

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KRONİK OBSTRÜKTİF AKCİĞER HASTALARINDA
ALFA – 1 ANTİTİRİPSİN GENİNE İLİŞKİN GENOTİPLEME ÇALIŞMASI**

Arş. Grv. Zafer SÖYLEMEZ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa SOLAK**

Tez No:

2006 - AFYONKARAHİSAR

| | |
|--|------|
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ | i |
| ÖNSÖZ | ii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | iii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | v |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | vi |
| ÖZET | vii |
| SUMMARY | viii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 2 |
| 2.1 Alfa 1 Antitripsin Geni ve Alfa 1 Antitripsin Proteini | 2 |
| 2.2. Alfa 1 Antitripsin Geni Mutasyonları | 8 |
| 2.3 En sık rastlanan AAT Geni Allelleri, Dağılımı ve Sonuçları | 10 |
| 2.4. Kronik Obstüriktif Akciğer Hastalığı (KOA) | 13 |
| 2.5. AAT'nin KOA'taki Önemi | 14 |
| 3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER | 15 |
| 3.1. GEREÇLER | 15 |
| 3.1.1. Kan Örneklerinin Elde Edilmesi | 15 |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler | 15 |
| 3.1.3. Kullanılan Cihazlar | 16 |
| 3.2. YÖNTEMLER | 16 |
| 3.2.1. DNA Ekstraksiyonu | 17 |
| 3.2.2. Genotipleme İçin Kullanılan Çalışma Yöntemi Akış Şeması ... | 19 |
| 3.2.2.1. DNA amplifikasyonu | 19 |
| 3.2.2.2. Post amplifikasyon | 19 |
| 3.2.2.3. Primer uzatma | 20 |
| 3.2.2.4. ELISA İşlemleri | 21 |
| 3.2.3. Sonuçların analizi | 22 |
| 4. BULGULAR | 23 |
| 5. TARTIŞMA | 30 |
| 6. SONUÇ | 32 |
| 7. KAYNAKLAR | 33 |

ÖNSÖZ

Çalışmamın gerçekleşmesinde sağladığı olanakların yanı sıra her aşamada değerli desteğini esirgemeyen ve yetişmemde kıymetli bilgileri ile bulunduğu katkılar, gösterdiği yakın ilgi ve yardımlarından dolayı değerli hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa SOLAK'a, tezimin deneysel aşamasındaki desteğinden dolayı değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hale ŞAMLI'ya, tezimin yazım aşamalarındaki destek ve katkılarından dolayı değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat TOSUN'a, tezimin yazım ve sunum aşamalarındaki tüm desteği için Arş. Grv. S. Handan YILDIZ'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca tüm desteği ve yardımlarından dolayı Sayın hocam Doç. Dr. Yüksel ARIKAN'a ve canım annem Aysel SÖYLEMEZ ve canım babam Ahmet SÖYLEMEZ'e teşekkürü borç bilirim. .

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-------|--------------------------------------|
| KOAH | Kronik Obstüriktif Akciğer Hastalığı |
| del | Delesyon |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| ELİSA | Enzim linked immuno sorbent assay |
| EDTA | Etilendiamintetraasetik asit |
| kb | Kilobaz |
| µl | Mikrolitre |
| mut | Mutasyon |
| PCR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| rpm | Revolution per minute |
| TMB | 3,3',5,5' - Tetra Metil Benzidin |
| TBE | Tris borat EDTA |
| wt | Yabanıl tip (wild type) |
| HRP | Horse Radish Peroksidaz |
| Rpm | Revolution per minute |
| Ala | Alanin |
| Arg | Arjinin |
| Asn | Asparajin |
| Cys | Sistein |
| Arg | Arjinin |
| Leu | Lösin |
| Pro | Prolin |
| Ser | Serin |

| | |
|-----|---------------|
| Phe | Fenilalanin |
| Gly | Glisin |
| Glu | Glutamik asit |
| Thr | Threonin |
| Ile | İzolösin |
| Met | Metionin |
| Asp | Aspartik asit |
| His | Histidin |
| Lys | Lizin |
| Gln | Glutamin |
| Val | Valin |
| Trp | Triptofan |
| Tyr | Tirozin |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1. Kromozom ve AAT geninin lokalizasyonu | 3 |
| Şekil 2. Alfa 1 antitripsin geni baz dizisi | 6 |
| Şekil 3. AAT geninin transkripsiyon nükleotid dizilimi | 7 |
| Şekil 4. En sık rastlanana AAT alellerinin diğer kuşaklara dağılımı ve risk değerlendirmesi | 11 |
| Şekil 5. Sonuçların ELISA ile değerlendirilmesi | 23 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 1.1 En sık görülen Alfa 1 antitripsin geni mutasyonlarının ekson, lokalizasyonu, kodon değişimi ve değişen amino asit (a.a) dağılımı | 9 |
| Çizelge 4.1 Çalışmamızda yer alan olgulara ilişkin veriler | 28 |

ÖZET

Alfa 1 antitripsin geni 14. kromozomun uzun kolunda (14q32.1) yer almakta olup, 5 ekzon ve 4 introndan oluşur. 12301 bç uzunluğunda olan Alfa 1 antitripsin geni karaciğerde eksprese olur ve 394 aa'lık tek bir polipeptit zincirinden oluşan, 52kDa bir glikoprotein olan Alfa 1 antitripsin proteinini kodlar. Bu araştırmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Polikliniği ile Afyonkarahisar Göğüs Hastalıkları Hastanesi'nde KOAH tanısı alan ve Anabilim Dalımız Tıbbi Genetik Laboratuvarına refere edilen toplam 40 erkek olguda PCR-ELISA yöntemi kullanılarak AAT geninde yaygın olarak gözlenen S,Z ve M alellere ait genotipleme çalışması yapıldı. Çalışılan 40 olgunun tümünde PiM / PiM genotipi saptandı. Veriler literatür ışığında değerlendirildi. Bölgesel olgulara ilişkin mutasyon değerlendirilmesi için daha geniş olgu serisinin çalışılması gerektiği kanısına varıldı.

SUMMARY

Alpha 1 antitrypsin gene locates in long arm of the 14th chromosome (14q32.1) and constructed by 5 exon and 4 intron. α_1 antitrypsin gene which is 12301 base pair long is expressed in liver and codes α_1 antitrypsin protein which is a 52 kDa molecular weight glycoprotein and single polypeptide chain containing 394 amino acids. In this study, 40 male patient' blood samples which have chronic obstructive pulmonary disease, referred from Afyonkarahisar Kocatepe University Faculty of Medicine Department of Respiratory Disease and Afyonkarahisar Respiratory Disease Hospital to our department were studied. S, Z and M allele genotype were analyzed with PCR-ELISA method. All of patients had PiMM genotype.

Data collected from study and literature were combined and interpreted. This study shows that regional mutation analyses needs to be widespread data collection.

1. GİRİŞ:

Alfa 1 antitripsin (AAT) 52 kDa ağırlığında ve karaciğerde üretilen salgısal bir glikoproteindir. Alfa 1 antitripsin Serin Proteaz İnhibitör Üst Ailesinin (SERPIN) prototipik bir üyesi olup akut faz proteinleri içinde yer alır ve serin proteazların dolaşım ve dokudaki başlıca inhibitörüdür ¹.

Alfa 1 antitripsin geni, serpin peptidaz inhibitör, alpha 1 antiproteinaz, antitripsin geni olarak da isimlendirilir. Bu isimlerin yanında A1A, A1AT, A1AT_HUMAN, alfa-1 antitripsin, PI, PI1 olarak da tanımlanmaktadır. AAT 14. kromozomun uzun kolu üzerindeki bir gen tarafından kodlanır. AAT geninin lokalizasyonu **14q32.1** şeklindedir. AAT geninin pek çok varyantı bulunmaktadır. En sık görülen iki varyant, nokta mutasyon tarzında olan **S** ve **Z** varyantlarıdır.

AAT'nin önemi, eksikliği durumunda ortaya çıkan akciğer amfizemi ve diğer kronik enflamatuvar durumlar sonucu ortaya çıkmıştır ².

AAT nin bir serin proteaz inhibitorü olma yanında değişik özellikleri de mevcuttur. Bu özellikler daha çok AAT mutasyonları sonucunda ortaya çıkan klinik tablolarla ortaya konmuştur. Örneğin, PiZ mutasyonu hem hepatosit ³ hemde akciğerlerde ⁴ protein yapımı ve beraberinde bunların polimerizasyonuna neden olur. Bu polimerize AAT proenflamatuvar olup fagositik hücreler için kemoatraktan rol oynayabilir. Ayrıca AAT oksidatif inaktivasyonu bu antiproteazın lokal düzenlenmesinde önemli rol oynar⁴.

AAT'nin ana fonksiyonu dokuları nötrofil elastaz enzimine karşı korumaktır. AAT'nin akciğeri proteolitik ataklara karşı korumadaki yetersizliği sonucu; panlobular amfizem, astım, bronşektazi ve Wegener granülomatoz'u gibi hastalıklar ortaya çıkmaktadır^{1,5}.

α_1 -antitripsinin en yaygın görülen formları, nokta mutasyonları sonucu oluşan S ve Z varyantlarıdır. S ve Z varyantlarının heterozigot ve / veya homozigot düzeyde varlığı serumda farklı düzeylerde α_1 -antitripsin varlığı ile sonuçlanmaktadır. Bu farklılık pek çok çeşitli hastalık için predispozisyon oluşturmaktadır⁵.

Bu araştırmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Polikliniği'nde ve Göğüs Hastalıkları Hastanesi'nde KOAH tanısı alan ve Anabilim Dalımız Tıbbi Genetik Laboratuvarına refere edilen olguların α_1 -antitripsin genine ait M, S ve Z alelleri açısından genotiplenmesi öngörülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

Alfa 1 antitripsin geninin en çok kullanılan adı serpin peptidase inhibitör clade A (alpha 1 antiproteinaz, antitripsin)'dır. Bu ismin yanı sıra değişik isimlerle de adlandırılır. Bu isimler; A1A, A1AT, A1AT_HUMAN, alpha-1 antitripsin, PI, PI1 olarak ifade edilmektedir. 14. kromozomun uzun kolunun 32.1 bölgesinde yer alan *AAT* geni 12301 baz çifti uzunluğunda olup, 5 ekzon ve 4 introndan oluşur⁶.

Kalıtsal hastalıklar içinde en sık gözlenenlerden birisi olan *AAT* eksikliği; karaciğer hastalığı (yükselmiş karaciğer enzimleri, neonatal hepatit, kronik karaciğer hastalığı, siroz ve karaciğer kanseri), akciğer hastalığı (astım, kronik bronşit, amfizem, KOAH ve bronşiektazi) ve cilt hastalıkları (panniculitis) ile kendini gösterir. *AAT* eksikliğinin, 14. kromozom üzerinde bulunan proteaz inhibitör (Pi) genindeki mutasyonlardan kaynaklandığı gösterilmiştir⁵.

KOAH gelişiminde en önemli risk faktörleri sigara kullanımı, meslek nedenlerle maruz kalınan etkiler ve *AAT* eksikliğidir. KOAH'ın, bireysel genetik duyarlılık ile olumsuz çevre faktörlerinin karşılıklı etkileşimi sonucu geliştiği bildirilmektedir^{7,8}.

2.1 Alfa 1 Antitripsin Geni ve Alfa 1 Antitripsin Proteini

Alfa 1 antitripsin geni 14. kromozomun uzun kolunda (14q32.1) yer almakta olup, 5 ekzon ve 4 introndan oluşur. 12301 bç uzunluğunda olan Alfa 1 antitripsin geni karaciğerde eksprese olur ve 394 aa'lık tek bir polipeptit zincirinden oluşan, 52kDa bir glikoprotein olan Alfa 1 antitripsin proteinini kodlar⁹ (Şekil 1).



Şekil 1. 14. Kromozom ve AAT geninin lokalizasyonu

AAT geni 14. kromozom üzerinde serpin ailesinin proksimalinde, diğer antiproteaz genlerin (alfa 1-antikimotripsin, kortikosteroid-binding globulin ve protein C inhibitörü genleri) uç noktasında yerleşmiştir⁹.

```

1 tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcaactgc tccacgcagc aaccctcaga
61 gtcttgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaagge ctagccgctg
121 ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc
181 tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggtg
241 gacattgctg ctgctgctca ctcaagtcca cagggtgggag ggacagcagg gcttagagtg
301 ggggtcattg tgcagatggg aaaacaaagg cccagagagg ggaagaaatg cccaggagct
361 accgagggca ggcgacctca accacagccc agtgctggag ctgtgagtgg atgtagagca
421 gcggaatata cattcagcca gctcagggga aggacagggg ccctgaagcc aggggatgga
481 gctgcaggga agggagctca gagagaaggg gaggggagtc tgagctcagt ttcccgtcgc
541 ctgaaaggag ggtggtacct actcccttca cagggttaact gaatgagaga ctgctggag
601 gaaagctctt caagtgtggc ccacccacc ccagtgacac cagccctga cacgggggag
661 ggagggcagc atcaggaggg gctttctggg cacacccagt acccgtctct gagctttcct
721 tgaactgttg ctttttaatc ctcacagcag ctcaacaagg tacataccgt caccatcccc
781 attttacaga tagggaaatt gaggtcggga gcggttaaac aactcacctg aggcctcaca
841 gccagtaagt gggttccctg gtctgaatgt gtgtgctgga ggatcctgtg ggtcactcgc
901 ctggtagagc cccaaggtgg aggcataaat gggactggtg aatgacagaa ggggcaaaaa
961 tgcaactcgc cattcactct gcaagtatct acggcacgta cgccagctcc caagcaggtt
1021 tgccgggttc acagcgggag atgcaatctg atttaggctt ttaaagggat tgcaatcaag
1081 tggggcccca ctagcctcaa ccctgtacct cccctcccct ccaccccag cagtctccaa
1141 aggcctccaa caaccccaga gtgggggcca tgtatccaaa gaaactccaa gctgtatagc
1201 gatcacactg gttttccagg agcaaaaaa gaaacaggcc tgaggctggt caaaattgaa
1261 cctcctcctg ctctgagcag cctggggggc agactaagca gagggtgtg cagaccaca
1321 taaagagcct actgtgtgcc aggcacttca cccgaggcac ttcacaagca tgcttgggaa
1381 tgaacttcc aactcttgg gatgcaggtg aaacagttcc tggttcagag aggtgaagcg
1441 gcctgcctga ggcagcacag ctcttcttta cagatgtgct tccccacctc taccctgtct
1501 cacggccccc catgccagcc tgacggtgtg gtctgcctca gtcagctcc attttccat
1561 cgggaccatc aagaggtgt ttgtgtctaa ggctgactgg gtaactttgg atgagcggtc
1621 tctccgctct gagcctgttt cctcatctgt caaatgggct ctaacccact ctgatctccc
1681 agggcggcag taagtcttca gcatcaggca ttttggggtg actcagtaaa tggtagatct

```

1741 tgctaccagt ggaacagcca ctaaggatct tgcagtgaga gcagagggcc agctaagtgg
 1801 tactctccca gagactgtct gactcacgcc acccctcca ccttggacac aggacgtgt
 1861 ggtttctgag ccaggtacaa tgactccttt cggtaagtgc agtggagct gtacactgcc
 1921 caggcaaagc gtccgggagc cgtaggcggg cgactcagat cccagccagt ggacttagcc
 1981 cctgtttgct cctccgataa ctggggtagc cttggtaat attcaccagc agcctcccc
 2041 gttgccctc tggatccact gcttaaatac ggacgaggac agggcctgt ctctcagct
 2101 tcaggcacca ccactgacct gggacagtga atcgtaagta tgcctttcac tgcgagaggt
 2161 tctggagagg cttctgagct ccccatggcc caggcaggca gcaggtctgg ggcaggagg
 2221 gggttgtgga gtgggtatcc gcctgctgag gtgcagggca gatggagagg ctgcagctga
 2281 gctcctattt tcataataac agcagccatg agggttgtgt cctgtttccc agtctgccc
 2341 ggtccccct cggtaacctc tgggtgatac actggttctc gtaagcagaa gtggatgagg
 2401 ggtctaggt ctgcacctc ggcaccacac gatgggggac accagccaag atacagcaac
 2461 agcaacaaag cgcagccatt tctttctggt tgcacagctc ctctgtctgt cgggggctcc
 2521 tgtctgttgt ctctataag cctcaccacc tctcctactg cttgggcatg catctttctc
 2581 cccttctata gatgaggagg ttaaggtcca gagaggggtg gggaggaacg cggctcaca
 2641 ttctccatcc cctccagata tgaccaggaa cagacctgtg ccaggcctca gccttacctc
 2701 aaaatgggccc tccccatgca ccgtggacct ctgggcctc ctgtcccagt ggaggacagg
 2761 aagctgtgag gggcactgtc acccagggtc caagctggca ttcctgaata atcgctctgc
 2821 accaggccac ggctaagctc agtgcctgat taagcctcat aacctccaa ggcagtact
 2881 agtgtgattc ccattttaca gatgaggaag atggggacag agaggtaaat aactggcccc
 2941 aatcacaca ccattccataa ttcgggctca ggcacctggc tccagtcccc aaactcttga
 3001 acctggcctc agtgtcactg tttctcttgg gtctcaggcg ctggatgggg aacaggaaac
 3061 ctgggctgga cttgaggcct ctctgatgct cggtgacttc agacagtgc tcaacctctc
 3121 tgttctcttg ggcaaaacat gataaccttt gacttctgtc ccctcccctc accccaccgg
 3181 acctgatct ctgaagtgtt ggaaggattt aatttttctc gcaactgagt ttggagacag
 3241 gtcaaaaaga tgaccaaggc caaggtggcc agtttctat agaacgctc taaaagacct
 3301 gcagcaatag cagcaagaac tggatttctc gagaacttgc tgcgcagcag gcacttcttg
 3361 gcattttatg tgtatttaac ttcacaatag ctctatgaca aagtccacct ttctcatctc
 3421 caggaaactg aggttcagag aggttaagta acttgtccaa ggtcacacag ctaatagcaa
 3481 gttgacgtgg agcaatctgg cctcagagcc ttttaattta gccacagact gatgtcccc
 3541 tcttcattta gccaggctgc ctctgaagtt ttctgattca agacttctgg cttagcttt
 3601 gtacacagag atgattcaat gtcaggtttt ggagtgaaat ctgtttaatc ccagacaaa
 3661 ctttaggat tacatctcag ttttgaagc aagtagctct gtgattttta gtgagtatt
 3721 taatgctctt tggggctcaa ttttctatc tataaaatag ggctaataat ttgcacctta
 3781 tagggtaagc tttgaggaca gattagatga tacgggtgct gtaaaacc accggttagt
 3841 aagtgtggca atgatggtga cgctgaggct gatgtttgct tagcataggg ttaggcagct
 3901 ggcaggcagc aaacagttgg ataatttaac ggaatattg ccaaactcag atgctgttca
 3961 ctgctgagca ggagcccctt cctgctgaaa tggctctggg gactgagca ggcctccgg
 4021 gaagaaatct accatctctc gggcaggagc tcaacctgtg tgcagttaca gggaggtctt
 4081 cctcacctgg tgcccactca tgcattacgt cagttattcc tcatccctgt ccaaaggatt
 4141 cttttctcca ttgtacagct atgaagctag tgctcaaaga agtgaagtca tttaccaccag
 4201 gccccctgcc agtaagtgac agggcctggt cacactggg tttatttatt gccagttca
 4261 acaggttggt tgaccatagg cgagattctc ttcccctgac cctgcccggg tgctcttgg
 4321 cccttatttt atgctcccgg gtagaatagg tgtgagatta ggcaggaggt ggctcgcttc
 4381 cctgtccctg gccccgcaaa gactgtctcc acctgcccg atcccagaaa gttcaccatg
 4441 aagccttcat tcttttggtt taaagcttgg cctcagtgtc cgtacacat ggggtacttg
 4501 gccagatggc gactttctcc tctccagtgc ccctcccagg cactagcttt taggagtgca
 4561 ggggtgctgcc tctgatagaa gggccaggag agagcaggtt ttggagctct gatgtataa
 4621 ggaacagctt gggaggcata atgaaccaca catgatgctt gagaccaatg tcacagcca
 4681 attctgacat tcatcatctg agatctgagg acacagctgt ctcagttcat gatctgagt
 4741 ctgggaaagc caagacttgt tccagcttgg tcaactgact gctgtatagc ctcaacaagg
 4801 cctgaccct ctctggcctt caaactctc actgtgaaag gaggaaacca gagttagtga
 4861 tgtgacacca ggaaagatgg atgggtgtgg gggaaatgtc tcctcccagc tgtaccccc
 4921 tgcaccctc ccctgcacca gcctctccac ctctttgag ccagaaattc ccctgtctag
 4981 gagggcacct gtctcatgcc tagccatggg aattctccat ctgttttgct acattgaacc
 5041 cagatgccat tctaaccaag aatcctggct ggggtgaggg gctctcgcct gtaaccaccag
 5101 cactttggga ggccaaggca ggcggatcaa gaggctcagga gttcaagacc tgcctggcca
 5161 acacggtgaa acctcagctc tactaaaata acaaaaatta gccaggcgtg gttgcacacg
 5221 cctgtaatcc cagctatttg ggaagctgag acagaagaat ttcttgaacc cgggaggtgg
 5281 aggtttcagt gagccgagat cacgccactg cactccacc tggcagataa agcgagactc
 5341 tgtctcaaaa aaaacccaaa aacctatggt agtgtacaga gggcccagc gaagtcttct
 5401 cccagcccca ctttgcaaaa ctggggagag tgaggcccca ggaccagagg attcttgcta
 5461 aaggccaagt ggatagtgat ggccctgcca gggctagaag ccacaacctc tggccctgag
 5521 gccactcagc atatttagtg tccccacctc gcagagggcc aactccctcc tgaccactga
 5581 gccctgtaat gatgggggaa tttccataag ccatgaagga ctgcacaaa ttcagttggg

5641 aagtgaaaga gaaattaaag ggagatggaa atatacagca ctaatttttag caccgtcttt
5701 agttctaaca aactagcta gctgaagaaa aatacaaaaca tgtattatgt aatgtgtggt
5761 ctgttcatt tggattactt agaggcacga gggccaggag aaagtggtg gagagaaacc
5821 agctttgcac ttcatttgtt gctttattgg aaggaaactt ttaaaagtc aagggggtg
5881 aagaatctca atatttgta tttccagctt ttttctcca gttttcatt tcccaaatc
5941 aaggacacct ttttcttgt attttctaa gatgatggtt ttggtttgt gactagtagt
6001 taacaatgtg gctgcccggc atattctct cagctaggac ctgagttttc ccatctgtga
6061 agacggcagg ttctacctag ggggctgcag gctgggtggtc cgaagcctgg gcatactgg
6121 agtagaagga tcactgtggg gcagggcagg ttctgtgttg ctgtggatga cgttgacttt
6181 gaccattgct cggcagagcc tgctctcgct ggttcagcca caggcccccac cactccctat
6241 tgtctcagcc cggggtatga aacatgtatt cctcactggc ctatcacctg aagcctttga
6301 atttgcaaca cctgcccaacc cctccctcaa aagagtggcc ctctcagatc gtgttgatgt
6361 aagggttggg gttgagactt atttcactaa attctcatac ataaacatca ctttatgtat
6421 gaggcaaaat gaggaccagg gagatgaatg acttgtcctg gctcatacac ctggaaagtg
6481 acagagttag attagatccc aggtctatct gaagttaaaa gaggtgtctt ttcacttccc
6541 acctcctcca tctactttaa agcagcaca acccctgctt tcaaggagag atgagcgtct
6601 ctaaagccc tgacagcaag agcccagaac tgggacacca ttagtgacc agacggcagg
6661 taagctgact gcaggagcat cagcctattc ttgtgtctgg gaccacagag cattgtgggg
6721 ctgacccctg ctcttgggaa aaaaacctca agggctgagg atccttgtga gtgtgggtg
6781 ggaacagctc ccaggaggtt taatcacagc ccctccatgc tctctagctg ttgccattgt
6841 gcaagatgca tttcccttct gtgcagcagt ttccctggcc actaaatagt gggattagat
6901 agaagcctc caagggctt cagcttgaca tgattcttga ttctgatctg gcccgattcc
6961 tggataatcg tgggcaggcc cattcctctt cttgtgcctc attttcttct tttgtaaac
7021 aatggctgta ccatttgcatt cttagggta ttgcagatgt aagtgttgtg gtccagagcc
7081 tgggtgcagg acctagatgt aggattctgg ttctgtact tctcagtgga cattgaatag
7141 ctgacctaat ctctctgct ttggttctt catctgtaaa agaaggatat tagcattagc
7201 acctcacggg attgttacia gaaagcaatg aattaacaca tgtgagcacg gagaacagtg
7261 cttggcatat ggtaagcact acgtacattt tgctattctt ctgattcttt cagtgtact
7321 gatgtcggca agtacttggc acaggctggt ttaataatcc ctaggcactt ccactggtg
7381 tcaatcctg atcactggga gtcactatgt gccttgactc ggggctggc cccccatct
7441 ctgtcttga ggacaatgcc gtcttctgtc tctgtgggca tctcctgctg ggcaggcctg
7501 tggctcctgg tccctgtctc cctggctgag gatcccagg gatcctgctg ccagaagaca
7561 gatacatccc accatgatca ggatcaccca acctcaaca agatcacccc caactggct
7621 gagttcgcct tcagcctata ccgcccagctg gcacaccagt ccaacagcac caatatctc
7681 ttctcccag tgagcatcgc tacagcctt gcaatgtctt ccctggggac caaggtgac
7741 actcacgatg aaatcctgga gggcctgaat ttcaacctca cggagatcc ggaggctcag
7801 atccatgaag gcttccagga actcctcctg acctcaacc agccagacag ccagctccag
7861 ctgaccaccg gcaatggcct gttcctcagc gagggctga agctagtga taagttttg
7921 ggaatgta aaaagtgtta ccaactgaaa gccttcactg tcaactcgg ggacacgaa
7981 gaggccaaga aacagatcaa cgattacgtg gagaagggtg ctcaagggaa aattgtggat
8041 ttggtcaagg agcttgacag agacacagtt tttgctctgg tgaattacat cttctttaa
8101 ggtaaggtg ctcaaccagc ctgagctggt cccatagaaa caagcaaaa tattctcaa
8161 ccatcagttc ttgaactctc cttggcaatg cattatgggc catagcaatg ctttccagc
8221 tggattcttc agttttctac acacaaacac taaaatgttt tccatcattg agtaattga
8281 ggaataata gattaactg tcaaaactac tgacagctct gcagacattt tcagagcctt
8341 taatgtcctt gtgtatactg tataatgtaga atataaatg cttagaacta tagaacaat
8401 tgtaatacac tgcataaagg gatagtttca tggaaacatac tttacacgac tctagtgtcc
8461 cagaatcagt atcagttttg caatctgaaa gacctgggtt caaatcctgc ctctaacaca
8521 attagctttt gacaaaaaca atgcatctca cctcttgag gtgctaattt ctcatcttag
8581 catggacaaa ataccattct tgctgtcagg ttttttagg attaacaaa tgacaaagac
8641 tgtgggatg gtgtgtggca tacagcagg gatggactct cctgtatctc aggtgcctt
8701 cctgccctg aggggttaaa atgccagggt cctggggccc ccaggcatt ctaagccagc
8761 tcccactgtc ccaggaaaac agcatagggg aggggaggtg ggaggcaagg ccaggggctg
8821 cttcctccac tctgaggctc cttgctctt gaggcaagg agggcagtg agagcagcca
8881 ggctgcagtc agcacagcta aagtcctggc tctgctgtgg ccttagtggg ggcccaggtc
8941 cctctccagc cccagctctc tctctctgtc caatgagaaa gctgggatca ggggtcctg
9001 aggccctgt ccactctgca tgcctcgatg gtgaagctct gttggtatgg cagaggggag
9061 gctgctcagg catctgcatt tcccgtcca atctagagga tgaggaagc tctcaggaat
9121 agtaagcaga atgtttgccc tggatgaaata actgagctgc caattacaa gggcaggga
9181 gccttagaca gaaggtacca aatatgcctg atgctccaac attttatttg taatatcaa
9241 gacaccctca aataaacata tgattccaat aaaaatgcac agccacgatg gcactctta
9301 gcctgacatc gccacgatgt agaaatctg catcttctc tagtttgaa ttatcccac
9361 acaatctttt tggcagctt ggatggtcag tttcagcacc ttttacagat gatgaagctg
9421 agcctcagag gatgtgtgtc gtcaagggg ctcagggtt ctcaggaggg gactcatgg
9481 tttctttatt ctgtacact cttccaaacc ttcactcacc cctgggtgatg cccacttcc

```

9541 cctctctcca ggcaaatggg agagaccctt tgaagtcaag gacaccgagg aagaggactt
9601 ccacgtggac caggtgacca ccgtgaaggt gcctatgatg aagcgttttag gcatgtttaa
9661 catccagcac tgtaagaagc tgtccagctg ggtgctgctg atgaaatacc tgggcaatgc
9721 caccgccatc ttcttctctg ctgatgaggg gaaactacag cacctggaaa atgaactcac
9781 ccacgatatc atcaccaagt tcctggaaaa tgaagacaga aggtgatccc ccaacctgag
9841 ggtgaccaag aagctgcccc cacctcttag ccatgttggg actgaggccc atcaggactg
9901 gccagagggc tgaggagggg gaacccccaca tccctgggtc actgctactc tgtataaact
9961 tggcttccag aatgaggcca ccactgagtt caggcagcgc catccatgct ccatgaggag
10021 gacagtaccg aggggtgagg aggtaaaggt ctcgtccctg gggacttccc actccagtgt
10081 ggacactgtc ccttcccaat atccagtgcc cagggcaggg acagcagcac caccacacgt
10141 tctggcagaa ccaaaaaagga acagatgggc ttcttggcaa aggcagcagt ggagtgtgga
10201 gttcaagggg agaatgtccc tggggggagc ggggaaagag ctgtgtggca aggccagaa
10261 aagcaagggt cgggaattgga acagccagcg catgttcgca gaaggttgc gtttctctgt
10321 cactttatcg gtgctgttag attgggtgtc ctgtagtaag tgatacttaa acatgagcca
10381 cacattagtg tatgtgtgtg cattcgtgat tatgccatg ccctgctgat ctagtctgtt
10441 ttgtactactg taaaaccaag atgaaaatac aaaaggtgtc gggttcataa taggaatcga
10501 ggctggaatt tctctgttcc atgccagcac ctcctgaggt ctctgctcca ggggttga
10561 aagaacaaag aggctgagag ggtaacggat cagagagccc agagccaagc tgcccgtca
10621 caccagaccg tgctcagggg ggcattgtct ccccatggaa aaccagagag gagcactcag
10681 cctggtgtgg tcactcttct cttatccact aaacggttgt cactgggcac tgccaccagc
10741 cccgtgttct tctgggtgta gggccctggg gatgttacag gctgggggccc aggtgaccca
10801 aactacaggg gcaagatgag acaggcttcc aggcaccta gaatatcaga ggaggtggca
10861 tttcaagctt ttgtgattca ttcgatgta acattctttg actcaatgta gaagagctaa
10921 aagtagaaca aaccaagcc gagttcccat cttagtgtgg gtggaggaca caggagtaag
10981 tggcagaaat aatcagaaaa gaaaacactt gcactgtggt ggggtcccaga agaacaagag
11041 gaatgctgtg ccatgccttg aatttctttt ctgcacgaca ggtctgcag cttacattta
11101 cccaaactgt ccattactgg aacctatgat ctgaagagcg tcctgggtca actgggcatc
11161 actaaggtct tcagcaatgg ggctgacctc tccgggtca cagaggaggc acccctgaag
11221 ctctccaagg tgagatcacc ctgacgacct tgttgacccc tggatctgt agggaagaat
11281 gtgtgggggc tgcagctctg tcctgaggct gaggaagggg ccgagggaaa caaatgaaga
11341 cccaggctga gctcctgaag atgccctgta ttcactgaca cgggactggg tcaaacagca
11401 aagccaggca ggggactgct gtgcagctgg cactttcggg gctcccttg aggtgtgtc
11461 actgacctg aatttcaact ttgcccaaga cttctagac attgggcctt gatttatcca
11521 tactgacaca gaaaggtttg ggctaagttg tttcaaagga atttctgact cttctgatct
11581 gtgagatttg gtgtctgaat taatgaatga tttcagctaa agatgacact tattttggaa
11641 aactaaaggc gaccaatgaa caactgcagt tccatgaatg gctgcattat cttgggtct
11701 gggcactgtg aaggctactg ccagggtccg tgtcctcaag gagctcaag ccgtgtacta
11761 gaaaggagag agccctggag gcagactgg agtgacgatg ctctccctg tctgagttg
11821 tgggtgacc tgagcagggg gagaggcgt tgtcaggaag atggacagag gggagccagc
11881 cccatcagcc aaagccttga ggaggagcaa ggcctatgtg acagggaggg agaggatgtg
11941 cagggccagg gccgtccagg gggagtgagc gcttccctggg aggtgtccac gtgagccttg
12001 ctcgaggcct gggatcagcc ttacaacgtg tctctgttcc tctcccctcc aggccgtgca
12061 taaggctgtg ctgaccatcg acgagaaagg gactgaagct gctggggcca tgtttttaga
12121 ggccataacc atgtctatcc cccccaggt caagttcaac aaacccttg tcttcttaat
12181 gattgaacaa aataccaagt ctcccctctt catgggaaaa gtgggtaac caccacaaaa
12241 ataactgcct ctcgctctc aaccctccc ctccatccct ggccccctcc ctggatgaca
12301 ttaaagaagg gttgagctgg tccctgcctg ca

```

Şekil 2. Alfa 1 antitripsin geni baz dizisi.

AAT geninin ürünü olan protein vücudtaki proteolitik enzimleri inhibe eden, karaciğerde sentezlenen 52kb büyüklüğünde bir glikoproteindir. Alfa 1 antitripsin proteini 394 aa'den oluşmaktadır. Şekil 1.2'de AAT geninin primer transkriptine ait nükleotid dizisi verilmektedir.

Alfa 1 antitripsin karaciğer tarafından üretilen diğer akut faz proteinler gibi indüklenebilir. Serumda AAT'nin normal seviyeleri 150-350mg/dL dir¹⁰. Alfa 1 antitripsinin plazmadaki konsantrasyonu enflamasyon, enfeksiyon ve malign

hastalıklarda 3–4 katına çıkabilir¹¹. *AAT* genelde hepatosit tarafından üretilir ve temel olarak serin proteaz inhibitör gibi hareket ederek kan içine sekrete olur¹².

Nötrofil elastaz *AAT*'nin ana hedefidir. Elastaz, serpin bölgesi tarafından çekilmiş, bağlanmış sonrasında baskılanmış ve seviyesi düşürülmüştür⁹.

```

1 ATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCT
61 GTCTCCCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCAGAAGACAGATACATCCCACCAT
121 GATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCAACCTGGCTGAGTTTCGCCTCAGC
181 CTATACCGCCAGCTGGCACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCAAGTGAGC
241 ATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATGAAATC
301 CTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTTC
361 CAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCGCAAT
421 GGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAG
481 TTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAG
541 ATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAAATGTGGATTTGGTCAAGGAGCTT
601 GACAGAGACACAGTTTTTGTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGA
661 CCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTG
721 AAGGTGCCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCC
781 AGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCTGCCTGAT
841 GAGGGGAAACTACAGCACCTGGAATAAAGTCAACCAAGTATCATCACCAAGTTCCCTG
901 GAAAATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACC
961 TATGATCTGAAGAGCGTCTGGGTCAACTGGGCATCACTAAGGTCTTCCAGCAATGGGGCT
1021 GACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCT
1081 GTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATA
1141 CCCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCTTTGTCTTCTTAATGATTGAA
1201 CAAAATACCAAGTCTCCCTCTTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCACCCAAAAATAACTG
1261 CCTCTCGTCTCCTCAACCCCTCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAGA
1321 AGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTG

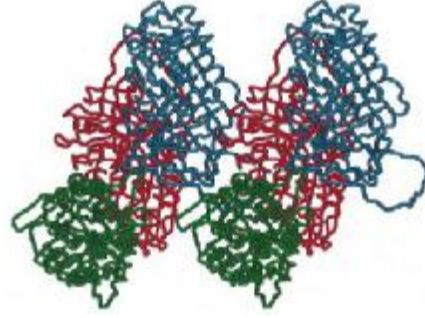
```

Şekil 3. *AAT* geninin transkripsiyon nükleotid dizilimi.

SERPİN ailesi içinde α_1 kimotripsin, C1 esteraz inhibitor, antitrombin ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 bulunmakta olup bunlar enflamatuvar, kompleman, koagülasyon ve fibrinolitik basamaklarda, proteinazların kontrolünü sağlamada çok önemli rol oynar¹¹. SERPIN ailesi üyeleri benzer yapısal özelliklere sahiptir ve 3 β tabakası ve 9 α heliks içerirler¹³. SERPIN'lerin yapısı tam anlamıyla iki ucu keskin kılıç gibidir. Serpin ailesi etkin antiproteazlar olup aynı zamanda hastalıklarla ilgili konformasyonel değişiklikleri uyarırlar³.

Bilindiği üzere dokuda bulunan proteazlar ile *AAT* gibi endojen inhibitörlerin dengesi bozulduğunda oluşan doku hasarı, denge bozukluğu şiddeti ile doğru orantılıdır¹⁴. *AAT*'nin antiinflamatuvar etkisini SERPIN aktivitesinden bağımsız yaptığı bildirilmektedir¹⁵. Bu antiinflamatuvar etkisinden dolayı *AAT*'nin nötrofil süperoksit yapımını baskılayarak makrofaj kökenli interlökin-1 reseptör antagonistlerini uyardığı¹⁶

ve insan akciğer fibroblastlarında hepatosit büyüme faktörü yapımını uyardığı ortaya konmuştur¹⁷.



Resim.1. Polimerize olan α 1-antitripsin molekülü¹¹

İn vitro çalışmalarda lipopolisakkarid uyarımlı sitokinleri uyarmak suretiyle ve ayrıca insanda monositlerden kemokin salgılatmak suretiyle antienflamatuar etki yaptığı da bilinmektedir¹. Aynı zamanda AAT TNF α veya endotoksin uyarımlı ölüme karşı koruyucu etki yapmakta ve farede akciğer enflamasyon modelinde enflamasyonu ve bağ doku hasarını oldukça etkin bir şekilde baskılamaktadır¹⁸. AAT nötrofil elastaz gibi doku proteolitik enzimleri etkin bir şekilde inhibe etmektedir. Bu hedef proteazlar ile doğal AAT'nin etkileşimi sonucu gelişen AAT parçalanması durumlarında hedef olmayan proteazlar tarafından proteolitik yıkım gerçekleştirilir. Bu hedef olmayan proteazlar içinde katepsin L, kollajenaz'lar, makrofaj elastaz, matrilisin, stromelisin-1 ve 3 bulunmaktadır¹.

Amfizemin hayvan modeli temel alınarak ve AAT'nin SERPIN aktivitesi hakkındaki bilgilere göre; pulmoner amfizemin klasik proteinaz modeli bize AAT yetmezliğine bağlı olarak nötrofil elastazın anormal derecede proteolitik aktivitesi sonucu akciğer bağ dokusunda ve ileride alveolar düzeyde yıkım oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Her ne kadar pulmoner amfizeme neden olan yolların çok daha karmaşık olduğu düşünülse de bugün için esas kabul edilen görüş yukarıda açıklanan mekanizmadır.

2.2. Alfa 1 Antitripsin Geni Mutasyonları

Alfa 1 antitripsin geninde oluşan mutasyonların pek çoğu alfa 1 antitripsin proteininin primer aa dizisinde değişiklik oluşturmaktadır. Proteinin primer yapısındaki değişiklik sekonder ve tersiyer yapıdaki değişimlere neden olmakta ve bunun sonucunda mutant proteinlerin meydana gelmektedir^{3,4}. 1981 yılında Hug ve arkadaşları tarafından AAT proteininin yaklaşık 30 varyantı olduğu belirtilmiştir¹⁹.

Nitekim alfa 1 antitripsin proteini üzerinde yapılan son çalışmalarda İEF yöntemi ile birbirinden ayrılabilen 70-100 farklı protein varyantının olduğu bildirilmiştir⁵.

Alfa 1 antitripsin geninde belirlenen ilk mutasyon 1983 yılında Kidd ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir²⁰.Günümüzde Alfa 1 antitripsin geni üzerinde 120 dolayında mutasyon tespit edilmiş olup bunların çoğunluğu substitüsyon ve delesyon tarzındaki mutasyonlardır. Bu mutasyonlardan en sık rastlanan 35'ine ait lokalizasyon, nükleotid ve aa. değişimleri çizelge 1'de verilmiştir^{21, 28, 29- 63}.

Çizelge 1. En sık görülen Alfa 1 antitripsin geni mutasyonlarının ekson, lokalizasyonu, kodon değişimi ve değişen amino asit (a.a) dağılımı

| Sıra No | Kodon | Mutasyon türü | Nükleotid değişimi | Amino asit değişimi |
|---------|---------|---------------|-------------------------|---------------------|
| 1. | 15 | Substitüsyon | cCAC-AAC | His-Asn |
| 2. | 39 | Substitüsyon | cCGC-TGC | Arg-Cys |
| 3. | 41 | Substitüsyon | CTG-CCG | Leu-Pro |
| 4. | 53 | Substitüsyon | TCC-TTC | Ser-Phe |
| 5. | 67 | Substitüsyon | GGG-GAG | Gly-Glu |
| 6. | 68 | Substitüsyon | ACC-ATC | Thr-Ile |
| 7. | 85 | Substitüsyon | ACG-ATG | Thr-Met |
| 8. | 92 | Substitüsyon | ATC-AAC | Ile-Asn |
| 9. | -19 | Substitüsyon | TCG-TTG | Ser-Leu |
| 10. | 101 | Substitüsyon | CGT-CAT | Arg-His |
| 11. | 115 | Substitüsyon | cGGC-AGC | Gly-Ser |
| 12. | 148 | Substitüsyon | cGGG-AGG | Gly-Arg |
| 13. | 160 | Substitüsyon | TACg-TAG | Tyr-Term |
| 14. | 194 | Substitüsyon | TGGg-TGA | Trp-Term |
| 15. | 204 | Substitüsyon | cGAG-AAG | Glu-Lys |
| 16. | 213 | Substitüsyon | GTG-GCG | Val-Ala |
| 17. | 217 | Substitüsyon | gAAG-TAG | Lys-Term |
| 18. | 223 | Substitüsyon | gCGT-TGT | Arg-Cys |
| 19. | 256 | Substitüsyon | GAT-GTT | Asp-Val |
| 20. | 264 | Substitüsyon | GAA-GTA | Glu-Val |
| 21. | 336 | Substitüsyon | gGCT-ACT | Ala-Thr |
| 22. | 341 | Substitüsyon | cGAC-AAC | Asp-Asn |
| 23. | 342 | Substitüsyon | cGAG-AAG | Glu-Lys |
| 24. | 358 | Substitüsyon | ATG-AGG | Met-Arg |
| 25. | 369 | Substitüsyon | CCC-CTC | Pro-Leu |
| 26. | 369 | Substitüsyon | aCCC-TCC | Pro-Ser |
| 27. | 376 | Substitüsyon | GAAc-GAC | Glu-Asp |
| 28. | 391 | Substitüsyon | CCC-CAC | Pro-His |
| 29. | 51 | Substitüsyon | CAATATC^TTCtcTCCCCAGTGA | |
| 30. | 159 | Substitüsyon | TCAAC^GATTAcGTGGAGAAGG | |
| 31. | 317 | Substitüsyon | GGGGCT^GACCtcTCCGGGGTCA | |
| 32. | 360 | Substitüsyon | TGTCT^ATCCCcCCCCAGGTCA | |
| 33. | 756del3 | Delesyon | F52delTTC | TTC/... |
| 34. | 954 | Ekzon 2 | CTG/TTG | Leu-Leu |
| 35. | 1043 | Ekzon 2 | TTC/TTT | Phe-Phe |

2.3. En sık rastlanan AAT Geni Allelleri, Dağılımı ve Sonuçları

En sık rastlanan Alfa 1 antitripsin allelleri **M**, **S** ve **Z** olup, **M** aleli toplumda en sık gözlenen formdur, yabancı allel olarak değerlendirilir ve **M1**, **M2**, **M3** ve **M4** alttipleri mevcuttur⁹. **S** alleli **M**'den 1393. nükleotiddeki A→T değişimi ile **Z** aleli ise 1626. nükleotiddeki G→A değişimiyle ayrılır⁹.

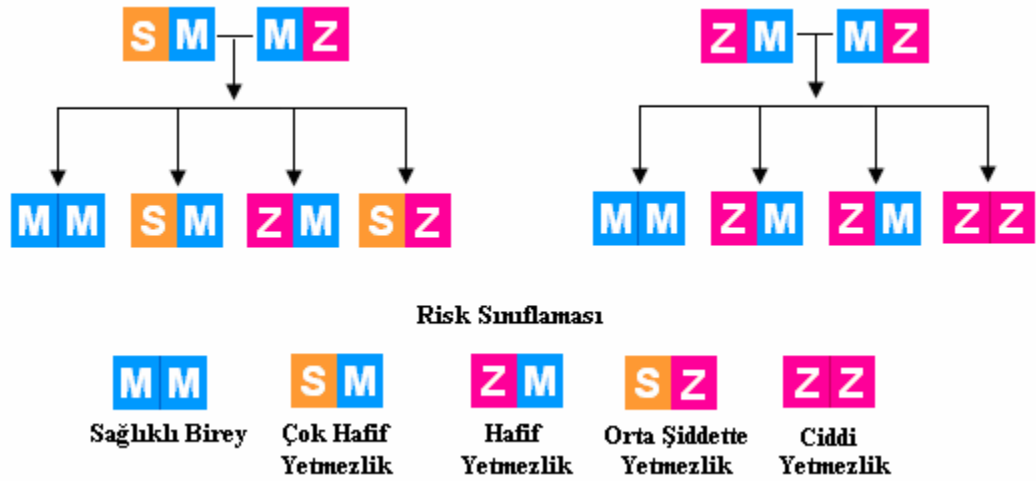
Alfa 1 antitripsin geninde **1626. nükleotidde** meydana gelen substitüsyon (**G**→**A**) türündeki nokta mutasyonu sonucu proteininin aa dizisinde **342. pozisyondaki Lizin** amino asiti **Glutamik asit (Glu342Lys)** ile yer değiştirir⁹. Oluşan varyant **Z varyantı** olarak isimlendirilir. Bunun sonucu olarak Alfa 1 antitripsinin büyük formları oluşur.

1393. nükleotidde meydana gelen substitüsyon (**A**→**T**) türündeki nokta mutasyonu sonucu proteininin aa dizisinde **264. pozisyondaki Glutamik asit - Valin (Glu342Val)** ile yer değiştirir⁹. Oluşan varyant **S varyantı** olarak isimlendirilir. Bunun sonucu olarak Alfa 1 antitripsinin stabil olmayan formları oluşur²².

α -1 antitripsin geninde **1626. nükleotiddeki** mutasyon ile oluşan **Z varyantı** transkribe olduğunda α -1 antitripsinin büyük formları oluşur. Bu büyük formlar karaciğer hücrelerinden dışarıya salgılanamaz ve karaciğer hücrelerinde birikir. Bu birikimin sonucu olarak karaciğer hücresi hasar görünürken diğer taraftan α -1 antitripsinin ulaşmadığı akciğerler, nötrofil elastaza karşı korumasız kalır. Böylece hem karaciğer hem de akciğer hücreleri bu mutasyondan zarar görür^{3,4}.

Gende meydana gelen diğer bazı mutasyonlar sonucunda küçük α -1 antitripsin molekülleri oluşur. Oluşan bu anormal derecede küçük protein molekülleri karaciğer hücrelerinde hızla parçalanır. Bu mutasyon tipinde karaciğer hücrelerinde herhangi bir hasar meydana gelmez. Buna karşın akciğerlere ulaşan α -1 antitripsin miktarı çok az olduğundan ya da hiç ulaşmadığından akciğer dokusu nötrofil elastazın inhibe edilemesi sonucu hasar görür³.

AAT geni son derece polimorfik olup, bu gendeki çeşitli mutasyonlar sonucu özellikle akciğer ve karaciğer tutulumlu bazı hastalıklar oluşur. Gende yaygın üç alelin bir sonraki kuşağa aktarımı ve hastalığa yatkınlık ile ilgili risk değerlendirmeleri şekil 2' de verilmiştir.



Şekil 4. En sık rastlanana AAT alellerinin diğer kuşaklara dağılımı ve risk değerlendirmesi

Avrupa kökenli insanların %90'ında normal serum AAT düzeyleri ile birlikte normal M alelleri vardır. Bunların genotipi Pi MM olarak adlandırılır. İleri derecede AAT eksikliği bulunan olguların %95'inden fazlası, homozigot Z allelini taşır. Pi ZZ genotipine sahip olanların serumlarındaki AAT düzeyi normalin %16'sı kadardır. Amfizem riski en çok bu ZZ homozigotlardadır. AAT eksikliği bulunan Pi SS genotipindeki bireylerde serum AAT düzeyleri ise normalin %52'si kadardır. Pi SZ bileşik heterozigotlarında bu enzimin serumdaki düzeyinin normalin %35'i olduğu bilinmektedir. Pi SS homozigotlarında amfizem riski yokken, Pi SZ heterozigotlarında orta derecede risk bulunur^{5,8}.

Tablo 1. En sık rastlanan AAT alellerinin sıklığı ve genotip fenotip ilişkisi

| Genotip | Allel frekansı | Tripsin inhibisyonu |
|---------|----------------|---------------------|
| MM | %90 | %100 |
| MZ | %4 | %61 |
| MS | %n.b. | %83 |
| SS | %0,1 | %63 |
| SZ | %0,12 | %38 |
| ZZ | %0,04 | %15 |

En riskli allellerden birisi olan *AAT* geni P1Z allelinin görülme sıklığı 1/162'dir. Dünyanın değişik ülkelerinde *AAT* yetmezliği prevalansı ile ilgili pek çok çalışma yapılmış ve önemli sonuçlar elde edilmiştir.

İtalya'da yapılan bir tarama çalışmasında 859 örneğin 70'inde *AAT* eksikliği tespit edilmiş ve bunların %80'inde ZZ fenotipi olduğu belirlenmiştir. İlginç olarak bu yetmezlik görülen hastaların %90'dan fazlası kuzey bölgelerinde bulunmaktadır²³.

İskandinavya'da yapılan başka bir çalışmada İsveç ve Finlandiya'da bulunan Lapp ırkında S ve Z varyantının Avrupada belirlenen en düşük düzeyde olduğu ortaya konmuş, bununla birlikte Norveç'te yaşayan aynı ırkta Z varyantının en üst düzeyde olduğu tespit edilmiştir²⁰. İzlanda'da yapılan bir başka çalışmada ise 94 vaka arasında Z gen sıklığının sıfır olarak belirlenmiş ancak Pi tip F sıklığı beklenenin üstünde çıkmıştır²⁴.

Hollanda'da ise bir endüstri şehri olan Vlaardingen'de hem S hemde Z varyant sıklığı diğer endüstri şehirlerindeki oranlara yakın olmasına karşın küçük bir göçmen şehri olan Vlagtwedde'de her iki allelin oldukça düşük düzeyde görülmesini geniş toplumsal göçlerden ayrı olan bir halk olmaları şeklinde yorumlamışlardır²⁴.

Fransa'da 5000 katılımcı üzerinde yapılan tarama çalışmasında S alleli sıklığı güneybatıda daha yüksek bulunmuştur. Marsilya'da S ve Z tiplerinin görülme sıklığının ülkenin diğer bölgelerinden daha düşük olması ise Afrika ve Asya'dan göç eden kişilerin bu bölgelerdeki çokluğuna bağlanmıştır²⁴. Yunanistan'da yapılan 3 çalışmada belirgin derecede farklı sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan bir çalışmada S varyantının oldukça az düzeyde olduğu ve Z varyantının orta düzeyde olduğu belirlenmiştir²⁴.

Macaristan'da ise 1282 kişilik bir grupta yapılan taramada Hint kökenli Gipsi ırkında S varyant sıklığı en az düzeyde tespit edilmiş ve 2. sıklıkta Çin kökenli olması muhtemel Jasz ırkında belirlenmiştir²⁴.

Çin'de KOAH hastaları üzerinde yapılan *AAT* tarama çalışmalarında Pi fenotip ve alt tipleri yetmezliği sıklığının az olması bu ülkedeki hastalarda *AAT* geninin KOAH'la ilişkili olmadığını ortaya koymaktadır²⁵.

Afrika'da yapılan oldukça geniş kapsamlı bir çalışmada PiS ve PiZ allelleri varlığı Nijerya, Güney Afrika, Somali'de tespit edilirken; Angola, Botswana,

Kamerun, Mozambik, Namibya ve Kongo'da daha çok PiS varyantı ve son olarakda Mali'de PiZ varyantının daha sık olduğu belirlenmiştir ¹².

2.4. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAİ)

KOAİ başlıca öksürük, balgam çıkarma, nefes darlığı ve hışırtılı solunum (wheezing) gibi semptomlarla karakterize genelde ileri yaşlarda ve sigara içenlerde daha sık görülen kişinin yaşam kalitesini ve aktivitelerini önemli ölçüde azaltan ciddi ve kronik bir hastalıktır. KOAİ'da hava akımı, KOAİ'ya bağlı obstrüksiyonunun şiddeti ile zayıf bir ilişki içinde bulunduğu için hastaların büyük bir kısmında tanıyı güçleştirmektedir.

KOAİ gelişiminde en önemli risk faktörleri sigara kullanımı, mesleki nedenlerle maruz kalınan etkiler ve AAT eksikliğidir. KOAİ'nın, bireysel genetik duyarlılık ile olumsuz çevre faktörlerinin karşılıklı etkileşimi sonucu geliştiği bildirilmektedir ^{7,8}. Bunlara ek olarak bazı risk faktörlerinin de KOAİ gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir. KOAİ gelişiminde olası risk faktörleri Tablo:1'de görülmektedir.

Yapılan çalışmalar, KOAİ hastalarının sadece %25'inin bir sağlık kurumuna tedavi için başvurduğundan tanınabildiğini göstermektedir. Bu nedenle, KOAİ prevalansı konusundaki bilgiler yetersizdir. ABD'de 1996'da 16 milyon KOAİ'lı hastanın bulunduğu bildirilmiştir. Ancak, gerçek sayının 30-35 milyon civarında olduğu tahmin edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre hastalık prevalansı, tüm dünyada erkeklerde binde 9.34, kadınlarda binde 7.3'tür ^{26,27}.

Tablo:2. KOAH'ta risk faktörleri

| Çevre faktörleri | Birey ile ilgili faktörler |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Sigara içimi • Aktif sigara içimi • Pasif sigara içimi <ul style="list-style-type: none"> ○ Annenin sigara içimi • Mesleki karşılaşmalar <ul style="list-style-type: none"> ○ Hava kirliliği ○ Dış ortam ○ İç ortam • Sosyoekonomik faktörler/yoksulluk • Diyetle ilgili faktörler <ul style="list-style-type: none"> ○ Yüksek tuzlu diyet ○ Diyetle antioksidan vitaminlerin azlığı • Diyetle doymamış yağ asitlerinin azlığı <ul style="list-style-type: none"> • Enfeksiyonlar | <ul style="list-style-type: none"> • Alfa-1 antitripsin eksikliği • Genetik faktörler • Aile öyküsü • Etnik faktörler Yaş • Hava yolu hiperreaktivitesi • Atopi • Düşük doğum ağırlığı • Semptomlar |

2.5. AAT'nin KOAH'taki Önemi

AAT, KOAH'a yol açtığı bilinen tek genetik düzensizliktir. ABD'de yapılan bir çalışmada KOAH olgularının %1'inden daha küçük bir bölümünde neden AAT enzim eksikliği olduğu belirlenmiştir. AAT enzimi, proteolitik enzimlerin majör inhibitörü olup, alt solunum yollarında kuvvetli bir doku yıkıcı proteaz olan nötrofil elastazın akciğer dokusunda yaratacağı yıkımı önler. Bu koruyucu mekanizma çalışmadığında, alveol duvarlarında hasarlar ve amfizem oluşur³.

Bu çalışmada Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalında KOAH tanısı alan 26 olgu ile Afyonkarahisar ili Göğüs Hastalıkları Hastanesinde KOAH tanısı alan 14 olguda AAT geninin en sık görülen iki varyantı olan S ve Z allellerinin genotipleme çalışması amaçlanmıştır.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kan Örneklerinin Elde Edilmesi

Bu araştırmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Göğüs Hastalıkları Polikliniği'ne ve Göğüs Hastalıkları Hastanesi'nde KOAH tanısı alan ve Anabilim Dalımız Tıbbi Genetik Laboratuvarına refere edilen toplam 40 erkek olgudan alınan kan örnekleri kullanıldı. Kan örnekleri pıhtılaşmayı engellemek için etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüplere alındı. Örnekler izolasyon yapıncaya kadar +4°C'de saklandı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada, Sigma ve Merck marka kimyasallar kullanıldı.

- 5X TBE
- Agaroz
- İsoopropanol
- Etanol
- Etidyum bromür
- Brom fenol blue
- Taq DNA Polimeraz
- Puregene® DNA izolasyon kiti içeriği:
 - Eritrosit parçalama çözeltisi(=RBC lizis solüsyonu): Amonyum klorür, etilen diamintetraasetik asit, sodyum bicarbonate
 - Hücre parçalama çözeltisi(=Cell lizis solüsyonu): Tris (hidroksimetil) aminometan, etilendiamintetraasetik asit, sodyum dodesil sülfat
 - Protein çöktürme çözeltisi (=Protein precipitation solution): Amonyum asetat
 - DNA hidrasyon çözeltisi(=DNA hydration solution): Tris (hidroksimetil) minometan, etilendiamintetraasetik asit
 - RNaz A çözelti
- Pronto AAT kit (şirket Cat:No:9971) içeriği:
 - Pronto™ tampon 2

- Çözelti C (=Solution C)
- Çözelti D (=Solution D)
- ColoRed™ oil
- Assay solution
- Yıkama solüsyonu 20X (=Wash solution)
- HRP birleştirici
- TMB substrat
- Durdurma çözeltisi (=Stop solution) (1 M H₂SO₄)
- Pronto™ AAT Screen™ plaque
- ELISA Belirleme plakaları (=ELISA Detection plaque)

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

- Thermal cycler (Eppendorf Mastercycler personal)
- İnkübatör (Nüve EN 500)
- Santrifüj (Thermo)
- Güç Kaynağı (Apelex PS 503)
- UV Transillüminatör (UVP)
- Buzdolabı (Profilo)
- Derin dondurucu (Bosch)
- Fotoğraf Makinesi
- Yatay Elektroforez Tankı (Biolab)
- Spektrofotometre (Nanodrop)
- Hotplate
- Mikrodalga fırın
- Görüntüleme Sistemi

3.2. YÖNTEMLER

Bu çalışmada yer alan ve KOAH tanısı alan 40 olgudan elde edilen periferik kan örneklerinden genomik DNA elde edildi. Olgulardan elde edilen genomik DNA'dan AAT genine ait 3. ve 5. ekzon polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı. Amplifiye

edilen DNA'nın basit nükleotid primer uzama reaksiyonunu takiben Pronto deteksiyon kiti kullanılarak ELISA yöntemiyle genotiplenmesi yapıldı.

Yöntem teorik olarak 3 basamaktan ibaret olup şu işlemleri içermektedir;

1. DNA Ekstraksiyonu
2. Genotiplenme
 - a. DNA Amplifikasyonu:
 - b. Amplifiye edilen ekzonların agaroz jelde görüntülenmesi
 - c. Post amplifikasyon
 - d. Primer Uzatma
 - e. ELISA uygulaması
3. Değerlendirme (Değerlendirme Z/S pozitif çıkarsa 4. basamaktan devam edilir)
4. Z / S pozitif olguların genotiplenmesi
 - a. Post amplifikasyon
 - b. Primer Uzatma
 - c. ELISA uygulaması
5. Değerlendirme

3.2.1. DNA Ekstraksiyonu:

Olgulara ait periferik kan örneklerinden genomik DNA izole edildi. DNA izolasyonunda Puregene® DNA izolasyon kiti (Gentra Systems) kullanıldı. Bu kit prosedürü temel olarak

1. Hücrelerin parçalanması
2. RNA'nın uzaklaştırılması
3. Proteinlerin çöktürülmesi
4. DNA'nın toplanması,
5. DNA'nın çöktürülmesi,
6. DNA'nın yıkanması
7. DNA'nın hidrasyonu

basamaklarını içermekteydi. Kullanılan kit laboratuvar koşullarına uygun olarak modifiye edildi. İşlem basamakları aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

1. İki adet 1,5 ml'lik eppendorf tüpe hastanın adı-soyadı ve DNA numarası yazıldı.
2. Tüplerden birine 300 µl % 100'lük isopropanol konuldu.
3. Diğer tüpe 900 µl eritrosit parçalama çözeltisi konuldu ve 300 µl periferik kan ilave edildi.
4. Karışım vorteksle homojen hale getirildi.
5. Tüp oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
6. Mikrosantrifüj ile 13000 rpm'de 20 saniye santrifüj edildi.
7. Tüpün dibindeki beyaz pellete dokunmadan ve tüpün içinde 10–20 µl supernatant kalacak şekilde supernatant uzaklaştırıldı.
8. Beyaz pellet ile sıvının karışması için tüp 15–20 saniye vorteks ile homojen hale getirildi.
9. 1.5 µl RNaz A çözeltisi ilave edildi.
10. Tüp 3–5 saniye vorteks ile homojen hale getirildikten sonra etüvde 37° C'de 20 dakika inkübe edildi.
11. İnkübasyondan sonra 300 µl hücre parçalama çözeltisi eklenerek pipetajla karıştırıldı.
12. 100 µl protein çöktürme çözeltisi eklendi.
13. Karışım vorteks yardımıyla 10 saniye karıştırılarak homojen hale getirildi.
14. 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
15. DNA'yı içeren supernatant pipetle 300 µl % 100'lük isopropanol üzerine ilave edildi.
16. Tüp yavaşça silkelenerek karıştırıldı ve DNA ipliksi yapıda görülür hale geldi.
17. Tüp 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA tüpün dibinde görünür bir çökelti haline geldi.
18. DNA'nın dipten kalkmamasına dikkat ederek supernatant döküldü.
19. Tüp kurutma kâğıdı üzerinde ters çevrilerek DNA kurutuldu.
20. DNA pelleti üzerine 300 µl % 70'lik etanol koyuldu.
21. Tüp ters düz edilerek DNA'nın kalkması sağlandı.

22. 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
23. DNA'nın dipten kalkmamasına dikkat ederek etanol dikkatlice döküldü.
24. Tüp kurutma kâğıdı üzerinde ters çevrilerek DNA kurutuldu.
25. 100 µl DNA hidrasyon çözeltisi eklendi.
26. DNA pelletinin kalkması sağlandı.
27. DNA örnekleri 65° C'de 5 dakika inkübe edildi.
28. DNA örnekleri bir gece oda sıcaklığında bekletildi ve tamamen çözünmesi sağlandı.
29. Elde edilen DNA çözeltisi nanadrop marka spektrofotometre ile ölçülerek DNA miktarı (ng/µl olarak) ve DNA'nın saflığı (260/280 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek) belirlendi.
30. Aynı gün içinde kullanılacaksa +4°C'de, daha sonra kullanılacaksa -20°C'de saklandı.

3.2.2. Genotipleme İçin Kullanılan Çalışma Yöntemi Akış Şeması

3.2.2.1. DNA amplifikasyonu: Test edilen mutasyonları içeren DNA fragmentleri (AAT genine ait 3. ve 5. ekzon) amplifiye edildi. Amplifiye olan DNA primer uzama reaksiyonları için substrat olarak kullanıldı. Amplifikasyon işlemi için 0,2 ml'lik tüplere 18µl amplifikasyon Miks, 0,5 µl Taq DNA polimeraz ile 5 µl örnek DNA konuldu ve thermal cycler cihazı 96 °C'de 15 saniye, 60 °C'de 15 saniye, 72°C'de 15 saniye (35 döngü), 72 °C'de 5 dakika ve son sıcaklık 4°C olmak üzere ayarlanarak örneklerle PCR işlemi uygulandı.

3.2.2.2. Post amplifikasyon

Amplifikasyon sırasında DNA'ya katılmayan serbet nükleotitleri inaktive etmek için örneğe muamele edildi. Böylece DNA'ya katılmayan serbest nükleotitlerin primer uzama reaksiyonuna katılması önlenildi.

Post amplifikasyon hazırlanışında amplifiye edilen her 15µl PCR ürününün 5µl'si post amplifikasyon işleminde kullanmak için, 5µl'si pozitif örnekleri tekrar çalışmak için ayrıldı. Amplifikasyon ürününün 5 µl'si 5 µl yükleme tamponu ile %2'lik agaroz jele yüklendi ve yürütüldü. Jelde görülen 3. ve 5. ekzonun görüntülenmesinden sonra sırasıyla aşağıda belirtilen basamaklar uygulanarak postamplifikasyon işlemi yapıldı.

1. Anakarışım için 1,5 ml'lik bir tüp hazırlanıp işaretlendi.

2. Post Amplifikasyon miksi kullanılmadan hemen önce hazırlandı. Tablo:4.'e göre Pronto Buffer, Solution C ve Solution D test tüpü içerisinde karıştırıldı. Tablodaki hacimler test edilecek örnek sayısının bir fazlasıyla çarpıldı.

Tablo:3. Post Amplifikasyon Miks'inin Hazırlanışı

| Çözeltiler | Bir Örnek İçin Kullanılacak Hacimler |
|-----------------|--------------------------------------|
| Pronto Buffer 2 | 25.0 µl |
| Solution C | 1.0 µl |
| Solution D | 0.75 µl |
| Toplam Hacim | 26.75 µl |

3. Solüsyon pipetaj yapılarak karıştırıldı.
4. Test tüplerine 26 µl Post Amplification Miksi kondu ve 5 µl 1. PCR ürünü ilave edildi.
5. Pipetaj yaparak Post Amplification Miks ile amplifiye olan DNA örneğinin karışması sağlandı.
6. 37 °C'de 30 dakika, sonra 95 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Hemen kullanmayacak durumlarda maksimum 4 saat 2-8 °C de saklandı.

3.2.2.3. Primer uzatma

Basit nükleotit primer uzama assayı 96 kuyucuklu bir termoplatede gerçekleştirildi. Her bir kuyucuk, beklenen mutasyon bölgesine yakın test edilen DNA'ya hibridize olan 5'- ucu etkilenmiş bir primeri ve test edilen bölgede nükleotit bazı tamamlayan basit biyotinle etiketlenmiş nükleotit türünü (mutant veya yabancı tip ile mukayese edilen) içerdi. Her bir post amplifikasyon uygulanmış örnek mutasyon başına iki kuyucukla test edildi. Her bir çiftin ilk kuyucuğu mutant allelin (Z/S) varlığı için test edilirken ikinci kuyucuk normal alelin (wt) varlığı için test edildi. Biyotinle etkilenmiş nükleotit test edilen her bir bireyin genotipine bağlı olarak reaksiyon boyunca primere katıldı veya katılmadı.

- 1- Thermocycler cihazı aşağıdaki protokole göre programlandı.

| | | | |
|---|-----------|---|------------------------|
| A | Başlangıç | 96°C | 15 saniye |
| B | 20 döngü | 96°C 65°C | 10 saniye 30 saniye |
| C | Sonlanma | 18-25°C sıcaklığı oda sıcaklığına indirildi | |

- 2- Kuyunun dibindeki renge dikkat edildi. Test edeceğimiz her örnek için bir pembe kuyu (mut, Z/S) ve bir mavi kuyu (wt) kullanıldı.
- 3- Post amplifikasyon uygulanmış örnekten 8'er µl kuyucuklara dağıtıldı. Amplifikasyon ürününün her bir kuyunun dibinde bulunduğunu kontrol edildi.
- 4- Her kuyu bir damla ColoRed - Oil ile kaplandı. Bu süreçte damlalığın ağzıyla kuyulara dokunulmamasına özen gösterildi.
- 5- Termal cycler cihazı çalıştırıldı ve siklus protokolü başlatıldı. Sıcaklık 90° C'ye ulaştığında plate yerleştirildi.
- 6- Basit primer uzama reaksiyonu tamamlandıktan sonra ELISA ile belirleme aşamasına geçildi.

3.2.2.4. ELISA İşlemleri

Biyotinle etkilenmiş primerlerin belirlenmesi ELISA prosedürü ile gerçekleştirildi. Biyotinle etkilenmiş primerler streptavidin kaplanmış ELISA plağına bağlanır ve primerin 5' antijenik ucuna yönelmiş peroksidaz reaksiyon TMB substratın varlığında meydana gelir.

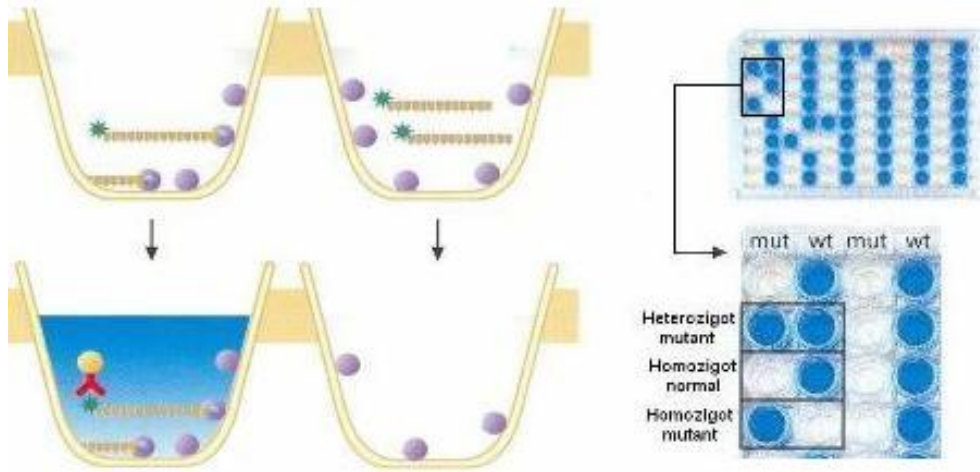
ELISA işlemleri uygulamaya başlandığında öncelikle bütün reaktifleri oda sıcaklığına getirildi. 20x Wash Solution deionize su ile dilue edilip 1x yıkama solüsyonu hazırlandı. Plate kenarına test ismi ve tarihi yazıldı. Bundan sonra aşağıda sıralanan basamaklar izlenerek ELISA ile belirleme işlemi yapıldı.

1. Çok kanallı pipet ile Pronto plate'deki her kuyuya mineral yağın altına girilerek 100 µl Assay Solution eklendi, birkaç kez pipetaj yapılarak assay solüsyonu ile örneğin karışması sağlandı. Assay ve örnek karışımı detection plate'ye aktarıldı.
2. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 10 dakika inkübe edildi.
3. İnkübasyon devam ederken 3,3 µl Konjugat HRP 330 µl Assay Solution içinde 1:100 oranında dilue edildi. Kullanılan her Detection Plate için gerekli olan 11 µl "Assay Solution'da dilue edilmiş Konjugat HRP" her testte taze olacak şekilde hazırlandı.

4. İnkübasyon sonrasında Detection Plate 1xWash Solution ile 4 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra kuyular kurumaya bırakıldı.
5. Tüm kuyulara çok kanallı pipet ile 100 µl taze hazırlanan Konjugat HRP ilave edildi.
6. Plate oda sıcaklığında ve karanlıkta 10 dakika inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrasında Detection Plate 1xWash Solution ile 4 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra kuyular kurumaya bırakıldı.
8. Tüm kuyulara çok kanallı pipet ile 100µl TMB-Substrate eklendi, oda sıcaklığında ve karanlıkta mavi renk oluşuncaya kadar 15 dakika süreyle inkübe edildi.

3.2.3. Sonuçların analizi

Sonuçlar TMB substrat çözeltisinin ilavesini takiben görülebilir hale geldi. Sonuçların değerlendirilmesinde test için kullanılan Pronto Plate kitinde belirtilen test değerlendirme ölçütleri göz önünde bulunduruldu. Mavi rengin olduğu kuyucukta test edilen mutasyon noktasında pozitif sonuç olduğuna karar verildi. (Şekil 5)



Şekil 5. Sonuçların ELISA ile değerlendirilmesi

4. BULGULAR

Bu çalışmada 26'sı Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları polikliniklerinde ve 14'ü Afyonkarahisar ili göğüs hastalıkları Hastanesinde KOAH tanısı alan ve yaşları 48 ile 82 arasında değişen toplam 40 olgu AAT geninin P1S ve P1Z mutasyonları açısından genotiplenmiştir.

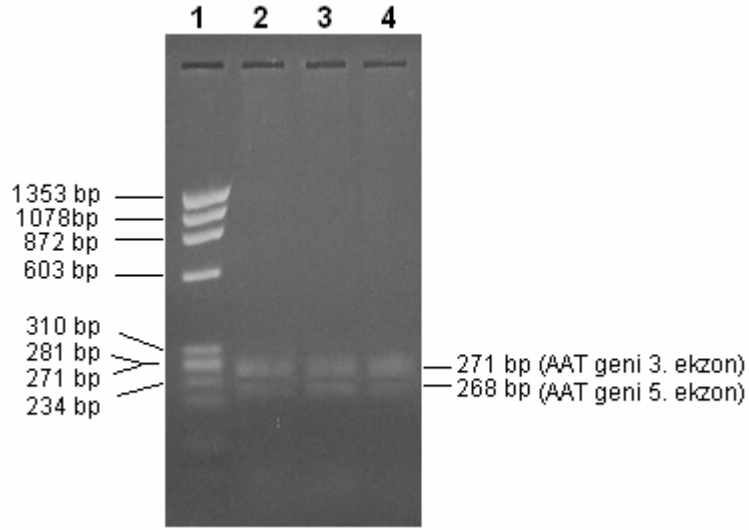
Olgulara ait izole edilen DNA örneklerinin miktar ve saflığı Tablo 4.'de verilmiştir.

Tablo 4. İzole edilen DNA moleküllerinin miktar ve saflığı

| Olgu No | 260/280 nm'de DNA'nın saflık Değeri | DNA miktarı (ng/ uL) |
|---------|-------------------------------------|----------------------|
| 1. | 1,88 | 111,8 |
| 2. | 1,83 | 35,7 |
| 3. | 1,97 | 43,7 |
| 4. | 1,85 | 51 |
| 5. | 1,82 | 166,2 |
| 6. | 1,72 | 25,8 |
| 7. | 1,70 | 21,5 |
| 8. | 1,81 | 47,7 |
| 9. | 1,62 | 12,8 |
| 10. | 1,64 | 22,7 |
| 11. | 1,61 | 11,3 |
| 12. | 1,30 | 3,5 |
| 13. | 1,82 | 2,7 |
| 14. | 1,36 | 2,11 |
| 15. | 1,26 | 9,1 |
| 16. | 1,86 | 235,4 |
| 17. | 1,88 | 85,42 |
| 18. | 1,88 | 91,6 |
| 19. | 1,05 | 9,8 |
| 20. | 1,02 | 15,3 |
| 21. | 1,83 | 48,1 |
| 22. | 0,95 | 17,7 |
| 23. | 1,53 | 6,0 |
| 24. | 0,86 | 10,2 |
| 25. | 1,64 | 0,6 |
| 26. | 0,99 | 10,6 |
| 27. | 1,45 | 34,3 |
| 28. | 1,22 | 5,5 |
| 29. | 1,92 | 9,9 |
| 30. | 1,48 | 7,7 |
| 31. | 1,77 | 10,6 |
| 32. | 1,64 | 4,00 |
| 33. | 1,93 | 12,8 |
| 34. | 2,01 | 50,05 |

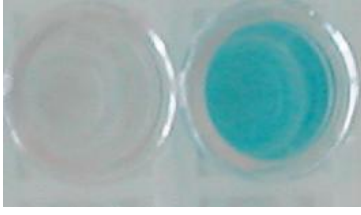
| | | |
|-----|------|------|
| 35. | 1,60 | 25,4 |
| 36. | 1,73 | 38,8 |
| 37. | 1,81 | 20,3 |
| 38. | 1,88 | 48,1 |
| 39. | 1,86 | 56,2 |
| 40. | 1,83 | 51,6 |

Çalışılan olgulardan üçüne ait *AAT* geninin PİS ve PİZ allerini içeren 3. ve 5. ekzonların agaroz jel görüntüsü resim 3’de verilmiştir.

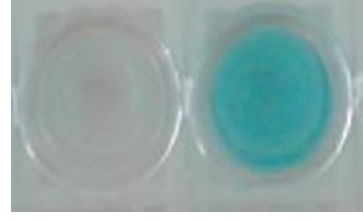


Resim 2. Agaroz jel görüntüsü

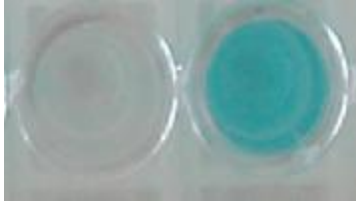
Olgulara ait ELİSA test sonuçları Şekil 3’de gösterilmiştir. Her bir mutasyonun varlığı, mutant tip (PİZ veya PİS) ve yabancı tip (normal) olmak üzere iki kuyucukta analiz edilmiştir. Mavi rengin oluşumu, incelenen genotip açısından rengin oluştuğu kuyucukta sonucun pozitif olduğunu göstermektedir.



Resim 4: Olgu No:1'in ELISA görüntüsü



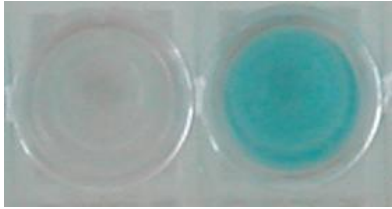
Resim 5: Olgu No:2'nin ELISA görüntüsü



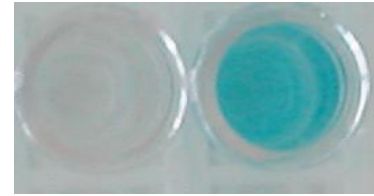
Resim 6: Olgu No:3'ün ELISA görüntüsü



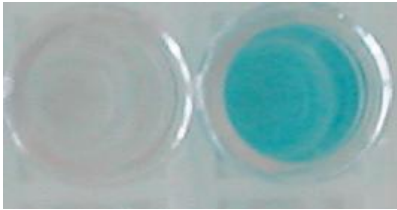
Resim 7: Olgu No:4'ün ELISA görüntüsü



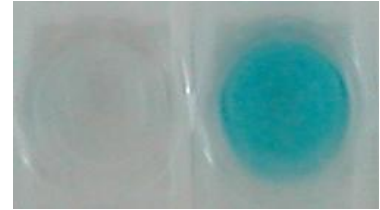
Resim 8: Olgu No:5'in ELISA görüntüsü



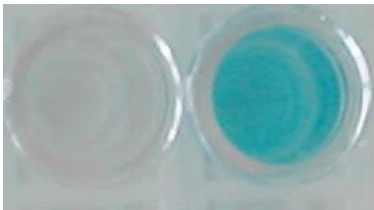
Resim 9: Olgu No:6'nın ELISA görüntüsü



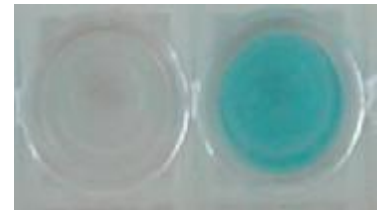
Resim 10: Olgu No:7'nin ELISA görüntüsü



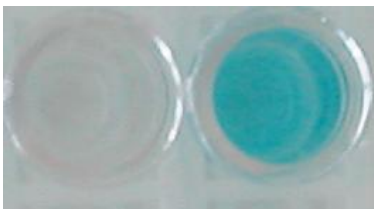
Resim 11: Olgu No:8'in ELISA görüntüsü



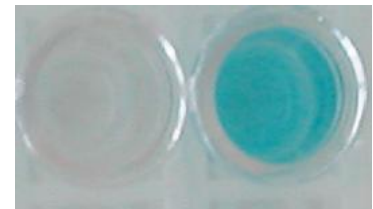
Resim 12: Olgu No:9'un ELISA görüntüsü



Resim 13: Olgu No:10'un ELISA görüntüsü



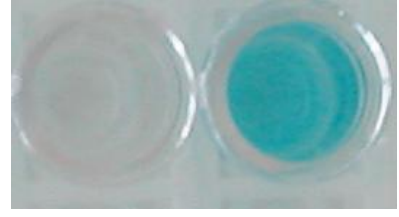
Resim 14: Olgu No:11'in ELISA görüntüsü



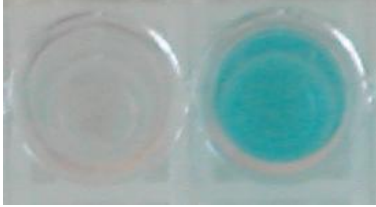
Resim 15: Olgu No:12'nin ELISA görüntüsü



Resim 16: Olgu No:13'ün ELISA görüntüsü



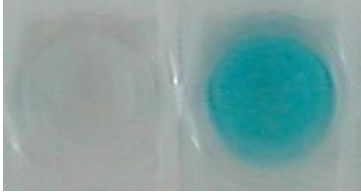
Resim 17: Olgu No:14'ün ELISA görüntüsü



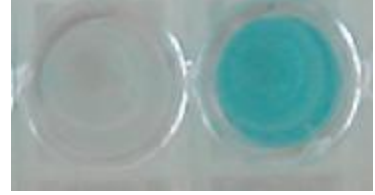
Resim 18: Olgu No:15'in ELISA görüntüsü



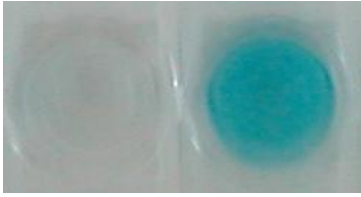
Resim 19: Olgu No:16'nın ELISA görüntüsü



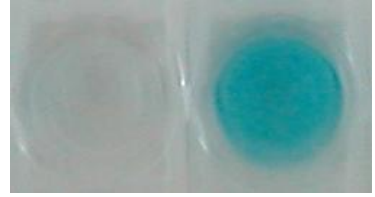
Resim 20: Olgu No:17'nin ELISA görüntüsü



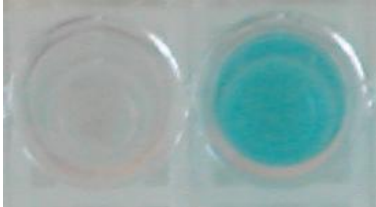
Resim 21: Olgu No:18'in ELISA görüntüsü



Resim 22: Olgu No:19'un ELISA görüntüsü



Resim 23: Olgu No:20'nin ELISA görüntüsü



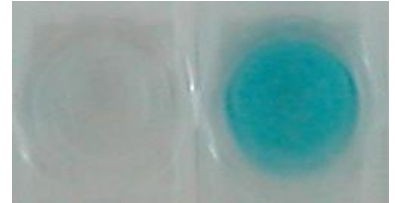
Resim 24: Olgu No:21'in ELISA görüntüsü



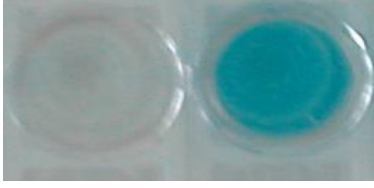
Resim 25: Olgu No:22'nin ELISA görüntüsü



Resim 26: Olgu No:23'ün ELISA görüntüsü



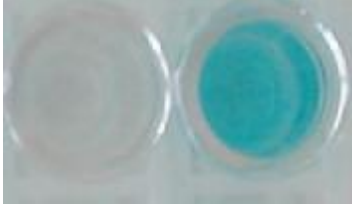
Resim 27: Olgu No:24'ün ELISA görüntüsü



Resim 28: Olgu No:25'in ELISA görüntüsü



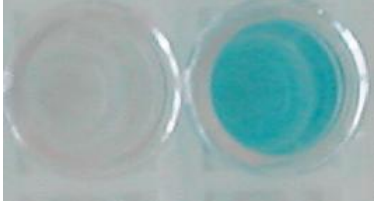
Resim 29: Olgu No:26'nın ELISA görüntüsü



Resim 30: Olgu No:27'nin ELISA görüntüsü



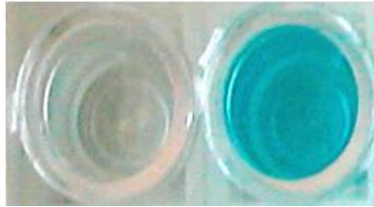
Resim 31: Olgu No:28'in ELISA görüntüsü



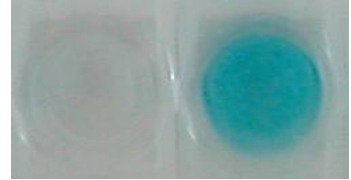
Resim 32: Olgu No:29'un ELISA görüntüsü



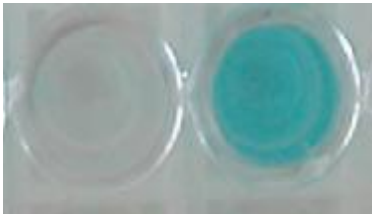
Resim 33: Olgu No:30'un ELISA görüntüsü



Resim 34: Olgu No:31'in ELISA görüntüsü



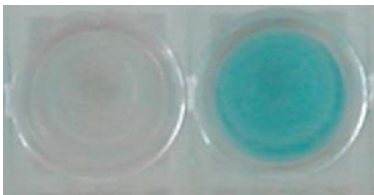
Resim 35: Olgu No:32'in ELISA görüntüsü



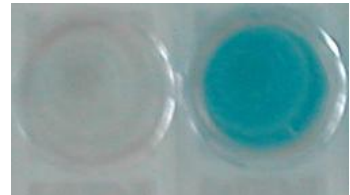
Resim 36: Olgu No:33'ün ELISA görüntüsü



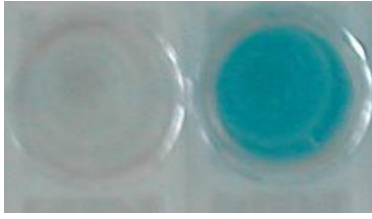
Resim 37: Olgu No:34'ün ELISA görüntüsü



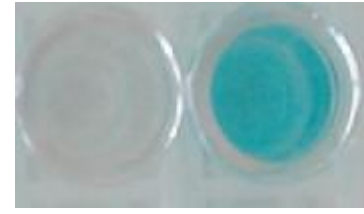
Resim 38: Olgu No:35'in ELISA görüntüsü



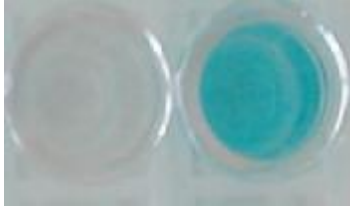
Resim 39: Olgu No:36'nın ELISA görüntüsü



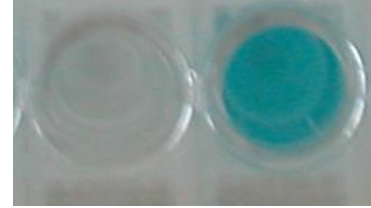
Resim 40: Olgu No:37'nin ELISA görüntüsü



Resim 41: Olgu No:38'in ELISA görüntüsü



Resim 42: Olgu No:39'un ELISA görüntüsü



Resim 43: Olgu No:40'in ELISA görüntüsü

Olgulara ait özellikler ve mutasyonlar Çizelge 4.1'de özetlenmiştir. Olguların tümü erkek ve yaşları 48 ile 82 arasında olup KOAH tanısı almıştır.

İncelenen 40 olguda P₁S ve P₁Z allelleri açısından mutasyon saptanmamış ve tüm olguların normal allelelere sahip olduğu tesbit edilmiştir.

Çizelge 4.1 Çalışmamızda yer alan olgulara ilişkin veriler.

| Olgu No | Yaş | Cinsiyet | Doğum yeri | Genotip |
|---------|-----|----------|------------|-------------------------------------|
| 1. | 61 | Erkek | Sincanlı | Pi M / Pi M |
| 2. | 58 | Erkek | Bolvadin | P ₁ M / P ₁ M |
| 3. | 56 | Erkek | Afyon | P ₁ M / P ₁ M |
| 4. | 66 | Erkek | Afyon | P ₁ M / P ₁ M |
| 5. | 72 | Erkek | Afyon | P ₁ M / P ₁ M |
| 6. | 62 | Erkek | Afyon | P ₁ M / P ₁ M |
| 7. | 58 | Erkek | Afyon | P ₁ M / P ₁ M |
| 8. | 75 | Erkek | Afyon | P ₁ M / P ₁ M |
| 9. | 59 | Erkek | Afyon | P ₁ M / P ₁ M |
| 10. | 63 | Erkek | Afyon | P ₁ M / P ₁ M |
| 11. | 60 | Erkek | Afyon | P ₁ M / P ₁ M |
| 12. | 60 | Erkek | Afyon | P ₁ M / P ₁ M |
| 13. | 75 | Erkek | Sultandağı | P ₁ M / P ₁ M |
| 14. | 72 | Erkek | Afyon | P ₁ M / P ₁ M |
| 15. | 65 | Erkek | Afyon | P ₁ M / P ₁ M |
| 16. | 44 | Erkek | Afyon | P ₁ M / P ₁ M |

| | | | | |
|-----|----|-------|------------|-----------|
| 17. | 68 | Erkek | Bolvadin | PİM / PİM |
| 18. | 65 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 19. | 73 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 20. | 66 | Erkek | İhsaniye | PİM / PİM |
| 21. | 82 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 22. | 63 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 23. | 56 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 24. | 73 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 25. | 58 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 26. | 67 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 27. | 57 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 28. | 74 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 29. | 66 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 30. | 62 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 31. | 70 | Erkek | Bolvadin | PİM / PİM |
| 32. | 50 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 33. | 77 | Erkek | Sivrihisar | PİM / PİM |
| 34. | 77 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 35. | 55 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 36. | 73 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 37. | 75 | Erkek | Bolvadin | PİM / PİM |
| 38. | 48 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 39. | 50 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |
| 40. | 50 | Erkek | Afyon | PİM / PİM |

5. TARTIŞMA

Bu araştırmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Göğüs Hastalıkları Polikliniği ile Afyonkarahisar Göğüs Hastalıkları Hastanesi'nde KOAH tanısı alan ve Anabilim Dalımız Tıbbi Genetik Laboratuvarına refere edilen olguların α_1 -antitripsin genine ait M, S ve Z alelleri açısından genotiplenmesi öngörölmüş olup yaptığımız çalışmanın sonucunda olguların tamamında PİM / PİM genotipi saptanmıştır.Olgularda PiS ve PiZ genotipleri açısından bir mutasyon gözlenmemiştir.

Benzer şekilde İtalya'da yapılan bir tarama çalışmasında 859 KOAH'lı olgu, İzlanda'da yapılan bir başka çalışmada 94 KOAH'lı olgu, Fransa'da 5000 KOAH'lı katılımcı üzerinde, Macaristan'da ise 1282 kişilik KOAH'lı grupta *ATT* geninin PİZ ve PİS mutasyonları açısından genotiplemeleri yapılmış ve *ATT* geni açısından olgularda genotipleme çalışması araştırılmıştır.

İtalya'da yapılan bir tarama çalışmasında 859 KOAH'lı örneğin 70'inde *AAT* eksikliği tespit edilmiş ve bunların %80'inde ZZ genotipi olduğu belirlenmiştir²³.

İzlanda'da yapılan bir başka çalışmada ise 94 KOAH'lı vaka arasında Z allel sıklığının sıfır olarak belirlenmiştir²⁴.

Fransa'da 5000 KOAH'lı katılımcı üzerinde yapılan tarama çalışmasında S alleli sıklığı güneybatıda daha yüksek bulunmuştur. Marsilya'da S ve Z tiplerinin görölme sıklığının ülkenin diğer bölgelerinden daha düşük olması ise Afrika ve Asya'dan göç eden kişilerin bu bölgelerdeki çokluğuna bađlanmıştır²⁴.

Macaristan'da ise 1282 kişilik KOAH'lı grupta yapılan taramada Hint kökenli Gipsi ırkında S varyantı sıklığı en az düzeyde tespit edilmiş ve 2. sıklıkta Çin kökenli olması muhtemel Jasz ırkında belirlenmiştir²⁴.

Buna karşın; bizim çalışmamızda 40 olgu incelenmiş ve *AAT* genine ait S ve Z allellere raslanamamıştır. Diğer alışmalarda *ATT* genine ilişkin Z aleli sıklığı yaklaşık olarak %0.08 oranında bulunmuştur. Bu durumun çalışmalardaki olgu sayısının fazla olması ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

İskandinavya'da yapılan başka bir çalışmada; İsveç ve Finlandiya'da bulunan Lapp ırkında S ve Z varyantının Avrupada belirlenen en düşük düzeyde olduğu ortaya konmuş, bununla birlikte Norveç'te yaşayan aynı ırkta Z varyantının en üst düzeyde olduğu tespit edilmiştir²⁰.

Hollanda’da bir endüstri şehri olan Vlaardingen’de ise hem S hem de Z varyant sıklığı diğer endüstri şehirlerindeki oranlara yakın olmasına karşın küçük bir göçmen şehri olan Vlagtwedde’de her iki allelin oldukça düşük düzeyde görülmesini geniş toplumsal göçlerden ayrı olan bir toplam olmaları şeklinde yorumlanmıştır ²⁴.

Yapılan literatür taramalarına göre bu güne kadar ülkemizde AAT gene ilişkin varyantların araştırıldığı geniş kapsamlı bir çalışma yapılmamıştır. Bizim çalışmamızda incelemeye alınan olgu sayısının 40 olması ve olguların belirli bir bölgeden olması nedeniyle S ve Z varyantlarının dağılımı ile ilgili yeterli bilgi edinilememiştir.

Yunanistan’da yapılan 3 ayrı çalışmada belirgin derecede farklı sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan çalışmaların birinde S varyantının oldukça az düzeyde, Z varyantının ise orta düzeyde olduğu belirlenmiştir ²⁴.

Yine Afrika’da yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada Nijerya, Güney Afrika, Somali’de **PiS** ve **PiZ** allelleri varlığı tespit edilirken; Angola, Botswana, Kamerun, Mozambik, Namibya ve Kongo’da daha çok **PiS** varyantı ve son olarak da Mali’de **PiZ** varyantının daha sık olduğu belirlenmiştir ¹².

Yukarıda değinildiği üzere ülkemizde bu konuya ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda ilk kez 40 olgu çalışılmış ve olgularda S ve Z varyantlarına rastlanmamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda 26’sı Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları polikliniklerinde ve 14’ü Afyonkarahisar ili göğüs hastalıkları Hastanesinde KOAH tanısı alan ve yaşları 48 ile 82 arasında değişen toplam 40 olguda AAT geninin **PiS** ve **PiZ** mutasyonları açısından genotipleme çalışması yapılmış ve **PiS** ve **PiZ** alellere rastlanmamış olup olguların tümünde **PiMM** genotipi saptanmıştır. Kronik obstrüktif akciğer hastalığında söz konusu mutasyonların yöremizdeki dağılımına ilişkin sıklığın ortaya konması için çalışmanın genişletilmesi ve olgu sayısının artırılması gerektiği kanısına varılmıştır.

6. SONUÇLAR

Bu araştırmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Göğüs Hastalıkları Polikliniği ile Afyonkarahisar Göğüs Hastalıkları Hastanesi'nde KOAH tanısı alan ve Anabilim Dalımız Tıbbi Genetik Laboratuvarına refere edilen olgularda α_1 -antitripsin genine ait M, S ve Z alelleri açısından genotipleme çalışması yapılmıştır.

Çalışmamızda 26'sı Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Göğüs Hastalıkları polikliniklerinde ve 14'ü Afyonkarahisar ili göğüs hastalıkları Hastanesinde KOAH tanısı alan ve yaşları 48 ile 82 arasında değişen toplam 40 olgu AAT geninde **PİS** ve **PİZ** alellere rastlanmamış olup olguların tümünde **PİMM** genotipi saptanmıştır.

Bu tez çalışmasının sonucunda kronik obstrüktif akciğer hastalığında söz konusu mutasyonların yöremizdeki dağılışına ilişkin sıklığın ortaya konması için çalışmanın genişletilmesi ve olgu sayısının arttırılması kanısına varılmış ve Anabilim Dalımız Tıbbi Genetik Laboratuvarında AAT genotipleme çalışması rutin olarak yapılır hale gelmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Subramaniam D., Glader P., Wachenfeldt K., Burneckiene J., Stevens T., Janciauskiene S. (2006) C-36 peptide, a degradation product of α 1 antitrypsin, modulates human monocyte activation through LPS signaling pathways. *The Int J of Biochem & Cell Biol* 38, 563-575.
2. Carrell R.W., Lomas D.A. (2002) Alpha1-antitrypsin deficiency. *N Eng J Med* 346, 45-53.
3. Lomas D.A., Evans D.L., Finch J.T., Carrell R.W. (1992) The mechanism of Z alpha1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* 357, 605-607.
4. Fishman A., Martinez F., Naunheim K., et al. (2003). A randomized trial comparing lung-volume reduction surgery with medical therapy for severe emphysema. *N Engl J Med* 348(21), 2059-2073.
5. Eriksson S., Carlson J., Velez R. (1986) Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha1-antitrypsin deficiency. *N Eng J Med* 314, 736-739.
6. National Institute of Health Web Page. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene=serpina1#location>
7. Barış IY. Hava Yolu Hastalıkları. Kalyoncu AF(Ed). In:Solunum Hastalıkları Temel Yaklaşım. 3. Baskı. Bölüm:5. Atlas Kitapçılık. Sayfa: 101-120.
8. Sandford A.J., Weir T.D., Pare P.D. (1997) Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 10, 1380-91.
9. Ugenskien R., Sanak M., Sakalaukas R., Szczeklik A. (2005) Genetic polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease. *Medicina* 41 (1), 17-22.
10. Gupta J., Bhadoria D.P., Lal M.K., et al. (2005) Association of the PIM3 allele of the alpha-1-antitrypsin gene with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Biochem* 38, 489-491.
11. Lomas D.A. (2000) Loop-sheet polymerization: the mechanism of alpha1-antitrypsin deficiency. *Resp Med* 94 (Supplement C). S3-S6.
12. Serres F.J., Blanco I., Bustillo E.F. (2005) Health implication of α 1 antitrypsin deficiency in SubSahara African countries and their emigrants in Europe and the New World. *Genetics in Med* 7, 3, 175-184.

13. Stratikos E., Gettins P.G.W. (1997) Major proteinase movement upon stable serpin-protease complex formation. *Proc Natl Acad Sci* 4. 453-458
14. Aldonyte R., Jansson L., Ljungberg O., Larsson S., Janciauskiene S.(2004) Polymerized α 1-antitrypsin is present on lung vascular endothelium. New insights into the biological significance of α 1-antitrypsin polymerization. *Histopathology* 45, 587-592.
15. Dabbagh K., Laurent G.J., Shock A., Leoni P. Papakrivopoulou J., Chambers R.C. (2001) Alpha1 antitrypsin stimulates fibroblast proliferation and procollagen production and activates classical MAP kinase signaling pathways. *J Cell Physiol* 186, 73-81.
16. Churg A., Dai J., Zay K., et al. (2001) Alpha1-antitrypsin and a broad spectrum mettaloprotease inhibitor RS113456 have similar acute antiinflammatory effects. *Lab Invest* 81, 1119-1131.
17. Kikuchi T., Abe T., Yaekashawa M., et al (2000) Secretary leukoproteinase inhibitors augments hepatocyte growth factor production in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 261, 14748-14751.
18. Libert C., Van Molle W., Brouckaert P., Fiers W. (1996) Alpha1-antitrypsin inhibits the lethal response to TNF in mice. *J Immunol* 157, 5126-5129.
19. Hug G., Chuck G., Fagerhol M.K. (1981)Pi(P-Clifton): a new alpha(1) antitrypsin allele in an American Negro family. *J. Med. Genet* 18, 43-45
20. Kidd V.J., Wallace R.B., Itakura K., Woo S.L. (1983) Alpha 1 antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene. *Nature* 21-27 304-(5923), 230-234.
21. Mahadeva R., Gaillard M.C., Pillay V., Halkas A., Lomas D.A. (2001) Characterization of a new variant of α 1-antitrypsin EJohannesburg (H15N) in association with asthma. *Hum Mutat* 17,(2), 156-159.
22. Graham A., Kalsheker N.A., Newton C.R., Bamforth F.J., Powell S.J., Markham A.F. (1989) Molecular characterisation of three alpha-1-antitrypsin deficiency variants:proteinase inhibitor (Pi) nullcardiff (Asp256----Val); PiMmalton(Phe51----deletion) and PiI (Arg39----Cys). *Hum Genet.* 84(1), 55-58.

23. Takahashi H., Nukiwa T., Satoh K., et al (1988) Characterization of the gene and protein of the alpha 1-antitrypsin "deficiency" allele Mprocida. *J Biol Chem.* 263(30) 15528-15534.
24. Seyama K., Nukiwa T., Takabe K., Takahashi H., Miyake K., Kira S. (1991) Siiyama (serine 53 (TCC) to phenylalanine 53 (TTC)). A new alpha 1-antitrypsin-deficient variant with mutation on a predicted conserved residue of the serpin backbone. *J Biol Chem.* 266(19), 12627-12632.
25. Curiel D.T., Vogelmeier C., Hubbard R.C., Stier L.E., Crystal R.G. (1990) Molecular basis of alpha 1-antitrypsin deficiency and emphysema associated with the alpha 1-antitrypsin Mmineral springs allele. *Mol Cell Biol.* 10(1),47-56.
26. Faber J.P., Poller W., Weidinger S., et al. (1994) Identification and DNA sequence analysis of 15 new alpha 1-antitrypsin variants, including two PI*Q0 alleles and one deficient PI*M allele. *Am J Hum Genet.* 55(6),1113-1121.
27. Lovegrove J.U., Jeremiah S., Gillett G.T., Temple I.K., Povey S., Whitehouse D.B. (1997) A new alpha 1-antitrypsin mutation, Thr-Met 85, (PI Zbristol) associated with novel electrophoretic properties. *Ann Hum Genet.* 61 (Pt 5):385-91.
28. Frazier G.C., Siewertsen M.A., Hofker M.H., Brubacher M.G., Cox D.W. (1990) A null deficiency allele of alpha 1-antitrypsin, QO Ludwigshafen, with altered tertiary structure. *J Clin Invest.* 86(6),1878-1884.
29. Graham A., Kalsheker N.A., Bamforth F.J., Newton C.R., Markham A.F. (1990) Molecular characterisation of two alpha-1-antitrypsin deficiency variants:proteinase inhibitor (Pi) Null(Newport) (Gly115----Ser) and (Pi) Z Wrexham Ser-19----Leu). *Hum Genet.* 85(5), 537-540.
30. Faber J.P., Weidinger S., Olek K. (1990) Sequence data of the rare deficient alpha 1-antitrypsin variant PI Zaugsburg. *Am J Hum Genet.* 46(6),1158-1162.
31. Matsunaga E., Shiokawa S., Nakamura H., Maruyama T., Tsuda K., Fukumaki Y. (1990) Molecular analysis of the gene of the alpha 1-antitrypsin deficiency variant, Mnichinan. *Am J Hum Genet.* 46(3), 602-612.
32. Nukiwa T., Takahashi H., Brantly M., Courtney M., Crystal RG. (1987) alpha 1-Antitrypsin null Granite Falls, a nonexpressing alpha 1-antitrypsin gene

- associated with a frameshift to stop mutation in a coding exon. *J Biol Chem.* 262(25), 11999-12004.
33. Lee J., Novoradovskaya N., Rundquist B., Redwine J., Saltini C., Brantly M. (1998) Alpha 1-antitrypsin nonsense mutation associated with a retained truncated protein and reduced mRNA. *Mol Genet Metab.* 63(4), 270-280.
 34. Lodewyckx L., Vandevyver C., Vandervorst C., Van Steenberghe W., Raus J., Michiels L. (2001) Mutation detection in the alpha-1 antitrypsin gene (PI) using denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat.* 18(3), 243-250.
 35. Nukiwa T, Satoh K, Brantly ML, et al. (1986) Identification of a second mutation in the protein-coding sequence of the Z type alpha 1-antitrypsin gene. *J Biol Chem.* 261(34), 15989-15994.
 36. Satoh K., Nukiwa T., Brantly M., Garver R.I. Jr, Hofker M., Courtney M., Crystal R.G. (1988) Emphysema associated with complete absence of alpha 1-antitrypsin in serum and the homozygous inheritance [corrected] of a stop codon in an alpha 1-antitrypsin-coding exon. *Am J Hum Genet.* 42(1), 77-83.
 37. Okayama H., Brantly M., Holmes M., Crystal R.G. (1991) Characterization of the molecular basis of the alpha 1-antitrypsin F allele. *Am J Hum Genet.* 48(6), 1154-1158.
 38. Curiel D.T., Chytil A., Courtney M., Crystal R.G. (1989) Serum alpha 1-antitrypsin deficiency associated with the common S-type (Glu264----Val) mutation results from intracellular degradation of alpha 1-antitrypsin prior to secretion. *J Biol Chem.* 264(18), 10477-10486.
 39. Crystal R.G. (1990) Alpha 1-antitrypsin deficiency, emphysema, and liver disease. Genetic basis and strategies for therapy. *J Clin Invest* 85(5), 1343-1352.
 40. Holmes M.D., Brantly M.L., Crystal R.G. (1990) Molecular analysis of the heterogeneity among the P-family of alpha-1-antitrypsin alleles. *Am Rev Respir Dis.* 142(5), 1185-1192.
 41. Kidd V.J., Wallace R.B., Itakura K., Woo S.L. (1983) alpha 1-antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene. *Nature* 21-27, 304(5923), 230-234.
 42. Vidaud D., Emmerich J., Alhenc-Gelas M., Yvart J., Fiessinger J.N., Aiach M. (1992) Met 358 to Arg mutation of alpha 1-antitrypsin associated with protein C

- deficiency in a patient with mild bleeding tendency. *J Clin Invest.*;89(5):1537-1543.
43. Hofker M.H., Nukiwa T., van Paassen H.M. et al. (1989) A Pro----Leu substitution in codon 369 of the alpha-1-antitrypsin deficiency variant PI MHeerlen. *Hum Genet.*81(3), 2640-2648.
 44. Rocha J., Pinto D., Santos M.T., et al. (1997) Analysis of the allelic diversity of a (CA)_n repeat polymorphism among alpha 1-antitrypsin gene products from northern Portugal. *Hum Genet* 99(2),194-198.
 45. Graham A., Hayes K., Weidinger S., Newton C.R., Markham A.F., Kalsheker N.A. (1990) Characterisation of the alpha-1-antitrypsin M3 gene, a normal variant. *Hum Genet* 85(3), 381-382.
 46. Jardi R., Rodriguez F., Miravittles M. (1998) Identification and molecular characterization of the new alpha-1-antitrypsin deficient allele PI Y barcelona (Asp256-->Val and Pro391-->His). *Mutations in brief no. 174. Hum Mutat* 12(3), 213.
 47. Laubach V.E., Ryan W.J., Brantly M. (1993) Characterization of a human alpha 1-antitrypsin null allele involving aberrant mRNA splicing. *Hum Mol Genet* 2(7), 1001-1005.
 48. Seixas S., Mendonca C., Costa F., Rocha J. (2002) alpha1-Antitrypsin null alleles: evidence for the recurrence of the L353fsX376 mutation and a novel G-->A transition in position +1 of intron IC affecting normal mRNA splicing. *Clin Genet* 62(2), 175-180.
 49. Morgan K., Scobie G., Kalsheker N.A. (1993) Point mutation in a 3' flanking sequence of the alpha-1-antitrypsin gene associated with chronic respiratory disease occurs in a regulatory sequence. *Hum Mol Genet* 2(3), 253-257.
 50. Curiel D.T., Holmes M.D., Okayama H. et al. (1989) Molecular basis of the liver and lung disease associated with the alpha 1-antitrypsin deficiency allele Mmalton. *J Biol Chem.* 15 264(23), 13938-13945.
 51. Nukiwa T., Takahashi H., Brantly M., Courtney M., Crystal R.G. (1987)alpha 1-Antitrypsin nullGranite Falls, a nonexpressing alpha 1-antitrypsin gene associated with a frameshift to stop mutation in a coding exon. *J Biol Chem.* 5, 262(25), 11999-2004.

52. Sifers R.N., Brashears-Macatee S., Kidd V.J., Muensch H., Woo S.L. A (1988) frameshift mutation results in a truncated alpha 1-antitrypsin that is retained within the rough endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 25, 263(15), 7330-7335.
53. Fraizer G.C., Siewertsen M., Harrold T.R., Cox D.W. (1989) Deletion/frameshift mutation in the alpha 1-antitrypsin null allele, PI*QObolton. *Hum Genet* 83(4), 377-382.
54. Curiel D., Brantly M., Curiel E., Stier L., Crystal R.G. (1989) Alpha 1-antitrypsin deficiency caused by the alpha 1-antitrypsin Nullmattawa gene. An insertion mutation rendering the alpha 1-antitrypsin gene incapable of producing alpha 1-antitrypsin. *J Clin Invest* 83(4),1144-1152.
55. Faber J.P., Poller W., Weidinger S. et al. (1994) Identification and DNA sequence analysis of 15 new alpha 1-antitrypsin variants, including two PI*QO alleles and one deficient PI*M allele. *Am J Hum Genet* 55(6),1113-1121.
56. Takahashi H., Crystal R.G. (1990) Alpha 1-antitrypsin Null(isola di procida): an alpha 1-antitrypsin deficiency allele caused by deletion of all alpha 1-antitrypsin coding exons. *Am J Hum Genet* 47(3), 403-413.
57. Poller W., Faber J.P., Weidinger S., Olek K. (1991) DNA polymorphisms associated with a new alpha 1-antitrypsin PIQO variant(PIQOriedenburg). *Hum Genet* 86(5), 522-524.
58. Tommaso AMA, Rossi AL, Escanhoela AF, Sera HG, Bertuzzo AC, Hessel G (2001) Diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency by DNA analysis of children with liver disease. *Arq. Gastroenterol* 38(1), 63-68.
59. Luisetti M., Massi G., Massobrio M. et al (1999) A national program for detection of α 1 antitrypsin deficiency in Italy. *RespMed* 93, 169-172.
60. Hutchison D.C.S. (1998) α 1 antitrypsin deficiency in Europe: geographical distribution of Pi types S and Z. *Resp Med* 92, 367-377.
61. Kwok J.S.Y., Lawton J.W.M.L., Yew W.W., Chau C.H., Lee J. and Wong P.C. (2004) Protease inhibitor phenotypes and serum alpha 1 antitrypsin levels in patients with COPD: a study from Hong Kong. *Respirology* 9, 265-270.
62. Kasper D.L., Braunwald E., Fauci A.S., Hauser S.L., Longo D.L., Jameson J.L. (2005) Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Reilly JJ, Silverman EK,

Shapiro SD (Ed) In: Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th Edition.
McGraw Hill Medical Publishing Division USA Sec:242. Pp: 1547-1554.

63. K ç kusta A.R. Solunum Yollarının ve Akciğerin İnfeksiyon Hastalıkları.
Nobel Tıp Kitapevi. 2002.