



Klinik Olarak İlerleyici Ailevi İntrahepatik Kolestaz ile Uyumlu Hastalarda ATP8B1 Mutasyonunun Araştırılması: Ön Çalışma

Analysis of the ATP8B1 Gene in Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Patients: A Preliminary Report

Ayça Aykut¹, Murat Çakır², Hüseyin Onay¹, Deniz Nart³, Çiğdem Arıkan², Funda Özgenç², Murat Kılıç⁴, Funda Yılmaz³, Sema Aydoğdu², Raşit Vural Yağcı², Ferda Özkınay¹, Özgür Çoğulu¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁴Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

ÖZET

Amaç: İlerleyici ailevi intrahepatik kolestaz (PFIC), karaciğerde safra asitlerinin oluşumu ve transferinde rol oynayan safra proteinlerinin metabolik bozuklukları ile karakterize nadir görülen heterojen, otozomal resesif genetik bir hastalıktır. Hepatosellüler kaynaklı kolestazla seyreden, hızla ilerleyen ve herhangi bir yaşta karaciğer yetmezliğinden dolayı ölüme neden olan çocukluk çağı kolestatik hastalığı olup, 3 alt tipi bulunmaktadır. Son moleküler genetik çalışmalarda PFIC'nin üç tipine neden olabilecek genler saptanmıştır. Moleküler düzeyde tanının tiplendirme yönünden ayrıcalık sağlaması hastanın tanı ve tedavisi için önemli olmaktadır. Bu çalışmadaki amaç klinik olarak ilerleyici ailevi intrahepatik kolestaz tanısı konmuş 25 hastada bu hastalığın en sık görüldüğü tip 1'in oluşumuna neden olan ATP8B1 genindeki mutasyonları araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Yirmi yedi ekzonlu bir gen olan ATP8B1 geninin en sık mutasyonların görüldüğü 3 ekzon DNA dizi analizi ile araştırılmıştır.

Bulgular: Hastaların taranan ekzonlarında mutasyon saptanmamıştır.

Sonuç: Yalnızca 3 ekzon taranması, PFIC tip 1'in genetik nedenini ortaya koymakta zorluk oluşturmalarına rağmen, PFIC subtiplerinin ayrıcalık tanısının klinik olarak daha ayrıntılı yapılması gerekliliğini göstermektedir. Bu çalışma, bu olguların genetik alt yapısını anlamak ve ileri genetik incelemeler için başka bir bakış açısı sağlamaktadır. *The Journal of Pediatric Research* 2014;1(3):138-41

Anahtar Kelimeler: Ailevi intrahepatik kolestaz, ATP8B1

ABSTRACT

Aim: Progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) is a group of rare heterogeneous autosomal recessive disorders characterized by metabolic defects in biliary proteins involved in the formation and transfer of bile acids in the liver. The clinical presentation usually occurs first in childhood with progressive cholestasis, characterized by causing rapidly progressive liver disease. and causing death due to liver failure, there are 3 subtypes. Recent molecular and genetic studies have allowed the identification of genes responsible for three types of PFIC. Molecular genetic testing is essential and conclusive for diagnosis. The aim of the study was to elucidate the role and characteristics of ATP8B1 gene mutations in 25 patients with progressive intrahepatic cholestasis type 1.

Materials and Methods: The most common mutations seen in the three exons were investigated by DNA sequencing within 27 coding exons.

Results: No mutations identified.

Conclusion: Mutation screening of just three exons of the gene revealed difficulty in diagnosis and characterizing the genetic molecular basis of patient with PFIC subtypes. This study was important to understand the genetic background of these cases and further genetic studies needed to provide an another perspective. *The Journal of Pediatric Research* 2014;1(3):138-41

Key Words: Familial intrahepatic cholestasis, ATP8B1

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Ayça Aykut, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
Tel.: +90 232 390 39 61 E-posta: aycaaykut@hotmail.com

Geliş tarihi/Received: 07.05.2014 Kabul tarihi/ Accepted: 24.07.2014

Giriş

Ailevi hepatoselüler kolestaz yapan çok sayıda hastalık olup en önemlilerinden biri günümüzde progressif familial intrahepatik kolestazdır (PFIC). İlk kez Clayton ve ark. tarafından bildirilmiştir (1). Hastalığın görülme sıklığı 1/50,000-100,000'dir. PFIC yenidoğan döneminde başlayıp genellikle ilk dekatta siroza ilerleyen kronik kolestazla giden bir hastalıktır. Ortalama başlangıç yaşı 3 ay olup bazı hastalar sarılığı daha ileri dönemlerde geliştirebilirler (2,3). Hastalığın patogenezinin safra kanalcıkları düzeyinde safra asidi transportunun bozukluğu sorumlu tutulmaktadır. PFIC moleküler düzeyde 3 gruba ayrılmaktadır. Üç tip arasında en sık gözlenen PFIC tip 1'dir (3).

Byler hastalığı olarak da adlandırılan PFIC tip 1'de klinik büyüme gelişme geriliği, sağırılık, diare, pankreatit ve yağda bürünen vitaminlerin düzeyinde düşüklük izlenirken hastalar ergenlik dönemine gelmeden karaciğer yetmezliği geliştirir. ATP8B1 genindeki mutasyonlardan dolayı oluşan bir hastalıktır. ATP8B1 geni 18q21-22'de lokalize olup P-tip ATPaz proteini (FIC-1) kodlamakta ve fosfolipidlerin karaciğer membranına alınmasında rol oynamaktadır (4). PFIC tip 2 ise sadece karaciğer hastalığı olarak kendini gösterir. Geni 2q24'e lokalize ABCB11'dir. PFIC 3 ise fosfolipid sekresyonuna neden olmaktadır (5). Klinik bulgular diğerlerine göre daha geç ortaya çıkmakta ve GGT değeri bu hastalarda yüksek saptanmaktadır, 7q21'e lokalize ABCB4 geni MDR3 proteinini kodlamaktadır (6).

Hastalığın kesin tanısı ve alt tiplendirmesi moleküler genetik incelemeler ile konulabilmektedir (3).

Bu çalışmadaki amacımız histopatolojik ve klinik olarak PFIC tip 1 tiplendirmesi yapılan hastalarda moleküler genetik çalışma ile kesin tanı koymaktır. Bu amaçla PFIC tip 1 öntanısıyla gönderilen 25 hastada tip 1 için en sık gözlenen mutasyonları içeren 3 ekzonun DNA dizi analizi yapılmıştır. Bunun yanı sıra bu çalışmayla PFIC genetik incelemeleri için ön çalışma ve standardizasyonun yapılması planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Organ Nakli Merkezi'nde klinik olarak PFIC tip 1 tanısı almış 30 yaşayan ya da kaybedilmiş hastada ve 30 kontrol grubundan ATP8B1 geninde bulunan 27 ekzondan en sık mutasyonların görüldüğü 3 ekzon seçilip DNA dizi analizi ile mutasyon varlığı araştırılmıştır. Bu ekzonlar 3., 7. ve 24. ekzonlardır. Ege Üniversitesi Etik Kurul Başvurusu yapıldıktan sonra bilgilendirilmiş gönüllü formları alınarak 30 hasta ve 30 kontrol üzerinde yaşayan olgulardan 2cc EDTA'lı kan alınarak, kaybedilmiş olgulardan da parafin karaciğer biyopsi materyallerinden DNA izolasyonu yapılarak 3., 7. ve 24. ekzonlar, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile çoğaltıldı. Oluşturulan PCR ürünlerinin saflaştırılma işleminin ardından dideoksi veya zincir sonlanma metodu denilen yöntemle dizi analizi yapılmak üzere cycle sequencing işlemine tabi tutuldu. ABI Prism v3,1 Big-Dye Terminator Kiti (Applied Biosystems, USA), 5X Buffer (Applied

Biosystems, USA), sekans primerleri (Tablo I) ve distile su ile hazırlanan karışıma, pürifiye edilmiş ürünler eklenerek uygun PCR programında cycle sequencing yapıldı. Daha sonra ABI PRISM® 3130 Genetik Analizöre yüklendi. Örnekler CLC Genomics Workbench programında, <http://www.ensembl.org/index.html> sitesindeki ATP8B1 gen dizilimi referans alınarak değerlendirildi.

Bulgular

1997 yılı ile 2005 yılları arasında Ege Üniversitesi Çocuk Gastroenteroloji Hepatoloji ve Beslenme Bilim Dalı'nda yenidoğan döneminde kolestaz yapan diğer tüm etiyolojik nedenler ekarte edildikten sonra bulguları PFIC ile uyumlu olan 30 hastanın (14 E, 16 K), (6-125 ay arası) dosya kayıtları incelendi. Yaşayan hastalardan 2cc EDTA'lı kan alınarak kaybedilmiş hastaların parafin biyopsi materyallerinden DNA elde edildi. Demografik özellikleri, klinik ve laboratuvar bulguları değerlendirilerek, histopatolojik özelliklerine ve GGT değeri yüksek olan hastalar PFIC tip 3, düşük olan hastalar ise PFIC tip 1 veya tip 2 olarak sınıflandırıldı. Daha önceki yapılan çalışmalarda histopatolojik olarak dev hücreli hepatit ve klinik olarak hızlı ve fetal seyir gösteren olgular daha çok tip 2 olarak değerlendirildi. Dört hasta GGT yüksekliği nedeniyle PFIC tip 3 olarak sınıflandırıldı. Bunun dışında 1 hasta histopatolojik ve klinik olarak tip 2 olarak sınıflandırıldı. Yirmi beş hasta klinik olarak değerlendirildiğinde en sık saptanan klinik bulgu sırasıyla sarılık (%100), şiddetli kaşıntı (%92) ve gelişme geriliği (%52) idi. Hastaların %40'ında anne-baba arasında akrabalık saptanmıştı. Sekiz hastada da yenidoğan döneminde kardeş ölüm hikayesi mevcuttu. Klinik bulgular arasında hepatosplenomegali ve büyüme gelişme geriliğine ilaveten 23 hastada deride kaşıntı izleri mevcuttu. Hiçbir hastada malign transformasyon saptanmadı. On bir hastaya karaciğer nakli yapıldı (6 ay-11 yaş). Bir yıllık takibi biten hastaların hepsinde kemik dansitesinde düzelme ve normal büyüme hızı yakalandı. Dört hastadan iki tanesi postoperatif komplikasyonlardan, bir tanesi postoperatif dönemde gelişen lenfoproliferatif hastalıktan, bir tanesi de sepsis ve ARDS nedeni ile kaybedildi. Hastalar GGT ve histolojik bulgular ışığında subgruplara ayrıldı (Tablo II). Hastaların geliş şikayetleri, GGT değerleri, akrabalık varlığı ve aile öyküsü araştırılarak yaşayan olgularda periferik kandan DNA izolasyonu karaciğer nakli yapılmış ve exitus olmuş hastalardan da parafin karaciğer biyopsi dokusundan DNA izolasyonu yapılarak ATP8B1P geninin 3., 7. ve 24. ekzonları

Tablo I. Sekans primerleri	
FIC1-2F	TGCAGGCAGTATTCAACCAA
FIC1-2R	CACGCAAATAGACCGATCA
FIC1-7F	TCCCTTGCCTGTAACCTAAATG
FIC1-7R	TTTAAATCAGGCCATCGAG
FIC1-23F	GGATGGTGAGCAAGACTTC
FIC1-23R	TAAGGAGACACAGCCCCAAA

dizi analizi ile çoğaltılıp veritabanlarından karşılaştırılarak sonuçlara ulaşılmıştır.

DNA dizi analizi yapılan hastaların her 3 ekzonunda da anlamlı mutasyon saptanmamıştır.

Tartışma

Byler hastalığı olarak da bilinen PFIC tip 1 otozomal resesif geçiş gösteren genetik bir hastalıktır. Hayatın ilk iki ayı içinde başlayan sarılık, kaşıntı, kronik ishal ve büyüme geriliği ile karakterizedir. Dirençli ve uzun süreli ishal atakları, malabsorpsiyon görülebilir. Hastalığın çeşitli dönemlerinde pankreatit, iştme kaybı ve ter testi yüksekliği bildirilmiştir. Hastalık ilerleyici bir seyir göstermekte olup, hastalarda hepatomegali gelişir ve genellikle siroz ve karaciğer yetmezliğine gidiş vardır. K vitamini eksikliğine bağlı

kanama diyatezi ve E vitamini eksikliğine bağlı nöromusküler semptomlar gibi yağda eriyen vitamin eksikliklerine ait bulgular hastalığın başlangıcında görülebilir. Hastalarda tipik olarak normal GGT düzeyleri bulunur, ALT ve AST başlangıçta normal olabileceği gibi hastalığın ilerlediği dönemlerde 10 katına kadar yükselebilir (7). Çalışması yapılan 25 olgunun kliniğini değerlendirdiğimizde literatürle uyumlu bulgular saptandı.

PFIC, ATP8B1, ABCB11 ve ABCB4 genlerindeki mutasyonlara göre üçe ayrılmıştır. Bu genlerdeki mutasyonların sınıflaması genotip ve fenotip korelasyonuna olanak vermektedir. Klinik olarak sınıflandırılması netleşmemiş olgularda moleküler düzeydeki bulgular ile hastaların erken tanısı ve etkin tedavisi daha hızlı bir şekilde planlanabilmektedir (3).

Bu araştırmada hastalarda mutasyon saptanmamasının nedenleri arasında klinik olarak PFIC tanısı almış hastalarının

Tablo II. Hastaların klinik bulguları

Hasta	Cinsiyet	Yaş (ay)	Sarılık	Kaşıntı	İshal	Boy Kısalığı	GGT	Aile Öyküsü	Akrabalık	DNA Materyali	PFIC Tip
1	E	16 ay	+	+	+	?	20	-	+	Kan	1
2	E	24 ay	+	+	+	+	15	-	+	Parafin Blok	1
3	K	36 ay	+	+	-	+	17	-	+	Kan	1
4	E	108 ay	+	+	-	+	27	+	-	Kan	1
5	K	22 ay	+	+	?	?	21	-	+	Kan	1
6	E	12 ay	+	+	+	+	27	+	+	Kan	1
7	E	34 ay	+	+	+	+	15	?	?	Parafin Blok	1
8	K	28 ay	+	+	-	?	43	+	+	Parafin Blok	1
9	E	88 ay	+	+	-	+	53	+	-	Parafin Blok	1
10	K	10 ay	+	+	-	+	50	-	-	Parafin Blok	1
11	K	69 ay	+	+	-	+	75	-	-	Parafin Blok	2
12	E	42 ay	+	+	-	+	19	+	+	Parafin Blok	1
13	E	24 ay	+	+	+	-	26	+	+	Parafin Blok	1
14	E	16 ay	+	+	+	+	30	-	+	Parafin Blok	1
15	K	125 ay	+	+	-	-	57	-	-	Parafin Blok	1
16	K	14 ay	+	+	-	?	26	+	+	Parafin Blok	-
17	E	8 ay	+	+	-	+	6	-	+	Parafin Blok	1
18	K	6 ay	+	+	+	-	14		+	Parafin Blok	1
19	K	24 ay	+	-	-	-	24	-	-	Kan	1
20	K	24 ay	+	-	-	-	10	-	-	Kan	1
21	K	9YAŞ	+	+	-	-	23	-	-	Kan	1
22	K	3YAŞ	+	+	-	-	46	-	-	Kan	1
23	K	24 ay	+	+	-	-	480	-	-	Kan	3
24	K	6 ay	+	+	-	-	78	-	-	Kan	1
25	E	96 ay	+	+	-	-	350	-	-	Kan	3
26	E	12 ay	+	+	+	+	59	-	-	Kan	1
27	K	4 ay	+	+	-	-	318	-	-	Kan	3
28	K	32 ay	+	+	-	-	268	-	-	Kan	3
29	E	18 ay	+	+	-	-	36	-	-	Kan	1
30	E	24 ay	+	+	+	+	31	+	-	Kan	1

klirik tiplendirmelerinin histopatolojik bulgularla birlikte değerlendirilmesi gerekliliğinin yanında, klinik tanının yeniden gözden geçirilmesi gerekmektedir. Geriye dönük hastaların tekrar değerlendirilmesinde 4 hastada GGT değerlerinin yüksek olması nedeniyle tip 1 tanısından uzaklaşıldı ve tip 3 tanısı ile izleme alındı. Bir hastada ise histopatolojik ve klinik bulgular doğrultusunda izleme tip 2 olarak devam edildi. ATP8B1 geni büyük olup, 27 ekzon bulunur. Çalışmamızda mutasyonların en sık görüldüğü 3 ekzon incelenmiştir. Tüm genin incelenmesi sonucu hastalarda mutasyonun bulunabileceği düşünülmektedir.

PFIC tip 1 hastalarında ATP8B1 geninde birçok mutasyon saptanmıştır. Familial intrahepatik kolestaz hastalığında belirgin klinik farklılığın nedeni bu değişik mutasyonlar olabilir. Bazı ırklarda spesifik olarak sık görülen missense mutasyonlar 10. ekzonda olup (G308V ve D554N) tüm etkilenmiş olgularda sorumlu tutulmuştur. Kabaca ATP8B1 geninin bilinen mutasyonlarının sadece %50'si bugüne kadar gösterilmiş olup, bu mutasyonlar aminoasit rezidülerini etkilemektedir. Splice site mutasyonları, nonsense mutasyonlar ve küçük delesyonlar da gösterilmiştir. Birçok hasta 2 farklı allel için birleşik heterozigot olarak değerlendirilmiş olup bu durumda fenotip genotip korelasyonu anlamlı olmamaktadır (8). Bununla birlikte, ATP8B1'e homolog, memeli proteinlerinde aminoasit rezidülerinin korunması göz önünde bulundurularak, missense bir mutasyonun ılımlı bir fenotip ya da ilerleyici bir fenotipe yol açtığı gösterilmiştir (9). Bu öngörü ile uyumlu olarak nokta mutasyonları PFIC tip 1 hastalarında aminoasit rezidülerini etkilemektedir. PFIC hastalarındaki lokus heterojenitesi daha önceki yayınlarda da gösterilmiştir (9). ATP8B1 ve ABCB11 ve birleşik heterozigot birçok olgunun varlığı düşük GGT düzeyli intrahepatik kolestazlı olguların moleküler tanısı ve PFIC tip 1'in PFIC tip 2'den ayrımını oldukça zorlaştırmaktadır. Moleküler genetikteki yeni gelişmeler ve intrahepatik kolestazın moleküler patogenezinin keşfiyle yakın gelecekte fenotip genotip korelasyonunun aydınlatılacağı düşünülmektedir.

Sonuç

Bu çalışma PFIC ile ilgili moleküler genetik yöntemlerin etkin şekilde kullanılmasına yönelik planlanmış olup, bundan sonraki süreçte diğer ekzonlarında dizi analizlerinin yapılması planlanmıştır. Bununla birlikte incelenmiş olan 3 ekzonda mutasyon saptanmamış olması; hastaların klinik olarak tiplendirilmesinde bundan sonra daha seçici olunmasının yararlı olacağını düşündürmektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Kaynaklar

1. Clayton RJ, Iber FL, Ruchner BH, Mckusick VA. Byler's disease: fatal intrahepatic cholestasis in an Amish kindred. *Am Pediatr Soc* 1965; 67: 1025-28.
2. Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 594-9.
3. Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. Genetic basis and treatment. *Clin LiverDis* 2000; 4: 753-63.
4. Houwen RH, Baharloo S, Blankenship K, et al. Genome screening by searching for shared segments: mapping a gene for benign recurrent intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 1994; 8: 380-6.
5. Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, et al. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 1998; 20: 233-8.
6. Dixon PH, Weerasekera N, Linton KJ, et al. Heterozygous MDR3 missense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy: evidence for a defect in protein trafficking. *Hum Mol Genet.* 2000; 9: 1209-17.
7. Tümçör G, Arıkan Ç, Aydoğdu S. Çocukluk çağının tanısız problemlili kolestatik hastalığı ilerleyici ailevi intrahepatik kolestaz *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2005; 48: 355-60.
8. Bull LN, van Eijk MJ, Pawlikowska L, et al. A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet* 1998; 18: 219-24.
9. Klomp LW, Bull LN, Juijn JA, et al. Characterization of multiple different mutations in FIC1 associated with hereditary cholestasis. *Hepatology* 1999;30:407.
10. Tygstrup N, Steig BA, Juijn JA, et al. Recurrent familial intrahepatic cholestasis in the Faeroe Islands. Phenotypic heterogeneity but genetic homogeneity. *Hepatology* 1999; 29:506-8.