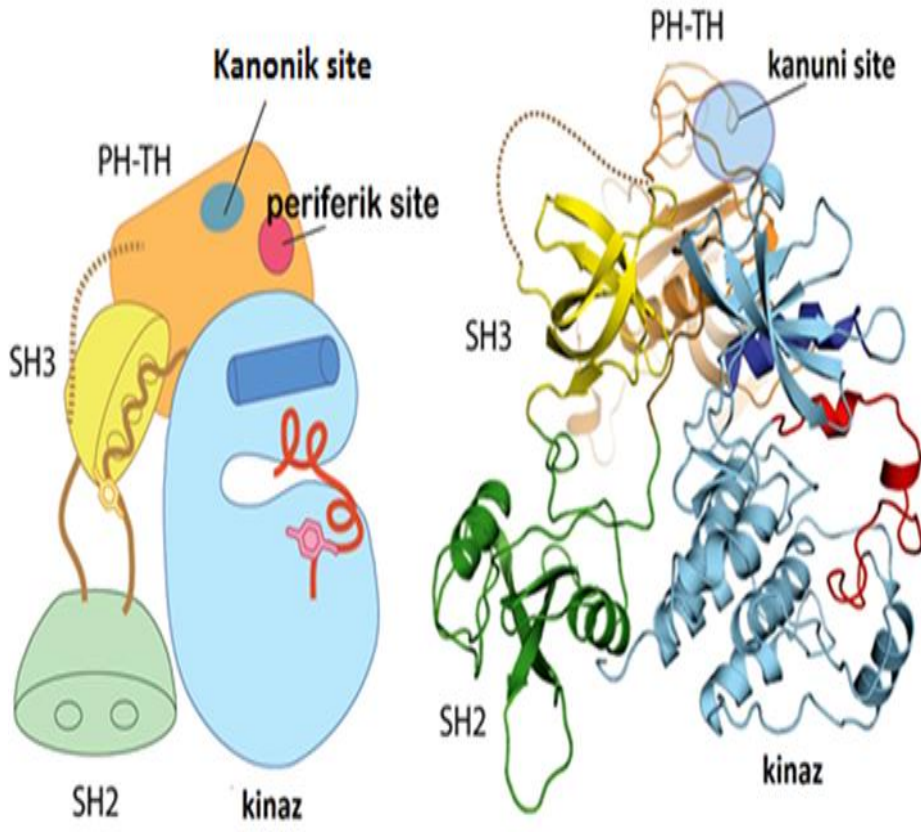


Şekil : 4.2.5 Kinaz domaininin aktivasyon lopu.Saptanan mutasyonların korelasyon.

BTK geninin 5' ucunun ekzon analizinde , herhangi bir konsensüs TATAA veya CAAT box'in olduğu saptanmadı ; Bu bölgede üç retinoik asit bağlanma yeri tespit edildi. BTK geninin , C-terminal alanı kinaz aktivitesinin düzenlenmesinde önemlidir.

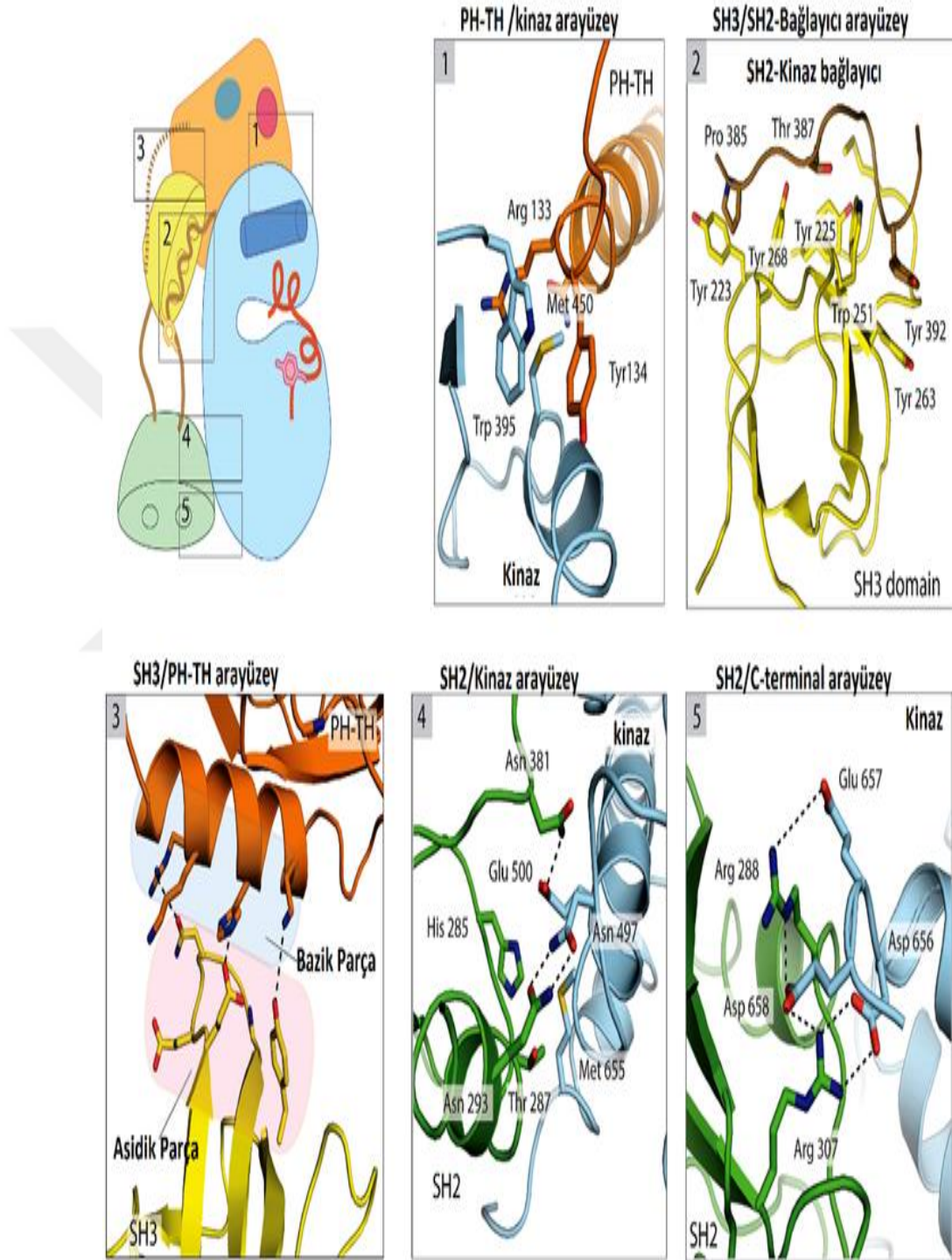
4.3 Tam Boy BTK Kompozit Modeli

Tam boy Btk kompozit modelinde PH-TH alanı kinaz alanının ve SH3 alanının üstüne oturur ve muhtemelen Src benzeri modül stabilize eden bir "mandal" görevini görmektedir.



Şekil : 4.3 BTK geninin kompozit modeli.

BTK domain simülasyonu, alanlar arası etkileşimleri ve arayüzey molekülleri, bileşik modelde gösterilmektedir.



Şekil : 4.3.1 BTK bileşik modeli (Wang ve ark 2015).

4.4 BTK domain sekansı

protein dizisi üzerinde yer aldığı bölgeler renkler ile ayrılarak gösterilmiştir.

5 Domainleri: **PH** **TH** **SH3** **SH2** **TK**

1 MAAVILESIF LKRSQKKKT SPLNFKKRLF LLTVHKLSYY EYDFERGRRG 50

51 SKKGSIDVEK ITCVETVVPE KNPPPERQIP RRGEESEME QISIERFPY 100

101 PFQVVYDEGF LYVFSPTTEL RKRWIHQ LKN VIRYNSDL VQ KYHPCFWIDG 150

151 QYLCCSQTAK NAMGCQILEN RNSLKP GSS HRKTKKPLPP TPEEDQILKK 200

201 PLPPEPAAAP VSTSELKKVV ALYDYM PMNA NDLQLRKGDE YFILEESNLF 250

251 WWRARDKNGQ EGYIPSNYVT EAEDSIEMYE WYSKHMTRSQ AEQLLKQEGK 300

301 EGGFIVRDSK KAGKYTVSVF AKSTGDPQGV IRHYVVCSTP QSQYYLAEKH 350

351 LFSSTIPELIN YHQHNSAGLI SRLKYPV SQQ NKNAPSTAGL GYGSWEIDPK 400

401 DLTFKELGT GQFGVVKYGK WRGQYDVAIK MIKEGSMSED EFIEEAKVMM 450

451 NLSHEKLVQL YGVCTKQRPI FIITEYMANG CLLNYLREMR HRFQTQQLLE 500

501 MCKDVCEAME YLESKQFLHR DLAARNCLVN DQGVVKVSDF GLSRYVLDDE 550

551 YTSSVGSKFP VRWSPPEVLM YSKFSSKSDI WAFGVL MWEI YSLGKMPYER 600

601 FTNSETAEHI AQGLRLYRPH LASEKVYTIM YSCWHEKADE RPTFKILLSN 650

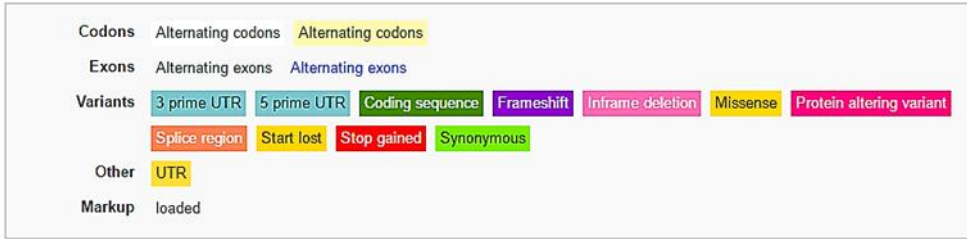
651 ILDVMDEES 659

4.5 BTK cDNA sekansı

BTKbase, 341 benzersiz moleküler olayını gösteren, 471 ilgisiz aileden elde edilen kayıtları içeren BTK mutasyon veritabanıdır. Ayrıca Fenotip ile ilgili bilgilerde bulunmaktadır. BTK'nın tüm domaininde yer alan mutasyonların, XLA'ya neden olduğu gözlemlenmekte olup , en yaygın değişim sınıfı missense mutasyonlarıdır. Mutasyonlar, sıklıkla arginin artıklarını oluşturan CpG bölgelerini etkilemektedir. Mutasyonlara ek olarak, bir dizi varyant veya polimorfizm bulunmaktadır. Bu veritabanına göre mutasyonların çoğu enzim kesim bölgelerinde gözükmemektedir. Ayrıca nokta mutasyonların yaklaşık üçte biri CpG bölgelerinde saptanmaktadır. BTK mutasyonlarının büyük çoğunluğu özel olduğu gösterilmektedir. Mutasyonlar gen üzerinde geniş çapta dağılmış olup yalnızca birkaç korunmuş bölgede saptanmaktadır. Bu veriler , XLA hastalarında yüksek bir spontan mutasyon oranını desteklemektedir.

BTK proteininin tüm alanlarının sekans dizisi ve son güncellemelere dayalı her alanda saptanan mutasyonlar ve varyasyon tipleri farklı renklerle gösterilmektedir.

Tablo 4.5 BTK sekansı



```

1 GCTCAGACTGTCCTTCCTCTCTGGACTGTAAGAATATGTCTCCAGGGCCAGTGTCTGCTG 60
0 Y                                1
NGATCGAGTCCCACCTTCCAAGTCCTGGCATCTCAATGCATCTGGGAAGCTACCTGCATT 119
0 * R**          M RYK YR ***** 7
120 AAGTCAGGACTGANcacacnntgaactccagaaagaagnagctnnnncnncagnnnn 179
.....ATGGCCGCAGTGATTCC 16
.....-M--A--A--V--I-- 5
0 *****RRY*R YYY * RR *W M* *K Y 13
nnnnnnnnnn nn nnnnnnnnnnncacaaanctcnnnnn nnnnnnnn nnnnnnnn 216
17 TGGAGAGCATCTTTCTGAAGCGATCCCAACAGAAAAAGAAAACATCACCTCTAAACTCA 76
6 L-E--S--I--F--L--L--K--R--S--Q--Q--K--K--K--T--S--P--L--N--F-- 25
0 * RRMSY *****Y**Y*MYSR* * *Y * WMMWR***** 17
217 aannnnctnnnn nnnnnnnnnn gacaaanctcnnnnn nnnnnnnn nnnnnnnn 276
77 AGAAGCGCTGTTTCTCTTGACCGTGCACAAACTCTCCTACTATGAGTATGACTTTGAAAC 136
26 K--K--R--L--F--L--L--T--V--H--K--L--S--Y--Y--E--Y--D--F--E-- 45
0 ***** M ***** * Y * *****W * YRW 6
nnnnnNNNNN GGNANN NN NAANN T CAANA ANNNN NN NN NCNCTTGNNNTGAAA 325
137 GTGGGAGAAGAGGCAGTAAGAAGGGTTCAATAGATGTTGAGAAGATCACTTGTGTTGAAA 196
46 R--G--R--R--G--S--K--K--G--S--I--D--V--E--K--I--T--C--V--E-- 65
0 ** Y R **** *****Y * *Y *****D R 6
326 CnTGGTTNCTGANAAAANNnCTCCTCCA NNNNNN NAG T NCNnnnnnaggtgagagt 385
197 CAGTGGTTCCTGAAAAAAATCCTCCTCCAGAAAGACAGATTCCGAGAAGAGGTGAAGAGT 256
66 T--V--V--P--E--K--N--P--P--P--E--R--Q--I--P--R--R--G--E--E-- 85
0 * ****          K * K YR ****Y 5
386 ccagt aaatggn aaattcaatcattgaagnt ccttanccctcnnnNNNNNAT 445
257 CCAGTCAAATGGAGCAAATTTCAATCATTGAAAGGTTCCCTTATCCCTTCCAGGTTGTAT 316
86 S--S--E--M--E--Q--I--S--I--I--E--R--F--P--Y--P--F--Q--V--V-- 105
    
```

0 Y* * K Y S*W ****YY** M * R R *R YRR** 14
 446 ANNAT AAGGGCCTCNANNCNNNNANCTAAGNAGNGNNTC 505
 317 ATGATGAAGGGCTCTCTACGTCTTCTCCCAACTGAAGAACTAAGGAAGCGGTGGATTC 376
 106 Y--D--E--G--P--L--Y--V--F--S--P--T--E--E--L--R--K--R--W--I-- 125

0 * S * **** * M * R**** *W K * M 6
 CCANCTCAANNNNtaatchgtanaa agtgnntttca naatancaccttnt 564
 377 ACCAGCTCAAAAACGTAATCCGGTACAACAGTGATCTGGTTCAGAAATATCACCTTGCT 436
 126 H--Q--L--K--N--V--I--R--Y--N--S--D--L--V--Q--K--Y--H--P--C-- 145

0 R**M* * **** R M YKS KR *****R * R Y 12
 565 tctgn nna gnn ngntntnnnctctnn nn nnn nnn nntggctcnc 624
 437 TCTGGATCGATGGGCAGTATCTCTGCTGCTCTCAGACAGCAAAAATGCTATGGGCTGCC 496
 146 F--W--I--D--G--Q--Y--L--C--C--S--Q--T--A--K--N--A--M--G--C-- 165

0 *W Y * ***** * Y**** Y*SS** R * M * * 8
 625 aahtntgagaannnnngganGNNAACCGNANTTCNCCGNAAGNCNAAA 684
 497 AAATTTTGGAGAACAGGAATGGAAGCTTAAAACCTGGGAGTTCTCACCGAAGACAAAAA 556
 166 Q--I--L--E--N--R--N--G--S--L--K--P--G--S--S--H--R--K--T--K-- 185

0 ***** ** R K* * * Y**** YSR Y *R* ** K 9
 NN NNNNCCAAACNCTN GNA GACNANNnnnnaaaagcnactacnncnanc 735
 557 AGCCTCTCCCAACGCCTGAGGAGGACCAGATCTTGAAAAAGCCACTACCGCCTGAGC 616
 186 K--P--L--P--P--T--P--E--E--D--Q--I--L--K--K--P--L--P--P--E-- 205

0 *R K Y M**** R****Y**** K * 7
 736 cahnngcancaccagctctnann n ctgaann nn nnn cccttngnttaca 795
 617 CAGCAGCAGCACCAGTCTCCACAAGTGAGCTGAAAAAGGTTGTGGCCCTTTATGATTACA 676
 206 P--A--A--A--P--V--S--T--S--E--L--K--K--V--V--A--L--Y--D--Y-- 225

0 D***** Y YR ***** WK M* **** *W * * 8
 796 tgccan nnn nnnnnnnctnagctngann nngann attnn cng ag 855
 677 TGCCAATGAATGCAAATGATCTACAGCTGCGGAAGGGTGATGAATATTTTATCTTGGAGG 736
 226 M--P--M--N--A--N--D--L--Q--L--R--K--G--D--E--Y--F--I--L--E-- 245

0 ** W RRR Y* R Y * * * 7
 856 aanncaactnaccatgtnnagacn agataaanatggNAGNAAGGTACATTC TA 915
 737 AAAGCAACTTACCATGGTGGAGAGCACGAGATAAAAATGGGCAGGAAGGCTACATTCTTA 796
 246 E--S--N--L--P--W--W--R--A--R--D--K--N--G--Q--E--G--Y--I--P-- 265

0 *Y * Y* **K * K**R ** 5
 916 GTAACNTNGTCA NTGAAGNANAAGACTCCA NAAA GTATNANNttatccaacncn 975
 797 GTAACATGTCACTGAAGCAGAAGACTCCATAGAAATGTATGAGTGGTATTCCAAACACA 856
 266 S--N--Y--V--T--E--A--E--D--S--I--E--M--Y--E--W--Y--S--K--H-- 285

0 * YR**** Y *Y Y* * Y **** **RR** * 8
 gactnn nncaggctganaa ngcna ngnaannGNAAA NNNNN TTTTCATTN 1034
 857 TGACTCGAGTCAGGCTGAGCAACTGCTAAAGCAAGAGGGGAAAGAAGGAGTTTCATTG 916
 286 M--T--R--S--Q--A--E--Q--L--L--K--Q--E--G--K--E--G--G--F--I-- 305

0 R R 2
2193 GGGNATGCACCTCTTCTTTGATTCCCTGGGATAGTGGCTTCTGAGCAAAGGCCAANAAT 2252

0 K Y 2
2253 TATTGTGCCTGAAATTTCCCGAGANAATTAAGACAGACTGAATTTGNGATGAAAATATTI 2312

2313 TTTAGGAGGGAGGATGTAAATAGCCGCACAAAGGGTCCAACAGCTCTTTGAGTAGGCAT 2372

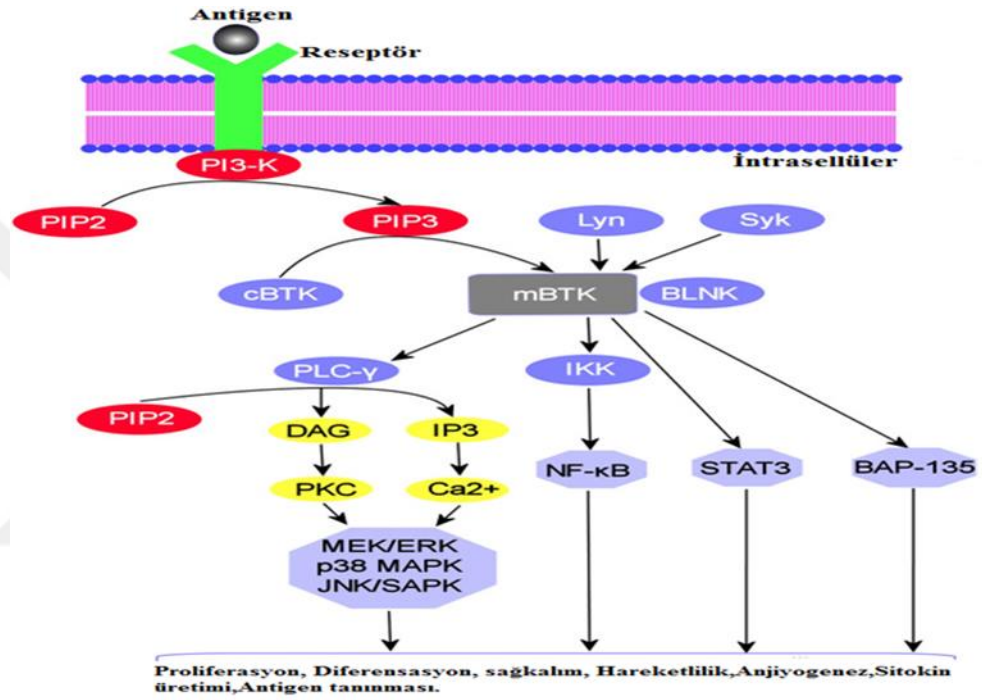
0 R K K 3
2373 TTGGTANAGCTTGGGGGNGTGTGTGNNGGGGTGGACCGAATTTGGCAAGAATGAAATGGT 2432

0 R K R 3
2433 GTCATAAAGATGGNAGGGGAGGGNGTTTTGATAAAATAAAATTACTAGAAAGCTTGNA 2491



4.6 BTK Sinyal Yolağı

BTK plazma membranına PIP3 ile etkileşerek translokasyon yapmakta olup ve trans-fosforilasyon yoluyla Lyn ve Syk kinazlar tarafından aktivasyona maruz bırakılan membrana bağlanmaktadır. Aktif BTK'nın downstream substratları ve ilişkili sinyalizasyon kaskadları gösterilmektedir.



Şekil : 4.5 BTK sinyal yolağı.

Antigen bağlanması nedeniyle aktif olan reseptörler, ikincil haberci PIP3'ün (fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfatlar) üretimini, PIP2'yi (Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat) membranın intrasellüler yüzeyinde yer alan ve ayrıca hücre içi sinyal transdüser enzimi olan PI3K'yı (Fosfatidilinositol 3-kinaz) deveye sokarak fosforile eder. PIP3, Syk ve Lyn kinazlar tarafından Tyr-551 rezidüsünde trans-fosforile edilmiş BTK'nın PH domainine bağlanmaktadır. BTK, Tyr-223 kalıntısında otofosforilasyon reaksiyonunu gerçekleştirerek fizyolojik olarak aktif hale gelmektedir. Aktif edilmiş BTK, SH2 domeni aracılığıyla adaptör proteinleri olan BLANK / SLP65 ile

etkileşime girmektedir. Bu kompleks daha sonra fosfolipaz C (PLC) - γ 2'yi aktif ederek hücre içi kalsiyum akışına neden olup ve MEK / ERK, p38 MAPK ve JNK / SAPK gibi downstream transkripsiyonel sinyalizasyonun indirekt aktivasyon faktörlerini tetiklemektedir . Ayrıca BTK'nın downstream substratları ve BAP-135 / TFII-I, NF κ B, ARID3A, STAT3 ve NFAT gibi transkripsiyon faktörleri, BTK'nın direkt transkripsiyon regülasyonunda ve yüzlerce genin sentezlenmesinde kritik rol oynamaktadırlar (Baba ve ark 1998).

Bazı fizyolojik koşullar altında, BTK çekirdeğe translokasyon yapabilir ve spesifik hedef genlerin transkripsiyonunu aktif edebilmektedir fakat BTK direkt olarak DNA'ya bağlanmamaktadır.

5. KULLANILAN YÖNTEM

Bu çalışma immün yetmezlik bozukluklu vakalarını yaşayan kişilerden alınan genomik DNA örneklerinin dizileme yöntemi ile nükleotid dizileri tespit edilmiş ve sağlıklı kontrol örnekleriyle karşılaştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı, ülkemizde ilk defa olarak bu genin nükleotid yapısı sağlıklı insanlarda araştırılacaktır. BTK geninin protein kodlayan eksonlarında ve biyolojik anlamı olan intron bölgelerinde olası nükleotid yer değişimlerini araştırmak ve bu yer değişimlerin X'e Bağımlı Agammaglobulinemi , moleküler tanısında kullanılmaktır.

5.1.DNA Eldesi

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 ile 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 Elution basamağında DNA'nın saf olarak eldesi sağlanır. Elution tampon çözeltisi ile membrana bağlı kalan nükleik asidin %85-100'ü elde edilir.

5.1.1.Invitrogen Purelink Genomic Blood DNA Purification .

(K1820-01) DNA izolasyon mini Kit prosedürü

5.1.2.Hazırlama

- Thermo-Shaker 550C'ye ayarlanır.
- Her hasta için 1,5 ml'lik ependorf, spin ve Columns tüpler hazırlanır. Hastaların isimleri tüplerin üzerine ve kapaklarına yazılır.

- Etil alkol saf olması için yeni olarak hazırlanır. (%95>)

5.1.3.Prosedür

- Steril bir ependorf tüpüne 200µl donmuş ya da taze kan örneği konur.
- Üzerine 20 µl Proteinaz-K eklenir.
- 20 µl Rnase A ekleyin ve vortekslenir, oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir.
- 200 µl Genomik/Lysis tamponundan eklenir ve homojen olana kadar vortekslenir.
- Protein sindirimini hızlandırmak için 550C'de 30 dk. Thermo-Shaker inkübe edilir.
- 200 µl %96-100'lük etil alkol eklenir, 15 saniye kadar vortekslenir.
- Ependorftaki lizattan collection tüplerine ~640 µl eklenir.
- 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edin. Kolonları atılır ve temiz tüpe yerleştirilir.

- 500 µl Wash Buffer 1 ilave edilir.
- 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edin. Kolonları atılır ve temiz tüpe yerleştirilir.
- 500 µl Wash Buffer 2 ilave edilir.
- 3 dakika maksimum hızda santrifüj edilir. Kolonları atın ve temiz tüpe yerleştirilir.
- 50-200 µl (ort. 100 µl) Elution Buffer eklenir, 5 dakika oda ısısında bekletilir.
- Maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilir.
- Elde edilen DNA toplama tüpünde birikmiştir, burdan mikropipetle ependorfa aktarılarak +4C0'de ya da -200C"de saklanılarak, gerekirse dilüe edilerek kullanılır.

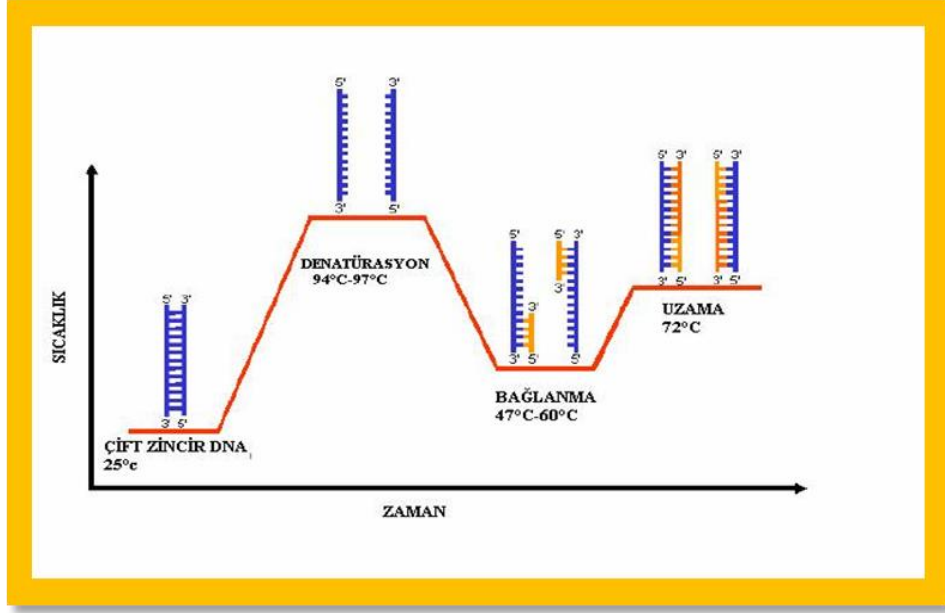
5.2.DNA'nın kontrolü:

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 +40C'de saklandı.

5.2.1.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 yöntem, Kaliforniya'da Dr. Kary Banks Mullis

tarafından 1980'lerde keşfedildi. Dr. Kary Banks Mullis PCR'in keşfi ve kimyanın Nobel ödülünü almıştır (McPherson, M.J 2000). 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. 94-950C'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 (50-70⁰C'ye) düşürülmesiyle, ilk basamakta ayrılmış olan kalıp DNA'nın özgül oldukları bölgelerine bağlanırlar. Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır (sentez = elongasyon). Ortama konmuş ve optimum sentez sıcaklığı 72-740C 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 $tx2n$ sayısına ulaşır. 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 (Mikael, 2006) .



(1) Çift iplikli DNA'nın ayrılması için sıcaklık yaklaşık 950C' ye yükselmiştir, (2) primerin bağlanmasına izin verilmesi için sıcaklık primere göre düşürülmüştür, (3) sıcaklık 72⁰C' ye ayarlanarak polimeraz primerin uzaması sağlar

BTK geninin her bir ekzonuna özgül olan oligonükleotid primerler ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi için toplamda 25 µl olacak şekilde; içerisinde; 1µl genomic DNA, Gene Amp Gold Buffer (15 mmol/l Tris-HCl, pH 8.0, 50 mmol/lKCl), 2.5 mmol MgCl₂ hazırlandı her birinden 50 µmol/l dGTP,dATP, dTTP ve dCTP, 5 pmol forward ve reverse primer ve 1.0U Ampli Taq Gold polimeraz eklendi.

PCR reaksiyonu 1 ul (100 ng) genomik DNA, Enhancer Buffer (20 mM Tris (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) 2.5 uL, d NTP mix karışımı 0.5 uL (0.2 mM), forward primer 1 uL (10 pmol/ul), reverse primer 1 ul (10 pmol/ul) (Invitrogen) , 1.0 U PlatinumTaq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), deiyonize su ile 25 uL total volüme tamamlanmıştır.

MyGene Gradient Thermal Cyclers cihazında gradient programında PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

5.3.DNA Dizileme:

Cycle Sequencing PCR Big Dye Terminator v3.1 kiti kullanılarak ve her sekans bölgesine uygun reverse ya da forward primer kullanılarak kit prospektüsünde yazılan protokole göre yapıldı.Elde edilen Cycle Sequencing PCR ürünleri BigDyeXT (Applied Biosystems; USA) saflaştırma kiti kullanılarak yapıldı.DNA dizi analizleri ABI 3100 Otomatik Jel Kapiller Analizatör sisteminde sekans bölgesinin boyutlarına göre kısa ve ya uzun kapiller seti kullanılarak yapıldı.Elde edilen diziler aynı sistemin kendi software ve SeqScape2.0 programı kullanılarak FASTA elektronik kütüphaneden elde edilen normal BTK NM_001287345.1 gen dizisi ile karşılaştırıldı ve varolan nukleotid yer değişimleri 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 değerlendirilir ve sonuçlar grafiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılarak değerlendirilir.

5.4.İstatistiksel Analiz:

Sonuçlar, Kruskal-Wallis analizi ile SPSS 13.0 programında karşılaştırılmıştır. $p<0,005$ düzeyleri istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

1993 yılında Gen Fonksiyonu ile ilişkili çalışmalardan, XLA'lı bireylerde, pre-B ve B hücre sayısının , BTKgeninin mRNA protein ekspresyonu ve kinaz aktivitesinin azaldığını veya yok olduğunu ilk defa kanıtlandı (Vorechovsky ve ark 1994).

DT-40 lenfoma B hücrelerinde BTK geninin, radyasyona bağlı apoptoza uğramasını hedefleyerek, BTK'nın tirozin kinaz (TK)domaini radyasyona bağlı apoptozu tetiklemek için gerekli olduğu ortaya çıktı (Uckun ve ark 1996).

XLA'lı hastaların periferik B hücrelerinde, rekombinant antikorların özgüllüğünü test etmek amacıyla yapılan bir çalışmada ; XLA B hücreleri, VH ve D genlerini kullanarak, antikor özgüllüğünü ifade etği bulundu. Ayrıca hasta B hücrelerinde , IgK ve IgL lokusunda yoğun ikincil rekombinasyon ve antikorları eksprese eden hücrelerin miktarında artış olduğu gösterildi. Bu çalışmadan, XLA B hücreleri tarafından eksprese edilen antikorların yarısının poli-reaktif olduğu ve BTK geni otoreaktif B hücrelerinin çıkarılması için şart olduğunu ortaya çıktı (Lim ve ark 2013).

BTK'nın SRC homolojisinde yer alan 3 domain (FYN , LYN ve HCK) ile etkileşimde olduğu saptanılmaktadır . Bunların hepsi B- ve T-hücre reseptörlerinin uyarılması üzerine aktive olan protein-tirosin kinazlardırlar. Bu etkileşimlere BTK geninde yer alan iki adet 10 amino asitli motifi aracılık etmektedir. Ayrıca BTK'nın T hücresine özgü homologu olan ITK'da aynı özgüllüğe sahip benzer bir site tespit edildi (Rousseau ve ark 2013) .

Islam ve arkadaşları, Southern analizi için, 33 bağımsız aileden ve 150 normal X kromozomundan türetilen DNA problemlerini kullanarak, XLA'lı erkeklerin kemik iliğindeki pre-B hücrelerinin dönüşmemesi nedeniyle,

dolaşımdaki B hücre yetmezliğine yol açarak mutant BTK geni, B hücrelerinin sinyalleme rolünü yerine getirmemesine neden olduğunu saptadılar (Asplund ve ark 2008) (Islam ve ark 2000).

Weston ve arkadaşları 2001 yılında , Tam uzunlukta BTK cDNA'sını temsil eden bir cDNA klonlaması kullanarak, Çocukluk döneminde B hücrelerinin sayısı azalmış erkeklerde , sporadik oluşumundan sonra , yaygın değişken immün yetmezliği (CVID) 'ın klinik ve immünolojik olarak XLA'dan ayırt edilemeyeceğini belirttiler (Weston ve ark 2001).

14 yaşındaki XLA'lı hastada, klasik tip I şeker hastalığının gelişiminde rolü alan 2 bp'lik bir delesyon (**BTK, 2-BP DEL, 54TG**) BTK geninde tespit edilmiştir (van Zelm ve ark 2008).

Bir X bağlantılı agammaglobulinemi hastasında BTK geninde exon skipping (eksonu atlama) mutasyonu nedeniyle büyüme hormon eksikliği sendromu bulunmuştur (Smith ve ark 2016).

XLA'lı 12 Koreli hastayı içeren bir çalışmada , intron 1'de bir nokta mutasyon dahil olmak üzere BTK geninde 7 mutasyon tespit edilmiştir .Bu çalışmada Lusiferaz enzim analizi yaparak intron-1 mutantını vahşi tip ile karşılaştırarak BTK'da transkripsiyonel aktivitesinin azaldığını göstermişler.Ayrıca fonksiyon analizi ile birkaç düzenleyici elementin BTK geninde, transkripsiyonel regülasyonuna aracılık ettiğini ve ilk intronun BTK promotör aktivitesinde önem taşıdığını önermektedirler (Natarajan ve ark 2015).

Dokuz aileden alınan XLA'lı 11 hastada , BTK protein ekspresyonu ve kinaz aktivitesi incelendi .İlginç şekilde SSCP değişiklikleri olmayan 2 hastada BTK ekspresyonu saptanmamıştır (Liu ve ark 2001).

Bir çok durumda BTK proteinini kodlayan genin eksprese edilmemesi geni kodlayan bölgelerin mutasyonları ile ilgili olmadığı gösterilmekte olup ve promotor gibi düzenleyici bölge veya birinci intron bölgesinin mutasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (Kotla ve ark 2017).

X-bağıntılı agammaglobulinemi ile ilişkili olmayan 12 Japon ailesinde BTK geninin anormallikler bildirmiştir (Tobinai 2016).

Kinaz alanındaki gen defektinin yeniden düzenlenmesi , 2 hastada yapılan Southern blot analizinde saptandı (Bestas ve ark 2014).

SSKP ile BTK geninin analizi, XLA hastalarının tanısı için ve taşıyıcı tespiti için değerli olduğu saptamışlar; Bununla birlikte, gen anomalileri ile klinik özellikleri arasındaki korelasyon hala belirsizliğini korumaktadır (Sinha ve ark 2015).

BTK inhibitörleri, özellikle ibrutinib ile ilgili çalışmalar da lösemi ve lenfoma tedavisine odaklanarak devam etmektedir (Wei ve ark 2016).

Son güncellemelere göre DCLRE1C ve IGHM gen kusurlarının yaklaşık% 60'ında, BTK gen defektlerinin yaklaşık% 40'ında Gross delesyonlar bulunmaktadır (Gabhann ve ark 2012).

Dasatinib(tirozin kinaz inhibitörü), BCR / ABL pozitif KML hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. KML hücre dizisinde, BTK geninde **Thr-474-İle** ikamesi **dasatinibe** direnç kazandırdığı saptandı. ABL geninde yapısal olarak homolog olan Thr315 kalıntısı gibi BTK geninde Thr474 kalıntısı, dasatinib'in bağlanması için kritik ve gözlemci kalıntı olduğu gösterilmiştir (Gleixner ve ark 2011).

XLA'lı bireylerde hastalığın yapısal temelini yorumlamak için , 8 bağımsız nokta mutasyonu inceleyerek ve BTK geninin kinaz alanının 3 boyutlu modelini kullanarak, BTK'da **Arg525**'in, lizine değişimi, proteinlerin kinazlarda işlevsel olarak kritik bölge olduğunu düşündürmekte olup ve **Arg-525-Gln** mutasyonu üzerinde yapılan çalışmalarından ise BTK'nın tirozin kinaz aktivitesini ortadan kaldırdığını göstermektedir (Ohashi ve ark 1995).

Glu445 / Arg544 arasında oluşan çift hidrojen bağının **Glu445 / Lys430** ile değişimini yaratarak Tyr551'in trans-fosforilasyonunu ve N-terminal lobunun alfa heliks –C ile yer değişimini tetikleyerek BTK aktivasyonuna yol açabileceği önermektedir (Hamasy ve ark 2017).

R562W gibi kinaz alanının C-terminal lobundaki mutasyonları, doğrudan veya dolaylı olarak peptid substrat bağlamasında önemli alan olduğunu belirtmektedir. Ayrıca bu alandaki diğer hastalıkla ilgili mutasyonları (örn., **E589G**), komşu rezidüidlerle olan etkileşimlerini değiştirmektedir (Tzeng ve ark 2000).

G414R, BTK genindeki glisin bakımından zengin halkada tanımlanan ilk mutasyondur ve **F559S** mutasyonu substrat peptid bağlanmasında rol olan P + 1 halkasında bulunan ilk mutasyondur (Stahelin ve Kuhne 2000).

CpG dinükleotidleri memeli genlerinde değişken bölgelerdir. BTK geninde arginin kodlayan CpG dinükleotitleri, en sık tekrarlanan mutasyon siteleri olmaktadır (örn., **R520** ve **R525**). Bu alanlarda, purin-CpG-pirimidin değişimi gözlemlenmektedir (Halcomb ve ark 2008).

R520 , **R525** ve TK domaninde kodlanan ve tirozin kinazlara spesifik olan **RDLAARNC** amino asit dizisinde , **10** farklı mutasyon tespit edilmiştir (Wang ve ark 2009).

BTK geninde, **PH** domaininin **L11**'den **T33**'e kadar olan amino asit dizisi , mutasyonların sık raslandığı ikinci alan olup ve **11** farklı mutasyon bu alanda tespit edilmiştir. Bu dizide, muhtemelen BTK proteininin fosfatidil inositol aracılığı ile membran ankorlanmasına katılan pozitif yüklü amino asit kümesi bulunmaktadır (Yoon 2014).

Başka bir hot spot mutasyon alanı ekson 3'te **341-347** nükleotid pozisyonlarında bildirilmektedir. Ayrıca bu alan adenosin kümesi olarakta bilinmektedir (Hagemann ve ark 1994).

Moleküler modelleme, patojenik mutasyonları klinik olarak önemsiz olan protein polimorfizmlerinden ayırımı için önemli araçtır.

Promotör mutasyon 5'UTR-58a → g PU.1 bağlama bölgesindeki sabit çekirdek sekansını (GGAA) etkilemekte olup , PU.1 proteininin bağlanma aktivitesini düşürerek promotör aktivitesinde azalmaya neden olduğu göstermektedir. Bu çalışmada, çekirdek sekansı olan GGAA dizisi B hücrelerinde BTK geninin fonksiyonel transaktivasyon işlemi için esas olduğunu ispatlamaktadır (Singh ve ark 2015).

GLA geninin 3-prim ucu BTK geninin 5-prime ucundan 9 kb uzaklığında olduğu ve 5-prim bölgede 2 ek genin bulunduğu saptanmıştır.

BTK geninin SRC, FES ve CSK dahil olmak üzere diğer reseptör-dışı tirozin kinazlarla karşılaştırılması sonucundan , ekson sınırlarının korunması konusunda eksikliklerin var olduğu ortaya çıkmıştır (Bauer ve ark 2001).

XLA çalışmalarından elde edilen kanıtlar, BTK'nın B-lenfosit farklılaşması ve aktivasyonunda önemli bir rol oynadığına işaret etmesine rağmen, kesin etki mekanizması bilinmemektedir, çünkü etkileşimde olduğu proteinlerin tamamı tanımlanmamıştır.

Japon araştırmalarında belirlendiği gibi, PH ve SH1 domainleri Missens mutasyonlara eğilimlidir. SH3 alanı için hastalık teşkil eden missense mutasyonu tanımlanmamıştır.

BPK geni aşağıdaki farklılıklara dayalı olarak SRC ailesinin bir üyesi olmadığı hipotezini desteklemektedir . kinaz katalitik alanı, ABL, FPS ve CSK gibi benzer DLAARN dizilerini içermektedir. Ancak SRC ailesinden (DLRAAN) dizileri farklıdır (Shinohara ve ark 2014).

2010 ,2014 yılından bu yana XLA için gen terapi araştırmaları farelerde yürütölmekte olup ve ancak bu tür tedavilerin insanlar için ne zaman sağlanabileceği belli değildir.

BTK mutasyon analizini , XLA taşıyıcıları olma riski altında yatan aile bireyelerine danışmanlık yapmak ve aynı zamanda amniyotik sıvı ve koryonik villus örnekleme kullanarak kesin prenatal test imkanı sunmak için önemli bir araçtır. BTK mutasyon analizi kesin ve erken teşhisin mümkün olduğu tek araç olabilir.

Klinik olarak XLA tanısı konulan hastaların , % 90'da mutasyon ve protein analizini kullanarak teyit edilmektedirler. Ayrıca Western blot analizi, saptanabilir mutasyona rağmen protein ürünü içermeyen hastaların belirlenmesinde önemli bir yardımcı arac olduğu kanıtlanmaktadır.

DNA bankacılığı, kullanılmak üzere DNA'nın depolanması (tipik olarak beyaz kan hücrelerinden çıkarılır). Gelecekte test metodolojisinin, genlerin, alelik varyantların ve hastalıkların anlaşılmasının muhtemel olması nedeniyle, etkilenen bireyelerin DNA bankacılığına dikkat edilmelidir.

6.1. SONUÇLAR

6.1 Hasta grubu ; Bu çalışma, aile öyküsü pozitif ve negatif olan gruplarda yapılmaktadır. Ayrıca aile öyküsü negatif olan bireyler klinik özelliklerine ve labratuvar sonuçlarına (periferik B hücre sayıları ve immünoglobulin düzeyleri düşük) dayalı olarak seçilmektedir . 25 birey hasta grubu ve 25 sağlıklı erkek kontrol grubu olarak kullanılmaktadır.

BTK geninde tek sarmallı konformasyon polimorfizminin önemini saptamak için mutasyon taraması yapıldı, 25 X-bağlı agammaglobulinemi (XLA) vakalarında araştırıldı. Genotip / fenotip korelasyonlarını elde etmek için, tahmin edilen protein sapmaları hastalığın klinik seyri ile korelasyon göstermektedir.

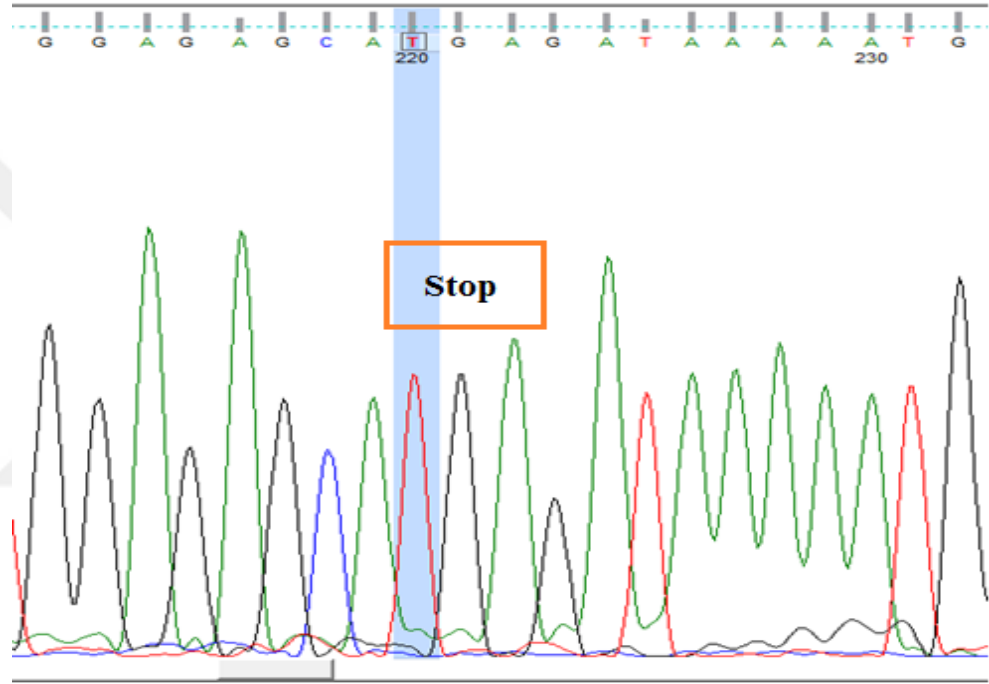
PCR analizi, ekzon-intron ve destekleyici bölgeler dahil olmak üzere tüm BTK geni için gerçekleştirildi. Mutasyonların yapısal etkileri araştırılarak , bazı mutasyonların işlevsel sonuçları in vitro kinaz tahlilleri ile değerlendirilmektedir.

XLA'lı 25 ilgisiz hastada BTK geninde 13 değişik mutasyon tipi ve 5 tekrarlanmış varyasyon, 1 novel varyant ve bir polimorfizm saptandı. Mutasyonların çoğu translasyonun erken sona ermesiyle sonuçlandı. Genin 5 asal ucunda çerçeve kayması ve nonsense mutasyonları ve enzimin katalitik alanına tekabül eden 3-asal kısmında missens mutasyonları saptanmadı.

Geri kalan 7 XLA'lı hastada, normal B hücresi gelişiminde gerekli olan diğer genlerin ((IGHM1; 147020) ve (IGLL1; 146.770)) defekti ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Bu gen defektlerini, tipik XLA'lı hastalardan ayıran hiçbir klinik özelliği bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu hastaların XLA'lı olması muhtemel değildir. .

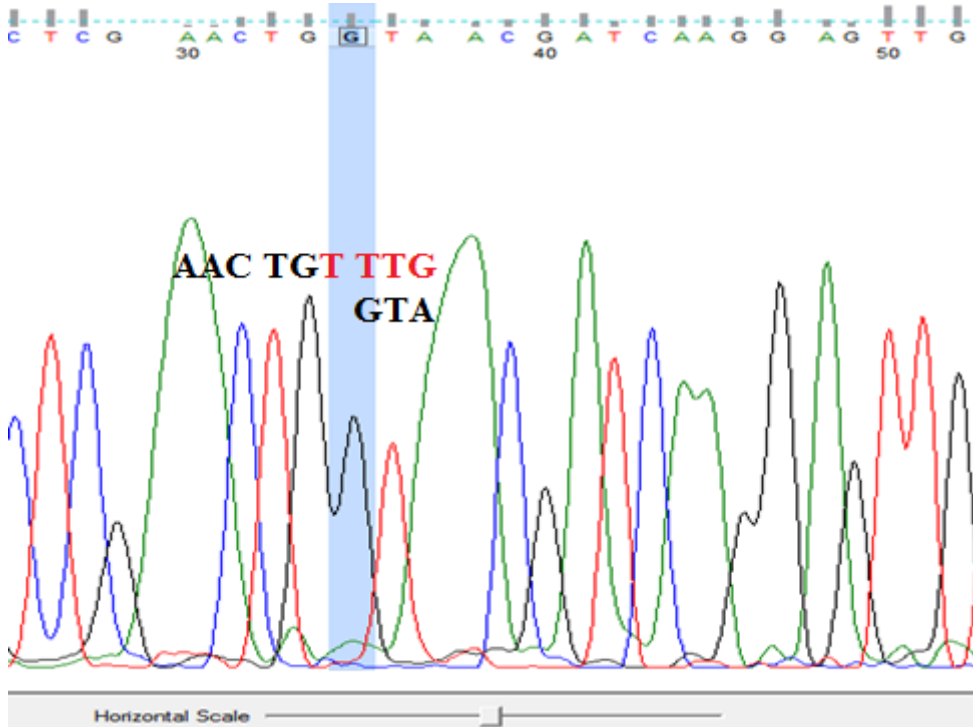
Bulgularımız,PCR analiziyle yapılan moleküler genetik testi , XLA'nın kesin teşhisi için doğru bir araç olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca XLA ile örtüşen bazı ortak klinik özelliklere sahip, değişken immün yetmezliği hastalıklarının, ayırt edilmesinde ve genotip / fenotip korelasyonunda yarar sağlamaktadır.

6.1.1 BTK geninin 8.eksonda saptanan mutasyon analizi:



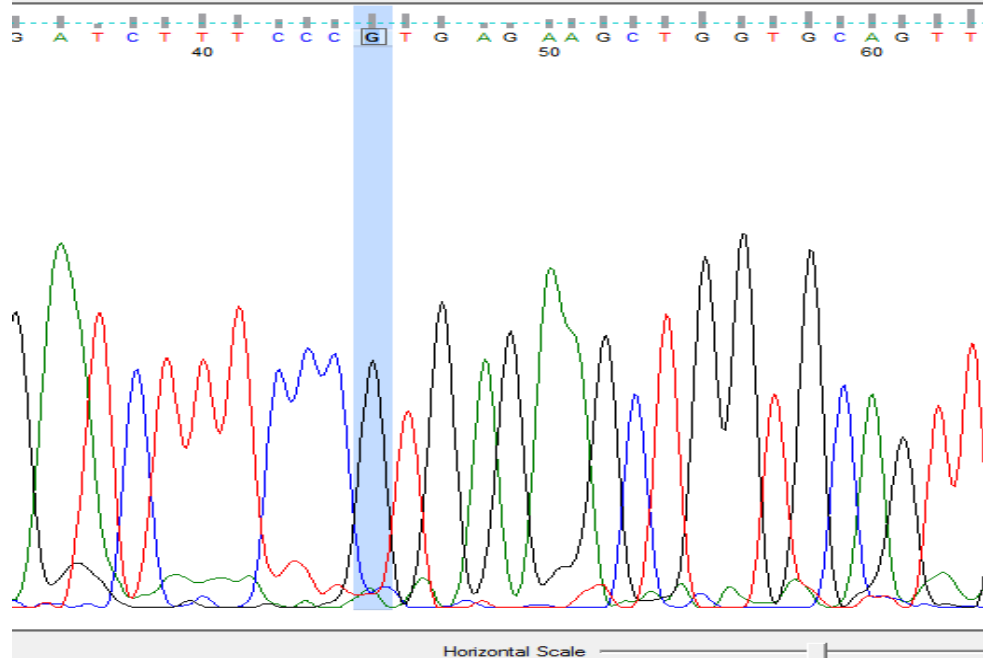
cDNA pozisyonu	c.763C> T
Variasyon tipi	Homozigot nonsense
Protein değişimi	p.Arg255Ter
Sequenc değişimi	CGA>TGA
Fenotipi	Agammaglobulinemia
Protein	SH3 domain
Bölge	8.Ekson
Değişim	Arg: Polar , pozitif yüklü
Yerleşim	Stop
Açıklama	BTK geninin 763 konumunda bir C-T geçişi 255 konumda stop kodonuna raslanmakta olup SH2 ve kinaz alanlarını içeren 404 amino asitten yoksun ve kesilmiş bir protein ortaya çıkarmaktadır. Btk'nin işlevsel alanlarının yokluğunda, klasik XLA fenotipinin olduğunu doğrulayan herhangi bir saptanabilir B-hücre bulunmamaktadır.

6.1.2 BTK geninin 16.eksonda saptanan mutasyon analizi:



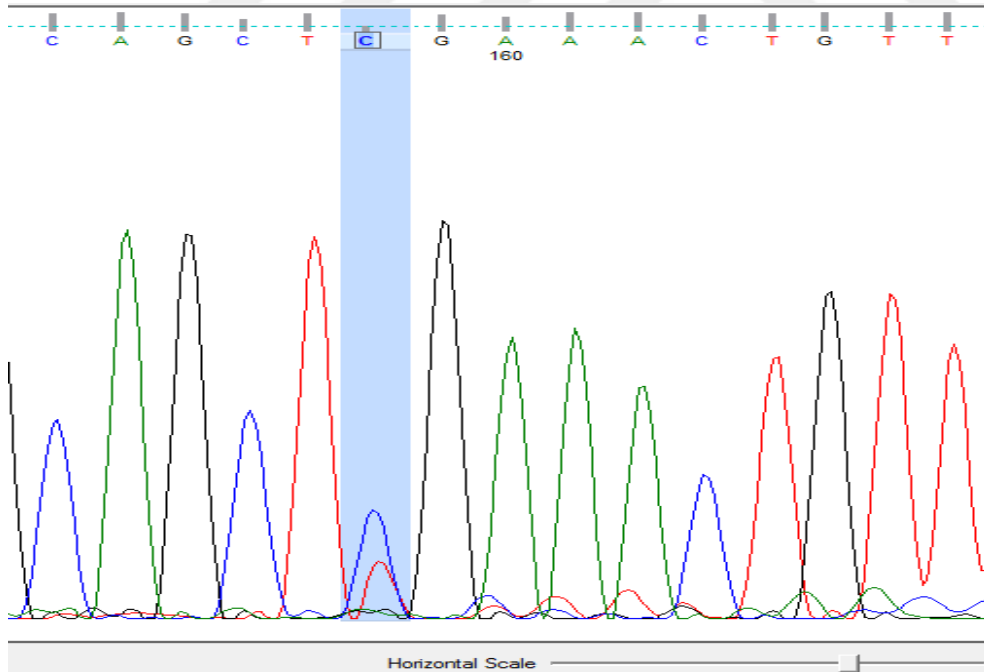
cDNA pozisyonu	c.1581_1584delTTTG
Variasyon tipi	Frameshift delesyon homozigot mutasyon
Protein değişimi	p.Cys527fsX2
Sequenc değişimi	AAC TGT TTTG GTA-AAC TGG TAA
Fenotipi	Agammaglobulinemia
Protein	SH1/TK domain
Bölge	16.Ekson
Değişim	Cys: Polar, Nötr, Hidrofobik
Yerleşim	Stop
Açıklama	Ekson 16'da 527 ve 528 kodonlarında bir 4-bp (GTTT) Frameshift delesyon tespit edildi ve çerçeve kaymasına neden oldu. Bu Frameshift delesyon TK domaininde Stop kodonuna yol açmakta olup ve XLA teşhisinde kullanılmaktadır.

6.1.3 BTK geninin 15.eksonda saptanan mutasyon analizi:



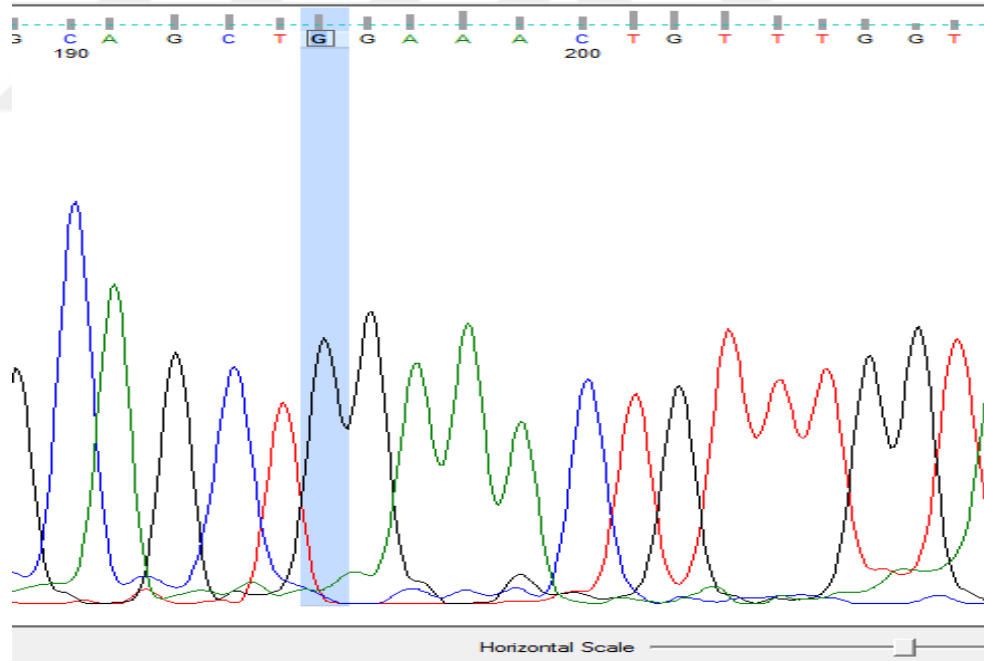
cDNA pozisyonu	c.1361A>G
Variasyon tipi	Homozigot missense mutasyon
Protein değişimi	p.His454Arg
Sequenc değişimi	CAT>CGT
Fenotipi	Agammaglobulinemia
Protein	TK domain
Bölge	15.Ekson
Değişim	His: Polar , pozitif yüklü, Aromatik, Hidrofobik
Yerleşim	Arg: Polar , pozitif yüklü
Açıklama	Btk'de minimal hipomorfik bir mutasyon, B hücre sayısının azalmasına ve klinik bir hastalığa neden olmaması tahmin edilmektedir.

6.1.4 BTK geninin 16.eksonda saptanan mutasyon analizi:



cDNA pozisyonu	c.1573C>T
Varyasyon tipi	Heterozigot nonsense
Protein değişimi	p.Arg525Ter
Sequenc değişimi	<u>C</u> GA> <u>T</u> GA
Fenotipi	Agammaglobulinemia
Protein	TK domain
Bölge	16. Ekson
Değişim	Arg : Polar , pozitif yüklü
Yerleşim	Stop
Açıklama	NOVEL :TK domaininin aktif sitesinde stop kodonuna yol açmaktadır.

6.1.5 BTK geninin 16.eksonda saptanan mutasyon analizi:



cDNA pozisyonu	c.1573C>G
Variasyon tipi	Homozigot missense mutasyon
Protein değişimi	p.Arg525Gly
Sequenc değişimi	C GA> G GA
Fenotipi	Agammaglobulinemia
Protein	TK domain
Bölge	16.Ekson
Değişim	Arg : Polar , pozitif yüklü
Yerleşim	Gly : Küçük ,Hidrofobik
Açıklama	1573. nükleotidin C'den G'ye geçişi saptanmakta ve arginin-525'in glisin'e dönüşmesine yol açmaktadır. Korunmuş amino asit ikamesinin, protein-tirozin kinazın katalitik fonksiyonu üzerinde oldukça zararlı bir etkiye sahip olduğu öngörülmüştür. Korunmuş arg525'in kaybı substrat tanımlanmasını engellemektedir.

Not: BTK genindeki R525X nansense varyantı sıklıkla X bağlantılı agammaglobulinemi ile bağlantılı olarak bildirilmektedir .Bu patojenik varyant, normal protein fonksiyonunun kaybına , protein kesilmesine ve ya mRNA bozunmasına neden olduğu tahmin edilmektedir. R525X varyantı, NHLBI Exome Sequencing Projesinde yaklaşık 6,500 Avrupalı ve Amerikan kökenli Afrikalı bireylerde görülmeydi. Ayrıca bu durum, R525X nansense varyantının bu popülasyonlarda Plimorfizm olduğu anlamına gelmemektedir.

6.1.6 BTK geninin 1.eksonda saptanan mutasyon analizi:

cDNA pozisyonu	c.82C>T
Variasyon tipi	Missense mutasyon
Protein değişimi	p.Arg28Cys
Sequenc değişimi	<u>CGC</u> > <u>TGC</u>
Fenotipi	Agammaglobulinemia
Protein	PH domain
Bölge	1.Ekson
Değişim	Arg: Polar , pozitif yüklü
Yerleşim	Cys: Polar, Nötr, Hidrofobik
Açıklama	Bulunan R28C mutasyonu PH domaininin fonksiyon kaybına neden olmaktadır.

6.1.7 BTK geninin 6.eksonda saptanan mutasyon analizi:

cDNA pozisyonu	c.496C>T
Variasyon tipi	Nonsense mutasyon
Protein değişimi	p.Gln166Ter
Sequenc değişimi	<u>CAA</u> > <u>TAA</u>
Fenotipi	Agammaglobulinemia
Protein	TH domain
Bölge	6.Ekson
Değişim	Gln: Polar
Yerleşim	Stop
Açıklama	Bu varyantın varlığı bu hastalığın tanısı ile uyumludur. Bu patojenik varyant normal protein fonksiyonunun kaybına veya protein kesilmesine ve mRNA bozunmasına neden olduğu tahmin edilmektedir.

6.1.8 BTK geninin 8.eksonda saptanan mutasyon analizi:

cDNA pozisyonu	c.671delA
Variasyon tipi	Frameshift delesyon homozigot mutasyon
Protein değişimi	p.Asp224fsX5
Sequenc değişimi	GAT TAC ATG CCA ATG AAT- <u>GTT</u> ACA TGC CAA TGA AT
Fenotipi	Agammaglobulinemia
Protein	SH3 domain
Bölge	8.Ekson
Değişim	Asp: Polar , Negatif Yüklü ,Küçük
Yerleşim	Val: Küçük , Hidrofobik, Alifatik
Açıklama	EX3'te SH3 alanında erken stop kodonuna yol açmaktadır. Bu varyantı, normal protein fonksiyonunun kaybına, ya mRNA bozulmasına neden olduğu tahmin edilmektedir. patojenik bir varyant olarak yorumlanmaktadır.

6.1.9 BTK geninin 12.eksonda saptanan mutasyon analizi:

cDNA pozisyonu	c.1044dupG
Variasyon tipi	Frameshift duplikasyon homozigot mutasyon
Protein değişimi	p.Lys349fsX9
Sequenc değişimi	GAG G AAG CAC CTT TTC AGC ACC ATC CCT GAG CTC- GAG GAA GCA CCT TTT CAG CAC CAT CCC TGA G CTC
Fenotipi	Agammaglobulinemia
Protein	SH2 domain
Bölge	12.Ekson
Değişim	Lys: Polar , Negatif Yüklü ,Küçük
Yerleşim	Glu: Polar , Pozitif Yüklü, Hidrofobik
Açıklama	mRNA bozulmasına neden olmaktadır

6.1.10 BTK geninin 15.eksonda saptanan mutasyon analizi:

cDNA pozisyonu	c.1516T> C
Variasyon tipi	Missens homozigot mutasyon
Protein değişimi	p.Cys506Arg
Sequenc değişimi	TGT>CGT
Fenotipi	Agammaglobulinemia
Protein	TK domain
Bölge	15.Ekson
Değişim	Cys: Polar, Nötr, Hidrofobik
Yerleşim	Arg: Polar , pozitif yüklü
Açıklama	Bu residoidin doğrudan katalitik aktivitede veya substrat tanıma ile ilişkili olup olmadığı net değildir.

6.1.11 BTK geninin 15.eksonda saptanan mutasyon analizi:

cDNA pozisyonu	c.1517G>T
Variasyon tipi	Missens homozigot mutasyon
Protein değişimi	p.Cys506Phe
Sequenc değişimi	TGT>TTT
Fenotipi	Agammaglobulinemia
Protein	TK domain
Bölge	15.Ekson
Değişim	Cys: Polar, Nötr, Hidrofobik
Yerleşim	Phe: Aromatik , Hidrofobik
Açıklama	Bu residoidin doğrudan katalitik aktivitede veya substrat tanıma ile ilişkili olup olmadığı net değildir.

6.1.12 BTK geninin 18.eksonda saptanan mutasyon analizi:

cDNA pozisyonu	c.1906G> T
Variasyon tipi	Nonsens homozigot mutasyon
Protein değişimi	p.Glu636Ter
Sequenc değişimi	GAG>TAG
Fenotipi	Agammaglobulinemia
Protein	TK domain
Bölge	18.Ekson
Değişim	Glu: Polar , Pozitif Yüklü, Hidrofobik
Yerleşim	Stop
Açıklama	636 nolu konumda G-T geçişi tespit edildi ve stop kodonuna yol açtı ve proteinden 24 uçlu amino asit kaybı ile sonuçlandı ve bu kayıp arasında çok sayıdaki yüksek oranda korunmuş resido'lar bulunmaktadır.

Daha önce bu varyantın saptandığı bir ailede, saptanabilir B-hücresi veya immünoglobülin bulunmayan 3 etkilenmiş erkek çocuk bildirilmiştir, bu verilere dayalı bu proteinin son 24 amino asidinin, B-hücre gelişiminde ve ekspresyonunda veya fonksiyonu için kritik olduğunu sunmaktadır.

6.1.13 BTK geninin 18.eksonda saptanan mutasyon analizi:

cDNA pozisyonu	c.1888A> C
Variasyon tipi	Missens homozigot mutasyon
Protein değişimi	p.Met630Leu
Sequenc değişimi	ATG>CTG
Fenotipi	Agammaglobulinemia
Protein	TK domain
Bölge	18.Ekson
Değişim	Met: Hidrofobik
Yerleşim	Leu: Alifati ,Hidrofobik
Açıklama	Polimorfizm

M630L varyantı patojenik bir varyant olarak yayınlanmamıştır ve bilgilerimize iyi huylu bir varyant olarak bildirilmemiştir. NHLBI Exome Sıralaması Projesinde bu varyant gözlemlenmemiştir,ve popülasyonlarda polimorfizm bir varyant olmadığını göstermektedir. M630L, korunmuş bir amino asit ikamesinde saptanmakta olmasına rağmen sekonder protein yapısını etkileme ihtimali bulunmamaktadır. Bununla birlikte, bu değişimin, protein yapısına / işlevine zarar verdiğini öngörülmektedir. Aynı kodonda olan (M630V / T / R / K) ve çevresinde saptanan (V626G, C633Y, W634L / S / C) varyasyonların agammaglobulinemi ile bağlantılı olduğu İnsan Gen Mutasyon Veri Tabanı'nda(HGMD) rapor edilmesine dayalı olarak , proteinin bu bölgesinin fonksiyonel önemini göstermektedir. Bu nedenle varyant muhtemelen patojeniktir; Bununla birlikte, Polimorfizm olma ihtimali göz ardı edilmemelidir.

6.2 Kontrol grubunda

Hiçbir mutasyon bulunamadı.

7. BULGULAR

DNA sekans tayinini kullanarak, 1 novel ve 5 tekrarlanan mutasyon dahil olmak üzere 25 XLA endeksli hastanın 18'inde klinik tanıyı teyit eden BTK mutasyonları saptanmaktadır.

8 missense mutasyonu, 7 nonsense mutasyonu ve 3 frame shift mutasyonu saptandı, bu mutasyonlar kodlanan bölgeler boyunca dağılmış olup, BTK proteininin tüm alanlarını etkilemektedir. İki ilgisiz bireylerde **R28C**, **R255X** ve **H454R** mutasyonları ve üç ilgisiz bireyde **R525X** mutasyonu saptandı. 18 mutasyondan 1'i heterozigot (**R525X**,)novel olduğu belirlendi.

İntron-ekzon sekans taranması yapılan XLA'lı 7 bireyde, hastalık yaratan mutasyon bulunmadı.

Domaine göre mutasyon dağılımı, 2 PH mutasyonu , 1 TH ,3 SH3 ,1 SH2 ve 11 TK mutasyonu saptandı. Bu varyasyonların etkileri BTKbase veritabanında daha ayrıntılı tartışılmıştır.

Bu, mutasyonların yaklaşık % 50'si BTK proteininin kesilmesi ile ilişkili olduğu ve XLA veritabanında bildirilen verilerle benzerdir.

Sonuçlarımız Tk domainindeki nonsens mutasyonlarının, artmış olan bulgularını desteklememektedir.

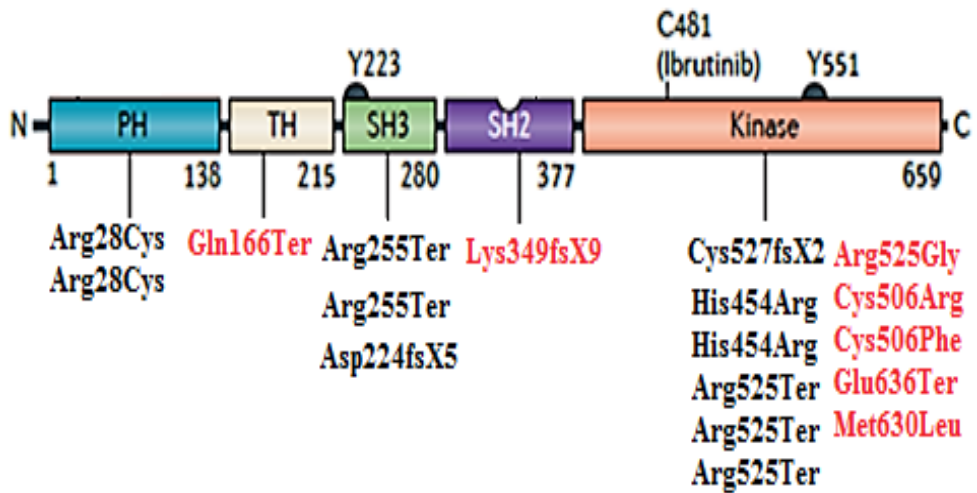
Sonuç olarak, bu tez, mutasyon tipini ve lokalizasyonunu, genotip / fenotip korelasyonunun eksikliğini ve agammaglobulinemi tanısını ve danışmanlığında, BTK gen testinin faydasını belgelemekte ve BTK mutasyonları grubu hakkında veri sunmaktadır . BTK domainlerinin hücre işleyişindeki rolünün netleştirilmesi, tirozin kinazların sağlıkta ve hastalıkta

oynadığı karmaşık rolün deşifre edilmesine yardımcı olabileceği amaçlanmaktadır. Bu bilgiler, hastalığı tedavi etmek veya iyileştirmek için özel müdahalelere imkan sunabilmektedir.

Mutasyon analizinin sonuçları,13 değişik varyant, 1 novel ve 5 tekrarlanan mutasyonu içeren Tablo 7.1’de özetlenmiştir.

HASTA TABLOSU					
Hastalar	Domainler				
	PH	TH	SH3	SH2	TK
1.H			Arg255Ter		
2.H					Cys527fsX2
3.H					His454Arg
4.H					Arg525Ter
5.H					Arg525Gly
6.H	Arg28Cys				
7.H		Gln166Ter			
8.H			Asp224fsX5		
9.H				Lys349fsX9	
10.H					Cys506Arg
11.H					Cys506Phe
12.H					Glu636Ter
13.H					Met630Leu

Tablo 7.1 Mutasyon özetleri.



Şekil : 7.1.1 BTK geninde saptanan varyantların gösterilmektedir.

8. KAYNAKLAR

- Aghamohammadi A., Naseri S., Teimourian S., Pourpak Z., Yeganeh M., Sorouri R.,** 2007, Polymorphism survey of Btk gene promoter and Tec intron1 regions to find any genotype/phenotype correlation in Iranian XLA patients. *Allergy*, 62, 484-.
- Arai T., Zhao M., Kanegane H., van Zelm MC., Futatani T., Yamada M., Ariga T., Ochs HD., Miyawaki T., Oh-ishi T.,** 2011, Genetic analysis of contiguous X-chromosome deletion syndrome encompassing the BTK and TIMM8A genes. *J Hum Genet*, 56, 8, 577-82.
- Asplund AC., Basile GD., Vahliaho J., Resnick I., Vihinen M., Smith CIE.,** 2008, 121 new families with mutations in Bruton's tyrosine kinase (BTK). *Clin Exp Immunol*, 154, 91-.
- Baba Y., Nonoyama S., Imai K., Ochs HD., Yata J., Kishimoto T., Tsukada S.,** 1998, Involvement of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) in B cell antigen receptor and Btk signaling pathway. *Faseb J*, 12, 5, A915-A.
- Bauer M., Maschberger P., Quek L., Briddon SJ., Dash D., Weiss M., Watson SP., Siess W.,** 2001, Genetic and pharmacological analyses of involvement of Src-family, Syk and Btk tyrosine kinases in platelet shape change - Src-kinases mediate integrin alpha(IIb)beta(3) inside-out signaling during shape change. *Thromb Haemostasis*, 85, 2, 331-40.

KAYNAKLAR (devam)

- Bestas B., Moreno PMD., Blomberg KEM., Mohammad DK., Saleh AF., Sutlu T., Nordin JZ., Guterstam P., Gustafsson MO., Kharazi S., Piatosa B., Roberts TC., Behlke MA., Wood MJA., Gait MJ., Lundin KE., El Andaloussi S., Mansson R., Berglof A., Wengel J., Smith CIE.,** 2014, Splice-correcting oligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model. *J Clin Invest*, 124, 9, 4067-81.
- Desiderio S.,** 1997, Role of Btk in B cell development and signaling. *Curr Opin Immunol*, 9, 4, 534-40.
- Gabhann JN., Spence S., Wynne C., Smith S., Byrne JC., Coffey B., Stacey K., Kissenpfennig A., Johnston J., Jefferies CA.,** 2012, Defects in acute responses to TLR4 in Btk-deficient mice result in impaired dendritic cell-induced IFN-gamma production by natural killer cells. *Clin Immunol*, 142, 3, 373-82.
- Gleixner KV., Mayerhofer M., Cerny-Reiterer S., Hormann G., Rix U., Bennett KL., Hadzijasufovic E., Meyer RA., Pickl WF., Gotlib J., Horny HP., Reiter A., Mitterbauer-Hohendanner G., Superti-Furga G., Valent P.,** 2011, KIT-D816V-independent oncogenic signaling in neoplastic cells in systemic mastocytosis: role of Lyn and Btk activation and disruption by dasatinib and bosutinib. *Blood*, 118, 7, 1885-98.
- Gustafsson MO., Mohammad DK., Ylosmaki E., Choi H., Shrestha S., Wang Q., Nore BF., Saksela K., Smith CIE.,** 2017, ANKRD54 preferentially selects Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) from a Human Src-Homology 3 (SH3) domain library. *Plos One*, 12, 4.

KAYNAKLAR (devam)

- Hagemann TL., Chen YX., Rosen FS., Kwan SP.,** 1994, Genomic Organization of the Btk Gene and Exon Scanning for Mutations in Patients with X-Linked Agammaglobulinemia. *Hum Mol Genet*, 3, 10, 1743-9.
- Halcomb KE., Musuka S., Cutierrez T., Wright HL., Satterthwaite AB.,** 2008, Btk regulates localization, in vivo activation, and class switching of anti-DNA B cells. *Mol Immunol*, 46, 2, 233-41.
- Hamasy A., Wang Q., Blomberg KEM., Mohammad DK., Yu L., Vihinen M., Berglof A., Smith CIE.,** 2017, Substitution scanning identifies a novel, catalytically active ibrutinib-resistant BTK cysteine 481 to threonine (C481T) variant. *Leukemia*, 31, 1, 177-85.
- Hashimoto S., Tsukada S., Matsushita M., Miyawaki T., Niida Y., Yachie A., Kobayashi S., Iwata T., Hayakawa H., Matsuoka H., Tsuge I., Yamadori T., Kunikata T., Arai S., Yoshizaki K., Taniguchi N., Kishimoto T.,** 1996, Identification of Bruton's tyrosine kinase (Btk) gene mutations and characterization of the derived proteins in 35 X-linked agammaglobulinemia families: A nationwide study of Btk deficiency in Japan. *Blood*, 88, 2, 561-73.
- Hyvonen M., Saraste M.,** 1997, Structure of the PH domain and Btk motif from Bruton's tyrosine kinase: Molecular explanations for X-linked agammaglobulinaemia. *Embo J*, 16, 12, 3396-404.
- Islam TC., Branden LJ., Kohn DB., Islam KB., Smith CIE.,** 2000, BTK mediated apoptosis, a possible mechanism for failure to generate high titer retroviral producer clones. *J Gene Med*, 2, 3, 204-9.

KAYNAKLAR (devam)

- Kerner JD., Appleby MW., Mohr RN., Chien S., Rawlings DJ., Maliszewski CR., Witte ON., Perlmutter RM.,** 1995, Impaired Expansion of Mouse B-Cell Progenitors Lacking Btk. *Immunity*, 3, 3, 301-12.
- Kotla S., Singh NK., Rao GN.,** 2017, ROS via BTK-p300-STAT1-PPAR gamma signaling activation mediates cholesterol crystals-induced CD36 expression and foam cell formation. *Redox Biol*, 11, 350-64.
- Lim LM., Chang JM., Wang IF., Chang WC., Hwang DY., Chen HC.,** 2013, Atypical X-linked agammaglobulinaemia caused by a novel BTK mutation in a selective immunoglobulin M deficiency patient. *Bmc Pediatr*, 13.
- Liu EL., Guan YL., Pastore Y., Ang SO., Prchal JT.,** 2001, Novel assay for clonality of hematopoiesis by detection of transcriptional polymorphisms of X chromosome genes BTK and FHL1 using SSCP analysis. *Blood*, 98, 11, 110a-a.
- Lovering RC., Sweatman A., Genet SA., Middletonprice HR., Vetrie D., Vorechovsky I., Bentley D., Fontan G., Espanol T., Morgan G., Levinsky RJ., Kinnon C.,** 1994, Identification of Deletions in the Btk Gene Allows Unambiguous Assessment of Carrier Status in Families with X-Linked Agammaglobulinemia. *Hum Genet*, 94, 1, 77-9.
- Natarajan G., Terrazas C., Oghumu S., Varikuti S., Satoskar A.,** 2015, Ibrutinib, a dual Btk/Itk inhibitor, promotes dendritic cell maturation by inducing IFN-alpha/beta. *J Immunol*, 194.
- Ohashi Y., Tsuchiya S., Konno T.,** 1995, A New Point Mutation Involving a Highly Conserved Leucine in the Btk Sh2 Domain in a Family with X-Linked Agammaglobulinemia. *J Med Genet*, 32, 1, 77-8.

KAYNAKLAR (devam)

- Roskoski R.**, 2016, Ibrutinib inhibition of Bruton protein-tyrosine kinase (BTK) in the treatment of B cell neoplasms. *Pharmacol Res*, 113, 395-408.
- Rousseau F., Oubel E., Pontabry J., Schweitzer M., Studholme C., Koob M., Dietemann JL.**, 2013, BTK: An open-source toolkit for fetal brain MR image processing. *Comput Meth Prog Bio*, 109, 1, 65-73.
- Satterthwaite AB., Li ZM., Witte ON.**, 1998, Btk function in B cell development and response. *Semin Immunol*, 10, 4, 309-16.
- Schnute ME., Huang A., Saiah E.**, 2012, Bruton's Tyrosine Kinase (Btk). *Rsc Drug Discov*, 26, 297-326.
- Sharma S., Galanina N., Guo A., Lee J., Kadri S., Van Slambrouck C., Long B., Wang W., Ming M., Furtado LV., Segal JP., Stock W., Venkataraman G., Tang WJ., Lu P., Wang YL.**, 2016, Identification of a structurally novel BTK mutation that drives ibrutinib resistance in CLL. *Oncotarget*, 7, 42, 68833-41.
- Shinohara M., Chang BY., Buggy JJ., Nagai Y., Kodama T., Asahara H., Takayanagi H.**, 2014, The orally available Btk inhibitor ibrutinib (PCI-32765) protects against osteoclast-mediated bone loss. *Bone*, 60, 8-15.
- Singh S., Seymour B., Sommer K., Khan I., Khim S., Hale M., Clough C., Rawlings DJ.**, 2015, BTK-Promoter LV Vectors Utilizing Conserved Intron Element Mediate Functional Rescue in Murine XLA. *Mol Ther*, 23, S93-S.

KAYNAKLAR (devam)

- Sinha S., Boysen J., Nelson M., Secreto C., Warner SL., Bearss DJ., Lesnick C., Shanafelt TD., Kay NE., Ghosh AK.,** 2015, Targeted Axl Inhibition Primes Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells to Apoptosis and Shows Synergistic/Additive Effects in Combination with BTK Inhibitors. *Clin Cancer Res*, 21, 9, 2115-26.
- Smaith CIE., Backesjo CM., Branden LJ., Islam T., Mattsson PT., Mohamed AJ., Nore BF., Vargas L., Vihinen M.,** 1998, XLA - Studies on the Btk tyrosine kinase. *Mol Immunol*, 35, 11-12, 669-70.
- Smith CIE., Bestas B., Turunen JJ., Wengel J.,** 2016, Correcting Exon Skipping Splicing Defects in BTK RNA by Using Bifunctional Oligonucleotides. *Mol Ther*, 24, S231-S.
- Stachelin F., Kuhne T.,** 2000, Identification of a new Bruton's tyrosine kinase (BTK) mutation associated with a mild phenotype in a child with X-linked agammaglobulinemia (XLA). *Clin Lab Haematol*, 22, 2, 123-5.
- Tobinai K.,** 2016, Clinical development of BTK inhibitors in Japan. *Ann Oncol*, 27.
- Tzeng SR., Lou YC., Pai MT., Jain ML., Cheng JW.,** 2000, Solution structure of the human BTK SH3 domain complexed with a proline-rich peptide from p120(cbl). *J Biomol Nmr*, 16, 4, 303-12.
- Tzeng SR., Pai MT., Lung FDT., Wu CW., Roller PP., Lei BF., Wei CJ., Tu SC., Chen SH., Soong WJ., Cheng JW.,** 2000, Stability and peptide binding specificity of Btk SH2 domain: Molecular basis for X-linked agammaglobulinemia. *Protein Sci*, 9, 12, 2377-85.
- Uckun FM., Waddick KG., Mahajan S., Jun X., Takata M., Bolen J., Kurosaki T.,** 1996, BTK as a mediator of radiation-induced apoptosis in DT-40 lymphoma B cells. *Science*, 273, 5278, 1096-100.

KAYNAKLAR (devam)

- van Zelm MC., Geertsema C., Nieuwenhuis N., de Ridder D., Conley ME., Schiff C., Tezcan I., Bernatowska E., Hartwig NG., Sanders EAM., Litzman J., Kondratenko I., van Dongen JJM., van der Burg M.,** 2008, Gross deletions involving IGHM, BTK, or Artemis: A model for genomic lesions mediated by transposable elements. *Am J Hum Genet*, 82, 2, 320-32.
- Vorechovsky I., Vetrie D., Holland J., Bentley DR., Thomas K., Zhou JN., Notarangelo LD., Plebani A., Fontan G., Ochs HD., Hammarstrom L., Sideras P., Smith CIE.,** 1994, Isolation of Cosmid and Cdna Clones in the Region Surrounding the Btk Gene at Xq21.3-Q22. *Genomics*, 21, 3, 517-24.
- Vorechovsky I., Vetrie D., Merup M., Zhou JN., Hammarstrom L., Bentley DR., Smith CIE.,** 1994, A Novel Protein-Tyrosine Kinase Gene Btk Mutated in Patients with X-Linked Agammaglobulinemia - No Evidence for DNA Rearrangements in B-Cell Neoplasias. *Chall Mod Med*, 2, 205-9.
- Wang Q., Vogan EM., Nocka LM., Rosen CE., Zorn JA., Harrison SC., Kuriyan J.,** 2015, Autoinhibition of Bruton's tyrosine kinase (Btk) and activation by soluble inositol hexakisphosphate. *Elife*, 4.
- Wang Y., Kanegane H., Wang XC., Han XH, Zhang QA., Zhao SY., Yu YH., Wang JY., Miyawaki T.,** 2009, Mutation of the BTK Gene and Clinical Feature of X-Linked Agammaglobulinemia in Mainland China. *J Clin Immunol*, 29, 3, 352-6.

KAYNAKLAR (devam)

Wei L., Su YK., Lin CM., Chao TY., Huang SP., Huynh TT., Jan HJ., Whang-Peng J., Chiou JF., Wu ATH., Hsiao M., 2016, Preclinical investigation of ibrutinib, a Bruton's kinase tyrosine (Btk) inhibitor, in suppressing glioma tumorigenesis and stem cell phenotypes. *Oncotarget*, 7, 43, 69961-75.

Weston SA., Prasad ML., Mullighan CG., Chapel H., Benson EM., 2001, Assessment of male CVID patients for mutations in the Btk gene: how many have been misdiagnosed? *Clin Exp Immunol*, 124, 3, 465-9.

Yoon Y., 2014, Small chemicals with inhibitory effects on PtdIns(3,4,5) P-3 binding of Btk PH domain. *Bioorg Med Chem Lett*, 24, 10, 2334-9.

ÖZGEÇMİŞ

Sona YAQUBOVA

Sahsi Bilgiler

Doğum Tarihi 09.07.1988
Doğum Yeri Azerbaycan sumqayıt

Ulaşım Bilgileri

Adres Bakü şəhri Nesimi
Tel. No. +994504409590
E- Mail address: yaqubova_sona@mail.ru

EĞİTİM HAYATI

1995-2006 SUMQAYIT, 12 NUMARALI ORTA MEKTEB
2008-2012 BAKU DEVLET ÜNİVERSİTESİ
2015~ Ege Üniversitesi Biyoteknoloji

DİL BİLGİLERİ

Azeri: kendi dili
İngilisce: orta
Rusca: orta
Türkce: yüksek

ÇALIŞMA HAYATI

2013-2014	BIYOLOJİ TEBABET KLİNİKİ
2016-	ADLI TIP MOLEKÜLAR GENETİK

BİLGİSAYAR PROGRAMLARI

Word, PowerPoint, Excel,