



**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SERPINA1 GENİNDE ALFA-1 ANTİTRİPSİN EKSİKLİĞİNE
(A1ATD) NEDEN OLAN ALLELLERİN ARMS TEKNİĞİ İLE
GENOTİPLENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Rabia Hande ŞAHİNGÖZ

**Danışman
Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL**

**RİZE
2023**

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında, Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL danışmanlığında, Rabia Hande ŞAHİNGÖZ tarafından hazırlanan *SERPINA1 Geninde Alfa-1 Antitripsin Eksikliğine (A1ATD) Neden Olan Allellerin ARMS Tekniği ile Genotiplenmesi* adlı bu tez çalışması, 27/01/2023 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliği/oy çokluğuyla başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı, Adı SOYADI

İmza

Başkan : Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ

Üye : Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Faruk SAYDAM

ETİK BEYAN

Tıbbi Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “*SERPINA1* Geninde Alfa-1 Antitripsin Eksikliğine (A1ATD) Neden Olan Allellerin ARMS Tekniği İle Genotiplenmesi” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

27 /01/2023

Rabia Hande ŞAHİNGÖZ

ÖN SÖZ

Yüksek lisans hayatım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen, sahip olduğu bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL'e;

Bir aile ortamında gibi hissettiğim, her daim bilgilerini, tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen çok değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Faruk SAYDAM, Dr. Öğr. Üyesi Hatice SEVİM NALKIRAN ve Dr. Öğr. Üyesi İhsan NALKIRAN'a;

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Göğüs Hastalıkları Polikliniğinde hasta ve kontrol örneklerin temininde yardımcı olan Prof. Dr. Aziz GÜMÜŞ ve İstatistik çalışmalarında yol gösteren Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KIVRAK'a;

Her zaman bilgisi, tavsiyeleriyle ve sevgisiyle yanımda olup bu zorlu tez sürecinde benden desteğini bir an için bile esirgemeyen canım dostum Elif İSLAMOĞLU KALE'ye, kısa sürede tanımama rağmen kardeş gibi gördüğüm, tezimin son aşamalarında manevi olarak yanımda olup yardımcı olan Ebiha CAN'a;

Hayatım boyunca beni her koşulda destekleyen, maddi manevi her anımda yanımda olan canım annem ve babama, canım ablam Tuğba ŞAHİNGÖZ ve biricik kız kardeşim Elanur ŞAHİNGÖZ'e;

Küçüklüğümünden beri her koşulda yanımda olup beni destekleyen canım Nermin teyzem ve Kemal enişteme teşekkür ederim.

Yüksek Lisans Tezi BAP Koordinatörlüğü tarafından TYL-2022-1347 nolu proje ile desteklenmiştir.

Rabia Hande ŞAHİNGÖZ

2023/RİZE

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
ETİK BEYAN	II
ÖN SÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
KISALTMALAR	VIII
TABLolar LİSTESİ	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Alfa-1 Antitripsin Geni	3
1.2. Alfa-1 Antitripsin Proteini.....	4
1.3. Alfa-1 Antitripsin Proteinin Yapısı.....	6
1.4. Alfa-1 Antitripsin Eksikliği.....	7
1.4.1. Epidemiyoloji.....	8
1.5. Alfa-1 Antitripsin Geni Mutasyonları	11
1.6. AAT İle İlişkili Hastalıklar	13
1.6.1. Amfizem	13
1.6.2. Kronik Obstrüktif Hastalığı	13
1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR): Optimizasyonu, Çeşitleri ve ARMS-PCR.....	14
1.7.1. PCR Optimizasyon Stratejileri.....	15
1.8. Multipleks PCR.....	20
1.8.1. Multipleks PCR Tasarımı.....	21

1.9. Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi (ARMS).....	22
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
2.1. Materyal	24
2.1.1. Alet ve Cihazlar	24
2.1.2. Kimyasal Malzemeler	25
2.1.3. Çözeltiler.....	26
2.1.4. Primerler	28
2.2. Yöntem.....	28
2.2.1. Salting-Out (Tuzla Çöktürme) Yöntemiyle DNA İzolasyon Protokolü.....	28
2.2.2. Konsantrasyon Ölçümü ve Saflık Belirleme	29
2.2.3. ARMS İçin Primer Tasarımı	30
2.2.4. PCR Optimizasyonu	33
2.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	34
2.2.6. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jelde Yürütülmesi (1.5).....	35
2.2.7. Örneklerin Görüntülenmesi	35
2.2.8. Dizi Analizi	35
2.2.9. S ve Z Allelleri Açısından Dizi Analizi ve ARMS-PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	36
2.2.10. İstatistiksel Analiz ve ARMS-PCR Yönteminin Güvenirliği.....	37
3. BULGULAR	39
3.2. ARMS-PCR Sonucuna Ait Jel Görüntüleri.....	47
3.3. Dizi Analizi Sonuçları	49
4. TARTIŞMA	54
4.1. Öneriler ve Kısıtlılık	56
KAYNAKÇA.....	57
EKLER.....	63

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ana Bilim Dalı : Tıbbi Biyoloji
Tez Türü : Yüksek Lisans Tezi
Danışman : Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL
Hazırlayan : Rabia Hande ŞAHİNGÖZ
Yıl : 2023
Sayfa Sayısı : 56

ÖZET

***SERPINA1* GENİNDE ALFA-1 ANTİTRİPSİN EKSİKLİĞİNE (A1ATD)
NEDEN OLAN ALLELLERİN ARMS TEKNİĞİ İLE GENOTİPLENMESİ**

Alfa-1-antitripsin eksikliği (AATD), *SERPINA1* olarak adlandırılan gendeki mutasyonlardan kaynaklı serumda normal sınırlardan düşük AAT seviyeleriyle karakterize otozomal ko-dominant bir hastalıktır. AAT hepatositlerde üretilerek kana salınır ve primer görevi vücudu nötrofil elastaz aktivitesinden korumaktır (antiproteaz). Serum AAT seviyesindeki eksiklik, nötrofil elastaz ve diğer proteolitik enzimlerin akciğer dokusunda hasar oluşturmaya ve buna bağlı olarak da amfizem, kronik bronşit, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), bronşektazi ve astım gibi hastalıklara neden olabilmektedir. *SERPINA1* geninde bugüne kadar 100'den fazla farklı mutasyon tanımlanmıştır. Bunlar arasında hastalıkla ilişkili en yaygın varyantlar S ve Z allelleri olarak belirlenmiştir. Normal AAT proteaz inhibitörü (PI) 'M' harfi ile gösterilmektedir. Varyantların tespitinde immünoassay yöntemler, izoelektrik odaklama (IEF) ve moleküler genotipleme (PCR ve PCR-RFLP) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Amplifikasyon-refrakter mutasyon sistemi (ARMS), tek baz değişiklikleri veya küçük delesyonlar içeren herhangi bir mutasyonu tespit etmek için basit, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Literatüre bakıldığında KOAH ve Amfizemli hastalarda ARMS metodu kullanılarak yapılmış bir genotipleme çalışması mevcut değildir. Planlan bu çalışmada ARMS-PCR yöntemiyle hastalıkla en sık ilişkili olan 'S' ve 'Z' varyantları ile bunların normal allellerinin genotiplenmesi amaçlanmıştır. KOAH ve amfizem tanısı konmuş hasta grubu (53 kişi) ile kontrol grubundan (33 kişi) periferik kan alınıp DNA'ları izole edilmiş ve tasarlanan özgün primer dizileri ile de PCR amplifikasyonları yapılmıştır. ARMS-PCR sonuçlarını doğrulamak amacıyla da tüm örneklerin ilgili bölgelerinin dizi analizi yapılmıştır. Sonuç olarak; bu yöntem ile Normal allel ve 'S' varyantı belirlenebilmiş ancak üç farklı primer kullanılmasına rağmen 'Z' varyantı ve normal alleli özgün olarak belirlenememiştir.

Anahtar Kelimeler: Alfa-1 Antitripsin (AAT), Alfa-1 antitripsin eksikliği (AATD), *SERPINA1* Geni, KOAH, Amfizem, ARMS-PCR

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies

Department : Medical Biology

Thesis Type : Master's Thesis

Supervisor : Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL

Author : Rabia Hande ŞAHİNGÖZ

Year : 2023

Pages : 56

ABSTRACT

GENOTYPING OF ALLELS CAUSING ALFA-1 ANTITRYPSIN DEFICIENCY (A1ATD) IN SERPINA1 GENE BY ARMS TECHNIQUE

Alpha-1-antitrypsin deficiency (AATD) is an autosomal co-dominant disease characterized by low-than-normal serum AAT levels caused by mutations in the gene called *SERPINA1*. AAT is produced in hepatocytes and released into the blood, and its primary function is to protect the body from neutrophil elastase activity (antiprotease). Deficiency in serum AAT level can cause damage to lung tissue by neutrophil elastase and other proteolytic enzymes, and consequently diseases such as emphysema, chronic bronchitis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), bronchiectasis and asthma. More than 100 different mutations have been identified in the *SERPINA1* gene to date. Among these, the most common variants associated with the disease were identified as S and Z alleles. Normal AAT protease inhibitor (PI) is denoted by the letter 'M'. Methods such as immunoassay methods, isoelectric focusing (IEF) and molecular genotyping (PCR and PCR-RFLP) are used to detect variants. The amplification-refractory mutation system (ARMS) is a simple, fast and reliable method to detect any mutation containing single base changes or small deletions. When we look at the literature, there is no genotyping study using the ARMS method in patients with COPD and Emphysema. In this planned study, it was aimed to genotype the most commonly associated 'S' and 'Z' variants and their normal alleles with the ARMS-PCR method. Peripheral blood was taken from the patient group (53 individuals) diagnosed with COPD and emphysema and the control group (33 individuals), their DNA was isolated, and PCR amplifications were performed with the designed specific primer sequences. Sequence analysis of the relevant regions of all samples was performed to confirm the ARMS-PCR results. In conclusion; With this method, normal allele and 'S' variant could be determined but 'Z' variant and normal allele could not be detected specifically despite using three different primers.

Keywords: Alpha-1 Antitrypsin (AAT), Alpha-1 antitrypsin deficiency (AATD), *SERPINA1* Gene, COPD, Emphysema, ARMS-PCR

KISALTMALAR

AAT	:	Alfa-1 Antitripsin
AATD	:	Alfa-1 Antitripsin Eksikliği
Abs	:	Absorbans
ARMS	:	Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi
BLAST	:	Basic Local Alignment Search Tool
bç	:	baz çifti
dk	:	Dakika
dH ₂ O	:	Distile Su
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	:	Deoksiribonükleotit Tri-Fosfat
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtBr	:	Etidyum Bromür
g	:	Gram
Glu	:	Glutamik Asit
IL-6	:	İnterlökin-6
IL-8	:	İnterlökin-8
IEF	:	İzoelektrik Odaklama
kda	:	Kilodalton
KOAH	:	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
L	:	Litre
Lys	:	Lizin
LPS	:	Lipopolisakkarit
M	:	Molar
MgCl ₂	:	Magnezyum Klorür
mg/dL	:	Miligram/ Desilitre
mM	:	Milimolar

mL	:	Mililitre
MPCR	:	Multipleks PCR
NaCl	:	Sodyum Klorür
NCBI	:	Ulusal Teknoloji Bilgi Merkezi
Ng	:	Nanogram
nm	:	Nanometre
nt	:	Nükleotit
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	:	Power of Hydrogen
PI	:	Proteinaz İnhibitör
RCL	:	Reaktif Merkez Döngü
Rpm	:	Revolutions Per Minute
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SERPIN	:	Serin Proteinaz İnhibitör
SERPINA1	:	Serpin Ailesi A Üyesi 1
Sn	:	Saniye
°C	:	Santigrat Derece
SNP	:	Tek Nükleotit Polimorfizmi
TAE	:	Tris-Asetat-Edta
TE	:	Tris-Edta
TNF- α	:	Tümör Nekroz Faktör Alfa
U	:	Unit
UTR	:	Transle Edilmeyen Bölge
μ L	:	Mikrolitre
μ M	:	Mikromolar
μ g/mL	:	Mikrogram/Mililitre
V	:	Volt
Val	:	Valin

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Alfa-1 antitripsin eksikliği ile ilgili mutasyonlardan bazıları ve ilişkili klinik veriler	12
Tablo 2. S alleli primerleri.....	31
Tablo 3. Z alleli primerleri	31
Tablo 4. Z alleli PCR reaksiyonu karışımı (Vivantis)	33
Tablo 5. S alleli PCR reaksiyonu karışımı (Vivantis)	33
Tablo 6. Z alleli Hot Start PCR master mix reaksiyonu karışımı.....	34
Tablo 7. S alleli Hot Start PCR master mix reaksiyonu karışımı	34
Tablo 8. Z ve S allelinin istatistiksel analizi.....	38
Tablo 9. Çalışmamızda yer alan KOAH'lı olgulara ilişkin veriler.....	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. SERPINA1 geni yapısı	4
Şekil 2. Alfa-1 antitripsin proteinin yapısı	6
Şekil 3. Alfa-1 antitripsin tarafından nötrofil elastazın inhibisyonu	7
Şekil 4. Gene runner programı kullanılarak kontrol ve allel spesifik primerlerin tasarlanması	30
Şekil 5. ARMS-PCR şematik gösterimi	32
Şekil 6. Dizi analizi sonuçlarının Finch TV’de analizi.....	36
Şekil 7. SERPINA1 geni ve dizi analizi sonuçlarının blastn analizi	37
Şekil 8. (a) Z alleleline ait gradiyent PCR jel görüntüsü (59-64 °C). (b) S alleleline ait gradiyent PCR jel görüntüsü (59-64 °C).	41
Şekil 9. Z ve S alleleline ait jel görüntüsü. (a) S alleli hasta (HS) ve kontrol (KS) bireye ait PCR jel görüntüsü. (b) Z alleli hasta (HZ) ve kontrol (KZ) bireye ait PCR jel görüntüsü (M:200 bç DNA ladder, Ta: 61°C).....	42
Şekil 10. (a) S alleleline ait PCR jel görüntüsü (Ta: 61 °C). (b) Z alleleline ait PCR jel görüntüsü (Ta: 63 °C) (MM: homozigot normal, MZ: heterozigot).	42
Şekil 11. Z alleleline ait jel görüntüsü (M: 500 bç DNA ladder, Ta: 63 °C).	43
Şekil 12. Z alleleline ait hasta ve kontrol örneklerden (H5-K2) DMSO kullanılarak elde edilen PCR jel görüntüsü.	43
Şekil 13. Z allelinde heterozigot (K29-28) ve homozigot (10) bireye ait PCR jel görüntüsü (Ta: 63°C, K+M: KZF+KZR+MZF, M: KZR+MZF).....	44
Şekil 14. Z allelinde MZF primeriyle yapılan gradient PCR sonucuna ait jel görüntüsü	45
Şekil 15. Z alleleline ait PCR jel görüntüsü. (a) Heterozigot bireye ait örneğin MZF2 (308 bç) primeriyle gradient sonucu. (b) Heterozigot bireye ait örneğin MZF3 (294 bç) primeriyle gradient sonucu.	45
Şekil 16. Z alleleline ait PCR jel görüntüsü. (a) Homozigot bireye ait örneğin MZF2 (308 bç) primeriyle gradient PCR sonucu. (b) Homozigot bireye ait örneğin MZF3 (294 bç) primeriyle gradient PCR sonucu	46
Şekil 17. Heterozigot (K29-28) ve homozigot (10-11) bireylerin MZF2 primeriyle PCR sonucuna ait jel görüntüsü (Ta: 72 °C, 30 döngü).	46
Şekil 18. Z alleleline ait jel görüntüsü. (a) Hot start master mix kullanılmasıyla elde edilen hasta ve kontrol örneklerine ait jel görüntüsü. (b) Vivantis Tag polimeraz kullanılmasıyla elde edilen hasta ve kontrol örneklerine ait jel görüntüsü (MZF2, Ta: 63 °C, 30 döngü).	47

Şekil 19. S alleleline ait PCR jel görüntüsü. (a) Hot start master mix kullanılmasıyla elde edilen hasta ve kontrol örneklerine ait jel görüntüsü. (b) Vivantis Tag polimeraz kullanılmasıyla elde edilen hasta ve kontrol örneklerine ait jel görüntüsü (Ta: 61 °C, 30 döngü, MM: homozigot normal).	48
Şekil 20. Z alleleline ait kontrol örneklerinden heterozigot bir bireye ait dizi analizi sonucu	49
Şekil 21. Z alleleline ait kontrol örneklerinden heterozigot bir bireye ait blastn sonucu	49
Şekil 22. Z alleleline ait hasta örneklerinden heterozigot bir bireye ait dizi analizi sonucu	50
Şekil 23. Z alleleline ait hasta örneklerinden heterozigot bir bireye ait blastn sonucu	50
Şekil 24. Z alleleline ait hasta örneklerinden homozigot bir bireye ait dizi analizi sonucu	51
Şekil 25. Z alleleline ait hasta örneklerinden homozigot bir bireye ait blastn sonucu.	51
Şekil 26. S alleleline ait hasta örneklerinden homozigot normal bireye ait dizi analizi sonucu	52
Şekil 27. S alleleline ait hasta örneklerinden homozigot normal bireye ait blastn sonucu	52
Şekil 28. S alleleline ait kontrol örneklerinden homozigot normal bireye ait dizi analizi sonucu	53
Şekil 29. S alleleline ait kontrol örneklerinden homozigot normal bireye ait blastn sonucu	53

GİRİŞ

Alfa-1 antitripsin (AAT) esas olarak hepatositler tarafından sentezlenen ayrıca nötrofiller, monositler, akciğer ve bağırsağın epitel hücreleri tarafından da üretilen bir serin proteinaz inhibitörü olup. 14. kromozomda yer alan *SERPINA1* geni tarafından kodlanır (Greene vd., 2016; Al-Jameil vd., 2017). Alfa 1 antitripsin, serpin peptidaz inhibitörü, serpin clade A, alfa-1 anti proteinaz, anti elastaz ve proteinaz inhibitörü 1 olarak da adlandırılmaktadır. Bu isimlerin yanı sıra Pİ, A1A, AAT, PI1, PI, A1AT olarak da tanımlanmaktadır.

İnsanlarda dolaşımda bulunan önemli bir antiproteaz olup temel görevi nötrofil elastazın akciğerlerdeki proteolitik etkilerinin düzenlenmesidir. Ayrıca antiinflamatuvar ve immünomodülatör özelliklere sahip bir akut faz proteindir. AAT eksikliği otozomal eş başkın bir durum olup *SERPINA1* genindeki mutasyonlar neden olur. *SERPINA1* geni oldukça polimorfik olup 100'den fazla varyant tanımlanmıştır. Bunlar arasında hastalıkla ilişkili en yaygın varyantlar 'S' ve 'Z' allelleri olarak belirlenmiştir. Hastalığa neden olmayan yabancıl allel ise M alleli olarak gösterilir (Saunders vd.,2012; Greene vd., 2016; Al-Jameil vd., 2017).

AAT eksikliği ile ilişkili klinik durumlar, birincil olarak ya akciğerlerdeki kontrolsüz elastaz aktivitesine bağlı doku hasarından ya da karaciğerde yanlış katlanmış ya da kümelenmiş protein birikiminden kaynaklanmaktadır. Dolaşımdaki düşük AAT seviyesi nötrofil elastaz ve diğer proteolitik enzimlerin akciğer dokusunda hasar oluşturmaya ve buna bağlı olarak da amfizem, kronik bronşit, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), bronşektazi ve astım gibi hastalıklara neden olmaktadır. Yanlış katlanmış proteinlerin hepatositlerde birikmesi ise karaciğer hastalıklarına (siroz, hepatit) yol açmaktadır (Greene vd., 2016).

KOAH, dünya çapında ve ABD'de önemli olan halk sağlığı sorunlarından biri olup genetik yatkınlık ve çevresel faktörler dahil olmak üzere karmaşık bir kombinasyonunun etkileşime girmesiyle gelişmektedir. Sigara içimi, aerotoksinler, enfeksiyonlar ve biyokütle dumanına maruz kalma ile aktive olan kronik akciğer iltihabı ve kalıcı hava akımı kısıtlaması ile karakterizedir. İnflamatuvar hücrelerden üretilen proteazlar ile nötrofil elastaz gibi epitelyal hücreler ve alfa-1 antitripsin gibi

antiproteazlar arasındaki bir dengesizliğin KOAH patogenezi, özellikle pulmoner amfizem ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. KOAH'ta bilinen en önemli çevresel faktör sigaradır. KOAH için en sık tanınan genetik risk faktörü AAT eksikliğidir ve KOAH hastalarının % 3'ünde saptanmıştır (Takei vd., 2019).

AAT eksikliği, ZZ, SZ veya SS fenotipine sahip bireyler dahil edildiğinde, dünya çapında yaklaşık 3.4 milyon kişiyi etkileyen genetik bir bozukluktur. Bununla birlikte, doktorların AATD'yi teşhis etmek için mevcut farklı test metodolojilerinin avantajlarını ve dezavantajlarını anlamaları önemlidir. AATD'den sorumlu genetik mutasyonların otozomal kalıtımı nedeniyle, genetik testler sadece AATD riski yüksek olan hastalara (örn. kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastalar) değil, aynı zamanda A1AT allelleri bakımından homozigot mutant olan hastaların akrabalarına da önerilmelidir (Kelly vd., 2011; Foil, 2021).

Amplifikasyon refrakter mutasyon sistemi (ARMS), tek nükleotit polimorfizmlerini genotiplemek için basit, hızlı, kolay ve ekonomik bir yöntemdir. Bu yöntemde tek bir PCR tüpünde dört farklı primer kullanılabilmekte ve ardından sadece jel elektroforezi yeterli olmaktadır (Medrano ve De Oliveira, 2014).

Yapılan bu tez çalışmasında, insan popülasyonunda *SERPINA1* geninde belirlenen yüzlerce mutasyon arasında alfa-1 antitripsin eksikliğine neden olduğu bilinen ve hastalıkla en çok ilişkilendirilen 'S' ve 'Z' allellerinin tespiti için hemen her laboratuvar da uygulanabilme imkanı yanında kolay ve ucuz bir yöntem olan ARMS tekniğine dayalı bir genotipleme geliştirilmesi amaçlanmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

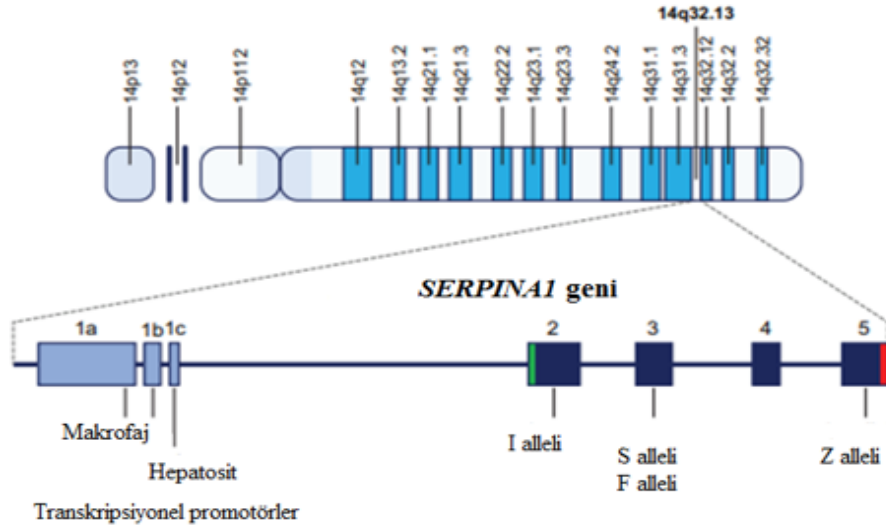
1.1. Alfa-1 Antitripsin Geni

Alfa-1 antitripsin (AAT) insan plazmasında bol miktarda bulunan serin proteaz inhibitörleri ailesinin prototipik bir üyesidir (SERPIN). AAT, alfa1-proteinaz inhibitörü, alfa1-antiproteinaz, *SERPINA1* (Serpine Ailesi A Üye 1) veya *SERPINA1* clade A olarak da adlandırılmaktadır (Seixas ve Marques, 2021).

AAT 14. kromozomun uzun kolunda (14q32.13) yer almakta olup, *SERPINA1* geni tarafından kodlanır (Lee ve Brantly, 2000; Bashir vd., 2016). *SERPINA1* geni 12.2 kb uzunluğunda olup dördü kodlanan ekzon (2-5), üçüde kodlanmayan olmak üzere (1a-1c) yedi ekzon ve altı introndan oluşur (Ferrarotti vd., 2014, Matamala vd., 2015) (Şekil 1).

Genin transle edilmeyen 5' ucu bölgesi (UTR), gen ekspresyonunu kontrol eden alternatif transkripsiyon başlatma bölgeleri içerir. Makrofajlarda transkripsiyon ekson 1a veya 1b'de başlatılırken, hepatositlerde transkripsiyon ekson 1c'de başlatılır (Silva vd., 2016; Seixas ve Marques, 2021). Hepatosit promotörü ile başlatıcı kodon arasındaki 5.3kb uzunluğundaki intron, psödo transkripsiyon start bölgesi ve Alu ailesi dizisi tekrarı olarak bilinen 143 amino asit açık okuma çerçevesinden oluşur (Tsechkovski vd., 1997; Bashir vd., 2016).

Genin kodlanan bölgesi esas olarak 418 amino asit uzunluğunda AAT'yi kodlayan dört ekzona yayılmış olup 1434 bp'den oluşur (Bashir vd., 2016). Sinyal peptidi için gerekli 24 amino asitlik start kodonu olan ATG sekansı ve üç N-bağlı glikozilasyon bölgesinden N46 ve N83 ekzon II'de yer alırken N247, ekzon III'de bulunur (Tsechkovski vd., 1997). Proteinin aktif bölgesi (met³⁵⁸), stop kodonu (TAA) ve poliadenilasyon sinyali ise (ATTAA) ekzon V'de bulunur (Tsechkovski vd., 1997; Lee ve Brantly, 2000).



Şekil 1. *SERPINA1* geni yapısı

1.2. Alfa-1 Antitripsin Proteini

SERPINA1 geninin ürünü olan AAT, 394 amino asitten oluşan 52 kDa'lık bir plazma glikoproteinidir. AAT molekülü dolaşıma salgılanmadan önce, 24 amino asitten oluşan sinyal peptidinin çıkarılması ve üç karbonhidrat yan zincirinin 46, 83 ve 247. asparajin amino asidine bağlanmasıyla post-translasyonel olarak modifiye edilir (Bashir vd., 2016; Seixas ve Marques, 2021).

AAT birçok doku ve vücut sıvısında bulunan akut faz reaktanıdır. Serumdaki normal seviyesi 100–220 mg/dL veya 20–53 μ M'dır. İnflamasyon, enfeksiyon ve malign hastalıklar sırasında plazma konsantrasyonu normalin 3-4 katına çıkmaktadır (Janciauskiene, 2001; Foil, 2021). Dolaşımdaki AAT miktarının artmasına neden olan mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte insan nötrofillerinin, monositlerinin ve alveoler makrofajlarının, interlökin-6, bakteriyel lipopolisakkarit gibi inflamasyon araçlara yanıt olarak ve nötrofil elastaz ile kompleks oluşturduğunda AAT'nin kendisine yanıt olarak AAT ekspresyonunu arttırdığı ortaya konmuştur (Janciauskiene, 2001).

AAT esas olarak yüksek miktarda hepatositler tarafından sentezlenmektedir. Ayrıca akciğer ve bağırsak epitel hücreleri, bağışıklık hücreleri (nötrofiller ve monositler) ve cilt gibi birçok doku tarafından da düşük miktarda sentezlenmektedir (Greene vd., 2016; Silva vd., 2016; Seixas ve Marques, 2021). AAT'nin sentezi tümör

nekroz faktörü-a (TNFa) ve interlökin-6 (IL 6) gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenir (Dabbagh vd., 2001).

Dokulardaki proteolitik enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesi ve homeostazın korunması genellikle plazmada bulunan ve birkaç sınıfa ayrılan endojen protein inhibitörler tarafından sağlanır. *SERPIN* olarak adlandırılan inhibitör ailesi plazmada baskın olup a1-antikimotripsin, C1 esteraz inhibitörü, antitrombin, alfa 1 antitripsin ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 gibi proteinler bu ailede yer almaktadır. Bu grup proteinler inflamatuvar, kompleman, pıhtılaşma ve fibrinolitik basamaklarda yer alan proteinazların kontrolünde önemli göreve sahiptir (Potempa, 1994; Lomas, 2000; Lomas ve Parfrey, 2004).

Akciğer yüzeyi havadaki patojenlere maruz kalmakta ve bu maruziyet sıklıkla hücrel bağışıklık tepkilerine yol açmaktadır. Bunun sonucunda oluşan fagositoz sürecinde akciğer dokusuna proteazlar ve oksidanlar salınmaktadır. AAT, geniş spektrumlu antiproteaz aktivitesine sahip olup akciğerde yüksek miktarda bulunmaktadır. En önemli görevi, akciğer dokusunda salınmış olan proteolitik enzimlerin inhibe edilmesidir. AAT, akciğer matriks bileşenlerini yok etme potansiyeline sahip en önemli proteaz olan nötrofil elastaz için yüksek afiniteye sahiptir (Lomas ve Parfrey, 2004; Köhnlein ve Welte, 2008).

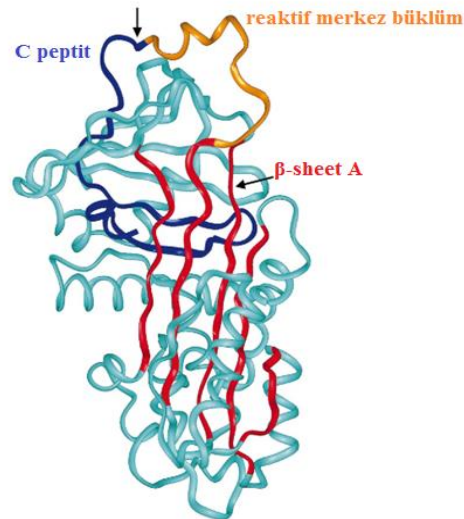
AAT esas olarak nötrofil elastaz inhibitörü olarak kabul edilse de proinflamatuvar nötrofil türevli katepsin G, proteinaz 3, alfa-defensinler gibi proteinazların da inhibitörüdür (Köhnlein ve Welte, 2008; Bergin vd., 2012; Loring ve Flotte, 2015). Yapılan çalışmalarda AAT'nin epitelyal sodyum kanallarının aktivasyonunda yer alan bir hücre yüzeyi serin proteazı olan matriptazın, mast hücreleri tarafından türetilen triptaz ve kimazın ve lenfosit türevli granzim B'nin de aktivitesini inhibe ettiği görülmüştür. Pıhtılaşma, sindirim enzimleri, serum ve dokudan türetilen kalkrien-7 ve ürokinaz ile ilişkili diğer serin proteazlar da AAT tarafından inhibe edilmektedir. AAT aynı zamanda hücre içi sistein proteazı olan kaspaz-3 ve metalloproteinazın da inhibitörüdür (Janciauskiene vd., 2011; Bergin, vd., 2012; Sark vd., 2022).

AAT antiproteinaz aktivitesi dışında anti-inflamatuvar ve immünomodülatör özelliklere sahip bir proteindir (Hadzic vd., 2006; Greene vd., 2016). AAT'nin nötrofil

süperoksit ve kemokin (IL-8) üretimini inhibe ederek; makrofajdan türetilen interlökin-1 reseptör antagonistlerini uyardığı ve insan akciğer fibroblastlarında hepatosit büyüme faktörü yapımını uyardığı *in vitro* çalışmalarda ortaya konmuştur. Aynı zamanda AAT'nin TNF-a veya bakteriyel endotoksin uyarımlı ölüme karşı koruyucu etki yaptığı ve fare akciğer inflamasyon modelinde inflamasyonu ve bağ doku hasarını oldukça etkin bir şekilde baskıladığı *in vivo* şartlarda ortaya konmuştur (Hadzic vd., 2006; Subramaniyam vd., 2006; Jonigk vd., 2013). Yapılan çalışmalarda AAT'nin hem transferrin reseptörü hem de ferritin sentezini arttırarak demir metabolizmasında rol aldığı ortaya konmuştur (Janciauskiene vd., 2011).

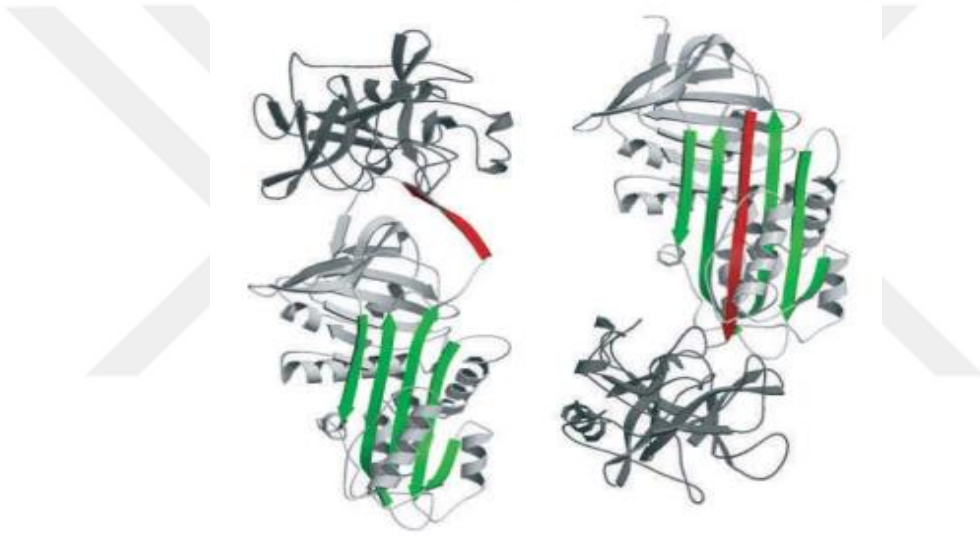
1.3. Alfa-1 Antitripsin Proteinin Yapısı

Alfa-1 antitripsin, 394 amino asitlik tek polipeptit zincirinden oluşan bir glikoproteindir. Toplam molekül ağırlığı 52 kDa olup globüler bir proteindir (Brantly vd., 1988; Kalsheker, 1989; Fregonese ve Stolk, 2008). Alfa-1 antitripsinin X-ışını kristalize yapısının incelenmesiyle 3 adet β sheet (A-B-C) tabakadan, 9 adet α heliks yapıdan ve bir adet reaktif merkez bükümünden (RCL) oluştuğu görülmüştür. Hedef proteinazın inhibisyonu için psödosubstrat görevi gören karboksi terminal bölgesinin yakınında yer alan reaktif merkez bükümü yaklaşık 20 amino asitlik bir peptit parçasından oluşmakta ve moleküler yüzey üzerinde dar bir alana yerleşmektedir (Janciauskiene, 2001; Kelly vd., 2011; Karatas ve Bouchecareilh, 2020) (Şekil2).



Şekil 2. Alfa-1 antitripsin proteinin yapısı

Bu reaktif merkez bükümde AAT'nin temel hedefi olan nötrofil elastaz için yem görevi gören metiyonin-serin amino asitleri (P1-P1') yer alır. Hedef enzime bağlandıktan sonra AAT'nin metiyonin-serin amino asitleri arasındaki yüksek enerjili bağ proteinaz tarafından kırılır ve β -sheet A'dan fazladan bir ipliğin reaktif bükümde araya girmesiyle molekülünün yapısında konformasyonel değişiklik meydana gelir. Yapıdaki bu değişiklik AAT'nin nötrofil elastaza doğru yönelmesi ve proteinazın fare kapanı benzeri bir mekanizma ile inaktive edilmesiyle sonuçlanır (Şekil 3). Hedef enzime bağlı konformasyonel yapısı değişmiş AAT daha sonra hepatik reseptörler tarafından tanınır ve dolaşımdan temizlenir (Lomas ve Parfrey, 2004; Lomas vd., 2005; Kelly vd., 2011).



Şekil 3. Alfa-1 antitripsin tarafından nötrofil elastazın inhibisyonu

1.4. Alfa-1 Antitripsin Eksikliği

Alfa 1 Antitripsin eksikliği (AATD) ilk olarak 1963 yılında İsveç'te Laurell ve Eriksson tarafından keşfedilmiştir. Laurell ve Eriksson amfizem öyküsü olan yaşlı ve genç bireyler üzerinde yapılan çalışmalar sonucuna göre, serumda normal sınırlardan düşük AAT seviyeleriyle ile pulmoner amfizem semptomları arasında bir bağlantı olduğunu rapor etmiştir. Laurell, 6 aylık bir süre boyunca laboratuvarına gönderilen tüm serum protein elektroforez jellerini incelerken, yaklaşık 1500 jelin beşinde AAT proteini için bant bulunmadığını fark etti. Eiksson sonradan yapmış olduğu çalışmada ise beş kişiden üçünde amfizem bulunduğu ve bu kişilerin ailesinde de amfizem öyküsü olduğu anlaşılmıştır. Bu vakalar tanımlandığında ilgili biyokimyasal

mekanizmalar ve genetik anormallikler hakkında bir anlayış gelişmiş olup AAT proteinin yokluğu, yaşamın erken döneminde başlayan amfizem ve genetik yatkınlık arasındaki ilişkiyi doğrulamış olup kalıtsal olduğu anlaşılmıştır (Stoller ve Aboussouan, 2005; Fregonese ve Stolk, 2008; Stockley, 2014).

AAT eksikliği, ana proteinaz inhibitörü olan AAT'nin serumda normal sınırlardan düşük seviyeleri ile karakterizedir. Yetişkinlerde akciğer hastalığına ve her yaşta karaciğer hastalığına neden olabilen otozomal ko-dominant genetik bir hastalıktır. AAT temel olarak karaciğerde üretilip dolaşıma salgılanmaktadır. Özellikle enfeksiyon veya tütün dumanı gibi solunan tahrip edici maddelere karşı artan proteaz aktivitesine karşı alveolları koruduğu için akciğerlerde önemli bir role sahiptir. Bazı durumlarda yanlış katlanan AAT molekülü karaciğerde normal seviyede salgılanamadığından dolayı hem serumda düşük seviyede bulunur hem de yanlış katlanma sonucu karaciğerde birikir. Alfa-1 antitripsin eksikliği, akciğer hastalıklarına (örn., amfizem, bronşektazi, KOAH), karaciğer bozukluklarına (örn., kronik hepatit, siroz ve hepatokarsinom), cilt hastalığına (örn., pannikülit) ve vaskülitte zemin hazırlayabilir (Soriano vd., 2018; Brantly vd., 2020).

1.4.1. Epidemiyoloji

Alfa-1 antitripsin eksikliğinden kaynaklanan ve PI MS, PI MZ, PI SS, PI SZ ve PI ZZ olarak gruplandırılan beş fenotipik sınıfın her birindeki birey sayılarını tahmin etmek için dünya çapında 97 ülkede epidemiyolojik çalışmalar yapılmıştır. Bu gruplandırmalar hem PI S ve PI Z alellerinin dünyadaki bir ana coğrafi gruptan diğerine yayılmasını hem de bu iki eksik allelinin büyük bir coğrafi bölge içindeki yayılmasını incelemeyi mümkün kılmaktadır. Yapılan çalışmada ülkeler Kuzey Afrika, Orta ve Güney Afrika, Kuzey Avrupa, Doğu Avrupa, Batı ve Güney Avrupa, Kuzey ve Orta Asya, Güneydoğu Asya, Kuzey ve Orta Amerika, Güney Amerika olarak coğrafi bölgelere ayrılmış ve prevalanslar her 1000 nüfus başına vaka olarak tanımlanmıştır. Kuzey Afrika'daki PI S frekansları Mali'de 0.0 iken Nijerya'da 63.8 oranında görülmektedir. PI Z frekansı ise Tunus, Gambiya ve Kamerun'da 0.0 ile Somali'de 11.5 oranında görülmektedir. Tüm sınıflar arasında genotip eksikliği en fazla görülen yer Nijerya'dır (de Serres ve Blanco, 2012).

Orta ve Güney Afrika'daki PI S frekansları Kongo Cumhuriyeti'nde 0.0, Angola'da 188 oranında görülmektedir. En yüksek sayıda MS ve SS genotipi Angola'da görülmüştür; ancak dikkat çekici bir şekilde Afrika'nın bu bölgesinin hiçbirinde MZ, SZ veya ZZ genotipleri görülmemiştir. Kuzey Avrupa'daki PI S frekansları Finlandiya'da 7.3'ten Letonya'da 31.3'e kadar değişmektedir. PI Z frekansı ise İzlanda'da 0.0'dan Letonya'da 45.1'e kadar değişmektedir. Çok yüksek olan PI Z frekansları (sırasıyla 1000'de 27.9 ve 24.5) Danimarka ve Estonya'da görülmüştür. MS, MZ, SS ve SZ genotiplerinin en yüksek sayıları Rusya'da, en yüksek ZZ fenotip sayıları Letonya (4519) ve Danimarka'da (4033) görülmüştür. Doğu Avrupa'daki PI S frekansları Arnavutluk ve Bosna-Hersek'te 0.0 ile Avusturya ve Yunanistan'da 21'in üzerindedir. PI*Z frekansları Arnavutluk'ta 0.0 ile Avusturya'da 13.3 arasında değişmektedir. En yüksek MS ve SS genotip sayıları Yunanistan'da, en yüksek MZ ve ZZ sayıları Romanya'da ve en yüksek SZ sayısı (yaklaşık 5000) Avusturya'dadır (de Serres ve Blanco, 2012).

Orta ve Batı Avrupa'daki PI S frekansları İber Yarımadası'nda 1000'de 100-200 ile Kuzey İrlanda'da 19 arasında değişmektedir. PI Z frekansları İsviçre'de 7'den, Portekiz'de 30'a kadar değişim göstermektedir. En yüksek sayıda PI MS genotip türü Fransa'dadır. En yüksek PI SS ve PI SZ sayıları ise İspanya'da görülmüştür. Çok yüksek sayıda ZZ genotipine sahip olan ülkeler yaklaşık 12.000 ile İspanya, yaklaşık 8000–11.000 ile İngiltere, Fransa ve Almanya'dır. Yaklaşık 5000 ile Portekiz de önemli sayıda PI ZZ genotipi görülmüştür. Kuzey ve Orta Asya'daki PI S frekansları Nepal ve Kazakistan'da 0.0 ile Suudi Arabistan'da 31 arasında değişmektedir. PI Z frekansları Nepal, Hindistan, Ürdün ve İsrail'de 1'den az, Suudi Arabistan'da 15'e kadar değişmektedir. Hindistan ve Pakistan her biri 3,5 milyonun üzerinde olmak üzere en yüksek PI MS sayıları görülmüştür. Suudi Arabistan ve Pakistan her biri 20.000'in üzerinde en yüksek PI SS sayıları görülmüştür. Pakistan, yaklaşık 4 milyon MZ, 36.000 SZ ve 15.000 ZZ ile bu coğrafi bölgede en fazla eksiklik genotipine sahip ülkedir (de Serres ve Blanco, 2012).

Doğu Asya, Avustralya ve Yeni Zelanda'daki PI S frekansları Japonya, Moğolistan ve Çin'de 1000'de 0-1 ile Yeni Zelanda ve Avustralya'da 33-43 arasında değişim göstermiştir. PI Z frekansları Endonezya, Çin ve Japonya'da 0–1 ile Avustralya ve Yeni Zelanda'da 1000'de 12–26 arasında değişmektedir. En yüksek MS genotip

sayısı 2 milyon ile Çin'dedir. En yüksek MZ (yaklaşık 500.000), SS (yaklaşık 40.000) ve SZ (yaklaşık 22.000) genotipi ise Avustralya'dadır. PI ZZ genotipi Malezya'da nadiren görülmüş olmakla birlikte ve Çin, Endonezya, Japonya ve Moğolistan gibi ülkelerde görülmemiştir (de Serres ve Blanco, 2012).

Kuzey ve Orta Amerika bölgesinde PI S frekansları ABD'de 23'ten Orta Amerika eyaletlerinde 30-45'e kadar değişmektedir. PI Z frekansı ise Meksika ve Orta Amerika'da 6-8'den, ABD ve Kanada'da sırasıyla 10 ve 13'e kadar değişim göstermiştir. ABD, 14 milyona yakın MS, 6 milyon MZ, 160.000 SS, 150.000 SZ ve 34.000 ZZ ile en fazla AAT eksikliği genotipine sahip ülkedir. Karayipler'e bakıldığında ise PI S frekansları Jamaika, Haiti ve Trinidad & Tobago'da 1000'de 7-9'dan; Küba, Porto Riko ve Dominik Cumhuriyeti'nde 1000'de 40'a kadar değişim göstermiştir. 900.000 MS, 150.000 MZ, 20.000 SS, 7000 SZ ve 500 ZZ ile AAT eksikliği genotiplerinin en yüksek sayıda görüldüğü ülke Küba'dır. Güney Amerika'da Brezilya, Arjantin, Kolombiya, Venezuela'da PI S frekansları 30 ve 50 arasında PI Z için 1000'de 5-8 arasında değişim göstermiştir. 18 milyon MS, 2 milyon MZ, 500.000 SS, 100.000 SZ ve 6000 ZZ AAT eksikliği genotiplerinin en yüksek sayısı Brezilya'da görülmüştür (de Serres ve Blanco, 2012).

AAT eksikliğin genetik epidemiyolojisine ilişkin yapılan çalışmada ayrılan 10 coğrafi bölgedeki 97 ülkede toplam 5.264.150.044 AAT eksikliği genotipi görülmüştür. Bunların 181.894'ü (%0,1) PI ZZ'dir; 1,269,054 (%0,7) PI SZ'dir; 4.017.900 (%2.1) PI SS'dir; 42.564.136 (%22.3) PI MZ ve kalan 142.541.291 (%74.8) ise MS genotipidir (de Serres ve Blanco, 2012).

Coğrafi bölgelere ayrılarak yapılan bu çalışmadaki ülkelerdeki birey sayılarına ve PI S ve PI Z eksikliği alellerinin prevalansına ilişkin genel verilere bakıldığında bu iki allelin nesiller önce ortaya çıktığı ve dünya çapında birçok farklı ülkeye yayıldığı görülmüştür. En yaygın iki eksiklik aleli PI S ve PI Z'nin prevalansına ilişkin genetik epidemiyolojik verilere göre dünya çapında birçok ülkede bulunmaktadır. PI*MS veya PI*MZ genotipine sahip bireylerin global sayısı 116 milyon, PI*ZZ, PI*SZ veya PI*SS genotipine sahip bireylerin sayısı ise 3.4 milyondur (de Serres ve Blanco, 2012).

1.5. Alfa-1 Antitripsin Geni Mutasyonları

AAT eksikliğine *SERPINA1* genindeki mutasyonlar neden olur. *SERPINA1* geni oldukça polimorfik olup 100'den fazla varyant tanımlanmıştır. Bu çeşitli varyantlar AAT proteinin yapısında ve konsantrasyonunda farklı değişikliklere neden olur. AAT proteini varyantlarının isimlendirilmesi, dar bir pH gradyanına (pH 4-5) sahip bir izoelektrik odaklama (IEF) jel elektroforezi üzerindeki göç etme hızlarına göre yapılır. En hızlı göç eden varyant A (IEF jelinin pozitif ucu-anodo daha yakın), en yavaş göç eden varyant Z olarak (IEF jelinin negatif ucu-katoda daha yakın) isimlendirilmiştir. Diğer varyantlar ise A-Z varyantları arasında göç etme hızlarına göre benzer şekilde sıralanmıştır (Bashir vd., 2016; Karatas ve Bouche-careilh, 2020; Seixas ve Marques, 2021). AAT'nin serum seviyelerine ve moleküler fonksiyona dayalı olarak varyantlar normal, eksiklik, null ve disfonksiyonel olmak üzere dört grupta sınıflandırılır (Camelier vd., 2008) (Tablo 1). Normal AAT proteaz inhibitörü (PI), M harfiyle isimlendirilmekte ve yabancı allel olarak değerlendirilmektedir. Jel elektroforezinde orta derecede migrasyon göstermektedir. Kafkas popülasyonunda görülen allellerin %95'ini oluşturmakta ve serumda normal AAT seviyesiyle karakterize edilmektedir. Homozigot M alleleline sahip bireyler PI MM olarak ifade edilmektedir. Serumdaki AAT seviyeleri yaklaşık olarak 100–220 mg/dL veya 20–53 µM'dir. M aleli, M1 (Ala213), M1 (Val213), M2, M3 ve M4 gibi iyi huylu alt varyantlara sahip olup, bunlar tüm test metodolojileriyle olmasa da bazıları ile ayırt edilebilmektedir (Bashir vd., 2016, Karatas ve Bouche-careilh, 2020; Seixas ve Marques, 2021).

AATD en yaygın olarak tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) ile ilişkilidir. En sık görülen varyantlar nokta mutasyonu sonucu oluşan PI Z ve PI S allelleridir. PI Z alleli şiddetli AATD ile en sık ilişkilendirilen allel olup AAT geninin 5. ekzonunda meydana gelen mutasyon sonucu proteinin amino asit dizisindeki 342. pozisyonundaki Glutamik asitin-Lizin (Glu342 GAG → Lys AAG) ile yer değiştirmesi sonucu oluşmaktadır. Z aleli için homozigot olan bireyler (PI ZZ) yüksek derecede akciğer ve karaciğer hastalığı riski altındadır. Normal AAT protein seviyesinin % 10-20'sine sahip olmakla birlikte serumdaki seviyesi 20–45 mg/dL veya 2.5–7 µM'dır. PI S alleli ise AAT geninin 3. ekzonunda meydana gelen mutasyon sonucu proteinin amino asit dizisindeki 264. pozisyonundaki Glutamik asitin-Valin (Glu264 GA→Val GT) ile yer

değiştirmesi sonucu oluşmaktadır. AAT serum seviyesi homozigot PI MM bireylerinin seviyelerine kıyasla düşük ancak PI ZZ bireylerinin seviyelerinden daha yüksektir (82mg/dL, 15µM) (Karatas ve Bouche-careilh, 2020; Seixas ve Marques 2021).

MMalton, MHeerlen, gibi nadir varyantlar ve hiçbir AAT proteininin üretilmediği boş (null) aleller de şiddetli AATD ile ilişkilidir. Daha yaygın ve iyi karakterize edilmiş MHeerlen, MMalton, MProcida, MWürzburg, PBrescia ve PLowell varyantları gibi birçok nadir AAT varyantı, AAT miktarındaki değişiklikler, polimerizasyon veya nötrofil elastazı (NE) inhibe etme kabiliyetindeki azalmanın bir sonucu olarak akciğer ve karaciğer hastalığının gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle, MMalton varyantının gendeki tek amino asit delesyonu sonucu olduğu ve bunun sonucunda amfizem ve karaciğer hastalığıyla güçlü bir şekilde bağlantılı olduğu görülmüştür. MMalton varyantı yakın zamanda yapılan bir Portekiz çalışmasında rapor edilen en yüksek sıklığa sahip nadir varyant olarak gözlemlenmiştir. Boş (null) varyantlar 'Q0' ön eki ile belirtilmektedir. Boş varyantlar AAT amino asit dizisinin erken sonlandırılmasıyla hiçbir AAT proteini üretilmemesine neden olmaktadır. Sonuç olarak serumda AAT seviyesi saptanamamaktadır. Boş varyantlar amfizem gelişimi ile güçlü bir şekilde bağlantılıdır, ancak tüm boş varyantlarla uyumlu olarak, karaciğer hasarından sorumlu AAT'nin polimerizasyonunu indüklemedikleri için karaciğer hastalığı riski taşımamaktadır. (Foil, 2021).

Tablo 1. Alfa-1 antitripsin eksikliği ile ilgili mutasyonlardan bazıları ve ilişkili klinik veriler

Alleller	Mutasyon Tipi	İlişkili hastalıklar
Normal Allel		
M (Farklı Subtipleri)	Substitüsyon (1 bp)	Yok
Eksiklik Allelleri		
S	Substitüsyon (1 bp)	Pulmoner
Z ^a	Substitüsyon (1 bp)	Pulmoner, Karaciğer
Mmalton	Delesyon (3 bp)	Pulmoner, Karaciğer
Siiyama	Substitüsyon (1 bp)	Pulmoner, Karaciğer
Null Alleller		
QO (subtipleri)	Delesyon veya Substitüsyon	Pulmoner, Karaciğer
Disfonksiyonel Alleller		
Pittsburgh	Substitüsyon (1 bp)	Kanama
Z ^a	Substitüsyon (1 bp)	Pulmoner, Karaciğer

1.6. AAT İle İlişkili Hastalıklar

1.6.1. Amfizem

Amfizem alveol duvarlarının tahribi ve terminal bronşiyollerin distalindeki hava boşluklarının kalıcı olarak genişlemesi olarak tanımlanmaktadır. Terminal hava yollarındaki akciğerin elastik yapısının kaybı ve intralümenal basınç, özellikle zorlu ekspiratuar manevralar sırasında küçük hava yollarının açıklığını kaybetmesine neden olur. Amfizem derecesiyle sigara kullanımı arasındaki ilişki çok güçlü değildir. Amfizem nedeniyle önemli akciğer yıkımı sigara kullanan bireylerin sadece yaklaşık % 40'ında görülmektedir. Ayrıca normal akciğer fonksiyonuna sahip bazı kişilerde de amfizem görülmektedir. AAT eksikliği, amfizem için bilinen genetik risk faktörüdür. Genellikle AAT eksikliği ile ilişkili olan amfizem formu panlobüler veya panasinar amfizemdir. Tüm asinüsün daha eşit genişlemesi ve yıkımı ile sonuçlanmaktadır (Mannino, 2002; MacNee, 2005).

1.6.2. Kronik Obstrüktif Hastalığı

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH); zararlı gaz ve partiküllere özellikle sigara dumanına karşı enflamatuvar bir süreç sonucu gelişen tam olarak geri dönüşümlü olmayan, ilerleyici hava akımı kısıtlanması ile karakterize olan bir hastalıktır. KOAH, dünya çapında özellikle 40 yaş üstü sigara kullananlar ve biyokütle dumanına maruz kalan bireylerde görülen morbidite ve mortalite nedenidir (Hillas vd., 2015). Tahminlere göre her yıl üç milyondan fazla ölüme neden olduğu görülen bu hastalık dünya çapındaki tüm ölümlerin % 5'ini oluşturmaktadır. Bunların % 90'ından fazlası düşük ve orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre KOAH, 2030 yılına kadar mevcut beşinci sıralamasından dünya çapında en yaygın üçüncü ölüm ve sakatlık nedeni olacağı tahmin edilmektedir. KOAH'lı bir bireyde kronik bronşit, amfizem veya her iki durumun kombinasyonu birlikte görülebilir. Bu durum kişiden kişiye değişmektedir. KOAH'ın en yaygın ve kesin bilinen risk faktörü sigara kullanımı olmasına rağmen, çevresel faktörler ve genetik risk olan AAT eksikliği de bu hastalığa neden olmaktadır (Wells vd., 2019).

AAT eksikliği, KOAH için bilinen tek genetik risk faktörüdür (Silverman vd., 1998). KOAH'a neden olabilecek veya daha da kötüleştirebilecek diğer faktörler yaş, cinsiyet, akciğer büyümesi ve gelişimi, kronik bronşit ve enfeksiyonlar

sosyoekonomik durum, astım ve hava yolu hiper-reaktivitesi olarak sıralanmaktadır. (Wang vd., 2020).

1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR): Optimizasyonu, Çeşitleri ve ARMS-PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Amerikalı biyokimyacı Kary Mullis tarafından 1984 yılında geliştirilmiştir. Laboratuvar ortamında DNA içerisinde yer alan dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi in vitro çoğaltma işlemidir. Hedef dizinin karşıt zincirlerine hibridize olan iki oligonükleotid primeri ile çevrili bir DNA fragmanının enzimatik amplifikasyonuna dayanmaktadır (White vd., 1989; Joshi ve Deshpande, 2010). İstenilen özgün bölgenin amplifikasyonu çift zincirli kalıp DNA'nın ısı ile denatürasyonu (denaturation), denatüre kalıp DNA'ya sentetik iki oligonükleotit primerinin bağlanması (annealing) ve bağlanan primerlerin DNA polimeraz ile uzatılması (extension) olmak üzere üç basamaktan oluşmaktadır (White vd., 1989; Green ve Sambrook, 2018).

PCR, yalnızca az miktardaki bir başlangıç materyalinden (yani DNA kalıbı veya hedef diziden) belirli bir DNA segmentini (yani bir amplikon) yeterli miktarda sentezleyen güçlü bir amplifikasyon tekniğidir. Bu teknik basit ve genellikle sorunsuz gibi görünse de reaksiyonu zorlaştıran birtakım durumlar olabilmekte ve bunlara bağlı yanlış sonuçlar oluşabilmektedir. Başarısız bir reaksiyonda farklı boyutlarda non-spesifik ürünler ve primerlerin etkileşimi sonucu primer dimerleri oluşabildiği gibi bazen de hiçbir DNA ürünü oluşmamaktadır. Bu yüzden bir PCR reaksiyonunda amplifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşebilmesi için optimum koşulların oluşturulması gerekmektedir. PCR'nin her bir fiziksel ve kimyasal bileşeni, verim, özgüllük veya duyarlılıkta potansiyel bir artış sağlamak için değiştirilebilir. Güçlü primer tasarımı, erime sıcaklığı, döngü koşulları, magnezyum iyonu konsantrasyonu ve reaksiyona eklenen birtakım bileşikler (enhansır) reaksiyonun optimize edilmesi sürecinde önemli etkilere sahip olabilmektedir (Asif vd., 2021).

1.7.1. PCR Optimizasyon Stratejileri

1.7.1.1. Primer Tasarımı

Başarılı bir PCR için en kritik parametre, optimal primer tasarımıdır. Primer sekansı ürünün gen üzerindeki pozisyonu ve uzunluğu, erime sıcaklığı ve sonuç olarak PCR verimi dahil pek çok parametreyi etkiler. Zayıf tasarlanmış bir primer, diğer tüm parametreler uygun şekilde optimize edildiğinde bile, spesifik olmayan amplifikasyon veya primer-dimer oluşumu nedeniyle reaksiyon başarısızlığına bağlı olarak çok az ürün oluşumu veya hiç ürün üretilmemesine neden olur. Primerler tasarlanırken amplifikasyon özgüllüğü ve verimliliği için birkaç parametre dikkate alınmalıdır (McPherson ve Moller, 2006; Apte ve Daniel, 2009).

Primer Uzunluğu

Primer uzunluğu özgüllüğü, erime sıcaklığını ve bağlanma süresini etkilediğinden PCR başarısında önemlidir. Çoğu PCR uygulaması için 18-30 bazlık bir primer uzunluğu idealdir. Kısa primerler, spesifik olmayan PCR amplifikasyonuna yol açabilir. Uzun primerler daha spesifiktir ancak firkete halkaları (saç tokası) gibi ikincil yapıları içermeye olasılığı daha yüksektir (Apte ve Daniel, 2009).

Primer Erime Sıcaklığı

Primerlerin ayrılmış DNA zincirleri üzerinde komplementer oldukları bölgelere eşleşip kalıp DNA zinciri ile primer arasında hidrojen bağlarının oluşmasının sağlanacağı bir sıcaklık derecesi vardır. Bu sıcaklığa erime sıcaklığı (T_m) denir. PCR'nin özgüllüğü, primerlerin erime sıcaklığına güçlü bir şekilde bağlıdır. Bu sıcaklık derecesi primer dizisinin baz içeriğine göre değişir. Primerdeki G ve C sayısı arttıkça T_m derecesi de artar. Çoğu PCR uygulaması için, primerlerin optimum erime sıcaklığı 55°C ile 60°C arasında olmalıdır. Bir reaksiyonda kullanılan tüm primerlerin benzer erime sıcaklıklarına sahip olması da önemlidir. Çoğu PCR uygulaması için oligonükleotit çiftlerinin T_m 'leri birbirine denk veya yakın olmalıdır. Aralarındaki fark 2°C-3°C'den fazla olmamalıdır. Aralarındaki fark yüksek olduğunda, amplifikasyon daha az verimli olur veya hiç çalışmayabilir. Çünkü daha yüksek T_m 'ye sahip primer, optimal bağlanma sıcaklığından daha düşük bir sıcaklıkta yanlış bağlanacaktır. Daha düşük T_m 'ye sahip primer ise optimal bağlanma sıcaklığından

daha yüksek bir sıcaklıkta düşük konsantrasyonlarda bağlanacaktır (McPherson ve Moller, 2006; Apte ve Daniel, 2009).

İkincil (Hairpin) Yapılar

Bir primer tasarlarken dikkate alınması gereken önemli bir faktör, ikincil yapıların varlığıdır. Primerler kendi içinde homolojiye sahip olursa hairpin (saç tokası) olarak adlandırılan, primerin homolog sekansları nedeniyle kendi üzerine katlanarak çift zincir oluşturması görülebilir. Bu da primerin hedef DNA'ya bağlanmasını etkileyecektir. Saç tokası oluşturmaması için oligonükleotit kendi içinde karşılıklı eşlenik baz dizileri içermemelidir (Dieffenbach vd., 1993; Asif vd., 2021).

Primer Dimerleri

Primer çiftinin özellikle 3' uçlarında birbirine tamamlayıcı olmamasına dikkat edilmelidir. PCR'da DNA kalıbına göre yüksek konsantrasyonlarda primerler kullanıldığından, primer çifti kalıba bağlandıklarından çok daha kolay bir şekilde birbirlerine bağlanabilirler. Bu yüzden en önemli parametrelerden biri oligonükleotit çiftleri dimer oluşumuna neden olacak şekilde birbirleri ile eşlenik olmamalıdır. Primer-dimer oluşumu istenen ürünle yarışacağı için istenen ürünün oluşmasını engelleyecektir (Saiki, 1989; Asif vd., 2021).

3'-uc sekansı (GC Kıskaçı)

3' terminal pozisyonu yanlış bağlanmayı kontrol için önemlidir. Bu bölgede yer alan primer homolojilerinin yaratacağı sorunlardan bahsedilmişti. Diğer bir değişken primerlerin 3' ucuna G ve C bazlarının eklenmesidir. Bu GC kıskaçı G/C nükleotitlerinin daha kuvvetli hidrojen bağlarla bağlanması nedeniyle 3' ucunun sonuna doğru bağlanmayı garanti eder. Aynı zamanda primer-hedef kompleksinde gevşemelere bağlı olarak reaksiyon hızının yavaşlamasının önüne geçerek süre kaybını azaltır ve reaksiyon verimini artırır (Dieffenbach vd., 1993).

G/C Miktarı ve Polipirimidin (T,C) ve Polipurin (A,G) Uzantıları

İdeal bir primer %50 GC içeriğe sahip ve yaklaşık 20 bp uzunluğunda nükleotitlerin rastgele karışımına sahiptir. Bu yapı Tm'yi 56-62 °C'lik aralıkta tutar.

Spesifik olmayan bağlanmaya ve yanlış eşleşmeye yol açtıklarından, düşük sayıda tek bazlı uzantılardan (örn. TTTT veya GGGG) ve ardışık di-nükleotidlerden (örn. TATATATA veya CGCGCGCG) kaçınılması gerekir. Poliprimidin (T,C) ve polipurin (A,G) uzantılarından da kaçınılmalıdır (Dieffenbach vd., 1993; Asif vd., 2021).

1.7.1.2. Reaksiyon Bileşenleri

Başarılı bir PCR kurulumu için en önemli adımlarından biri, gerekli konsantrasyonlarda buna göre reaktifler eklemektir. Reaksiyon karışımına doğru miktarı eklemek için her reaktifin rolünü ve işlevini anlamak çok önemlidir. $MgCl_2$, reaksiyon tamponu, dNTP'ler, Taq DNA polimeraz ve kalıp DNA'nın konsantrasyonunu değiştirmek, optimize edilmiş PCR ürünleri elde etmenin kolay ve güvenilir bir yoludur. Bununla birlikte, reaktiflerin yanlış konsantrasyonda eklenmesinin, değişken boyutlarda istenmeyen ampikonların üretilmesine neden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (Asif vd., 2021).

Kalıp DNA

Bir PCR reaksiyonunu optimize etmek için ilk adım, ana karışımı içeren her reaksiyon tüpüne eşit konsantrasyonda DNA kalıbının eklenmesidir. Bu adımı tamamladıktan sonra, istenen PCR ürününü elde etmek için kalan reaktif konsantrasyonları değiştirilebilir. Optimize edilmiş bir reaksiyon için genomik DNA konsantrasyonu 10-30 ng/μl civarında olmalıdır. Reaksiyon karışımında kalıp DNA miktarının artırılması sadece jelde soluk veya zayıf bantlar görüldüğünde yapılmalıdır. Aksi takdirde fazla DNA jelde smear oluşumuna ve spesifik olmayan ampikon üretimine neden olması sonucu reaksiyon özgüllüğü azalır (Asif vd., 2021).

Magnezyum Klorür

Magnezyum klorür, Taq DNA polimeraz tarafından gerçekleştirilen kalıbın uzaması için bir yardımcı kofaktör olarak görev yapar. Çoğu başarısız PCR deneyi, reaksiyon karışımındaki $MgCl_2$ konsantrasyonu değiştirilerek optimize edilebilir. Ayrıca reaksiyon karışımındaki DNA kalıbı, dNTP'ler gibi diğer bileşenlerle etkileşime girer ve DNA stabilitesini artırarak erime sıcaklığını artırabilir. $MgCl_2$ genellikle 10X PCR reaksiyon tamponunda bulunur veya 15 mM ila 25 mM arasında değişen bir konsantrasyonda ayrı olarak sağlanabilir. Reaksiyondaki dNTP konsantrasyonu değiştirilirse $MgCl_2$ konsantrasyonu da değiştirilmelidir. Mg^{2+} miktarı

düşükse reaksiyon zayıf ürün oluşumuyla sonuçlanır. Yüksek Mg^{2+} miktarı ise primerlerin kalıba bağlanmasını önleyerek, reaksiyonun başarısız olmasına veya spesifik olmayan ürünlerin amplifikasyonuna neden olur (McPherson ve Moller, 2006; Asif vd., 2021).

Reaksiyon Tamponu (Buffer)

Reaksiyon tamponunun amacı, çözeltinin pH'ını koruyarak reaksiyon için en uygun koşulları sağlamaktır. Tampon konsantrasyonunun değiştirilmesi, bir PCR deneyinin optimize edilmesine yardımcı olabilir. Tampon, amplifikasyon sırasında polimeraz aktivitesine yardımcı olur ve böylece reaksiyon özgülüğünü artırır. PCR tamponu veya reaksiyon tamponu, Tris-HCL, Potasyum klorür (KCl9 Amonyum sülfat $[(NH_4)_2SO_4]$, Bovin Serum Albumin (BSA), Triton-X veya Tween 20 içerebilir. Bazı tampon bileşenleri $MgCl_2$ içerir; aksi takdirde, genellikle ayrı bir $MgCl_2$ çözeltisi de bulunur. Reaksiyon tamponunun konsantrasyonları ve bileşenleri üreticiye bağlı olarak değişir (McPherson ve Moller, 2006; Asif vd., 2021).

Deoksinükleotit Trifosfatlar

Deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP'ler), hedeflenen DNA dizilerinin amplifikasyonunda yer alan DNA polimeraz için bir substrat görevi görür. dNTP'ler homojen bir karışım içinde olabilir veya 20 mM ila 200 mM arasında değişen konsantrasyonlarda ayrı olarak temin edilebilir. Optimizasyonda dNTP konsantrasyonları $MgCl_2$ konsantrasyonuna paralel olarak arttırılmalıdır. Reaksiyon karışımında dNTP'ler eşit miktarda eklenmelidir; aksi takdirde, daha yüksek oranda bir dNTP'nin varlığı, yeni sentezlenen DNA dizisine yanlış bazın dahil edilmesiyle sonuçlanabilir (Saiki, 1989; Asif vd., 2021).

Taq DNA Polimeraz

PCR reaksiyonun en önemli bileşeni polimerazdır. Taq DNA polimeraz, kalıp DNA'nın amplifikasyonunda yer alır. Enzim, uzama sırasında yeni sentezlenen DNA dizisine dNTP'leri dahil eder. Polimeraz, 2 ile 5U arasında değişen miktarlarda mevcut olabilir. Reaksiyon karışımındaki nihai DNA polimeraz konsantrasyonu 0.02 ile 0.05 U/ μ L aralığında olmalıdır. Optimizasyonu sağlarken DNA polimerazın spesifik

olmayan amplifikasyonuna bağlı olarak smear oluşturmaması için polimeraz konsantrasyonunu dikkatli bir şekilde arttırılmalıdır (Asif vd., 2021).

1.7.1.3. Döngü

PCR'de yer alan reaktifler ve prosedürlerin yanı sıra, bir amplifikasyon reaksiyonunun optimizasyonu ve başarısı için uygun döngü koşullarının kullanılması çok önemlidir. Döngü koşulları, denatürasyon, bağlanma ve uzatma sıcaklıklarına, kalıp boyutuna, GC içeriğine ve primer uzunluğuna bağlı olarak reaksiyondan reaksiyona değişebilir. Bazen, normal döngü koşulları bir PCR reaksiyonunda çalışmayabilir. Bu yüzden optimizasyonu sağlamak için çok yönlü PCR modifikasyonları bulunmaktadır (McPherson ve Moller, 2006; Asif vd., 2021).

Gradient PCR (G-PCR)

Döngü koşullarını optimize etmenin ilk adımı, primerlerin kalıba bağlanma sıcaklığını (Annealing-Ta) belirlemektir ve bir gradient PCR deneyi gerçekleştirilerek ulaşılabilir. G-PCR, başarılı PCR deneylerine yol açabilecek kritik bir optimizasyon aşamasıdır. Bu işlemde, termal döngüleyici, her sıraya özel bir sıcaklık aralığına ayarlanır; bu, primerlerin çeşitli sıcaklıklarda bağlanma kabiliyetini kontrol ederek primerler için optimal Ta'nin belirlenmesine yardımcı olabilir (Asif vd., 2021).

Hot-Start PCR (HS-PCR)

HS-PCR, normal döngü koşullarında nispeten basit ve etkili bir modifikasyondur. HS-PCR'nin temel ilkesi genel 3 adımlı döngü kurulumunun başlamasından önce artırılmış bir denatürasyon süresi sağlamaktır. HS-PCR modifikasyonu, ayrı olarak veya geleneksel bir PCR deneyi ile birlikte kullanılabilir. Nispeten yüksek bir erime sıcaklığı nedeniyle, amplifikasyon reaksiyonu optimizasyon gerektirebilir. HS-PCR'ın karmaşık kalıplar, dimer oluşumu ve reaktif konsantrasyonlarını değiştirmek ve steril ekipman kullanmak işe yaramazsa spesifik olmayan bağlanma ile uğraşırken etkili bir optimizasyon stratejisi olduğu kanıtlanmıştır. Temel prensibi, ana karışımı içeren her bir reaksiyon tüpüne 5-10 dakika süreyle artırılmış başlangıç denatürasyon sıcaklığı (50-90°C) sağlanmasını içerir. Bununla birlikte, Taq DNA polimeraz, enzimi inaktive edebileceğinden, bu ilk denatürasyon aşamasında reaksiyon karışımından alıkonulur. Başlangıç sıcaklığı

arttırıldıktan sonra her bir PCR tüpüne polimeraz eklenir ve geleneksel üç fazlı kurulumuna devam edilir. Bu işlem, kalıbın tam denatürasyonuna yardımcı olur, spesifik olmayan amplifikasyonu azaltır ve amplifikasyon reaksiyonunun spesifitesini artırır (Roux, 2009; Asif vd., 2021).

1.7.1.4. Katkı Maddeleri

Bir PCR reaksiyonunda döngü koşullarını ve reaktif konsantrasyonlarını değiştirdikten sonra bile başarısızlık varsa amplifikasyon reaksiyonuna yardımcı olmak için reaksiyon karışımına bazı arttırıcı (enhansır) bileşenler eklenebilir. Bu bileşenler primer bağlanma özgülüğünü arttırmak, primerlerin yanlış bağlanmasını azaltmak için reaksiyon karışımına eklenerek PCR'nin etkinliğini artırır. Dimetil sülfoksit (DMSO), Bovin serum albümin (BSA), Formamid, Gliserol, Tween 20, Triton-X, Betain vb. PCR reaksiyonuna eklenen bileşenlere örnektir (Asif vd., 2021).

1.8. Multipleks PCR

Multipleks PCR (MPCR), tek bir PCR'de birden fazla hedef dizinin aynı anda amplifikasyonu için bir kalıp ve birkaç primer seti kullanan yöntemdir. Yapılan birçok araştırma ve teşhis testleri, bir gen içindeki çoklu bölgelerin analizini veya çoklu lokusların analizini içermektedir. Özellikle çok sayıda bireyin analiz edilmesi gerektiğinde avantaj sağlamakla birlikte önemli bir zaman ve maliyet tasarrufu sağlar (McPherson ve Moller, 2006).

Verimli bir multipleks PCR testinin optimizasyonu bazı ek kritik faktörlere dikkat edilmesini gerektirir. Bir multipleks PCR sistemi geliştirmedeki temel zorluk, primer dimer oluşumunun üstesinden gelmektir. Primer dimerleri, genellikle ilk PCR döngüsünden önce oluşturulan ve tipik olarak iki veya daha fazla bazın 3' ucunda birbirine tamamlayıcı olan primerlerin neden olduğu kısa ürünlerdir. Normalde PCR için kullanılan yüksek sıcaklıklarda bu tür kısa örtüşmelerin oluşması pek olası olmasa da, oda sıcaklığında gerçekleştirilen bu primerleri içeren bir reaksiyon, 3' ucunun geçici olarak bağlanmasına izin verecektir. Bu koşullar altında, kısa ürünleri oluşturmak için bağlanan primerleri uzatmaya başlamak için yeterli polimeraz aktivitesi de vardır. Bir kez oluşturulduktan sonra, bu dimerler çok verimli bir şekilde amplifiye edilir ve istenen hedefin amplifikasyonu ile etkin bir şekilde rekabet eder. Multipleks reaksiyonlardaki hedef sayısı arttıkça, en az iki primerin 3' ucunda birbirine tamamlayıcı olma olasılığı

önemli ölçüde artar. 3' uçlarında bağlanabilen primerlerin sayısı arttıkça, primer dimer birikimi de artar. Primer dimer oluşumunu en aza indirmek için tek hedefli reaksiyonlarla kullanılan bir yaklaşım, reaksiyon çözeltisinin sıcaklığı bağlanma sıcaklığından daha yüksek olana kadar DNA polimeraz veya $MgCl_2$ olan bileşenlerden birinin reaksiyonunu sınırlamaktır (Edwards ve Gibbs, 1994; Zangenberg vd., 1999).

1.8.1. Multipleks PCR Tasarımı

Multiplex PCR'da kullanım için primerler tasarlanırken, primer tasarımının genel kuralları geçerlidir, ancak ek hususlar dikkate alınmalıdır.

- Primer uzunluğu, GC içeriğine bağlı olarak 16 ila 28 nükleotit arasında değişebilir. Daha uzun primerlerin, primer-dimerlerin oluşumuna yol açabilir.
- Tek hedefli PCR sistemlerinde olduğu gibi, benzer erime sıcaklıklarına sahip ve ikincil yapı oluşturmayacak primerler seçilmelidir. Tamamlayıcı 3' nükleotidli primerlerden kaçınmak için özen gösterilmelidir.
- Optimum koşulları belirlemek için her bir primer çifti ayrı ayrı test edilmelidir.
- Bağlanma sıcaklığı ve döngü sayısı, multiplex PCR'nin başarısı için kritik öneme sahiptir. Bağlanma sıcaklığı mümkün olduğunca yüksek tutulmalıdır. Her primer çifti için bağlanma sıcaklıklarını belirlenmeli ve multipleks reaksiyonda en düşük sıcaklığı kullanılmalıdır. Benzer şekilde, minimum döngü sayısı kullanılmalıdır.

Birden fazla hedef aynı anda amplifiye edildiğinden, bir multiplex PCR'deki enzim ve nükleotid miktarı sınırlayıcı bir faktör olabilir ve tüm ürünlerin tam sentezi için daha fazla zaman gerekir. Her reaksiyon için reaktif konsantrasyonlarını ve uzatma sürelerini optimize etmek önemlidir (Edwards ve Gibbs, 1994; Zangenberg vd., 1999).

1.9. Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi (ARMS)

Allel spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (ASPCR) veya spesifik alellerin PCR amplifikasyonu olarak da bilinen amplifikasyon-refrakter mutasyon sistemi (ARMS), bilinen tek nükleotid polimorfizmlerinin veya küçük delesyonların belirlenmesi için basit, hızlı, ekonomik ve etkili bir metottur (Little, 1995). Bu metod olarak Newton ve arkadaşları (1989) tarafından tanımlanmıştır (Duta-Cornescu vd., 2009). ARMS, yalnızca hedef allel numune içinde bulunduğunda DNA'nın amplifikasyonuna izin veren ve hedef olmayan aleli amplifiye etmeyecek sekansa özgü PCR primerlerinin kullanımına dayanmaktadır. Bu yöntem dört farklı primerin aynı anda kullanılarak yapıldığı PCR işlemini (mültipleks PCR) ve ardından jel elektroforezini takip eder. Normal ve mutant allele özgün iki iç ve iki dış primerin kullanıldığı yöntemde, dış primerler ile SNP'in de bulunduğu tüm bölge çoğaltılmaktadır. Her iç primer ve bir adet dış primer ile mutant ve normal alleller belirlenmektedir (Little, 1995; Medrano ve De Oliveira, 2014).

ARMS için Primer Tasarım Kriterleri

ARMS primerleri de klasik PCR primerleri tasarlamının genel ilkeleriyle aynıdır. ARMS PCR, bir ortak ve bir ARMS primeri içeren bir çift primer gerektirir. Ortak primer, diğer PCR primerleri gibidir. Ancak ARMS primerleri aşağıdaki bazı özelliklere sahiptir:

- Primer genellikle 30 baz uzunluğundadır. 28 baz uzunluğundan daha kısa primerlerden kaçınılmalıdır. Daha uzun primerler de (60 bp'e kadar) kullanılabilir.
- Normal ve Mutant alleller için tasarlanan primerlerin 3' uçlarındaki nükleotitler, hedef nükleotidi tamamlayıcı (yani C için G veya G için C ve A için T veya T için A) olmalıdır.
- ARMS primerinin son beş nükleotidinden birinde ek bir yanlış eşleşme (tercihen sondan hemen önceki), özgüllüğünü daha da artırır.
- ARMS primerinin geri kalanı, hedef diziyi tamamlayıcı olmalıdır.
- Ortak primerlerin yaklaşık 30 baz uzunluğunda ve %50 G + C içeriğine sahip olması ideal olup standart primerler gibi tasarlanır. Reaksiyon mültipleks

olacağı için bunların T_m 'lerinin allel spesifik primerlerle uyumlu olması önemlidir.

- Bir ARMS reaksiyonunun duyarlılığı ve özgüllüğü, sıkı reaksiyon koşullarıyla kontrol edilebilir. Yanlış sonuçların önlenmesinde iyi primer tasarımı, daha yüksek bağlanma sıcaklığı ve sınırlı döngü önemlidir. Döngü sayısı, net bir pozitif sonuç vermek için yeterli olmalıdır. Döngü sayısını gereksiz yere artırmak yanlış sonuçlara neden olabilir. ARMS primerinin normal uzunluğu 30 bazdır. Bu uzunluktaki primerler, yüksek bir erime (T_m) ve bağlanma sıcaklığına sahiptir ve bu nedenle daha spesifiktir (Newton vd., 1989; Little, 1995).



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Alet ve Cihazlar

- Elektroforez Güç Kaynağı (Cleaver CS-300V)
- Jel Görüntüleme ve İşleme Sistemi (DNR Bio-Imaging Systems/MiniLumi)
- UV Transilluminator (Major Science, MUV21-254/312)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye/İstanbul)
- Isı Bloğu (Wealtec Corp./HB-1, Amerika Birleşik Devletleri/ Sparks)
- Yatay Jel Elektroforez Sistemi (Thermo Scientific Owl™ EasyCast™ B1 Mini Gel Electrophoresis Systems)
- Hassas Terazı (OHAUS Pioneer® Analytical, Filipinler/Batangas)
- Manyetik Karıştırıcı (Velp® Scientifica are Heating Magnetic Stirrer, İtalya/Usmate)
- Mikrodalga Fırın (SAMSUNG Model: 03, Malaysia)
- 1,5 ml'lik Mikrosantrifüj Tüpleri (DNaz/RNaz/Endotoxin Free) (ISOLAB)
- 0.2 ml'lik PCR Tüpü (DNaz/RNaz/Endotoxin Free) (ISOLAB)
- Mikrosantrifüj (Beckman Coulter Microfuge® 16, A46473, ABD/ Kaliforniya)
- Parafilm (PM-996)
- Tüp Standı (ISOLAB)
- Mikropipet Seti (Eppendorf, Almanya/ Hamburg)
- Pipet uçları (ISOLAB)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, ABD/Massachusetts)
- Thermal Cycler (Applied Biosystems Veriti™ 96 Well Thermal Cycler)
- Thermal Cycler (Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700)
- Otoklav (Nüve OT 40L, Türkiye/Ankara)
- Vorteks (ZX3 VELP® SCIENTIFICA, İtalya/Usmate)
- pH Metre (Hanna Instruments pH 211)
- İnkübatör/Etöv (WiseCube)

- Spin Cihazı (ExiSpin, BIONEER)
- Saf Su Cihazı (GFL Saf Su Cihazı 2104, Germany)
- Güvenlik Kabini (Class II Safety Cabinet, METSAFE)

2.1.2. Kimyasal Malzemeler

- Etilen diamintetraasetikasit (EDTA) (Bio Basic Inc., Kanada, 6381-92-6)
- Etil alkol (Isolab, 64-17-5)
- Asetik asit (Glasiyel % 100) (EMPROVE®, Merck, 64-19-7)
- Distile su
- Etidyum Bromür (EtBr) (SIGMA®, ABD/ Missouri, 1239-45-8)
- Tris Baz (Fisher Bioreagents®, ABD, BP152-500)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (SIGMA®, 205-788-1)
- Sodyum Klorür (NaCl) (Merck, 7647-14-5)
- Agaroz (peqGOLD, 35-1010)
- Triton X-100 (Acros Organics, 9002-93-1)
- Proteinaz K (SIGMA®, 39450-01-6)
- Sükroz (Bio Basic Inc., Kanada, 57-50-1)
- Magnezyum Klorür (MgCl₂) (Tekkim, 7791-18-6)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (AppliChem, 67-68-5)
- Primer Çiftleri (Macrogen, Oligomer)
- 100 bp DNA Ladder (Thermo, SMO321)
- Tag DNA Polimeraz 5U/μL (Vivantis, PL1202)
- dNTP Mix 10 mM (Ampliqoon, 503004)
- Hot Start PCR Master Mix (2X) (Nucleogene, NG2020051)

2.1.3. Çözeltiler

Eritrosit Lizis Tamponu (100 mL)

- Sükroz: 0.32 M/10.95 g
- EDTA: 10 mM/0.37 g
- $MgCl_2$: 5 mM/0.102 g

10.95 g sükroz, 0.37 g EDTA ve 0.102 $MgCl_2$ hassas terazide tartılıp dH_2O ile 99 mL'ye tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Otoklavlandıktan sonra 1 mL Triton X-100 eklendi ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Fizyolojik Tampon (50 mL)

- NaCl: 75 mM/0.44 g
- EDTA: 25 mM/0.93 g

0.44 g NaCl ve 0.93 g EDTA hassas terazide tartılarak dH_2O ile 50 mL'ye tamamlandı, manyetik karıştırıcıda çözdürüldü, otoklavlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

TE-9 Tamponu (Lizis Tampon, 100 mL)

- Tris-HCl: 500 mM/6.06 g
- EDTA: 20 Mm/0.74 g
- NaCl: 10 mM/0.06 g

6.06 g Tris-HCl, 0.74 g EDTA ve 0.06 g NaCl hassas terazide tartılarak dH_2O ile 80 mL'ye tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. HCl ile pH 9'a ayarlandıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı, otoklavlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

TE-8 Tamponu (ph:8, 100 mL)

- Tris-HCl: 10 mM/0.12 g
- EDTA: 0.1 mM/20 μL

0.12 g Tris hassas terazide tartıldı ve 0.1 mM stok EDTA çözeltiden 20 μL alınıp dH_2O ile 80 mL'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda çözdürdükten sonra HCl ile pH 8'e ayarlandı, dH_2O ile 100 mL'ye tamamlandı, otoklavlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

SDS (%10'luk 50 mL)

5 gr SDS hassas terazide tartılarak dH₂O ile 50 mL'ye tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda çözdürüldü.

Yoğun Tuz Solüsyonu (6 M, 100mL)

35.06 g NaCl hassas terazide tartılıp dH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda çözdürüldü, otoklavlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Proteinaz K (100 mg/mL)

100 mg Proteinaz K'ya 10 mL dH₂O eklendi, oda sıcaklığında çözülmesi sağlandıktan sonra da 1,5 mL'lik santrifüj tüplerine porsiyonlanarak -20 °C'de saklandı.

Etanol (%70)

70 ml etanol mezurla ölçülerek şişeye eklendi ve dH₂O ile 100 mL'ye tamamlandı.

50 X TAE (Tris-Asetat-Edta) Hazırlanışı

242 g Tris baz ve 372.24 g EDTA disodyum tuzu hassas terazide tartıldı ve dH₂O ile 700 mL'ye tamamlandı. İyice çözünene kadar manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Ardından 57.1 mL glisiel asetik asit (pH: 8-8.5) eklenip dH₂O ile 1000 mL'ye tamamlandı.

1X Elektroforez Yürütme Tamponu

Hazırlanmış olan 50X TAE'den 20 mL alındı ve dH₂O ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Jel Boyama Solüsyonu (0.5 µg/mL)

1X TAE içerisine 0.5 µg/mL olacak şekilde stok (5 mg/mL) Etidyum Bromür çözeltisinden alınarak hazırlandı.

6X Yükleme Tamponu

- %0.25 Bromofenol mavisi
- %0.25 Ksilen Siyanol
- %30 Gliserol,

Olacak şekilde hazırlandı ve +4 °C'de saklandı.

%1.5'lik Agaroz Jel (50 mL)

0.75 g Agaroz hassas terazide tartılıp erlen içine eklendi. Daha sonra 1X TAE'den 50 mL alınıp agaroz çözülene kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. Soğuması için (60 °C ye kadar) bir süre bekletildikten sonra 5 µL Etidyum Bromür eklendi.

2.1.4. Primerler

Yöntem kısmında anlatıldığı üzere Z ve S allellerini özgün bir şekilde belirleyebilmek için tasarlanmış ve KZF, KZR, NZR, MZF, KSF, KSR, NSF ve MSR olarak isimlendirilmiş olan primerler ticari olarak sentezlendi ve liyofilize halde teslim alındı. 100 µM stok solüsyon hazırlamak için liyofilize halde primerlere firmanın belirttiği miktarda TE-8 Tamponu eklenerek homojen bir şekilde çözülmesi için +4 °C'de 1 gün bekletildi. Sonrasında stok solüsyondan 10 µM çalışma solüsyonları olarak hazırlanıp porsiyonlanarak -20 °C'de saklandı. Kullanım için stoktan alınan primerler tekrarlı dondurma-çözdürme işlemi önerilmediği için bitene kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Salting-Out (Tuzla Çöktürme) Yöntemiyle DNA İzolasyon Protokolü

Alınan periferik kan örneklerinden Salting-Out yöntemiyle DNA izolasyonu protokolü aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir:

- 0.5 mL tam kan üzerine 1000 µL eritrosit lizis tampon ilave edilerek oda ısısında 3-5 dk bekletildi. 3.500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant (üstte kalan sıvı kısım) atıldı. Oluşan lökosit peleti kırmızı ise işlem tekrarlandı.
- Hücre pelleti üzerine 1000 µL fizyolojik solüsyon eklendi ve hafif parmak darbeleri ile pelet çözüldü. 3.500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı (Hücre pelleti beyaz renkte olmalıdır, değilse işlem tekrarlanır).
- Pellet üzerine 350 µL hücre (lökosit) lizis tampon (250 µL TE-9 tamponu, 80 µL SDS, 20 µL Proteinaz K) ilave edilerek parmak darbeleri ile pellet çözüldü ve 56°C'deki ısı bloğu üzerinde pellet çözülene kadar 30 dk kadar inkübe edildi.

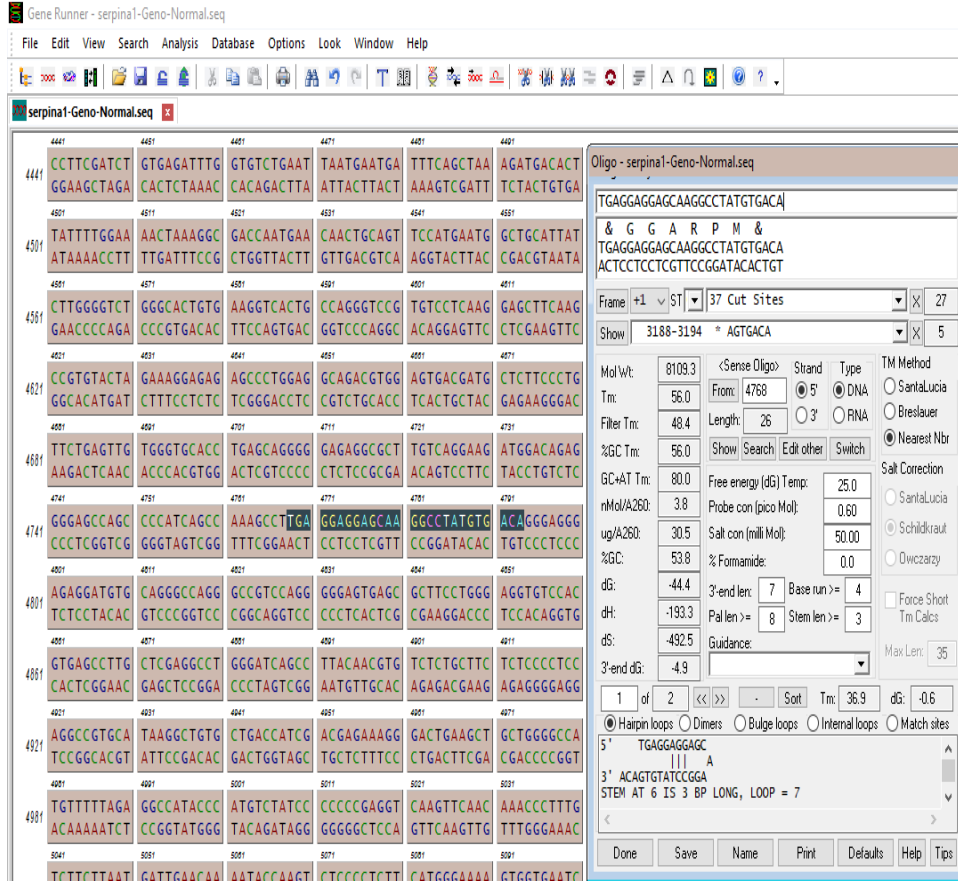
- 6 M tuz solüsyonundan 150 µL ilave edilerek karışım beyaz köpük olana kadar kuvvetlice karıştırıldı. 14.500 rpm’de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı.
- Süpernatant 14.500 rpm’de tekrar 5 dk santrifüj edildi ve oluşan yeni süpernatant temiz steril bir tüpe aktarıldı.
- Steril tüpe aktarılan süpernatant üzerine 1000 µL saf etanol ilave edildi ve hafifçe alt üst edilerek DNA’nın yoğunlaşması gözlemlendi.
- 14.500 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek DNA peletinin çökmesi sağlandı ve süpernatant atıldı.
- Peletin üzerine 1000 µL % 70’lik etanol ilave edilerek 14500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi ve oluşan süpernatant atılarak DNA temizlenmiş oldu.
- Ependorf tüp içerisindeki pellete zarar vermeden tüp ters çevrilerek kurutma kağıdı yardımı ile alkolün uçması sağlandı.
- Pellet büyüklüğüne göre 100-150 µL aralığında TE tamponu ilave edildi.
- Olası Dnaz kontaminasyonuna karşı 70°C’de 20 dk inkübe edildi.
- DNA örneği buzdolabına kaldırıldı (Bir gün sonra her türlü moleküler çalışmalarda kullanılması için +4°C’de, uzun süre saklanabilmesi için ise -20°C’ye kaldırılır).

2.2.2. Konsantrasyon Ölçümü ve Saflık Belirleme

İzole edilen DNA’ların konsantrasyon ölçümleri spektrofotometre (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer) cihazında gerçekleştirildi. DNA örneklerinden 2’şer µl alınıp 260, 280 ve 320 nm dalga boylarında ölçümleri gerçekleştirildi. DNA konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) = $Abs_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times (10 \text{ mm}/0,5 \text{ mm})$ denklemi kullanılarak hesaplandı. DNA saflığı (kalitesi) için $Abs_{260}/Abs_{280/320}$ değerinin 1,8-2,0 arasında olması gerektiğine dikkat edildi.

2.2.3. ARMS İçin Primer Tasarımı

SERPINA1 genine ait DNA dizisi NCBI Genbank (Genbank: NG_008290.1) veri tabanından temin edildi. Aktif protein (394 aa), Glutamik asitle (GAG) başlayıp, Lizin ile (AAA) bitmektedir. Z ve S alleri için ikişer tane kontrol, birer tane normal ve mutant primer tasarlanmıştır. Primerlerin dizilerinin seçimi ve tüm kontrollerinde (kendi içinde ve kullanılacak olan diğeri primer dizileri ile dimer ve hairpin oluşturma durumları, Tm sıcaklıkları ve GC içerikleri gibi) Gengerunner programı kullanılmış olup örnek ekran görüntüsü şekil 4'te verilmiştir. Ayrıca primerler tasarlanırken normal ve mutant nükleotitleri spesifik olarak belirleyebilecek (ARMS) tekniğine uygun ve 3' ucundan son nükleotitten bir öncesinde yanlış eşleşme oluşturacak şekilde tasarlanmasına dikkat edilmiştir.



şekil 4. Gene runner programı kullanılarak kontrol ve allel spesifik primerlerin tasarlanması

Generunner programı kullanılarak yukarıda bahsedilen ve primer dizilerinde olması gereken özellikleri taşıyacak olmasına da dikkat edilerek hazırlanmış olan primer dizileri aşağıdaki Tablo 2 ve Tablo 3’de verilmiştir. Z allelinin özgün bir belirlenmesinde sorunlar yaşandığından bu allel için üç farklı uzunlukta primer hazırlanmıştır.

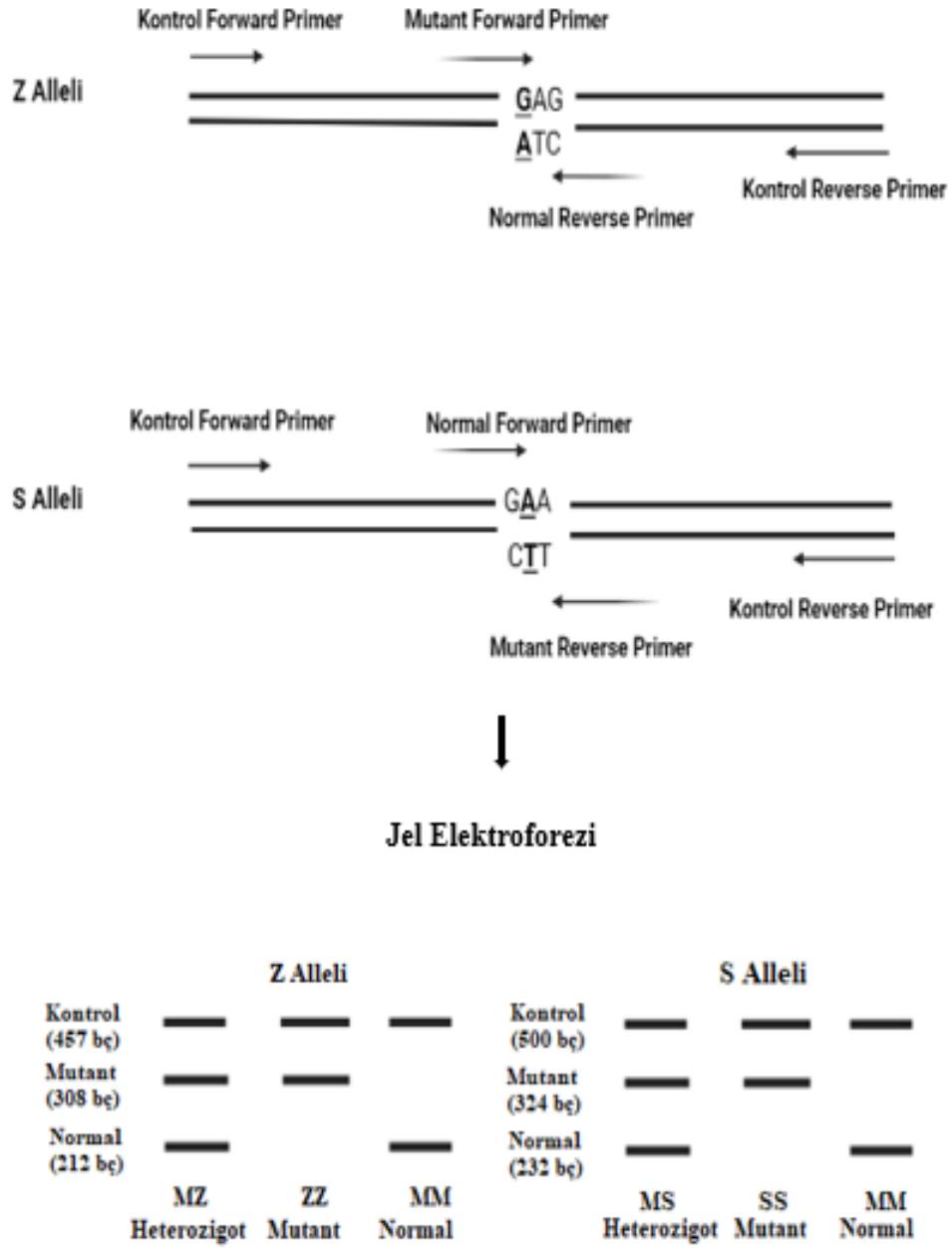
Tablo 2. S alleli primerleri

S Alleli	Primerler	Amplikon (bp)
NSF	CTGATGAGGGGAACTACAGCACCTGCA	232
MSR	GGTGATGATATCGTGGGTGAGTTCATTgA	324
KSF	ACTCATGGTTTCTTTATTCTGCTACAC	500
KSR	TTCTGGAAGCCAAGTTTATACAGAGTAG	

Tablo 3. Z alleli primerleri

Z Alelli	Primerler	Amplikon (bp)
NZR	GGCCCCAGCAGCTTCAGTCCCTTTTCAC	212
MZF	GTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGAGA	299
MZF2	CTCCAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGAGA	308
MZF3	TAAGGCTGTGCTGACCATCGAGA	294
KZF	TGAGGAGGAGCAAGGCCTATGTGACA	457
KZR	ATGGGAGGGATTTACAGTCACATGCAG	

Yukarıdaki primer dizileri ile beklenen PCR ürün çeşitleri ve büyüklükleri Şekil 5’te verilmiştir.



Şekil 5. ARMS-PCR şematik gösterimi

2.2.4. PCR Optimizasyonu

Primerlerin bağlanma sıcaklıkları ve $MgCl_2$, primer ve DNA konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için PCR denemeleri yapılarak bütün bileşenler için gerekli optimum koşullar ve konsantrasyonlar tespit edildi. Vivantis Tag polimeraz ve Hot start PCR master mix ile her bir allel için (Z ve S) tablo 4,5,6 ve 7’de verilen reaksiyon içeriği, farklı primer, DNA ve $MgCl_2$ konsantrasyonları ve bağlanma sıcaklıklarında denendi. Her bir allel multiplex PCR olacak şekilde çalışılmıştır.

Tablo 4. Z alleli PCR reaksiyonu karışımı (Vivantis)

PCR Karışımı	Hacim	Final Konsantrasyonu
Tampon S (10X)	2,5 µL	1X
Kontrol Forward (KZF)	0,8 µL	10 µM
Kontrol Reverse (KZR)	0,8 µL	10 µM
Mutant Forward (MZF)	1,5 µL	10 µM
Normal Reverse (NZR)	1 µL	10 µM
dNTP (25 mM)	0,4 µL	0,4 mM
Tag Polimeraz 5U/ µL	0,5 µL	2,5 U
DNA (10 ng/ µL)	2 µL	5-50 ng
Toplam Hacim	25 µL	

Tablo 5. S alleli PCR reaksiyonu karışımı (Vivantis)

PCR Karışımı	Hacim	Final Konsantrasyonu
Tampon S (10X)	2,5 µL	1X
Kontrol Forward (KSF)	0,6 µL	10 µM
Kontrol Reverse (KSR)	0,6 µL	10 µM
Mutant Reverse (MSR)	0,8 µL	10 µM
Normal Forward (NSF)	1,5 µL	10 µM
dNTP (25 mM)	0,4 µL	0,4 mM
Tag Polimeraz 5U/ µL	0,5 µL	2,5 U
DNA (10 ng/ µL)	2 µL	5-50 ng
Toplam Hacim	25 µL	

Tablo 6. Z alleli Hot Start PCR master mix reaksiyonu karışımı

PCR Karışımı	Hacim	Final Konsantrasyonu
Hot Start PCR Master Mix (2X)	6,25 µL	1X
Kontrol Forward (KZF) (10 µM)	1 µL	0.1-1 µM
Kontrol Reverse (KZR) (10 µM)	1 µL	0.1-1 µM
Mutant Forward (MZF) (10 µM)	0,5 µL	0.1-1 µM
Normal Reverse (NZR) (10 µM)	0,5 µL	0.1-1 µM
DNA (10 ng/ µL)	1 µL	<250 ng
Toplam Hacim	12.5 µL	

Tablo 7. S alleli Hot Start PCR master mix reaksiyonu karışımı

PCR Karışımı	Hacim	Final Konsantrasyonu
Hot Start PCR Master Mix (2X)	6,25 µL	1X
Kontrol Forward (KSF) (10 µM)	1,5 µL	0.1-1 µM
Kontrol Reverse (KSR) (10 µM)	1,5 µL	0.1-1 µM
Mutant Reverse (MSR) (10 µM)	1 µL	0.1-1 µM
Normal Forward (NSF) (10 µM)	0,5 µL	0.1-1 µM
DNA (10 ng/ µL)	1 µL	<250 ng
Toplam Hacim	12.5 µL	

2.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Optimizasyon sonucunda Vivantis Tag polimeraz ve Hot start PCR master mix ile örneklerin çalışıldığı PCR programları aşağıdaki gibidir. Optimizasyon çalışmalarına göre S alleli için primerin kalıp DNA'ya bağlanma derecesi (Ta) 61 °C; Z alleli için ise 68 °C olarak belirlenmiştir.

PCR Programı (Vivantis)

94 °C'de 2 dk	→ İlk Denatürasyon	
94 °C'de 30 sn	→ Denatürasyon	} 30 Döngü
Primere bağlı 30 sn	→ Bağlanma	
72 °C'de 30 sn	→ Uzama	
72 °C'de 7 dk	→ Son Uzama	
4 °C'de ∞	→ İnkübasyon	

PCR Programı (Hot Start PCR Master Mix 2X)

95 °C'de 5 dk	→ İlk Denatürasyon	
95 °C'de 30 sn	→ Denatürasyon	} 30 Döngü
Primere bağlı 30 sn	→ Bağlanma	
72 °C'de 1 dk	→ Uzama	
72 °C'de 10 dk	→ Son Uzama	
4 °C'de ∞	→ İnkübasyon	

2.2.6. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jelde Yürütülmesi (1.5)

0.75 g agaroz hassas terazide tartılıp TAE solüsyonuyla 50 mL'ye tamamlandı. Biraz soğuduktan sonra 5 µL Etidyum bromür eklendi. Hafifçe karıştırıldıktan sonra jel tablasına döküldü ve örneklerin yürütülmesi için katılaşması bekledi. Jel katılaştıktan sonra PCR ürünleri yükleme boyasıyla karıştırılarak (8:2 µL oranında) kuyucuklara yüklendi. 100 V'da 45 dk yürütüldü.

2.2.7. Örneklerin Görüntülenmesi

Jelde yürütülen örnekler Jel Görüntüleme ve İşleme Sisteminde görüntüledi.

2.2.8. Dizi Analizi

Bütçemiz yetersiz olduğu için S ve Z allellerinin dizi analizi hizmet alımı ile yapılmıştır.

2.2.9. S ve Z Allelleri Açısından Dizi Analizi ve ARMS-PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması

S ve Z allelleri hasta ve kontrol örnekleri için Sanger sekanslama yapılmıştır. Bu allellerin sekans sonuçları Finch TV kromotogram görüntüleyici program kullanılarak analiz edilmiştir. Mutant bölgeye yakın olan 6-7 nt'lik bir sekans dizisi alınarak Finch Tv'ye yapıştırılıp hedef bölgenin doğru okunup okunmadığı ve o bölgedeki homozigotluk heterozigotluk durumu tespit edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Dizi analizi sonuçlarının Finch TV'de analizi

Bu çalışmada dizi analizi sonuçları referans alınarak ARMS-PCR metodu çalışılmıştır. Dizi analizi ve ARMS-PCR sonucuna göre S allelinde hasta (53 kişi) ve kontrol (33 kişi) örnekleri homozigot normal (MM) olarak tespit edilmiştir. Dizi analizi sonuçlarına göre Z allelinde hasta örneklerinden 2 tanesi heterozigot (MZ); kontrol örneklerinden 1 tane heterozigot (MZ) olarak tespit edilmiştir. Z allelinde ARMS-PCR sonucuna göre tüm hasta ve kontrol örneklerine mutant primerin bağlanması sonucu heterozigot (MZ) olarak bulunmuştur.

Aynı zamanda *SERPINA1* gen dizisiyle dizi analizi sonuçları BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yapılarak benzerlikleri incelenmiştir (Şekil 7).

BLAST® » blastn suite

Align Sequences Nucleotide BLAST

blastn blastp blastx tblastn tblastx

BLASTN programs search nucleotide subjects using a nucleotide

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) ? Clear

ACTCGGAAAAGCAGGAGTGTCATATTGTATCATATGGAGAGGGCAGGC
TGTGTGCTCTCAGGGAAGTT
CCTCAACTTCTCTGTG

Query subrange ?

From

To

Or, upload file Dosya seçilmedi ?

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search ?

☒ Align two or more sequences ?

Enter Subject Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) ? Clear

TGGAAATGAAGACAGAAGGTGATTCCTCCCAACCTGAGGGTGACCAAGAA
GCTGCCACACCTCTTAGCCATGTTGGGACTGAGGCCCATCAGGACTGG
CCAGAGGGCTGAGGAGGGTGAACCCACATCCCTGGGTCAGTCTACT
CTGTATAAACTTGGCTTTCCAAAAA

Subject subrange ?

From

To

Şekil 7. SERPINA1 geni ve dizi analizi sonuçlarının blastn analizi

2.2.10. İstatistiksel Analiz ve ARMS-PCR Yönteminin Güvenirliği

Çalışma verilerinin istatistiksel analizi için iki eş grup (bağımlı gruplar) arasındaki farkın anlamlılığını test etmek için varyans analizi (ANOVA) uygulandı. İki grup arasındaki farkın ortalamasını almak için t testi yapıldı ve farkların ortalaması t testi tablosuyla karşılaştırıldı. Ölçüm ortalamalarının kabul veya red bölgesine denk gelmesine göre anlamlılık değerine (p değeri) bakıldı. S allelinde dizi analizi ile ARMS sonuçları arasında % 100 bir uyum elde edilmiştir. Z allelinde ise $p < 0.05$ dizi analizi ile ARMS sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. AAT seviyeleri bakımından da PCR ve dizi analizi kategorileri açısından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Tablo 8. Z ve S allelinin istatistiksel analizi

Farkların ortalaması	t değeri	p değeri
0.035	1.753	0.083*
-0.965	-48.494	<0.0001**
0.965	48.494	<0.0001***

*Z ve S alleli dizileme sonuçlarını kendi aralarında karşılaştırdık. $P>0.05$ olduğundan H_0 'ı red edemedik. Yani S ve Z allelinin dizileme sonuçları arasında fark yoktur.

** Z allelinin dizi analizi ve PCR sonuçlarının karşılaştırdık. $P<0.05$ olduğundan H_0 red edildi. Yani dizi analizi ve pcr sonuçları arasında anlamlı bir fark vardır.

***Z ve S allellerinin PCR sonuçlarını kendi aralarında karşılaştırdık. $P<0.05$ olduğundan H_0 red edildi. S ve Z alleli PCR sonuçları arasında anlamlı bir fark vardır.

3. BULGULAR

Planlanan bu çalışmada, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Araştırma Hastanesi Göğüs Hastalıkları Polikliniğinden KOAH ve amfizem tanısı konmuş hasta grubu (yaklaşık 53 kişi) ile kontrol grubunda (yaklaşık 33 kişi) bu hastalıklarla en sık ilişkili olan PI S ve PI Z mutasyonları ARMS-PCR tekniğiyle genotiplenmiştir. Hasta grubuna ait AAT seviyesi ve demografik bilgiler Tablo 9’da gösterilmektedir.

Tablo 9. Çalışmamızda yer alan KOAH’lı olgulara ilişkin veriler

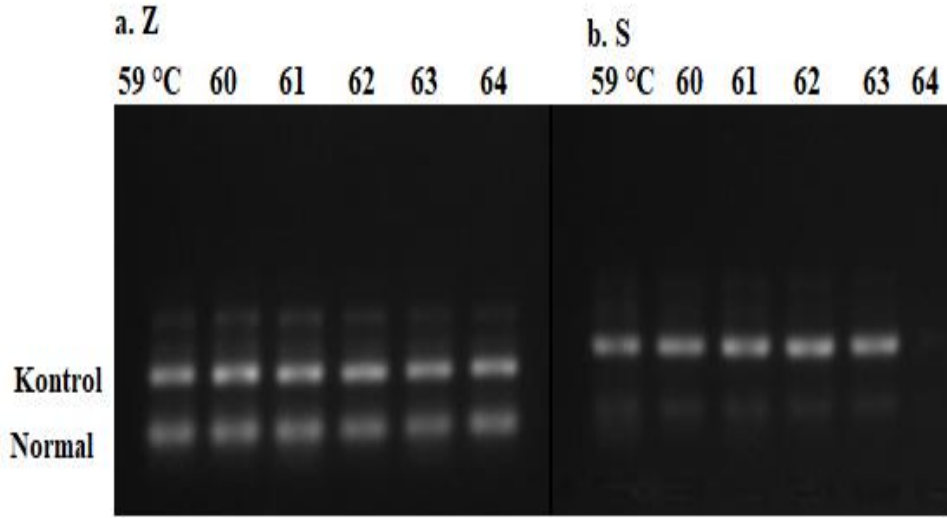
Olgu No	Yaş	Cinsiyet	AAT Seviyesi (g/L) (0.9-2)
1	80	Erkek	-
2	72	Erkek	1.1
3	72	Erkek	1.033
4	93	Kadın	0.2
5	75	Erkek	-
6	49	Erkek	1.97
7	78	Erkek	0.54
8	95	Kadın	1.21
9	48	Erkek	1.47
10	67	Erkek	1.43
11	49	Kadın	-
12	71	Erkek	3.1
13	74	Erkek	2.15
14	64	Erkek	1.57
15	63	Erkek	1.47
16	52	Erkek	2.56
17	30	Kadın	1.36
18	69	Erkek	1.23
19	54	Erkek	1.59
20	68	Erkek	1.45
21	63	Erkek	1.5
22	59	Erkek	1.34
23	46	Erkek	0.2

Tablo 9 (Devam). Çalışmamızda yer alan KOAH'lı olgulara ilişkin veriler

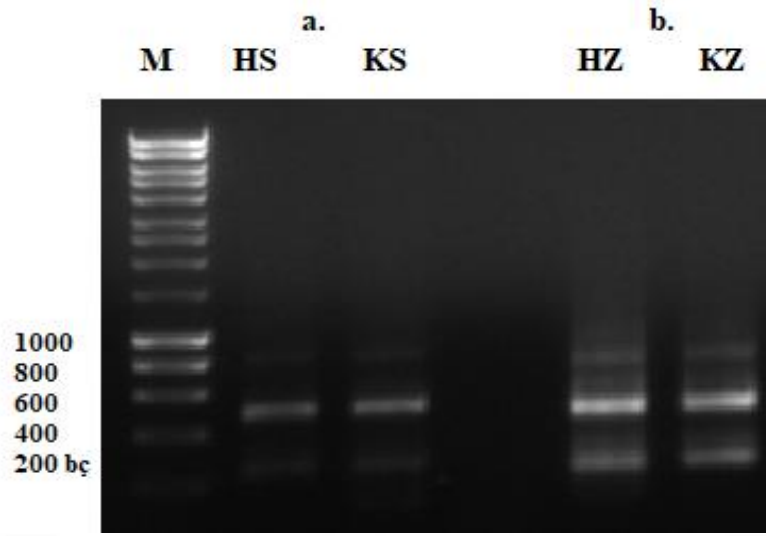
24	76	Erkek	1.57
25	65	Erkek	1.62
26	85	Erkek	1.41
27	71	Erkek	1.85
28	74	Erkek	1.65
29	68	Erkek	1.49
30	57	Kadın	1.31
31	23	Kadın	1.67
32	73	Erkek	1.21
33	56	Erkek	1.39
34	79	Erkek	1.65
35	74	Erkek	2.33
36	64	Erkek	1.96
37	64	Erkek	1.65
38	58	Erkek	1.55
39	61	Erkek	2.53
40	79	Erkek	1.58
41	77	Erkek	1.33
42	60	Erkek	1.62
43	59	Erkek	-
44	80	Erkek	2.07
45	78	Erkek	1.4
46	65	Erkek	1.44
47	78	Erkek	1.36
48	72	Erkek	1.38
49	90	Kadın	-
50	58	Erkek	0.2
51	79	Erkek	1.67
52	57	Erkek	1.5
53	68	Erkek	1.36

3.1. Optimizasyon Sırasında Elde Edilen Jel Görüntüleri

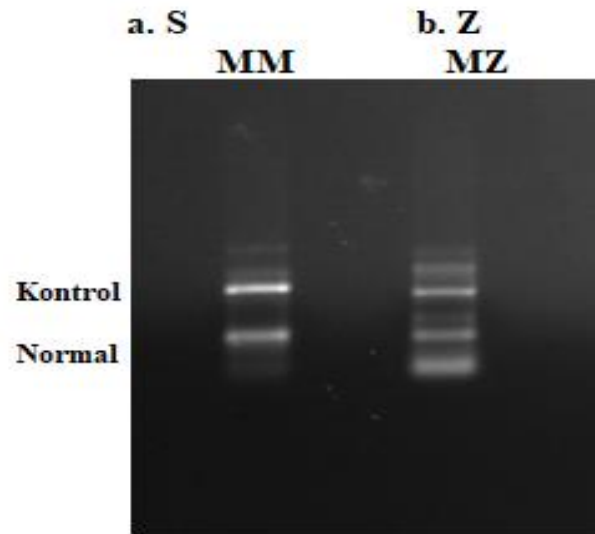
Hasta ve kontrol örneklerinden birer tanesi kullanılarak Z ve S allellerine ait primerlerin Ta derecesini bulmak için Vivantis Tag DNA polimerazı kullanarak 59-64°C arasında gradiyent PCR yapıldı. Özellikle S allelinde normal primerlerin net görülmediği ve sıcaklık yükseldikçe kontrol primerlerin de zayıfladığı görüldü. İlk başta optimum sıcaklık Z alleli için 63 °C; S alleli için ise 61 °C olarak 35 döngü olarak belirlendi (Şekil 8). Z ve S allelleri için hasta ve kontrol örneklerinden bir örnek alınarak tekrar PCR yapıldı (Şekil 9). S allelinde normal primerin konsantrasyonu artırılarak normal bant gözlemlendi. Ayrıca dizi analizi sonuçlarıyla ARMS-PCR eş zamanlı ilerlendi. Dizi analizi sonucuna göre heterozigot birey bulunduktan sonra Z alleli için de mutant primerin konsantrasyonu artırılarak mutant bant gözlemlendi (Şekil 10). Ta sıcaklığı ayarlandıktan sonra DNA konsantrasyonun yüksek olmasından dolayı oluşan non-spesifik bantlar ve multipleks PCR yapıldığından primer dimerleri karşımıza çıkan en büyük problemlerdi. Konsantrasyonu yüksek olan örnekler 5:1 oranında ve sonrasında 3:1 oranında seyreltildi. Fakat hala karşımızda non-spesifik bantlar çıkmaktaydı (Şekil 11).



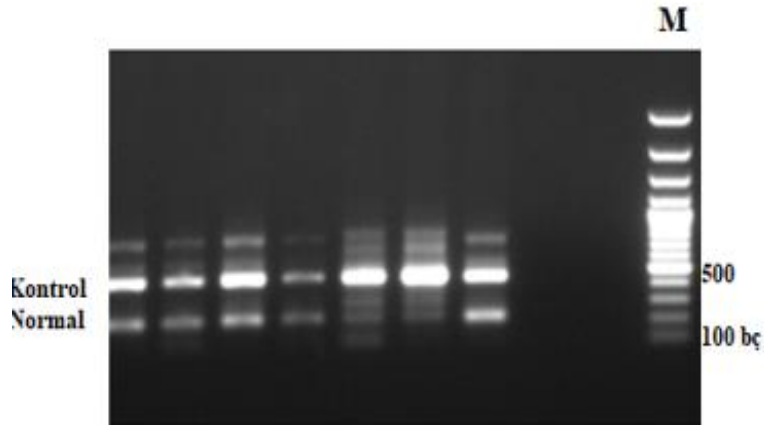
Şekil 8. (a) Z alleleine ait gradiyent PCR jel görüntüsü (59-64 °C).
(b) S alleleine ait gradiyent PCR jel görüntüsü (59-64 °C).



Şekil 9. Z ve S alleleline ait jel görüntüsü. (a) S alleli hasta (HS) ve kontrol (KS) bireye ait PCR jel görüntüsü. (b) Z alleli hasta (HZ) ve kontrol (KZ) bireye ait PCR jel görüntüsü (M:200 bç DNA ladder, Ta: 61°C).

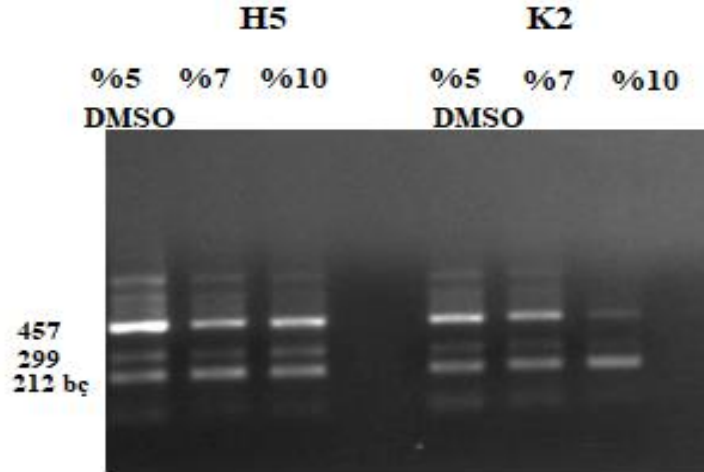


Şekil 10. (a) S alleleline ait PCR jel görüntüsü (Ta: 61 °C).
(b) Z alleleline ait PCR jel görüntüsü (Ta: 63 °C)
(MM: homozigot normal, MZ: heterozigot).



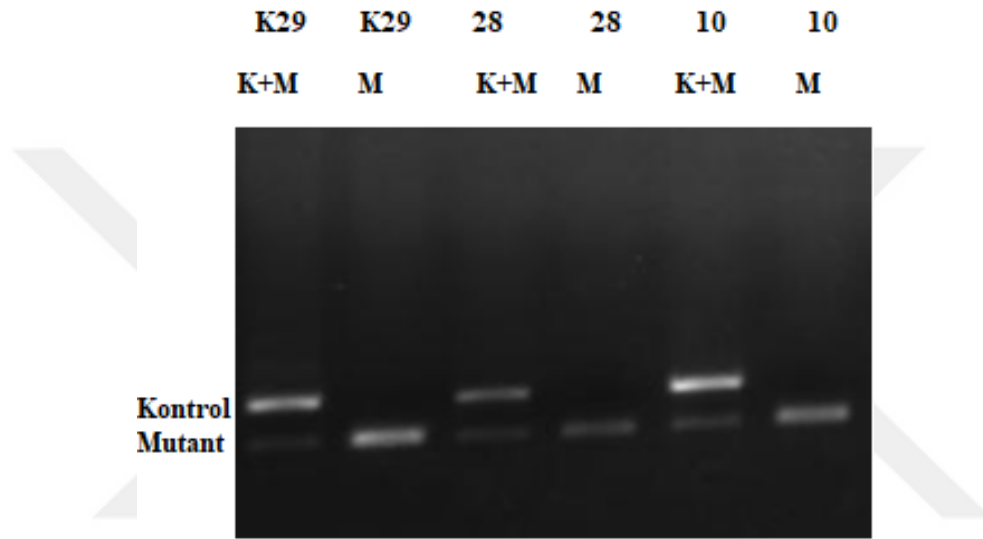
Şekil 11. Z alleleline ait jel görüntüsü (M: 500 bç DNA ladder, Ta: 63 °C).

Bir PCR reaksiyonunda non spesifik bantların giderilmesi için arttırıcı (enhansır) bileşenler eklenebilir. Z alleli için hasta ve kontrol örneklerinden bir örnek alınarak % 5, % 7, % 10 oranlarında dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek nasıl bir sonuç elde edileceğine bakıldı. DMSO, nispeten sonuç vermesiyle birlikte tamamen non spesifik bantları giderememiş ve heterozigot olan bireylerde mutant bantın zayıfladığı gözlemlendi (Şekil 12).



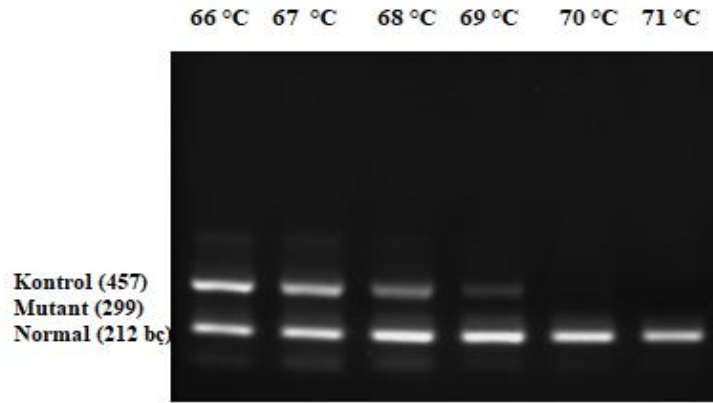
Şekil 12. Z alleleline ait hasta ve kontrol örneklerden (H5-K2) DMSO kullanılarak elde edilen PCR jel görüntüsü.

Z alleli için dizi analizi sonucunda homozigot olan bireylerin ARMS-PCR’da heterozigot olarak sonuç vermesi karşımıza çıkan en büyük problemlerden biriydi. Emin olmak için dizi analizinde heterozigot ve homozigot bireyler üzerinden ayrı ayrı kontrol ve mutant primerlerle kontrol+mutant (KZF+KZR+MZF) ve sadece mutant (KZR+MZF) olacak şekilde 63 °C’de 30 döngü olacak şekilde PCR yapıldı. Fakat dizi analizi sonuçlarına göre heterozigot (K29-28) ve homozigot (10) bireye mutant primerin bağlandığı gözlemlendi (Şekil 13).



Şekil 13. Z allelinde heterozigot (K29-28) ve homozigot (10) bireye ait PCR jel görüntüsü (Ta: 63°C, K+M: KZF+KZR+MZF, M: KZR+MZF).

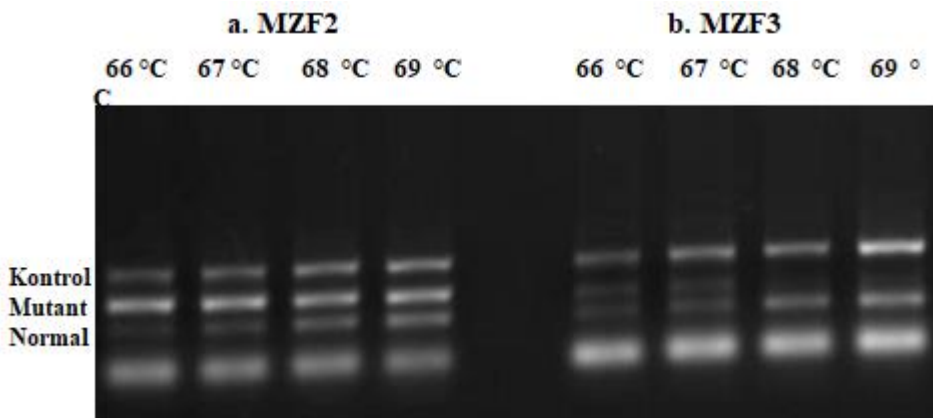
Z allel için dizi analizi sonuçlarında homozigot bireylere mutant primerin bağlanmasını gidermek 66 °C-71 °C arasında gradient yapıldı. Sıcaklık yükseldikçe kontrol ve mutant bantların yok olduğu görüldü, bu da istenen bir sonuç değildi (Şekil 14).



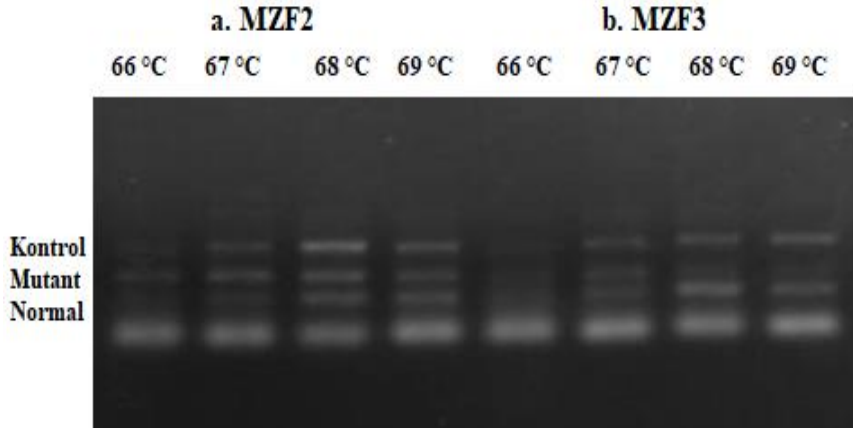
Şekil 14. Z allelinde MZF primeriyle yapılan gradient PCR sonucuna ait jel görüntüsü

Verimli bir sonuç alabilmek için 28 nt uzunluğundaki mutant primer (MZF) hem kısaltıldı (MZF3) hem de uzatılarak (MZF2) yeniden sipariş edildi. Primerler geldiğinde sekans sonucuna göre Z alleli için homozigot ve heterozigot bireye ait DNA örneğinden tekrar gradient PCR (66 °C-69 °C) yapıldı. Buna rağmen mutant primerin tüm kontrol ve hasta bireylerde yapıştığı ve sıcaklık yükseldikçe sekansta heterozigot olan sonuca göre mutant primerin kaybolduğu gözlemlendi (Şekil 15-16).

MZF	GTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGAGA	28 nt
MZF2	CTCCAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGAGA	37 nt
MZF3	TAAGGCTGTGCTGACCATCGAGA	23 nt

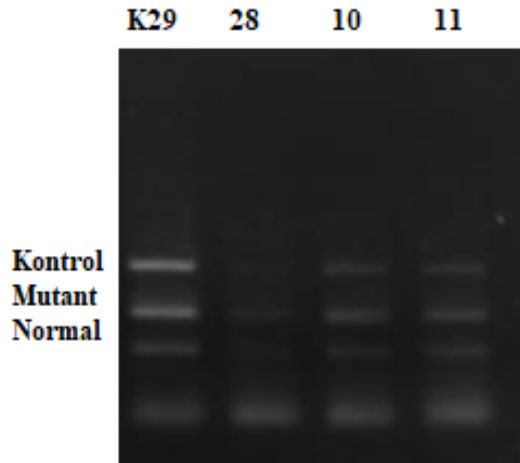


Şekil 15. Z alleleine ait PCR jel görüntüsü. **(a)** Heterozigot bireye ait örneğin MZF2 (308 bp) primeriyle gradient sonucu. **(b)** Heterozigot bireye ait örneğin MZF3 (294 bp) primeriyle gradient sonucu.



Şekil 16. Z alleleline ait PCR jel görüntüsü. **(a)** Homozigot bireye ait örneğin MZF2 (308 bç) primeriyle gradient PCR sonucu. **(b)** Homozigot bireye ait örneğin MZF3 (294 bç) primeriyle gradient PCR sonucu

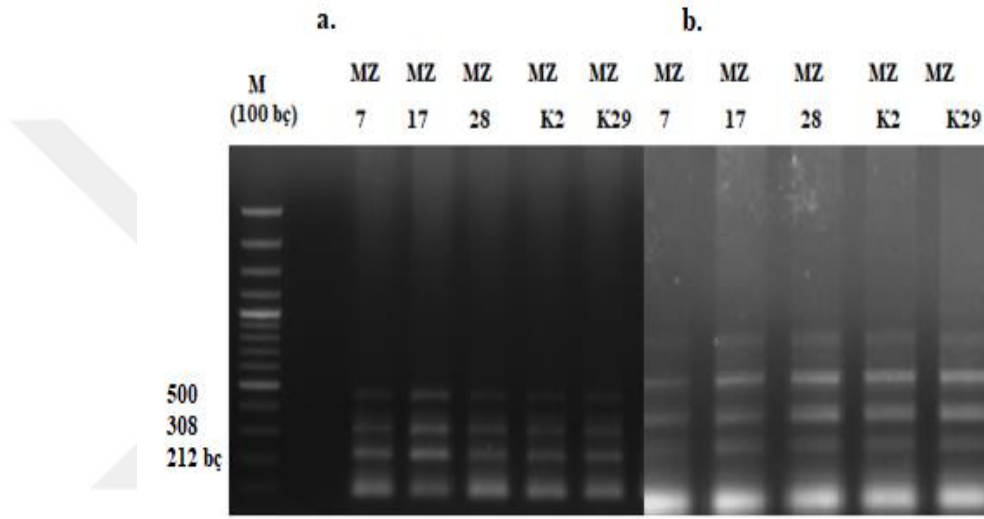
MZF2 primeriyle son olarak 72°C’de 30 döngü olacak şekilde dizi analizi sonucuna göre heterozigot (K29-28) ve homozigot (10-11) sonuca göre PCR yapıldı. Primerin bağlanma sıcaklığı arttıkça mutant primerin homozigot örneklere hala bağlı kaldığı ve ayrıca kontrol ve normal bantların da zayıfladığı gözlemlendi (Şekil 17).



Şekil 17. Heterozigot (K29-28) ve homozigot (10-11) bireylerin MZF2 primeriyle PCR sonucuna ait jel görüntüsü (Ta: 72 °C, 30 döngü).

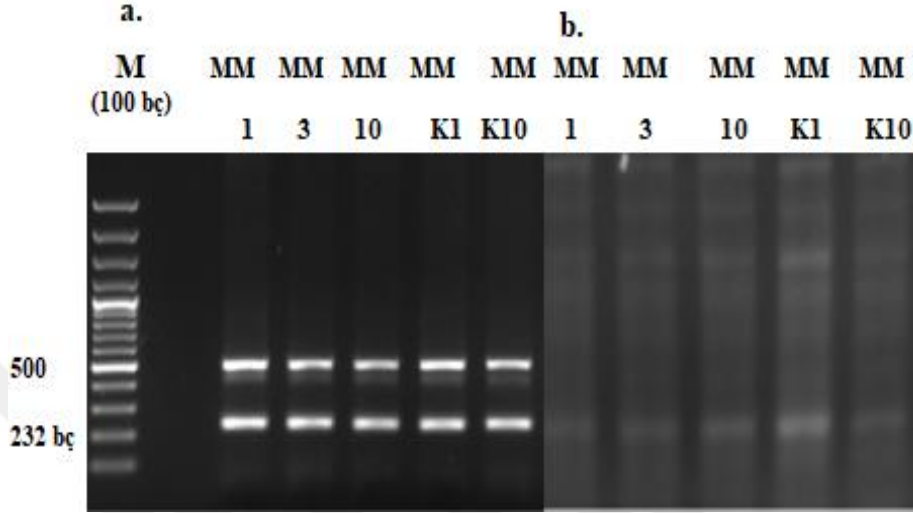
3.2. ARMS-PCR Sonucuna Ait Jel Görüntüleri

Multipleks PCR yapıldığı için birtakım sorunlarla karşılaşıldı. Non-spesifiklerin giderilmesi, mutant primerin bağlanması, primer dimer oluşumu gibi sorunlarının giderilmesi için oldukça yoğun bir optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bunun için özellikle Hot start Tag polimeraz kullanılarak non-spesifiklerin giderilmesinde ve primer dimerlerinin bir miktar azalmasında büyük bir başarı elde edildi. Aynı zamanda döngü sayısı 35'ten 30'a düşürülerek daha iyi bir sonuç elde edilmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Z alleleline ait jel görüntüsü. **(a)** Hot start master mix kullanılmasıyla elde edilen hasta ve kontrol örneklerine ait jel görüntüsü. **(b)** Vivantis Tag polimeraz kullanılmasıyla elde edilen hasta ve kontrol örneklerine ait jel görüntüsü (MZF2, Ta: 63 °C, 3).

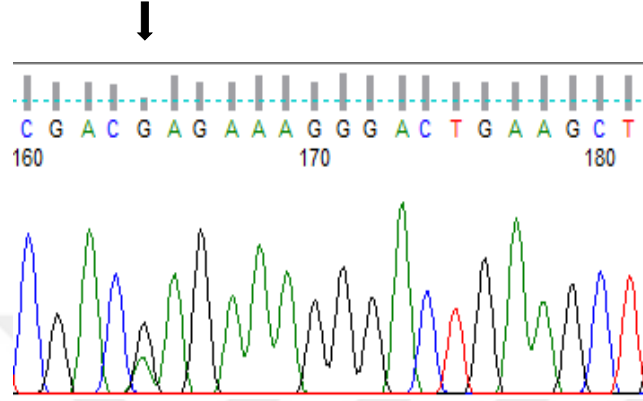
S allelinde Hot start polimeraz kullanıldığında güzel bantlar elde edilmesine rağmen Vivantis kullanıldığında güzel bir sonuç elde edilemedi. Bantlar net bir şekilde çıkmadı ve non spesifik bantlar oldukça fazla gözlemlendi (Şekil19).



Şekil 19. S alleleine ait PCR jel görüntüsü. **(a)** Hot start master mix kullanılmasıyla elde edilen hasta ve kontrol örneklerine ait jel görüntüsü. **(b)** Vivantis Tag polimeraz kullanılmasıyla elde edilen hasta ve kontrol örneklerine ait jel görüntüsü (Ta: 61 °C, 30).

3.3. Dizi Analizi Sonuçları

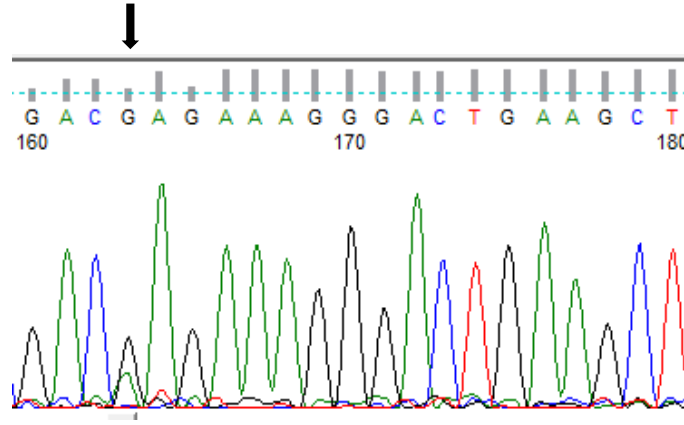
Heterozigot ve homozigot bireylerden bazılarına ait dizi analizi ve blastn sonuçları aşağıda verilmiştir.



Şekil 20. Z alleleline ait kontrol örneklerinden heterozigot bir bireye ait dizi analizi sonucu

```
Query 4819 GGGCCGTCCAGGGGGAGTGAGCGCTTCCTGGGAGGTGTCCACGTGAGCCTTGCTCGAGGC 4878
Sbjct 30 GGGCCGTCCAGGGGGAGTGAGCGCTTCCTGGGAGGTGTCCACGTGAGCCTTGCTCGAGGC 89
Query 4879 CTGGGATCAGCCTTACAACGTGTCTGCTTCTCTCCCTCCAGGCCGTGCATAAGGCTG 4938
Sbjct 90 CTGGGATCAGCCTTACAACGTGTCTGCTTCTCTCCCTCCAGGCCGTGCATAAGGCTG 149
Query 4939 TGCTGACCATCGACGAGAAAGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTAGAGGCCATAC 4998
Sbjct 150 TGCTGACCATCGACGAGAAAGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTAGAGGCCATAC 209
Query 4999 CCATGTCTATccccccGAGGTCAAGTTCACAAACCCCTTTGTCTTCTTAATGATTGAAC 5058
Sbjct 210 CCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCACAAACCCCTTTGTCTTCTTAATGATTGAAC 269
Query 5059 AAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAAAATAACTGc 5118
Sbjct 270 AAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAAAATAACTGC 329
Query 5119 ctctcgctcctcaacccctccccctccatccctggccccctccctGGATGACATTAAAGAA 5178
Sbjct 330 CTCTCGCTCCTCAACCCCTCCCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAAGAA 389
Query 5179 GGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAATC-CCTCCC 5222
Sbjct 390 GGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAATCACCTCCC 434
```

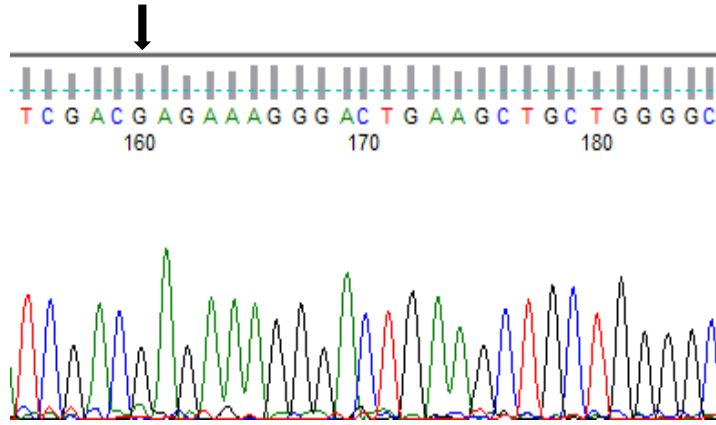
Şekil 21. Z alleleline ait kontrol örneklerinden heterozigot bir bireye ait blastn sonucu



Şekil 22. Z alleleine ait hasta örneklerinden heterozigot bir bireye ait dizi analizi sonucu

Query	4811	CAGGGCCAGGGCCGTCAGGGGG-AGTGAGCGCTTCCTGGGAGGTGT-CCACGTGAGCCT	4868
Sbjct	19	CAGGGCCAGGGCCGTCAGGGGGAAGTGAGCGCTTCCTGGGAGGTGTCCACGTGAGCCT	78
Query	4869	TGCTCGAGGCCTGGGATCAGCCTTACAACGTGTCTGCTTCTCTCCCTCCAGGCCGTG	4928
Sbjct	79	TGCTCGAGGCCTGGGATCAGCCTTACAACGTGTCTGCTTCTCTCCCTCCAGGCCGTG	138
Query	4929	CATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTA	4988
Sbjct	139	CATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTA	198
Query	4989	GAGGCCATACCCATGTCTATccccccGAGGTCAAGTTCAACAAACCTTTGTCTTCTTA	5048
Sbjct	199	GAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCTTTGTCTTCTTA	258
Query	5049	ATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAA	5108
Sbjct	259	ATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAA	318
Query	5109	AAATAACTGcctctcgctcctcaaccctccccctccatccctggccccctccctGGATGA	5168
Sbjct	319	AAATAACTGCCTCTCGCTCCTCAACCCCTCCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGA	378
Query	5169	CATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAATCCCTCCCAT	5224
Sbjct	379	CATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAACCACTCCCAT	434

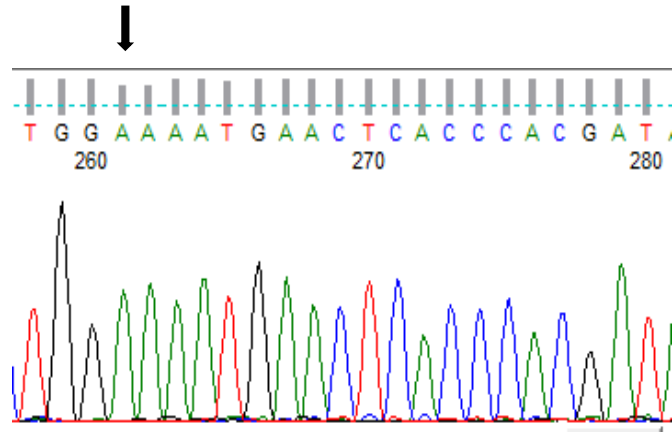
Şekil 23. Z alleleine ait hasta örneklerinden heterozigot bir bireye ait blastn sonucu



Şekil 24. Z alleleline ait hasta örneklerinden homozigot bir bireye ait dizi analizi sonucu

Query	16938	GTGCAGGGCCAGGGCCGTCCAGGGGGAGTGAGCGCTTCTGGGAGGTGTCCACGTGAGCC	16997
Sbjct	15	GTGCAGGGCCAGGGCCGTCCAGGGGGAGTGAGCGCTTCTGGGAGGTGTCCACGTGAGCC	74
Query	16998	TTGCTCGAGGCCTGGGATCAGCCTTACAACGTGTCTGCTTCTCTCCCTCCAGGCCGT	17057
Sbjct	75	TTGCTCGAGGCCTGGGATCAGCCTTACAACGTGTCTGCTTCTCTCCCTCCAGGCCGT	134
Query	17058	GCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTT	17117
Sbjct	135	GCATAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTT	194
Query	17118	AGAGGCCATACCCATGTCTATcccccccGAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTCTT	17177
Sbjct	195	AGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTCTT	254
Query	17178	AATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCA	17237
Sbjct	255	AATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCA	314
Query	17238	AAAATAACTGcctctcgctcctcaacccctccctccatccctggccccctccctGGATG	17297
Sbjct	315	AAAATAACTGCCTCTCGCTCCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATG	374
Query	17298	ACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAATCCCTCCCA	17353
Sbjct	375	ACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAATCCCTCCCA	430

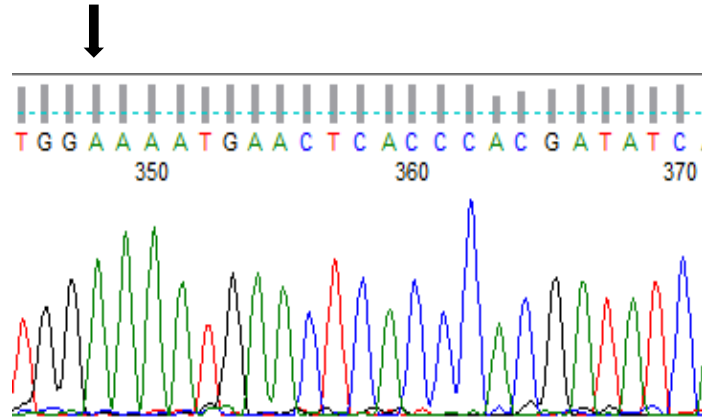
Şekil 25. Z alleleline ait hasta örneklerinden homozigot bir bireye ait blastn sonucu



Şekil 26. S alleleline ait hasta örneklerinden homozigot normal bireye ait dizi analizi sonucu

Query	2377	AACCTTCACTCACCCCTGGTGATGCCACCTTCCCTCTCTCCAGGCAATGGGAGAGAC	2436
Sbjct	1	AACCTTC-CTCACCCCTGGTGATGCCACCTTCCCTCTCTCCAGGCAATGGGAGAGAC	59
Query	2437	CCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTGA	2496
Sbjct	60	CCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTGA	119
Query	2497	AGGTGCCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCA	2556
Sbjct	120	AGGTGCCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCA	179
Query	2557	GCTGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCCTGATG	2616
Sbjct	180	GCTGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCCTGATG	239
Query	2617	AGGGGAACTACAGCACCTGGAAAATGAACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGG	2676
Sbjct	240	AGGGGAACTACAGCACCTGGAAAATGAACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGG	299
Query	2677	AAAATGAAGACAGAAGGTGATTCCCAACCTGAGGGTGACCAAGAAGCTGCCACACCTC	2736
Sbjct	300	AAAATGAAGACAGAAGGTGATTCCCAACCTGAGGGTGACCAAGAAGCTGCCACACCTC	359
Query	2737	TTAGCCATGTTGGGACTGAGGCCCATCAGGACTGGCCAGAGGGCTGAGGAGGGTGAACCC	2796
Sbjct	360	TTAGCCATGTTGGGACTGAGGCCCATCAGGACTGGCCAGAGGGCTGAGGAGGGTGAACCC	419
Query	2797	CACATCCCTGGGTCACTGCTACTCTGTATAAACTTGGCTT	2836
Sbjct	420	CACATCCCTGGGTCACTGCTACTCTGTATAAACTTG-CTT	458

Şekil 27. S alleleline ait hasta örneklerinden homozigot normal bireye ait blastn sonucu



Şekil 28. S alleleine ait kontrol örneklerinden homozigot normal bireye ait dizi analizi sonucu

Query	2343	ACTCATGGTTTCTTTATTCTGCTACACTCTTCCAAACCTTCACTCACCCCTGGTGATGCC	2402
Sbjct	53	ACTCATGGTTTCTTTATTCTGCTACACTCTTCCAAACCTTCACTCACCCCTGGTGATGCC	112
Query	2403	CACCTTCCCTCTCTCCAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAA	2462
Sbjct	113	CACCTTCCCTCTCTCCAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAA	172
Query	2463	GAGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCGTTTAGGC	2522
Sbjct	173	GAGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCGTTTAGGC	232
Query	2523	ATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTG	2582
Sbjct	233	ATGTTTAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTG	292
Query	2583	GGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAAT	2642
Sbjct	293	GGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAAT	352
Query	2643	GAACTACCCACGATATCATACCAAGTTCCTGGAAAAATGAAGACAGAAGGTGATTCCCC	2702
Sbjct	353	GAACTACCCACGATATCATACCAAGTTCCTGGAAAAATGAAGACAGAAGGTGATTCCCC	412
Query	2703	AACCTGAGGGTGACCAAGAAGCTGCCCACACCTCTTAGCCATGTTGGGACTGAGGCCCAT	2762
Sbjct	413	AACCTGAGGGTGACCAAGAAGCTGCCCACACCTCTTAGCCATGTTGGGACTGAGGCCCAT	472
Query	2763	CAGGACTGGCCAGAGGGCTG	2782
Sbjct	473	CAGTACTGGCCATAGGGCTG	492

Şekil 29. S alleleine ait kontrol örneklerinden homozigot normal bireye ait blastn sonucu

4. TARTIŞMA

Alfa- 1 Antitripsin eksikliği yaklaşık 2.000 ile 5.000 kişiden 1'ini etkileyen, akciğer (amfizem, KOAH) ve karaciğer (siroz, hepatosellüler karsinom) hastalıklarına yatkınlık oluşturan otozomal ko-dominant genetik bir hastalıktır (Stoller vd., 2012; Brantly vd., 2020). Alfa-1-antitripsin eksikliği KOAH için kanıtlanmış genetik bir risk faktörü olup vakaların yaklaşık sadece %1-3'ü ciddi AAT eksikliğine bağlıdır (Denden vd., 2010).

Literatürde AAT eksikliğinin ARMS-PCR metodu ile tespitine dair bir çalışmaya raslanmadığından bu tez çalışmasında KOAH ve amfizemli hastalardan ve kontrol bireylerinden alınan kanlardan izole edilen DNA örnekleri kullanılarak *SERPINA1* geninde AAT eksikliğine neden olan S ve Z allellerinin ARMS-PCR yöntemi kullanılarak genotiplenmesi ve hastalığa neden olan allellerin kolay ve ucuz bir şekilde belirlenebilmesi için ARMS-PCR metodunun uygulanması amaçlanmıştır.

ARMS-PCR her ne kadar standart laboratuvar malzemeleri ve ekipmanları ile yapılabilmesi, sonuçların hızlı ve kolay bir şekilde yorumlanabilmesi gibi avantajlara sahip olsa da multipleks PCR koşulları nedeniyle uygun primer tasarımlarının yapılabilirliğindeki zorluklar ve optimizasyon açısından oldukça zaman alıcı olması bu yöntemin dezavantajlarından (Mesrian Tanha vd., 2015; Ehnert vd., 2019).

Yukarıda bahsedilen amaçla yapılmış olan bu çalışmada, tüm örneklerin dizi analizi hizmet alımı yoluyla yapılmış olup sonuçlara göre 53 hasta 33 kontrol bireyin hepsinde S alleli homozigot normal (MM) olarak tespit edilirken 2 hasta ve 1 kontrol bireyinde Z alleli heterozigot (MZ) olarak tespit edilmiştir. Allellere özgün olarak tasarlanmış olan primerler kullanılarak yapılan ARMS-PCR sonuçlarına göre ise tüm hasta ve kontrol bireylerinde S alleli dizi analizi sonuçlarında olduğu gibi homozigot normal olarak tespit edilirken Z alleli tüm hasta ve kontrol bireylerinde heterozigot olarak tespit edilmiştir. Çalışmada dizi analiz sonuçları referans alındığından Z alleli sonuçlarının tüm optimizasyon çalışmalarına rağmen uyumsuz olmasından dolayı yeni primerler tasarlanmıştır. Bu primerlerle de tüm optimizasyon işlemlerine rağmen benzer şekilde dizi analiz sonuçları ile uyumsuz veriler elde edilmiştir.

Literatüre baktığımızda bu yöntemle yapılmış çok sayıda başarılı genotiplleme çalışması olduğu görülmektedir. Ahlawat vd., tarafından yapılan bir çalışmada keçilerde Fec genlerindeki mutasyonların genotiplenmesinde tetra-primer ARMS-PCR metodunu kullanılmıştır. Sonuçların dizi analizi ile tam uyumlu olduğu rapor edilen çalışmada ARMS-PCR'ın keçi Fec genlerindeki mutasyonların SNP genotiplemesi için hızlı, güvenilir ve uygun maliyetli bir yöntem olduğu kanısına varılmıştır (Ahlawat vd., 2014).

Lüleyap vd., Türk hastalarda fenilalanin hidroksilaz gen mutasyonlarının dizileme ve ARMS teknikleri ile incelenmesi çalışmasında tek baz mutasyonlarının ARMS tekniği kullanılarak daha ucuza, daha az teknik ekipmanla ve %100 doğrulukla tespit edildiği doğrulanmıştır (Lüleyap vd., 2016).

Huang vd., formalinle sabitlenmiş, parafine gömülmüş (FFPE) dokuda BRAF V600E mutasyonunu saptamak için ARMS-PCR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin sekanslamaya göre yüksek duyarlılığa sahip olduğu ve çeşitli biyobelirteç genlerinin nokta mutasyonlarının erken tespiti için uyarlanabileceğini kanısına varılmıştır (Huang vd., 2013).

Li vd., yabancı tip popülasyonların araştırılmasında moleküler düzeyde cinsiyet belirleme önemli bir bileşen olup kızıl pandalarda cinsiyetinin belirlenmesinde ARMS tekniğinin hızlı ve güvenilir bir teknik olduğu tespit edilmiştir (Li vd., 2011).

Vannucchi vd., Janus tirozin kinaz 2 (JAK2) genindeki bir nokta mutasyonu, kronik miyeloproliferatif bozuklukları (MPD) olan hastalarda tanımlanmış ve bu gendeki mutasyon için ARMS-PCR'ın güvenilir olduğu tespit edilmiştir (Vannucchi vd., 2006).

Dizi analizleri pahalı ve zaman alıcı bir yöntem olsa da genotiplleme çalışmalarında güvenilir sonuçlar üretmektedir. Daha ucuz ve kolay yollardan genotiplleme yapılabilmesi için kullanılan yöntemler de kendi içlerinde birtakım dezavantajlar barındırabilmektedir. Bu yöntemlerden biri olan ARMS-PCR ile yukarıda başarılı sonuçlar elde edilen çalışma örnekleri verilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise, S alleli için ARMS-PCR ile dizi analizi sonuçları uyumlu bulunmuş ancak Z alleli açısından uyumlu sonuçlar elde edilememiştir. Bu uyumsuzluğun nedenlerinin hem hedef allel bölgesi hem de tasarlanan primer dizileri kaynaklı

olabileceğini düşündürmektedir. Primerlerin değiştirilmesine rağmen sonuçlarda herhangi bir değişiklik tespit edilmemesi sorunun hedef bölge kaynaklı olabileceği kanaatini güçlendirmektedir. Sonuç olarak, bu çalışmada S alleli için ARMS-PCR yöntemi ile güvenilir bir genotipleme yapılabilmiş ancak Z alleli için yapılamamıştır.

4.1. Öneriler ve Kısıtlılık

Sorun hedef bölge kaynaklı ise bu tür bölgelerdeki sorunları giderebileceği düşünülen farklı PCR additivlerinin kullanımı veya daha fazla primer alternatifleri kullanılarak yapılacak optimizasyon çalışmaları sorunun çözümüne katkı sağlayabilir idi, ancak proje bütçesindeki sınırlılık bu tür çalışmaların yapılabilmesini kısıtlamıştır.



KAYNAKÇA

- Ahlawat, S., R. Sharma, A. Maitra, M. Roy and M. J. M. g. Tania (2014). "Designing, optimization and validation of tetra-primer ARMS PCR protocol for genotyping mutations in caprine *Fec* genes." 2: 439-449.
- Al-Jameil, N., A. A. Hassan, A. Buhairan, R. Hassanato, S. R. Isac, M. Al-Otaiby, B. Al-Maarik and I. J. M. Al-Ajeyan (2017). "Genotyping diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency in Saudi adults with liver cirrhosis." 96(6).
- Apte, A. and S. J. C. S. H. P. Daniel (2009). "PCR primer design." 2009(3): pdb. ip65.
- Asif, S., M. Khan, M. Arshad and M. Shabbir PCR Optimization for Beginners: A Step by Step Guide. Research in Molecular Medicine. 2021; 9 (2): 81-102.
- Bashir, A., N. N. Shah, Y. M. Hazari, M. Habib, S. Bashir, N. Hilal, M. Banday, S. Asrafuzzaman and K. M. J. R. M. Fazili (2016). "Novel variants of *SERPINA1* gene: interplay between alpha1-antitrypsin deficiency and chronic obstructive pulmonary disease." 117: 139-149.
- Bergin, D. A., K. Hurley, N. G. McElvaney and E. P. J. A. i. e. t. e. Reeves (2012). "Alpha-1 antitrypsin: a potent anti-inflammatory and potential novel therapeutic agent." 60: 81-97.
- Brantly, M., M. Campos, A. M. Davis, J. D'Armiento, K. Goodman, K. Hanna, M. O'Day, J. Queenan, R. Sandhaus and J. J. O. j. o. r. d. Stoller (2020). "Detection of alpha-1 antitrypsin deficiency: the past, present and future." 15(1): 1-10.
- Brantly, M., T. Nukiwa and R. G. J. T. A. j. o. m. Crystal (1988). "Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency." 84: 13-31.
- Camelier, A. A., D. H. Winter, J. R. Jardim, C. E. G. Barboza, A. Cukier and M. J. J. B. d. P. Miravittles (2008). "Alpha-1 antitrypsin deficiency: diagnosis and treatment." 34: 514-527.
- Dabbagh, K., G. J. Laurent, A. Shock, P. Leoni, J. Papakrivopoulou and R. C. J. J. o. c. p. Chambers (2001). "Alpha-1-antitrypsin stimulates fibroblast proliferation and procollagen production and activates classical MAP kinase signalling pathways." 186(1): 73-81.
- de Serres, F. J. and I. J. T. a. i. r. d. Blanco (2012). "Prevalence of α 1-antitrypsin deficiency alleles PI* S and PI* Z worldwide and effective screening for each of the five phenotypic classes PI* MS, PI* MZ, PI* SS, PI* SZ, and PI* ZZ: a comprehensive review." 6(5): 277-295.
- Denden, S., A. H. Khelil, J. Knani, R. Lakhdar, P. Perrin, G. Lefranc, J. B. J. G. Chibani and m. biology (2010). "Alpha-1 antitrypsin gene polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)." 33: 23-26.

- Dieffenbach, C., T. Lowe and G. J. P. m. a. Dveksler (1993). "General concepts for PCR primer design." 3(3): S30-S37.
- Duta-Cornescu, G., A. Simon-Gruita, N. Constantin, F. Stanciu, M. Dobre, D. Banica, R. Tuduce, P. Cristea and V. J. B. Stoian (2009). "A comparative study of ARMS-PCR and RFLP-PCR as methods for rapid SNP identification." 14(6): 4845-4850.
- Edwards, M. C. and R. A. J. G. R. Gibbs (1994). "Multiplex PCR: advantages, development, and applications." 3(4): S65-S75.
- Ehnert, S., C. Linnemann, B. Braun, J. Botsch, K. Leibiger, P. Hemmann, A. K. J. M. Nussler and protocols (2019). "One-step ARMS-PCR for the DETECTION of SNPs—Using the example of the PADI4 gene." 2(3): 63.
- Ferrarotti, I., T. P. Carroll, S. Ottaviani, A. M. Fra, G. O'Brien, K. Molloy, L. Corda, D. Medicina, D. R. Curran and N. G. J. O. J. o. R. D. McElvaney (2014). "Identification and characterisation of eight novel SERPINA1 Null mutations." 9: 1-9.
- Foil, K. E. J. T. A. i. C. D. (2021). "Variants of SERPINA1 and the increasing complexity of testing for alpha-1 antitrypsin deficiency." 12: 20406223211015954.
- Fregonese, L. and J. J. O. j. o. r. d. Stolk (2008). "Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences." 3(1): 1-9.
- Green, M. R. and J. J. C. S. H. P. Sambrook (2018). "The basic polymerase chain reaction (PCR)." 2018(5): pdb. prot095117.
- Greene, C. M., S. J. Marciniak, J. Teckman, I. Ferrarotti, M. L. Brantly, D. A. Lomas, J. K. Stoller and N. G. J. N. r. D. p. McElvaney (2016). " α 1-Antitrypsin deficiency." 2(1): 1-17.
- Hadzic, R., I. Nita, H. Tassidis, K. Riesbeck, A. G. Wingren and S. J. I. l. Janciauskiene (2006). " α 1-Antitrypsin inhibits Moraxella catarrhalis MID protein-induced tonsillar B cell proliferation and IL-6 release." 102(2): 141-147.
- Hillas, G., F. Perlikos, I. Tsiligianni and N. J. I. j. o. c. o. p. d. Tzanakis (2015). "Managing comorbidities in COPD." 95-109.
- Huang, T., J. Zhuge and W. W. J. B. r. Zhang (2013). "Sensitive detection of BRAF V600E mutation by amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR." 1(1): 1-6.
- Janciauskiene, S. J. B. E. B. A.-M. B. o. D. (2001). "Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles." 1535(3): 221-235.

- Janciauskiene, S. M., R. Bals, R. Koczulla, C. Vogelmeier, T. Köhnlein and T. J. R. m. Welte (2011). "The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease." 105(8): 1129-1139.
- Jonigk, D., M. Al-Omari, L. Maegel, M. Müller, N. Izykowski, J. Hong, K. Hong, S.-H. Kim, M. Dorsch and R. J. P. o. t. N. A. o. S. Mahadeva (2013). "Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of α 1-antitrypsin without inhibition of elastase." 110(37): 15007-15012.
- Joshi, M. and J. J. I. J. o. B. R. Deshpande (2010). "Polymerase chain reaction: methods, principles and application." 2(1): 81-97.
- Kalsheker, N. J. B. r. (1989). "Alpha1-antitrypsin: Structure, function and molecular biology of the gene." 9(2): 129-138.
- Karatas, E. and M. J. I. j. o. m. s. Bouche-careilh (2020). "Alpha 1-antitrypsin deficiency: a disorder of proteostasis-mediated protein folding and trafficking pathways." 21(4): 1493.
- Kelly, E., C. M. Greene, T. P. Carroll, N. G. McElvaney and S. J. J. R. M. C. O'Neill (2011). "Alpha-1 antitrypsin deficiency." 4(1): 1-8.
- Köhnlein, T. and T. J. T. A. j. o. m. Welte (2008). "Alpha-1 antitrypsin deficiency: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and treatment." 121(1): 3-9.
- Lee, J. and M. J. R. m. Brantly (2000). "Molecular mechanisms of alpha1-antitrypsin null alleles." 94: S7-S11.
- Li, Y., X. Xu, L. Zhang, Z. Zhang, F. Shen, W. Zhang and B. J. M. e. r. Yue (2011). "An ARMS-based technique for sex determination of Red Panda (*Ailurus fulgens*)." 11(2): 400-403.
- Little, S. J. C. p. i. h. g. (1995). "Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations." 7(1): 9.8. 1-9.8. 12.
- Lomas, D., D. Belorgey, M. Mallya, E. Miranda, K. Kinghorn, L. Sharp, R. Phillips, R. Page, A. Robertson and D. J. B. S. T. Crowther (2005). "Molecular mousetraps and the serpinopathies." 33(2): 321-330.
- Lomas, D. and H. J. T. Parfrey (2004). " α 1-Antitrypsin deficiency• 4: Molecular pathophysiology." 59(6): 529-535.
- Lomas, D. J. R. m. (2000). "Loop-sheet polymerization: the mechanism of alpha1-antitrypsin deficiency." 94: S3-S6.
- Loring, H. S. and T. R. J. E. o. o. b. t. Flotte (2015). "Current status of gene therapy for α -1 antitrypsin deficiency." 15(3): 329-336.

- Lüleyap, Ü., P. PAZARCI, G. Cömertpay, H. N. Önenli, A. PAZARBAŞI, D. Alptekin, H. Kasap and U. J. C. M. J. Froster "Türk hastalarda Fenilalanin Hidroksilaz gen mutasyonlarının dizileme ve ARMS teknikleri ile incelenmesi." 41(4): 702-708.
- MacNee, W. J. P. o. t. A. t. s. (2005). "Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease." 2(4): 258-266.
- Mannino, D. M. J. C. (2002). "COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity." 121(5): 121S-126S.
- Matamala, N., M. T. Martínez, B. Lara, L. Pérez, I. Vázquez, A. Jimenez, M. Barquín, I. Ferrarotti, I. Blanco and S. J. J. o. T. M. Janciauskiene (2015). "Alternative transcripts of the SERPINA1 gene in alpha-1 antitrypsin deficiency." 13(1): 1-11.
- McPherson, M. and S. Moller (2006). PCR. THE BASICS (Garland Science), Taylor & Francis, New York, NY.
- Medrano, R. F. V. and C. A. J. M. b. De Oliveira (2014). "Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development." 56(7): 599-608.
- Mesrian Tanha, H., M. Mojtabavi Naeini, S. Rahgozar, S. M. M. Rasa, S. J. G. t. Vallian and m. biomarkers (2015). "Modified tetra-primer ARMS PCR as a single-nucleotide polymorphism genotyping tool." 19(3): 156-161.
- Newton, C., A. Graham, L. Heptinstall, S. Powell, C. Summers, N. Kalsheker, J. Smith and A. J. N. a. r. Markham (1989). "Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)." 17(7): 2503-2516.
- Potempa, J. J. J. B. C. (1994). "The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation." 269: 15957-15960.
- Roux, K. H. J. C. S. H. P. (2009). "Optimization and troubleshooting in PCR." 2009(4): pdb. ip66.
- Saiki, R. K. (1989). The design and optimization of the PCR. PCR technology, Springer: 7-16.
- Sark, A. D., M. Fromme, B. Olejnicka, T. Welte, P. Strnad, S. Janciauskiene and J. J. B. Stolk (2022). "The relationship between plasma alpha-1-antitrypsin polymers and lung or liver function in ZZ alpha-1-antitrypsin-deficient patients." 12(3): 380.
- Saunders, D. N., E. A. Tindall, R. F. Shearer, J. Roberson, A. Decker, J. A. Wilson and V. M. J. P. O. Hayes (2012). "A novel SERPINA1 mutation causing serum alpha1-antitrypsin deficiency." 7(12): e51762.

- Seixas, S. and P. I. J. T. a. o. c. g. Marques (2021). "Known mutations at the cause of alpha-1 antitrypsin deficiency an updated overview of SERPINA1 variation spectrum." 14: 173.
- Silva, D., M. J. Oliveira, M. Guimaraes, R. Lima, S. Gomes and S. J. R. M. Seixas (2016). "Alpha-1-antitrypsin (SERPINA1) mutation spectrum: three novel variants and haplotype characterization of rare deficiency alleles identified in Portugal." 116: 8-18.
- Silverman, E. K., H. A. Chapman, J. M. Drazen, S. T. Weiss, B. Rosner, E. J. Campbell, W. J. O'DONNELL, J. J. Reilly, L. Ginns, S. J. A. j. o. r. Mentzer and c. c. medicine (1998). "Genetic epidemiology of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease: risk to relatives for airflow obstruction and chronic bronchitis." 157(6): 1770-1778.
- Soriano, J. B., S. J. Lucas, R. Jones, M. Miravittles, V. Carter, I. Small, D. Price and R. J. E. R. J. Mahadeva (2018). "Trends of testing for and diagnosis of α 1-antitrypsin deficiency in the UK: more testing is needed." 52(1).
- Stockley, R. A. J. C. i. c. m. (2014). "Alpha1-antitrypsin review." 35(1): 39-50.
- Stoller, J. K., L. S. J. A. j. o. r. Aboussouan and c. c. medicine (2012). "A review of α 1-antitrypsin deficiency." 185(3): 246-259.
- Stoller, J. K. and L. S. J. T. L. Aboussouan (2005). " α 1-antitrypsin deficiency." 365(9478): 2225-2236.
- Subramaniam, D., P. Glader, K. von Wachenfeldt, J. Burneckiene, T. Stevens, S. J. T. i. j. o. b. Janciauskiene and c. biology (2006). "C-36 peptide, a degradation product of α 1-antitrypsin, modulates human monocyte activation through LPS signaling pathways." 38(4): 563-575.
- Takei, N., M. Suzuki, H. Makita, S. Konno, K. Shimizu, H. Kimura, H. Kimura and M. J. I. j. o. c. o. p. d. Nishimura (2019). "Serum alpha-1 antitrypsin levels and the clinical course of chronic obstructive pulmonary disease." 14: 2885.
- Tsechkovski, M., V. Boulyjenkov and C. J. B. W. H. O. Heuck (1997). "A1-antitrypsin deficiency: Memorandum from a who meeting." 75(5): 397-415.
- Vannucchi, A., A. Pancrazzi, C. Bogani, E. Antonioli and P. J. L. Guglielmelli (2006). "A quantitative assay for JAK2V617F mutation in myeloproliferative disorders by ARMS-PCR and capillary electrophoresis." 20(6): 1055-1060.
- Wang, C., J. Zhou, J. Wang, S. Li, A. Fukunaga, J. Yodoi, H. J. S. t. Tian and t. therapy (2020). "Progress in the mechanism and targeted drug therapy for COPD." 5(1): 1-20.
- Wells, A. D., A. Woods, D. E. Hilleman, M. A. J. P. Malesker and Therapeutics (2019). "Alpha-1 antitrypsin replacement in patients with COPD." 44(7): 412.

White, T. J., N. Arnheim and H. A. J. T. i. g. Erlich (1989). "The polymerase chain reaction." 5: 185-189.

Zangenberg, G., R. Saiki and R. Reynolds (1999). Multiplex PCR: optimization guidelines. PCR applications, Elsevier: 73-94.



EKLER

EK-1. Bilimsel Araştırma İzni



T.C.
RİZE VALİLİĞİ
İl Sağlık Müdürlüğü



Sayı : E-64247179-799
Konu : Prof.Dr.Ali İrfan GÜZEL/Bilimsel
Araştırma İzni

MÜDÜRLÜK MAKAMINA

Prof.Dr.Ali İrfan GÜZEL, kurumumuza bağlı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde **"SERPINA 1 Geninde Alfa-1 Antitripsin Eksikliğine (A1ATD) Neden Olan Allellerin ARMS Tekniği ile Genotiplenmesi "** konulu çalışmasını yapmak üzere tarafına izin verilmesini talep etmektedir.

Çalışma planı "Bilimsel Araştırma Başvuru İnceleme Komisyonu" tarafından incelenmiş olup, çalışma süresince değişikliğe gidilmeden, sunulan hizmeti aksatmayacak şekilde, hasta mahremiyeti ve bilgi güvenliği hususlarında güvenlik tedbirleri alınarak çalışmanın yürütülmesi, yapılacak çalışma sonucunun Bakanlığımız bilgisi dışında ilan edilmemesi ve çalışma sonucu ile ilgili tarafımıza bilgi verilmesi kaydıyla kurumumuza bağlı ilgili sağlık tesisinde **01/12/2021-31/03/2022** tarihleri arasında yapılması uygun görülmüştür.

Olurlarınıza arz ederim.

Fatih TURAN
Dest.Hiz.Bşk. Yrd.

Uygun görüşle arz ederim.

.../.../2021

Dr.Hakan GÖRGÜLÜ
Dest. Hizm. Başkanı

O L U R

.../.../2021

Dr.Mustafa TEPE
İl Sağlık Müdürü

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ BAŞTARİPLİĞİNE

Bilgilerinizi ve yazınız ile ekte gönderilen protokol metninin ilgili kişiye tebliği hususunda gereğini rica ederim.

EKLER:

Protokol (2 Sayfa)

Dr.Mustafa TEPE
İl Sağlık Müdürü

Bu belge, güvenli elektronik imza ile onaylanmıştır.

Bilgi: Protokol No: 374594-2021-1276-MHİ-İl Sağlık Müdürlüğü - Bilgi: Protokol No: 374594-2021-1276-MHİ-İl Sağlık Müdürlüğü
Paşakaya Mahallesi Zübeyde Hanım Cad. Sağlık Kompleksi Kat:4 Rize Merkez

Telefon: Faks No: 04642130364

e-Posta: ozgur.senturk@saglik.gov.tr İnternet Adresi:
<http://www.rizeagitim@saglik.gov.tr>

Bilgi için: Esra Nur ŞENTÜRK

EHE

Telefon No: (0 464) 213 03 57



ETİK KURUL KARARI



**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı



Sayı : E-40465587-050.01.04-290
Konu : Etik Kurul

27.12.2021

Sayın Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "SERPINA1 Genide Alfa-1 Antitripsin Eksikliğine (A1AATD) Neden Olan Allellerin ARMS Tekniği İle Genotiplenmesi" isimli başvurunuz etik kurulumuz yönergesine göre 23.12.2021 tarihinde yapmış olduğu toplantıda incelenmiş olup, 2021/222 karar numarası ile bilimsel ve etik yönden uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla rica ederim.

Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU
Başkan

Bu belge güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : 6333acbb6693

Belge Takip Adresi: <http://ehys.erdogan.edu.tr/EBYS/cim/zadogrulama>

Fener Mah. Zihni Derin Yerleşkesi 53100 Rize / TÜRKİYE
Telefon No :+90 (464) 223 61 26 Faks No :+90 (464) 223 53 76
e-Posta : Internet.Adresi:http://www.erdogan.edu.tr/
Kep Adresi:

Bilgi için : BURAK HANKAYA

