



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
—ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837—

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μοριακή διερεύνηση ασθενών με νόσο Wilson

**Παναγιώτης Ν. Κύτταρης
Βιολόγος**

Επιβλέπουσα: Μαρία Τζέτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ

Ιούνιος 2019

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μοριακή διερεύνηση ασθενών με νόσο Wilson

Παναγιώτης Ν. Κύτταρης

A.M.: 20160643

Επιβλέπουσα: Μαρία Τζέτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική, ΕΚΠΑ

**Εξεταστική
Επιτροπή: Μαρία Τζέτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική, ΕΚΠΑ
Ελένη Φρυσίρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρική, ΕΚΠΑ
Ιωάννα-Ραχήλ Traeger-Συνοδινού, Καθηγήτρια, Ιατρική, ΕΚΠΑ**

Ιούνιος 2019

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης «Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση» της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Η διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ευχαριστώ θερμά την Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής, Καθηγήτρια, κυρία Φρυσίρα Ελένη για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική εργασία στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής και την εμπιστοσύνη της.

Ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, κυρία Τζέτη Μαρία για την επίβλεψη και καθοδήγηση που μου έδειξε κατά την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την βιοεπιστήμονα Πούλου Μυρτώ για τις πολύτιμες συμβουλές της και τη συμβολή της στην επίλυση των εργαστηριακών προβλημάτων.

Τέλος, ευχαριστώ όλους τους υπόλοιπους συνεργάτες του εργαστηρίου για την φιλοξενία τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η νόσος Wilson (WD) είναι ένα κληρονομικό νόσημα που χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση χαλκού στο ήπαρ, τον εγκέφαλο και τους οφθαλμούς. Κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο και η συχνότητα εμφάνισης είναι 1/30000.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάλυση ολόκληρης της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του γονιδίου *ATP7B* για την ανίχνευση μεταλλάξεων που προκαλούν τη νόσο.

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε άτομα που παραπέμφθηκαν στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με υποψία νόσου Wilson.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η ομάδα μελέτης αποτελείται από 30 ασθενείς με υποψία νόσου Wilson. Ο μοριακός έλεγχος του γονιδίου *ATP7B* πραγματοποιήθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger όλων των κωδικοποιουσών περιοχών και των παρακαίμενων περιοχών στα όρια εσωνίων-εξωνίων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Βρέθηκαν 14 διαφορετικές μεταλλάξεις *ATP7B* σε 16 ασθενείς με υποψία νόσου Wilson. Οι μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν είναι οι ακόλουθες: c.3525delA (p.Gly1176Aspfs*16), c.3689T>C (p.Ile1230Thr), c.3207C>A (p.His1069Gln), c.2827G>A (p.Gly943Ser), c.1707+3insT, c.3400delC (p.Ala1135Glnfs*13), c.3688A>G (p.Ile1230Val), c.4396T>C (p.Ter1466Arg), c.2906G>A (p.Arg969Gln), c.3506T>C (p.Met1169Thr), c.2530delA (p.Val845Serfs*28), c.3295G>A (p.Gly1099Ser), c.1995G>A (p.Met665Ile) και η c.3284A>C (p.Gln1095Pro).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί στο γονίδιο *ATP7B* αποτελούν την αιτία εκδήλωσης της νόσου Wilson. Η μελέτη οδήγησε στην ανίχνευση 2 νέων μεταλλάξεων (c.3525delA και c.3689T>C) και 12 γνωστών παθολογικών μεταλλάξεων. Σε 13 ασθενείς δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Wilson's disease (WD) is a genetic disorder characterised by accumulation of copper in the liver, brain and eyes. It is inherited with autosomal recessive pattern. Its prevalence is estimated at 1/30000.

PURPOSE

The purpose of this study was to sequence the *ATP7B* gene in order to detect mutations that cause Wilson disease that the patients were referred to the Medical Genetics laboratory of National and Kapodistrian University of Athens.

MATERIALS-METHODS

The study group consists of 30 persons with possible Wilson disease. The coding portions and adjoining intronic sequences of the *ATP7B* gene were sequenced by Sanger sequencing.

RESULTS

Sequencing of the *ATP7B* gene detected, 14 different mutations in 16 individuals with possible Wilson disease. The following mutations were detected: c.3525delA (p.Gly1176Aspfs*16), c.3689T>C (p.Ile1230Thr), c.3207C>A (p.His1069Gln), c.2827G>A (p.Gly943Ser), c.1707+3insT, c.3400delC (p.Ala1135Glnfs*13), c.3688A>G (p.Ile1230Val), c.4396T>C (p.Ter1466Arg), c.2906G>A (p.Arg969Gln), c.3506T>C (p.Met1169Thr), c.2530delA (p.Val845Serfs*28), c.3295G>A (p.Gly1099Ser), c.1995G>A (p.Met665Ile) and c.3284A>C (p.Gln1095Pro).

CONCLUSIONS

Mutations in *ATP7B* gene cause Wilson disease. The study lead to the detection of 2 new mutations (c.3525delA and c.3689T>C) and 12 previously characterized mutations. No mutations were detected in 13 individuals.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Ιστορικά στοιχεία	8
1.2 Μεταβολισμός του χαλκού	8
1.3 Γονίδιο <i>ATP7B</i>	10
1.4 Μοριακή διαταραχή του γονιδίου <i>ATP7B</i>	12
1.5 Γεωγραφική συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου <i>ATP7B</i>	13
1.6 Κλινικά χαρακτηριστικά	16
1.7 Διάγνωση	19
1.8 Διαφορική διάγνωση	21
1.9 Θεραπευτικές μέθοδοι	21
1.9.1 Φάρμακα	22
1.9.2 Μεταμόσχευση του ήπατος	23
1.9.3 Ασυμπτωματικοί ασθενείς	23
2 ΣΚΟΠΟΣ	23
3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	24
3.1 Υλικό μελέτης	24
3.2 Απομόνωση DNA	24
3.3 Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	25

3.3.1 Αντιδραστήρια και διαδικασία της αντίδρασης	25
3.4 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των προϊόντων PCR- Έλεγχος ποιότητας	29
3.5 Ενζυμικός καθαρισμός του προϊόντος PCR	30
3.6 Αλληλούχηση κατά Sanger	30
3.6.1 Αντιδραστήρια και διαδικασία της αντίδρασης	30
3.7 Καθαρισμός της αντίδρασης sequencing με αιθανόλη (ethanol precipitation)	31
3.8 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός στη συσκευή 3500 Series Genetic Analyzer	31
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	40
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	42

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορικά στοιχεία

Η νόσος Wilson (WD) περιγράφηκε πρώτη φορά από τον S.A.K. Wilson το 1912 ως μια ηπατοεκφυλιστική νόσο η οποία ήταν θανατηφόρα. Για πάνω από μισό αιώνα, τα αίτια της νόσου παρέμεναν αδιευκρίνηστα και οι ασθενείς κατέληγαν χωρίς να λαμβάνουν κάποια θεραπεία. Το 1948, ο John Nathaniel Cumings ανακοίνωσε πως η νόσος οφείλεται στη συσσώρευση χαλκού στο ήπαρ και τον εγκέφαλο. Το 1955, ο John Walshe πρότεινε την πενικιλλαμίνη ως μέσο θεραπείας αλλάζοντας την πρόγνωση της WD καθώς η χρήση χηλικών παραγόντων, είναι απαραίτητη για τη δέσμευση και την απομάκρυνση της περίσσειας του χαλκού. Αργότερα, αποκαλύφθηκε πως οι μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη ATP7B ευθύνονται για την αδυναμία απομάκρυνσης του χαλκού από τον οργανισμό και τη συμπτωματολογία της νόσου. Η μεταλλαγμένη ATP7B αδυνατεί να συνδέσει το χαλκό σε χαλκοένζυμα ή κυστίδια με αποτέλεσμα τη συσσώρευση χαλκού στα ηπατοκύτταρα. Ακολούθησε η εισαγωγή νέων φαρμάκων στη θεραπεία και έγινε εφικτή η μεταμόσχευση ήπατος σε ασθενείς με ηπατική ανεπάρκεια ή με ανεκτικότητα στη φαρμακευτική θεραπεία (1).

1.2 Μεταβολισμός του χαλκού

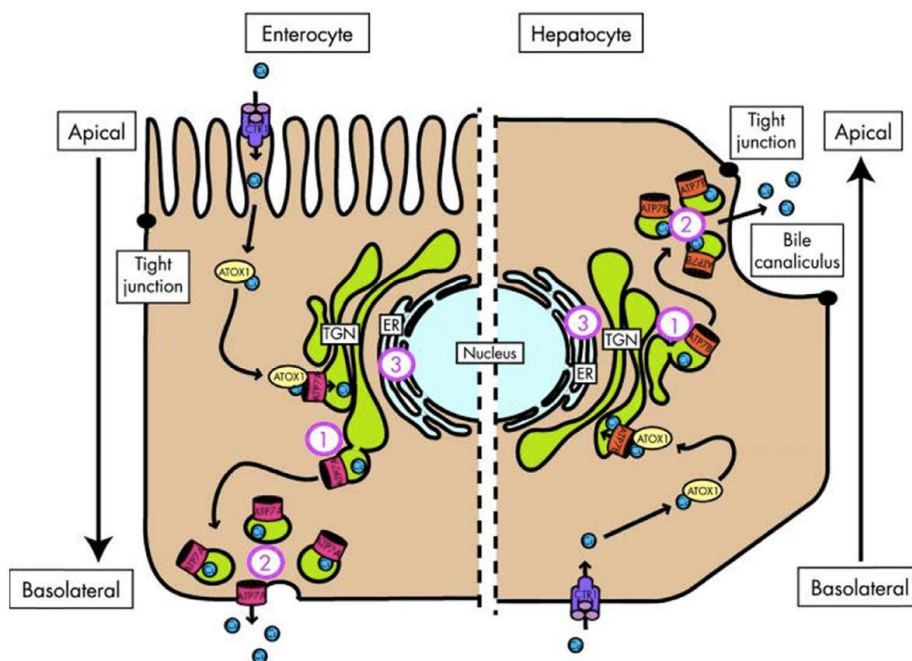
Ο χαλκός είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο με σημαντικό ρόλο σε ορισμένες μεταβολικές διαδικασίες. Χρησιμοποιείται από τα ένζυμα ως συμπράγοντας σε διαδικασίες όπως τη σύνθεση του συνδετικού ιστού, τη σύνθεση του αμινοξέος τρυπτοφάνη, την ομοιόσταση σιδήρου, την κυτταρική αναπνοή, την απομάκρυνση ελεύθερων οξειδωτικών ριζών και την παραγωγή νευροδιαβιβαστών (1). Λόγω της οξειδοαναγωγικής του ικανότητας, όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή, σχηματίζει ρίζες υδροξυλίου (OH⁻) που καταστρέφουν τη δομή των πρωτεϊνών, τα νουκλεϊκά οξέα και τα λιπίδια (2).

Με τη διατροφή προσλαμβάνουμε καθημερινά 1 με 2mg χαλκού από τα οποία το 85-95% εκκρίνεται στη χολή από το ήπαρ. Οι ασθενείς συσσωρεύουν χαλκό λόγω δυσλειτουργίας της ATP7B. Η συσσώρευση χαλκού ξεκινά στη γέννηση αλλά οι ασθενείς συχνά παραμένουν ασυμπτωματικοί μέχρι τη πρώτη ή δεύτερη δεκαετία ζωής. Ο χαλκός, λόγω τοξικότητας, οδηγεί σε συμπτώματα ηπατικής βλάβης και νευρολογικής επιδείνωσης στα προχωρημένα στάδια. Χωρίς θεραπεία επέρχεται ο θάνατος 1-3 χρόνια μετά την έναρξη των νευρολογικών συμπτωμάτων και συνήθως είναι αποτέλεσμα ηπατικής ανεπάρκειας.

Ο χαλκός εισέρχεται στα εντεροκύτταρα και τα ηπατοκύτταρα με τη βοήθεια του μεταφορέα χαλκού 1 (copper transporter 1, CTR1) και με τη συμμετοχή της συνοδού πρωτεΐνης Antioxidant

protein 1 (ATOX1) συνδέεται με τις ATP7A και ATP7B που βρίσκονται στο δίκτυο Trans Golgi (TGN) και έπειτα ενσωματώνεται σε χαλκοένζυμα ή σε μεμβρανικά κυστίδια (εικόνα 1).

Η ATP7B ενσωματώνει το χαλκό στη σερουλοπλασμίνη που εντοπίζεται εντός του TGN. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα όταν τα επίπεδα του χαλκού στο ήπαρ είναι φυσιολογικά. Η σερουλοπλασμίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία συντίθεται στα ηπατοκύτταρα και περιέχει το 95% του χαλκού του πλάσματος. Ο χαλκός συνδέεται με την σερουλοπλασμίνη και εκκρίνεται στο κυκλοφορικό μέσω κυστιδίων που σχηματίζονται στο Trans Golgi (3). Όταν τα επίπεδα χαλκού αυξηθούν, τότε η πρωτεΐνη ATP7B ενσωματώνει το χαλκό σε μεμβρανικά κυστίδια που σχηματίζονται στο Trans Golgi. Τα κυστίδια αυτά απελευθερώνουν το χαλκό στη χολή με εξωκυττάρωση.



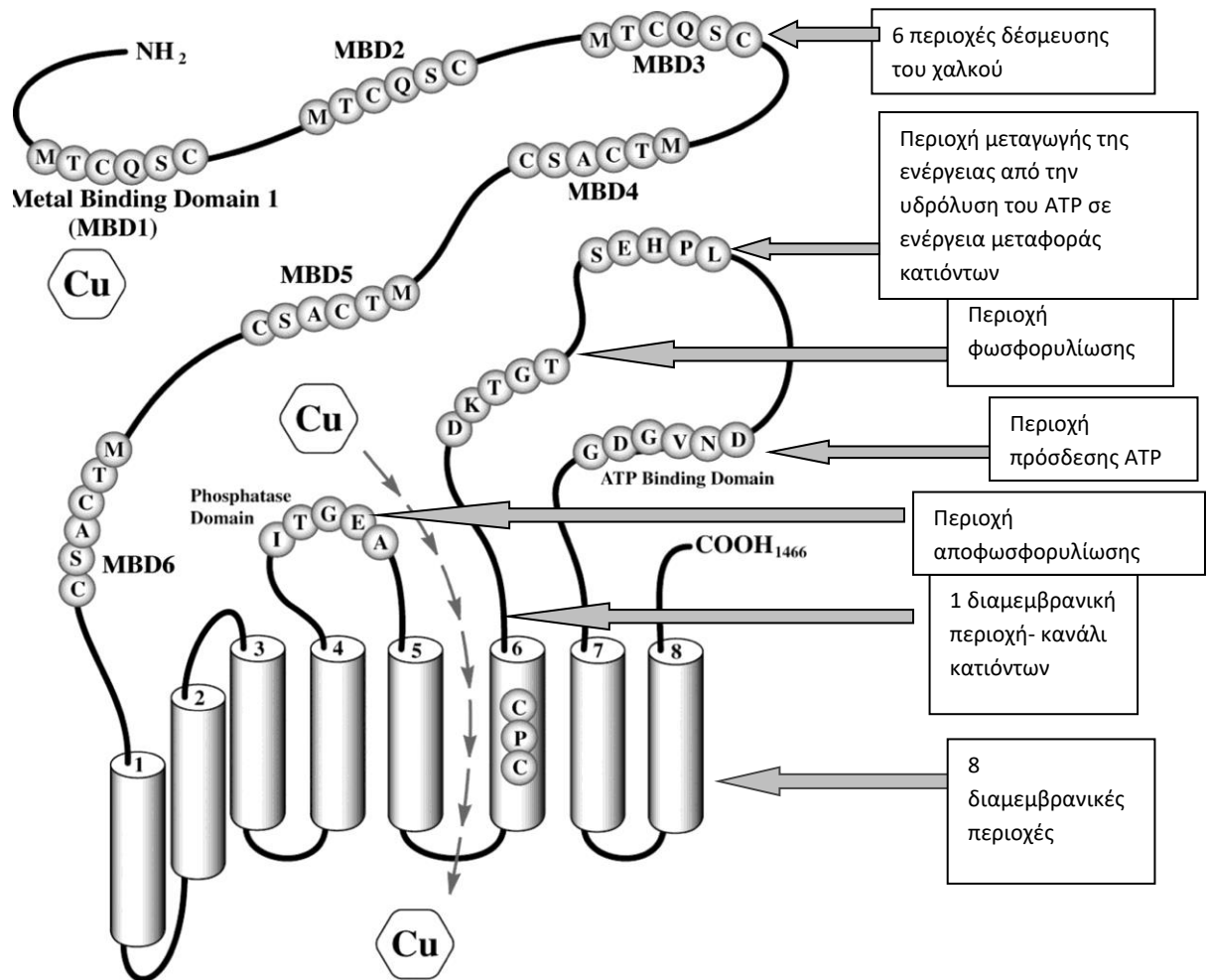
Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της επαγόμενης από χαλκό μετεγκατάστασης των πρωτεϊνών ATP7A και ATP7B. Η αριστερή πλευρά του διαγράμματος αντιπροσωπεύει ένα εντεροκύτταρο και η δεξιά πλευρά αντιπροσωπεύει ένα ηπατοκύτταρο. Και στις δύο περιπτώσεις, ο χαλκός εισέρχεται στο κύτταρο μέσω του μεταφορέα χαλκού 1 (CTR1) και με τη συμμετοχή της συνοδού πρωτεΐνης ATOX1, ο χαλκός συνδέεται με την ATP7A ή την ATP7B στο δίκτυο Trans-Golgi (TGN). Όταν τα επίπεδα του χαλκού αυξάνονται πάνω από ένα ορισμένο κατώφλι, οι πρωτεΐνες ATP7A και ATP7B εκκρίνουν χαλκό στο πλάσμα επί της βασεοπλευρικής πλευράς του εντεροκυττάρου και εντός της χολής από την κορυφαία πλευρά του ηπατοκυττάρου. Σφάλματα στον εντοπισμό του ATP7B μπορεί να οδηγήσουν σε συσσώρευση χαλκού 1) στο TGN λόγω μη ανταπόκρισης, 2)στη περιφέρεια κυττάρων και 3) στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) λόγω εσφαλμένης αναδίπλωσης. (Αναπαράγεται από τους de Bie et al., 2007)

1.3 Γονίδιο *ATP7B*

Η νόσος Wilson είναι ένα γενετικό νόσημα, που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Το υπεύθυνο γονίδιο, μεταλλάξεις του οποίου οδηγούν στην εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων είναι το *ATP7B*. Το γονίδιο *ATP7B* εντοπίζεται στην γενωμική περιοχή 13q14.3 και αποτελείται από 20 εσώνια και 21 εξώνια με μέγεθος μεταγράφου 6638bp (1465 αμινοξέα) (4). Το πρωτεϊνικό παράγωγο του γονιδίου είναι μια διαμεμβρανική ΑΤΡάση τύπου P που μεταφέρει χαλκό.

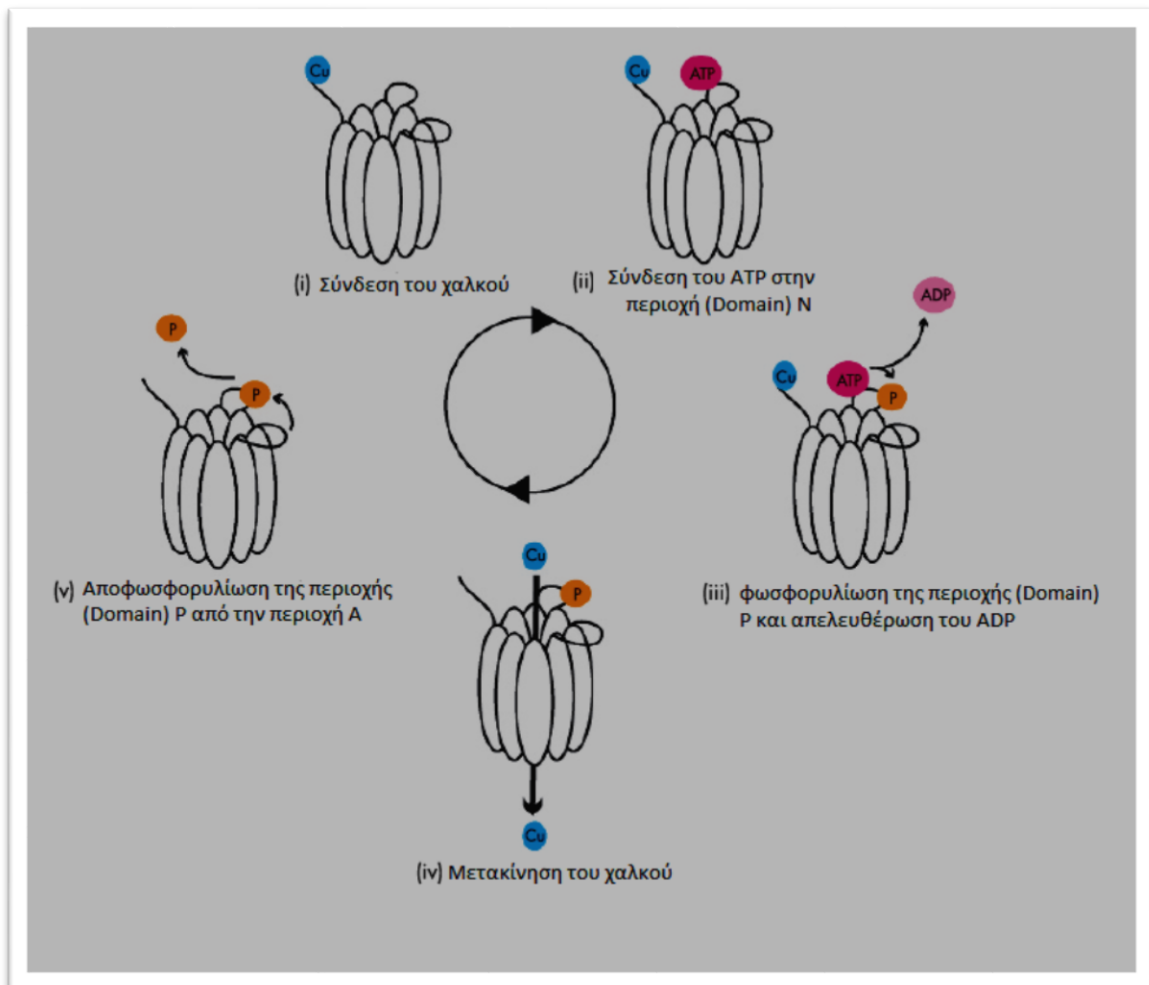
Η πρωτεΐνη συντίθεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συνέχεια εγκαθίσταται στο δίκτυο Trans Golgi. Η πρωτεΐνη *ATP7B* εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και τα νεφρά και λιγότερο στον πλακούντα, τους μαστούς, τον εγκέφαλο και τους πνεύμονες (6). Ανήκει στη κλάση 1B του τύπου P της υπεροικογένειας των ΑΤΡάσεων, η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά χαλκού και άλλων βαρέων μετάλλων μέσω της κυτταρικής μεμβράνης (7).

Η πρωτεΐνη *ATP7B* αποτελείται από 18 λειτουργικούς τομείς: 6 τομείς που δεσμεύουν 6 άτομα χαλκού στο αμινοτελικό άκρο, έναν τομέα μεταφοράς ενέργειας από την υδρόλυση του ATP (αμινοξέα 837-864 και συμπεριλαμβάνει το μοτίβο Thr-Gly-Glu), έναν τομέα διαύλου κατιόντων και φωσφορυλίωσης (αμινοξέα 971-1035 και συμπεριλαμβάνει το μοτίβο Asp-Lys-Thr-Gly-Thr που έχει διατηρηθεί δια μέσου της εξέλιξης), έναν τομέα δέσμευσης του ATP (αμινοξέα 1240-1291), έναν τομέα αποφωσφορυλίωσης και 8 υδρόφοβες διαμεμβρανικές αλληλουχίες. Στην διαμεμβρανική αλληλουχία 6 βρίσκεται η αλληλουχία Cys-Pro-Cys, η οποία είναι διατηρημένη σε όλες τις ΑΤΡάσεις τύπου P. Στις κυστεΐνες (Cys) του μοτίβου Cys-Pro-Cys προσδένεται ο χαλκός και διέρχεται από τον διάυλο κατιόντων. Ο τομέας δέσμευσης του ATP (N-domain) περιλαμβάνει το μοτίβο SEHPL (Ser-Glu-His-Pro-Leu), στο οποίο εντοπίζεται η His1069 που συνδέεται με το ATP (8). Ο τομέας φωσφορυλίωσης (P-domain) περιέχει τη διατηρημένη αλληλουχία DKTGT (Asp-Lys-Thr-Gly). Το ασπαρτικό (Asp) της DKTGT φωσφορυλιώνεται και ο χαλκός διέρχεται από τον διάυλο κατιόντων. Ο τομέας φωσφατάσης (A-domain) περιέχει την αλληλουχία Thr-Gly-Glu (TGE). Το γλουταμικό οξύ (Glu) απαιτείται για να συνδεθεί και να λειτουργήσει η περιοχή αποφωσφορυλίωσης. Η αποφωσφορυλίωση του ακυλ-φωσφορικού υποδηλώνει την ολοκλήρωση του κύκλου. Παρόλο που το καρβοξυτελικό άκρο δεν συμμετέχει στην καταλυτική δράση της *ATP7B*, διατηρεί δομικά την *ATP7B*, συμμετέχει στην εξωκυττάρωση και ρυθμίζει την μετακίνησή της από την πλασματική μεμβράνη στο TGN. Η δομή της πρωτεΐνης φαίνεται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2: Δομικές περιοχές της πρωτεΐνης ATP7B. Αποτελείται από 6 περιοχές πρόσδεσης του χαλκού, μία περιοχή δέσμευσης του ATP, μία περιοχή φωσφορυλίωσης, μία περιοχή μεταγωγής της ενέργειας από την υδρόλυση του ATP, μία διαμεμβρανική περιοχή με το κανάλι κατιόντων και 8 υδρόφοβες διαμεμβρανικές αλληλουχίες (Amy K. Wernimont, Liliya A. Yatsunyk and Amy C. Rosenzweig, 2003).

Η μεταφορά του χαλκού από το Trans Golgi ξεκινά με τη σύνδεση του χαλκού στη N-τελική περιοχή (MBD) της πρωτεΐνης, στη συνέχεια μέσω του μοτίβου Cys-Pro-Cys (CPC) διέρχεται από τον διάυλο κατιόντων στα σχηματιζόμενα κυστίδια (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της δράσης της πρωτεΐνης ATP7B ως ATPάσης. P de Bie et al., 2007

Η μετακίνηση του χαλκού από τις ATP7A και ATP7B πραγματοποιείται μέσω μίας κυκλικής διαδικασίας που περιλαμβάνει κάποια διακριτά στάδια. Αυτά τα στάδια περιλαμβάνουν: (i) την πρόσδεση του χαλκού (ii) σύνδεση του ATP στην περιοχή (Domain) N (iii) την υδρόλυση του ATP και την φωσφορυλίωση της περιοχής P (iv) την μετακίνηση του χαλκού (v) την αποφωσφορυλίωση της περιοχής (Domain) P από την περιοχή (Domain) A

1.4 Μοριακή διαταραχή του γονιδίου *ATP7B*

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *ATP7B* ανήκουν σε όλα τα είδη. Υπάρχουν παρερμηνεύσιμες και μη νοηματικές (60%), ενθέσεις/ελλείψεις (26%) και μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης (9%). Άλλες γενετικές διαταραχές είναι οι ελλείψεις ολόκληρων των εξωνίων, οι μεταλλάξεις στην περιοχή του υποκινητή και στις περιοχές συρραφής εξωνίων (9, 10). Οι μη νοηματικές μεταλλάξεις (13% των γνωστών σημειακών μεταλλάξεων) (11) και οι μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης οδηγούν σε αποδόμηση του mRNA ή σε κολοβωμένη πρωτεΐνη (truncated protein).

Η μετάλλαξη p.His1069Gln στο εξώνιο 14 είναι η πιο κοινή μετάλλαξη παγκοσμίως και έχει συχνότητα 35% στον Ελληνικό πληθυσμό. Οι ομόζυγοι ασθενείς με τη μετάλλαξη p.His1069Gln έχουν πιο ήπιο φαινότυπο, με συχνές νευρολογικές εκδηλώσεις (30%) και έναρξη συμπτωμάτων σε ηλικίες 16-20 ετών (11). Η μετάλλαξη οφείλεται στην αντικατάσταση της

ιστιδίνης του μοτίβου SEHPL στην περιοχή N της ATP7B από τη γλουταμίνη με αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας σύνδεσης του ATP, το εσφαλμένο δίπλωμα της περιοχής N και την ανώμαλη φωσφορυλίωση στην περιοχή P.

Η p.Arg969Gln είναι η δεύτερη συχνότερη μετά την p.His1069Gln και έχει συχνότητα 12% στον Ελληνικό πληθυσμό. Η αντικατάσταση της αργινίνης από γλουταμίνη στη θέση 969 της πρωτεΐνης έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού μεταφοράς χαλκού (12).

Η μετάλλαξη c.2530delA (p.Val845Serfs*28) εντοπίζεται στην διαμεμβρανική αλληλουχία, έχει συχνότητα 7% στον Ελληνικό πληθυσμό και οδηγεί σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κολοβωμένης πρωτεΐνης. Συνεπώς, η πρωτεΐνη αδυνατεί να μεταφέρει το χαλκό (12).

Η μετάλλαξη p. Gly943Ser έχει συχνότητα 0,7% στον Ελληνικό πληθυσμό, οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος γλυκίνη σε σερίνη στη θέση 943 της αμινοξικής αλυσίδας που εντοπίζεται στην 5^η διαμεμβρανική αλληλουχία και εμποδίζει τις διαμεμβρανικές αλλαγές οι οποίες απαιτούνται για την απομάκρυνση του κυστιδίου από το Trans Golgi ή αναστέλλει τη μοριακή στόχευση στη μεμβράνη.

1.5 Γεωγραφική συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου *ATP7B*

Η συχνότητα εμφάνισης της WD ποικίλει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, με υψηλότερο επιπολασμό ορισμένων μεταλλάξεων σε συγκεκριμένους πληθυσμούς (28)(εικόνα 4).

Ευρώπη

Η συχνότητα της μετάλλαξης p.His1069Gln σε ασθενείς ποικίλει ανάλογα με τη γεωγραφική καταγωγή (Ferenci, 2006) (πίνακας 1). Από τις Ευρωπαϊκές χώρες, η μεγαλύτερη συχνότητα αλληλομόρφου παρατηρείται στην Πολωνία (72%), την πρώην Ανατολική Γερμανία (63%) και τη Βουλγαρία (55,8%). Στις υπόλοιπες Ευρωπαϊκές χώρες η συχνότητα του αλληλομόρφου σε ασθενείς είναι η εξής: Τσεχία και Σλοβακία (57%), Ρωσία (49%), Πρώην Γιουγκοσλαβία (48,9%), Γερμανία (47,9%), Ουγγαρία (42,9%), Ρουμανία (38,1%), Σουηδία (38%), Ελλάδα (35%), Αυστρία (34,1%), Ολλανδία (33%), Αγγλία (19%), Δανία (18%), Ιταλία (17,5%), Τουρκία (17,4%) και Γαλλία (15%). Παρ' όλα αυτά, ορισμένες χώρες εμφανίζουν ένα διαφορετικό φάσμα μεταλλάξεων. Στην Ισπανία, η παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη p.Met645Arg (27%) είναι η πιο συχνή, ενώ στα Κανάρια νησιά η p.Leu708Pro (64%). Η Σαρδηνία αποτελεί, επίσης, μία εξαίρεση, όπου παρατηρείται η έλλειψη στο 5' αμετάφραστο άκρο c.-441_-427del (60,5%) και ακολουθείται από την μετάλλαξη p.Met822Trpfs*51 (8,5%) και την p.Val1146Met (7,9%).

Ινδία

Η μελέτη μεταλλάξεων της νόσου Wilson σε διαφορετικές περιοχές της Ινδίας δείχνει πως υπάρχει υψηλή γενετική ετερογένεια ενώ απουσιάζουν οι μεταλλάξεις που οφείλονται σε κάποιον κοινό πρόγονο (μεταλλάξεις ιδρυτή). Στη βόρεια Ινδία, οι πιο συχνές μεταλλάξεις είναι η p.Arg778Trp (19%), η p.Ile1102Thr (12%) και η p.Pro992His (9%), ενώ στη νότια Ινδία η p.Ala1003Val (11%), η p.Cys271* (11%), η p.Pro768Leu (9%) και η p.Arg969Gln (9%). Μεγάλη ποικιλομορφία των μεταλλάξεων παρατηρείται και ανάμεσα στην ανατολική και τη δυτική χώρα. Στα ανατολικά, οι συχνότερες μεταλλάξεις είναι η p.Cys271* (16%), η p.Gly1061Glu (11%)

και η c.1708-1G>C (8.5%). Στα δυτικά, οι συχνότερες μεταλλάξεις είναι η p.Cys271* (20%), η p.Glu122fs (11%), η p.Thr977Met και η p.Leu795Phe (6%) (29, 30).

Ανατολική Ασία

Τα δεδομένα της ανατολικής Ασίας προέρχονται κυρίως από την Κίνα, την Ιαπωνία και την Κορέα. Στην Κίνα, το 67% των μεταλλάξεων της νόσου Wilson εντοπίζεται στα εξώνια 8, 12 και 13 (Li et al., 2011), με συχνότερη την p.Arg778Leu (28.4–33.8%). Ακολουθούν οι μεταλλάξεις p.Pro992Leu (8.8–11.2%) και p.Thr935Met (0.86–6.8%). Στην Ιαπωνία, οι μεταλλάξεις συγκεντρώνονται στα εξώνια 8, 13 και το εσώνιο 4 σε ποσοστό 40% (31). Η μετάλλαξη p.Asn958Thrfs*9 (c.2871delC) (15.9–20%) είναι η συχνότερη, μετά η p.Arg778Leu (13.4–20%) και η c.1708-5T>G (11%). Στην Κορέα, οι επικρατέστερες μεταλλάξεις είναι η p.Arg778Leu(37.9%), η p.Asn1270Ser (12.1%) και η p.Ala874Val (9.4%).

Κεντρική Ασία

Στη Σαουδική Αραβία πραγματοποιήθηκε ανάλυση 56 ασθενών για την ταυτοποίηση των παθολογικών μεταλλάξεων (32). Η ανάλυση έδειξε πως οι μεταλλάξεις βρίσκονται σε τρία εξώνια (εξώνια 8, 19 και 21) του ATP7B στο 50% των ασθενών. Οι δύο συχνότερες μεταλλάξεις είναι η p.Gln1399Arg (32%) και η p.Ser774Arg (16%). Μία μελέτη στο Ιράν το 2011 ανέφερε πως η μετάλλαξη p.His1069Gln είναι η συχνότερη μετάλλαξη στον Ιρανικό πληθυσμό με συχνότητα αλληλομόρφου 19%.

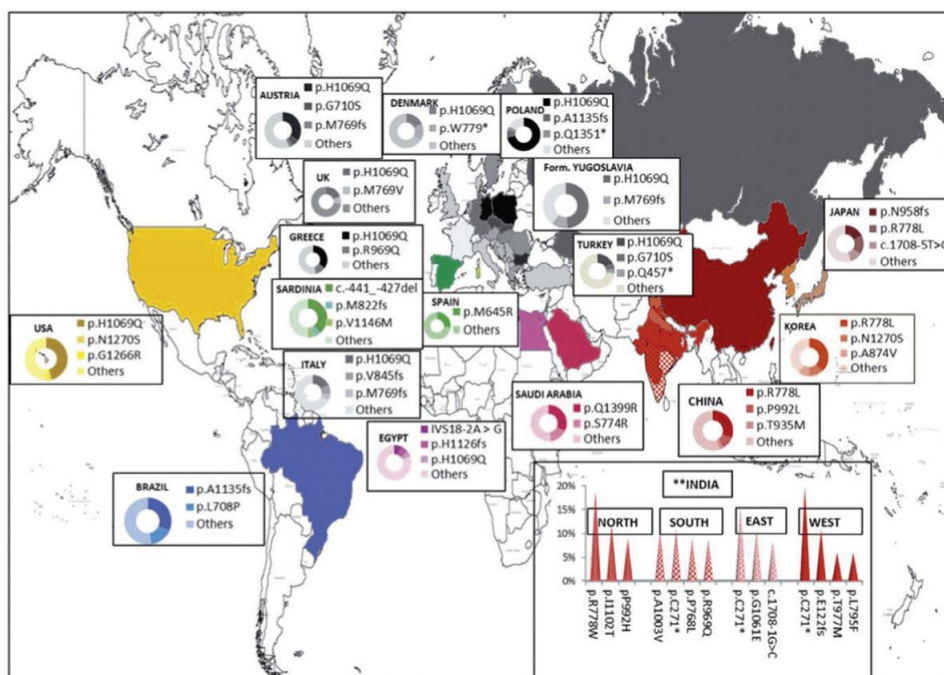
Αφρική

Το 2011 πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση του γονιδίου ATP7B σε 64 ασθενείς νόσου Wilson Αιγυπτιακής καταγωγής. Η συχνότερη μετάλλαξη είναι η c.3698A>G (7%), η οποία ακολουθείται από τη p.His1126Profs*3 (6.25%) και τη p.His1069Gln (5.46%).

Αμερική

Η μελέτη στις ΗΠΑ αφορούσε 108 ασθενείς με Ευρωπαϊκή καταγωγή. Η μετάλλαξη p.His1069Gln (η συχνότερη στην Ευρώπη) έχει την μεγαλύτερη συχνότητα (40,3%) και μετά η p.Asn1270Ser (1,9%) και η Gly1266Arg (1,9%).

Οι μελέτες στη Βραζιλία έδειξαν πως οι συχνότερες μεταλλάξεις είναι η p.Ala1135Glnfs*13 (c.3402delC) (30.8–31.7%) και η p.Leu708Pro (15.8–16.7%). Η κατανομή στη Βραζιλία είναι παρόμοια με αυτή στη Μεσόγειο λόγω του μεταναστευτικού ρεύματος στη νότια Αμερική (15).



Εικόνα 4: Συχνότητα των μεταλλάξεων ATP7B ανά περιοχή. Όσο πιο σκούρο το χρώμα, τόσο υψηλότερη η συχνότητα του αλληλομόρφου (Gomes and Dedoussis, 2016)

Πίνακας 1: Συχνότητα μετάλλαξης p.H1069Q σε διάφορους πληθυσμούς (Panagiotakaki et al. 2004)

Χώρα	Συχνότητα αλληλομόρφου %	Βιβλιογραφική αναφορά
Πολωνία	72	Gromadzka et al. (2005)
Πρώην ανατολική Γερμανία	63	Caca et al. (2001)
Βουλγαρία	55.8	Todorov et al. (2005)
Τσεχία και Σλοβακία	57	Vrabelova et al. (2005)
Ρωσία	49	Ivanova-Smolenskaya et al. (1999)
Πρώην Γιουγκοσλαβία	48.9	Loudianos et al. (2003)
Γερμανία	47.9	Ferenci (2006)
Ουγγαρία	42.9	Firneisz et al. (2002)
Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής	40.3	Kuppala et al. (2009)
Ρουμανία	38.1	Iacob et al. (2012)
Σουηδία	38	Shah et al. (1997)
Ελλάδα	35	Panagiotakaki et al. (2004)
Αυστρία	34.1	Ferenci (2006)
Ολλανδία	33	Stapelbroek et al. (2004)
Ιράν	19	Zali et al. (2011)
Αγγλία	19	Coffey et al. (2013)
Δανία	18	Møller et al. (2011)
Ιταλία	17.5	Loudianos et al. (1999)
Τουρκία	17.4	Simsek Papur et al. (2013)
Γαλλία	15	Bost et al. (2012)
Αίγυπτος	5.5	Abdel Ghaffar et al. (2011)

1.6 Κλινικά χαρακτηριστικά

Η νόσος Wilson είναι μια διαταραχή μεταβολισμού του χαλκού με ηπατικές, νευρολογικές και ψυχιατρικές διαταραχές ή συνδυασμό αυτών, σε άτομα ηλικίας 3 έως άνω των 50 ετών. Τα συμπτώματα ποικίλουν μεταξύ ατόμων της ίδιας οικογένειας εξαιτίας της επίδρασης της επιγενετικής και γονιδίων-τροποποιητών. Ένας μεγάλος αριθμός ασθενών έχει μικτές εκδηλώσεις από διάφορα συστήματα.

Ηπατική βλάβη

Η μέση ηλικία εμφάνισης ηπατικής βλάβης είναι τα 15 ετή, αλλά μπορεί να εμφανιστεί όψιμα, για παράδειγμα σε άτομα άνω των 60 ετών. Οι ασθενείς έχουν ποικίλες ηπατικές εκδηλώσεις και συμπτώματα όπως μικρή ή μέτρια αύξηση ηπατικών ενζύμων, προοδευτική κίρρωση του ήπατος με ίκτερο, κόπωση, ανορεξία, χρόνια ενεργή ηπατίτιδα με οριακή αύξηση των τρανσαμινασών και οξεία ηπατική ανεπάρκεια με αιμόλυση και σπληνομεγαλία.

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί ασθενείς Wilson με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και χολαγγειοκαρκίνωμα. Η συχνότητα είναι μικρή και υπολογίζεται πως είναι κάτω από 1% των ασθενών. Μεγάλη σημασία έχουν και οι ιογενείς λοιμώξεις στην ιστική βλάβη του ήπατος.

Προσβολή του νευρικού συστήματος

Η παρκινσονική συνδρομή με τρέμουλο, βραδυκινησία, σπαστικότητα, δυσαρθρία, δυσφαγία και η επιδείνωση του συντονισμού των εκούσιων κινήσεων είναι τα συχνότερα συμπτώματα. Συχνά συνοδεύονται από ακούσιες κινήσεις και δυστονία (περιστροφικές και επαναλαμβανόμενες κινήσεις μέρους του σώματος ή και ανώμαλες θέσεις μελών του σώματος) (εικόνα 5). Η ψευδοπρομηκική παράλυση (αμφοτερόπλευρη σπαστικότητα μυών προσώπου και κατάποσης) μπορεί να αναπτυχθεί αρκετά νωρίς και αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου σε ασθενείς που δεν έλαβαν θεραπεία. Επίσης, παρατηρείται δυσλειτουργία της παρεγκεφαλίδας στο 25% των ασθενών με νευρολογικά συμπτώματα και βλάβες στα βασικά γάγγλια του εγκεφάλου λόγω εναπόθεσης χαλκού (14). Η επιδείνωση των ανώτερων πνευματικών λειτουργιών και της συμπεριφοράς είναι συχνή καθώς εξελίσσεται η νόσος. Μπορούν να παρατηρηθούν αλλαγές συμπεριφοράς με εναλλαγές συναισθήματος, μείωση της ικανότητας για πνευματικές ενασχολήσεις όπως μείωση της σχολικής απόδοσης, απώλεια ελέγχου των συναισθημάτων, αϋπνία, άγχος, παρορμητική συμπεριφορά, επιληψία, σχιζοφρένεια και άλλες ψυχώσεις (14, 15).

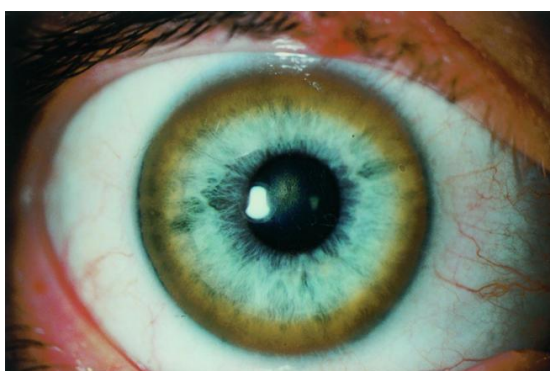


Εικόνα 5: Ασθενείς με νόσο Wilson. Aggarwal and Bhatt, 2013

Οι ασθενείς με νόσο Wilson εμφανίζουν δυστονία στα άκρα του σώματος και σπαστικότητα μυών στο πρόσωπο.

Προσβολή των οφθαλμών

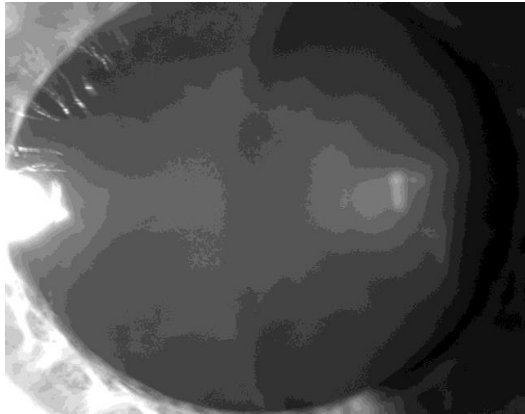
Οι δακτύλιοι Kayser-Fleischer (KF) είναι χαρακτηριστικοί στη νόσο Wilson, έχουν χρώμα κίτρινο-πράσινο και εντοπίζονται στη μεμβράνη του Descemet στην περιφέρεια του κερατοειδούς. Σχηματίζονται από την εναπόθεση του χαλκού στην περιφέρεια της κόρης του οφθαλμού (Εικόνα 6). Οι δακτύλιοι εξαφανίζονται με τη θεραπεία και η όραση δεν επηρεάζεται. Όταν αναπτυχθούν πλήρως, γίνονται ορατοί με γυμνό μάτι ή με το οφθαλμοσκόπιο, αλλά στα αρχικά στάδια η εξέταση γίνεται με τη σχισμοειδή λυχνία. Οι δακτύλιοι Kayser-Fleischer παρατηρούνται στο 50%-60% των ασθενών με ηπατική νόσο και στο 95% των ασθενών με νευρολογικά ευρήματα. Εμφανίζονται και σε ασθενείς με άλλα νοσήματα του ήπατος που συνοδεύονται από μεγάλο φορτίο χαλκού όπως την πρωτοπαθή χολική κίρρωση και την πρωτοπαθή χολαγγειίτιδα (φλεγμονή χοληφόρων πόρων) (16).



Εικόνα 6: Ο έντονα χρωματισμένος δακτύλιος Kayser-Fleischer στον δεξί οφθαλμό. Sullivan et al 2002

Ο καταρράκτης δίκην ηλιοτροπίου περιγράφηκε πρώτη φορά το 1922 από τους Siemerling και Oloff. Εμφανίζεται ως μία παχιά κεντρική θολερότητα λόγω εναπόθεσης χαλκού στον κρυσταλλοειδή φακό (Εικόνα 7). Η διάγνωση του καταρράκτη γίνεται με τη σχισμοειδή λυχνία.

Μικρό ποσοστό ασθενών (15%) εμφανίζει καταρράκτη δίκην ηλιοτροπίου αλλά δεν αποτελεί κλινικό σημείο για WD (17).



Εικόνα 7: Καταρράκτης δίκην ηλιοτροπίου που φαίνεται στην εξέταση με σχισμοειδή λυχνία.
Wosko et al., 2015

Οξείες αιμολυτικές κρίσεις

Εμφανίζονται σε ορισμένους ασθενείς εξαιτίας των πολύ υψηλών επιπέδων χαλκού μη ενσωματωμένου στη σερουλοπλασμίνη. Ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός, όμως ο συσσωρευμένος χαλκός κάνει ζημιά στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, επιταχύνει την οξείδωση της αιμοσφαιρίνης και απενεργοποιεί ένζυμα των μονοπατιών της φωσφορικής πεντόζης και της γλυκόλυσης. Οι οξείες αιμολυτικές κρίσεις προκαλούνται από την μαζική απελευθέρωση χαλκού από το ήπαρ. Για αυτό, χορηγούνται μεγάλες δόσεις γλυκοκορτικοειδών, τα οποία προστατεύουν από την οξεία αιμόλυση (18).

Νεφρική βλάβη

Οι νεφρικοί λίθοι έχουν βρεθεί σε ορισμένους ασθενείς με WD. Η συσσώρευση του χαλκού στα νεφρά προκαλεί νεφρική σωληναριακή διαταραχή, η οποία μαζί με την υπερασβεστιουρία ευθύνονται για την ανεπαρκή οξεοποίηση των ούρων (19).

Εργαστηριακά ευρήματα

Η σερουλοπλασμίνη του ορού είναι πολύ μειωμένη στους ασθενείς (<200 mg/L). Η σερουλοπλασμίνη διαμορφώνεται δομικά στο Trans Golgi. Όμως, λόγω απουσίας της ATP7B δεν γίνεται η μεταφορά χαλκού στη σερουλοπλασμίνη η οποία εμφανίζει δομική αστάθεια και διασπάται γρήγορα όταν εκκριθεί στο κυκλοφορικό. Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στη διάγνωση καθώς το 5% των ασθενών με νευρολογικά συμπτώματα και το 40% των ασθενών με ηπατικά συμπτώματα έχουν φυσιολογικές τιμές σερουλοπλασμίνης. Η μέτρηση και μόνο της συγκέντρωσης της σερουλοπλασμίνης του ορού δεν αρκεί για τη διάγνωση της WD, δηλαδή χρειάζεται να αξιολογηθούν και άλλα ευρήματα του συστήματος βαθμολόγησης.

Ο συνδυασμός χαμηλής συγκέντρωσης σερουλοπλασμίνης και φυσιολογικής ή υψηλής συγκέντρωσης χαλκού στον ορό δείχνει πως υπάρχει περίσσεια χαλκού που δε δεσμεύεται στη σερουλοπλασμίνη. Η υψηλή συγκέντρωση ελεύθερου χαλκού είναι άμεσο αποτέλεσμα της υπερφόρτωσης του οργανισμού με χαλκό. Η μέτρηση της συγκέντρωσης του χαλκού στα ούρα

πραγματοποιείται στα πλαίσια διερεύνησης της νόσου και στους ασθενείς αναμένεται αυξημένη (>100μg/24h).

Η συγκέντρωση του χαλκού στο ήπαρ είναι συνήθως αυξημένη στους ασθενείς με WD. Σε μεταγενέστερα στάδια της νόσου, ο χαλκός κατανέμεται άνισα στο ήπαρ και ως εκ τούτου η μέτρηση της συγκέντρωσης του ηπατικού χαλκού είναι λιγότερη αξιόπιστη (20).

1.7 Διάγνωση

Η WD εμφανίζεται τόσο σε παιδιά και νέους, όσο και σε οποιαδήποτε άλλη ηλικία. Στα πλαίσια της διερεύνησης των ασθενών πραγματοποιείται μέτρηση της συγκέντρωσης σερουλοπλασμίνης και χαλκού στον ορό με νεφελομετρική μέθοδο, μέτρηση χαλκού στα ούρα και το ήπαρ με φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης, οφθαλμολογική εξέταση με σχισμοειδή λυχνία, βιοχημικός έλεγχος της ηπατικής λειτουργίας, νευρολογική εξέταση και βιοψία ήπατος σε κάποιες περιπτώσεις.

Ο γενετικός έλεγχος είναι συμπληρωματικός για την επιβεβαίωση της νόσου αλλά είναι απαραίτητος προκειμένου να προσδιοριστούν οι δύο παθολογικές μεταλλάξεις και να μπορέσει να γίνει έλεγχος στους συγγενείς των ασθενών (26). Η προσυμπτωματική εντόπιση των ασθενών είναι ζωτικής σημασίας για την αποφυγή εκδήλωσης συμπτωμάτων. (21). Αλλά τα αρνητικά αποτελέσματα δεν αποκλείουν πάντα τη νόσο Wilson (20). Έχει διαμορφωθεί ένα διαγνωστικό σύστημα βαθμολόγησης για τη νόσο Wilson από επιστήμονες στο Leirzig της Γερμανίας το οποίο υιοθετήθηκε στη συνέχεια από την ευρωπαϊκή εταιρεία μελέτης ήπατος στη νόσο Wilson (16) με σκοπό την καλύτερη αξιολόγηση των ασθενών (20). Το σύστημα βαθμολόγησης περιλαμβάνει τα εξής διαγνωστικά στοιχεία:

- 1) Την σερουλοπλασμίνη ορού
- 2) Την 24ωρη απέκκριση χαλκού μέσω ούρων
- 3) Την παρουσία αιμολυτικής αναιμίας
- 4) Τον ηπατικό χαλκό
- 5) Την παρουσία δακτυλίων Kayser-Fleischer
- 6) Τα νευρολογικά συμπτώματα
- 7) Την παρουσία μεταλλάξεων

Πίνακας 2: Βαθμολογική κλίμακα για τη διάγνωση της νόσου Wilson

Συμπτώματα	
Δακτύλιοι Kayser-Fleischer	
Παρόντες	2
Απόντες	0
Νευρολογικά συμπτώματα ή τυπική μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου	
Σοβαρά	2
Μέτρια	1
Απόντα	0
Σερουλοπλασμίνη ορού	
Φυσιολογική (>0,2g/L)	0
0,1-0,2g/L	1
<0,1g/L	2
Αιμολυτική αναιμία με αρνητική Coombs	
Παρούσα	1
Απούσα	0
Χαλκός ήπατος με απουσία χολόστασης	
>5× ανώτατο φυσιολογικό όριο (>4μmol/g)	2
0,8-4μmol/g	1
Φυσιολογικός (<0,8μmol/g)	-1
Ροδανίνη ηπατοκυττάρων αν δεν είναι δυνατή η μέτρηση του χαλκού ήπατος	1
Χαλκός ούρων με απουσία οξείας ηπατίτιδας	
Φυσιολογικός	0
1-2× ανώτατο φυσιολογικό όριο	1
>2 του ανώτατου φυσιολογικού ορίου	2
Φυσιολογικός αλλά >5× ανώτατο φυσιολογικό όριο μετά από πενικιλλαμίνη	2
Ανίχνευση μεταλλάξεων	
Μεταλλάξεις και στα δύο χρωμοσώματα	4
Μετάλλαξη στο ένα μόνο χρωμόσωμα	1
Απουσία μετάλλαξης	0

Αξιολόγηση της βαθμολογίας

≥4 βαθμοί: Τίθεται η διάγνωση της νόσου Wilson

2-3 βαθμοί: πιθανή η διάγνωση, απαιτείται περαιτέρω έλεγχος

0-1 βαθμοί: μη πιθανή η διάγνωση της νόσου

1.8 Διαφορική διάγνωση

Ορισμένες ηπατικές νόσοι που παρουσιάζουν ανώμαλους βιοχημικούς δείκτες με ή χωρίς ηπατομεγαλία που πρέπει να αποκλειστούν είναι οι εξής:

- Χρόνια ιϊκή ηπατίτιδα
- Αυτοάνοση ηπατίτιδα
- Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH)
- Πρωτοπαθής χολοαγγειίτιδα
- Φαρμακευτική ηπατοτοξικότητα
- ΗFE-σχετιζόμενη κληρονομική αιμοχρωμάτωση
- Ανεπάρκεια A-1-αντιθρυψίνης
- Αλκοολική ηπατική ασθένεια
- Πρωτοπαθής χολική κίρρωση
- οξεία ιϊκή ηπατίτιδα οποιασδήποτε αιτιολογίας
- φαρμακευτική τοξικότητα

Οι δακτύλιοι Kayser-Fleischer μπορεί να εμφανιστούν και σε άλλες παθήσεις όπως η χολοστατική ηπατική ασθένεια ή η αυτοάνοση ηπατίτιδα. Επίσης, η μειωμένη συγκέντρωση της σερουλοπλασμίνης μπορεί να οφείλεται σε οξεία ηπατική ανεπάρκεια ή κίρρωση οποιασδήποτε αιτιολογίας. Η μειωμένη συγκέντρωση σερουλοπλασμίνης παρατηρείται στην εντεροπάθεια, το νεφρωσικό σύνδρομο, τον υποσιτισμό, την τελικού σταδίου ηπατοπάθεια, την σοβαρή ανεπάρκεια χαλκού καθώς και σε ορισμένες νευρολογικές διαταραχές και σε ορισμένους ετεροζυγώτες WD (16). Η συγκέντρωσή της εξαρτάται από την ηλικία. Η σερουλοπλασμίνη, ως προϊόν φλεγμονώδους αντίδρασης, αυξάνεται σε φλεγμονές, μολύνσεις και τραύματα λόγω αυξημένης γονιδιακής έκφρασης στα ηπατοκύτταρα με την επίδραση φλεγμονωδών κυτταροκινών. Η συγκέντρωση της σερουλοπλασμίνης είναι <2 mg/dL στη κληρονομική ασερουλοπλασμιναιμία (27).

Η μεγάλη συγκέντρωση χαλκού στο ήπαρ μπορεί να οφείλεται σε χρόνια χολόσταση (ελάττωση ή αναστολή χολικής ροής) ή ελαττωματική χολική απέκκριση. Παθολογικές καταστάσεις με νευρολογική βάση είναι ο οικογενής τρόμος, η νόσος Parkinson, η νόσος Huntington, ο νεανικός τύπος Parkinson, οι κληρονομικές μορφές δυστονίας, ο υπερθυρεοειδισμός, η νεοπλασία του ΚΝΣ και η νόσος Niemann-Pick σχετιζόμενη με ηπατική βλάβη (16).

1.9 Θεραπευτικές μέθοδοι

Η θεραπεία της WD γίνεται με φάρμακα που δεσμεύουν το χαλκό και εμποδίζουν την απορρόφησή του από το πεπτικό σύστημα. Οι χηλικοί παράγοντες που δίνονται είναι η πενικιλλαμίνη και η τριεντίνη. Η λήψη ψευδαργύρου με την μορφή αλάτων ψευδαργύρου μειώνει την εντερική απορρόφηση του χαλκού.

1.9.1 Φάρμακα

Πενικιλλαμίνη

Το 1955, ο John Walshe απέδειξε ότι η πενικιλλαμίνη, ως θειόλη με μία σουλφυδρυλομάδα, είναι ένας χηλικός παράγοντας που βελτιώνει την κλινική εικόνα των ασθενών με WD.

Κινητοποιεί τις αποθήκες χαλκού των ιστών και η μακροχρόνια χρήση της ρυθμίζει αποτελεσματικά το ισοζύγιο του χαλκού. Καθώς αδειάζουν οι αποθήκες χαλκού, μειώνεται η έκκριση του χαλκού, ιδιαίτερα από το τέλος του έτους χρήσης. Η πενικιλλαμίνη συστήνεται να χρησιμοποιηθεί σε συμπτωματικούς ασθενείς κατά την αρχική οξεία φάση και αργότερα ως συντηρητική θεραπεία. Επίσης, συστήνεται σε προσυμπτωματικούς ασθενείς. Η αποτελεσματικότητα φαίνεται σε κλινικό επίπεδο, όπου η ηπατική δυσλειτουργία σταθεροποιείται και παρατηρείται ιστολογική πρόοδος. Υπάρχει βελτίωση στα κινητικά, γνωστικά και σωματικά προβλήματα. Οι δακτύλιοι Kayser–Fleischer περιορίζονται και εξαφανίζονται.

Στους περισσότερους ασθενείς η πενικιλλαμίνη μπορεί να συνταγογραφηθεί μακροπρόθεσμα και χρειάζεται συστηματικός έλεγχος για τις ανεπιθύμητες παρενέργειες. Μπορεί να δοθεί και σε εγκύους χωρίς να προκαλέσει προβλήματα. Ωστόσο, πρέπει να δίνεται συστηματικά στην έγκυο διαφορετικά προκαλείται επιδείνωση των συμπτωμάτων. Ο θηλασμός πρέπει να αποφεύγεται καθώς η πενικιλλαμίνη περνά μέσω του γάλακτος στο νεογνό. Η δόση μπορεί να μειωθεί όταν επανέλθει η κλινική εικόνα του ασθενούς. Η συντηρητική θεραπεία πρέπει να συνεχιστεί εφ' όρου ζωής, ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση του χαλκού ξανά.

Η επιδείνωση των νευρολογικών συμπτωμάτων αποτελεί την πιο ανησυχητική παρενέργεια του φαρμάκου. Αναφέρεται στο 10% ή παραπάνω των ασθενών (22). Πέραν τούτου, η πενικιλλαμίνη έχει συσχετιστεί με πρώιμες ή όψιμες παρενέργειες. Οι πρώιμες εκδηλώσεις περιλαμβάνουν πυρετό, δερματικά εξανθήματα, λεμφαδενοπάθεια, κυτταροπενία, λευκοπενία και πρωτεϊνουρία. Οι όψιμες παρενέργειες αν και σπάνιες είναι συνήθως θανατηφόρες, εμφανίζονται μετά από χρόνια ή δεκαετίες και περιλαμβάνουν λύκο ή νεφρωσικό σύνδρομο, νεφρική ανεπάρκεια και μυασθένεια Gravis. Σε περίπτωση σοβαρών παρενεργειών, η πενικιλλαμίνη πρέπει να αντικατασταθεί άμεσα από την τριεντίνη (16).

Τριεντίνη

Η ανάγκη για ένα διαφορετικό φάρμακο προέκυψε ύστερα από εμφάνιση παρενεργειών, όπως νεφροπάθεια και νεφρική ανεπάρκεια, σε ορισμένους ασθενείς που λάμβαναν πενικιλλαμίνη. Ο Walshe, βασιζόμενος σε κλινικές μελέτες, έδειξε ότι η τριεντίνη έχει δομή πολυαμίνης και δεσμεύει το χαλκό και τον απομακρύνει μέσω της ούρησης.

Η τριεντίνη συστήνεται σε ασυμπτωματικούς και συμπτωματικούς ασθενείς. Μπορεί να χορηγείται μακροπρόθεσμα όμως μετά από 6 έως 12 μήνες, όπου υπάρχει σημαντική βελτίωση της ηπατικής λειτουργίας, πρέπει να μειωθεί η δοσολογία. Η τριεντίνη μπορεί να δοθεί και σε εγκύους, αλλά συστήνεται η αποφυγή του θηλασμού για να μην περάσει μέσω του γάλακτος στο νεογνό (23).

Ψευδάργυρος

Το 1961 ο Gerrit Schouwink έδειξε ότι ο ψευδάργυρος μπορεί να ελαττώσει την εντερική απορρόφηση του χαλκού και ως εκ τούτου να χρησιμοποιηθεί ως μέσο θεραπείας.

Ο ψευδάργυρος απορροφάται από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και αυξάνει την παραγωγή της μεταλλοθειονίνης σε αυτά. Οι μεταλλοθειονίνες είναι πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνες που μπορούν να προσδέσουν μεταλλικά ιόντα και υπάρχουν στο έντερο, το ήπαρ, τον εγκέφαλο και άλλους ιστούς. Έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με τον χαλκό από τον ψευδάργυρο. Ο χαλκός, που προσδέεται στη μεταλλοθειονίνη, παραμένει στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και δεν περνάει στο κυκλοφορικό σύστημα. Στη συνέχεια, κατά την κυτταρική ανανέωση μεταφέρεται στον εντερικό αυλό και αποβάλλεται (21). Ο ψευδάργυρος δίνεται ως συντηρητική αγωγή σε συμπτωματικούς ασθενείς σε περίπτωση που έχουν επιδείνωση με άλλες θεραπείες. Επίσης, είναι η πιο κατάλληλη θεραπεία σε ασυμπτωματικούς ασθενείς (24). Συνταγογραφείται ωςθειϊκό, οξικό ή γλυκονικό άλας. Ο ψευδάργυρος μπορεί να δοθεί και κατά την εγκυμοσύνη. Βέβαια, προκαλεί ορισμένες παρενέργειες. Η γαστρίτιδα είναι συχνή παρενέργεια και αντιμετωπίζεται με μείωση της δόσης. Πέρα από τα γαστρικά συμπτώματα, δύναται να προκληθούν αναιμία και αύξηση της λιπάσης και της αμυλάσης, ουδετεροπενία, αισθητική, κινητική νευροπάθεια και μυελοπάθεια (25).

1.9.2 Μεταμόσχευση του ήπατος

Η μεταμόσχευση του ήπατος πραγματοποιείται σε ασθενείς με πολύ προχωρημένη ηπατική ανεπάρκεια και αποτελεί την έσχατη λύση. Το ποσοστό επιβίωσης για 1 χρόνο είναι 87,5% και μετά από αυτό το διάστημα το ποσοστό επιβίωσης είναι μεγάλο. Τα αποτελέσματα είναι καλύτερα για τους ενήλικες (26).

Η μεταμόσχευση ήπατος σε ασθενείς με σοβαρά νευρολογικά προβλήματα χωρίς ηπατική ανεπάρκεια είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Ωστόσο, μια πρόσφατη έρευνα έδωσε ορισμένα ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Μια ομάδα 18 ασθενών με σοβαρά νευρολογικά συμπτώματα υποβλήθηκε σε μεταμόσχευση ήπατος. Το ποσοστό επιβίωσης ήταν 88,8% στον 1 χρόνο και 72,2% στα 5 χρόνια. Μετά από 5 χρόνια, οι ασθενείς είχαν ήπια έως μέτρια αναπηρία που τους επέτρεπε να περπατούν χωρίς βοήθεια, ενώ προηγουμένως αδυνατούσαν να σηκωθούν από το κρεβάτι. Οι περισσότεροι ασθενείς είχαν μεγάλη βελτίωση στις νευρολογικές λειτουργίες (27).

1.9.3 Ασυμπτωματικοί ασθενείς

Οι ασυμπτωματικοί ασθενείς, οι οποίοι έχουν διαγνωστεί κατά τον οικογενειακό έλεγχο (screening), χρειάζονται θεραπεία δια βίου. Οι Ευρωπαϊκές οδηγίες συστήνουν τη λήψη ψευδαργύρου ή πενικιλλαμίνης και ετήσιο έλεγχο του ασθενούς και της συγκέντρωσης του χαλκού στον οργανισμό του (27).

2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάλυση ολόκληρης της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του γονιδίου *ATP7B* για την ανίχνευση μεταλλάξεων που προκαλούν τη νόσο.

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε 30 άτομα που παραπέμφθηκαν στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με υποψία νόσου Wilson.

3 ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Υλικό μελέτης

Η ομάδα μελέτης αποτελείται από 30 ασθενείς με υποψία νόσου Wilson. Οι ασθενείς προσήλθαν στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Νοσοκομείο Παιδων Αγία Σοφία) για μοριακό έλεγχο του γονιδίου *ATP7B*. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger όλων των κωδικοποιουσών περιοχών και των παρακείμενων περιοχών στα όρια εσωνίων-εξωνίων. Τα κλινικά τους χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα ασθενών με υποψία νόσου Wilson

Αριθμός ασθενούς	Φαινότυπος	Σερουλοπλασμίνη	Χαλκός ούρων 24ώρου
1	διπολική διαταραχή, τρόμος άνω άκρων, δακτύλιοι KF άμφω	200mg/l	-
2	κίρρωση ήπατος, δακτύλιοι KF άμφω	102mg/l	65,7μg/24h
3	τρανσαμινασαιμία	240mg/l	-
4	υποτροπιάζουσα καταθλιπτική συνδρομή, τρόμος, δυσκολία βάδισης, δακτύλιοι KF άμφω	130mg/l	167μg/24h
5	λιπώδης διήθηση ήπατος	66mg/l	1320μg/24h
6	τρανσαμινασαιμία	40mg/l	79,5μg/24h
7	κίρρωση ήπατος	80mg/l	-
8	επίμονη τρανσαμινασαιμία	250mg/l	30μg/24h
9	τρόμος άνω άκρων	145mg/l	23,6μg/24h
10	ηπατομεγαλία, λιπώδης διήθηση ήπατος	140mg/l	-
11	κίρρωση ήπατος	180mg/l	-
12	τρανσαμινασαιμία	193mg/l	23,6μg/24h
13	τρόμος κεφαλής και άνω άκρων, δακτύλιοι KF	143mg/l	338μg/24h
14	οξεία ηπατική ανεπάρκεια	140mg/l	212μg/24h
15	διαταραχές συμπεριφοράς, δυσαρθρία	200mg/l	-
16	τρανσαμινασαιμία, ασκίτης	82mg/l	248,4μg/24h
17	τρανσαμινασαιμία	205mg/l	-
18	τρανσαμινασαιμία	-	128,5μg/24h
19	τρανσαμινασαιμία	120mg/l	-
20	ψυχιατρικές εκδηλώσεις	119mg/l	154,7μg/24h
21	κίρρωση ήπατος	210mg/l	87μg/24h
22	τρανσαμινασαιμία	220mg/l	27μg/24h
23	κίρρωση ήπατος, δακτύλιοι KF άμφω	345mg/l	-
24	τρανσαμινασαιμία	60mg/l	256μg/24h
25	κίρρωση ήπατος	180mg/l	99μg/24h
26	λιπώδης διήθηση ήπατος	210mg/l	74μg/24h
27	τρανσαμινασαιμία	390mg/l	35μg/24h
28	τρομώδη συνδρομή και αστάθεια βάρδισης, δακτύλιοι KF	90mg/l	57,5μg/24h
29	ίκτηρος, ψηλαφητός σπλήνας	370mg/l	66μg/24h
30	κίρρωση ήπατος	230mg/l	71μg/24h

3.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε από ολικό αίμα των ασθενών. Το αίμα συλλέχθηκε σε φιαλίδια 3ml με EDTA και η απομόνωση του DNA έγινε με τη χρήση κολωνών εκχύλισης DNA του αντιδραστήριου Blood Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με τη χρήση πρωτεάσης και κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων. Στη συνέχεια, τα θραύσματα μεταφέρθηκαν στις κολώνες εκχύλισης DNA. Το DNA αναμίχθηκε με αιθανόλη και προσδέθηκε στη μεμβράνη QIAmp ενώ τα άχρηστα προϊόντα από την λύση των κυττάρων απομακρύνθηκαν με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις. Το DNA συλλέχθηκε μέσα σε απιονισμένο νερό. Η μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA πραγματοποιήθηκε στο φασματοφωτόμετρο με επιθυμητή συγκέντρωση 10ng/μl έως 100ng/μl.

3.3 Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αρχή της PCR συνοψίζεται στην *in vitro* ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA με τη χρήση διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας. Η PCR επιτρέπει την ενζυμική σύνθεση της επιθυμητής αλληλουχίας DNA, το οποίο έχει μέγεθος από 100 έως 2000 ζεύγη βάσεων, μέσα σε λίγες ώρες. Κατά τη διαδικασία αυτή παράγονται πολλαπλά αντίγραφα (1×10^9) ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA από ελάχιστη ποσότητα υποστρώματος. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της DNA πολυμεράσης να συνθέτει συμπληρωματική αλυσίδα DNA σε κατεύθυνση 5' → 3' ως προς τη μονόκλωνη αλυσίδα DNA.

3.3.1 Αντιδραστήρια και διαδικασία της αντίδρασης

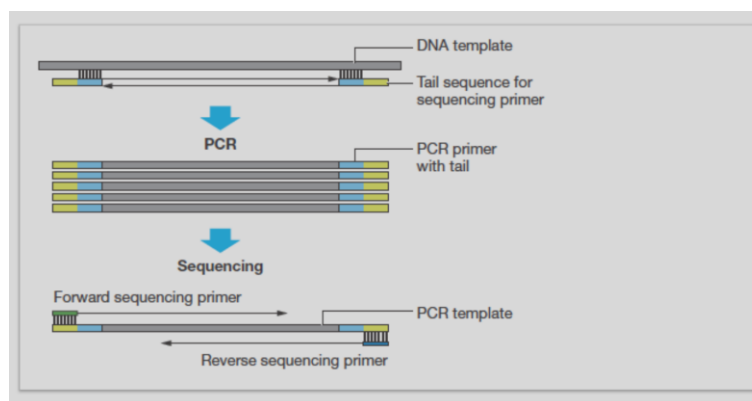
Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης απαιτούνται, πέραν του γενωμικού DNA που χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο, η DNA πολυμεράση, μείγμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$), ζευγάρια εκκινητών που καθορίζουν το τμήμα του DNA που επιθυμούμε να ενισχύσουμε, ένα ρυθμιστικό διάλυμα που βελτιστοποιεί τη δράση του ενζύμου και νερό. Το νερό παρέχει το υγρό περιβάλλον στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση.

Στην αντίδραση χρησιμοποιήσαμε το διάλυμα Hotstart της εταιρείας QIAGEN, το οποίο περιέχει τη θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση. Η πολυμεράση αυτή είναι σταθερή στους 95°C και εισάγεται στην αρχή της αντίδρασης. Το μίγμα Hotstart περιέχει το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να εξασφαλιστούν η βέλτιστη ιονική ισχύς της αντίδρασης και το κατάλληλο pH. Επίσης, περιέχει $MgCl_2$. Τα δισθενή κατιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) αποτελούν συμπαραγόντες για ένζυμα όπως πολυμεράσες, σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs διευκολύνοντας την ενσωμάτωσή τους στην αλυσίδα του DNA και αυξάνουν την T_m (melting temperature). Η T_m είναι η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται μετάβαση από το δίκλωνο στο μονόκλωνο μόριο DNA στο 50% των μορίων. Το διάλυμα Hotstart περιέχει επίσης μίγμα από dNTPs σε ίσες συγκεντρώσεις των dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Τα dNTPs παρέχουν ενέργεια στην αντίδραση σύνθεσης συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Ταυτόχρονα, απομακρύνεται ο πυροφώσφορος (PPi).

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε αυτόματους θερμοκούς κυκλοποιητές που μεταβαίνουν αυτόματα στις καθορισμένες επιθυμητές θερμοκρασίες κάθε κύκλου.

Σχεδιασμός εκκινητών

Ο σχεδιασμός των εκκινητών είναι καθοριστικός για την επιτυχή αντίδραση πολλαπλασιασμού. Σκοπός είναι οι εκκινητές να αναγνωρίσουν και να προσδεθούν ειδικά, στην επιθυμητή αλληλουχία DNA. Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν ήταν είτε απλοί (χωρίς τροποποίηση) είτε έφεραν τροποποίηση m13 στα άκρα. Οι τροποποιημένοι εκκινητές (m-13) φέρουν συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία από βακτηριοφάγο που συνδέεται με το 5' άκρο του εκκινητή ώστε όλα τα προϊόντα PCR διαφορετικών εξωνίων να φέρουν τα ίδια άκρα m13 και να πολλαπλασιαστούν από το ίδιο ζευγάρι εκκινητών, λόγω συμπληρωματικότητάς των εκκινητών με τα m13 άκρα, κατά την αλληλούχηση κατά Sanger (εικόνα 8). Αντιθέτως, για τα PCR προϊόντα χωρίς m13 άκρα χρησιμοποιήθηκαν ξανά οι εκκινητές της αντίδρασης PCR.



Εικόνα 8: Αλληλούχηση με εκκινητές PCR και άκρα M-13 (Thermo Fisher Scientific)

Τα κριτήρια επιλογής του ζευγαριού εκκινητών είναι τα εξής:

- Βέλτιστο μήκος: 20-26 βάσεις (bp)
- Βέλτιστη θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m): 55-65°C
- Περιεκτικότητα σε βάσεις G & C : 40-60%
- Αποφυγή επανάληψης G και C στο 3' άκρο των εκκινητών
- Αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών στο 3' άκρο μεταξύ των δύο εκκινητών (primer-dimers)
- Αποφυγή συμπληρωματικών αλληλουχιών κατά μήκος του ίδιου εκκινητή (self complementarity)
- Αποφυγή πολυμορφισμών στο 3' άκρο του εκκινητή

Το μήκος των εκκινητών πρέπει να κυμαίνεται από 20-30bp. Η αλληλουχία των εκκινητών καθορίζει την T_m και κατ' επέκταση τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών με την συμπληρωματική τους αλληλουχία στο DNA εκμαγείο.

Η βέλτιστη θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) είναι 55-65°C. Για αυτό το λόγο κατά το σχεδιασμό των εκκινητών επιλέχθηκαν εκκινητές με παραπλήσιες τιμές T_m .

Το ποσοστό των βάσεων G+C δεν πρέπει να υπερβαίνει το 40-60% των βάσεων του εκκινητή. Επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες με υψηλό ποσοστό βάσεων γουανίνης και κυτοσίνης μπορεί να οδηγήσουν σε αναδιπλώσεις φουρκέτας (loops).

Το 3' άκρο του εκκινητή δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικό με το 5' άκρο του άλλου εκκινητή για να μην σχηματιστούν διμερή εκκινητών (primer-dimers). Επίσης, το 3' άκρο του εκκινητή δεν πρέπει να είναι συμπληρωματικό με το 5' άκρο του ίδιου εκκινητή (self complementarity).

Η αλληλουχία του 3' άκρου του εκκινητή δεν πρέπει να έχει πολυμορφικές θέσεις με υψηλή συχνότητα και σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να υπάρχει πολυμορφισμός στην τελευταία βάση επειδή η πολυμεράση αδυνατεί να επεκτείνει την αλληλουχία λόγω μη σωστού υβριδισμού του εκκινητή με την αλληλουχία του DNA.

Για τη μοριακή ανάλυση ολόκληρης της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του γονιδίου *ATP7B* σχεδιάστηκαν εκκινητές ειδικοί για καθένα από τα 21 εξώνια. Για το εξώνιο 2 σχεδιάστηκαν 4 ζευγάρια εκκινητών για να καλύψουν όλο το μήκος της αλληλουχίας του μεγέθους 1234bp. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Primer 3 (33, 34). Στην συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Primer-Blast, το οποίο διαθέτει 2 ρυθμίσεις. Η μία ρύθμιση επιτρέπει το σχεδιασμό των εκκινητών και η άλλη ρύθμιση ελέγχει την συμπληρωματικότητα των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο του γονιδιώματος. Στο Blast-Blat ελέγχονται οι μεταλλάξεις-πολυμορφισμοί στους εκκινητές (35).

Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν για τις PCR αντιδράσεις.

Πίνακας 4: Οι αλληλουχίες των εκκινητών και το μέγεθος των προϊόντων PCR

Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος (bp)
Exon 1	GGACCCCTGTTTGCTTTAGA AACGCGGGGAGGAAAATC	271
Exon 2i	TGACACCAGTGGCATTGTTT CTGCCTTTCCTTCTGCAATG	446
Exon 2ii	AATATGTGCCATCGGTTGTG AGTGCTTTGTAACCGCTCAA	389
Exon 2iii	TGACATGGGATTTGAAGCTG TGCCTCGATAGCCCTCTG	346
Exon 2iv	CAGCTCCTAGGGGTTCAAAG CACAAAGAGAAAAGGAGACAAGC	497
Exon 3	CCTCACAAAGAGCCCTGA CGAGGTCTATACGCAGCATTTC	395
Exon 4	CTGCCCCACCCAGAGTGTTA CAGAAGCCTGTAACCCCGTA	245
Exon 5	TTCCTTGATCCTGGGTCTG GCTATATTTTCTCATTTTCTTCACTG	291
Exon 6	AAAGTGCTTTCTGCCAATGC CCATGGGAAGACAAGACCAG	247
Exon 7	CAGAAGGGGAGTGGCTTGTA ACACAGCATGGAAGGGAGAG	293
Exon 8	TGTCGCTCATTGAACTCTCCT CATGGTGTTTACAGAGGAAGTGAG	366
Exon 9	GTGACTCTCAGGCTGGGTTT GATGCAGCTCACACAGATTGA	224
Exon 10	CTAGAACCTGACCCGGTGAC TGACCTGACAGCTGCTATGAT	246

Exon 11	ATGGGGCTGAGCAAGTGAC TTTCTAAAACGAGAAAGATGAAGTT	245
Exon 12	AGGTTGTAATTTCCCATGGTC TGAAAGAACAGGATCAATGTCAG	248
Exon 13	GGAGCTTCCTTATTGAACTCTCA AACAGATACTACTTTCATCTCTCAGGA	300
Exon 14	CCCCTCCATCTGTATTGTGG GAGAGAAGGACATGGTGAGGA	300
Exon 15	TTTCACTTCACCCCTTGG CTGTGGTTTGACCCACCTCT	283
Exon 16	GCTGTAAAAGGATTGCATGG AGGAGGACTCTTTGCCTGA	300
Exon 17	CCCAACTGTGTAGCTGCTG GGCCAAGTGGTCTACTTT	259
Exon 18	GGGCAAGGGTAACTTGAGGT CTGATGGAGAGGAGCACACA	364
Exon 19	CAATGGGCAGACCCCTTC TACTAACCCAGCAGGAAC	239
Exon 20	GCTCCTCTCCCAGACCTA TGGGAAATGAGAGGCAAGTT	245
Exon 21	GCCTTCACCAGGCTTAGAAA GTGGTGAGTGGAGGCAAGTC	398

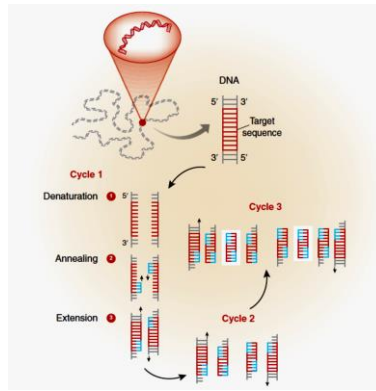
PCR αντίδραση

Ο κύκλος της αντίδρασης είναι ο εξής:

1. Αποδιάταξη αρχικού δείγματος (denaturation): Το μείγμα θερμαίνεται αρχικά στους 95°C για 15min για να αποδιαταχθεί το DNA και να ανοίξει η διπλή έλικα σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες και να ενεργοποιηθεί το ένζυμο
2. Υβριδισμός (annealing): Η θερμοκρασία μειώνεται στους 55°C για 30sec ώστε να συνδεθούν οι εκκινητές στο μονόκλωνο DNA-εκμαγείο στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας. Η θερμοκρασία αυτή είναι συνδεδεμένη με τη βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών.
3. Επέκταση (extension) ή επιμήκυνση (elongation): Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C για 20sec, τη βέλτιστη θερμοκρασία για τη θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, όπου πραγματοποιείται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας DNA.
4. Αποδιάταξη προϊόντων: Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 95°C για 30sec ώστε τα δίκλινα μόρια DNA που δημιουργήθηκαν να αποχωριστούν πάλι και να αποτελέσουν εκμαγεία για επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA.

Τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται για 35 φορές. Η χρονική διάρκεια επιμήκυνσης στον τελευταίο κύκλο είναι 5min, ώστε να υπάρξει χρόνος για την επέκταση όλων των προϊόντων από τη DNA πολυμεράση.

Παρατίθενται η εικόνα 9, η αντίδραση και οι συνθήκες της αντίδρασης.



Εικόνα 9: Σχηματική παρουσίαση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Lilit Garibyan et al., 2013

Πίνακας 5: PCR Reaction

Hot Start (enz)	6μl
H2O	6μl
Primers (forward,reverse, 10μM)	1μl
Total	13μl

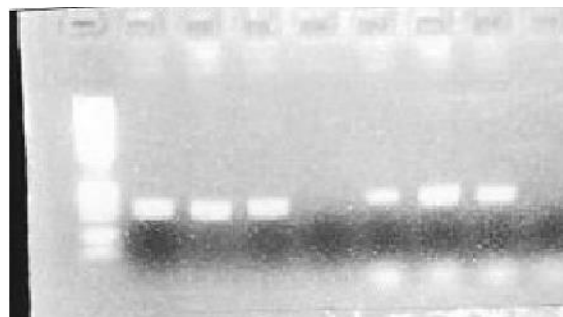
Προσθήκη 1,2μl από το DNA του δείγματος (10ng/μl έως 100ng/μl)

Πίνακας 6: Συνθήκες αντίδρασης PCR

95°C	15min	
95°C	30sec	
55°C	30sec	35 κύκλοι
72°C	20sec	
72°C	5min	
4°C	Soak	

3.4 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των προϊόντων PCR- Έλεγχος ποιότητας

Ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR (PCR products) σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5g αγαρόζης σε 100ml TBE αραιωμένο κατά 20 φορές με απιονισμένο νερό). Ο διαχωρισμός των προϊόντων PCR έγινε σύμφωνα με το μέγεθος και το φορτίο τους. Το βρωμιούχο αιθίδιο ενσωματώνεται στην διπλή έλικα του DNA και βοηθά στην χρώση των προϊόντων PCR μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (εικόνα 10).



DNA ladder 1 2 3 Blank 4 5 6 Blank

EXON 9

EXON 10

Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5% σε 1×TBE)

3.5 Ενζυμικός καθαρισμός του προϊόντος PCR

Μετά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης τα προϊόντα τα οποία θα υποβληθούν σε αλληλούχηση κατά Sanger είναι απαραίτητο να υποστούν διαδικασία καθαρισμού ώστε να απομακρυνθούν οι διάφορες προσμίξεις που υπάρχουν από την αντίδραση (dNTPs, εκκινητές, πολυμεράσες, άλατα). Για τον καθαρισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το ExoSAP (New England Biolabs) που αποτελείται από 2 ένζυμα. Το ένζυμο εξωνουκλεάση I (ExoI) διασπά τους εκκινητές που έχουν απομείνει από την αντίδραση PCR και η αλκαλική φωσφατάση (rSAP) αποφωσφορυλιώνει τα εναπομείναντα dNTPs ώστε να αποκτήσουν ουδέτερο φορτίο.

Η αντίδραση καθώς και οι συνθήκες για τον καθαρισμό παρατίθενται παρακάτω:

Πίνακας 7: PCR cleanup-Enzyme Mix

ExoI	0.25μl
rSAP	0.5μl
Total	0.75μl

DNA (PCR product) 2.5μl

Πίνακας 8: Συνθήκες αντίδρασης PCR cleanup

37°C	5min
80°C	10min
4°C	Soak

3.6 Αλληλούχηση κατά Sanger

Η αλληλούχηση κατά Sanger στηρίζεται στη χρήση τριφωσφορικών 2',3'-διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTP), τα οποία οδηγούν σε τερματισμό της επιμήκυνσης της αλυσίδας του DNA. Κάθε ddNTP διαφέρει από τα κανονικά dNTPs που χρησιμοποιούνται κατά την αντιγραφή του DNA καθώς δε διαθέτει OH στην 3' θέση. Αυτά τα πρόδρομα μόρια ενσωματώνονται κατά την αντιγραφή σε μία αναπτυσσόμενη αλυσίδα DNA, όμως προκαλούν τον τερματισμό της αντίδρασης επειδή δεν διαθέτουν την 3'-OH ομάδα για να σχηματίσουν φωσφοδιεστερικό δεσμό με επόμενο τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο. Αν κατά την *in vitro* αντιγραφή ενός μορίου, προστεθεί στο μίγμα της αντίδρασης ίση ποσότητα ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) μαζί με τα τέσσερα dNTPs που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση του DNA από την DNA πολυμεράση, θα σχηματιστούν πολλές διαφορετικές αλυσίδες που θα έχουν τερματιστεί ειδικά στο σημείο ενσωμάτωσης ενός ddNTP. Οι αλυσίδες DNA που προκύπτουν από κάθε αντίδραση διαχωρίζονται μεταξύ τους με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis) και ανιχνεύεται ο φθορισμός που εκπέμπουν οι χρωστικές, οι οποίες είναι συζευγμένες με τα ddNTPs, οπότε καθίσταται δυνατή η ανάγνωση της αλληλουχίας.

3.6.1 Αντιδραστήρια και διαδικασία της αντίδρασης

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το BigDye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems), το οποίο περιείχε Ταq πολυμεράση, dNTPs και ddNTPs, το BigDye Terminator Sequencing Buffer που περιέχει Tris-HCl και MgCl₂, ο εκκινητής (Forward ή Reverse), νερό και το ενζυμικά καθαρισμένο προϊόν PCR.

Η αντίδραση καθώς και οι συνθήκες για τον καθαρισμό παρατίθενται παρακάτω:

Πίνακας 9: Sequencing Reaction

BigDye Term Buffer	1.75μl
BigDye Term (enz)	0.25μl
Primer (forward ή reverse ή M13, 5μM)	0.32μl
H₂O	6.68μl
Total	9.00 μl

Προσθήκη 1μl από το ενζυμικά καθαρισμένο PCR product

Πίνακας 10: Συνθήκες αντίδρασης sequencing

96°C	1min	25 κύκλοι
96°C	10sec	
55°C	5sec	
60°C	4min	
4°C	soak	

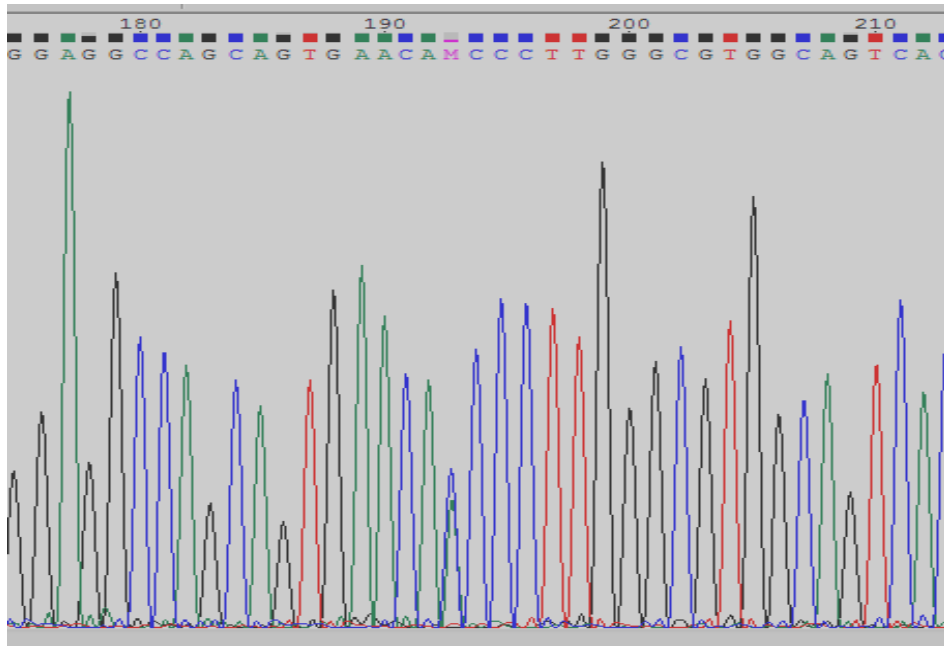
3.7 Καθαρισμός της αντίδρασης sequencing με αιθανόλη (ethanol precipitation)

Μετά από την αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του προϊόντος. Ακαθαρσίες, όπως άλατα, νουκλεοτίδια, ίχνη οργανικών διαλυτών και εκκινητών απομακρύνθηκαν με τη βοήθεια της αιθανόλης. Το μίγμα EtOH/NH₄c χρησιμοποιήθηκε για την καταβύθιση του DNA από την αντίδραση Sequencing. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν φυγοκεντρήσεις για τον καθαρισμό των προϊόντων και προσθήκη φορμαμιδίου HiDi για την επαναδιαλυτοποίηση των προϊόντων πριν την ηλεκτροκινητική έγχυσή τους στη συσκευή 3500 Series Genetic Analyzer.

3.8 Ηλεκτροφορητικός Διαχωρισμός στη συσκευή 3500 Series Genetic Analyzer

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των προϊόντων της αλληλούχησης έγινε με τη χρήση ενός πλήρως αυτοματοποιημένου αναλυτή DNA και πραγματοποιήθηκε στη συσκευή 3500 Series Genetic Analyzer της Applied Biosystems. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν και πραγματοποιήθηκε ανάλυση των αποτελεσμάτων.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 11: Ανάλυση αλληλούχησης κατά Sanger του εξωνίου 14 του γονιδίου ATP7B στο πρόγραμμα Chromas. Στο ΔΕΙΓΜΑ 12 ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη c.3207C>A (p.His1069Gln) σε ετεροζυγωτία.

Για τον προσδιορισμό των μεταλλάξεων εφαρμόστηκε η μέθοδος αλληλούχησης σε 30 ασθενείς με υποψία νόσου Wilson. Εντοπίστηκαν 14 διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *ATP7B* στο σύνολο των υπό εξέταση δειγμάτων.

Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά

Συγκεκριμένα, εντοπίστηκε η μετάλλαξη **c.3525delA** στο εξώνιο 16, που είναι έλλειψη της αδενίνης (A) στη θέση 3525 της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του γονιδίου. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν έχει αναφερθεί ξανά και προκαλεί αντικατάσταση της γλυκίνης σε ασπαρτικό στη θέση 1176 της αμινοξικής αλληλουχίας και τερματισμό της μετάφρασης μετά από 16 αμινοξέα (**p.Gly1176Aspfs*16**). Η p.Gly1176Aspfs*16 ταυτοποιήθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε 1 ασθενή με **λιπώδη διήθηση ήπατος** και σε 1 ασθενή με **τρανσαμινασαιμία και ασκίτη**.

Επίσης, ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη **c.3689T>C** στο εξώνιο 17 που είναι αντικατάσταση μίας βάσης θυμίνης σε κυτοσίνη στη θέση 3689 του cDNA του γονιδίου. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν έχει αναφερθεί ξανά και προκαλεί αντικατάσταση της ισολευκίνης σε θρεονίνη στη θέση 1230 της αμινοξικής αλληλουχίας (**p.Ile1230Thr**). Η p.Ile1230Thr ταυτοποιήθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε 2 ασθενείς με **κίρρωση ήπατος** και **ψυχιατρικές εκδηλώσεις**.

Καταγεγραμμένες μεταλλάξεις

Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων Wilson Disease Mutation Database, university of Alberta και στη διεθνή βιβλιογραφία και είναι οι ακόλουθες.

Η μετάλλαξη **c.3207C>A** στο εξώνιο 14 είναι αντικατάσταση μίας βάσης κυτοσίνης σε αδενίνη στη θέση 3207 της κωδικοποιούσας αλληλουχίας. Προκαλείται αντικατάσταση της ιστιδίνης σε γλουταμίνη στη θέση 1069 της αμινοξικής αλληλουχίας (**p.His1069Gln**). Η μετάλλαξη ταυτοποιήθηκε σε ομοζυγωτία σε 2 ασθενείς με **διπολική διαταραχή, τρόμο άνω άκρων, δακτυλίους KF άμφω ή μη, τρομώδη συνδρομή, αστάθεια βάδισης** και σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε 5 ασθενείς με **κίρρωση ήπατος, δακτυλίους KF άμφω, ηπατομεγαλία, λιπώδη διήθηση ήπατος, τρανσαμινασαιμία και οξεία ηπατική ανεπάρκεια**.

Η μετάλλαξη **c.2827G>A** στο εξώνιο 12 είναι αντικατάσταση μίας βάσης γουανίνης σε αδενίνη στη θέση 2827 της κωδικοποιούσας αλληλουχίας. Η μετάλλαξη προκαλεί αντικατάσταση της γλυκίνης σε σερίνη στη θέση 943 της αμινοξικής αλληλουχίας (**p.Gly943Ser**). Η p.Gly943Ser ταυτοποιήθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε 4 ασθενείς με **υποτροπιάζουσα καταθλιπτική συνδρομή, τρόμο, δυσκολία βάδισης, δακτύλιοι KF άμφω ή μη, τρόμο κεφαλής, άνω άκρων και τρανσαμινασαιμία**.

Η μετάλλαξη **c.4396T>C** στο εξώνιο 21 είναι αντικατάσταση της θυμίνης σε κυτοσίνη στη θέση 4396 της κωδικοποιούσας αλληλουχίας. Πρόκειται για αντικατάσταση του κωδικονίου λήξης της μετάφρασης σε αργινίνη και την συνέχιση της μετάφρασης (**p.Ter1466Arg**). Η μετάλλαξη προκαλεί επέκταση της μετάφρασης κατά 1 αμινοξύ και έχει ως αποτέλεσμα την δομική αστάθεια του προϊόντος. Βρέθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε 2 ασθενείς με **κίρρωση ήπατος και ψυχιατρικές εκδηλώσεις**.

Η μετάλλαξη **c.1707+3insT** στο εσώνιο 4-5 είναι μία ένθεση θυμίνης στη θέση 1707+3, που αποτελεί τη θέση ματίσματος του δότη του εσωνίου 4. Η μετάλλαξη προκαλεί έλλειψη του εξωνίου 4, μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης και τερματισμό της μετάφρασης στο κωδικόνιο 607 (36). Βρέθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε έναν ασθενή με **κίρρωση ήπατος και δακτυλίους KF άμφω**.

Η μετάλλαξη **c.3400delC** στο εξώνιο 15 είναι έλλειψη μίας βάσης κυτοσίνης στη θέση 3400 της κωδικοποιούσας αλληλουχίας. Η μετάλλαξη προκαλεί αντικατάσταση της αλανίνης σε γλουταμίνη στη θέση 1135 της αμινοξικής αλληλουχίας και τερματισμό της μετάφρασης μετά από 13 αμινοξικές θέσεις (**p.Ala1135Glnfs*13**). Η μετάλλαξη βρέθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε έναν ασθενή με **υποτροπιάζουσα καταθλιπτική συνδρομή, τρόμο, δυσκολία βάδισης, δακτυλίους KF άμφω**.

Η μετάλλαξη **c.3688A>G** στο εξώνιο 17 είναι αντικατάσταση της αδενίνης σε γουανίνη στη θέση 3688 του cDNA του γονιδίου. Προκαλείται αντικατάσταση της ισολευκίνης σε βαλίνη στη θέση 1230 της αμινοξικής αλληλουχίας (**p.Ile1230Val**). Βρέθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε έναν ασθενή με **λιπώδη διήθηση ήπατος**.

Η μετάλλαξη **c.2906G>A** στο εξώνιο 13 είναι αντικατάσταση της γουανίνης σε αδενίνη στη θέση 2906 του cDNA του γονιδίου. Προκαλείται αντικατάσταση της αργινίνης σε γλουταμίνη στη θέση 969 της αμινοξικής αλληλουχίας (**p.Arg969Gln**). Βρέθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε έναν ασθενή με **ηπατομεγαλία και λιπώδη διήθηση ήπατος**.

Η μετάλλαξη **c.3506T>C** στο εξώνιο 16 είναι αντικατάσταση της θυμίνης σε κυτοσίνη στη θέση 3506 της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του γονιδίου. Η μετάλλαξη έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση της μεθειονίνης σε θρεονίνη στη θέση 1169 της αμινοξικής αλληλουχίας (**p.Met1169Thr**). Ανιχνεύθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε έναν ασθενή με **τρόμο κεφαλής, άνω άκρων και δακτυλίους KF**.

Η μετάλλαξη **c.2530delA** στο εξώνιο 10 είναι έλλειψη της αδενίνης στη θέση 2530 της κωδικοποιούσας αλληλουχίας. Η μετάλλαξη προκαλεί αντικατάσταση της βαλίνης σε σερίνη

στη θέση 845 της αμινοξικής αλληλουχίας και πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης μετά από 28 θέσεις (**p.Val845Serfs*28**). Ταυτοποιήθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε έναν ασθενή με **οξεία ηπατική ανεπάρκεια**.

Η μετάλλαξη **c.3295G>A** στο εξώνιο 15 είναι αντικατάσταση της γουανίνης σε αδενίνη στη θέση 3295 της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του γονιδίου. Προκαλείται αντικατάσταση της γλυκίνης σε σερίνη στη θέση 1099 της αμινοξικής αλληλουχίας (**p.Gly1099Ser**). Ανιχνεύθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε έναν ασθενή με **τρανσαμινασαιμία** και **ασκίτη**.

Η μετάλλαξη **c.1995G>A** στο εξώνιο 7 είναι αντικατάσταση της γουανίνης σε αδενίνη στη θέση 1995 της κωδικοποιούσας αλληλουχίας. Η μετάλλαξη οδηγεί σε αντικατάσταση της μεθειονίνης σε ισολευκίνη στη θέση 665 της αμινοξικής αλληλουχίας (**p.Met665Ile**). Βρέθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε έναν ασθενή με **τρανσαμινασαιμία**.

Τέλος, ανιχνεύθηκε η μετάλλαξη **c.3284A>C** στο εξώνιο 15 που είναι αντικατάσταση της αδενίνης σε κυτοσίνη στη θέση 3284 της κωδικοποιούσας αλληλουχίας. Η μεταλλάξη προκαλεί αντικατάσταση της γλουταμίνης σε προλίνη στη θέση 1095 της αμινοξικής αλληλουχίας (**p.Gln1095Pro**). Ανιχνεύθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία με την μετάλλαξη p.His1069Gln στο άλλο αλληλόμορφο σε ασθενή με **τρανσαμινασαιμία** (ασθενής 24). Επίσης, βρέθηκε σε ετεροζυγωτία σε φορέα (ΔΕΙΓΜΑ 6).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ανά ασθενή παρουσιάζονται στον Πίνακα 11. Τα *in silico* προγράμματα αξιοποιήθηκαν για την εύρεση της πιθανότητας πρόκλησης της νόσου από τις προαναφερθείσες μεταλλάξεις. Ο έλεγχος με τα *in silico* προγράμματα (PolyPhen-2, SIFT, Mutation taster, Human Splicing Finder και Varsome) σε συνδυασμό με τη βάση δεδομένων Ensembl (αλληλουχία με κωδικό ID ENST00000242839.8) και την διεθνή βιβλιογραφία έδειξε πως οι μεταλλάξεις που ταυτοποιήθηκαν είναι παθολογικές. Παρατίθενται παραδείγματα με έλεγχο των μεταλλάξεων (Πίνακες 12, 13, 14, 15 και 16).

Πίνακας 11: Αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης των εξωνίων του γονιδίου *ATP7B* ανά ασθενή

Αριθμός ασθενούς	Γονότυπος σε επίπεδο DNA	Γονότυπος σε επίπεδο πρωτεΐνης
1	c.3207C>A/c.3207C>A	p.His1069Gln/p.His1069Gln
2	c.3207C>A/c.1707+3insT	p.His1069Gln/c.1707+3insT
3	w.t.	w.t.
4	c.2827G>A/c.3400del	p.Gly943Ser/p.Ala1135Glnfs*13
5	c.3525del/c.3688A>G	p.Gly1176Aspfs*16/p.Ile1230Val
6	c.3284A>C/w.t	p.Gln1095Pro/w.t.
7	c.3689T>C/c.4396T>C	p.Ile1230Thr/p.Ter1466Arg
8	w.t.	w.t.
9	w.t.	w.t.
10	c.3207C>A/c.2906G>A	p.His1069Gln/ p.Arg969Gln
11	w.t.	w.t.
12	c.3207C>A/w.t.	p.His1069Gln/w.t.
13	c.2827G>A/c.3506T>C	p.Gly943Ser/p.Met1169Thr
14	c.2530del/c.3207C>A	p.Val845Serfs*28/p.His1069Gln
15	w.t.	w.t.
16	c.3525del/c.3295G>A	p.Gly1176Aspfs*16/p.Gly1099Ser

17	c.3243+5G>C/w.t.	c.3243+5G>C/w.t.
18	c.1995G>A/c.2827G>A	p.Met665Ile/p.Gly943Ser
19	c.2827G>A/c.3207C>A	p.Gly943Ser/p.His1069Gln
20	c.3689T>C/c.4396T>C	p.Ile1230Thr/p.Ter1466Arg
21	w.t.	w.t.
22	w.t.	w.t.
23	w.t.	w.t.
24	c.3207C>A/c.3284A>C	p.His1069Gln/p.Gln1095Pro
25	w.t.	w.t.
26	w.t.	w.t.
27	w.t.	w.t.
28	c.3207C>A/c.3207C>A	p.His1069Gln/p.His1069Gln
29	w.t.	w.t.
30	w.t.	w.t.

Πίνακας 12: Έλεγχος της μετάλλαξης c.2530delA (p.Val845Serfs*28) στο πρόγραμμα Mutation Taster για την πιθανότητα πρόκλησης νόσου

Prediction disease causing	
Summary	<ul style="list-style-type: none"> • NMD • amino acid sequence changed • frameshift • protein features (might be) affected • splice site changes
analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr13:52524453_52524453delT
HGNC symbol	ATP7B
Ensembl transcript ID	ENST00000242839
Genbank transcript ID	NM_000053
UniProt peptide	P35670
alteration type	deletion
alteration region	CDS
DNA changes	c.2530_2530delA cDNA.2687_2687delA g.61178_61178delA
AA changes	V845Sfs*28
position(s) of altered AA if AA alteration in CDS	845 (frameshift or PTC - further changes downstream)

- Τιμή 1,00 σημαίνει μεγάλη πιθανότητα για πρόκληση νόσου

Πίνακας 13: Έλεγχος της μετάλλαξης c.3525delA (p.Gly1176Asprfs*16) στο πρόγραμμα Mutation Taster για την πιθανότητα πρόκλησης νόσου

Prediction disease causing	
Summary	
	<ul style="list-style-type: none"> • NMD • amino acid sequence changed • frameshift • protein features (might be) affected • splice site changes
analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr13:52515248_52515248delT
HGNC symbol	ATP7B
Ensembl transcript ID	ENST00000242839
Genbank transcript ID	NM_000053
UniProt peptide	P35670
alteration type	deletion
alteration region	CDS
DNA changes	c.3525_3525delA cDNA.3682_3682delA g.70383_70383delA
AA changes	G1176Dfs*16
position(s) of altered AA if AA alteration in CDS	1176 (frameshift or PTC - further changes downstream)
frameshift	yes
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G. Search ExAC .
regulatory features	H3K36me3, Histone, Histone 3 Lysine 36 Tri-Methylation H3K27me3, Histone, Histone 3 Lysine 27 Tri-Methylation
phyloP / PhastCons	PhyloP PhastCons

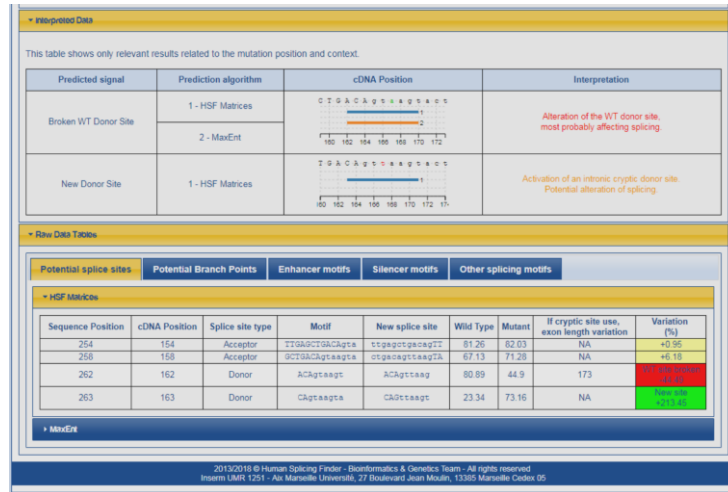
- Τιμή 1,00 σημαίνει μεγάλη πιθανότητα για πρόκληση νόσου

Πίνακας 14: Έλεγχος της μετάλλαξης c.2827G>A (p.Gly943Ser) στο πρόγραμμα PolyPhen-2 για την πιθανότητα πρόκλησης νόσου



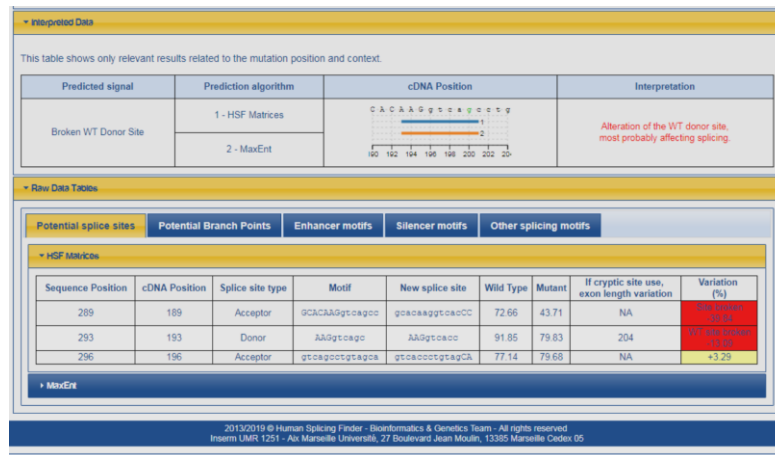
- Τιμή 1,00 σημαίνει πιθανώς ζημιογόνα μετάλλαξη (μεγαλύτερη από 0,908)

Πίνακας 15: Έλεγχος της μετάλλαξης c.1707+3insT στο πρόγραμμα Human Splicing Finder 3.0 για την πιθανότητα πρόκλησης νόσου



- Αλλαγή στη θέση του δότη ματίσματος
- Ενεργοποίηση κρυφής θέσης δότη ματίσματος στο εσώνιο
- Έλλειψη εξωνίου 4 και τερματισμός της μετάφρασης στο κωδικόνιο 607

Πίνακας 16: Έλεγχος της παραλλαγής c.3243+5G>C στο πρόγραμμα Human Splicing Finder 3.0 για την πιθανότητα πρόκλησης νόσου



- Αλλαγή της θέσης του δότη ματίσματος

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε το γονίδιο *ATP7B* το οποίο κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική ΑΤΡάση τύπου Ρ που μεταφέρει χαλκό από το κυτταρόπλασμα του ηπατικού κυττάρου στο δίκτυο Trans Golgi για να ενσωματωθεί στη σερούλοπλασμίνη και να εκκριθεί στο κυκλοφορικό σύστημα με κυστίδια.

Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάλυση ολόκληρης της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του γονιδίου *ATP7B* για την ανίχνευση μεταλλάξεων που προκαλούν τη νόσο Wilson. Χρησιμοποιήθηκε το γενετικό υλικό από 30 ασθενείς με υποψία νόσου Wilson. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αλληλουχίας κατά Sanger με τη συσκευή 3500 Series Genetic Analyzer της εταιρείας Applied Biosystems.

Από τα ευρήματα του ελέγχου επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη 14 μεταλλάξεων. Η ανάλυσή τους έγινε με *in silico* προγράμματα με σκοπό την εύρεση της πιθανότητας πρόκλησης της νόσου. Το PolyPhen-2 είναι ένα χρήσιμο εργαλείο που προβλέπει την πιθανή επίδραση της αμινοξικής αντικατάστασης στην δομή και τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης αξιοποιώντας τις παραμέτρους της φυσικής. Το SIFT προβλέπει εάν μία αμινοξική αντικατάσταση επηρεάζει τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης σύμφωνα με την αλληλουχία και τις ιδιότητες των αμινοξέων της. Το Mutation Taster είναι ένα εργαλείο που χρησιμεύει στην πρόβλεψη πιθανότητας εκδήλωσης νόσου λόγω μεταλλάξεων στο DNA. Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι αντικαταστάσεις βάσεων, ενθέσεις ή ελλείψεις 2 ή περισσότερων νουκλεοτιδίων. Το πρόγραμμα Human Splicing Finder 3.0 συνδυάζει 12 διαφορετικούς αλγόριθμους για να αναγνωρίσει και να προβλέψει την επίδραση μεταλλάξεων σε περιοχές συρραφής εξωνίων και γειτονικές αλληλουχίες που ενισχύουν ή καταστέλλουν την συρραφή των εξωνίων. Το Varsome αξιοποιεί στοιχεία από πολλές βάσεις δεδομένων και καθορίζει αν μία μετάλλαξη είναι παθολογική, πιθανώς παθολογική, πιθανώς μη παθολογική, μη παθολογική ή αβέβαιης κλινικής σημασίας.

Η μελέτη οδήγησε στην ανίχνευση 2 νέων μεταλλάξεων. Η πρώτη μετάλλαξη είναι η c.3525delA στο εξώνιο 16. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη προκαλεί αντικατάσταση της γλυκίνης σε ασπαρτικό στη θέση 1176 της αμινοξικής αλληλουχίας και τερματισμό της μετάφρασης μετά από 16 αμινοξέα (p.Gly1176Aspfs*16). Η μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης προκαλεί ελάττωση στο μέγεθος της πρωτεΐνης και απώλεια της λειτουργίας της. Η p.Gly1176Aspfs*16 ταυτοποιήθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε 2 ασθενείς με εργαστηριακά και κλινικά ευρήματα για νόσο Wilson.

Η δεύτερη μετάλλαξη είναι η c.3689T>C στο εξώνιο 17. Πρόκειται για αντικατάσταση μίας βάσης θυμίνης σε κυτοσίνη στη θέση 3689 του cDNA του γονιδίου. Στην αμινοξική αλληλουχία προκαλείται αντικατάσταση της ισολευκίνης σε θρεονίνη στη θέση 1230 (p.Ile1230Thr). Η ισολευκίνη είναι υδρόφοβη που σημαίνει ότι κρύβεται στο εσωτερικό του μορίου, ενώ η θρεονίνη είναι υδρόφιλη, σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του νερού και πιθανόν αλλάζει τη στερεοδομή του μορίου. Η θέση αυτή βρίσκεται στην περιοχή φωσφορυλίωσης και συνδέεται με το ATP και είναι καλά διατηρημένη θέση ανάμεσα στα θηλαστικά. Η p.Ile1230Thr ταυτοποιήθηκε σε σύνθετη ετεροζυγωτία σε 2 ασθενείς με εργαστηριακά και κλινικά ευρήματα για νόσο Wilson. Για το λόγο αυτό, συμπεραίνουμε πως προκαλεί νόσο Wilson. Οι υπόλοιπες 12 μεταλλάξεις είναι παθολογικές και περιγράφονται προηγουμένως.

Η παραλλαγή c.3243+5G>C που εντοπίστηκε στο εσώνιο 14-15 προκαλεί αλλαγή στη θέση του δότη ματίσματος και είναι αβέβαιης κλινικής σημασίας σύμφωνα με το Varsome. Η c.3243+5G>C ταυτοποιήθηκε σε ετεροζυγωτία σε έναν ασθενή (ΔΕΙΓΜΑ 17). Ο συγκεκριμένος ασθενής έχει 1 παραλλαγή και δεν εμφανίζει εργαστηριακά και κλινικά ευρήματα πέραν της τρανσαμινασαιμίας και συνεπώς ο συγκεκριμένος ασθενής φαίνεται να μην πάσχει από Wilson.

Ο ασθενής (ΔΕΙΓΜΑ 6) με τη μετάλλαξη c.3284A>C (p.Gln1095Pro) και ο ασθενής (ΔΕΙΓΜΑ 12) με τη μετάλλαξη c.3207C>A (p.His1069Gln) έχουν ελαττωμένη σεουλοπλασμίνη ορού που είναι δείκτης ορισμένων φορέων και τρανσαμινασαιμία, που οφείλεται πιθανόν σε άλλη αιτιολογία.

Οι ασθενείς (ΔΕΙΓΜΑΤΑ) 1, 2, 4, 5, 7, 10, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 24, 28 φέρουν 2 μεταλλάξεις, εμφανίζουν κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα και συνεπώς πάσχουν από νόσο Wilson.

Σε 13 ασθενείς δεν ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις. Σύμφωνα με το σύστημα βαθμολόγησης κατά Leipzig (Πίνακας 2) και τον γονιδιακό έλεγχο συμπεραίνουμε πως οι συγκεκριμένοι ασθενείς δεν πάσχουν από νόσο Wilson.

Οι μελέτες σχετικά με την κατανομή των μοριακών διαταραχών της νόσου Wilson αποδεικνύουν πως η μετάλλαξη p.His1069Gln στο εσώνιο 14 είναι η πιο κοινή μετάλλαξη παγκοσμίως και έχει συχνότητα 35% στον Ελληνικό πληθυσμό. Στη μελέτη μας βρέθηκε πως 7 ασθενείς με υποψία νόσου Wilson εμφανίζουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη.

Πρέπει να τονιστεί πως ο γενετικός έλεγχος είναι απαραίτητος για την επιβεβαίωση της νόσου Wilson και για οικογένειες στις οποίες έχουν προσδιοριστεί και οι δύο μεταλλάξεις ώστε να γίνει ο έλεγχος στους συγγενείς α' βαθμού και να αποφευχθεί η εκδήλωση συμπτωμάτων σε αυτούς με τη λήψη της κατάλληλης φαρμακευτικής θεραπείας. Επίσης, ο γενετικός έλεγχος είναι χρήσιμος για να διαγνωστούν ζευγάρια που είναι φορείς πριν την τεκνοποίηση. Σε περίπτωση που είναι φορείς πρέπει οπωσδήποτε να γίνει προγεννητική ή προεμφυτευτική διάγνωση. Η δυνατότητα αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική σε πληθυσμούς όπου η συχνότητα φορέων είναι υψηλότερη. Ο γενετικός έλεγχος μπορεί να διαχωρίσει τους ασυμπτωματικούς ασθενείς από τους φορείς ώστε να αποτραπεί η άσκοπη λήψη θεραπείας από αυτούς.

Από την συγκεκριμένη μελέτη προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο πλήρης έλεγχος του γονιδίου αυξάνει το ποσοστό ανίχνευσης των μεταλλάξεων στους ασθενείς. Αν μετά τον πλήρη έλεγχο έχει βρεθεί μόνο μία μετάλλαξη, τότε απαιτείται περαιτέρω μοριακός έλεγχος με άλλες μεθόδους όπως MLPA (πολλαπλή ενίσχυση ανιχνευτών εξαρτώμενη από την αντίδραση λιγάσης, multiplex ligation-dependent probe amplification) ή gene-targeted microarray. Για τον λόγο αυτό, οι ασθενείς (ΔΕΙΓΜΑΤΑ 6, 12 και 17) πρέπει να ελεγχθούν περαιτέρω με MLPA ή gene-targeted microarray. Ωστόσο, αν και αυτός ο έλεγχος δεν ανιχνεύσει κάποια άλλη μετάλλαξη, τότε δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα να βρίσκεται βαθιά μέσα σε εσώνιο. Μετά τον πλήρη έλεγχο του ATP7B υπάρχει ένα ποσοστό 4% των ασθενών στους οποίους εντοπίζεται μόνο το ένα παθολογικό αλληλόμορφο. Επίσης, η παρακολούθηση των φορέων με μία μετάλλαξη και η απόκριση στη θεραπεία μπορούν να συμβάλλουν στη διάγνωση της νόσου Wilson.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Uncategorized References

1. Letelier ME, Lepe AM, Faundez M, Salazar J, Marin R, Aracena P, et al. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chemico-biological interactions*. 2005;151(2):71-82.
2. Festa RA, Thiele DJ. Copper: an essential metal in biology. *Current biology : CB*. 2011;21(21):R877-83.
3. Skjorringe T, Amstrup Pedersen P, Salling Thorborg S, Nissen P, Gourdon P, Birk Moller L. Characterization of ATP7A missense mutants suggests a correlation between intracellular trafficking and severity of Menkes disease. *Scientific reports*. 2017;7(1):757.
4. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annual review of nutrition*. 2002;22:439-58.
5. Chang JJ, Hahn SH. The genetics of Wilson disease. *Handbook of clinical neurology*. 2017;142:19-34.
6. Gouider-Khouja N. Wilson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 2009;15 Suppl 3:S126-9.
7. Chen C, Shen B, Xiao JJ, Wu R, Duff Canning SJ, Wang XP. Currently Clinical Views on Genetics of Wilson's Disease. *Chinese medical journal*. 2015;128(13):1826-30.
8. Arioiz C, Li Y, Wittung-Stafshede P. The six metal binding domains in human copper transporter, ATP7B: molecular biophysics and disease-causing mutations. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 2017;30(6):823-40.
9. Coffey AJ, Durkie M, Hague S, McLay K, Emmerson J, Lo C, et al. A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom. *Brain : a journal of neurology*. 2013;136(Pt 5):1476-87.
10. Bandmann O, Weiss KH, Kaler SG. Wilson's disease and other neurological copper disorders. *The Lancet Neurology*. 2015;14(1):103-13.
11. Panagiotakaki E, Tzetzis M, Manolaki N, Loudianos G, Papatheodorou A, Manesis E, et al. Genotype-phenotype correlations for a wide spectrum of mutations in the Wilson disease gene (ATP7B). *American journal of medical genetics Part A*. 2004;131(2):168-73.
12. Huster D, Finegold MJ, Morgan CT, Burkhead JL, Nixon R, Vanderwerf SM, et al. Consequences of copper accumulation in the livers of the *Atp7b*^{-/-} (Wilson disease gene) knockout mice. *The American journal of pathology*. 2006;168(2):423-34.
13. Curtis D. <A Study of Wilson.pdf>. 1999.
14. Svetel M, Kozi Dk, Stefanova E, Semnic R, Draga?evi Na, Kostic VS. Dystonia in Wilson's disease. *Movement Disorders*. 2001;16(4):719-23.
15. Machado A, Chien HF, Deguti MM, Cancado E, Azevedo RS, Scaff M, et al. Neurological manifestations in Wilson's disease: Report of 119 cases. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2006;21(12):2192-6.
16. European Association for Study of L. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *Journal of hepatology*. 2012;56(3):671-85.
17. Langwinska-Wosko E, Litwin T, Dziezyc K, Czlonkowska A. The sunflower cataract in Wilson's disease: pathognomonic sign or rare finding? *Acta neurologica Belgica*. 2016;116(3):325-8.
18. Sharma S, Toppo A, Rath B, Harbhajanka A, Lalita Jyotsna P. Hemolytic Anemia as a Presenting Feature of Wilson's Disease: A Case Report. *Indian journal of hematology & blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion*. 2010;26(3):101-2.
19. Wang H, Zhou Z, Hu J, Han Y, Wang X, Cheng N, et al. Renal impairment in different phenotypes of Wilson disease. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2015;36(11):2111-5.

20. Schilsky ML. Wilson Disease: Diagnosis, Treatment, and Follow-up. *Clinics in liver disease*. 2017;21(4):755-67.
21. Ferenci P. Diagnosis of Wilson disease. *Handbook of clinical neurology*. 2017;142:171-80.
22. Weiss KH, Thurik F, Gotthardt DN, Schafer M, Teufel U, Wiegand F, et al. Efficacy and safety of oral chelators in treatment of patients with Wilson disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2013;11(8):1028-35 e1-2.
23. Aggarwal A, Bhatt M. Advances in Treatment of Wilson Disease. Tremor and other hyperkinetic movements. 2018;8:525.
24. Ranucci G, Di Dato F, Spagnuolo MI, Vajro P, Iorio R. Zinc monotherapy is effective in Wilson's disease patients with mild liver disease diagnosed in childhood: a retrospective study. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:41.
25. Litwin T, Dziezyc K, Karlinski M, Chabik G, Czepiel W, Czlonkowska A. Early neurological worsening in patients with Wilson's disease. *Journal of the neurological sciences*. 2015;355(1-2):162-7.
26. Wang XH, Cheng F, Zhang F, Li XC, Kong LB, Li GQ, et al. Living-related liver transplantation for Wilson's disease. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2005;18(6):651-6.
27. Poujois A, Woimant F. Wilson's disease: A 2017 update. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2018.
28. Ferenci P, Czlonkowska A, Merle U, Ferenc S, Gromadzka G, Yurdaydin C, et al. Late-onset Wilson's disease. *Gastroenterology*. 2007;132(4):1294-8.
29. Gupta A, Aikath D, Neogi R, Datta S, Basu K, Maity B, et al. Molecular pathogenesis of Wilson disease: haplotype analysis, detection of prevalent mutations and genotype-phenotype correlation in Indian patients. *Human genetics*. 2005;118(1):49-57.
30. Santhosh S, Shaji RV, Eapen CE, Jayanthi V, Malathi S, Chandy M, et al. ATP7B mutations in families in a predominantly Southern Indian cohort of Wilson's disease patients. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology*. 2006;25(6):277-82.
31. Okada T, Shiono Y, Hayashi H, Satoh H, Sawada T, Suzuki A, et al. Mutational analysis of ATP7B and genotype-phenotype correlation in Japanese with Wilson's disease. *Human mutation*. 2000;15(5):454-62.
32. Al Jumah M, Majumdar R, Al Rajeh S, Awada A, Al Zaben A, Al Traif I, et al. A clinical and genetic study of 56 Saudi Wilson disease patients: identification of Saudi-specific mutations. *European journal of neurology*. 2004;11(2):121-4.
33. Mann T, Humbert R, Dorschner M, Stamatoyannopoulos J, Noble WS. A thermodynamic approach to PCR primer design. *Nucleic acids research*. 2009;37(13):e95.
34. Thornton B, Basu C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;39(2):145-54.
35. Ye J. <Primer-BLAST A tool to design target-specific.pdf>. *BMC Bioinformatics*. 2012.
36. Loudianos G, Lovicu M, Dessi V, Tzetis M, Kanavakis E, Zancan L, Zelante L, Galvèz-Galvèz C, Cao A. Abnormal mRNA splicing resulting from consensus sequence splicing mutations of ATP7B. 2002;10.1002/humu.10121

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Σχεδιασμός εκκινητών του γονιδίου *ATP7B*

ATP7B

Exon 1

catccgtgtgaagaggggctgcccgtcccgaatgaaggggcggTTCGGGACCCTGTTTGCTTTAGA GCCGAGC
 CCGCCGATGCCCTCAC
 [ACTCTGCGCCTCTCTCCGGGACTTTAAACCCCGCTCTCTCCAACGACCAGGTGACCTTTTGCTCTGA
 GCCAGATCAGAGAAGAAATTCGGTGTCTCGTGGGGACGATGCCTGAGCAGGAGAGACAGATCACAGCCA
 GAGAAGGGGCCAGTCGGAAAgtgagttttgttcccccgcgtccgcgcagcgtgctcactccaccagga]ggattttcctccc
 cgttcggcgcttactcgcccaggggggtcgcagggagggcagagccagacccagctccagggatgtctggcgtgggagaaaagga
 cccttagaaaaagtgtccgtcaactgatgtttgggagcaatggaaaaccgcgacctcaaalatcatctttatgcttttaagggg

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGACCCCTGTTGCTTTAGA	20	57.42	50.00	3.00	2.00
Reverse primer	AACCGGGGAGGAAAATC	18	57.69	55.56	4.00	1.00
Products on target templates						
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly product length = 271 Features associated with this product: copper-transporting ATPase 2 isoform a copper-transporting ATPase 2 isoform c						
Forward primer	1 GGACCCCTGTTGCTTTAGA 20					
Template	52011489 52011470					
Reverse primer	1 AACCGGGGAGGAAAATC 18					
Template	52011219 52011236					

Exon 2

tccttcatttttagatgctgccttagccttctgtgatgtatgttcttctacccttgggatatttgcaccgsgcattgtttccatt
 ttcctcagtccag[agaagctgggatgtttagaataattggttcaaggtaaaaatgttatttctttcttttag
 ATCTTATCTAAGCTTCTTTGCCTACCCTGCCTGGAAACAGCAATGAAGAAGAGTTT
 GCCTTGACAAATGTTGGCTATGAAGGTGGTCTGGATGGCCTGGGCCCTTCTTCTCAGGTG
 GCCACCAGCACAGTCAAGGATCTTGGGCATGACTTCCAGTCAATGTGTAAGTCCATTGAG
 GACAGGATTTCCAATTTGAAAGGCATCATCAGCATGAAGTTTCCCTGGAAACAGGCAGT
 GCCACTGTGAAATATGTGCCATCGGTTGTGTGCCTGCAACAGGTTTGCATCAAAATITGGG
 GACATGGGCTTCGAGGCCAGCATTGCAGAAAGGAAAGCCAGCCTCTGGCCCTCAAAGTCC
 TTGCCTGCCAGGAGGCTGTGGTCAAGCTCCGGGTGGAGGGCATGACCTGCCAGTCTGT

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGACACCAAGTGGCATTGTT	20	58.23	45.00	6.00	3.00
Reverse primer	CTGCCTTCTCTTCTGCAATG	20	57.35	50.00	4.00	3.00

Products on target templates
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 446
Features associated with this product:
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3](#)
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3](#)

Forward primer	1	TGACACCAAGTGGCATTGTT	20
Template	51975274	51975255
Reverse primer	1	CTGCCTTCTCTTCTGCAATG	20
Template	51974829	51974848

G C C A C T G T G A A A T A T G T G C C A T C G G T T G T G T G C C T G C A A C A G G T T T G C C A T C A A A T T G G G
 [G A C A T G G G C T T C G A G G C C A G C A T T G C A G A A G G A A G G C A G C C T C C T G G C C C T C A A G G T C C
 T T G C C T G C C A G G A G G C T G T G G T C A A G C T C C G G G T G G A G G G C A T G A C C T G C C A G T C C T G T
 G T C A G C T C C A T T G A A G G C A A G G T C C G G A A C T G C A A G G A G T A G T G A G A G T C A A A G T C T C A
 C T C A G C A A C C A A G A G G C C G T C A T C A C T T A T C A G C C T T A T C T C A T T C A G C C G A A G A C C T C
 A G G G A C C A T G T A A A T G A C A T G G G A T T T G A A G C T G C C A T C A A G A G C A A A G T G G C T C C C T T A]
 A G C C T G G G A C C A A T T G A T A T T G A G C G G T T A C A A A G C A C T A A C C C A A A G A G A C C T T T A T C T
 T C T G C T A A C C A G A A T T T T A A T A A T T C T G A G A C C T T G G G G C A C C A A G G A A G C C A T G T G G T C
 A C C C T C C A A C T G A G A A T A G A T G G A A T G C A T T G T A A G T C T T G C G T C T T G A A T A T T G A A G A A

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AATATGTGCCATCGGTTGTG	20	56.48	45.00	4.00	1.00
Reverse primer	AGTGCTTTGTAACCGCTCAA	20	58.04	45.00	3.00	3.00

Products on target templates
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 389
Features associated with this product:
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3](#)
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3](#)

Forward primer	1	AATATGTGCCATCGGTTGTG	20
Template	51974918	51974899
Reverse primer	1	AGTGCTTTGTAACCGCTCAA	20
Template	51974530	51974549

A G G G A C C A T G T A A A T G A C A T G G G A T T G A A G C T G C C [A T C A A G A G C A A A G T G G C T C C T T A
 A G C C T G G G A C C A A T T G A T A T T G A G C G G T T A C A A A G C A C T A A C C C A A A G A G A C C T T T A T C T
 T C T G C T A A C C A G A A T T T T A A T A A T T C T G A G A C C T T G G G G C A C C A A G G A A G C C A T G T G G T C
 A C C C T C C A A C T G A G A A T A G A T G G A A T G C A T T G T A A G T C T T G C G T C T T G A A T A T T G A A G A A
 A A T A T T G G C C A G T C C T A G G G T T C A A A G T A T T C A A G T G T C C T T G G A G A A C A A A A C T G C C
 C A A G T A A A G T A T G A C C C T T C T T] G T A C C A G C C A G T G G C T C T G C A G A G G G C T A T C G A G G C A

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGACATGGGATTTGAAGCTG	20	56.01	45.00	4.00	2.00
Reverse primer	TGCTCGATAGCCCTCTG	18	58.14	61.11	4.00	1.00

Products on target templates
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 346
Features associated with this product:
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3](#)
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3](#)

Forward primer	1	TGACATGGGATTTGAAGCTG	20
Template	51974614	51974595
Reverse primer	1	TGCTCGATAGCCCTCTG	18
Template	51974269	51974286

AATATGGCCAGCTCTAGGGGTTCAAAGTATTCAAGGTCCTTGGAGAA[CAAACTGCC
 CAAGTAAAGTATGACCCTTTTGTACCAGCCAGTGGCTCTGCAGAGGGCTATCGAGGCA
 CTTCCACCTGGGAATTTAAAGTTTCTTCTCTGATGGAGCCGAAGGGAGTGGGACAGAT
 CACAGGTCTTCCAGTTCATTCCCTGGCTCCCCACCGAGAAACCAAGTCCAGGGCACA
 TGCAGTACCACTCTGATTGCCAITGCCGGCATGACCTGTGCATCCTGTGTCCAATCCATT
 GAAGGCATGATCTCCAACCTGGGAAGGGTGGAGCAAAATTCGGTGTCTTTGGCCGAAGGG
 ACTGCAACAGTCTTTATAATCCCTCTGTGAATTAGCCAGAAAGAACTCAGAGCTGCTATA
 GAAGCATGGATTGAGGCTTCAGTCTGTTCTGgtaagtagtgtgtttgaggcaagtc]cagagcctgtctccttttctctt
 gttcttatagctcctggaagggtggtataggtgagccctgctccctgctccatgtcaacagtgaacaaaatcctgcaaaccttctctgca
 tgttaaatgttaagatagaggaataaatctccaa

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CAGCTCTAGGGGTTCAAAG	20	57.59	56.00	6.00	0.00
Reverse primer	CACAAAGAGAAAAGGAGACAAGC	23	58.15	43.48	2.00	2.00
Products on target templates						
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly						
product length = 497						
Features associated with this product:						
copper-transporting_ATPase_2 isoform X3						
copper-transporting_ATPase_2 isoform X3						
Forward primer	1 CAGCTCTAGGGGTTCAAAG 20					
Template	51974379 51974369					
Reverse primer	1 CACAAAGAGAAAAGGAGACAAGC 23					
Template	51973883 51973995					

Exon 3

aggggctgaggctgctcgggtgggagccgggacaatgaacccctaccaagagccctga[aac
 ctctgttctgaaaacacatattatttgctctctaatggaatattttctgacattttatcctagAAAGCTGTTCTACTA
 ACCCTCTTGGAAACCAAGTGTCTGGGAATCCATGGTGCAAACTACAGATGGTACACCTA
 CATCTGTGCAGGAAGTGGCTCCCCA CACTGGGAGGCTCCCTGCAAACCATGCCCCGGACAT
 CTTGGCAAAGTCCCCACAATCAACCAGAGCAGTGGCAACCGCAGAAGTGCTTCTTACAGATC
 AAAGGCATGACCTGTGCTATCCTGTGTGCTAACATAGAAAGGAATCTGCAGAAAGAAGCT
 Ggtaagagatgaaccgatgtgaactt]aggaatgctgctgtagacctcgtattctcct

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCTCACCAAGAGCCCTGA	18	58.19	61.11	4.00	1.00
Reverse primer	CGAGGTCTATACGACGATTC	21	58.68	52.38	4.00	2.00
Products on target templates						
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly						
product length = 395						
Features associated with this product:						
copper-transporting_ATPase_2 isoform X3						
copper-transporting_ATPase_2 isoform X3						
Forward primer	1 CCTCACCAAGAGCCCTGA 18					
Template	51970835 51970818					
Reverse primer	1 CGAGGTCTATACGACGATTC 21					
Template	51970441 51970461					

Exon 4

gtttctttgtcggttatattgactgtgtcaacctaaggccctgcccaccagagtgttacagccatgacctgatggttcag
 GTGTTCTCTCGTGTTGGTTGCCITGATGGCAGGAAAGGCAGAGATCAAGTATGACCCAG
 AGGTATCCAGCCCTCGAGATAGCTCAGTTCACTCAGGACCTGGGTTTGGAGGCAGCAG
 TCATGGAGGACTACGAGGCCTCCGATGGCAAATTGAGCTGACA]gtaagtagtgggtgctg
 cgaaatcacagctctcagagttgcatcttggacacatccatctttgtgattagtaaattdccatcttggacgtgtctggt
 tttgttggttggg

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTGCCACCCAGAGTGTTA	19	58.93	57.89	5.00	2.00
Reverse primer	CAGAAGCCTGTAACCCCGTA	20	59.10	55.00	3.00	2.00

Products on target templates
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 245
Features associated with this product:
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3](#)
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3](#)

Forward primer	1	CTGCCACCCAGAGTGTTA	19
Template	51968649	51968631
Reverse primer	1	CAGAAGCCTGTAACCCCGTA	20
Template	51968495	51968424

Exon 5

ggaacgttgagaatctcacatgcggggttggagggtgagtcagggtcttgagagcagtgctggaggaggaaaggctc
 ttggctgcctgtaacctagactccctggactggctttcacagggttctctgctcgtggttgggattcttgccatccctgtgtgcag
 [ATCAGGGGATGACCTGCGCTCCTGTGTCCACACATAGAGTCCAAACTCACGAGGACAAATGGCATC
 ACTTATGCCTCCGTGCCCTTGCCACCAGCAAAGCCCTTGTTAAGTTTIGACCCGGAAATTATCGGTCCA
 CGGATATTATCAAAATATTATTGAG]aaagtaattcattaaaattgtagtcaccttttaaaaacagtaataataatagtgaa
 aaaaatgagaataatagtaagaaaaatgaaaataaccaaaattcttcaacttt

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTTCCTTGATCCTGGGTCTG	20	56.82	50.00	5.00	1.00
Reverse primer	GCTATATTTTCTCATTTTCTTCACTG	27	55.90	29.63	4.00	3.00

Products on target templates
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p7 Primary Assembly

product length = 291
Features associated with this product:
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X2](#)
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X2](#)

Forward primer	1	TTTCCTTGATCCTGGGTCTG	20
Template	51965080	51965061
Reverse primer	1	GCTATATTTTCTCATTTTCTTCACTG	27
Template	51964790	51964816

Exon 6

aaagtgctttctgccaatgcatatttaaccagtagcttctccttttcccacccctctcttttaatgacag[GAAATGGCTTT
 CATGCTTCCCTGGCCAGAGAAACCCCAACGCTCATCACTTGGACCAAGATGGAAATAAAGCA]gttaggt
 agaacacaaaagataaaactcagctctcatctaaagtccttctctacctgggcccactctgccagctggcttctctccagtgctcct
 cctcctggattagctgcctttaccctgtaatgtgaacctctgaaacagtgctgtccaaagaagtctggaatgatggc

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAAGTGCTTTCTGCCAATGC	20	57.84	45.00	6.00	2.00
Reverse primer	CCATGGGAAGACAAGACCAG	20	57.88	55.00	6.00	1.00

Products on target templates
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 247
Features associated with this product:
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3](#)
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3](#)

Forward primer	1	AAAGTGCTTTCTGCCAATGC	20
Template	51961990	51961971
Reverse primer	1	CCATGGGAAGACAAGACCAG	20
Template	51961744	51961763

Exon 7

cagaaggggagtggtgtaatccagggtgacaagcagcatctgatafa[ctgtgttgctgcatttgcttccagGTGGAAGAAGTCT
 TTCCTGTGCAGCCTGGTGTGGCATCCCTGTCATGGCCTTAAATGATCTATATGCTGATACCCAGCAACGA

GCCCACAGTCATGGTCCTGGACCACAACATCATTCCAGGACTGTCCATICTAAATCTCATCTCTTTAT
 CTTGTGTACCTTGTCCAGGtatatatgagaagtggcaga]cctctccctccatgctgtgtggccctcagatacttcccg
 taagcgcacacatagtgctttagcttggttaaatggcactttattgcagct

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CAGAAGGGAGTGGCTTGTA	20	59.02	55.00	3.00	2.00
Reverse primer	ACACAGCATGGAAGGGAGAG	20	59.38	55.00	4.00	0.00

Products on target templates
 >NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 293
 Features associated with this product:
 copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3
 copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3

Forward primer	1	CAGAAGGGAGTGGCTTGTA	20
Template	51960396	51960377
Reverse primer	1	ACACAGCATGGAAGGGAGAG	20
Template	51960104	51960123

Exon 8

cacaaagctagaggcttggccatcccaggcccttggccctgtgtcgctcattgaactcctccctacttgctggcag]ccttdactgtcct
 tgtccttcagCTCCTCGGTGGGTGGTACTTCTACGTTACAGGCCTACAAATCTCTGAGACACAGGTCAGGCCAAC
 ATGGACGTGCTCATCGTCCTGGCCACAAGCATTGCTTATGTTTATCTCTGGTCATCCTGGTGGTTGCTGT
 GGCTGAGAAAGCGGAGAGGAGCCCTGTGACATTCCTCGACACGCCCCCATGCTCTTTGTGTTTCATTGCC
 CTGGGCCGGTGGCTGGAACACTTGCAAAGtatacagcagcttcaggttc]agaaaagagctgctcctcagtaaacaaat
 ctcaactcctcgaacaccatggttagaattactaattatacacagcatagagacagactctaaagaata

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGTCGCTCATTGAACCTCCT	21	59.10	47.62	5.00	0.00
Reverse primer	CATGGTTCAGAGGAAGTGAG	22	58.67	50.00	4.00	0.00

Products on target templates
 >NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 366
 Features associated with this product:
 copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3
 copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3

Forward primer	1	TGTCGCTCATTGAACCTCCT	21
Template	51958604	51958584
Reverse primer	1	CATGGTTCAGAGGAAGTGAG	22
Template	51958239	51958260

Exon 9

ctctgcaccagctgtctctaacaccacgctgtgactctcaggctgggttggacaggtctgcttcgtagatgctt]catttcacattcgggt
 atttcttagAGCAAACCTCAGAAGCCCTGGCTAAACATCATGTCCTCCAAAGCCACAGAAGCCACCGTTGTG
 ACCCTTGGTGAGGACAATTAATCATCAGgtgagttatggtatcaaatgtc]tttgggttgatctatcaatctgtgtgagc
 tgcacagatgcccattgtatggacattgcaatagaccttggtagtggggcagagacacagt

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTGACTCTCAGGCTGGGTTT	20	59.60	55.00	5.00	3.00
Reverse primer	GATGACGCTCACAGATTGA	21	58.65	47.62	4.00	3.00

Products on target templates
 >NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 224
 Features associated with this product:
 copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3
 copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3

Forward primer	1	GTGACTCTCAGGCTGGGTTT	20
Template	51957678	51957659
Reverse primer	1	GATGACGCTCACAGATTGA	21
Template	51957455	51957475

Exon 10

aagcaatacagtgtactattgtaacagctggcctgaaactaccctatgacggaatgagtgccatgttgagtgataagtgccgtttg
 ttgcagGGAGGAGCAAGTCCCATGGAGCTGGTG CAGCGGGCGATATCGTCAAGGTGGTCCCTGGGGG
 AAGTTTCCAGTGGATGGGAAAGTCCTGGAAGGCAATACCATGGCTGATGAGTCCCATCACAGgtgag
 atggcttgtttcatgtt]cctcaggaggatcatagcagctgtcaggtcatcatg

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CTAGAACCTGACCCGGTGAC	20	59.47	60.00	5.00	3.00
Reverse primer	TGACCTGACAGCTGCTATGAT	21	58.89	47.62	6.00	3.00
Products on target templates						
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly						
product length = 246						
Features associated with this product:						
copper-transporting ATPase 2 isoform X3						
copper-transporting ATPase 2 isoform X3						
Forward primer	1 CTAGAACCTGACCCGGTGAC 20					
Template	51950461	51950442				
Reverse primer	1 TGACCTGACAGCTGCTATGAT 21					
Template	51950216	51950236				

Exon 11

agtgcigggatggggctgagcaagtgacag[ttgtctctttcctacgtctagGAGAAGCCATGCCAGTCACTAAGAAACCCGG
 AAGCACTGTAATTGCGGGGCTATAAAIGCACATGGCTCTGTGCTCATTAAAGCTACCCACGTGGGCAAT
 GACACCACITTTGGCTCAGATTGTGAAACTGGTGAAAGAGGCTCAGATGTCAAAGgtaatgaagaaatttttaa
 a]ctaacctcatctttctcgttttagaalaatgtggaagagttctgggaaatcagacagttttatgagtagagattgattagtaaatgtggtt
 aatgaa

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATGGGGCTGAGCAAGTGAC	19	60.00	57.89	5.00	3.00
Reverse primer	TTTCTAAACGAGAAAGATGAAGTT	25	55.47	28.00	5.00	3.00
Products on target templates						
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly						
product length = 245						
Features associated with this product:						
copper-transporting ATPase 2 isoform X3						
copper-transporting ATPase 2 isoform X3						
Forward primer	1 ATGGGGCTGAGCAAGTGAC 19					
Template	51950203	51950185				
Reverse primer	1 TTTCTAAACGAGAAAGATGAAGTT 25					
Template	51949959	51949983				

Exon 12

ggagattaaccaatctttatccatgcttgggtgtttatttctcataggttgtaattcccaaggct[ttggtgtttattttcatagGCACC
 CATTGAGCAGCTGGCTGACCGTTTAGTGGATATTTTGTCCATTTATCATCATCATGTCAA CTTTGACGTTI
 GGTGGTATGGATTGTAATCGGTTTTATCGATTTGGTGTGTTTCAGAGATACCTTCCTgtaagtgaatgccttg
 gccllatggtggttgtgttttaataatctactgacattgatcctgttctttcaalacttagatcactgggctttaaattatcattacatttta
 tttgctt

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGGTTGTAATTTCCCATGGTC	21	55.82	42.86	6.00	2.00
Reverse primer	TGAAAGAACAGGATCAATGTCAG	23	56.79	39.13	4.00	1.00

Products on target templates
 >NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 248
 Features associated with this product:
[cooper-transporting ATPase 2 isoform X3](#)
[cooper-transporting ATPase 2 isoform X3](#)

Forward primer	1	AGGTTGTAATTTCCCATGGTC	21	
Template	51949837	51949817	
Reverse primer	1	TGAAAGAACAGGATCAATGTCAG	23	
Template	51949590	51949612	

Exon 13

t t t c g g a a c c c a a g t t c g t c a c g t t g t g t c c a g t g c c c c c t g a a a t g t c c t t a t g t g a t t a g a g t t c t g a g a g c t t c t t a t g a a t r t c a
 a c c t g c c t c t g a c t c t g t c t g t t t c a g A A C C C A A C A A G C A C A T C T C C C A G A C A G A G G T G A T C A T C C G G T T T G C T T
 T C C A G A C G T C C A T C A C G G T G C T G T G C A T T G C C T G C C C T G C T C C C T G G G G C T G G C C A C G C C C A C G G C T G T
 C A T G G T G G G C A C C G G G T G G C C G C G C A G A A C G G C A T C T C A T C A A G G G A G G C A A G C C C C T G G A G A T G G
 C G C A C A A G g t c a g c c t g t a g c a g g c t t t c c c a t c c t g a g a g a t g a a a g t a g t a t c g t t t a c t a t t t d a c a t t g a g a g a a a g c c t g
 a g a g c c a c t c a a g a c a g c a g t g t t a a t t a c a t a g a a t a g

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGAGCTTCCTTATTGAACTCTCA	23	57.91	43.48	6.00	3.00
Reverse primer	AACAGATACTACTTTTCATCTCTCAGGA	27	59.16	37.04	4.00	3.00

Products on target templates
 >NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 300
 Features associated with this product:
[cooper-transporting ATPase 2 isoform X3](#)
[cooper-transporting ATPase 2 isoform X3](#)

Forward primer	1	GGAGCTTCCTTATTGAACTCTCA	23	
Template	51946530	51946508	
Reverse primer	1	AACAGATACTACTTTTCATCTCTCAGGA	27	
Template	51946231	51946257	

Exon 14

t c a c g t t a g g a a g c t g t g c a g g t g t c t t g t t t c c t g t c t g a g g c a g g t t g g g t g a a g t t c g c c t c a g g a t g t g a c t a g g a a g c c c t c c a
 t c t g t a t t g t g g t c a g t g a g t g t g g t g t t t t t g c a g A T A A A G A C T G T G A T G T T T G A C A A G A C T G G C A C C A T T A C C C A
 T G G C G T C C C A G G G T C A T G C G G G T G C T C T G C T G G G G G A T G T G G C A C A C T G C C C T C A G G A A G G T T C T
 G G C T G T G T G G G A C T G C G G A G G C C A G C A G T G A A C A C C C C T T G G G C G T G G C A G T C A C C A A A T A C T G T A
 A A G A G g t a c g t g g a c t t g g g c g t g g c c t g c c c t c c c g c a a t g t c t c t t t a t c c t c a c c a t g t c t t c t c d t a g t g c c c t c g a g g
 a g c c t t c t c t g t g t g t c t g g a a a c c a c t t a g a

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCCCCCTCATCTGTATTGTGG	20	57.35	55.00	3.00	3.00
Reverse primer	GAGAGAAGGACATGGTGAGGA	21	58.54	52.38	4.00	0.00

Products on target templates
 >NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 300
 Features associated with this product:
[cooper-transporting ATPase 2 isoform X3](#)
[cooper-transporting ATPase 2 isoform X3](#)

Forward primer	1	CCCCCCTCATCTGTATTGTGG	20	
Template	51944338	51944319	
Reverse primer	1	GAGAGAAGGACATGGTGAGGA	21	
Template	51944039	51944059	

Exon 15

ctttcgcgctgctctctgacaccttcacccctgtgctccctgctcctgctgccctccctttcacttcacccccttggcttacagtttcctctt[cttc
 tctttccaccttccagGAACTTGGAACAGAGACCTGGGATACTGCACGGACTTCCAGGCAGTGCCAGGCTGT
 GGAATTGGGTGCAAAAGTCAGCAACGTGGAAGGCATCCTGGCCACAGTGAGCGCCCTTIGAGTGCACCG
 GCCAGTCACTGAATGAGGCTGGCAGCCTCCCGCAGAAAAGgtattgctggctttt[gtcctctg]cagctggtaaaa
 gttagaggtgggtcaaaccacagagagcaaccaagcccagcagtgtgctcctgctgtgcggcagacaggttcattggctaaggcacc

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTTCACTTCACCCCTCTTGG	20	57.34	50.00	2.00	0.00
Reverse primer	CTGTGGTTTGACCCACCTCT	20	59.53	55.00	6.00	1.00

Products on target templates
 >NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 283
 Features associated with this product:
 copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3
 copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3

Forward primer 1 TTTCACTTCACCCCTCTTGG 20
 Template 51942611 51942592

Reverse primer 1 CTGTGGTTTGACCCACCTCT 20
 Template 51942329 51942348

Exon 16

gatgctgtcacaagaggtgcttaacaaggttcaagttttcagaatggttaaaaggaatattttctgtttaaaggattgcaagtttttagttc
 acagtgaattggaccatttagaata[accacagcccttttgaatagATGCAGTCCCCAGACCTTCTCTGTGCTGATG
 GAAACCGTGAGTGGCTGAGGGCGCAACGGTTTAACCAITTTCTAGCGATGTCAGTGACGCTATGACAGACC
 ACGAGATGAAAGGACAGACAGCCATCCTGTGGCTATTGACGGtattccttctgctcctt[ctt]cgcctctctcaga
 aatacagttttctcgatatacaggcaaaagagtcctcctttataaaagaaaagaagacaacaaagccttctctctaatt

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCTGTAAAAGGATTGCATGG	21	56.09	42.86	6.00	2.00
Reverse primer	AGGAGGACTTTTGCTGA	20	58.27	50.00	4.00	1.00

Products on target templates
 >NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 300
 Features associated with this product:
 copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3
 copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3

Forward primer 1 GCTGTAAAAGGATTGCATGG 21
 Template 51941303 51941283

Reverse primer 1 AGGAGGACTTTTGCTGA 20
 Template 51941004 51941023

Exon 17

ttatatgatgagaacattgcaagtggtgtatcttgggtcggggtgcccaacttgtagctgctg[atgctggctggttcgctccagGTGT
 GCTCTGTGGGATGATCGCAATCGCAGACGGCTGTCAAGCAGGAGGCTGCCCTGGCTGTGCACACGCTGCA
 GAGCATGGGTGTGACGTGTTCTGATCACGGGGGACACCGGAAGACAGCCAGAGCTATTGCCACCC
 AGgtacagcccttaattgttcaaacctgtgtaaagctataaaagcagttagag]acaagtaagcaccagttggccagcaactgagct
 gtactctgctctttctcccttgcctggaatgctt

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCCAACTGTGTAGCTGCTG	20	59.12	55.00	5.00	3.00
Reverse primer	GGCCAACCTGGTCTACTTT	20	58.67	50.00	4.00	0.00

Products on target templates
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 259
Features associated with this product:
[copper-transporting ATPase 2 isoform X3](#)
[copper-transporting ATPase 2 isoform X3](#)

Forward primer	1	CCCAACTGTGTAGCTGCTG	20
Template	51939234	51939215
Reverse primer	1	GGCCAACCTGGTCTACTTT	20
Template	51938976	51938995

Exon 18

tcaactgactggaccagaggccgagggcagaggagccaaggtaacttaaggcttctgctgctgatacctttgccaadactaggca
 [ttgcttccctttgtcttagGTGGCATCAACAAAGTCTTIGCAGAGGIGCTGCCTTCGCACAAGGTGGCCAAGG
 TCCAGGAGCTCCAGAATAAAGGGAAAGAAAGTCGCCATGGTGGGGATGGGTCAATGACTCCCGGCC
 TTGGCCAGGCGACATGGGTGTGGCCATTGGCACCGGCACGGATGTGGCCATCGAGGCCAGCGACGT
 CGTCCATTATCAGAgtagcgtggctgcagccag]gctgtgggtgctgggagggcaatgggcaaaccttctcaactgtgtgctcctc
 tccatcag

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGGCAAGGTAACCTGAGGT	20	59.60	55.00	4.00	3.00
Reverse primer	CTGATGGAGAGGACACACA	20	59.10	55.00	2.00	0.00

Products on target templates
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 364
Features associated with this product:
[copper-transporting ATPase 2 isoform X3](#)
[copper-transporting ATPase 2 isoform X3](#)

Forward primer	1	GGGCAAGGTAACCTGAGGT	20
Template	51937757	51937738
Reverse primer	1	CTGATGGAGAGGACACACA	20
Template	51937394	51937413

Exon 19

gtgagcgtggctgcagccaggctgtgggtgctgggagggcaatgggcagacccttctca[ctgtgtgctcctctccatcag
 AATGATTTGCTGGATGTGGTGGCTAGCATTACCTTCCAGAGGACTGTCGAAAGGATACGCATCAACC
 TGGTCTGGCAGTATTATAACCTGGTGGGATACCCATTGCAGCAGgtaggcagctcttaccact]gtgctccag
 ctgcccagaaaggcttctgctcccaggttctctgctggggttagtgaatggctcactcctggctggctagaggcgtttagaaggct

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CAATGGCAGACCCCTTC	18	57.66	61.11	5.00	3.00
Reverse primer	TCACTAACCCAGCAGGAAC	20	59.31	55.00	4.00	0.00

Products on target templates
>NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 239
Features associated with this product:
[copper-transporting ATPase 2 isoform X3](#)
[copper-transporting ATPase 2 isoform X3](#)

Forward primer	1	CAATGGCAGACCCCTTC	18
Template	51937436	51937419
Reverse primer	1	TCACTAACCCAGCAGGAAC	20
Template	51937198	51937217

Exon 20

tggggcagcccggtgctctgaagccctctcctggctcctctcccagacctagggtgtgag[tcg]agttctttcttcccagGTGTCTCA
 TGCCCATCGGCAITGTGCTGAGCCCTGGATGGCTCAGCGGCCATGGCAGCCTCCTCTGTGTCIGTGGT
 GCTCTCATCCCTGCAGCTCAAGTGgtgagtcctcctcaggtggagcat]ctgiggaggctcccaggaggccttgtcattctgcat
 gcttagcacagtggaacttgcctctcatttccattcattcacctgggacaaatgctgca

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCTCCTCTCCCAGACCTA	19	59.38	63.16	3.00	2.00
Reverse primer	TGGAAATGAGAGGCAAGT	20	57.02	45.00	3.00	3.00

Products on target templates
 >NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 245
 Features associated with this product:
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3](#)
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3](#)

Forward primer	1	GCTCCTCTCCCAGACCTA	19
Template	51935743	51935725
Reverse primer	1	TGGAAATGAGAGGCAAGT	20
Template	51935499	51935518

Exon 21

atgagaggcctcaccaggcttagaaa[aa]aaa[aa]agcctt[gt]ttctagaatggctcagatgct[gt]tgcgttcttgctttcagCTATAA
 GAAGCCTGACCTGAGAGGTAAGAGGCACAGGCGCATGGCCACATGAAGCCCTGACGCGCATCCAGG
 TCAGTGTGCACATAGGCGATGGATGACAGGTGGCGGGACTCCCAGGGCCACACCATGGGACCAGGTC
 AGCTATGTCAGCCAGGTGTGCTGTCTCCCTGACGTCCGACAAGCCATCTCGGCACAGCGCTGCAGCAG
 ACGATGATGGGACAAGTGTCTCTGCTCTGAATGGCAGGGATGAGGAGCAGTACATCTGATGACTTC
 AGGCAGGCGGGCCG]GGGCAGGGACTGCCTCCACTACCACAAGCTGAGCAGGACAGCCAGCAGCAG
 GATGGGCTGAGCTAGCTCCAGCTTTGGGGACTTCCGCTCCCTGGATATGTCCAGTCATCTGCCCTGCA
 GC

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCCTTACCAGGCTTAGAAA	20	57.80	50.00	4.00	1.00
Reverse primer	GTGGTGAAGGAGGCAAGTC	20	60.60	60.00	2.00	1.00

Products on target templates
 >NC_000013.11 Homo sapiens chromosome 13, GRCh38.p12 Primary Assembly

product length = 398
 Features associated with this product:
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3](#)
[copper-transporting_ATPase_2_isoform_X3](#)

Forward primer	1	GCCTTACCAGGCTTAGAAA	20
Template	51935105	51935086
Reverse primer	1	GTGGTGAAGGAGGCAAGTC	20
Template	51934708	51934727