

**MİKROARRAY TABANLI YENİDEN DİZİLEME SİSTEMİ İLE  
WILSON HASTALARINDA ATP7B GENİNDE  
MOLEKÜLER GENETİK ANALİZLER**

**AYHAN YILMAZ**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı için öngördüğü

**DOKTORA TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

**2010**

**MİKROARRAY TABANLI YENİDEN DİZİLEME SİSTEMİ İLE  
WILSON HASTALARINDA ATP7B GENİNDE MOLEKÜLER  
GENETİK ANALİZLER**

**MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF ATP7B GENE IN  
WILSON DISEASE BY MICROARRAY BASED  
RESEQUENCING SYSTEM**

**AYHAN YILMAZ**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2010

# MİKROARRAY TABANLI YENİDEN DİZİLEME SİSTEMİ İLE WILSON HASTALARINDA ATP7B GENİNDE MOLEKÜLER GENETİK ANALİZLER

**Ayhan Yılmaz**

## **ÖZ**

Bu tez çalışmasında, mikroarray tabanlı DNA yeniden dizileme çipi ve direkt DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak, bakır metabolizması bozukluğu sonucu oluşan Wilson hastalığı için mutasyon taraması yapıldı.

Mikroarray tabanlı DNA yeniden dizileme çipi kullanılarak, Wilson hastalığından sorumlu ATP7B geninin yirmi bir ekzonu, ekzon-intron bağlantısı ve kodlanmayan (5' UTR ve 3' UTR ) gen bölgeleri nükleotit seviyesinde analiz edildi. Mikroarray yeniden dizileme yöntemi ile tespit edilen mutasyonlar, direkt DNA dizi analizi yöntemiyle doğrulandı. Çalışma sonucunda, ATP7B geninde toplam on üç farklı mutasyon ve dokuz farklı polimorfizm saptandı. ATP7B geninde tespit edilen mutasyon ve polimorfizmler, daha önce literatürde tanımlanan mutasyonlardır. En sık görülen p.R778G ve p.H1069Q mutasyonlarının allel sıklıkları sırasıyla %31,25 ve %20.8 olarak belirlendi. ATP7B geninde yaygın olarak bulunan bu iki mutasyon, Türk toplumunda Wilson hastalarının mutasyonlarının daha hızlı taranmasında kullanıldı.

Mikroarray tabanlı yeniden dizileme yöntemi, Wilson hastalarında genetik analizler için başarılı bir şekilde kullanılabilir. Bu yöntem özellikle yüksek işlem hacimli çok sayıda örneğin birarada değerlendirilmesinin gerekli olduğu, hızlı ve yüksek veri analizi içeren deney sistemleri için tercih edilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Mikroarray tabanlı DNA yeniden dizileme çipi, direkt DNA dizi analizi, Wilson hastalığı, ATP7B, mutasyon

**Danışman:** Prof.Dr. Erol AKSÖZ, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

**Eş Danışman:** Doç.Dr. R. Köksal ÖZGÜL, Hacettepe Üniversitesi, Çocuk Sağlığı Enstitüsü & Tıp Fakültesi, Pediatri Anabilim Dalı, Metabolizma ve Beslenme Ünitesi

# MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF ATP7B GENE IN WILSON DISEASE BY MICROARRAY BASED RESEQUENCING SYSTEM

**Ayhan Yilmaz**

## ABSTRACT

In this study, microarray resequencing chip and direct DNA sequencing was performed for mutation screening in Wilson disease which caused as a result of copper metabolism defect.

All twenty-one exons, exon-intron boundaries and noncoding genomic regions (5' UTR and 3' UTR) of *ATP7B* gene responsible of Wilson disease were analyzed at nucleotide level by microarray based resequencing DNA chips. The mutations found by microarray resequencing chip were confirmed by direct DNA sequencing method. As result of this study, thirteen different mutations and nine different polymorphisms were identified in *ATP7B* gene. All detected mutations and polymorphisms in *ATP7B* gene has been previously described in the literature. Disease causing variants, namely p.R778G and p.H1069Q, were found to be most common mutations in Wilson disease with an allele frequencies of 31,25% and 20,8%, respectively in Turkish patients. These two common mutations found in *ATP7B* gene were used for rapid mutation screening of patients with Wilson disease in Turkish population.

Microarray based resequencing can be used as a efficient genetic analyses method in Wilson patients. This method should be used in experimental systems which needs high amount of sample processing and highthroughput data analysis.

**Keywords:** Microarray based resequencing DNA chip, Direct DNA sequencing method, Wilson disease, ATP7B, mutation

**Advisor:** Prof.Dr. Erol AKSÖZ, Hacettepe University, Department of Biology, Molecular Biology Division

**Co-advisor:** Assoc. Prof.Dr. R. Köksal ÖZGÜL, Hacettepe University, Institute of Child Health & Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Metabolism and Nutrition Unit

**BU TEZ ÇALIŞMASI, TÜRKİYE'DE SIK GÖRÜLEN KALITSAL METABOLİK HASTALIKLARIN MOLEKÜLER PATOLOJİ PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ (PROJE NO: Devlet Planlama Teşkilatı, DPT 2006K 120640 06 03) PROJESİ TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR.**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında, pratik ve teorik alandaki değerli bilgileri ve tecrübeleri ile her zaman yanımda olan sabrı, hoşgörüsü ve titizliği ile bana her konuda destek olan değerli danışmanım Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji (Moleküler Biyoloji) Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Erol Aksöz'e,

Çalışmalarım sırasında araştırma laboratuvarındaki bütün imkanları sağlayan ve çalışma alanım hakkındaki bütün pratik ve teorik bilgileri paylaşan ve karşına çıkan bütün zorlukları aşmamda yardımcı olan değerli eş danışmanım, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Metabolizma ve Beslenme Ünitesi öğretim üyesi Doç.Dr. R. Köksal Özgül'e,

Klinik olarak değerli fikirlerini benimle paylaşan, Hacettepe Üniversitesi, Çocuk Hastanesi, Metabolizma ve Beslenme Ünitesi öğretim üyesi Doç.Dr. Ali Dursun'a, Gastroenteroloji ünitesinden Prof.Dr. Aysel Yüce ve diğer öğretim üyelerine,

Çalışmanın sonuca ulaştırılmasında ve karşılaşılan güçlüklerin aşılmasında yön gösterici olan Dr. Halil DüNDAR'a ve Yard.Doç.Dr. Mehmet Karaca'ya, laboratuvardaki çalışma arkadaşlarım Arş.Gör. Didem Yücel, Arş.Gör. Ayşegül Güzel ve tekniker Esin Göksun'a,

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve beni her konuda karşılıksız destekleyen sevgili anneme, babama ve kardeşlerime,

Hayatıma girdiğinden beri beni inanılmaz sevgisiyle büyüleyen ve hayallerim gerçekleşirken yanımda olan biricik eşim Çiğdem Yılmaz'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

sayfa

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Mikroarray Çipleri.....	2
2.1.1. Çip Tipleri.....	4
2.2. Otomatik DNA Dizi Analizi.....	12
2.3. Wilson Hastalığı.....	14
2.4. Wilson hastalığından sorumlu ATP7B geninin özellikleri.....	18
3. MATERYAL VE METOT.....	24
3.1. Mikroarray Yeniden Dizileme (Microarray Resequencing) Çipinin Tasarlanması.....	24
3.2. Bireyler.....	26
3.3. DNA İzolasyonu.....	26
3.4. Uzun DNA Fragmentleri İçin PCR (Long Range PCR).....	28
3.5. Kısa DNA Fragmentleri İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Short Range PCR).....	29
3.6. DNA Dizi Analizi.....	32
3.7. PCR Ürünlerinin Miktar Tayini ve Birleştirilmesi.....	33
3.8. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu.....	33
3.9. PCR Ürünlerinin Elüsyonu.....	34
3.10. Fragmentasyon.....	34
3.11. İşaretleme.....	36
3.12. Hibridizasyon.....	37

3.13. Örneklerin Denatüre Edilmesi.....	38
3.14. Yıkama, Boyama ve Tarama.....	39
3.15. Çiplerin Taranması.....	43
4. SONUÇLAR.....	44
5. TARTIŞMA.....	53
6. KAYNAKLAR.....	58

## ŞEKİLLER DİZİNİ

sayfa

Şekil 2.1 ATP7B proteininin fonksiyonel bölgeleri.....	19
Şekil 2.2 ATP7B proteininin bakır döngüsü.....	22
Şekil 2.3 Bakırın hücre içi trafiği.....	23
Şekil 3.1 DNA Yeniden Dizileme Çipi Deney Basamakları.....	26
Şekil 4.1 ATP7B geninin ikinci ekzonunda homozigot olarak bulunan c.562 C>T p.Gln188Lys mutasyonu.....	45
Şekil 4.2 ATP7B geninin sekizinci ekzonunda heterozigot olarak bulunan c.2332 C>G p.Arg778Gly mutasyonu.....	45
Şekil 4.3 ATP7B geninin sekizinci ekzonunda homozigot olarak bulunan c.2332 C>G p.Arg778Gly mutasyonu.....	46
Şekil 4.4 ATP7B geninin onuncu ekzonunda homozigot olarak bulunan c.2506 G>C p.Gly836Arg mutasyonu.....	46
Şekil 4.5 ATP7B geninin onuncu ekzonunda homozigot olarak bulunan c.2508 G>A p.Gly836Glu mutasyonu.....	46
Şekil 4.6 ATP7B geninin ondördüncü ekzonunda heterozigot olarak bulunan c.3207 C>A p.His1069Gln mutasyonu.....	47
Şekil 4.7 ATP7B geninin ondördüncü ekzonunda homozigot olarak bulunan c.3207 C>A p.His1069Gln mutasyonu.....	47
Şekil 4.8 ATP7B geninin onyedinci ekzonunda homozigot olarak bulunan c.3664 G>T p. Asp1222Tyr mutasyonu.....	47
Şekil 4.9 ATP7B geninin onsekizinci ekzonunda homozigot olarak bulunan c.3733 C>A p. Pro1245Thr mutasyonu.....	48
Şekil 4.10 ATP7B geninin onsekizinci ekzonunda homozigot olarak bulunan c.3809 A>G p. Asn1270Ser mutasyonu.....	48
Şekil 4.11 ATP7B geninin onsekizinci ekzonunda homozigot olarak bulunan c.3818 C>T p. Pro1273Leu mutasyonu.....	48
Şekil 4.12 ATP7B geninin sekizinci ekzonunda mikroarray tabanlı DNA yeniden dizileme çipiyle bulunan c.2332 C>G p.Arg778Gly mutasyonu.....	49

Şekil 4.13 ATP7B geninin on dördüncü ekzonunda mikroarray tabanlı DNA yeniden dizileme çipiyle bulunan c.3207 C>A p.His1069Gln mutasyonu.....	49
Şekil 4.14 ATP7B geninde saptadığımız mutasyonların gen içindeki Dağılımları.....	50

## ÇİZELGELER DİZİNİ

sayfa

Çizelge 2.1 Çiplerde kullanılan haberci sistemler.....	7
Çizelge 2.2 DNA çip uygulamaları.....	8
Çizelge 2.3 DNA mikroçiplerin kullanım alanları.....	10
Çizelge 2.4 Ekzonik dizilere göre ATP7B proteininin bölgeleri.....	19
Çizelge 3.1 DNA çipinde (TR_06_01r520489) mutasyon taraması yapılan kalıtsal metabolik hastalıklar ve bu hastalıklardan sorumlu genler.....	24
Çizelge 3.2 Long Range PCR için kullanılan reaksiyon hacimleri.....	28
Çizelge 3.3 Long PCR için kullanılan kimyasallar.....	28
Çizelge 3.4 Uzun fragment PCR’da kullanılan primerler ve amplikon büyüklüğü (baz çifti).....	29
Çizelge 3.5 PCR reaksiyonu protokolü.....	30
Çizelge 3.6 Short PCR için ATP7B genine ait primer dizileri.....	31
Çizelge 3.7 DNA dizi analizi reaksiyon protokolü.....	32
Çizelge 3.8 Amplikon büyüklüğüne göre birleştirme için alınacak ürün Miktarları.....	33
Çizelge 3.9 Fragmentasyon için kullanılan kimyasallar.....	34
Çizelge 3.10 Fragmentasyon ana karışımının hazırlanmış havuzlara eklenmesi (örnek).....	35
Çizelge 3.11 İşaretleme için kullanılan kimyasallar.....	36
Çizelge 3.12 İşaretleme ana karışımının hazırlanması.....	36
Çizelge 3.13 İşaretlemede kullanılan “thermal cyclers” programı.....	36
Çizelge 3.14 Hibridizasyon için kullanılan kimyasallar.....	37
Çizelge 3.15 Hibridizasyon ana karışımının hazırlanması.....	37
Çizelge 3.16 Hibridizasyon ana karışımının eklenmesi.....	38
Çizelge 3.17 Pre-Hibridizasyon tamponunun hazırlanması.....	38
Çizelge 3.18 Çiplerin Pre-Hibridizasyonu.....	38
Çizelge 3.19 Denatüre edilmiş örneklerin çipe yüklenmesi.....	39
Çizelge 3.20 Yıkama, boyama ve tarama için kullanılan kimyasallar.....	39
Çizelge 3.21 Boyama tamponunun hazırlanması.....	41

Çizelge 3.22 SAPE boyama çözeltilisinin hazırlanması.....	41
Çizelge 3.23 Antikor çözeltilisi karışımının hazırlanması.....	41
Çizelge 3.24 Çip bekletme tamponunun hazırlanması.....	41
Çizelge 3.25 FS-450 Fluidiks protokolü kullanılarak hedefler için antikor amplifikasyonu yapılması.....	42
Çizelge 4.1 ATP7B geninde saptanan mutasyonlar.....	44
Çizelge 4.2 Mutasyon bulunan hastalarda saptanan polimorfizmler ve buldukları hasta sayısı.....	51
Çizelge 4.3 Mutasyon bulunan hastalara ait bilgiler.....	52
Çizelge 5.1 ATP7B geninde saptanan mutasyonların proteinde etkilemesi olası bölgeler.....	55

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ABD</b>	ATP bağlanma domeyni
<b>ATP7B</b>	ATPase, Cu <sup>++</sup> transporting, beta polypeptide
<b>Cu1</b>	Bakır bağlanmanın önündeki bölge
<b>Cu1-6</b>	1-6 arası bakır bağlanma bölgeleri (MBB)
<b>LR-PCR</b>	Uzun DNA fragmenti için polimeraz zincir reaksiyonu
<b>Ph</b>	Fosforilasyon bölgesi
<b>PCR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SR-PCR</b>	Kısa DNA fragmenti için polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SNP</b>	Tek nükleotit polimorfizmleri
<b>Td</b>	Transdüksiyon bölgesi
<b>TMS1-8</b>	1-8 arası transmembran segmentleri
<b>WH</b>	Wilson hastalığı

## 1. GİRİŞ

Günümüzde mutasyon taramaları ve gen dizileme yöntemlerinde, geleneksel metodların yerini ileri gen teknolojisi ürünü olan, yüksek işleme kapasitesine sahip otomatize sistemler almaya başlamıştır. DNA çipleri bu alanda kullanılan en son teknolojik ürünlerdendir. DNA çiplerinin kullanımı ile geleneksel metoda dayanan pek çok deney tek bir çip üzerinde yapılabilir hale gelmiştir. Genombilim araştırmalarında farklı amaçlarla kullanılmak üzere, ekspresyon analiz çipleri, SNP genotiplendirme çipleri, belirli nükleotit dizilerine hedeflenerek özgün tasarlanmış genotiplendirme çipleri ve farklı genom analizlerine imkan veren mikroarray tabanlı yeniden dizileme çipleri üretilmektedir. DNA çip analizlerinde bir zemin üzerinde sabitlenmiş sentetik gen dizileriyle, serbest nükleik asitler melezleştirilerek eş zamanlı olarak birçok gen bölgesi yüksek duyarlılıkla incelenir. Bu tez çalışması kapsamında, on kalıtsal metabolik hastalık için mutasyon taramasına yönelik geliştirilmiş olan mikroarray tabanlı DNA dizileme sistemi kullanılarak, Wilson hastalarında moleküler patoloji profilinin hızlı, ekonomik ve yüksek hassasiyet ile belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu DNA çipi ile on farklı kalıtsal metabolik hastalıktan sorumlu toplam on dört genin tüm DNA dizi analizi tek bir mikroarray tabanlı yeniden dizileme çipi kullanılarak aynı anda sonuçlandırılabilir (Özgül vd,2008a, Özgül vd,2008b, Özgül vd,2008c). Bu çalışma, çipin kapsadığı on dört gen içerisinde yer alan ve Wilson hastalığına yol açan *ATP7B* geninde hastalık nedeni olan mutasyonların ve polimorfizmlerin taranmasını kapsamaktadır.

Wilson Hastalığı (WH), otozomal çekinik olarak kalıtılan bir bakır metabolizması düzensizliği olup, dünya genelinde görülme sıklığı 1/30,000 ile 1/100,000 arasında değişir (Frydman,1990; Scheinberg vd,1984; Brewer,1992; Bearn,1960; Giagheddu,1985 ). WH, kromozomun 13q14.3 bandında, bakır taşınımı ve fazla bakırı vücuttan atmak için gerekli ATP7B proteinini kodlayan *ATP7B* genindeki mutasyonlardan kaynaklanır. ATP7B proteini, bakır taşıyan P tipi bir ATPaz olup, safradan bakır atılımında önemli bir rol oynar (Bull vd,1993; Tanzi vd,1993; Yamaguchi vd,1993). ATP7B proteini, safra bakır atılımı yolağında işlev görür. *ATP7B* geninde tanımlanan mutasyonlar, ATP7B proteininin fonksiyonunu

bozarak, başta karaciğer olmak üzere beyin, kornea ve böbreklerde patolojik bakır birikimine sebep olur (Tanzi vd,1993).

Bu tez çalışmasına Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Gastroenteroloji Bölümünde Wilson hastalığı tanısı konulup, klinik olarak izlenmekte olan kırk Wilson hastası dahil edilmiştir. Bu çalışmanın amaçları;

- i) *ATP7B* geninin 21 ekzonunun mikroarray tabanlı yeniden dizileme ve direkt DNA dizi analizi yöntemleri ile taranması,
- ii) *ATP7B* gen mutasyonlarının ve polimorfizmlerin tespit edilmesi,
- iii) Tüm bu veriler ışığında yaygın mutasyonlar tespit edilerek, hastaların mutasyonlar açısından daha kısa zamanda taranması amaçlanmıştır.

DNA çip uygulaması ile *ATP7B* geninin yirmi bir ekzonu, dört fragmente ayrılarak analiz edildi ve elde edilen DNA dizi sonuçları kullanılarak, mutasyon ve polimorfizmler tespit edildi. Tespit edilen mutasyonlar, direkt DNA dizileme yöntemi kullanılarak doğrulandı. Yapılan çalışmalar sonucu, on üç farklı mutasyon ve dokuz farklı polimorfizm tespit edildi. Hasta grubumuzda en yaygın olarak bulunan, p.R778G ve p.H1069Q mutasyonlarının allel sıklığı toplam %52'dir. Geleneksel metotlar kullanıldığında, uzun zaman isteyen *ATP7B* gibi oldukça büyük bir genin tüm bölgelerinin mutasyon taraması, mikroarray tabanlı yeniden dizileme çipleri kullanılarak, bu tez çalışması kapsamında tamamlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Mikroarray Çipleri**

Kalıtsal hastalıkların tanı ve tedavisi için öncelikle bu hastalıkların moleküler patolojilerinin aydınlatılması zorunludur. Bu alanda genetik tanıya yönelik yeni metot ve teknolojilerin gelişimi hızla devam etmektedir. Bilişim teknolojisindeki gelişime, İnsan Genom Projesinin sonuçları da eklenince, tıbbi tanı sistemlerinde olağanüstü bir dönem yaşanmaktadır. Bu heyecanı yaratan yeni gen teknolojileri arasında en dikkat çekici olanı, DNA çip teknolojisidir. Bu yöntem belki biyoteknolojinin ulaştığı son noktalardan birisidir (Savlı,2003). DNA çipi, üzerine

basılı silikon, plastik veya cam gibi katı bir yüzeye bağlanmış mikroskopik DNA noktaları koleksiyonudur. Tek bir DNA çipi üzerinde binlercesi sabitlenmiş DNA segmentlerine, haberci veya taşıyıcı denir. Fragmentize edilen DNA, önce bir substrata bağlanır ve ardından bir gen veya fragment bağlanır (Parihar,2007). Gen ifade analizlerine ek olarak, artık araştırmacıların kendi seçecekleri gen panelleri için de, özgün çip tasarımları üretilebilmektedir.

İnsan Genom Projesi tamamlanıp, referans olarak kullanılacak genom dizileri elde edildikten sonra, farklı populasyonlar arasındaki varyasyonların ortaya çıkarılması için araştırmalar başladı (Collins vd,1997; Nickerson vd,1998). Bu varyasyonları belirleme ve arşivleme, hastalıklara direnç ve yatkınlığın genetik temelini ortaya çıkaracak, pozisyonel ve aday gen yaklaşımı için kritiktir. Bu dizi varyasyonları, basit ve kompleks kalıtsal hastalıklar ile güçlü çevresel etkileşimler arasındaki çalışmalarda, genetik belirteç olarak kullanılır (Moldin vd,1997; Zhang vd,1998). Mutasyonlar tanımlandıktan sonra, populasyon tabanlı genetik risk değerlendirme ve tanısal testler için büyük ölçekli dizi analizleri gereklidir. Bu karşılaştırmalı dizi ve mutasyon analizleri, düşük bütçeli geleneksel teknolojiyle yapılamaz (Hacia,1999). Oldukça farklı uygulama alanları olan çip tabanlı hibridizasyon analizi, hızla gelişen bir teknolojidir (Southern,1996; Ramsay,1998). Çipe konulan nükleik asit komponenti yüz nükleotitden uzun olanlar, RNA ekspresyon çalışması ve yirmi beş nükleotit uzunluğuna kadar olan oligolar da hem RNA ekspresyonu hem de dizi analizi için kullanılır (Schena vd,1995; Lockhart vd,1996). İlk başlarda hedef DNA'ya hibridize edilen oligolar, tipik olarak sekiz nükleotit uzunluğundaydı (Bains ve Smith,1988; Southern vd,1992). DNA çipleri, teorik olarak üzerlerine sabitlenmiş dizilerle komplementer bütün dizileri analiz edebilir ama kısa tekrar bölgeleri, hibridizasyon çakışmalarına neden olduğu için yanlış sonuçlar verir (Hacia,1999).

### **Daha önce karakterize edilmiş sekans varyasyonları tanımlama**

Bilinen genomik DNA dizi varyasyonlarının mikroarray tabanlı çip teknolojisiyle tespiti, ilk olarak 1989'da rapor edildi (Saiki vd,1989). Büyük doku uyumu kompleksi genlerinden olan, altı *HLA-DQA* allele ve dokuz *HLB* mutasyonuna komplementer probolar naylon filtrelelere bağlandı ve biyotinle işaretlenmiş PCR ürünleriyle inkübe edildi. Genotipin her allele özgül probolarla kolorometrik olarak

hibridizasyon sinyal şiddetiyle belirlendiği, “reverse dot blot” uygulaması geliştirildi. Mikroarray tabanlı çip teknolojisindeki gelişmeler, daha kompleks sistemlerin çalışmasına olanak sağlar. Kistik fibroz transmembran iletim düzenleyicisi olan *CFTR* geninde, bilinen otuz yedi mutasyon ve tüm tek baz değişikliklerini taramak için fotolitografik tabanlı işlemle in situ sentezlenen, 1480 oligonükleotit problu çipler tasarlanmıştır (Hacia,1999).

### **2.1.1. Çip Tipleri**

Baskın olarak çoğu laboratuvarında yaygın bir şekilde kullanılan üç çeşit mikroarray tabanlı çip teknolojisi vardır: 1- Önceden sentezlenmiş oligolar ve PCR ürünlerinin robotlarla bir yüzeye sabitlendiği bağlantı mikroçipleri, 2- Çip yüzeyinde sentezlenmiş, göreceli olarak kısa oligonükleotitlerden oluşan, Affymetrix mikroçipleri, 3- Agilent ve NimbleGen tarafından yapılmış, diğer in situ sentez platformlu mikroçipler.

Bu tiplerin hepsi, etkili bir genomik okuma sağlamasına karşın, içerik olarak avantaj ve dezavantajları olan, özgül özelliklere sahiptirler. DNA ve RNA'yı ölçen paralel uygulamalar, değişmeye ve evrimleşmeye devam ederken, günümüzde en fazla kullanılan üç platform bunlardır (Emmert-Streib ve Dehmer,2008).

### **Bağlantı Mikroçipleri**

Bağlantı mikroçipleri, yaygın olarak ilk kullanılan ve kullanımı hala devam eden çiplerdir. Bu çiplerde, robotlarla iğneli borular kullanılarak, DNA mikrotiter pleytlerden alınıp, üzerinde PCR ürünleri veya uzun oligonükleotitlerin yazıldığı mikroskop lamının cam yüzeyine mikron ayarıyla bırakılır (Shalon,1995; Adleman,1994). İlk üretildikten sonra, çiplerin üretim ve kullanımında gerekli bütün protokoller ve robot yapım planlarını içeren teknolojiyi yaygınlaştırmak için çok yönlü girişimlerde bulunuldu ve birçok akademik laboratuvar, çipleri yerel olarak üretmek için kaynak yatırımı yaptı. Bunların arasında robotun yapımı veya satın alınması, cam yüzeye yapıştırılacak PCR ürünlerinin üretimi, oligoların tasarım ve sentezlenmesi vardır (Emmert-Streib ve Dehmer,2008).

Bağlantı mikroçipleri, öncelikle karşılaştırmalı bir teknolojidir. İki örnek arasında göreceli hedef konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılır. Karşılaştırılacak kompleks örnekler karıştırılmadan önce, özgül renkli bir floresan belirteçle işaretlenir (Çizelge 2.1) ve mikroçip noktalarına hibridize etmek için rekabet ettirilir (Duggan vd,1999; Brown ve Botstein,1999). Böylece orjinal kompleks karışımındaki hedeflerin, göreceli konsantrasyon farkları kısmi işgalden dolayı taranır ve bir okuma elde edilir (Emmert-Streib ve Dehmer,2008).

### **Affymetrix çipler**

Affymetrix çipler, piyasadaki en özgül çip platformlarıdır. Çipler, cam yüzeyin üzerinde in situ olarak sentezlenen yirmi beş nükleotitlik oligonükleotitlerden oluşur. Yarı iletken çiplerin yapımında kullanılına benzer bir fotolitografi maskesi, cam veya katı bir yüzey kullanılır. Bu yüzeylerin belirli bölgelerine ışık yardımıyla hedeflenen DNA sentezi teknolojisi kullanılarak, her seferinde bir nükleotit eklenecek şekilde, oligo diziler sabitlenir (Fodor vd,1991; Pease vd,1994). Dolayısıyla litografik metotla sıkıştırılmış kare yamalı prob matrisler oluşturulur. Böylece üretilen çipler, 1.28 cm<sup>2</sup>'lik alanda 6.5 milyon özgül prob içerir (Emmert-Streib ve Dehmer,2008). Küçük bir alana sabitlenen prob sayısı gün geçtikçe artmaktadır.

Bağlantı çiplerinde, her bir genin ekspresyonunu probalayacak bir tek dizi kullanılırken, Affymetrix çipleri, bir genin ekspresyonunu ölçmek için bir prob seti uygular. Prob seti, ilgili geni ölçmek için iki tip prob kullanır: Mükemmel uyumlu ve uyumsuz proplar. 1- Mükemmel uyum probları, genin üzerindeki özgül bir dizi için tasarlanmışlardır. Her bir prob özgül olmasına rağmen, zaman zaman birbirleriyle hibridize olurlar. 2- Uyumsuz proplar, mükemmel uyum proplarına benzerler fakat probun merkezinde tek baz değişikliği vardır. Yirmi beş nükleotit uzunluktaki kısa bir dizide tek baz uyumsuzluğu, hibridizasyonu büyük oranda bozar. Uyumsuz probun amacı, arka plan hibridizasyonu için negatif kontrol olarak hizmet etmektir. Tipik bir prob seti, on bir tane mükemmel uyumlu ve on bir tane de uyumsuz prob içerir. Tek gen için, propların çip üzerine yerleştirilmeleri, bölgesel hibridizasyon hatalarına karşı korumak için rastlantısal bir işlemle seçilir. Bölgesel hibridizasyon hataları gruplaşırsa, genin bütün probları etkilenir. Bağlantı

çipleri, her gen için sadece bir tek prob kullandığı için bölgesel hibridizasyon sorunları oluşur (Emmert-Streib ve Dehmer,2008).

### **Diğer in situ sentez platformları**

Affymetrix'ten farklı olarak, 25-60 nükleotit uzunluğunda proplar sentezlemek için, ardışık olarak her seferinde bir nükleotit ekleyecek alternatif iki in situ sentez metodu vardır (Blanchard vd,1996). Affymetrix ışık yardımıyla hedeflenen DNA sentezini kontrol etmek için, maske tabanlı bir fotolitografik metot kullanmasına karşın, NimbleGen aynı görevi başarmak ve ışığı kontrol etmek için dönen küçük aynalar kullanır (Blanchard ve Friend,1999). Texas Instrument tarafından geliştirilen bu yaklaşım, maskesiz litofotografi olarak adlandırılır ve dijital kontrollü, küçük ayna çipleriyle çalışan, projektörlü televizyon teknolojisine benzer. Uygun dalga boyu ve şiddetteki ışık aktivasyonu yardımıyla, katı bir yüzeye herhangi bir nükleotit serisi inşa edilerek, istenilen kalıpta bir oligonükleotit dizisi elde edilir (Singh-Gasson vd,1999; Nuwaysir vd,2002).

NimbleGen yaklaşımı, Affymetrix metoduna göre iki büyük avantaja sahiptir. Birincisi, bir maskeye ihtiyaç duymaz. N uzunluğunda farklı oligonükleotitlerden oluşan bir çip oluşturmak için, 4N sentez aşamalı bir seriye ihtiyaç vardır. Dolayısıyla, bir yüzeye yirmi beş nükleotit uzunluğunda özgül oligolardan oluşan bir kütüphane kurmak için, yüz kimyasal sentez aşamasına gerek vardır. Affymetrix'te her bir sentez aşamasını kontrol eden, özgül bir fotolitografi maskesi kullanılır. Bu maskeleri yapmak çok pahalı olduğu için üretilen çipler de pahalıdır. Ayrıca üretilen bir maske seti, sadece tek bir çip tasarımını tanımlar. Tasarımı değiştirmek için tamamıyla yeni maske serilerine ihtiyaç duyulur. Bununla birlikte elektronik kontrole, küçük ayna paternlerini değiştirmek daha kolaydır. Dolayısıyla, NimbleGen tarafından üretilen her bir çip, farklı bir tasarıma sahiptir (Emmert-Streib ve Dehmer,2008).

Çip yapımında kullanılan ikinci alternatif, in situ sentez yaklaşımı, geleneksel oligo sentez kimyasını kullanır, fakat baz ekleme kontrolü özgündür. Hewlett Packard tarafından günlük kullandığımız yazıcılar için geliştirilen Jet mürekkep teknolojisi, DNA sentezinin sıvı öncüllerini kontrol etmek için uyarlanmıştır. Agilent firması bu

teknolojiyi, cam yüzeylerde altmış nükleotit uzunluğunda oligolar sentezlemek için kullanır (Blanchard ve Friend,1999; Nuwaysir vd,2002). Jet mürekkep yazıcısında olduğu gibi, bu teknoloji de oldukça esnektir. Her bir çip, yapılacak araştırmanın türüne uygun özgüllüğe getirilir (Emmert-Streib ve Dehmer,2008).

Bir çipin tasarımının değiştirilme esnekliğinin olumlu ve olumsuz tarafları vardır. Olumlu tarafı, deneyde ihtiyaç duyulan genom ve ekspresyon aralığını keşfetmek için çip tasarlamak kolaydır. Olumsuz tarafı ise veri analizi zordur, çünkü; problemler çipten çipe ve çipin içeriği de deneyden deneye değişir. Affymetrix'in ürettiği çiplerde, herkes aynı çipleri kullandığı için, veri setleri arasında karşılaştırma yapmak oldukça kolaydır. Her çip farklı olursa, veri setleri arasında karşılaştırma yapmak da zor olur (Emmert-Streib ve Dehmer,2008).

In situ sentez metodu kullanarak tasarlanan çiplerin bir diğer olumlu tarafı, klon kütüphanelerine veya başka yerde üretilen moleküllere bağımlı olmamalarıdır. Bunun yerine her çipin içeriği taze olarak hazırlanır. Buna karşın bağlantı çiplerinde araştırmacı, kütüphanenin geçmişini ve çipin tasarlanmasında kaç kere kullanıldığını asla bilemez. İn situ sentez çiplerinin bütün bu olumlu yönlerine karşın kontrol kalitesi oldukça belirsizdir (Emmert-Streib ve Dehmer,2008).

Çizelge 2.1 Çiplerde kullanılan haberci sistemler (Call,2001).

Hedef işaret	İkincil bağlanan	Tespit
Haptenler Biyotin Digoksinin Dinitrofenil	Alkalın fosfataz, horseradish peroksidaz veya floresans boyalara bağlanan streptavidin veya antibadiler	Enzim işaretli floresans, tiramid sinyal amplifikasyonu veya doğrudan floresan
Floresan boyalar AlexaFluor 546 Cy-3 ve Cy-5 Foeritrin	Yok	Doğrudan floresan

Çizelge 2.2 DNA çip uygulamaları (Friend ve Stoughton,2002).

Çip tipi	Uygulama
Gen ekspresyonu	İlaç ve tedavi geliştirme Ön tanı tahmini Genetik test
Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon	Tümör sınıflandırması Risk değerlendirme Ön tanı tahmini Genetik test
Tek nükleotit polimorfizmleri	İlaç ve tedavi geliştirme Ön tanı tahmini Genetik test

### DNA Çiplerinin Karakteristik Özellikleri (Parihar,2007)

- 1) Paralellik:** Bir gen veya bir bölgeyi analiz etmek yerine, SNP çiplerinde olduğu gibi, aynı anda binlerce genle çalışılır ve çoklu sonuçlar alınır.
- 2) Küçültme:** Gözlem, küçültme seviyesinde olduğu için, analiz yüksek hızdadır.
- 3) Hız:** Çok yüksek hızda bir teknik olduğu için, mutasyon tarama çiplerinde olduğu gibi, birkaç DNA bir kerede analiz edilebilir.
- 4) Yüksek esnekliği:** Aynı anda farklı kaynaklardan örneklerin analiz edilmesine izin verir. Farklı DNA örnekleri, farklı floresans materyalle işaretlendiğinde, aynı anda analiz edilebilir.
- 5) Otomasyon:** Çip üretimi, hibridizasyon, tarama ve tespit gibi bütün işlemler oldukça sofistikedir ve oldukça iyi otomasyon sağlanmıştır.
- 6) Kombinasyonel sentez:** Oldukça fazla sayıda farklı tipteki oligonükleotitler, daha kısa döngü süreleri içinde sentezlenir.

### DNA çiplerinin kullanım alanları

Çipler küçük olmaları ve çok sayıda gen içermelerinden dolayı, gen ekspresyonunu ölçmede, Southern blot gibi geleneksel metodlardan daha kullanışlıdır. Çipler tek bir örnek içindeki veya iki farklı hücre tipi veya dokulardaki gene ekspresyonlarının karşılaştırılması gibi büyük ölçekli genetik analizlerde kullanılır. Çipler, hücrelerde belirli şartlar altında, hangi genlerin aktif olarak ürün üretme, sağlıklı ve hasta hücreler arasındaki gen aktivite farklarını tespit çalışmalarında kullanılabilir. Çiplerin şu ana kadar ki en önemli uygulamalarından

biri, mRNA yoğunluğunu yani gen ekspresyonu paternini görüntülemektir. Genomik DNA'dan transkribe veya eksprese olan genlerin kolleksiyonu olarak bilinen transkriptom (gen ekspresyonu paterni), hücrenel fenotip ve işlevinin temel belirleyicisidir. Transkriptom DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi gibi normal hücrenel olaylar sırasında, dramatik ve hızlı bir şekilde değişir. Bir genin nerede, ne zaman ve ne aşamaya kadar ekspresyonunun olduğunu belirlemek, kodladığı proteinin biyolojik rolünü anlamak için esastır. Arıca gen ekspresyonu paternlerindeki değişiklikler, düzenleyici mekanizmalar ve biyokimyasal yollar hakkında aydınlatıcı bilgiler verir. Bu ölçümlerden kazanılan bilgiler, hastalığın ortaya çıkışı ve kaynağını belirleyip, terapik faydası olan gen ürünleri ve terapik müdahale şekilleri tanımlanabilir (Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3) (Friend ve Stoughton,2002).

Çipler ayrıca, genomik kazanç ve kayıplar (karşılaştırmalı genomik hibridizasyon çipleri) ve mutasyon taraması (DNA mutasyon ve SNP çipleri) çalışmalarında da kullanılır (Friend ve Stoughton,2002). Belli bir kromozomal bölgenin kaybı veya çoğaltılması, genetik yeniden düzenlenmeler veya mutasyonlar gibi kromozomal DNA değişiklikleri, Down veya Turner sendromu gibi anormalliklere yol açar. Elde edilen genetik belirteç, genotip ve genomik bölge kopya sayısı karşılaştırmaları ile kanserleşme öncesi ve kanserli hücreleri içeren farklı hücre tiplerindeki kaybolan ve çoğaltılan gen ve kromozomal bölgelerin tespitinde kullanılır. Çiplerin yardımıyla DNA mutasyonları, kromozomal yeniden düzenlenmeler ve kopya sayısı değişikliklerinin nerede ve nasıl olduğu belirlenebilir. Bu değişiklikler gelişim bozukluklarının tanısı, tümör baskılayıcı genlerin belirlenmesi, hastalık ön tanısı ve tedavi seçimi için kullanılır (Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3) (Dobrovolski vd,1999; Star ve Birshtein,2007).

Çizelge 2.3 DNA mikroçiplerin kullanım alanları (Stoughton,2005).

Amaç	Hedef	Multipleks reaksiyonlar	Çipte ikili multipleks problemler
Ekspresyon profili	İlgili hücre kültürü ve dokuların mRNA veya totalRNA'sı	RT/PCR/IVT'nin bazı kombinasyonları yoluyla bütün mRNA'ların amplifikasyonu	Hedef transkriptlere komplementer tek ve çift iplikli DNA
Patojen saptanması ve karakterizasyonu	Mikropların genomik DNA'sı	Rastlantısal şekilde praymlanmış PCR veya belirli hedef bölgeleri için seçilmiş primer çiftleriyle PCR	Önceden seçilmiş tanımlama yerlerine komplementer diziler
Genotipleme	İnsan veya hayvanların genomik DNA'sı	Özel SNP bölgeleri için ligasyon veya ekstensiyon ve amplifikasyon	Beklenen ürünlere komplementer diziler
Yeniden dizileme (Resequencing)	Genomik DNA	Seçilmiş bölgelerin amplifikasyonu	Bir taban sekans boyunca kayan her bir N-mer penceresine ve ayrıca merkezi pozisyonunda üç muhtemel mutasyona komplementer diziler
Protein-DNA etkileşimleri	Genomik DNA	Transkripsiyon faktörü bağlamaya dayalı zenginleştirme	Genler arası bölgelere komplementer diziler

İnsan hücreleri binlerce gen eksprese eder. Bu ekspresyon düzeyleri hücre farklılaşması için anahtardır. DNA çip teknolojisi günümüzde esas olarak gen ekspresyon analizlerinde kullanılmaktadır. Biyoinformatik ve istatistik bilimlerinin de yardımıyla geniş genom bölgelerinin taranmasına olanak sağlamaktadır (Bassett vd,1999). Test edilen hasta ve referans örneklerde ortak bulunan ve aynı oranda eksprese edilmesi beklenen housekeeping gen bölgeleri, bir iç kontrol olarak kullanılmaktadır. Bu sayede sinyalin göreceli değişikliği standardize edilebilmektedir.

Bu teknolojiyle, aynı gene ait birçok mutasyon ve binlerce tek nükleotit değişikliği de eş zamanlı olarak tespit edilebilmektedir. Elde edilen mutant veya polimorfik bölgelere ait bilgi, genom haritalama çalışmalarında kullanılmaktadır (Lipshutz vd,1999; Gerhold vd,1999; Cheung vd,1999; Yershov vd,1996). Kullanıma giren

*p53* ya da *BRCA1* ve *BRCA2* gibi onkogenlere yönelik DNA çipleri ticari olarak mevcuttur (Ahrendt vd,1999; Sapolsky vd,1999). Ayrıca kistik fibrozis ve Ataksiya telenjiyektazi hastalıklarından sorumlu genlere yönelik oligonükleotit DNA çipleri de düzenlenmiştir. Günümüzde özgül mutasyonların tanısında kullanılan çeşitli oligonükleotit DNA çipleriyle, DiGeorge sendromu ve Duchenne Distrofisi hastalıklarının tanısı da mümkündür. Birçok doku gruplarının yer aldığı DNA çiplerinin transplantasyonda kullanımı ya da bilinen birçok onkogenin yer aldığı DNA çipleriyle onkolojik tanıya gidilmesi de mümkündür (Hacia vd,1998; Cronin vd,1996; Wang vd,1998; Hacia vd,1996).

Prokaryotik genomlar da DNA çip teknolojisiyle, mutasyon ve polimorfizm açısından analiz edilmektedir. Bunların arasında HIV proteaz geni dizilerinde yapılan DNA çip taramaları, çok değişken bir mikroorganizma genomuyla karşı karşıya olduğunu ortaya koymuştur (Kozal vd,1996). Son yıllarda bu teknolojinin mikrobiyoloji alanında kullanımı yaygınlaşmıştır. Yayımlanan binlerce çalışma arasında “transkriptom” analizlerinin yapıldığı çalışmalar söylenebilir. Bu yöntemle, Gama herpesvirüs ve *Neisseria meningitidis*'in enfeksiyon sırasındaki ekspresyonunda azalan ve artan genleri, binlerce gen arasından taranarak belirlenmiştir (Ebrahimi vd,2003; Dietrich vd,2003; Wang vd,2002).

DNA çiplerinin gerek klinik mikrobiyoloji gerek sitogenetik açısından yeni ufuklar açan bir yönü de, Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (KGH) çiplerinin üretilmesidir. Klasik karşılaştırmalı genomik hibridizasyon çiplerinde, genomik kazanç ve kayıplar tek bir deneyde, tümör DNA'sı ve normal referans DNA'sı karşılaştırılarak elde edilir. Bu amaçla tümör DNA'ları normal metafaz kromozomlarıyla hibridize edilir (Kallioniemi vd,1992). Mikroarray tabanlı karşılaştırmalı genomik hibridizasyon DNA çiplerinde ise normal metafaz kromozomlarının yerini, aynı kromozomun bir çok gen bölgesinin bulunduğu bir platform alır. Böylece beş bin noktacıta yaklaşık bir megabit çözünmeye ulaşan genomik kayıp ve kazancı taramak olanağı vardır (Pinkel vd,1998). Yani başka bir deyişle, klasik KGH'nın laboratuvarlarda rutin tanıda kullanılmasıdaki büyük bir engel olan çözünürlük problemi ortadan kalkmıştır. Mikroarray tabanlı KGH teknolojisi ve silikon çiplerin kullanımıyla yapılan çok geniş ölçekli bir çalışmada, *Streptococcus agalactiae*'nin 2.160.267 baz çiftli genomu taranmış; genetik

heterojenite ve virülans mekanizmalarının evrimi açısından ilginç sonuçlara ulaşılmıştır (Tettelin vd,2002).

DNA çiplerinin ekspresyon analizleri klinik amaçlı olarak da kullanılmaktadır. Tümörlerin, bu teknolojiyle, gen ekspresyon paternlerine göre primer mi sekonder mi olduklarını tayin etmek, tedavi şemaları ve risk ölçümü yapmak mümkündür (Golup vd,1999). Yine tümörlerin ön tanısı ve ilaç dirençliliğiyle olan ilişkileri de, DNA çip kökenli gen ekspresyon analizlerinin potansiyel uygulama alanları arasındadır. Öte yandan DNA çipleriyle tedavide kullanılan ajanlara karşı, genetik ekspresyonda oluşan cevabın ölçülmesi çalışmaları da gerçekleştirilmiştir (Gray vd,1998; Marton vd,1998). Özellikle ilaç toksisitesine yol açan özel genlere ait bilgilerin, DNA çipleriyle taranarak dökümlenmesinin çok değerli olduğu bir gerçektir (Nuwaysir vd,1999; Braxton ve Bedilion,1998).

Günümüzde mikroarray tabanlı DNA çip teknolojisini uygulayacak yetişmiş insan gücündeki eksiklik, uygulamaların toplulaşması önündeki en büyük engeldir. Üstelik farklı DNA çip sistemleri arasında elde edilen bilginin, standardize edilmesinin zorluğunu da yaşıyoruz. Bu yüzden bu teknolojiyi henüz olgunluk dönemine ulaşmamış olarak kabul etmemiz gerekiyor. 1995'den bu yana önemli gelişmeler kaydedilmiş ve daha düşük maliyetli ve yüksek yoğunluklu, uyarlanma yeteneği geniş DNA çiplerine kavuşmuş durumdayız. Şu anda yalnız ön tanı ve tanı için yeni olanaklardan değil, histopatolojik sınıflandırmalarda da bir yeniden değerlendirmeden söz ediyoruz (Perou vd,1999). İlginç olan nokta, patoloğun, mikrobiyoloğun, yada başka bir laboratuvar disiplininin atlanarak mikroarray tabanlı DNA çip laboratuvarlarıyla, klinisyen arasında bağımsız bir diyalogun doğmasıdır. Elimizdeki veriler bu yönde hızlı bir gelişme ve yeni bir tıp anlayışının doğduğuna işaret ediyor. Teknolojinin gücüne ve koruyucu hekimlikteki kullanımına paralel olarak yaklaşan bir dizi problem de uluslararası yasaları zorunlu kılmaktadır (Savlı,2003).

## **2.2. Otomatik DNA Dizi Analizi**

İnsan Genom Projesi gibi büyük projeler çok sayıda DNA dizi analizi yapılmasını gerektirmektedir. Artan analiz sayısı, uzun zaman ve yüksek iş gücü gerektirir. Bu

gelişmeler sonucunda otomasyon kaçınılmaz olmuştur. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de yarar sağlamıştır. Otomatik analizde de Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan, zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır. 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 dedektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek, sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında, altı bazdan bin baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (Sambrook vd,1989).

### **ABI Prism Genetik Analizatörü**

ABI Prism 3130 Genetik Analizatörü kendinden önceki sistemlerden farklı olarak, poliakrilamid jelmatriks sistemi yerine, kapiler sistem içine doldurulan polimer jelmatriks sistemi içerir. Bu polimer jelmatriks, çapı nanometre ölçütlerinde olan cam borular içerisine doldurulur. Cihaz iki ana parçadan oluşur. Birinci kısım veri ünitesidir. Veri ünitesi bir bilgisayar sisteminden ibarettir. Bu bilgisayarda, ikinci kısım ile bağlantıyı kuran ve ikinci kısmı kontrol eden programlar yüklüdür. İkinci kısım analizin yapıldığı elektroforez kısmıdır (Applied Biosystems,2005).

### **Kontrol Sistemi**

Tipik bir masa üstü bilgisayar sistemidir. Bu sistemde iki ana program yüklüdür. İki programdan birinin görevi, elektroforez cihazı ile bağlantıyı kurmak, elektroforez koşullarını sağlamak ve verileri toplamaktır. İkinci programın görevi ise toplanan verilerinin değerlendirilmesidir. ABI Prism 3130 Genetik Analizatöründe "DATA Collection™" programı birinci tip bilgisayar programına örnektir. "Sequence Analyse™" programı ise cihazın ikinci tip programıdır.

## **Elektroforez Ünitesi**

Bu kısım hazırlanan örneğin yüklendiği ve elektroforezin gerçekleştiği kısımdır ve üç üniteden oluşur.

**1-Örnek yükleme ünitesi.**

**2-Dedektör ünitesi.**

**3-Jel blok ünitesi.**

### **2.3. Wilson Hastalığı**

WH gelişiminde bakır birikimi yavaştır ve hastalık 2-70 yaşları arasında ortaya çıkar (Schoen ve Sternlieb,1990; Beyersdorff ve Morbus,2006; Ala vd,2005). Batı ülkelerinde hastalığın görülme yaş aralığı 20-40 arasındadır. Belirtiler görülmeye başlandıktan sonra hasta bireylerin % 40'ında karaciğer hasarı oluşur (Bull vd,1993). Hastalar, asemptomatik karaciğer, hepatomegali, karaciğer yağlanması, akut hepatit ve yüksek serum transaminazın sebep olduğu karaciğer yetmezliği, sarılık veya siroz ve hemolitik anemi geliştirirler. Kronik olarak ise hepatit, portal hipertansiyon veya siroz geliştirirler. Bu belirtiler tek tek gözleneceği gibi aynı anda da gelişebilirler (Yarze vd,1992; Brewer ve Yuzbasiyan-Gurkan,1992).

Hastaların bir kısmında karaciğer bozukluğu gözlenmez ama devam eden bakır birikmesi sonucu, vücudun diğer organlarında bakır seviyesi artar. Bu hastalarda hareket veya distonik bozukluk, disartriya ve davranış bozukluklarını içeren nöropsikiyatrik semptomlar gözlenir (Schoen ve Sternlieb,1990). Hareket bozukluğu, disarthriya, disfajiya, koordinasyon bozukluğu, tremor ve distoniya gibi nörolojik belirtiler tek tek gözleneceği gibi birkaçı birarada da olabilir. Depresyon, duygusal kontrolün kaybı, görevlerine odaklanamama, yasaklama veya reddetme duygusunun kaybı ve garip davranışlar şeklinde bozukluklar görülebilir (Wiggelinkhuizen vd,2009).

## **Wilson hastalığını belirlemede kullanılan tanı ve testler**

Wilson hastalığının tanısı, laboratuvar testleri, klinik özellikler ve mutasyon taramalarının birarada değerlendirilmesi ile yapılır. Tarama testleri arasında slit lambasıyla, Kayser-Fleischer halkasının muayenesi vardır. Deri altından karaciğer biyopsisiyle örnek alınır ve kantitatif bakır testi yapılır (Brewer ve Askari,2005). Laboratuvar testleri; 24 saatlik idrar bakır atılımı, karaciğer bakır, serum dışı bakır ve serüloplazmin konsantrasyonları ölçülerek yapılır. Hastaların tanısı çoğu durumda klasik klinik ve biyokimyasal özellikler gösterir (Medici vd,2007).

### **24 saatlik idrar bakır atılımı**

Wilson hastalığının tanısı için idrar bakır konsantrasyonunun 100 µg/24 saat (>1,6µmol/24saat)'den yüksek olması gerekir. Semptomatik hastaların çoğunda bu seviyeye ulaşılır fakat asemptomatik hastalardaki 40-100µg seviyesi hastalığın olmadığı anlamına gelmez ve daha ileri testlerin yapılması gerekir. Heterozigot olan bir bireyin idrar bakır seviyesi nadiren 70 µg/24 saatin üstüne çıkar. Birincil safra sirozu, birincil skleroz şolangit, alegil sendromu ve otoimmün hepatit gibi diğer kronik karaciğer hastalıklarında da yüksek idrar bakır seviyesi görülmesi, bu metodun kullanılabilirliğini sınırlayan bir gerçektir. 24 saatlik idrar toplamada dikkatsiz davranma ve bakır kontaminasyonuna yol açma, idrar bakır atılım seviyesinin yanlış hesaplanmasına yol açar. Civa oksit (stabilür) gibi rutin analizde kullanılan koruyucular, bütün metal testlerinde karışıklığa yol açabilir (Medici vd,2007).

Penisilamin verilerek idrar bakır atılımını test etme kullanışlıdır ama bu yalnızca pediyatrik populasyonlarda standardize edilmiştir ve heterozigot olan Wilson hastalığı taşıyıcılarında geçerliliği onaylanmamıştır. Bu testte ilk olarak idrar toplamanın başında ve 12 saat sonra iki defa 500 mg penisilamin verilir. Eğer son idrar bakır konsantrasyonu 1600 µg/24 saatten büyükse, o zaman otoimmün kronik aktif hepatit, primer skleroz şolangit ve akut karaciğer bozukluğu gibi diğer karaciğer hastalıklar göz önüne alınmaz ve Wilson hastalığının tanısı büyük olasılıkla kesinleşir (Medici vd,2007).

## **Karaciğer bakır konsantrasyonu**

Hemen hemen bütün hastalarda karaciğer bakır konsantrasyonu 250 µg/g kuru ağırlıktan fazla (normal olarak < 50 µg/g kuru ağırlık ) ve hatta 3000 µg/g kuru ağırlık kadar yüksek olur. Şiddetli siroz hastalarında karaciğer parankimasındaki heterojen bakır dağılımından dolayı, karaciğer bakır seviyesi 250 µg/g kuru ağırlığın altında olur. Genellikle nöropsikiyatrik semptomları olan Wilson hastalarının %20'sinde, karaciğer bakır konsantrasyonu 250 µg/g kuru ağırlığın altındadır. Karaciğer bakır seviyesindeki farklar, kötü örnek alma ve sadece tekli bakır seviyesi test etmeden doğan düşük güvenilirlikten de kaynaklanabilir. Karaciğerde bakır seviyesini tespit eden histokimyasal metodlar güvenilir değildirler (Medici vd,2007).

## **Serum bakır konsantrasyonu**

Wilson hastalığının tanısında kullanılan diğer bir metot, serüloplazmine bağlı olmayan yani plazma dışı bakır konsantrasyonunun ölçümüdür. Bu plazmadaki total serüloplazmin ve bakır konsantrasyonunun ölçülmesinin ardından hesaplanır. Serüloplazmine bağlı bakır miktarı, serüloplazminin yaklaşık 3,15 µg/mg'ı kadar olduğu için serum dışı bakır konsantrasyonu, serum bakır konsantrasyonu (µg/dl) ile serüloplazmin konsantrasyonunun (mg/dl) üç katı arasındaki farkı alınarak hesaplanır. Tedavi uygulanmayan çoğu hastada, serum dışı bakır konsantrasyonu 25 µg/dl'den yüksektir. Normal değer 15 µg/dl'den küçüktür. Akut karaciğer bozukluğu ve kronik şolestas olan hastalarda bu değer, normal değerden daha yüksek olabilir. Bu testin geçerliliği serüloplazminin ne kadar iyi ölçüldüğüne bağlı olup, enzimatik metot tavsiye edilir ama kesin kabul görmüş değildir. Bu test, bir tanısal araç olmaktan çok, hastaların izlenmesi ve tedaviye tepkilerinin değerlendirilmesinde kullanılır (Medici vd,2007).

## **Serüloplazmin konsantrasyonu**

Serüloplazmin, bakır taşıyan bir protein olup, normal bireylerde dolaşımdaki bakırın %90'nını bağlar. Normal serüloplazmin konsantrasyonu 200-400 mg/l olup, eğer 200 mg/l (20 mg/dl)'nin altındaysa Wilson hastalığı tanısı önerilir. Bu

ölçümün klinik kullanımı sınırlıdır, çünkü normal kontrollerin %1'i ve Wilson heterozigot taşıyıcılarda, bakır yetersizliği olan hastalarda, Menkes hastalığında, kalıtsal hiposerüloplazminemiya, kötü emilim, nefrotik sendrom ve kronik karaciğer bozukluklarının %10'unda serüloplazmin konsantrasyonu 200 mg/l'nin altındadır. Ayrıca Wilson hastalarının %20'sinde normal serüloplazmin konsantrasyonu değeri bulunmuştur. Özellikle karaciğer hastalarında, serum serüloplazmin konsantrasyonunu belirlemede, immünojenik-nefelometrik metodun, enzimatik metotla (oksidaz aktivitesi) karşılaştırılabileceği tartışmalıdır. Enzimatik aktivite biyolojik bir parametredir ama immünonefelometrik metot, hem serüloplazmin, hemde biyolojik olarak inaktif apo formunu ölçer. Enzimatik metot Wilson hastalığının tanısında tercih edilir ama farklı seviyelerde karaciğer bozukluğu olan hastalarda, serüloplazmin protein konsantrasyonu, oksidaz aktivitesi arasında zayıf bir korelasyon bulunmuştur. İki testin beraber yapılması, tanıda oldukça kullanışlıdır, çünkü testler arasında iyi bir korelasyon vardır (Medici vd,2007).

### **Kayser-Fleischer Halkaları**

Bu halkaların varlığı, serbest bakırın dolaşıma salındığının bir göstergesidir. Diğer oftalmolojik bulgular arasında, ayçiçeği kataraktı vardır (Medici vd,2007).

### **Genetik Test**

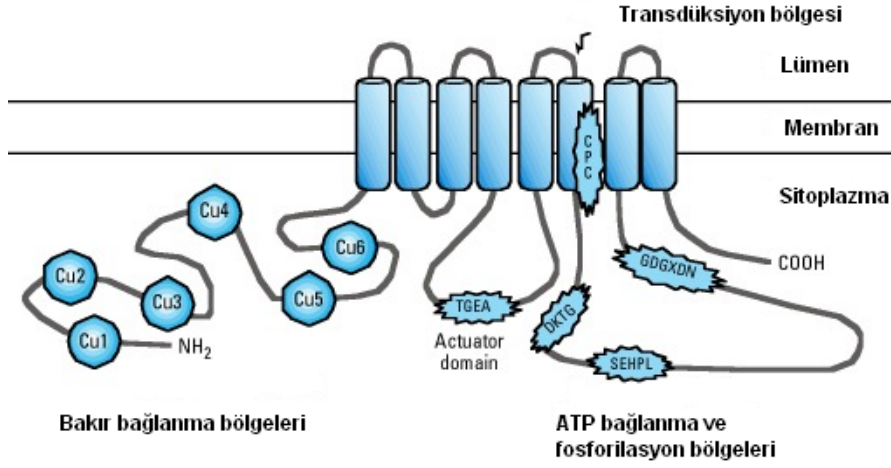
Wilson hastalarındaki biyokimyasal ve klinik özelliklerdeki çeşitlilik, mutasyon ve polimorfizm analizini gerekli kılmıştır. Bugüne kadar yaklaşık üç yüz *ATP7B* gen mutasyonu ve yüzlerce polimorfizm tanımlanmıştır. Wilson hastalığından sorumlu bir mutasyon tespit edildiğinde, durum onaylanmış olur fakat, mutasyon bulunmaması, klinik semptomların olması durumunda hastalığın tanısını değiştirmez. Ayrıca çoğu laboratuvar bütün geni ve promotor bölgeyi de sekanslamaktadırlar. Bazı ırklarda bulunan yaygın mutasyonlar vardır: Mesela Doğu Avrupa'da H1069Q, Sardinya'da c-441\_427del15, Kore'de R778L, İzlanda'da 2007del7, Japonya'da 229insC ve R778L, İspanya'da M645R ve Çin'de R778L. Bu bölgelerde yaygın mutasyonların analizi faydalı bir tanı metodudur (Medici vd,2007).

## 2.4. Wilson hastalığından sorumlu ATP7B geninin özellikleri

### Yapısal özellikler

*ATP7B* geni yirmi bir ekzon içerir ve yaklaşık 7,5 kilobaz büyüklüğünde bir transkript eksprese ederek, 1,465 amino asitten oluşan ATP7B proteinini kodlar. Bu protein insanda öncelikli olarak karaciğer, böbrek ve plasentada eksprese olur (Tanzi vd,1993; Bull vd,1993; Petrukhin vd,1994). Bu genin alternatif olarak kırılan formları beyin, böbrek ve plasentada belirlenmiştir (Petrukhin vd,1994). Elde edilen protein dizisine dayanarak, ATP7B proteininin bakır geçişi yapan bir P tipi ATPaz olduğu bulunmuştur. P tip ATPaz'lar, ATP'nin  $\gamma$ -fosfatını proteinin bir aspartik asit rezidüsüne transfer ederek, kendi reaksiyon döngüsünde kovalent bir fosforile ara form oluştururlar ve hücre membranı boyunca çeşitli katyonların taşınmasına yardımcı olurlar (Pedersen ve Carafoli,1987).

ATP7B proteininin de içinde yer aldığı P tipi ATPaz'ların genel özellikleri aşağıdaki gibidir: TGEA motifi (fosfataz domeyni), DKTGT motifi (fosforilasyon domeyni), TGDN motifi (ATP bağlama domeyni) ve ATP bağlama domeynini, transmembran segmentine bağlayan MXGDGXNDXP sekansı. ATP7B proteini, ağır metal geçişi sağlayan bir P tipi ATPaz olup, molekülün amino ucunda altı metal bağlayıcı GMTCXXC motifi, membran içi bölgede CPC motifi, SEHPL motifi ve sekiz transmembran segmenti içerir (Lutsenko ve Kaplan,1995; Solioz ve Vulpe,1996). GMTCXXC motifi, metal bağlayıcı domeynin içinde yer alıp, bakteriyel bakır geçişi sağlayan P tipi ATPaz'lara homoloji gösterir. ATP7B'nin metal bağlayıcı motifi bakıra özgüdür. Stokiyometrik analiz, her bir metal bağlayıcı domeyne bir molekül bakır bağlandığını göstermiştir (Lutsenko vd,1997). Menkes hastalığından sorumlu diğer bir memeli P tipi ATPaz olan ATP7A proteininin amino ucundaki bakır geçişinden sorumlu metal bağlama motifi, ATP7B proteininin aynı motifiyle %65 homoloji gösterir (Payne ve Gitlin,1998). Ağır metal transport eden ATPaz'ların, CPC ve SEHPL motifleri membran boyunca metal geçişini sağlar. CPC bölgesindeki mutasyon, bu proteinin metal geçişini inhibe eder (Hung vd,1997). Bu protein sınıfı P<sub>1</sub>-ATPaz'lar veya CPx-tip ATPaz'lar olarak adlandırılır (Lutsenko ve Kaplan,1995; Solioz ve Vulpe,1996).



Şekil 2.1 ATP7B proteininin fonksiyonel bölgeleri (Google görseller,2010)

Çizelge 2.4 Ekzonik dizilere göre ATP7B proteininin bölgeleri (Wilson veritabanı,2010).

Ekzon	Domeyn
1	Cu1 öncesi
2	Cu1 öncesi, Cu1, Cu1/Cu2 ara bölgesi, Cu2, Cu2/Cu3 ara bölgesi, Cu3, Cu3/Cu4 ara bölgesi, Cu4
3	Cu4/Cu5 ara bölgesi , Cu5
4	Cu5, Cu6
5	Cu6
6	Cu6, Cu6/TM1 ara bölgesi
7	Cu6/TM1 ara bölgesi, TM1, TM1/TM2 ara bölgesi, TM2
8	TM2, TM2/TM3 ara bölgesi, TM3, TM3/TM4 ara bölgesi, TM4
9	TM4/Td ara bölgesi
10	TM4/Td ara bölgesi, TM4/Td, TM4/Td ara bölgesi, Td
11	Td, Td/TM5 ara bölgesi
12	Td/TM5 ara bölgesi, TM5, TM5/TM6 ara bölgesi
13	TM5/TM6 ara bölgesi, TM6, TM6/Ph ara bölgesi
14	Ph, ATP loop
15	ATP loop
16	ATP loop
17	ATP loop, ATP bağlanma
18	ATP bağlanma, ATP hinge, ATP hinge/TM7 ara bölgesi
19	ATP hinge/TM7 ara bölgesi, TM7
20	TM7, TM8
21	TM8 sonrası, 3'COOH

## **ATP7B proteininin moleküler mimarisi ve enzimatik özellikleri**

ATP7B proteini, mimarisinde farklı fonksiyonel özellikleri olan büyük bir membran taşıyıcı proteindir. ATP7B proteini ATP'ye bağlanır ve onu hidrolize eder. Bakır, proteine bağlanarak bu reaksiyonu uyarır (Tsivkovskii vd,2001). ATP hidrolizi sırasında ortaya çıkan enerji, protein içinde konformasyonel değişikliklere yol açıp, membranın zıt tarafında tutulan bakırın serbest bırakılmasına yol açar. ATP7B'nin yapısında beş fonksiyonel domeyn tanımlanmıştır (Çizelge 2.4). Transmembran domeyni sekiz transmembran segmentinden (TMS) oluşmuş olup, bakır geçiş yolunu oluşturur. TMS6, karakteristik CPC motifini içerip C rezidüsünün metal geçişi sırasında bakır koordinasyonunu sağladığı düşünülmektedir. Bakteriyel homologuna bakılarak, TMS7 ve TMS8'de de bu koordinasyonu sağlayan rezidülerin varlığı düşünülmektedir (Forbes ve Cox,1998; Mandal vd,2004; Voskoboinik vd,2001).

Sitozolik amino ucu domeyni ( N-ATP7B ), altı metal bağlanma bölgesine sahiptir (MBB) ve bakır şaperonu olan Atox1'den bakır alır (Walker vd,2002; Larin vd,1999). Amino ucundaki MBB'ler dizi ve yapı olarak benzer olup, korunmuş GMT/HCxxC dizisindeki sistein yoluyla bir bakır molekülü bağlar (Arnesano vd,2002; DiDonato vd,2000; Ralle vd,2004). MBB'lere bakırların bağlanması, düzenli bir şekilde sırayla olur. Tek bir MBB içindeki yapısal değişiklikler, bütün N-ATP7B'nin konformasyonel transisyona uğramasına yol açar (DiDonato vd,2000; Walker vd,2004). Hücre zarına en yakın olan MBB5 ve MBB6 transportta gerekli olup, daha distal MBB'ler düzenleyici roller üstlenmiştir. Bakırın MBB5 ve MBB6'ya bağlanması katalitik aktiviteyi azaltırken, bu domeynlerin delesyonu, interaksiyonu bozar ve katalizi hızlandırır (Huster ve Lutsenko,2003; Cater vd,2004; Guo vd,2005; Achila vd,2006; Tsivkovskii vd,2002; Tao vd,2003).

Amino ucu domeyni bakırla uyarıldığında, yeniden lokalizasyon sırasında, ATP7B'nin uygun hücre içi bölgesine yönlendirilmesinde ve protein aktivitesi ve trafiğinin düzenlenmesinde de görev alır. Amino ucu domeyni, çeşitli proteinlerle etkileşim bölgesidir. Bu proteinler şunlardır: Bakır şaperonu Atox1, Murr1/Commd1, dinaktin alt ünitesi olan p62 ve glutaredoksin. Bu

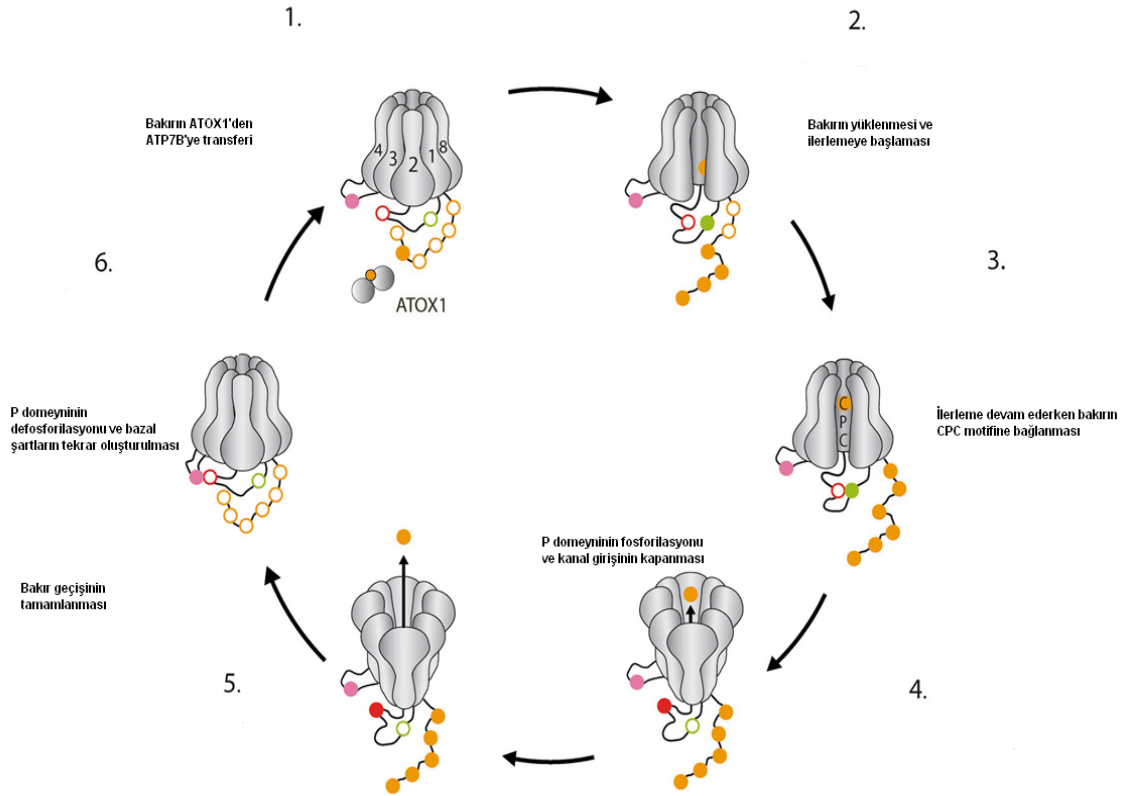
interaksiyonların çoğunun fonksiyonel sonuçları halen karakterize edilmemesine karşın, interaksyona giren proteinlerin çeşitliliği, amino ucu domeyni aracılı düzenleme işleminin karmaşıklığını vurgular (Guo vd,2005; Tao vd,2003; Lim vd,2006a; Lim vd,2006b; Mee ve Lutsenko,2007).

ATP bağlama domeyni, ATP7B'nin aktivitesinde merkezi konumdadır. ATP hidrolizindeki enerjiyi toplayarak, bakırın ATP7B tarafından membrandan geçirilmesinde yakıt olarak kullanır. ATP7B proteini, ATP hidrolizi sırasında geçici fosforlanmış bir açıl ara ürünü oluşturur. Fosforlanmış D1027 rezidüsü, ATP bağlama domeyni (ABD) içinde yer alır ve bir P tipi ATPaz ailesi imza dizisi olan DKTG motifine aittir. ABD, iki parçaya ayrılır: 1- Fosforilasyon domeyni (P-domeyni): D1027'ye sahiptir ve yapısal olarak bakır geçişi yapan ATPaz'lar da dahil, bütün P tipi ATPaz'larda aynıdır. 2- Nükleotit bağlama domeyni (N-domeyni). ATP varlığında ATP7B'nin N-domeyninin yapısı çok boyutlu NMR ile yüksek çözünürlükte çözüldü. Bu domeynde yerleşmiş hastalığa sebep olan farklı mutasyonların analizinde yapısal bir çerçeve sağladı. N-domeyndeki beş rezidü, bütün bakır geçişi sağlayan ATPaz'larda korunmuştur. ATP7B'deki bu beş rezidü şunlardır: E1064, H1069, G1099, G1101 ve G1149. Bu rezidüler ve az korunmuş N1150 rezidüsü ATP bağlama bölgesini oluşturur (Toyoshima ve Mizutani,2004; Sazinky vd,2006; Dmitriev vd,2006).

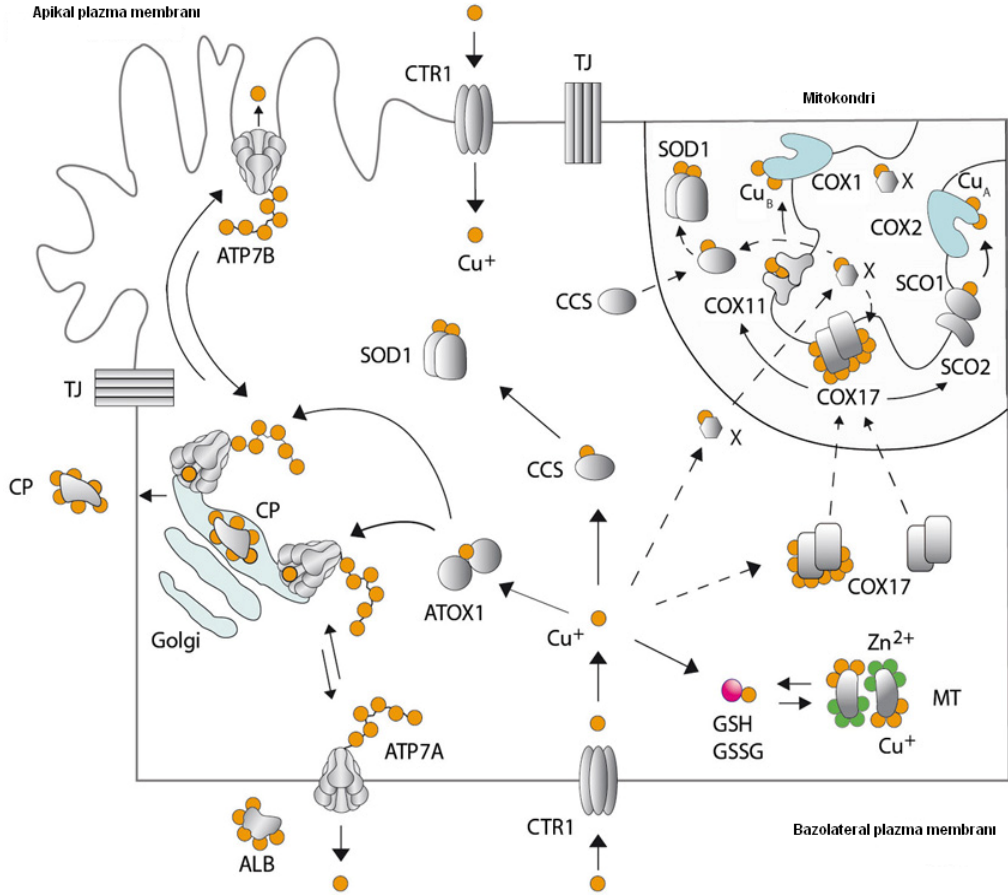
ATP7B'nin diğer iki sitozolik domeyni için aşağıdaki yapısal bilgiler vardır. A-domeyni TMS5 ve TMS6 arasında yerleşmiş olup, değişmeyen TGE sekansı içerir. Bakteriyel termofilik bakır geçişi yapan ATPaz CopA'nın A-domeyninin yeni aydınlatılan yapısı, bu domeynin yapısal olarak  $Ca^{2+}$ -ATPaz'ın A-domeynine çok benzer olduğunu göstermektedir.  $Ca^{2+}$ -ATPaz ve diğer P tipi ATPaz'lardaki A-domeyni, korunmuş TGE motifinin merkezi rol oynadığı katalitik ara ürünün defosforilasyonu işleminde esastır. A-domeyni, ATP7B proteininin transmembran ve sitozolik kısımlarında, konformasyonel değişiklikleri koordine ederek, kataliz olayı sırasında önemli hareketler yapar. ATP7B'nin A-domeyni, bakır bağımlı protein-protein interaksyonu yoluyla, amino ucundaki MBB5 ve MBB6 ile transmembran kısmı arasında karşılıklı iletişimi sağlar. A-domeyni öncelikle MBB5 ve/veya MBB6 ile interaksyona girer ve ardından bakırın MBB5 ve/veya MBB6'ya bağlanmasıyla A-domeyninin hareketlerini değiştirir. Bu olay proteinin

transmembran kısmında, konformasyonel değişikliklere yol açar. Bu durum ATP7B'nin MBB6 veya MBB1-5 bölgesindeki C>A mutasyonlarının, bakırın proteinin membran içi bölgelerine bağlanma afinitesini etkilemesiyle ispatlanmıştır (Anthonisen vd,2006; Toyoshima ve Inesi,2004; Moller vd,2005).

ATP7B'nin karboksil ucu katalitik fonksiyon için gerekli olmamasına karşın, protein stabilitesi ve ATP7B'nin hücre içi lokalizasyonunun düzenlenmesinde görev alır. Karboksil ucundaki L1454LL1456 sekansı, ATP7B'nin bazal medyumdaki TGN (Trans golgi ağı) lokalizasyonu için önemli olup, kullanılan ATP7B'lerin tekrar TGN'ye geri götürülmesi ve orada tutulmasında önemli bir rol oynar (Paulsen vd,2006; Majumdar vd,2000; Hsi vd,2004; Cater vd,2006).



Şekil 2.2 ATP7B proteininin bakır döngüsü (Google görseller,2010)



Şekil 2.3 Bakırın hücre içi trafiği (Google görseller,2010)

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Mikroarray Tabanlı Yeniden Dizileme (Microarray Resequencing) Çipinin Tasarlanması

Bu tez çalışması kapsamında, on kalıtsal metabolik hastalık için (Fenilketonuri, fruktoz 1-6 difosfataz eksikliği, galaktozemi, glutarik asidüri tip I, herediter fruktoz intoleransı, “Maple Syrup Urine” hastalığı, metilmalonik asidemi, propiyonik asidemi, tirozinemi tip I, Wilson hastalığı) geliştirilen mikroarray sistemi kullanılarak, Wilson hastalarında moleküler patoloji profillerinin hızlı, ekonomik ve yüksek hassasiyet ile belirlenmesi hedeflenmiştir (Özgül vd,2008a, Özgül vd,2008b, Özgül vd,2008c).

Tasarımı Hacettepe Üniversitesi, Metabolizma ünitesinde gerçekleştirilen ve mutasyon taramalarında kullanılan DNA çipi ile on farklı kalıtsal metabolik hastalıktan sorumlu toplam on dört genin tüm DNA dizi analizi, tek bir “DNA microarray resequencing” çip kullanımı ile aynı anda sonuçlandırılabilir. DNA çip maskesinin teorik tasarımı tamamen bu metabolik hastalıklar için özgün olup *ALDOB*, *ATP7B*, *BCKDHA*, *BCKDHB*, *DBT*, *DLD*, *FAH*, *FBP1*, *GALT*, *GCDH*, *MUT*, *PAH*, *PCCA*, *PCCB* gen dizilerini içermektedir (Çizelge 3.1) (Özgül vd,2008a, Özgül vd,2008b, Özgül vd,2008c).

Çizelge 3.1 DNA çipinde (TR\_06\_01r520489) mutasyon taraması yapılan kalıtsal metabolik hastalıklar ve bu hastalıklardan sorumlu genler

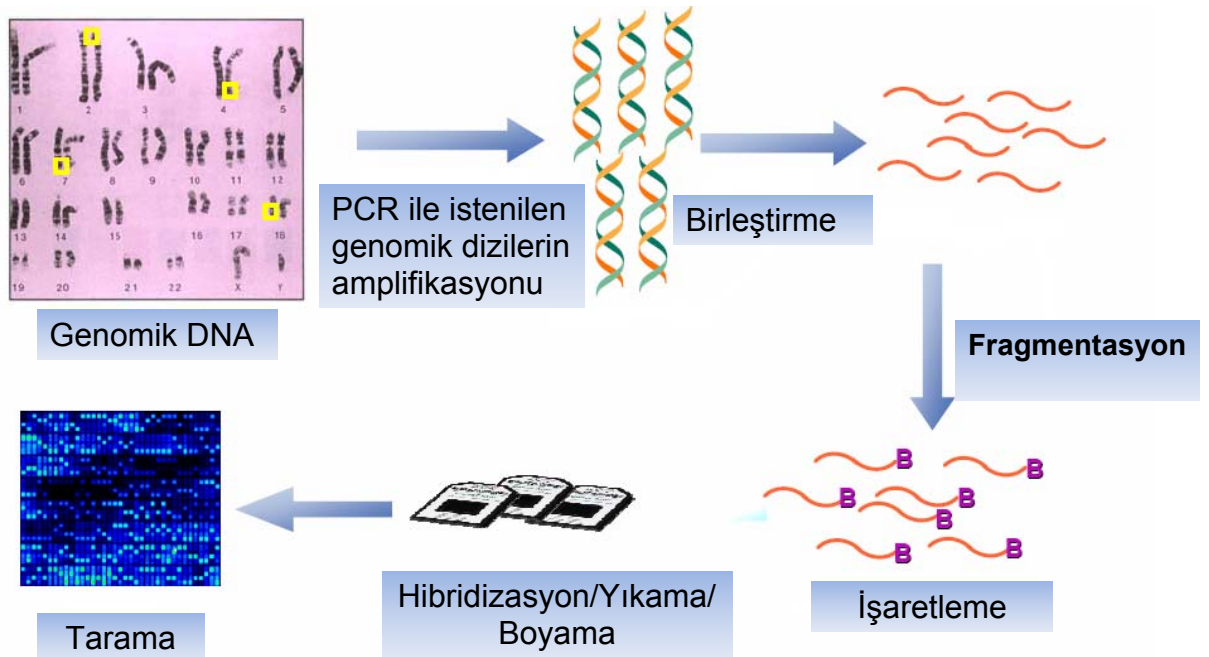
	Hastalık ismi	DNA çipi üzerinde yer alan genler
1	MSUD	<i>BCKDHA</i> , <i>BCKDHB</i> , <i>DBT</i> , <i>DLD</i>
2	Galaktozemi	<i>GALT</i>
3	Metilmalonik asidemi	<i>MUT</i>
4	Propiyonik asidemi	<i>PCCA</i> , <i>PCCB</i>
5	Herediter fruktoz intoleransı	<i>ALDOB</i>
6	Tirozinemi tip I	<i>FAH</i>
7	Fenilketonuri	<i>PAH</i>
8	Glutarik asidüri tip I	<i>GCDH</i>
9	Wilson hastalığı	<i>ATP7B</i>
10	Früktoz 1-6 difosfataz eksikliği	<i>FBP1</i>
Toplam	10 hastalık	14 gen

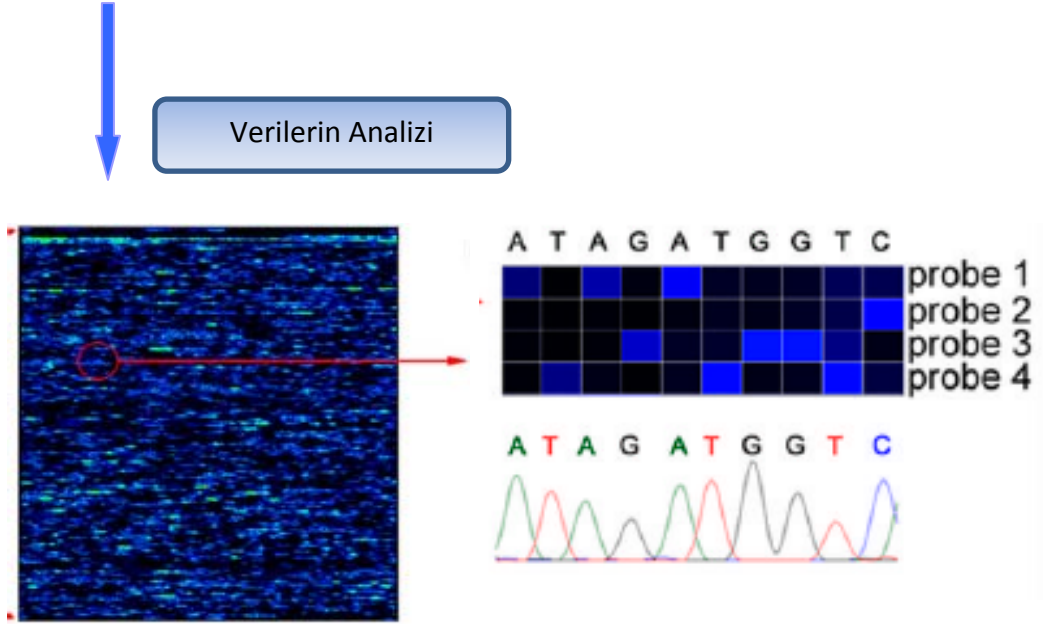


Bu çip kullanılarak on dört farklı genin toplam 50,000 nükleotit uzunluğunda olan referans genomik dizilerinin basılı olduğu tek bir çipte dizi analizinin yapılması mümkündür. "TR-06-01r520489" olarak kodlandırılan çip özgün tasarıma sahip olup, kalıtsal metabolik hastalıklar konusunda literatürde geliştirilen ilk mikroarray tabanlı DNA yeniden dizileme çipidir. On dört ayrı gene ait DNA dizi analizi tek bir array platformunda, mikroarray üzerine yerleştirilen her bir nükleotidin tüm allelik varyasyonları saptanacak şekilde yapılabilmektedir.

### DNA Çip Maskesinin Özellikleri

Kullanılan çip üzerinde basılı olan referans gen dizileri uygun sıralamada on dört genin her bir ekzonu, yirmi beş baz çiftlik ekzon-intron bağlantı bölgeleri ve toplam 50,000 baz çift uzunlukta olacak şekilde genomik dizi veri tabanlarından karşılaştırılarak seçilen dizilerden oluşmaktadır. Genom dizi organizasyonu bozulmadan birbirine ardışık olacak şekilde, protein kodlayan ve kodlayıcı olmayan gen dizileri için referans dizilerin çip platformuna yerleştirilmesi ile çipler basıldı. Seçilen ampliconların çipte yer alan diğer gen dizileri ile homoloji araştırması yapıldı. Aşağıda deney basamakları kısaca verilmiştir.





Şekil 3.1 DNA Yeniden Dizileme Çipi Deney Basamakları

### 3.2. Bireyler

Bu tez çalışmasına Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Bölümünde son on bir yıldır Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden başvuran ve klinik olarak izlenmekte olan kırk Wilson hastası dahil edilmiştir. Yaygın mutasyonlar bulunduğundan sonra, yeni tanı alan on dört ilave hastaya otomatik DNA dizi analizi uygulanarak, yaygın mutasyonlar için iki ekzonun DNA dizi analizi yapılmıştır.

### 3.3. DNA İzolasyonu

Tüm hastalara ve aile bireyelerine ait kan örnekleri alınarak, genomik DNA izolasyonu yapılmış ve hasta bilgileri arşivlenerek, biyolojik örnekler -20/-80 derece derin dondurucularda saklanmıştır.

#### DNA İzolasyonunda Kullanılan Malzemeler

- a- Liziz tamponu (pH 8.2) : 10mM TrisHCL (Merck), 400 mM NaCl (Merck), 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA (Merck)
- b- %10 Sodyum Dodesil Sülfat (pH 7.2) : 10 gr SDS, 100 ml dH<sub>2</sub>O
- c- Proteinaz K solüsyonu (10 mg/ml) (Qiagen)
- d- Doymuş Amonyum Asetat Solüsyonu : 74 gr Amonyum Asetat (Merck), 100 ml dH<sub>2</sub>O

## DNA İzolasyonu

Hastalardan EDTA'lı tüplere alınan yaklaşık 10 ml kan, soğuk distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. 2-3 dakika eritrositleri parçalamak için hızlıca çalkalandı ve 10 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atıldı. Pelet üzerine son hacim 25 ml olacak şekilde tekrar soğuk dH<sub>2</sub>O ilave edilerek 2-3 dakika çalkalandı ve tekrar 10 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra pelet yeterince temiz ise bir sonraki aşamaya geçildi, yeterince temiz değilse son basamak bir kere daha tekrar edildi. Peletin üzerine 3 ml liziz tamponu, 200 µl SDS, 200 µl proteinaz K ilave edilerek 1 gece 37<sup>0</sup>C'de etüvde bekletildi. Etüvden alınan örneklerin üzerine 2 ml amonyum asetat ilave edilerek 1 dakika çalkalandı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 15 dakika 3500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısım yeni tüplere alındı ve üzerlerine iki katı kadar hacimde soğuk %95'lik etanol ilave edildi. Tüpler hafifçe çalkalanarak DNA molekülünün toplanması sağlandı. Etanol içerisinde bulunan DNA yeni tüpe aktarıldı ve pelet miktarına göre 300-400 µl arası dH<sub>2</sub>O ilave edildi. DNA, çözünmesi için bir gün oda sıcaklığında bekletildi. NanoDrop® (NanoDrop Technologies, USA) ile DNA konsantrasyonları ölçüldü ve mikrolitresinde 50 ng olacak şekilde ileri analizler (PCR) için sulandırıldı. Elde edilen DNA, hem çip uygulamalarında uzun fragment PCR, hem de otomatik DNA dizi analizi uygulamalarında kısa fragment (short) PCR reaksiyonlarında kullanıldı.

## Primer Dizilerinin Seçimi ve PCR

Mutasyon taraması yapılacak olan *ATP7B* geni için öncelikli olarak, ilgili veri tabanlarından genomik dizilere ait bilgiler sağlandı ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), [www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas](http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas), [www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas](http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas), [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org), [www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu), [genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu))

Daha sonra "In silico PCR" ve otomatik primer tasarım programları (Oligo6 ve primer3) kullanılarak, *ATP7B* genine ait intron-ekzon birleşme bölgelerini de içerisine alacak şekilde intronik bölgelerden primer dizileri belirlendi.

DNA çiplerine yönelik olarak ekzonların tek tek çoğaltılması yerine, genomik dizide birbirine yakın olan genler 2-15 kilobaz uzunlukta olacak şekilde seçilerek, birden fazla ekzonun aynı anda amplifiye edilmesi sağlandı. Uzun gen bölgelerinin çoğaltılmasına yönelik LR-PCR primerleri seçilerek, bu primerlerin optimizasyonları tamamlandı. Bununla birlikte DNA dizi analizi için LR-PCR çalışmalarına alternatif olarak, ilgili ekzon bölgeleri için ekzonik PCR ile kısa fragmentler halinde amplifikasyonları gerçekleştirildi.

### 3.4. Uzun DNA Fragmentleri İçin PCR (Long Range PCR)

#### Reaksiyon Hacimleri:

Long-Range PCR protokolü 100 µl'lik reaksiyonlar için yazılmıştır ve 49-format çip (30/300 kilobaz)'ler için optimize edilmiştir (Çizelge 3.2, Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4).

Çizelge 3.2 Long Range PCR için kullanılan reaksiyon hacimleri

Kimyasallar	Array Formatı		
	49 (100 µl)	100 (50 µl)	169 (25 µl)
<u>PCR Reaksiyon Karışımı:</u>			
Su	33.0 µl	16.7 µl	8.4 µl
2.5 mM dNTP'ler	16.0 µl	8.0 µl	4.0 µl
10X LA-Taç Tamponu (+ Mg)	10.0 µl	5.0 µl	2.5 µl
LA-Taç Polimeraz	1.0 µl	0.3 µl	0.1 µl
Primer çifti (3 µM/primer/PCR reaksiyonu)	20.0 µL	10.0 µL	5.0 µl
Genomik DNA (5 ng/µl)	20.0 µl	10.0 µl	5.0 µl
<b>Toplam Hacim (Bir reaksiyon için)</b>	<b>100.0 µl</b>	<b>50.0 µl</b>	<b>25.0 µl</b>

Çizelge 3.3 Long PCR için kullanılan kimyasallar

Bileşik
10X LA PCR Tamponu II (Mg <sup>2+</sup> )
dNTP karışımı
LA Taç Polimeraz
Steril su
1X TE Tamponu, pH 8
% 99.9'luk DMSO

### Uzun DNA Fragmentleri İçin PCR Reaksiyonunun Kontrolü:

Her reaksiyondan 2-4 µl'lik örnek, %1'lik TBE agaroz jelde yürütüldü. İstenilen büyüklükteki bantların olup olmadığı moleküler belirteçle kontrol edildi.

### Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Malzemeler

a- 10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu (1 litre); 108 gr Tris (Merck), 55 gr Borik Asit (Merck), 7.4 gr EDTA (Merck)

b- Agaroz (Prona)

c- Yükleme tamponu : 5,5 ml gliserol (Merck), 4.5 ml dH<sub>2</sub>O, 0.01 gr orange G

d- Etidyum Bromüd : 10 mg Etidyum Bromüd (AppliChem), 1 ml dH<sub>2</sub>O

e- DNA için moleküler ağırlık belirleyicisi : 3.000-10.000 baz çifti DNA ladder (Fermentas)

Çizelge 3.4 Uzun fragment PCR'da kullanılan primerler ve amplikon (amp.) büyüklüğü (baz çifti).

ATP7B amp.	Ekzonlar	İleri primer	Geri primer	Amp. bç
1	1,2,3,4,5,6,7,8	TAAATGGGTAAAATTATAC ACTTCAGGAAT	AGACTATGTACGAAGAAAG GAACAGACTAT	10765
2	9,10,11,12	TATGATCTCATGGCTTTAAA TGCTATCTAC	TAATACTCAGTCAGCTTTGC TATTTACTTT	5921
3	13,14,15,16,17	AAGTACCATTGAAATATTT GGATACTTGAT	GTGTAAAGGTTAAGAAAAT AGACTCTGGAT	9270
4	18,19,20,21	ATGTATTTACTGGATTGAG CAATATCTTTT	CTATCACAAGCCCTTTTCTC TTAGAAT	8536

### 3.5. Kısa DNA Fragmentleri İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ( Short Range PCR )

#### Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Malzemeler

a- Taq DNA polimeraz tampon 10X (Fermentas)

b- MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Fermentas)

c- dNTP solüsyonu (10 mM) (GeneMark) : 2,5 mM dATP, 2,5 mM dTTP, 2,5 mM dGTP, 2,5 mM dCTP

d- Taq DNA polimeraz (5 u/µl) (Fermentas)

e- ATP7B genine özgül primerler (100 pmol/µl)

## “Short Range” Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu ile *ATP7B* geninin yirmi bir ekzonu ayrı ayrı çoğaltıldı. PCR reaksiyonu üç basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamak genomik DNA'nın denatürasyonu, ikinci basamak özgül primerlerin bağlanması ve üçüncü basamak ise sentez reaksiyonudur. PCR reaksiyonuna ait protokol Çizelge 3.5'de özetlenmiştir. *ATP7B* geninin PCR reaksiyonunda kullanılan primerler, Primerdesign3 (v.0.4) programıyla tasarlandı (Çizelge 3.6).

PCR koşulları : 94<sup>0</sup>C'de 3 dakika  
94<sup>0</sup>C'de 30 saniye  
55<sup>0</sup>C'de 30 saniye  
72<sup>0</sup>C'de 30 saniye  
72<sup>0</sup>C'de 5 dakika  
32 döngü olacak şekilde.

Çizelge 3.5 PCR reaksiyonu protokolü

STOK		Son Konsantrasyon
10X Taq polimeraz tamponu	2,5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5 µl	1.5 mM
dNTP 10 mM	2 µl	her birinden 0.8 mM
İleri primer 100 pmol/µl	0.3 µl	1.2 pmol
Geri primer 100 pmol/µl	0.3 µl	1.2 pmol
Genomik DNA 50 ng/µl	1 µl	50 ng
Taq DNA polimeraz (5 u/µl)	0.1 µl	0.5 u
dH <sub>2</sub> O		17.4 µl

Çizelge 3.6 Short PCR için *ATP7B* genine ait primer dizileri ve ampikon büyüklüğü

Ekzon	İleri primer	Geri primer	Sentez ( °C )	Amp. (bp)
2A	GTTTCAAGGTTAAAAAATGT	GGCACATATTTACAGTGG	57	298
2B	GGCCACCAGCACAGTC	CTGGGCAGGCAAGGAC	59,60	253
2C	GAGGCCAGCATTGCAGA	AGCCACTTTGCTCTTGATG	57,58	282
2D	ATGACATGGGATTTGAAG	TCCATCAGGAAGAGAAAC	56,57,58	386
2E	GCCCAAGTAAAGTATGACCC	GACACCGATATTTGCTGCAC	57,58	290
2F	GGCACATGCAGTACCACTCT	AGGGCTCACCTATACCACCATCC	57,58	308
3	GAATATTTTCTGACATTTTATCC	GCAGCATTCTAAGTTCA	55	323
4	CCACCCAGAGTGTTACAGCC	ACCCCGTAACGCACCCA	55	229
5	CCTGGGTCTGTGGGATTCT	AAAGGTGACTACAATTTTTAATGA	55	233
6	CTGCCAATGCATATTTAAC	GGTAGAGGAAGGGACTTAGA	55,56	199
7	TGTAATCCAGGTGACAAGCAG	CACAGCATGGAAGGGAGAG	57	276
8	CAGCCTTCACTGTCCTTGTC	GAGCAGCTCTTTTCTGAAC	55,56,58	295
9	TTTCGATAGCTCTCATTTCACA	TGCCACACTCACAAGGTC	55	241
10	AGTGGCCATGTGAGTGATAA	CTGAGGGAACATGAAACAA	55,56	193
11	CTGTCAGGTACATGAGTGCT	TTTCCAGAACTCTTCACA	55	290
12	CTTGTGGTGTTTTATTCTT	ACCACCATATAGCCCAAG	55	230
13	TGAACTCTCAACCTGCCT	TCTCAGGATGGGGAAAGCCG	55-62	268
14	TCCATCTGTATTGTGGTCAG	CAGCTAGGAGAGAAGGACAT	55	303
15	CTTCACTTCACCCCTCT	AGCTGCAGAGACAAAAGC	58,60	254
16	CCATTTAGAAATAACCACAG	AGGAAGGCAGAAGCAGA	60	201
17	CAAGTGTGGTATCTTGGTG	CTGGTGCTTACTTTTGTCTC	55	280
18	ACCTTTTGCCAACACTAGGCAT	TCCAGCACCCACAGCC	55	281
19	GGCAGACCCCTTCTCAC	CCTGGGAGACAGAAGCCTTT	55	215
20	CTAGGTGTGAGTGCGAGTT	CAGCATTTGTCCAGGT	55	253
21	AATGGCTCAGATGCTGTT	GCTTGTGGTGAGTGGAGG	55,59	361

#### Kısa DNA Fragment PCR Reaksiyonunun Kontrolü:

ATP7B geninin short PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi.

### 3.6. DNA Dizi Analizi

Microarray DNA çip sonuçlarından elde edilen mutasyonlar, ekzonların DNA dizi analizi ile nükleotit seviyesinde okunarak mutasyonlar onaylandı.

#### Kısa DNA Fragment PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu

PCR ürünleri, ortamdaki kullanılmamış dNTP'lerden ve primerlerden temizlenmesi için MinElute 96 UF Plate (Qiagen) kullanılarak pürifiye edildi. Örnekler 96 kuyucuklu örnek kabına yüklenerek, 10 dakika vakum pompasında (KnFlab) 800 mbar'da vakumlandı. Süre sonunda 30 µl dH<sub>2</sub>O ilave edilerek, tekrar 10 dakika 800 mbar'da vakumlandı. Örneklerin üzerine 30 µl su ilave edilerek, PCR ürünlerinin çözünmesi için 10 dakika yavaşça çalkalandıktan sonra örnekler toplandı.

#### DNA Dizi Analizi Reaksiyonu

DNA dizi analizi reaksiyon protokolü Çizelge 3.7'de gösterildi.

DNA dizileme reaksiyonu koşulları : 96<sup>0</sup>C'de 1 dakika

96<sup>0</sup>C'de 10 saniye

50<sup>0</sup>C'de 5 saniye

60<sup>0</sup>C'de 4 dakika

25 döngü olacak şekilde.

Çizelge 3.7 DNA dizi analizi reaksiyon protokolü

BigDye® Terminator v3.1	2 µl
5 X sekans tamponu	4 µl
PCR ürünü	2 µl
İleri veya geri primer (5 pmol/µl)	0.7 µl
dH <sub>2</sub> O	11.3 µl

#### Dizileme Reaksiyonu Sonrası Pürifikasyon

Dizileme reaksiyonu sonrasında, reaksiyona girmemiş olan floresan işaretli nükleotitleri ve primerleri uzaklaştırmak amacıyla pürifikasyon yapıldı. Her örneğe 2 µl 3M amonyum asetat ve 50 µl %95'lik etanol eklendi ve 20 dakika -20<sup>0</sup>C'de bekletildi. Bu süre sonunda örnekler 20 dakika süreyle 13,000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tekrar süpernatant kısım atılarak, kalan etanolün uçması için 70<sup>0</sup>C'de bekletildi. Örnekler 25 µl dH<sub>2</sub>O'da çözüldükten sonra, 95<sup>0</sup>C'de 5

dakika denatüre edildi ve daha sonra ABI 3130 otomatik DNA dizi analiz cihazına yüklendi.

### 3.7. PCR Ürünlerinin Miktar Tayini ve Birleştirilmesi

Bu aşamada çip uygulaması için uzun DNA fragmentli PCR ürünleri kullanıldı. PCR reaksiyonunun verimliliği örnekler arasında çeşitlilik gösterir. Deney performansı, ampikon konsantrasyonunun hibridizasyon sırasında 10 katına kadar farklılığını tolere eder. Dolayısıyla tek bir hibridizasyondan maksimum miktarda sekans bilgisi elde etmek için, her PCR reaksiyonundan benzer miktarlar DNA çipine uygulanmalıdır.

### PCR Ürünlerinin Birleştirilme Çizelgesi

Aşağıdaki tablo kullanılarak farklı baz çifti için birleştirilecek nanogram miktarda PCR ürünleri eşleştirildi (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8 Ampikon büyüklüğüne göre birleştirme için alınacak ürün miktarları

Hesaplama Biçimi	Ampikonun büyüklüğü ( baz çifti )	Absorbsiyon Spektrofotometre Metodu
Metoda ait çalışma kitapçığı kullanılarak otomatik olarak hesaplanan değerler	1,000	36.3 ng
	2,000	72.6 ng
	3,000	108.9 ng
	4,000	145.2 ng
	5,000	181.5 ng
	6,000	217.8 ng
	7,000	254.1 ng
	8,000	290.4 ng
	9,000	326.7 ng
	10,000	363.0 ng

### 3.8. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu

- 1- Vakum manifoldunun üstüne bir temizleme pleyti yerleştirildi.
- 2- Her bir ampikon veya havuzlanmış örnek temizleme pleytinin bir kuyusuna transfer edildi.
- 3- 600 mbar'lık bir vakumda, kuyucuklar tamamen kuruyuncaya kadar tutuldu.

4- PCR ürünlerini 50 µl distile suyla yıkayıp, kuyucuklar tamamen kurutuldu (yaklaşık 20 dakika). Yıkama bir kez daha tekrarlandı. Temizleme pleyti vakum aletinden dikkatlice çıkarıldı.

5- Temizleme pleyti temiz bir emici kağıt destesinin üzerine hafifçe vurulup, pleytin altında kalması muhtemel sıvı uzaklaştırıldı.

### 3.9. PCR Ürünlerinin Elüsyonu

1- Herbir kuyucuğa 50 µl RB tamponu veya distile su eklendi.

2- Temizleme pleyti bir pleyt çalkalayıcı üzerinde, 1,000 rpm'de oda sıcaklığında 10 dakika orta derecede karıştırıldı.

3- Bir seferde bir kuyucuk çalışacak şekilde her bir kuyucuktan eluat'ı pipetleyip, 96 kuyucuklu pleytin ait olduğu kuyucuğuna transfer edildi.

### 3.10. Fragmentasyon

Fragmentasyon reaksiyonu enzimatik bir reaksiyon olup zamana ve sıcaklığa duyarlıdır. Bundan dolayı bu reaksiyonun şartlarını kesin bir şekilde gözlemek gerekir. Fragmentasyon için kullanılan kimyasallar Çizelge 3.9'da gösterildi.

Çizelge 3.9 Fragmentasyon için kullanılan kimyasallar

Kimyasallar
Fragmentasyon çözeltisi
10X Fragmentasyon tamponu
RB tamponu
%20 TBE jel
DNA belirteci (50-2,500 baz çifti)
EtBr

### Fragmentasyon Çözeltisinin Aktivitesinin Doğrulanması

Deneydeki bütün PCR ürünlerini fragmente etmeden önce, fragmentasyon reaksiyonu bir kontrol örnekle test edildi. Mevcut olan farklı PCR ve pürifikasyon şartları için fragmentasyon şartlarını optimize etmede, küçük bir fragmentasyon çözeltisi titrasyon aralığı (örneğin, 0.010, 0.015, 0.020, 0.025, 0.030 U/µg) uygulandı.

## Birleştirilen PCR Ürünlerinin Seyreltilmesi ve Miktar Tayini

Aynı büyüklükteki havuzlar için birleştirme çalışma tablosu tamamlandı.

**a-** Havuz başına amplikon büyüklüklerinin toplamı her havuz için aynı olmalıdır. Aynı çalışma çizelgesi üzerinde farklı büyüklükteki havuzlar birleştirilmez. Özgül örnekli bir havuzda her bir amplikon büyüklüğüne göre eklendi.

**b-** UV<sub>260</sub> absorbans

**c-** Seyreltme faktörü

Fragmentasyon için kullanılacak havuzlanmış PCR ürünü hacmi µl cinsinden otomatik olarak hesaplandı.

**1-** Kullanılan deney formatına dayanarak havuzlanmış PCR ürünü şöyle seyreltildi:

**a-** Çalışma çizelgesi üzerinde gösterilen havuz hacmi, yeni bir PCR tüpüne bir alikuat/havuz/ tüp olacak şekilde transfer edildi.

**b-** Çalışma çizelgesinde belirtilen hacimde, her bir havuzdaki her bir alikuat'a RB tamponu ve 10X Fragmentasyon tamponu eklendi.

**2-** Tüp buzun üzerine koyuldu.

## Fragmentasyon Ana Karışımının Hazırlanması

1 µl fragmentasyon çözeltisi için gerekli sayıda örnek hesaplandı ve fragmentasyon çözeltisinin aktivitesi girildi. Bu değer girilir girilmez fragmentasyon ana karışımı için gerekli her bir çözelti hacmi, çalışma çizelgesi üzerinde otomatik olarak hesaplandı.

## Birleştirilen PCR Ürünlerinin Fragmente Edilmesi

Fragmentasyon ana karışımının hazırlanmış havuzlara eklenmesine bir örnek olarak, standart olan 49'lu format için Çizelge 3.10'da gösterildi.

Çizelge 3.10 Fragmentasyon ana karışımının hazırlanmış havuzlara eklenmesi

Fragmentasyon reaksiyonunun oluşturulması		49'lu format(standart)
Hazırlanmış havuz	µl	42.6
Fragmentasyon mastır karışımı	µl	4.0
<b>Toplam reaksiyon hacmi</b>	<b>µl</b>	<b>46.6</b>

## Fragmentasyonun Tamamlandığının Doğrulanması

1- Her bir fragmentasyon reaksiyonu için:

a- 169 format çipler için 2 µl'lik örnek jel kuyucuğuna eklendi.

2- 4 µl 2X jel yükleme boyası eklendi.

3- 50-2,500 baz çifti DNA belirteçleriyle beraber % 20'lik TBE PAGE jelde yürütüldü.

4- Jel etidyum bromid ile boyandı ve UV altında görüntülendi. Uygun bir şekilde fragmente edilmiş DNA, 20-200 baz çifti arasında gözlemlendi.

### 3.11. İşaretleme

İşaretleme için kullanılan kimyasallar, ana karışımın hazırlanması ve kullanılan "thermal cycler" programı sırasıyla Çizelge 3.11, Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13'de gösterildi.

Çizelge 3.11 İşaretleme için kullanılan kimyasallar

Kimyasallar
DNA işaretleme çözeltisi Terminal deoksinükleotidil transferaz 5X Terminal deoksinükleotidil transferaz tamponu

Çizelge 3.12 İşaretleme ana karışımının hazırlanması

Array formatı	İşaretleme ana karışımı	Her bir tüpün total hacmi
169	7.8 µl	26.9 µl

Çizelge 3.13 İşaretlemede kullanılan "thermal cycler" programı

Sıcaklık	Süre
37 °C	2 saat
95 °C	15 dakika
4 °C	Bekletilir.

### 3.12. Hibridizasyon

Hibridizasyon için kullanılan kimyasallar Çizelge 3.14'de gösterildi.

Çizelge 3.14 Hibridizasyon için kullanılan kimyasallar

<b>Kimyasallar</b>
Oligonükleotit kontrol çözeltisi
Tetrametilammoniyum klorid çözeltisi
Asetillenmiş sığır serum albümin
Herring sperm DNA'sı
Tris-HCl, 1 M, pH 7.8
Tween-20 (Steril suyla %1'e seyreltilmiş)
Steril su

### Hibridizasyon Ana Karışımının Hazırlanması

Hibridizasyon ana karışımının hazırlanması üç farklı çip formatı içinde Çizelge 3.15'de gösterildi.

Çizelge 3.15 Hibridizasyon ana karışımının hazırlanması

Hibridizasyon ana karışımının hazırlanması	Cinsi	49-format	100-format	169-format
%5 ekstra hacim	µl			
5M TMAC	µl	136.6	499.0	62.4
1M tris 7.8	µl	2.3	8.3	1.0
%1 Tween	µl	2.3	8.3	1.0
50 mg/mL BSA	µl	2.3	8.3	1.0
10 mg/ml HS DNA	µl	2.3	8.3	1.0
130X oligo kontrol çözeltisi	µl	1.8	6.4	0.8
Su	µl	18.4	66.2	8.3
Toplam hacim	µl	168.0	604.8	75.6
İşaretlenmiş örneğe uygulanacak hacim	µl	160.0	96.0	72.0
Son hacim (İşaretlenmiş örnek+Hibridizasyon karışımı)	µl	220.0	130.4	98.9

### Hibridizasyon Ana Karışımının Eklenmesi

Hibridizasyon ana karışımının eklenmesi Çizelge 3.16'da gösterildi.

Çizelge 3.16 Hibridizasyon ana karışımının eklenmesi

Çip formatı	Hibridizasyon master karışımı	Her bir tüpün total hacmi
49	160 µl	220 µl
100	96 µl	130.4 µl
<b>169</b>	<b>72 µl</b>	<b>98.9 µl</b>

### Pre-Hibridizasyon Tamponunun Hazırlanması

Pre-Hibridizasyon tamponunun hazırlanması Çizelge 3.17'de gösterildi.

Çizelge 3.17 Pre-Hibridizasyon tamponunun hazırlanması

Kimyasal	Stok	Final	Bir çip için
Su	-	-	196 µl
Tris, pH 7.8	1M	10mM	2 µl
Tween-20	%1	%0.01	2 µl
<b>Toplam</b>			<b>200 µl</b>

### Çiplerin Pre-Hibridizasyonu

Çiplerin Pre-Hibridizasyon tamponunun üç farklı format için kullanım miktarı Çizelge 3.18'de gösterildi.

Çizelge 3.18 Çiplerin Pre-Hibridizasyonu

Çip formatı	Pre-Hibridizasyon tamponu
49	200 µl
100	120 µl
<b>169</b>	<b>80 µl</b>

### 3.13. Örneklerin Denatüre Edilmesi

- 1- Tüpler thermal cycler'da 5 dakika 95°C'de tutuldu.
- 2- Tüpler 5 dakika 49°C'de tutularak dengelendi.
- 3- Tüpler vortekslelendikten sonra kısa bir spinle kenarlarda kalmış kalıntılar toplandı.

### Denatüre Edilmiş Örneklerin Çipe Yüklenmesi

Pre-Hibridizasyon tamponu çiplerden çıkarılarak, her bir çipe uygun hacimde denatüre edilmiş örnek yüklendi (Çizelge 3.19).

Çizelge 3.19 Denatüre edilmiş örneklerin çipe yüklenmesi

Çip formatı	Denatüre edilmiş örnek
49	200 µl
100	120 µl
169	80 µl

### 3.14. Yıkama, Boyama ve Tarama

Çipler GeneChip Fluidics Station 450/250 kullanılarak yıkandı ve GeneChip Scanner 3000 kullanılarak tarandı. Kurma ve ayarlama GeneChip Operating Software ile yapıldı. Taranan çip (.dat dosyası) görüntüleri GeneChip Sequence Analysis Software User's Guide kullanılarak analiz edildi. Yıkama, boyama ve tarama için kullanılan kimyasallar Çizelge 3.20'de gösterildi.

Çizelge 3.20 Yıkama, boyama ve tarama için kullanılan kimyasallar

Kimyasallar
Steril su
20X SSPE (3M NaCl, 0.2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.02 M EDTA)
Biotinlenmiş keçi anti-streptavidin antikoru
R-Fikoeritrin Streptavidin
%10 Tween-20 (Surfact-Amps20)
% 5.25 Sodyum Hipoklorid
50X Denhardt çözeltisi
MES hidrat
MES sodyum tuzu
5M NaCl (RNaz ve DNaz'dan arındırılmış)

### Çözelti Hazırlama

#### Yıkama Çözeltisi (A): Non-Stringent Yıkama Tamponu

(6X SSPE, % 0.01 Tween 20)

1000 ml için:

300 ml 20X SSPE

1 ml % 10'luk Tween-20

699 ml su

0.2 µm'lik filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklandı.

### **Yıkama Çözeltisi (B): Stringent Yıkama Tamponu**

(0.6X SSPE, % 0.01 Tween 20)

1000 ml için:

30 ml 20X SSPE

1 ml % 10'luk Tween-20

969 ml su

0.2 µm'lik filtreden geçirilip oda sıcaklığında saklandı.

### **0.5 mg / ml Anti-Streptavidin Antikoru**

0.5 mg'ı 1 ml suda çözüldü. 4°C'de saklandı.

### **12X MES Stok Tamponu**

(1.22 M MES, 0.89 M Na<sup>+</sup>)

1000 ml için:

70.4 g MES hidrat

193.3 MES sodyum tuzu

800 ml steril su

Karıştırılarak hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.

pH 6.5 ile 6.7 arasına ayarlandı. 0.2 µm'lik filtreden geçirildi.

### **1X Çip Bekletme Tamponu**

(100 mM MES, 1 M Na<sup>+</sup>, % 0.01 Tween 20)

100 ml için:

8.3 ml 12X MES stok tamponu

18.5 ml 5 M NaCl

0.1 ml % 10'luk Tween-20

73.1 ml su

2°C ile 8°C arasındaki sıcaklıkta saklandı ve ışıktan korundu.

### **Deney ve Fluidiks İstasyonunun Kurulması**

Aşağıdaki talimatlar GeneChip Operating Software ( GCOS ) 1.4 veya GeneChip

Operating Software Server ( GCOS Server ) kullanılarak otomatik olarak yapıldı.

### **Yıkama ve Boyama İçin Çiplerin Hazırlanması**

Üç aşamadan oluşur:

**1-** Streptavidin fikoeritrin ( SAPE ) boyama

**2-** Antikor amplifikasyon basamağı

**3-** SAPE ile son boyama

Çiplerin hazırlanması:

- 1- 16 saatlik hibridizasyondan sonra çiplerden hibridizasyon kokteyli çıkarılarak, bir mikrosantrifüj tüpüne koyuldu.
- 2- İşlem sırasında hibridizasyon kokteyli buz üstünde tutuldu veya uzun süreli saklama için -80°C'ye kaldırıldı.
- 3- Çip 250 µl çip bekletme tamponuyla tamamen dolduruldu.

### Tampon ve Boyama Çözeltilerinin Hazırlanması

Bu aşamadaki bütün hazırlıklar Çizelge 3.21-24'de gösterildi.

Çizelge 3.21 Boyama tamponunun hazırlanması

Bileşenler	1X	Son konsantrasyon
Su	666.7 µl	
SSPE (20X)	300 µl	6X
Tween-20 (%3)	3.3 µl	%0.01
Denhardt (50X)	20 µl	1X
<b>Toplam</b>	<b>990 µl</b>	

Çizelge 3.22 SAPE boyama çözeltisinin hazırlanması

Kimyasallar	Hacim	Son Konsantrasyon
Boya tamponu	495 µl	1X
1 mg/mL SAPE	5.0 µl	10 µg/ml
<b>Total</b>	<b>500 µl</b>	

Çizelge 3.23 Antikor çözeltisi karışımının hazırlanması

Bileşenler	Hacim	Son Konsantrasyon
Boya tamponu	495 µl	1X
0.5 mg/ml Biotinile antikor	5.0 µl	5 µg/ml
<b>Total</b>	<b>500 µl</b>	

Çizelge 3.24 Çip bekletme tamponunun hazırlanması

Bileşenler	Hacim
MES stok tamponu (12X)	8.3 ml
5M NaCl	18.5 ml
Tween-20 (%10)	0.1 ml
Su	73.1 ml
<b>Toplam</b>	<b>100 ml</b>

## Fluidiks İstasyonunun Kullanım Protokolleri

**169'luk çip formatı için** Mini\_DNAArray\_WS5\_450 ve FLEXMini\_DNAArray\_WS5\_450 protokolleri kullanıldı. FS-450 Fluidiks protokolü kullanılarak hedefler için antikor amplifikasyonu yapılması Çizelge 3.25'de gösterildi.

Çizelge 3.25 FS-450 Fluidiks protokolü kullanılarak hedefler için antikor amplifikasyonu yapılması

<b>49 format ( standart ) protokol: DNAArray_WS5_450</b>	
Hibridizasyon sonrası 1. Yıkama	25°C'de yıkama tamponu A ile 5 karışımın 6 döngüsü/döngü
Hibridizasyon sonrası 2. Yıkama	45°C'de yıkama tamponu B ile 5 karışımın 6 döngüsü/döngü
1. Boyama	25°C'de çipi SAPE çözeltisinde 10 dakika boya
Boyama sonrası yıkama	25°C'de yıkama tamponu A ile 5 karışımın 6 döngüsü/döngü
2. Boyama	25°C'de çipi antikor çözeltisinde 10 dakika boya
3. Boyama	25°C'de çipi SAPE çözeltisinde 10 dakika boya
Son yıkama	30°C'de yıkama tamponu A ile 6 karışımın 10 döngüsü/döngü. Son bekletme sıcaklığı 25°C'dir.
Çipleri doldurma	Çip, çip bekletme tamponuyla doldurulur

### FS-450/250 Kullanarak Çiplerin Yıkanma ve Boyanması

1- Çalışma istasyonundaki fluidiks diyalog kutusundan doğru deney ismi seçildi. Prob çip tipi otomatik olarak görüldü.

2- Fluidiks istasyonundaki LCD penceresinden talimatlar izlendi.

3- Kart atma kolu aşağı veya çıkarma pozisyonundayken fluidiks istasyonunun tanımlanmış modülüne uygun çip yerleştirildi.

a- Numune bekletme 1'e 500 µl SAPE çözeltisi içeren tüp yerleştirildi.

b- Numune bekletme 2'ye 500 µl anti-streptavidin biyotinile antikorlu boyama çözeltisi içeren tüp yerleştirildi.

c- Numune bekletme 3'e 800 µl çip bekletme tamponu içeren tüp yerleştirildi.

d- İğne kolu iğneleri pozisyona getirecek şekilde bastırarak yürütme başlatıldı.

4- Boyama bittiğinde boya içeren tüplerle boş tüpler gösterilen şekilde değiştirildi.

5- Kart atma kolu çıkar pozisyonuna getirmek için bastırılarak çipler modüllerden çıkarıldı.

6- Çip penceresinden büyük hava kabarcıklarının veya hava ceplerinin olup olmadığı kontrol edildi.

a- Eğer hava kabarcıkları varsa, el yordamıyla çipler pipet kullanılarak çip bekletme tamponuyla dolduruldu. Ardından çözeltinin yarısı dışarı atıldı ve yine el yordamıyla çip bekletme tamponuyla dolduruldu.

b- Çipi taramak için kart atma kolu yukarı çekilerek yıkama bloğu bağlandı.

7- Eğer çipler hemen taranmayacaksa 4°C'de karanlıkta bekletildi. Tarama 24 saat içinde gerçekleştirildi.

### 3.15. Çiplerin Taranması

Tarayıcı GeneChip Operating Software 1.4 tarafından kontrol edilmektedir. Tarama, yıkama protokolleri tamamlandıktan sonra yapıldı. Taramadan en az 10 dakika önce lazer açıldı ve ısıtıldı. Eğer örnekler 4°C'de saklanmışsa, taramadan önce oda sıcaklığına getirildi.

#### Çipleri Taramaya Hazırlama

Eğer gerekiyorsa, taramadan önce çipin cam yüzeyi, çizmeyen bir mendil veya kumaşla silindi. Camı silmek için alkol kullanılmadı. Çip taramadan önce iki septa Tough-Spots yapışkanlarıyla sızmayı önlemek için kapatıldı.

1- Çipin arka yüzeyinde septaların çevresindeki fazla sıvı silindi.

2- Dikkatli bir şekilde septaların her birine Tough-Spots uygulandı. Tough-Spots'lar düzgün bir şekilde uygulanmadığında oluşan çıkıntılar, şişlikler, yırtıklar veya kırışık kenarlar düzeltmeye çalışılmadı ve eskisi çıkarılıp yenisi uygulandı.

3- Çip tarayıcıya sokuldu ve Tough-Spotsların odaklanmaya engel olmadıklarını garantilemek için otomatik odaklama testi yapıldı.

#### Çiplerin Taranmaya Başlanması

1- Taramak istediğimiz çipe ait deney ismi seçildi.

2- Çip tarayıcıya yerleştirildi. GeneChip Scanner 3000 için sadece bir tarama yeterlidir.

3- Bu tarayıcı için piksel çözünürlüğü ve dalga boyu önceden kurulmuştur.

4- Tarayıcının örnek kapısı açıldı ve çip tutucuya yerleştirildi.

5- Tarama başlatıldı. Görüntüleme menüsünden tarama süreci komutu seçilerek çip görüntüsü tarama yapılırken ekranda görüldü.

#### 4. SONUÇLAR

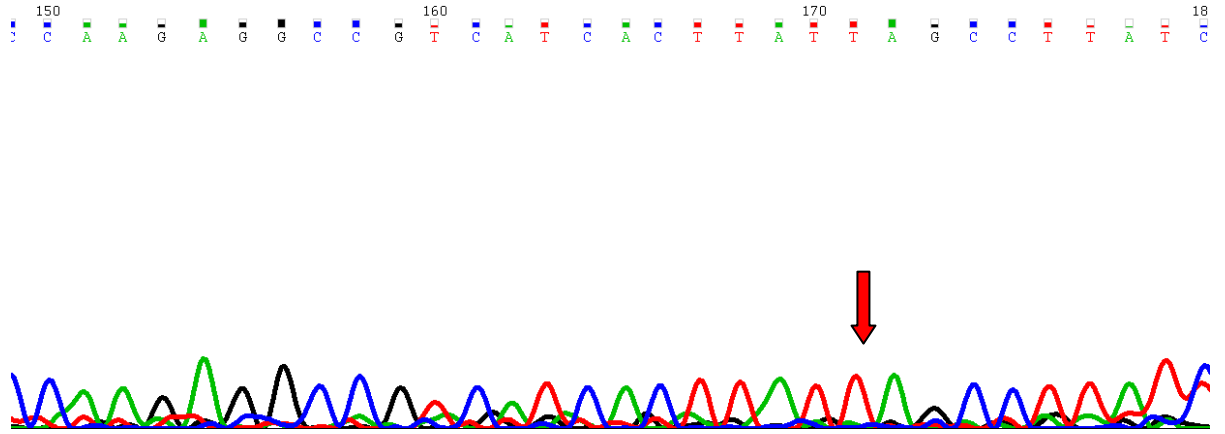
Toplam kırk Wilson hastasının mikroarray tabanlı DNA yeniden dizileme çipleriyle, *ATP7B* geninin tüm kodlayıcı ekzonik dizileri, ekzon-intron bağlantısında yer alan diziler ve 5' ve 3' kodlayıcı olmayan bölgeleri (5' UTR, 3' UTR) mutasyonlar açısından tarandı. Hastalarda bulunan nükleotit değişiklikleri otomatik DNA dizi analizi yöntemiyle tekrar doğrulandı. Hastalarda saptanan nükleotit değişiklikleri referans genom ile karşılaştırılarak, mutasyonların tipi, yeri ve proteinde yaptığı değişiklikler belirlendi. Sonuçlar toplu olarak değerlendirilerek on üç farklı mutasyon ve sıklıkları belirlendi (Çizelge 4.1). Mutasyon saptanan hastalara ait diğer bilgiler çizelge 4.3'de gösterildi.

Çizelge 4.1 *ATP7B* geninde saptanan mutasyonlar

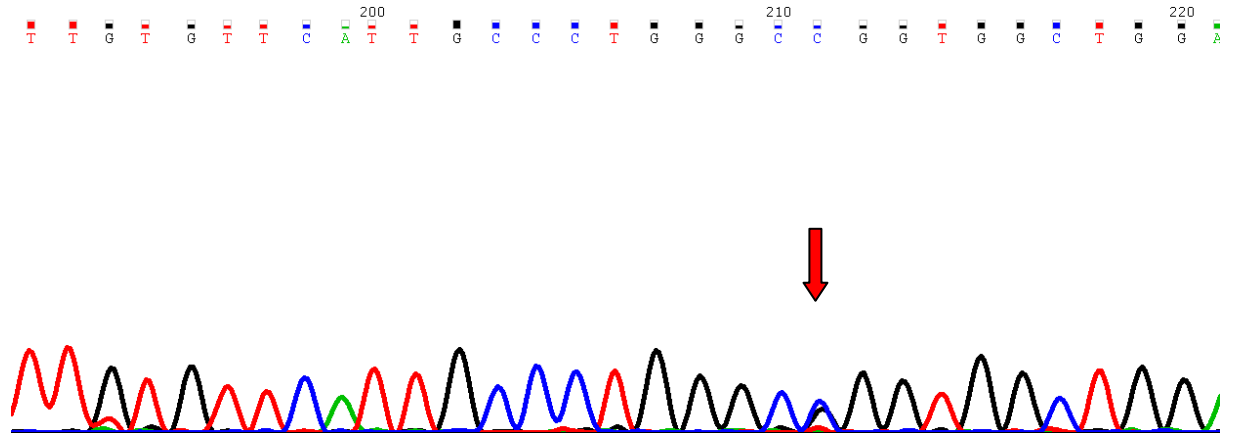
Ekzon	Nükleotit değişikliği	Etki	Allel Sıklığı (%)
2	c.562 C>T	p.Q188K	4,16
8	c.2332 C>G	p.R778G	31,25
10	c.2506 G>C	p.G836R	4,16
10	c.2508 G>A	p.G836E	4,16
12	c.2732 C>T	p.A912V	4,16
12	c.2755 C>T	p.R919W	2,08
14	c.3207 C>A	p.H1069Q	20,8
17	c.3664 G>T	p.D1222Y	4,16
18	c.3733 C>A	p.P1245T	4,16
18	c.3809 A>G	p.N1270S	4,16
18	c.3818 C>T	p.P1273L	4,16
19	c.3955 C>T	p.R1319X	4,16
19	c.3979 C>G	p.L1327V	4,16
<b>Toplam</b>			<b>95,8</b>

**Not:** Birleşik heterozigotluk saptanan iki hastada, hastalık nedeni olan diğer allel bulunamadı.

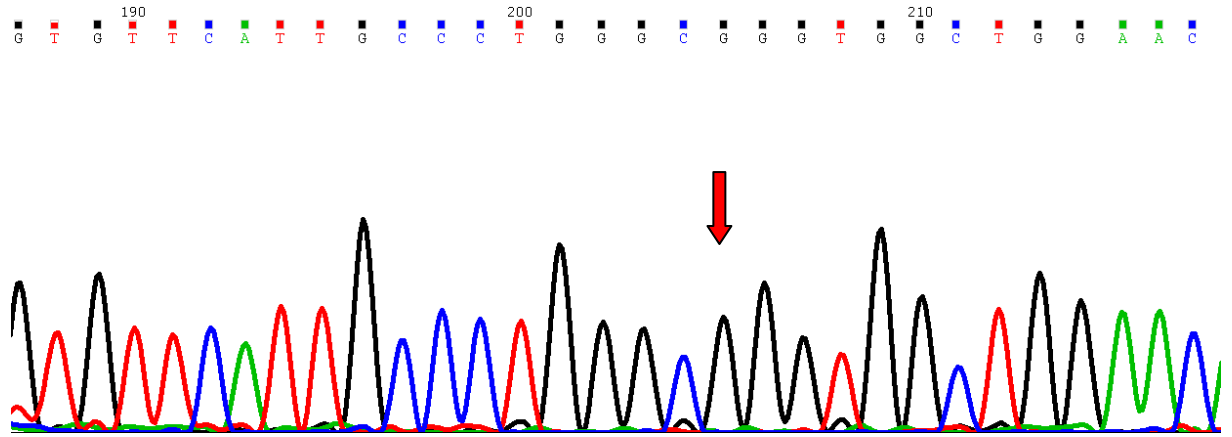
Direkt DNA dizi analizi sonucu elde edilen farklı mutasyonların, DNA dizi analizi sonuçları aşağıda gösterilmektedir (Şekil 4.1-11). DNA kromatogramları üzerinde meydana gelen nükleotit değişiklikleri kırmızı kalın ok yardımıyla gösterilmiştir. 'Chromas 2' ve 'Paint' programları kullanılarak, nükleotit değişikliğini içeren dizi sonuçlarının yaklaşık otuz nükleotidlik kısmı verilmiştir. Şekillerde nükleotit piklerinin renkleri, Guanin (G) siyah, Sitozin (C) mavi, Timin (T) kırmızı ve Adenin (A) yeşil olarak görülmektedir.



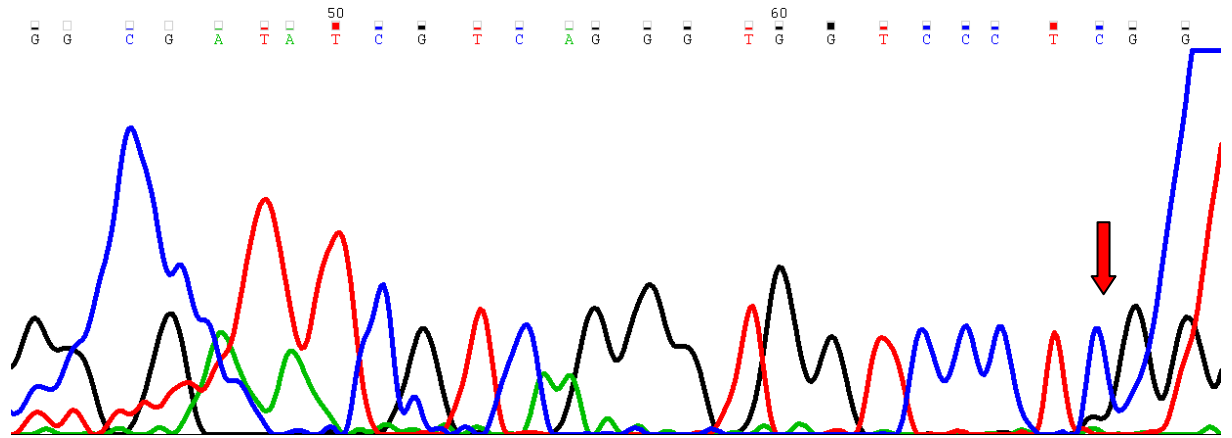
Şekil 4.1 *ATP7B* geninin ikinci ekzonunda homozigot olarak bulunan c.562 C>T p.Q188K mutasyonu



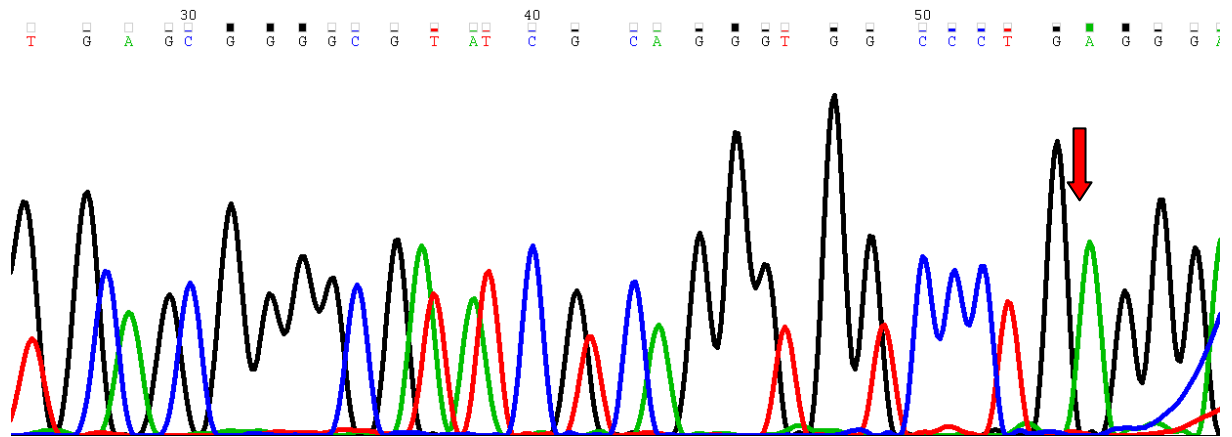
Şekil 4.2 *ATP7B* geninin sekizinci ekzonunda heterozigot olarak bulunan c.2332 C>G p.R778G mutasyonu



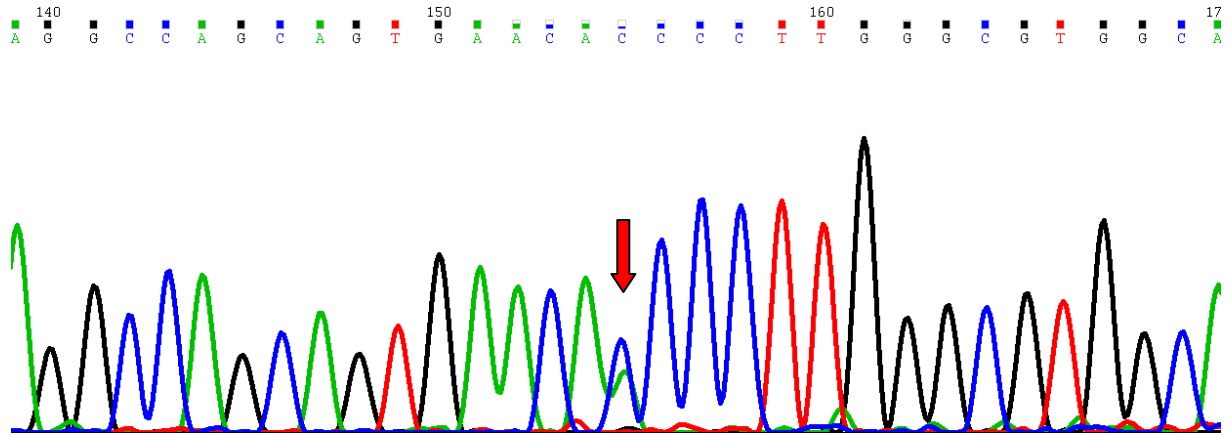
Şekil 4.3 *ATP7B* geninin sekizinci ekzonunda homozigot olarak bulunan c.2332 C>G p.R778G mutasyonu



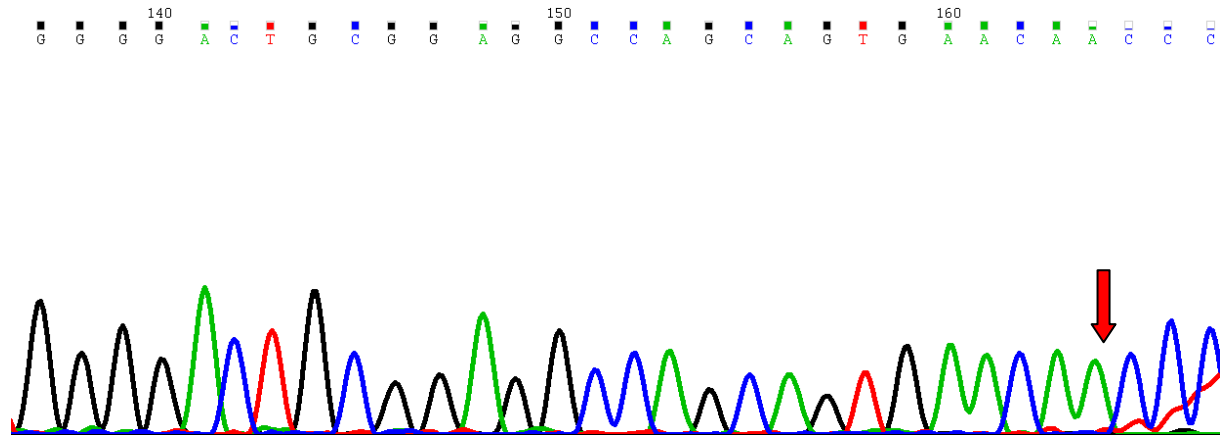
Şekil 4.4 *ATP7B* geninin onuncu ekzonunda homozigot olarak bulunan c.2506 G>C p.G836R mutasyonu



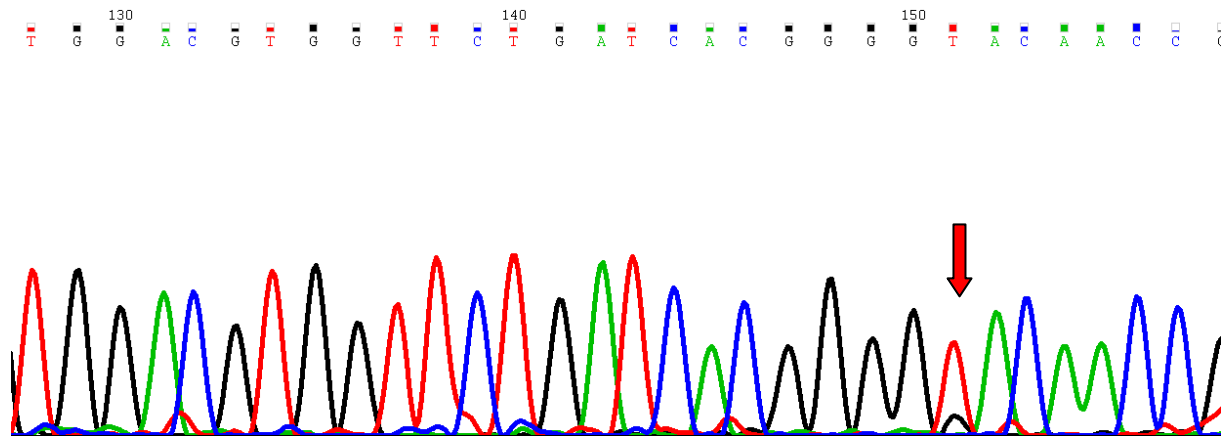
Şekil 4.5 *ATP7B* geninin onuncu ekzonunda homozigot olarak bulunan c.2508 G>A p.G836E mutasyonu



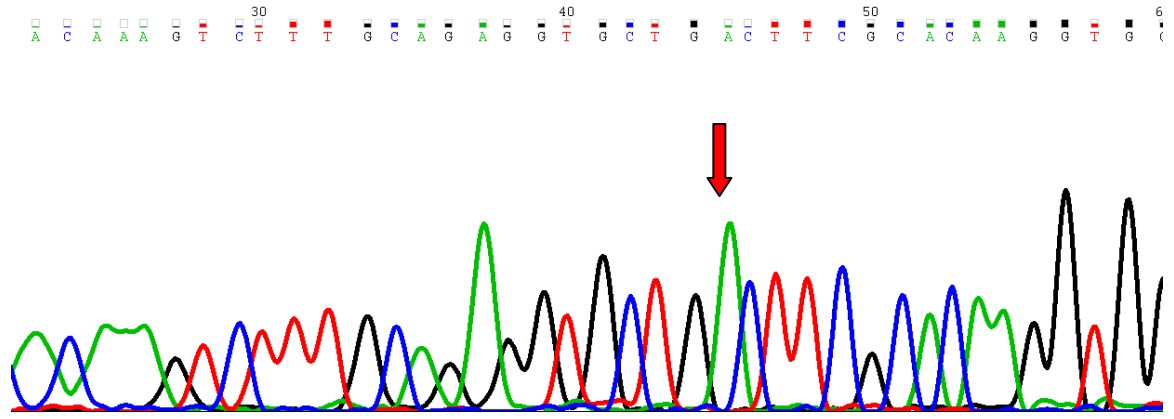
Şekil 4.6 *ATP7B* geninin ondördüncü ekzonunda heterozigot olarak bulunan c.3207 C>A p.H1069Q mutasyonu



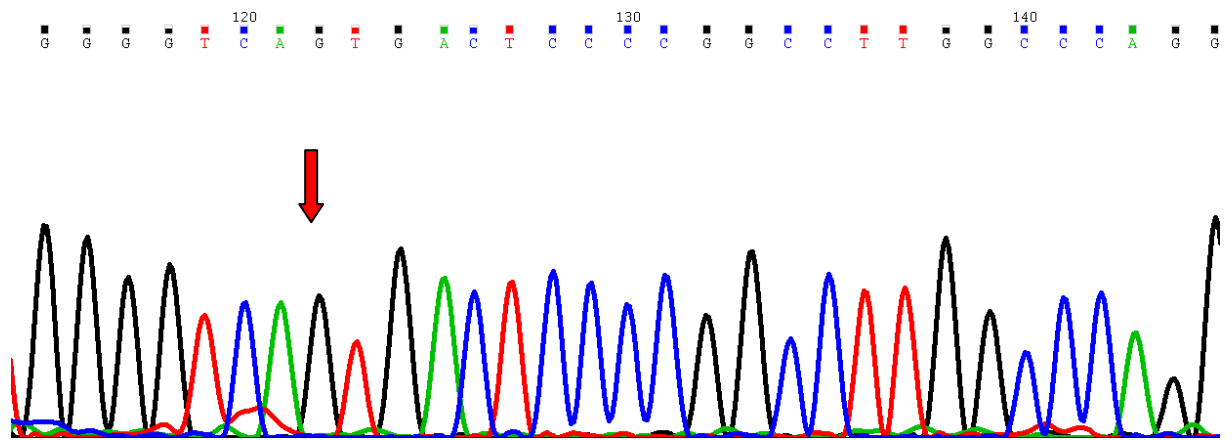
Şekil 4.7 *ATP7B* geninin ondördüncü ekzonunda homozigot olarak bulunan c.3207 C>A p.H1069Q mutasyonu



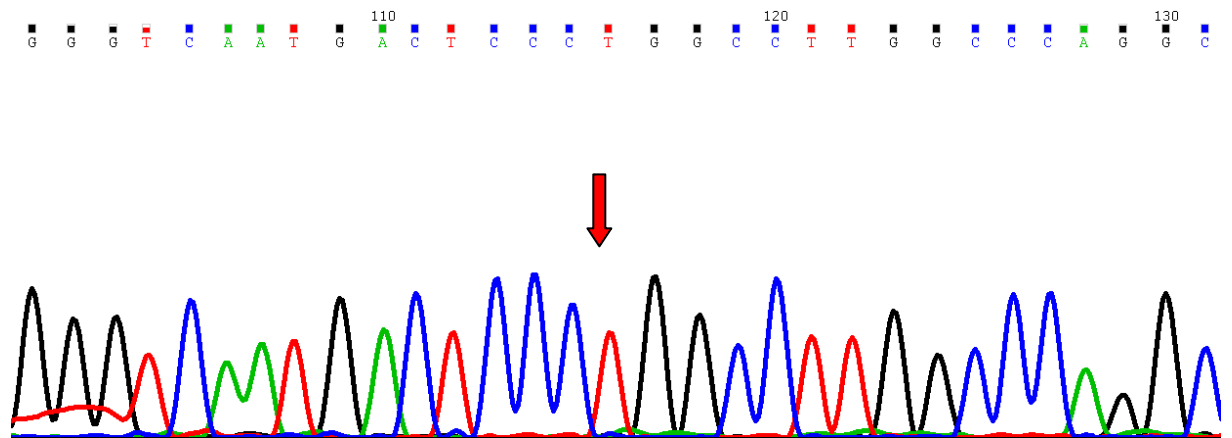
Şekil 4.8 *ATP7B* geninin onyedinci ekzonunda homozigot olarak bulunan c.3664 G>T p. D1222Y mutasyonu



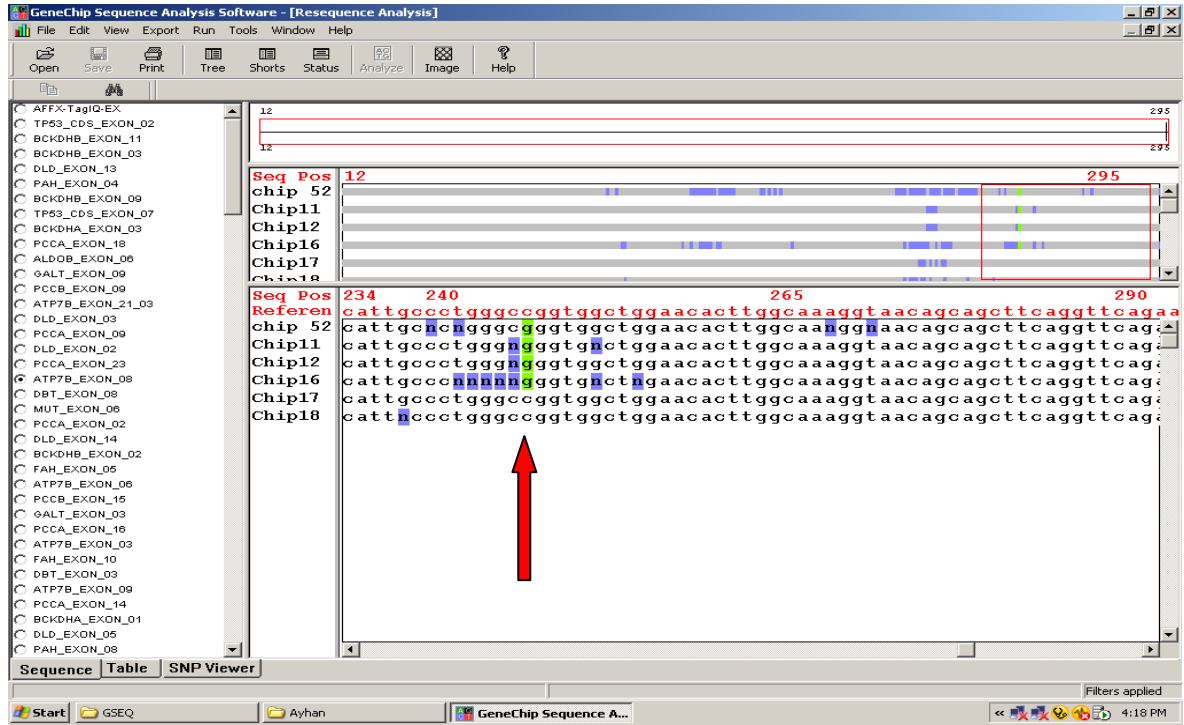
Şekil 4.9 *ATP7B* geninin onsekizinci ekzonunda homozigot olarak bulunan c.3733 C>A p. P1245T mutasyonu



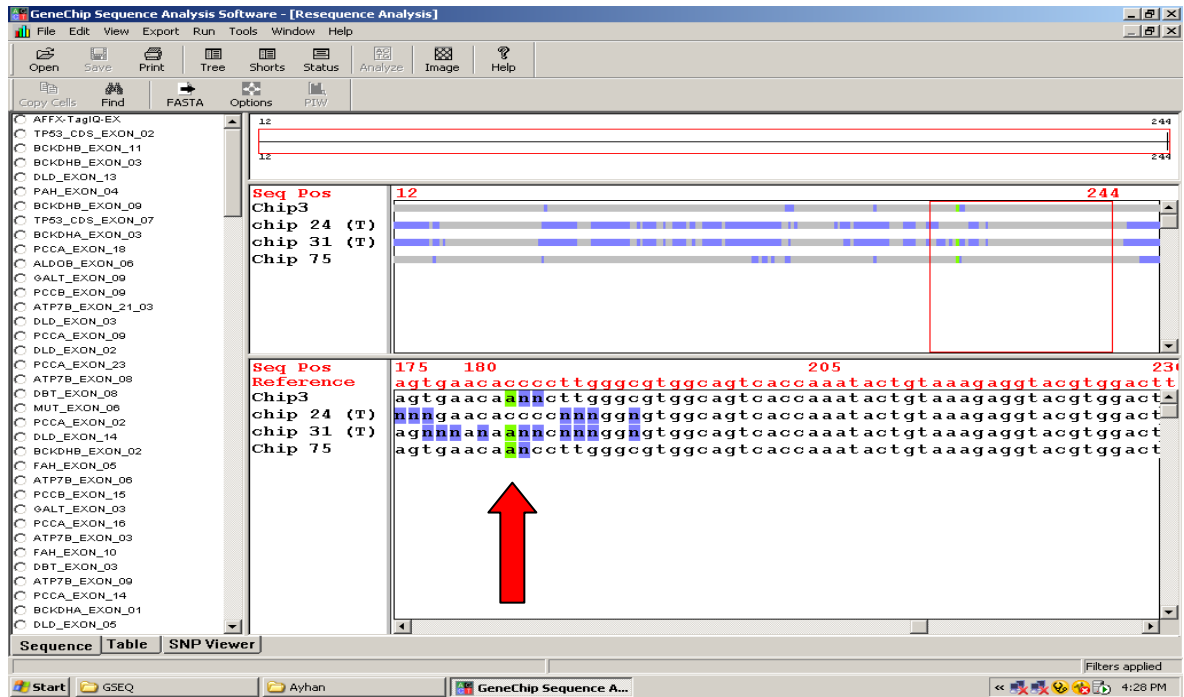
Şekil 4.10 *ATP7B* geninin onsekizinci ekzonunda homozigot olarak bulunan c.3809 A>G p. N1270S mutasyonu



Şekil 4.11 *ATP7B* geninin onsekizinci ekzonunda homozigot olarak bulunan c.3818 C>T p. P1273L mutasyonu

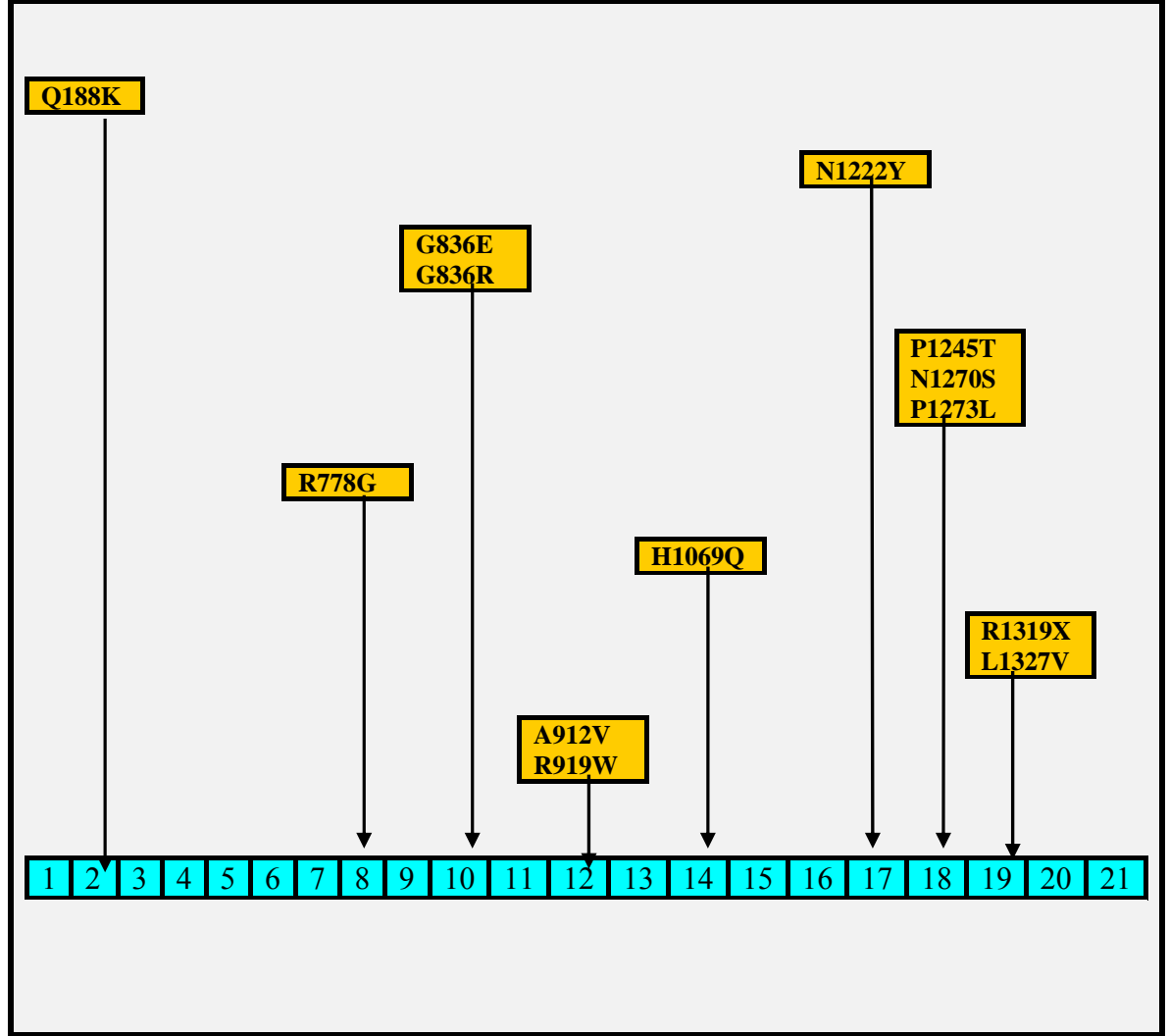


Şekil 4.12 *ATP7B* geninin sekizinci ekzonunda mikroarray tabanlı DNA yeniden dizileme çipiyle bulunan c.2332 C>G p.R778G mutasyonu



Şekil 4.13 *ATP7B* geninin on dördüncü ekzonunda mikroarray tabanlı DNA yeniden dizileme çipiyle bulunan c.3207 C>A p.H1069Q mutasyonu

*ATP7B* geninde tespit ettiğimiz on üç farklı mutasyonun ekzonlara göre dağılımı Şekil 4.14'de verilmiştir.



Şekil 4.14 *ATP7B* geninde saptadığımız mutasyonların gen içindeki dağılımları (Turkuaz rengi *ATP7B* geninin 21 ekzonunu ve altın sarısı renkler de ait oldukları ekzonda bulunan mutasyonları göstermektedir).

Kırk Wilson hastasının mikroarray tabanlı DNA yeniden dizileme çip yöntemiyle taranması sonucu, mutasyona sahip bireylerde dokuz farklı polimorfizm bulundu. Bu polimorfizmlerin altı tanesi ekzonik bölgelerde ve üç tanesi intronik bölgelerde tespit edildi. 2,3,9,10,13,16 ve 18 numaralı ekzonlarda birer, 12 numaralı ekzonda iki farklı polimorfizm bulundu. Çalıştığımız gruba göre en polimorfik ekzon 12 numaralı ekzondur. Tespit edilen dokuz polimorfizmin hepsinde, tek nükleotit değişikliği olmuştur. Bu değişiklik sonucu bir sessiz ve beş yanlış anlama polimorfizmi oluşmuştur. İtronik bölgelerdeki değişiklikler, proteinde herhangi bir değişikliğe yol açmaz. Aşağıdaki çizelgede polimorfizmlere sebep olan nükleotit değişiklikleri ve proteinde yol açtığı değişiklik ve her bir polimorfizmin bulunduğu hasta sayısı gösterilmektedir.

Çizelge 4.2 Mutasyon bulunan hastalarda saptanan polimorfizmler ve buldukları hasta sayısı

Ekzon/İntron	Nükleotit değişikliği	Etki	Hasta sayısı
2	c.1216 T>G	p.S406A	5
3	c.1366 G>C	p.V456L	6
9	c.2448 -25 G>A	İntronik değişiklik	7
10	c.2495 A>G	p.K832R	15
12	c.2855 A>G	p.K952R	16
12	c.2866 -13 G>C	İntronik değişiklik	5
13	c.3009 G>A	p.A1003A	3
16	c.3149 C>T	p.V1140A	4
18	c.3903 +6 C>T	İntronik değişiklik	4

Literatürde en sık rastlanan dört polimorfizmin, grubumuzda tespit edilen mutasyonlarla beraber saptanması durumu şöyle ifade edilebilir: p.S406A ve p.V456L polimorfizmleri, p.H1069Q, p.R919W, p.G836E ve p.G836R mutasyonlarıyla beraber saptanmıştır. p.K832R ve p.K952R polimorfizmleri, p.H1069Q, p.R778G, p.R919W, p.R1319X, p.P1273L, p.P1245T ve p.L1327V mutasyonlarıyla beraber saptanmıştır. Özgül mutasyonlarla giden polimorfizmler için haplotip oluşturulabilmesi için daha fazla hastaya ve kontrol örneğinin

incelenmesine ihtiyaç vardır. Elde edilen veriler ışığında, hastalık alleleriyle beraber dağılım gösteren polimorfik varyantlar bulunmamaktadır.

Çizelge 4.3 Mutasyon bulunan hastalara ait bilgiler

Hasta No	Doğum Tarihi	Tanı Yaşı	Doğum Yeri	Cinsiyeti	Mutasyon	Allel Durumu
1	01.01.1986	16	Bitlis	K	p.Q188K	Homozigot
2	01.07.1981	19	Kırıkkale	K	p.R778G	Homozigot
3	01.01.1988	7	Yozgat	K	p.R778G	Homozigot
4	15.04.1990	12	Çorum	E	p.R778G	Homozigot
5	01.01.1994	16	Konya	K	p.R778G	Homozigot
6	01.01.1999	7	Tokat	K	p.R778G	Homozigot
7	01.10.1988	14	Çorum	K	p.R778G	Homozigot
8	01.01.1995	12	Çorum	K	p.R778G	Homozigot
9	-	-	-	K	p.R778G/-	Bileşik Het.
10	01.01.1987	14	Konya	K	p.G836E	Homozigot
11	-	-	-	K	p.G836R	Homozigot
12	01.01.1986	16	Eskişehir	K	p.A912V	Homozigot
13	17.02.1997	12	Bartın	E	p.H1069Q	Homozigot
14	-	-	-	K	p.H1069Q	Homozigot
15	-	-	-	K	p.H1069Q	Homozigot
16	18.07.1999	16	İçel	E	p.H1069Q	Homozigot
17	27.07.1997	5	Ankara	E	p.H1069Q/p.R919W	Bileşik Het.
18	02.04.1997	11	Ankara	E	p.H1069Q/-	Bileşik Het.
19	01.01.1989	15	Adana	E	p.D1222Y	Homozigot
20	08.08.1991	12	Diyarbakır	E	p.P1245T	Homozigot
21	01.01.1986	15	Ankara	E	p.N1270S	Homozigot
22	-	-	-	E	p.P1273L	Homozigot
23	01.01.1992	10	Kastamonu	E	p.R1319X	Homozigot
24	-	-	-	K	p.L1327V	Homozigot

## 5. TARTIŞMA

Mikroarray tabanlı DNA yeniden dizileme yöntemi ile *ATP7B* geninin analizleri sonucunda, toplam kırk hastadan yirmi dördünde hastalık nedeni olan mutasyonlar bulundu. Mikroarray analizi sonucunda saptanan mutasyonların tamamı direkt DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak doğrulandı. Mikroarray tabanlı DNA yeniden dizileme yöntemi ile mutasyonu saptanamayan hastalara ait DNA örneklerinde, direkt DNA dizi analizi ile *ATP7B* genine ait yirmi bir ekzonun tamamı tekrar sekanslanarak, nükleotit değişiklikleri açısından tarandı. Bu hastalarda hastalık nedeni olan mutasyonlar saptanamadı.

Mutasyon bilgileri toplu olarak değerlendirildiğinde, sekizinci ve on dördüncü ekzonlar, en sık mutasyona uğrayan *ATP7B* gen bölgesi olarak belirlendi. Bu ekzonlarda yer alan mutasyonların allel sıklığı, toplumumuzda çalışılan grup için sırasıyla %31,25 ve %20,8'dir.

p.R778G mutasyonu sekizinci ekzon üzerinde yer alır ve bu mutasyonun değişik toplumlardaki allel sıklığı farklı olup %0-12 oranlarında bildirilmiştir. Bizim grubumuzda bu mutasyonun allel sıklığı daha yüksek bulundu (%31,25). Bu mutasyon c.2332'deki C>G nükleotit değişikliği ile p.R778G yanlış anlamlı mutasyonunun oluşumuna yol açar. Bu mutasyon proteininin TM4 segmenti üzerinde olup, hidrofilik yan grubu olan ve içinde bazik grup taşıyan arjinin, alifatik yan zinciri olan glisine dönmüştür ve bu değişim proteinin hücre zarına doğru transportunu ve yerleşimini etkiler. Ayrıca TM4 segmenti, sekiz transmembran segmentinden oluşan transmembran domenyi (bakır geçiş yolunu oluşturur)'nin bir parçası olduğundan, proteinin hücre zarı içindeki kısmının konformasyonu üzerinde etkisi vardır. Dolayısıyla TM4'deki bu mutasyon bakır geçişini de etkiler (Loudianos vd,1999).

p.H1069Q mutasyonu on dördüncü ekzon üzerinde yer alır ve bu mutasyonun allel sıklığı Doğu ve Kuzey Avrupa toplumlarında %30 oranlarında bulunmuştur. Bizim grubumuzda bu mutasyonun allel sıklığı daha düşük bulundu (%20,8). Bu mutasyon c.3207'deki C>A nükleotit değişikliği ile p.His1069Gln yanlış anlamlı mutasyonunun oluşumuna yol açar. Bu mutasyon proteininin ATP loop domenyi

üzerinde olup, hidrofilik yan grubu olan ve içinde bazik grup taşıyan histidin, içinde asit grubunun amidini taşıyan yan zinciri olan glutamine dönmüştür ve bu değişim proteinin ATP bağlamasını etkiler. Proteinin amino domeynindeki H1069 rezidüsü, evrimsel olarak bütün bakır geçişini sağlayan ATPaz'larda korunduğu için, bakır transportunu da etkilediği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda ATP loop bu mutasyona uğradığında, protein bakırla uyarıldığı zaman aktivite kaybı gösterir (Thomas vd,1995).

Hastalık grubumuzda bulunan diğer on bir farklı mutasyon ATP7B proteininin farklı kısımlarını etkiler (Çizelge 5.1). İkinci ekzonda c.562 C>T nükleotit değişikliği sonucu p.Q188K'ya dönüşen yanlış anlamlı mutasyon proteinin ikinci bakır bağlanma bölgesinde bulunur ve muhtemelen bakır bağlanmasını etkiler. Onuncu ekzonda bulunan c.2506 G>C nükleotit değişikliği sonucu p.G836R'e ve c.2508 G>A nükleotit değişikliği sonucu p.G836E'ye dönüşmüş yanlış anlamlı mutasyonlar proteinin dördüncü transmembran segmenti ve transdüksiyon bölgesinin çakıştığı alanda bulunurlar ve muhtemelen bakırın transmembran kanalı boyunca hücre zarının dışına atılmasını etkilerler. On ikinci ekzonda bulunan c.2732 C>T nükleotit değişikliği sonucu p.A912V'e ve c.2755 C>T nükleotit değişikliği sonucu p.R919W'ya dönüşmüş yanlış anlamlı mutasyonlar, proteinin transdüksiyon ve beşinci transmembran segmentinin çakıştığı bölgesinde bulunurlar ve muhtemelen bakırın transmembran kanalı boyunca hücre zarının dışına atılmasını etkilerler. On yedinci ekzonda c.3664 G>T nükleotit değişikliği sonucu p.D1222Y'ye dönüşen yanlış anlamlı mutasyon, proteinin ATP bağlama bölgesinde bulunur ve muhtemelen ATP bağlanmasını etkileyerek proteinin konformasyonel değişiklikler için ihtiyaç duyduğu enerjiden yoksun bırakır. On sekizinci ekzonda yer alan c.3733 C>A nükleotit değişikliği sonucu p.P1245T'e, c.3809 A>G nükleotit değişikliği sonucu p.N1270S'e ve c.3818 C>T nükleotit değişikliği sonucu p.P1273L'e dönüşmüş yanlış anlamlı mutasyonlar, muhtemelen proteinin ATP hinge bölgesini etkileyerek ATP bağlanmasıyla bakırın bir sonraki transmembran segmentine ulaştırılmasını etkiler. On dokuzuncu ekzonda yer alan c.3955 C>T nükleotit değişikliği sonucu p.R1319X'e ve c.3979 C>G nükleotit değişikliği sonucu p.L1327V'e dönüşmüş anlamsız mutasyon, proteinin ATP hinge/TM7 ara bölgesinde bulunur ve muhtemelen erken sonlanmadan dolayı normalden daha kısa bir protein oluşur.

1319. amino asitten sonrası olmayan bu proteinin, hücre içinde üretildiği yerden hücre zarına iletilmesinde ve hücre zarına yerleştirilmesinde, proteinin sentez ve yıkım döngüsünde değişime ve transmembran kanalında altıncı segmente (TM6) kadar gelen bakırın dışarı atılmasında problemler ortaya çıkabilir. Yanlış anlamlı mutasyon ise proteinin TM7 bölgesinde bulunur ve muhtemelen proteinin hücre zarına konumlanmasını ve bakır geçişini etkiler.

Çizelge 5.1 *ATP7B* geninde saptanan mutasyonların proteinde etkilemesi olası bölgeler

Ekzon	Nükleotit değişikliği	Etki	Bölge
2	c.562 C>T	p. Q188K	Cu <sup>2+</sup>
8	c.2332 C>G	p.R778G	TM4
10	c.2506 G>C	p.G836R	TM4/Td ara bölgesi
10	c.2508 G>A	p.G836E	TM4/Td ara bölgesi
12	c.2732 C>T	p.A912V	Td/TM5 ara bölgesi
12	c.2755 C>T	p.R919W	Td/TM5 ara bölgesi
14	c.3207 C>A	p.H1069Q	ATP loop
17	c.3664 G>T	p.D1222Y	ATP bağlanma
18	c.3733 C>A	p.P1245T	ATP hinge
18	c.3809 A>G	p.N1270S	ATP hinge
18	c.3818 C>T	p.P1273L	ATP hinge
19	c.3955 C>T	p.R1319X	ATP hinge/TM7 ara bölgesi
19	c.3979 C>G	p.L1327V	TM7

Tespit ettiğimiz polimorfizmlerin hastalık yapmadığı doğrultusunda çalışmalar bulunmaktadır (Wilson veritabanı,2010).

Mikroarray tabanlı DNA yeniden dizileme çipleriyle, DNA örneklerinin dizi analizleri, geleneksel metodlardan çok daha hızlı, ekonomik ve hassastır. Bu yöntem, klasik DNA dizileme ya da mutasyon ön tarama yöntemleri ile karşılaştırıldığında çok daha kapsamlı sonuçlar elde edilmesi (tüm allelik varyasyonların saptanması, SNP'lerin de tespiti), iş gücü ve deney süresi açısından da büyük avantajlara sahiptir. Tek bir çip üzerine on farklı metabolik hastalık grubuna ait DNA örnekleri (on hasta için toplam on dört gen analizi) hibridize edildiği için, çip metodu maliyet açısından da avantaj sağlamaktadır. Genomdaki ilgilendiğimiz gen bölgelerin çoğaltılması için uzun DNA fragment PCR (Long Range PCR) amplifikasyon yöntemi kullanılarak, yüzlerce olan amplifikasyon sayısı önemli ölçüde azaltıldı. Bu şekilde deney maliyeti düşürülerek harcanan iş gücü daha verimli kullanıldı. Kalıtsal metabolik hastalık nedeni on dört genin genomik dizilerini içeren bu çipte, toplam 50,000 nükleotidin analizini yapmak mümkündür.

Mikroarray tabanlı DNA yeniden dizileme çipi kullanılarak mutasyon tespit ettiğimiz hastalarda, bulunan bu mutasyonlar onaylandığı gibi mikroarray yönteminde analiz edilemeyen hastalarda, direkt DNA dizi analizi ile mutasyonlar bulundu.

Mutasyon bulunamayan on altı hastanın klinik olarak Wilson hastalığı belirtileri olsa bile, kesin hasta olmama olasılığı vardır. Wilson tanısı çoğu hastanede bakır seviyesi ölçülerek yapılmaktadır ama bakır metabolizmasının bozuk olduğu birçok karaciğer hastalığında bakır seviyeleri değişmektedir. Dolayısıyla karaciğer hastalıkları klinik testler sonucunda karışık ve yanlış tanı konulmasına yol açabilir. Çalışılan hasta grubunda *ATP7B* geninin tüm kodlayıcı ve ekzon-intron bağlantısında yer alan nükleotit dizileri ile 5' promotor ve 3' kodlanmayan bölgelerindeki nükleotit dizileri analiz edilmiştir. Hasta grubunda mutasyonu bulunamayan iki birleşik heterozigot allelin bulunamayışının nedeni, *ATP7B* genindeki büyük delesyon-insersiyon tipi mutasyonlar veya geniş çaplı kromozomal yeniden düzenlemeler olabilir. Mutasyon bulunamayan hastalarda klinik izlem tekrar dikkatle takip edilmeli, ayırıcı testlere öncelik verilerek hastalara ait bulgular tekrar gözden geçirilmelidir.

Laboratuvarımızda uyguladığımız mikroarray tabanlı yeniden dizileme çipi, Wilson hastalığının genetik tanısı ve hastalık nedeni olan patolojik allelerin belirlenmesi için başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Bu yöntem ile gene ait tüm diziler analiz edilmiş, bulunan varyantların allel sıklıkları ve literatür bilgisi doğrultusunda deneysel ve protein üzerindeki patolojik etkileri araştırılmıştır. Özellikle tanı alınamayan hastalarda, genetik tarama yapılması için mikroarray yöntemi hızlı bir mutasyon tarama yöntemi olarak kullanılabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Achila D, Banci L, Bertini I, Bunce J, Ciofi-Baffoni S, Huffman DL. 2006, Structure of human Wilson protein domains 5 and 6 and their interplay with domain 4 and the copper chaperone HAH1 in copper uptake, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 103:5729–34.
- Adleman, L.M. 1994, Molecular computation of solutions to combinatorial problems, *Science.*, 266(5187):1021–1024.
- Ahrendt SA, Halachmi S, Chow JT, Wu L, Halachmi N, Yang SC, Wehage S, Jen J, Sidransky D. 1999, Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 96:7382-7.
- Ala A, Borjigin J, Rochwarger A, Schilsky M. 2005, Wilson disease in septuagenarian siblings: raising the bar of diagnosis, *Hepatology.*, 41:668–70.
- Anthonisen AN, Clausen JD, Andersen JP. 2006, Mutational analysis of the conserved TGES loop of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, *J Biol Chem.*, 281:31572–82.
- Arnesano F, Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Molteni E, Huffman DL, O'Halloran TV. 2002, Metallochaperones and metal-transporting ATPases: a comparative analysis of sequences and structures, *Genome Res.*, 12:255–71.
- Bains, W. & Smith, G. 1988, A novel method for nucleic acid sequence determination, *J. Theor. Biol.*, 135:303–307.
- Bassett DE Jr, Eisen MB, Boguski MS. 1999, Gene expression informatics—it's all in your mine, *Nat Genet.*, 21(1 Suppl):51-5. Review.
- Bearn AG. 1960, A genetical analysis of thirty families with Wilson's disease (hepatolenticular degeneration), *Ann Hum Genet.*, 24:33–43.
- Beyersdorff A, Findeisen A. Morbus. 2006, Wilson: case report of a two year-old child as first manifestation, *Scand J Gastroenterol.*, 41: 496–7.
- Blanchard, A.P. and Friend, S.H. 1999, Cheap DNA arrays – it's not all smoke and mirrors, *Nature Biotechnology.*, 17(10): 953.
- Blanchard, A.P., Kaiser, R.J. and Hood, L.E. 1996, High-density oligonucleotide arrays, *Biosensors and Bioelectronics.*, 6/7: 687–690.
- Braxton S, Bedilion T. 1998, The integration of microarray information in the drug development process, *Curr Opin Biotechnol.*, 9:643-9. Review.
- Brewer GJ, Askari FK. 2005, Wilson's disease: clinical management and therapy, *Journal of Hepatology.*, 42:13–21.

- Brewer GJ, Yuzbasiyan-Gurkan V. 1992, Wilson disease, *Medicine.*, 71: 139–64.
- Brown, P.O. and Botstein, D. 1999, Exploring the new world of the genome with DNA microarrays, *Nature Genetics.*, 21(1 Suppl.):33–37. Review.
- Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. 1993, The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene, *Nat Genet.*, 5:327–37.
- Call D. 2001, DNA microarrays – their mode of action and possible applications in molecular diagnostics, *Veterinary Sciences Tomorrow.*, 3:1-9.
- Cater MA, Forbes J, La Fontaine S, Cox D, Mercer JF. 2004, Intracellular trafficking of the human Wilson protein: the role of the six N-terminal metal-binding sites, *Biochem J.*, 380:805–13.
- Cater MA, La Fontaine S, Shield K, Deal Y, Mercer JF. 2006, ATP7B mediates vesicular sequestration of copper: insight into biliary copper excretion, *Gastroenterology.*, 130:493–506.
- Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G. 1999, Making and reading microarrays, *Nat Genet.*, 1(Suppl):15-9. Review.
- Collins, F.S., Guyer, M.S. & Chakravarti, A. 1997, Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation, *Science.*, 278:1580–1581.
- Cronin MT, Fucini RV, Kim SM, Masino RS, Wespi RM, Miyada CG. 1996, Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light-generated DNA probe arrays, *Hum Mutat.*, 7:244-55.
- DiDonato M, Hsu HF, Narindrasorasak S, Que L Jr, Sarkar B. 2000, Copper-induced conformational changes in the N-terminal domain of the Wilson disease copper-transporting ATPase, *Biochemistry.*, 39:1890–6.
- Dietrich G, Kurz S, Hubner C, Aepinus C, Theiss S, Guckenberger M, Panzner U, Weber J, Frosch M. 2003, Transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* during infection, *J Bacteriol.*, 185:155-64.
- Dmitriev O, Tsivkovskii R, Abildgaard F, Morgan CT, Markley JL, Lutsenko S. 2006, Solution structure of the N-domain of Wilson disease protein: distinct nucleotide-binding environment and effects of disease mutations, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 103:5302–7.
- Dobrovolski, S., Banas, A., Naylor, E., Powdrill, T., Thakkar, D. 1999, DNA microarray technology for neonatal screening, *Acta. Paediatr.*, Suppl. 432:61-64.
- Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. and Trent, J.M. 1999, Expression profiling using cDNA microarrays, *Nature Genetics.*, 21(1 Suppl.):10–14.

- Ebrahimi B, Dutia BM, Roberts KL, Garcia-Ramirez JJ, Dickinson P, Stewart JP, Ghazal P, Roy DJ, Nash AA. 2003, Transcriptome profile of murine Gamma herpesvirus-68 lytic infection, *J Gen Virol.*, 84:99-109.
- Fodor, S.P., Read, J.L., Pirrung, M.C., Stryer, L., Lu, A.T. and Solas, D. 1991, Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis, *Science.*, 251(4995): 767–773.
- Forbes JR, Cox DW. 1998, Functional characterization of missense mutations in ATP7B: Wilson disease mutation or normal variant?, *Am J Hum Genet.*, 63:1663–74.
- Friend, S. H. and Stoughton, R. B. 2002, The Magic Of Microarrays, *Scientific American.*, 286:44-53.
- Frydman M. 1990, Genetic aspects of Wilson's disease, *J Gastroenterol Hepatol.*, 5:483–90.
- Gerhold D, Rushmore T, Caskey CT. 1999, DNA chips: promising toys have become powerful tools, *Trends Biochem Sci.*, 24:168-73. Review.
- Giagheddu A, Demelia L, Puggioni G, Nurchi AM, Contu L, Pirari G, Deplano A, Rachele MG. **et al.** 1985, Epidemiologic study of hepatolenticular degeneration (Wilson's disease) in Sardinia (1902–1983), *Acta Neurol Scand.*, 72:43–55.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. 1999, Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring, *Science.*, 286:531-7.
- Gray NS, Wodicka L, Thunnissen AM, Norman TC, Kwon S, Espinoza FH, Morgan DO, Barnes G, LeClerc S, Meijer L, Kim SH, Lockhart DJ, Schultz PG. 1998, Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors, *Science.*, 281:533-8.
- Guo Y, Nyasae L, Braiterman LT, Hubbard AL. 2005, NH<sub>2</sub>-terminal signals in ATP7B Cu-ATPase mediate its Cu-dependent anterograde traffic in polarized hepatic cells, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 289:G904–16.
- Hacia JG, Brody LC, Chee MS, Fodor SP, Collins FS. 1996, Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis, *Nat Genet.*, 14:441-7.
- Hacia JG. 1999, Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays, *Nature genetics supplement.*, 21:42-47.

- Hacia JG, Sun B, Hunt N, Edgemon K, Mosbrook D, Robbins C, Fodor SP, Tagle DA, Collins FS. 1998, Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays, *Genome Res.*, 8:1245-58.
- Hsi G, Cullen LM, Moira Glerum D, Cox DW. 2004, Functional assessment of the carboxy-terminus of the Wilson disease copper-transporting ATPase, ATP7B, *Genomics.*, 83:473–81.
- Hung I.H, Suzuki M, Yamaguchi Y, Yuans D.S, Klausner R.D, Gitlin J.D. 1997, Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, 272:21461-21466.
- Huster D, Lutsenko S. 2003, The distinct roles of the N-terminal copper-binding sites in regulation of catalytic activity of the Wilson's disease protein. *J Biol Chem.*, 278:32212–8.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992, Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors, *Science.*, 258:818-21.
- Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, Richman DD, Morris D, Hubbell E, Chee M, Gingeras TR. 1996, Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays, *Nat Med.*, 2:753-9.
- Larin D, Mekios C, Das K, Ross B, Yang AS, Gilliam TC. 1999, Characterization of the interaction between the Wilson and Menkes disease proteins and the cytoplasmic copper chaperone, HAH1p, *J Biol Chem.*, 274:28497–504.
- Lutsenko S, Kaplan J.H. 1995, Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity, *Biochemistry.*, 34:15607-15613.
- Lim CM, Cater MA, Mercer JF, La Fontaine S. 2006a, Copper-dependent interaction of dynactin subunit p62 with the N terminus of ATP7B but not ATP7A, *J Biol Chem.*, 281:14006–14.
- Lim CM, Cater MA, Mercer JF, La Fontaine S. 2006b, Copper-dependent interaction of glutaredoxin with the N termini of the copper-ATPases (ATP7A and ATP7B) defective in Menkes and Wilson diseases, *Biochem Biophys Res Commun.*, 348:428–36
- Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. 1999, High density synthetic oligonucleotide arrays, *Nat Genet.*, 21:20-4. Review.
- Lockhart, D.J, Dong H, Byrne M.C, Follettie M.T, Gallo M.V, Chee M.S, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown E.L. et al. 1996, Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays, *Nature Biotechnol.*, 14:1675–1680.

- Loudianos G, Dessi V, Lovicu M. et al. 1999, Haplotype and mutation analysis in Mediterranean patients with Wilson Disease, *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine.*, 12:315-319.
- Loudianos G, Dessi V, Lovicu M, Angius A, Nurchi A, Sturniolo G. C, Pirastu M. et al. 1998, Further delineation of the molecular pathology of Wilson disease in the Mediterranean population, *Human mutation.*, 12:89-94.
- Lutsenko S ve Kaplan J.H. 1995, Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity, *Biochemistry* 34:15607-15613.
- Lutsenko S, Petrukhin K, Cooper M.J, Gilliam T.C, Kaplan J.H. 1997, N-terminal domains of human copper-transporting adenosine triphosphatases (the Wilson's and Menkes disease proteins) bind copper selectively in vivo and in vitro with stoichiometry of one copper per metal-binding repeat, *J. Biol. Chem.*, 272:18939-18944.
- Majumdar R, Al Jumah M, Al Rajeh S, Fraser M, Al Zaben A, Awada A, Al Traif I, Paterson M. 2000, A novel deletion mutation within the carboxyl terminus of the copper-transporting ATPase gene causes Wilson disease, *J Neurol Sci.*, 179:140–3.
- Mandal AK, Yang Y, Kertesz TM, Arguello JM. 2004, Identification of the transmembrane metal binding site in Cu<sup>+</sup>-transporting PIB-type ATPases, *J Biol Chem.*, 279:54802–7.
- Marton MJ, DeRisi JL, Bennett HA, Iyer VR, Meyer MR, Roberts CJ, Stoughton R, Burchard J, Slade D, Dai H, Bassett DE Jr, Hartwell LH, Brown PO, Friend SH. 1998, Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays, *Nat Med.*, 4:1293-301.
- Medici V, Rossaro L, Sturniolo G.C. 2007, Wilson disease-A practical approach to diagnosis, treatment and follow-up, *Digestive and Liver Disease* 39:601-609.
- Mee YB ve Lutsenko S. 2007, Hepatic copper-transporting ATPase ATP7B: function and inactivation at the molecular and cellular level, *Biometals.*, 20:627-637.
- Moldin, S.O. & Gottesman, I.I. 1997, At issue: genes, experience and chance in schizophrenia—positioning for the 21st century, *Schizophr. Bulletin.*, 23:547–561.
- Moller JV, Olesen C, Jensen AM, Nissen P. 2005, The structural basis for coupling of Ca<sup>2+</sup> transport to ATP hydrolysis by the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, *J Bioenerg Biomembr.*, 37:359–64.
- Nickerson, D.A., Nickerson DA, Taylor SL, Weiss KM, et al. 1998, DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene, *Nature Genet.* **19**:233–240.

- Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, Barrett JC, Afshari CA. 1999, Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics, *Mol Carcinog.*, 24:153-9. Review.
- Nuwaysir, E.F., Huang, W., Albert, T.J., Singh, J., Nuwaysir, K., Pitas, A., Richmond, T., Gorski, T., Berg, J.P., Ballin, J., McCormick, M., Norton, J., Pollock, T., Sumwalt, T., Butcher, L., Porter, D., Molla, M., Hall, C., Blattner, F., Sussman, M.R., Wallace, R.L., Cerrina, F. and Green, R.D. 2002, Gene expression analysis using oligonucleotide arrays produced by maskless photolithography, *Genome Research.*, 12(11):1749–1755.
- Özgül RK, Mesci L, Dursun A. 2008a, Microarray resequencing analysis of fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) gene in tyrosinemia patients, *European Journal of Human Genetics*, 16(Supp2):55-78.
- Özgül RK, Güzel A, Mesci L, Dursun A. 2008b, Screening of GALT gene mutations in Turkish patients with galactosemia by microarray technology, VII. Tıbbi Genetik Kongresi, 6-7 Mayıs, Çanakkale, Türkiye (Oral sunum).
- Özgül RK, Dursun A. 2008c, Application of microarray resequencing high throughput platform in inherited metabolic diseases, 49th Annual short course on medical and experimental mammalian genetics, July20-August1, Bar Harbor, Maine, USA, p377.
- Parihar P. 2007, DNA microarray technology, *Pharma Times.*, 39(2):28-30.
- Paulsen M, Lund C, Akram Z, Winther JR, Horn N, Moller LB. 2006, Evidence that translation reinitiation leads to a partially functional menkes protein containing two copper-binding sites, *Am J Hum Genet.*, 79:214–29.
- Payne A.S, Gitlin J.D. 1998, Functional expression of the Menkes disease protein reveals common biochemical mechanisms among the copper-transporting P-type ATPases, *J. Biol. Chem.*, 273:3765-3770.
- Pease, A.C., Solas, D., Sullivan, E.J., Cronin, M.T., Holmes, C.P. and Fodor, S.P. 1994, Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 91(11):5022–5026.
- Pedersen P.L, Carafoli E. 1987, Ion motive ATPases, *Trends Biochem. Sci.*, 12: 146-150.
- Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Brown PO, Botstein D. 1999, Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 96 :9212-7.

- Petrukhin K, Lutsenko S, Chernov I, Ross B.M, Kaplan J.H, Gilliam T.C. 1994, Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing and structure/function predictions, *Hum. Mol. Genet.*, 3:1647-1656.
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. 1998, High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays, *Nat Genet.*, 20:207-11.
- Ralle M, Lutsenko S, Blackburn NJ. 2004, Copper transfer to the N-terminal domain of the Wilson disease protein (ATP7B): X-ray absorption spectroscopy of reconstituted and chaperone-loaded metal binding domains and their interaction with exogenous ligands, *J Inorg Biochem.*, 98:765–74.
- Ramsay, G. 1998, DNA chips: state-of-the art, *Nature Biotechnol.*, 16:40–44.
- Saiki, R.K., Walsh, P.S., Levenson, C.H. & Erlich, H.A. 1989, Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 86:6230–6234.
- Sapolsky RJ, Hsie L, Berno A, Ghandour G, Mittmann M, Fan JB. 1999, Highthroughput polymorphism screening and genotyping with high-density oligonucleotide arrays, *Genet Anal.*, 14:187-92.
- Sazinsky MH, Mandal AK, Arguello JM, Rosenzweig AC. 2006, Structure of the ATP binding domain from the *Archaeoglobus fulgidus* Cu<sup>+</sup>-ATPase, *J Biol Chem.*, 281:11161–6.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. & Brown, P.O. 1995, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science.*, 270:467–470.
- Schoen RE, Sternlieb I. 1990, Clinical aspects of Wilson's disease, *Am J Gastroenterol.*, 85:1453–7.
- Singh-Gasson, S., Green, R.D., Yue, Y., Nelson, C., Blattner, F., Sussman, M.R. and Cerrina, F. 1999, Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array, *Nature Biotechnology.*, 17(10):974–978.
- Soloz M, Vulpe C. 1996, CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals, *Trends Biochem. Sci.*, 21:237-241.
- Southern, E.M. 1996, DNA chips: analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale, *Trends Genet.*, 12:110–115.
- Southern, E.M., Maskos, U. & Elder, J.K. 1992, Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models, *Genomics.*, 13:1008–1017.

- Star K and Birshtein B. 2007, Genomic Medicine, Einstein J. Biol. Med., 23:21-25.
- Stoughton R.B. 2005, Applications of DNA Microarrays in Biology, Annu. Rev. Biochem., 74:53-82.
- Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, Parano E, Pavone L, Brzustowicz LM, et al. 1993, The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene, Nat Genet., 5:344–50.
- Tao TY, Liu F, Klomp L, Wijmenga C, Gitlin JD. 2003, The copper toxicosis gene product Murr1 directly interacts with the Wilson disease protein, J Biol Chem., 278:41593–6.
- Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, Wessels MR, Paulsen IT, Nelson KE, Margarit I, Read TD, Madoff LC, Wolf AM, et al. 2002, Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V Streptococcus agalactiae, Proc Natl Acad Sci USA., 99:12391-6.
- Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. 1995, The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences, Nature genetics., 9:210-217.
- Toyoshima C, Inesi G. 2004, Structural basis of ion pumping by Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the sarcoplasmic reticulum, Annu Rev Biochem., 73:269–92.
- Toyoshima C, Mizutani T. 2004, Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue, Nature., 430:529–35.
- Tsvikovskii R, Eisses JF, Kaplan JH, Lutsenko S. 2002, Functional properties of the coppertransporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) expressed in insect cells, J Biol Chem., 277:97683.
- Tsvikovskii R, MacArthur BC, Lutsenko S. 2001, The Lys1010-Lys1325 fragment of the Wilson's disease protein binds nucleotides and interacts with the N-terminal domain of this protein in a copper-dependent manner, J Biol Chem., 276:2234–42.
- Walker JM, Huster D, Ralle M, Morgan CT, Blackburn NJ, Lutsenko S. 2004, The N-terminal metal-binding site 2 of the Wilson's Disease Protein plays a key role in the transfer of copper from Atox1, J Biol Chem., 279:15376–84.
- Walker JM, Tsvikovskii R, Lutsenko S. 2002, Metallochaperone Atox1 transfers copper to the NH<sub>2</sub>-terminal domain of the Wilson's disease protein and regulates its catalytic activity, J Biol Chem., 277:27953–9.
- Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, Avila PC, Boushey HA, Ganem D, DeRisi JL. 2002, Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens, Proc Natl Acad Sci USA., 99:15687-92.

- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lander ES, et al. 1998, Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome, *Science.*, 28:1077-82.
- Wiggelinkhuizen M, Tilanus M. E. C, Bollen C. W. & Houwen R. H. J . 2009, Systematic review: clinical efficacy of chelator agents and zinc in the initial treatment of Wilson disease, *Aliment Pharmacol Ther.*, 29:947–958.
- Voskoboinik I, Greenough M, La Fontaine S, Mercer JF, Camakaris J. 2001, Functional studies on the Wilson copper P-type ATPase and toxic milk Mouse mutant, *Biochem Biophys Res Commun.*, 281:966–70.
- Yamaguchi Y, Heiny ME, Gitlin JD. 1993, Isolation and characterization of a human liver cDNA as a candidate gene for Wilson disease, *Biochem Biophys Res Commun.*, 197:271–7.
- Yarze JC, Martin P, Munoz SJ, Friedman LS. 1992, Wilson's disease: current status, *Am J Med.*, 92:643–54.
- Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, Kirillov E, Kreindlin E, Ivanov I, Parinov S, Guschin D, Drobishev A, Dubiley S, Mirzabekov A. 1996, DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 93:4913-8.
- Zhang, H., Zhao, H. & Merikangas, K. 1998, Strategies to identify genes for complex diseases, *Ann. Med.*, 29:493–498.

### Kitaplar

- Scheinberg IH, Sternlieb I., Smith LH Jr. 1984, Major Problems in Internal Medicine, Chapter: Wilson's disease, 126–55. ed. XXIII. Philadelphia, PA: WB Saunders Co.
- Dr. Frank Emmert-Streib, Dr. Matthias Dehmer (Editörler). 2008, Analysis of Microarray Data, Chapter 1:Introduction to DNA Microarrays, Chris Seidel, 1-26, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

### Tez

- Shalon, T.D. 1995, DNA Microarrays: a new tool for genetic analysis, Stanford University. Ph.D. thesis.

### Kongreler

- Savlı H. 2003, KLİMİK XI. Türk klinik mikrobiyoloji ve enfeksiyon hastalıkları kongresi, DNA chip teknolojisi.

### El kitapçıkları

Sambrook, J. Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989, Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold spring harbor laboratory Press New York.

Applied Biosystems, ABI 3130 Genetic Analyzer Manuel, 2005.

PE Applied Biosystems, ABI Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit protocol, 1998.

### Veritabanı

Wilson veritabanı,2010:

<http://www.wilsondisease.med.ualberta.ca/database.aspdatabase>

### İnternet Sitesi

Google görseller,2010:

<http://www.google.com.tr>, Kelimeler: ATP7B protein, ATP7B gene, Copper



## **ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı : Ayhan YILMAZ

Doğum Yeri : Adıyaman

Doğum Yılı : 12.10.1969

Medeni Hali : Evli

E-posta : [schizoayhan@yahoo.com](mailto:schizoayhan@yahoo.com)

İletişim adresi : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü,  
Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı, 06800 Beytepe, Ankara

### **Eğitim ve Akademik Durumu:**

Lisans : 1988-1992 Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim  
Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Merkez, Erzurum

Yüksek Lisans : 1994-1997 University of Texas, Department of Molecular&Cell  
Biology, Richardson, TX, USA

Yabancı Dil : İngilizce ve Fransızca

### **İş Tecrübesi:**

2000-2002 : Araştırma Görevlisi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji  
Bölümü, Merkez, Kütahya

2002- : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Beytepe, Ankara