

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GENÇLERİN ERİŞKİN BAŞLANGIÇLI DİYABETİ (MODY)
HASTALIĞINDA ETKİSİ KANITLANAN GENLERİN YENİ
NESİL DİZİLEME(NGS) İÇİN “mPZR” OPTİMİZASYONU**

Dilara DÖRTER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Haziran, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GENÇLERİN ERİŞKİN BAŞLANGIÇLI DİYABETİ (MODY)
HASTALIĞINDA ETKİSİ KANITLANAN GENLERİN YENİ
NESİL DİZİLEME(NGS) İÇİN “mPZR” OPTİMİZASYONU**

Dilara DÖRTER tarafından hazırlanan tez çalışması 29.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Emre TEPELİ, Üye

İstanbul Atlas Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Gençlerin Erişkin Başlangıçlı Diyabeti (MODY) Hastalığında Etkisi Kanıtlanan Genlerin Yeni Nesil Dizileme(NGS) İçin “mPZR” Optimizasyonu başlıklı çalışmada etik kaygı oluşturacak bir materyal kullanmadığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Dilara DÖRTER

İmza



*Yola beraber çıktığımız
Ancak ani bir şekilde kaybettiğimiz
Sayın Hanifi AKTAŞ
Hocama*

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezimde yanımda olan ve bana güvenen sayın danışman hocam Prof. Dr. Muhammed Hamza MÜSLÜMANOĞLU'na çok teşekkür ederim. Kendisi olmasa ben ilerleyemezdim.

Aramızdan beklenmedik bir şekilde ayrılan Hocam Hanifi AKTAŞ'a çok teşekkür ediyorum. Rabbim mekanını cennet eylesin.

Tüm deneysel çalışmalarımnda destek olduğu için NGC'nin Gizem Hanımı Gizem SOMUNCUOĐLU'na çok teşekkür ederim.

Bir dost ve arkadaş gibi yanımda olduğu için ArŐ.Gör. Mine KUÇAK'a çok teşekkür ederim.

Tüm süreç boyunca arkamda olduklarını hissettirdikleri için aileme teşekkür ederim.

Dilara DÖRTER

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	viii
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	3
2 GENÇLERİN ERİŞKİN BAŞLANGIÇLI DİYABETİ-MODY	4
2.1 Tip1 Diyabet	5
2.2 Tip2 Diyabet	6
2.3 Monogenik Diyabet.....	6
2.3.1 MODY (GENÇLERİN ERİŞKİN BAŞLANGIÇLI DİYABETİ)	8
3 MODY'DE MOLEKÜLER TANI	13
3.1 PZR Nedir?.....	13
3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bileşenleri.....	15
3.2.1 Kalıp DNA.....	15
3.2.2 Primer	15
3.2.3 DNA Polimeraz	17
3.2.4 Tampon/Reaksiyon Koşulları.....	19
3.2.5 dNTP Karışımı	20
3.2.6 Polimeraz Kofaktörü-Magnezyum.....	20
3.3 Multipleks (Çoklu) Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	21
4 MATERYAL METHOD	22
4.1 Materyal.....	22
4.1.1 Kullanılan Kitler/Kimyasallar.....	22
4.1.2 Kullanılan Genetik Materyal	22
4.1.3 Kullanılan Biyoinformatik Araçlar.....	22
4.2 Method	23

4.2.1	Biyoinformatik Tasarım	24
4.2.2	In Sliko mPZR Optimizasyonu:	25
4.2.3	In Vitro Optimizasyon:	31
4.2.4	PZR Ürünlerinin Konfirmasyonu	40
5	BULGULAR VE TARTIŞMA	42
5.1	<i>În-Vitro</i> Tek Lokus PZR Sonucu.....	42
5.2	Betain(N,N,Ntrimetilglisin) Katkılı Tek Lokus PZR.....	44
5.3	VitaTaq® HS Multiplex Kit mPZR Uygulaması.....	47
5.4	Qiagen HotStartTaq mPZR Uygulaması.....	48
5.5	Thermo scientific Rec. Taq Polimeraz mPZR Uygulaması.....	48
5.6	mPZR'de Farklı Tutunma Isısı Uygulama.....	50
5.7	Farklı Primer/Tüp Kombinasyon Uygulaması.....	51
5.8	DMSO-Betain katkılı mPZR Uygulaması.....	51
5.9	Sonuç Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Görüntüleme	53
5.10	Yeni Nesil Dizileme Analizi	54
6	SONUÇ VE ÖNERİLER	60
	KAYNAKÇA	62
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	68

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
dk	Dakika
$^{\circ}\text{C}$	Derece Santigrat
W/V	Hacimde Ağırlıkça Yüzde
μl	Mikro Litre
ml	Mili Litre
mM	Mili Molar
ng	Nano Gram
nmol	Nanomol
sn	Saniye
∞	Sınırsız
U	Unit

KISALTMA LİSTESİ

<i>ABCC8</i>	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 8
<i>APPL1</i>	Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interacting With PH Domain And Leucine Zipper 1
APS	Amonyum Persülfat
BAM	Binary Alignment Map
bç/bp	Baz Çifti
<i>BETA2</i>	Beta Hücresi Transaktivatörü 2
Betain	N,N,Ntrimetilglisin
<i>BLK</i>	B Lymphoid Tyrosine Kinase
<i>CEL</i>	Carboxyl Ester Lipase
dH2O	Distile Su
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DMSO	Dimetil Sülfoksit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
F	İleri Primer (Forward)
<i>GCK</i>	Glukokinaz
<i>HNF1A/ HNF-1 α</i>	Hepatosit Nükleer Faktör 1 Alfa - <i>TCF1</i>
<i>HNF1B/ HNF-1β</i>	Hepatosit Nükleer Faktör 1 Beta - <i>TCF2</i>
<i>HNF4A/ HNF-4α</i>	Hepatosit Nükleer Faktör 4 Alfa
HOX	Homeobox
IGV	Integrative Genomics Viewer
<i>INS</i>	İnsulin
<i>IPF-1</i>	İnsülin Promotör Faktör 1
<i>ISL-1</i>	ISL LIM Homeobox 1
<i>KCNJ11</i>	Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 11
<i>KLF11</i>	Kruppel Like Factor 11
Mg	Magnezyum
MODY	Gençlerin Erişkin Başlangıçlı Diyabeti (Maturity Onset Diabetes Of The Young)
mPZR	Multipleks(Çoklu) Pzr, mPCR
<i>NEUROD1</i>	Neuronal Differentiation 1
NGS	Yeni Nesil Dizileme

<i>NK6-1</i>	NK6 Homeobox 1
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<i>PAX4</i>	Paired Box 4
<i>PDX1</i>	Pancreatic And Duodenal Homeobox 1, IPF1
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	Geri Primer (Reverse)
<i>RFX6</i>	Regulatory Factor X6
SNP	Tek Nükleotid Değişim
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/Edta
TDF	Tiled Data File
TEMED	Tetrametiletilediamin
Tm	Erime Sıcaklığı
UCSC	The University Of California, Santa Cruz

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 <i>GCK</i> 'nin insülin/glukagon yolaklarına etkisinin şematik gösterimi (Matschinsky & Wilson, 2019).....	10
Şekil 2.2 Hepatosit Nükleer Faktörlerin sinerjik regülasyon şekli verilmiştir ...	12
Şekil 3.1 Amplifikasyon yönünün şematik çizimi.....	16
Şekil 3.2 Hedef diziye olası primer bağlanma biçimleri.....	16
Şekil 3.2 DMSO (Dimetil Sülfoksit) ve Betain (N,N,N-trimetilglisin) ajanlarının kimyasal yapısı.....	19
Şekil 5.1 <i>GCK-Glukokinaz</i> geninin katkısız Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.	42
Şekil 5.2 <i>HNF-4A</i> geninin katkısız Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.	42
Şekil 5.3 <i>HNF-1B</i> geninin katkısız Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.	43
Şekil 5.4 <i>HNF-4A</i> geninin katkısız Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.	43
Şekil 5.5 <i>GCK-Glukokinaz</i> geninin betain katkılı Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.	44
Şekil 5.7 <i>HNF-1B</i> geninin betain katkılı Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.	45
Şekil 5.8 <i>HNF-4A</i> geninin betain katkılı Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.	45
Şekil 5.9 VitaTaq® HS Multiplex Kitiyle gerçekleştirilen mPZR jel görüntüsü.	47
Şekil 5.10 Qiagen HotStartTaq DNA Polimerazlı mPZR agaroz jel görüntüsü.	48
Şekil 5.11 Toplam hacim 25 µl olarak gerçekleştirilen Thermo Scientific Rec. Taq mPZR jel görüntüsü.	49
Şekil 5.12 Toplam hacim 50 µl olarak gerçekleştirilen Thermo Scientific Rec. Taq mPZR jel görüntüsü.	49
Şekil 5.13 Tutunma(annealing) ısısı 61°C olan mPZR jel görüntüsü.	50
Şekil 5.14 Tutunma(annealing) ısısı 63°C olan mPZR jel görüntüsü.	50
Şekil 5.15 DMSO katkılı mPZR agaroz jel görüntüsü.	52
Şekil 5.16 Betain katkılı mPZR agaroz jel görüntüsü.....	52
Şekil 5.17 Son mPZR poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü.	53
Şekil 5.18 <i>GCK-1</i> 'in NGS sonucunun yakın gösterimi.....	56
Şekil 5.19 <i>GCK-2 – GCK-10</i> ekzonlarının NGS dosyasının IGV görüntüsü.	56
Şekil 5.20 <i>HNF-1A -1 – HNF-1A -10</i> ekzonlarının NGS dosyasının IGV görüntüsü.	57
Şekil 5.21 <i>HNF-1B-1 – HNF-1B-4</i> ekzonlarının NGS dosyasının IGV görüntüsü.	57
Şekil 5.22 <i>HNF-1B-5 – HNF-1B-9</i> ekzonlarının NGS dosyasının IGV görüntüsü.	58
Şekil 5.23 <i>HNF-4A -1 – HNF-4A -3</i> ekzonlarının NGS dosyasının IGV görüntüsü.	58
Şekil 5.24 <i>HNF-4A -4-5 – HNF-4A -7</i> ekzonlarının NGS dosyasının IGV görüntüsü	59
Şekil 5.25 <i>HNF-4A -8 – HNF-4A -10</i> ekzonlarının NGS dosyasının IGV görüntüsü.	59

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1	Gen/Fenotip İlişkisi(Anik vd., 2015)	2
Tablo 2.2	MODY türleri ve ilişkili genler.(Naylor vd., 2018)	9
Tablo 2.3	MODY türleri ve ilişkili genler (devamı)(Naylor vd., 2018).....	10
Tablo 3.1	Optimum PZR için gereken primer nitelikleri.	17
Tablo 4.1	MODY ile ilişkilendirilmiş 4 gen için belirlenen referans diziler....	24
Tablo 4.2	Sentezlenen <i>GCK (glukokinaz)</i> primerleri.	26
Tablo 4.3	Sentezlenen <i>HNF-1A</i> primerleri.	27
Tablo 4.4	Sentezlenen <i>HNF-1B</i> primerleri.	28
Tablo 4.5	Sentezlenen <i>HNF-4A</i> primerleri.	29
Tablo 4.6	Primer/tüp dağılım tablosu.	30
Tablo 4.7	Katkısız Tek Lokus PZR reaksiyon içeriği ve döngü koşulları	32
Tablo 4.8	Katkılı Tek Lokus PZR reaksiyon içeriği ve döngü koşulları	33
Tablo 4.9	VitaTaq HS Multiplex PZR reaksiyon içeriği ve döngü koşulları....	34
Tablo 4.10	Sıcak Başlangıçlı mPZR reaksiyon içeriği ve döngü koşulları.....	35
Tablo 4.11	Thermo Scientific Taq. Polimerazlı mPZR reaksiyon içeriği ve döngü koşulları.....	36
Tablo 4.12	<i>İn-Siliko</i> optimizasyon basamağında hazırlanan ilk primer/tüp dağılımı.	37
Tablo 4.13	<i>İn-Vitro</i> uygulamalar sonrasında güncellenen ikinci primer/tüp dağılımı	37
Tablo 4.14	DMSO katkılı mPZR reaksiyon içeriği ve döngü koşulları.....	38
Tablo 4.15	Betain katkılı mPZR reaksiyon içeriği ve döngü koşulları.	39
Tablo 4.16	%1(W/V) 'lik agaroz jel içeriği.	40
Tablo 4.17	%2(W/V) 'lik agaroz jel içeriği.	40
Tablo 4.18	Thermo Scientific web sayfasından elde edilen denatüre edici olmayan PAGE protokolü.	41
Tablo 5.1	Agaroz jelde görüntülenen bantların beklenen boyut ile uyumunun Image-J analizi ile doğrulama.	46
Tablo 5.2	Başarıyla sonuçlanan panel mPZR ürünlerinin NGS analizi.....	54
Tablo 5.3	Başarıyla sonuçlanan panel mPZR ürünlerinin NGS analizi(devamı).	55

Gençlerin Erişkin Başlangıçlı Diyabeti (MODY) Hastalığında Etkisi Kanıtlanan Genlerin Yeni Nesil Dizileme (NGS) İçin “mPZR” Optimizasyonu

Dilara DÖRTER

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Gençlerin erişkin başlangıçlı diyabeti (MODY) basitçe ergenlik döneminde veya genç erişkinlik döneminde (25 yaş öncesinde) tanı alan otozomal dominant kalıtılan bir hastalıktır. Muktifaktöriyel olan *Diabetes Mellitus*'un insüline bağımlı olmayan diyabet formu ile karakterize edilen monogenik diyabet türlerindedir. Tüm diyabet vakalarının %1-2'lik kısmını oluşturan MODY sıklıkla Tip1 ve Tip2 diyabet ile karıştırılarak yanlış teşhis edilmektedir. Kesin moleküler tanı, hastaların optimal tedavisini sağladığı ve asemptomatik aile üyeleri için erken tanıya olanak sağladığı için önemlidir. MODY ile ilişkilendirilen genlerde delesyonlar ve nokta polimorfizmler beta-hücrelerinde fonksiyon kaybına neden olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde rutin genetik tanıda kullanılan mevcut ve bilinen konvansiyonel yöntemlerin erişilebilirliği, maliyeti, ithal ürün olması gibi pek çok noktada eksiklik bulunmaktadır. Çalışmanın amacı bu eksikliği gidermeye yönelik olarak pahalı ve kapalı devre çalışan kit'in ithalatını düşürmek ve ilgili kitlerin içeriğini sıfırdan tasarlamaktır. Böylece gelecek benzer çalışmalara da temel oluşturacağı düşünülmektedir.

Çalışmanın kapsamı Gençlerin Erişkin Başlangıçlı Diyabeti (MODY, Maturity Onset Diabetes of the Young) genetik tanısında kullanılmak üzere daha düşük maliyet, daha yüksek verim ve daha hızlı süre sağlayan yerli multipleks PZR (çoklu PZR) panel protokolü optimizasyonudur.

Belirlenen amaç doğrultusunda literatürde bildirilen genlere özgü mPZR tasarlamak amacıyla *in-siliko* ve *in-vitro* optimizasyon basamakları uygulandı. *In-vitro* optimizasyon basamağında hacim, polimeraz, döngü koşulları, ek katkı maddeleri gibi parametrelerin çeşitli kombinasyonları ile uygulamalar ve deneyler yapıldı.

Uygulamalar sonucunda elde edilen en verimli protokol Poliakrilamid Jel Elektroforezi yöntemi ile görüntülenmiştir. Tüm ekzonlar başarı ile tek bir set mPZR paneli ile sentezlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mody, Gençlerin Erişkin Başlangıçlı Diyabeti, multipleks polimeraz zincir reaksiyonu, mPZR , optimizasyon.

“mPCR” Optimization For The Next Generation Sequencing (NGS) of The Genes That Have Proven Effects In Maturity-Onset Diabetes Of The Young (MODY)

Dilara DÖRTER

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Muhammed Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) is an autosomal dominant inherited disease that is diagnosed simply during adolescence or young adulthood (before age 25). MODY is one of the non-insulin-dependent monogenic diabetes types of *Diabetes Mellitus*. MODY, which accounts for 1-2% of all diabetes cases, is often confused with Type 1 and Type 2 diabetes and misdiagnosed. Definitive molecular diagnosis is important as it provides optimal treatment of patients and allows early diagnosis for asymptomatic family members. Deletions and single nucleotide polymorphisms in genes associated with MODY have been reported to cause loss of function in beta-cells. There are deficiencies in many aspects such as the accessibility, cost, and imported product of the existing and known conventional methods used in routine genetic diagnosis in our country. The study

aims to reduce the import of the expensive and closed-circuit operating kits and to design the content of the relevant kits from scratch to eliminate this deficiency. Thus, it is thought that it will form the basis for future similar studies.

The scope of the study is the optimization of the domestic multiplex PCR (mPCR) panel protocol, which provides lower cost, higher efficiency and faster time to be used in the genetic diagnosis of Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY).

In line with the determined purpose, *in-silico* and *in-vitro* optimization steps were applied to design mPCR specific to the genes reported in the literature. In the *in-vitro* optimization step, applications and experiments were performed with various combinations of parameters such as volume, polymerase, cycling conditions, and enhancer additives.

The most efficient protocol obtained as a result of the applications was visualized by the Polyacrylamide Gel Electrophoresis method. All exons were successfully synthesized with a single set of mPCR panel.

Keywords: Mody, Maturity Onset Diabetes of the Young, multiplex polymerase chain reaction, mPCR, optimization.

1.1 Literatür Özeti

Dünya’da diyabet hastalığı gün geçtikçe artan bir ivme ile artış göstermektedir. Dokuzuncu Diyabet Atlası’na göre 2019 yılı itibari ile dünyada 463 milyon diyabetli yaşamakta ve 2045 yılında bu sayının 700 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Federation, 2017; Saeedi vd., 2019). IDF (Uluslararası Diyabet Federasyonu) verilerine göre bu sayı her 11 kişiden 1’inin diyabet hastası olduğunu ve her 6 saniyede 1 kişi diyabete bağlı nedenlerle hayatını kaybediyor. Diyabet ve bağlı sebeple 2019 yılında toplamda 4.2 milyon kişi hayatını kaybetmiştir (Federation, 2019).

Diyabete bağlı sağlık harcamaları 2015’te 613 milyar doları, 2017’de ise yıllık 727 milyar doları bulmuştur. Toplam bu harcama küresel sağlık harcamalarının %12’sini oluşturmaktadır. 2017’de yayımlanan 8.Atlastaki tahminlere göre 2045 yılında Türkiye’nin, diyabetli nüfus oranı en yüksek ülkeler sıralamasında ilk 10’a gireceği tahmin edilmektedir. Diyabete bağlı prematüre ölüm ve sakatlık, diyabetin dolaylı maliyeti olarak adlandırılır. Bu ve benzeri diyabet nedenli dolaylı harcamalar ABD’de 69 milyar dolara ulaştığı tahmin edilmektedir (Federation, 2019).

Gençlerde Görülen Erişkin Tipi Diyabeti kısaca MODY hastalığı tüm dünyada bu derece yaygın olan *Diabetes Mellitus* tipi şeker hastalığına göre farklı biyolojik kökene sahiptir. Omim veri bankasına göre insüline bağımlı olmayan Otozomal Dominant kalıtmımlı bir hastalıktır. Hastada insülin seviyeleri normal seviyelerde seyrederken, hastada hiperglisemi gözlenir. Fazla kilo ve obezite ile nadiren ilişkilidir. Diyabet başlangıç yaşı 25 altıdır, ailede 2 veya daha fazla kuşakta diyabet hikayesi mevcuttur. Tüm diyabetli hastaların %1-2’lik kısmını oluşturmaktadır. Dünyadaki toplam diyabetli sayısı göz önüne alındığında bu yüzde anlamlı bir kitleyi oluşturmaktadır

Gençlerde Görülen Erişkin Tipi Diyabet, kısaca MODY, tanısında klinik ve genetik bulgular beraber kullanılır. Hastalığın bildirilen 11 farklı alt tipi bulunmaktadır. Her farklı tip farklı bir gen bozukluğundan sorumlu tutulmaktadır (TEMD, 2020) MODY hastalığında, *GCK*(10 ekzon), *HNF-4A* (10 ekzon), *HNF-1B*(9 ekzon) ve *HNF-1A* (10 ekzon) genlerindeki varyasyonların literatürde bildirilen diğer genlere göre daha yüksek mutasyon frekansına sahip olduğu yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir (Ellard vd., 2008)(Murphy vd., 2008; Valkovicova vd., 2019). ClinVar veritabanına kayıtlı MODY hastalığı ile ilişkisi bildirilmiş olan çeşitli varyasyonlar bulunmaktadır. *HNF-1A* için 355 farklı SNP, *HNF-4A* için 515 farklı SNP, *HNF-1B* için 358 farklı SNP ve *GCK* için 549 farklı SNP bulunmaktadır (“*GCK* [gene] - ClinVar - NCBI”, 2020; “*HNF-4A* [gene] - ClinVar - NCBI”, 2020; “*HNF-1B* [gene] - ClinVar - NCBI”, 2020; “*HNF-4α* [gene] - ClinVar - NCBI”, 2020) . İlgili genlerdeki bildirilen veya henüz bildirilmemiş varyasyonlar tanı için anlamlı kabul edilmektedir.

Tablo 1.1 Gen/Fenotip ilişkisi (Anik vd., 2015)

GEN ADI	FENOTİP	Mutasyon Frekansı	Omim Ref.
<i>HNF4A</i>	MODY TİP 1	%~5	600281
<i>GCK</i>	MODY TİP 2	%20–50	138079
<i>HNF-1A (TCF1)</i>	MODY TİP 3	%20–50	142410
<i>HNF-1B (TCF2)</i>	MODY TİP 5,	%~5	189907

Yapılan patent araştırmasında çalışmaya en yakın patentin Çin menşeli bir firma tarafından alınan “CN106011268A” kodlu bir patentin olduğu görülmüştür. 2016 yılında alınan bu patent ülkelerinde kendi kitlerini üretme çabalarını göstermektedir. Protokol *HNF-1A*, *GCK* ve *KCNJ11* genlerini içermektedir. Yapılan literatür taramasında. Monogenik MODY ve diyabette seçtiğimiz *HNF-1A*, *HNF-4A*, *GCK* ve *HNF-1B* genlerinin etkisi olduğu bildirilirken *KCNJ11* geninin poligenik diyabette etkisi olduğu bildirilmiştir (Vaxillaire ve Froguel, 2008). Patentteki tüm protokol açıkça paylaşılmıştır. Patentte TAKARA polimerazı tercih edilmiştir

(CN106011268A - *MODY type diabetes gene detection kit and mutation site* - *Google Patents*, 2016). TAKARA polimerazı, HotStart reaksiyona uygun olarak modifiye edilmiş, uzun ampikon zincirlerini amplifiye edebilen bir rekombine enzimdir. Deneysel aşamının kurgulanmasında sıcak başlangıçlı polimeraz seçimi, reaksiyon koşulları ve elektroforez gibi noktalarda literatür kaynağı olmuştur. Fakat daha yüksek prevalansa sahip *HNF-1B* geninin dahil olmaması patentin eksikliğidir.

1.2 Tezin Amacı

Kapalı devre çalışan dizileme kitleri yerine optimum verim ile NGS tanısında kullanıma uygun mPZR tasarlamak, yerli tasarım ile dışa bağımlılık düşürülmesi ve daha sonraki çalışmalara örnek, modifikasyona açık bir genetik tanı paneli optimizasyonu hedeflenmektedir.

1.3 Hipotez

Hazır olarak yurtdışından ithal edilen genetik testlerin Türkiye ve Dünya genelinde kullanımı yıldan yıla artmaktadır. Bu durum sağlık sektörünün istemsizce dışa bağımlılığına neden olmaktadır. Bu testleri sağlayan firmaların da dünya genelinde sınırlı sayıda olması ve ülke bazlı fiyat değişimlerinin olması dünyada tekelleşmeye neden olmaktadır.

Çalışma, bu genetik testlerini üreten neden biz değiliz sorusu ile başladı. Çalışmanın kapsamı, içeriği bilinmeyen hazır kitlerinin yerine geliştirilebilir, içeriği sıfırdan üretilecek optimum multipleks PCR protokolü üretme çabasıdır.

Proje sonunda optimizasyonu sağlanan yöntem sayesinde daha uygun maliyette, daha hızlı tanı koymak için ve daha az sarf malzeme kullanılarak sekanslama yapılabilmesi amaçlanmaktadır. Geliştirilecek yöntem ile tek tek sekanslamaya göre el manipülasyonu ve kontaminasyon riskinin azaltılması öngörülmektedir. Gelecekte yürütülebilecek ailelerin üzerindeki genetik tanı ve tarama testlerinin neden olacağı zaman ve mali sarfiyat yerli protokol ile azaltılacaktır. Gelişen gen terapi tedavi yaklaşımları için gelecekte kullanılabilir bir temel oluşturabilecek bir sonuca erişilebileceği düşünülmektedir.

2

GENÇLERİN ERİŞKİN BAŞLANGIÇLI DİYABETİ- MODY

Diabetes Mellitus, hakkında bilinen ilk kanıt MÖ 1550'li yıllardan kalma Mısır'da yazılmış bir papirüstdür. Papirüste, günümüzde diyabet olarak tanımlanan hastalıkla benzer şekilde tanımlanan, idrara çok çıkma ile tanımlanan bir durumdan bahsedilmektedir. “Diabetes” ve “mellitus” kelimeleri ise Latince'den köken almaktadır. Dia-betes, akıp gitmek; Mellitus ise bal kadar tatlı manasına gelmektedir. Diabetes kelimesi ilk kez Anadolu'da Kapadokya'da (MS 2.yy) Arateus tarafından için kullanılmıştır. Halk arasında şeker hastalığı olarak tanımlanan diyabet Arteus tarafından idrar miktarında artma, aşırı susama ve kilo kaybı görülen bir hastalık olarak tanımlanmıştır(Jahangir Moini, M.D., 2019).

Diyabet, insülin salgılanması ve / veya insülinin birincil kusurlara bağlı hiperglisemi ile karakterizedir. Diyabet türlerinin büyük kısmı, poligenik bozukluklar olan tip 1 diyabet (T1D) veya tip 2 diyabet (T2D) olarak sınıflandırılabilir. Monogenik diyabet formları, birincil olarak orta ve şiddetli hiperglisemiye neden olan pankreas beta hücrelerinin fonksiyonel kusurları ile karakterize, nadir görülen gen bozuklukları grubunu temsil eder; MODY, mitokondriyal diyabet ve nadir diyabetle ilişkili sendromik hastalıklar(Jahangir Moini, M.D., 2019).

Diyabet Türlerinin Sınıflandırılması

Tip1 Diyabet β -hücrelerinin yıkımı(otoimmün yıkım), genellikle tam insülin eksikliğine yol açar

Tip1a: Otoimmün, Tip1b: idiyopatik

Tip2 Diyabet Baskın insülin direç aralığı, değişken insülin aralığı, çoğunlukla insülin direnci ile veya dirençsiz görölen insülin salınım bozukluğu

Diğer Türler

- Monogenik Diyabet

β -hücre fonksiyonunda monogenik hasarlar (MODY)

İnsülin çalışmasında monogenik hasarlar

- Ezokrin Pankreas hastalıkları
- Endokrinopati
- İlaç veya kimyasal etkili, örn. Steroidler
- Enfeksiyonlar (bakteriyel veya viral)
- İmmün aracılı diyabetlerin nadir formları
- Diğer genetik sendromlarla ilişkili diyabetler
- Gestasyonel Diyabet

2.1 Tip1 Diyabet

Çocukluk çağı diyabeti olarak bilinen *Diabetes Mellitus* (DM) türlerinden birisidir. Vakalar çocukluk çağı ve ergenlik döneminde yığılım gösterirler. Pankreas β -Hücrelerinde otoimmün veya otoimmün dışı nedenlerle gerçekteşen yıkım sonucu görölen insülin yetmezliği ve hiperglisemi ile karakterize edilen metabolik bir hastalıktır. Hastalar genellikle zayıf ya da normal kilodadır ve insülin üretemedikleri için insülin kullanmalıdırlar. Olgularda 0-25 yaş arasında pankreas β -hücrelerindeki otoimmün yıkım, çevresel faktörlerden ziyade kalıtsal faktörlerin etkisiyle gerçekteşir (Thomas vd., 2016).

Tip 1 DM gelişmesinde 3 önemli neden görölür,

1. Genetik Faktörler, poligenik veya monogenik olabilir.

2. Otoimmünite, kişinin kendi kendisine alerjik yanıt göstermesi ile pankreas β hücrelerinin yıkımı gerçekleşir.
3. Çevresel faktörler, virüsler, kimyasal maddelere maruziyet gibi sebeplerle gerçekleşir.

2.2 Tip2 Diyabet

İleri yaşlarda (35 yaş ve üzeri) ve sıklıkla çevresel faktörlere bağlı olarak ortaya çıkan metabolik bir hastalıktır. Hastalar obeziteye bağlı değişken kan şeker düzeylerine sahiptir ve insülin yetersizliği görülür. Obezite ve hareketsizliğin genç yaşlarda yaygınlaşmasıyla erken yaşlarda da görülebilir. İleri seviye tip 2 DM dışında insülin kullanımı gerekmez ancak şeker seviyesini düzenlemek için ilaç kullanırlar. Başlangıç seviyesinde sağlıklı bir diyet ile tedavi desteklenir.

Tip 2 Diyabeti, hiperglisemi sonucunda oluşur. Hastalarda yüksek glikoz düzeyleri nedeniyle insüline tam yanıt oluşamaz ve hastalarda insülin direnci görülür. İnsülin direnci ile insülin üretimi baskılanır. Artan talep ile yetersiz insülin üretimi pankreatik β -Hücrelerinin iflasıyla sonuçlanır (Federation, 2017). Dolayısıyla direkt genetik ile ilişkili değildir. Tip 2 diyabet günümüzün en yaygın sağlık sorunlarından biridir. Tip 2 diyabet heterojen bir hastalıktır. Göreceli insülin eksikliğine yol açan birçok farklı birincil çevresel ve genetik hasarı temsil ettiğine inanılmaktadır. Tip 2 diyabet, tüm diyabet vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturur (Jahangir Moini, M.D., 2019).

2.3 Monogenik Diyabet

Monogenik diyabet, tek gen üzerinde meydana gelen, mutasyon veya mutasyonlar ile tanı alan dominant veya resesif biçimde ailesel olarak kalıtılabilen ya da de novo olarak görülebilen diyabet türlerinin tamamını kapsar. Monogenik diyabet, genellikle neonatal, çocukluk, adolesan dönemde tanı alır. Çocuklarda hemen hemen tüm monogenik diyabetler, beta hücre fonksiyonunu düzenleyen genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanır, ancak nadiren çok şiddetli insülin direnci ile sonuçlanan mutasyonlar ortaya çıkabilir. Klinik seyri Tip 1 ve Tip 2'den farklı olarak ilerlediği için doğru tanısı önemlidir. Hastalarda insülin seviyesi normal

seyrederken glikoz seviyelerinde artış görülür. Neonatal dönemdeki hiperglisemi hali gelişimi etkiler.

Monogenik diyabet Tip 1 ve Tip 2 diyabete göre çok düşük insidansa sahiptir. Tüm diyabet hastalarının %1,5-2'sini oluşturmaktadır. Orana bakınca düşük görülse de Dünya toplam vakalarına bakınca ciddi düzeydedir. Genellikle Tip1 veya Tip2 ile karıştırılır. monogenik formlar, neonatal *Diabetes Mellitus* (bazen 'bebekliğin monogenik diyabeti' olarak adlandırılır), gençlerin erişkin başlangıçlı diyabeti (MODY) ve diyabetle ilişkili nadir görülen sendromik hastalıklardan geniş bir spektrum sunar(Thomas vd., 2016).

Monogenik Diyabette Klinik Öykü

Monogenik diyabet Tip1 ve Tip2 diyabet ile sıkça karıştırılmaktadır. Ancak klinik öyküde karşılaşılan önem bulgular aşağıdaki gibidir(Carmody vd., 2016);

1. Yenidoğan(neonatal) diyabet öyküsü (hastada ilk 6 ay içinde tanı alan diyabet)
Tip 1 diyabet hastalarının %1'inden azında görülebilir.
2. Ailesel diyabet öyküsü
Tip 1 diyabet hastalarının yaklaşık %2-4'ünde ailesel diyabet öyküsü görülebilir.
3. Genç veya ailesel hafif açlık hiperglisemisi, özellikle gençken tespit edilen stabil, hafif açlık hiperglisemisi olan hastalar bir glukokinaz mutasyonuna sahip olabilir ve spesifik tedavi gerektirmeyebilir.
4. Ek pankreas olguları ile ilişkili diyabet

Klinik tanı ve tedavi için diyabetin monogenik olup olmamasının kesin tanısı önemlidir(Thomas vd., 2016). Bazı durumlarda tedavi spesifik genetik kusurlara göre uyarlanabilir. Gen varyasyonlarının başlıca β -hücre disfonksiyonu yoluyla diyabetle sonuçlandığı çok sayıda diyabet genetik alt tipi tanımlanmıştır. Kalıcı neonatal diyabet, geçici neonatal diyabet veya gençlerin erişkin başlangıçlı diyabeti (MODY) hastalık türleri monogenik diyabet türlerindedir. Bu diyabet türleri de ilişkilendirildiği gene göre farklı alt gruba göre sınıflandırılabilir.

Genetik alt grubun tanımlanması, uygun tedavi, genetik danışmanlık ve prognostik bilgi ile sonuçlanacaktır (Murphy vd., 2008).

Gençlerin erişkin başlangıçlı (MODY) diyabetinde ise tanı daha karmaşıktır. MODY'nin tanımlanmış 14 alt türü olduğu bilinmektedir. Her bir alt türünün ilişkilendirildiği gen farklıdır, dolayısıyla farklı tanı, tedavi ve seyir gözlenmektedir. Kesin tanı, yalnızca klinik yönetimde farklılıklara değil, aynı zamanda farklı komplikasyon risk analizlerine de neden olur. Böylece genetik alt yapısı tanımlanan vakaya daha uygun tedavi, hastalık seyrinin öngörülmesi ve aile taraması ve genetik danışmanlık sağlanır. Örneğin; ailesel ve hafif açlık hiperglisemi glukokinaz (*GCK*) geni ile; ailesel, genç diyabeti ise *HNF-4A* (eski adıyla *TCF1*) ve *HNF-4A* genleri ile, böbrek hastalıkları *HNF-1B* geni ile ilişkilendirilmiştir(Tajudeen O. Yahaya ;Ufuoma, 2020).

2.3.1 MODY (GENÇLERİN ERİŞKİN BAŞLANGIÇLI DİYABETİ)

Erişkin başlangıçlı genç diyabeti tabiri adından da anlaşılabilceği gibi sıklıkla 25 yaş öncesinde çocukluk veya ergenlik döneminde tanı alan dominant olarak kalıtılan diyabet türü olarak karakterize edilir. Klinik olarak heterojen bir hastalık grubudur. Pankreas β -hücrelerinin işlev kaybıyla ilişkilendirilmiş bilinen 17 farklı gen bulunmaktadır. Bu genlerden biri glikolitik enzim glukokinazını (MODY 2 ile ilişkili), ve diğer beş gen ise transkripsiyon faktörü kodlar: hepatosit nükleer faktör (HNF)4a (MODY 1 ile ilişkili), *HNF-4A* (MODY 3), insülin promotör faktör 1 (IPF-1 [MODY 4]), *HNF-1 β* (MODY 5), ve nörojenik farklılaşma faktörü 1 (*NEUROD1*), ayrıca beta-hücre E-box transaktivatörü 2 (BETA2 [MODY 6]) olarak da bilinir(Anik vd., 2015; Fajans vd., 2001).Tüm bu genler sağlıklı β -hücrelerinde eksprese edilir ancak herhangi birinde oluşacak bir varyasyon β -hücrelerde fonksiyon kaybına ve *Diabetes Mellitus*'a yol açar. Bu genler sadece pankreasta değil, çeşitli dokularda da eksprese edilmektedir. Dolayısıyla genlerdeki varyasyonlar o dokularda da -örneğin; karaciğer ve böbrek- anormallikler görülmektedir. MODY çalışmaları, β -hücrelerindeki işlev kaybının nedenlerinin daha iyi anlaşılmasına yol açmıştır.

Farklı Genetik kökenli MODY Tipleri

Mody ile ilişkilendirilmiş bilinen 17 gen bulunmaktadır. İlişkili genlerin literatürde bildirilen detayları tablo 2.1’de verilmiştir.

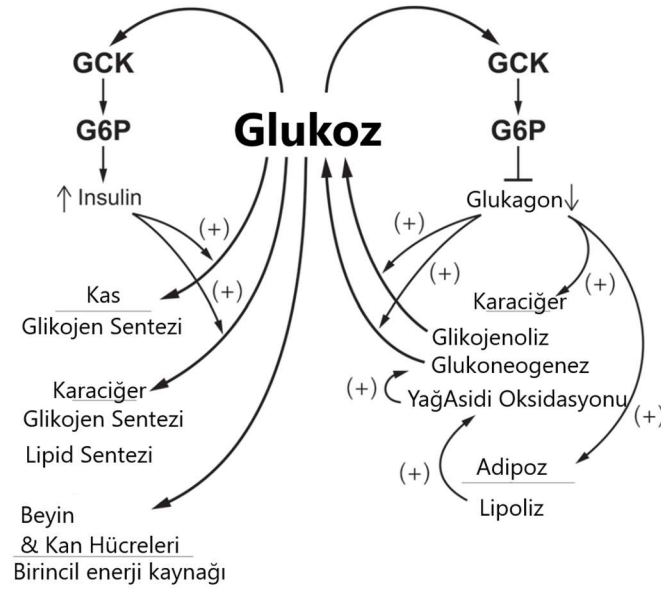
Tablo 2.2 MODY türleri ve ilişkili genler.(Naylor vd., 2018)

MODY TÜRÜ	GEN/FONKSİYON	LOKASYON	PREVELANS/FENOTİP ETKİSİ
MODY 1	<i>HNF-1α</i> / Transkripsiyon Faktörü	20q12	Nadir (Mody’nin %5-10); neonatal hiperinsülinemi
MODY 2	<i>GCK</i> /Glikolitik Enzim	7p15	Yaygın (%30-70); Genellikle Anti-diyabet ilacı gerektirmeyen hafif diyabet
MODY 3	<i>HNF-1A</i> / Transkripsiyon Faktörü	12q24.31	Yaygın (%30-70); yüksek penetrasyon
MODY 4	<i>IPF1/PDX1</i> /Transkripsiyon Faktörü	13q27.92	Nadir (% 1); ortalama tanı yaşı 35
MODY 5	<i>HNF-1β</i> / Transkripsiyon Faktörü	17q12	Nadir (%5-10); diyabet ile beraber ekstra pankreas belirtileri (böbrek kistleri veya displazi, kadınlarda genital anormallikler, erkeklerde azospermi); değişken fenotip; insülin tedavisi gerektirir
MODY 6	<i>NEUROD1</i> /Transkripsiyon Faktörü	2q31.3	Çok seyrek (<%1); erişkin başlangıçlı diyabet
MODY 7	<i>KLF11</i> /Transkripsiyon Faktörü	2p25.1	Çok seyrek (<%1); tip 2 diyabete benzeyen fenotip
MODY 8	<i>CEL</i> /Lipaz	9q34	Çok seyrek (<%1); tipik olarak otozomal dominant diyabet
MODY 9	<i>PAX4</i> /Transkripsiyon Faktörü	7q32.1	Çok seyrek (<%1); olası ketoasidoz
MODY 10	<i>INS</i> /İnsülin Sentezi	11p15.5	Çok seyrek (<%1); 20 yaşından önce diyabet başlangıcı
MODY 11	<i>BLK</i> /B-Hücre reseptör sinyalizasyonu, gelişim ve uyarılması	8p23.1	Çok seyrek (<%1); daha yüksek vücut kitle indeksleri ile artan penetrans

Tablo 2.3 MODY türleri ve ilişkili genler (devamı)(Naylor vd., 2018).

MODY 12	<i>ABCC8</i> /İnsülin sekresyon regülasyonu	11p15.1	Çok seyrek (<%1); klinik fenotip <i>HNF-4A</i> /4A-MODY'ye benzer
MODY 13	<i>KCNJ11</i> /İnsülin sekresyon regülasyonu	11p15.1	Çok seyrek (<%1); klinik fenotip heterojendir
MODY 14	<i>APPL1</i> /Proliferasyon ve Hüresel Sinyal Yolaklarının Regülasyonu	3p14.3	Çok seyrek (<%1)
	<i>ISL-1</i> / Transkripsiyon Faktörü, INS enhansırı	5q11	Çok seyrek (<%1)
	<i>RFX6</i> /Regülasyon Faktörü (beta hücre olgunlaşması ve işlevinde yer alan transkripsiyon faktörlerini düzenler)	6q22.1	Çok seyrek (<%1)
	<i>NK6-1</i> /Transkripsiyon Faktörü	4q21.23	Çok seyrek (<%1)

Glukokinaz(*GCK*) Fonksiyon Kaybı - MODY 2



Şekil 2.1 GSK'nın insülin/glukagon yollarına etkisinin şematik gösterimi(Matschinsky & Wilson, 2019).

***HNF-1 α* Fonksiyon Kaybı-MODY 3**

Hepatosit Nükleer Faktör 1 α -Homeobox A veya eski adıyla TCF-1 (Transkripsiyon Faktör 1) olarak adlandırılan *HNF-1 α* doku spesifik transkripsiyon faktörüdür. *HNF-1 α* ilişkili MODY, en yaygın görülen erişkin başlangıçlı genç diyabetinin alt türlerinden birisidir. MODY3 olarak adlandırılan bu MODY türü çocukluk, ergenlik veya erken yetişkinlik döneminde başlayan, kronik mikrovasküler diyabet komplikasyonları için yüksek risk taşıyan hipergliseminin ilerleyici karakteri olan nonketotik diyabettir. MODY hastalarının %30-50'sini oluşturacak kadar yaygındır ve yüksek penetransa sahiptir (An & Abac, 2015; Valkovicova vd., 2019).

***HNF-1β* Fonksiyon Kaybı-MODY 5**

HNF-1B'de saptanan varyasyonlar, MODY tip 5 dahil olmak üzere böbrek ve böbrek dışı sonuçları olan baskın olarak kalıtsal bir hastalıktan sorumludur. Murin gelişimi evresinde ve yetişkin farelerde, *HNF-1β* pankreas, karaciğer, böbrek ve genital yolların polarize epitelinde dokuya özgü ekspresyona sahip olduğu bildirilmiştir. İnsanlarda yetişkin fenotipi yeterince tanımlanmamıştır. (Wu vd., 2004)

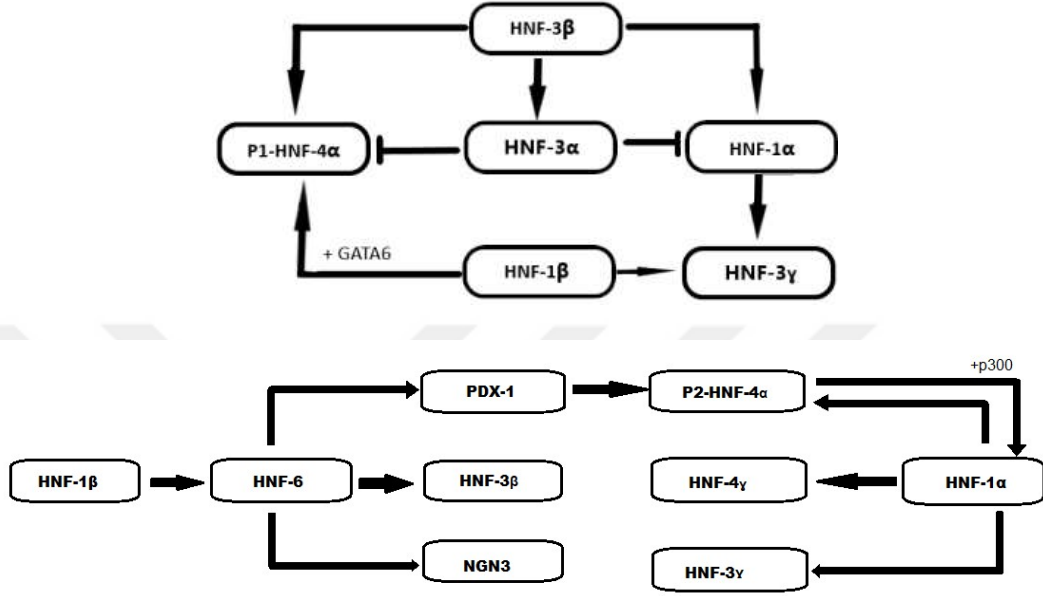
***HNF-4α* Fonksiyon Kaybı-MODY 1**

Doku spesifik gen regülasyonundan sorumlu transkripsiyon faktörlerinden olan *HNF-4α*, iki farklı promotor (P1 ve P2) ile regüle edilir. Farklı promotor kullanımı, alternatif sprints sonucunda yaklaşık 20 farklı izoform oluşur. P1'den *P1-HNF-4α* 1-6; P2'den *P2-HNF-4α* 7-12 izoformları geçici veya doku spesifik olarak sentezlenir. Renal proksimal tübül gelişimi ile ilişkilendirilmiş olan *HNF-4α* genindeki varyasyonların kalıtsal MODY1 'e neden olduğu pek çok kaynakta bildirilmiştir (Lau vd., 2018).

Hepatosit Nükleer Faktörlere Genel Bakış

Homeobox (HOX) ailesindeki genlerden olan HNF'ler pankreas dahil çeşitli organın gelişimi sırasında çok çeşitli kritik faaliyetlerde bulunur. Organların vücudun ön-arka düzlemindeki yapı ve dizilimlerini kontrol eder. Organların anterior-posterior ekseninde konumuna karar verirler. Embriyogenesiste hücrel

farklılaşma aşamasında da görevi olan HNF'ler yapısında homeodomain içeren heliks-turn-heliks yapısına sahip protein kodlar. Görevi itibari ile homeobox gen ailesinden olan HNF genlerindeki olası değişimler ciddi sonuçlar ortaya çıkarabilecek etkiye sahiptir(Cereghini, 1996; Lau vd., 2018).



Şekil 2.2 Hepatosit Nükleer Faktörlerin sinerjik regülasyon şekli verilmiştir.

HNF-4α 'nın P1 ve P2 olarak farklı izoformu bulunması sebebiyle iki ayrı şematik gösterim bulunmaktadır. HNF'ler başlangıçta karaciğerdeki rollerine dayalı olarak ayrı ayrı tanımlansa da çok sayıda çalışma, HNF'lerin birbirlerini çapraz regüle ettiğini ve doku gelişimi ve fonksiyonunun düzenlenmesinde sinerjik ilişkiler sergilediğini ortaya koymuştur (Şekil 2.2). Karmaşık HNF transkripsiyonel düzenleyici ağlar, kemirgen modellerinde büyük ölçüde açıklanmıştır, ancak insan biyolojik sistemlerinde daha az aydınlatılmıştır. Kemirgenlerde tanımlanan bu sistemlerdeki olası heterozigot mutasyonların insanlarda MODY gibi çeşitli hastalıklara neden olduğu ancak kemirgenlerde bu hastalıkların olmadığı bulundu. Dolayısıyla HNF'lerin çalışma mekanizmasının türlere göre değişiklik gösterebileceği ortaya konmuştur(Lau vd., 2018). HNF'ler üzerinde daha detaylı çalışmalar yapılması gereken gen ailesidir. Çünkü mekanizması kemirgenlerde tanımlanmış ve fenotipik etkisi henüz geniş spektrumlu klinik kohort çalışmasıyla tanımlanmamıştır

MODY'DE MOLEKÜLER TANI

MODY'yi *Diabetes Mellitus* türlerinden ayıran en önemli nokta monogenetik diyabet türlerinden birisi olması ve tanı/tedavisinde sağlam adımlarla ilerlenmesi için ailesel genetik tanı gerekmektedir. PZR'nin 1984 yılında keşfinden bu yana moleküler genetik tanı amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Ancak gelişen teknolojilerin de temelinde PZR bulunmaktadır. Günümüzde genetik tanının temel tekniği olan PZR'yi tanımlayan Kary Mullis'i Nature dergisinin reddettiği göz önüne alındığında PZR tekniğinin temel yöntem kabul edilmesi fazlasıyla ironiktir. Nature dergisi PZR'nin en az 10 yıl kullanılmış olmasını talep etse de yalnızca 9 yılda yani 1993 yılında Nobel Ödülünün sahibi olmuştur(K. B. Mullis, 1990; MULLIS & FALOONA, 1989; Kary B. Mullis, 1994).

Sekanslama yöntemlerinden Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojilerinde genellikle ilk basamak olan sekansı klonlamak amacıyla konvansiyonel PZR yöntemleri kullanılır. Bu aşamaya birincil PZR denilir.

3.1 PZR Nedir?

Polimeraz Zincir Reaksiyonu şeklinde tanımlanan PZR, özetle replikasyonun *in-vitro* olarak gerçekleştirilmesidir. DNA polimerizasyonundan sorumlu DNA polimeraz enziminin DNA'yı kopyalaması bir sır değildi. Fakat sıcaklık döngüsü ile kontrollü çoğaltma fikri Kary Mullis (1984) tarafından tanımlanan bir yöntem oldu. PZR yönteminin öncesinde kullanılan restriksiyon enzimleri ile kesime dayalı teknikler yüksek miktarda kalıp DNA numunesi gerektirirken, PZR ile kısa sürede milyonlarca kopya DNA fragmanı kopyalanabilmektedir. Az sayıda kalıp DNA ile başlayan reaksiyonun her döngüsünde DNA eksponensiyel (2^n) olarak çoğaltılır(Joshi & Deshpande, 2011).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu basamakları;

Denatürasyon, Kalıp DNA zincirinin açıldığı basamaktır. In-vivo'da helikazların açtığı kalıp DNA zincirleri sıcaklığın etkisi ile birbirinden ayrılır. Deoksiribonükleotid moleküllerinde nükleotidler birbirlerine hidrojen bağı ile tutunur. Hidrojen bağı kimyasal bir bağ değildir. Hidrojen bağı, bağ olarak adlandırılmasına karşın elektiriksel bir etkileşimdir. DNA'ya 90°C'nin üzerinde sıcaklık uygulanması ile çift zincirli DNA kolaylıkla ayrılabilir. (DNA molekülünün boyutuna ve kompozisyonuna bağlı olarak süre ve sıcaklık değişecektir.)

Tutunma (Annealing) Hedef bölgeye spesifik kısa oligonükleotidlerin, yani primerler, hedef tek zincirli DNA'ya tutunma aşamasıdır. Primer çifti, kalıp DNA'nın 3' ve 5' ucuna komplementerdir. Uygun tutunma koşulları ile primerler DNA'ya tutunur ve uzama için uygun 3'OH grubunu sağlar. Tutunma sıcaklığı, primerlerin boyut ve kompozisyonuna bağlı olarak hesaplanan erime sıcaklığı ile hesaplanır.

Uzama (Ekstensiyon) Uzama aşaması DNA polimeraza bağlıdır. Enzimin çalıştığı ve polimerizasyonun gerçekleştiği basamaktır. Primerlerin 3'OH grubuna eklenen dNTP'ler ile uzama sağlanır, yeni DNA Fragmanları sentezlenir. Termostabil enzimler genellikle 70-72°C'de sentez yapmaya uygundur.

Zincir kelimesinden de anlaşılacağı üzere PZR'de yukarıdaki 3 basamak art arda 25-40 döngü ile sentez gerçekleşir.

3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bileşenleri

Polimeraz Zincir Reaksiyonunu temelde 4 ana bileşen gerçekleştirir; kalıp DNA, dNTP karışımı, DNA polimeraz, primer çifti. Ancak reaksiyon koşullarını sağlamak için tamponlar ve enzim kofaktörleri de dahil edilir. Sayılan 6 bileşen olmadan reaksiyon gerçekleşmeyecektir. PZR değişkenlerinde ufak manipülasyonlar reaksiyonun türünü değiştirir. Optimum reaksiyonun gerçekleşebilmesi için değişkenlerde optimizasyon basamakları çok önemlidir (Najafov & Hoxhaj, 2016; Roux, 2009; Walker vd., 1999).

3.2.1 Kalıp DNA

Hedef DNA sekansını içeren çift veya tek zincirli olabilen DNA dizisidir. Kalıp DNA'nın içeriği, miktarı, konsantrasyonu, kompleksliği, yapısı, boyutu, denatürasyon düzeyi ve kontaminant içerip içermemesi PZR'nin çalışmasını ve verimini direkt etkiler. Halkasal, lineer olabilir. Ancak halkasal DNA molekülleri lineer dizilere göre daha düşük verimle amplifiye edilir.

Kalıp DNA, ampikonun bir bütün halinde sentezlenebilmesi için, kalıp DNA'daki hedef bölgenin kırksız bir bütün olması gerekmektedir. DNA kaynakları değişebilir. Kaynağa bağlı olarak kalıp DNA denatüre olmuş veya kontamine olmuş olabilir. Bu sebeple kalıp DNA'nın kaynak ve yapısına bağlı olarak izolasyon tekniği seçilir. Kontaminasyon varsa reaksiyona etki edip etmeyeceği değerlendirilmelidir. Örneğin, kan izolasyonunda numuneye bulaşan EDTA reaksiyonun inhibisyonuna neden olacaktır.

DNA molekülünün boyutu reaksiyon açısından kritik öneme sahip değildir. Ancak yüksek moleküler ağırlıklı (10kb den büyük) DNA molekülleri restriksiyon enzimleri ile kesilmesi gömülü hedef diziye ulaşımı arttıracaktır. Dikkat edilmesi gereken nokta hedefin kesilmemiş bir bütün halinde bulunmasıdır.

3.2.2 Primer

Primerler hedef fragmanın 3' ve 5' ucuna komplementer 18-24 bç uzunluğunda tek zincirli DNA parçalarıdır. Denatürasyon aşamasından sonra DNA'ya tutunur. Replikasyondaki okazaki fragmanların uzadığı şekilde primerin 3'oh ucundan

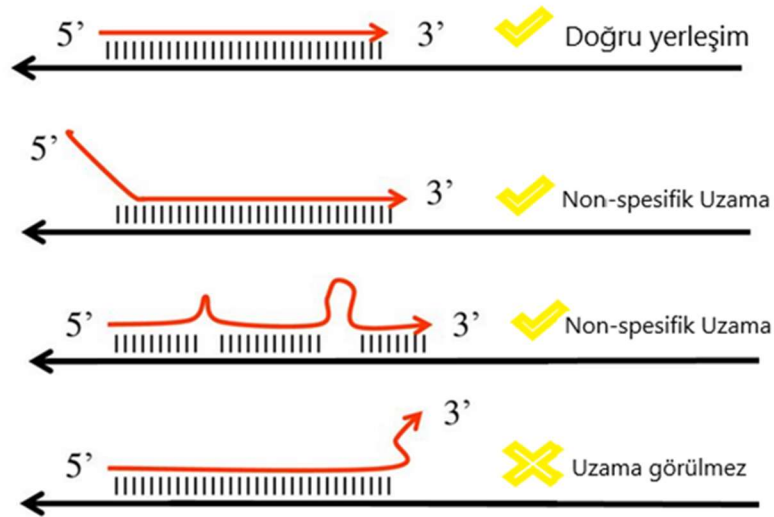
uzama gerçekleşir (şekil 3.1). Optimizasyon ve reaksiyonun gerçekleşmesi için en kritik değişkenlerden birisidir. Primer çiftleri uygun T_m sıcaklığına sahip olmalıdır. Reaksiyonu inhibe edecek sekonder yapıları oluşturmamalıdır (Sint vd., 2012).



Şekil 3.1 Amplifikasyon yönünün şematik çizimi.

Primer Optimizasyonu

Primerler sonuç ürüne ulaşmada spesifiteyi arttıran en önemli değişkendir. Fragmanın 3'-5' ucuna tam komplementer bağlanmalı ve istenmeyen amplikonların sentezinden kaçınılmalıdır. Primerler kısa DNA fragmanıdır ve dolayısıyla primer dimerleşmesi, saç tokası yapısı gibi sekonder yapılar oluşturabilecektir(Yang vd., 2013).



Şekil 3.2 Hedef diziyeye olası primer bağlanma biçimleri

Uzama olabilmesi için 3'ucunun komplementer olması yeterlidir. Primerin kısmen tutunması ile istenmeyen bölgelere bağlanan primerlerden kaynaklı istenmeyen

non-spesifik olarak adlandırılan amplikonlar görülebilir (Şekil 3.2). Spesifiteyi arttırmak amacıyla tutunma sıcaklıklarında optimizasyon gereklidir. Bu amaçla Touch-down PZR, Gradient PZR gibi yöntemler geliştirilmiştir(Henegariu vd., 1997; Roux, 2009). Optimum PZR için gerekli olan primer nitelikleri tablolaştırılarak tablo 3.1’de verildi.

Tablo 3.1 Optimum PZR için gereken primer nitelikleri.

Primerlerin Nitelikleri:	Primer Tasarımı
Spesifiklik	
Hedef Sekansa %100 uyumlu olmalı hedef dışı bağlanmamalıdır.	Tek, özgün Uzunluk Baz Kompozisyonu İnternal Stabilite
Stabilite	
PZR koşullarında DNA ile stabil hibridizasyon oluşturmalıdır.	Erime Sıcaklığı (T _m) Tutunma Sıcaklığı İnternal yapı
Uyumluluk	
Primer çiftleri aynı reaksiyon içinde çalışacakları için eşit değerlere sahip olmalıdır.	Primer çiftinin uyumu

3.2.3 DNA Polimeraz

Tüm reaksiyonu gerçekleştiren enzimdir. Enzim sıcaklık döngüsüne dayanabilmeli ve yüksek sıcaklıkta çalışabilmelidir. Yani termostabil olmalıdır. İlk tanımlanan enzim Taq polimeraz, termofilik öbakteriyal mikroorganizma *Thermus aquaticus*'dan izole edilmiştir. Ardından yapılan çalışmalarda farklı organizmalardan izole edilmiş formları ve gelişen teknoloji ile modifiye edilmiş formları üretilmiş ve kullanılmıştır(Jeong vd., 2008).

Polimeraz Optimizasyonu

Reaksiyonda polimerizasyondan sorumlu öge polimerazdır. Yapılacak çalışmaya göre dört temel özellikten hangisi veya hangilerine sahip enzime ihtiyaç olduğu belirlenmelidir.

Termalstabilite, Enzimler polipeptid dizilerden oluşur. Denatürasyon aşamasındaki 90-95°C yüksek sıcaklığa sürekli ve uzun süre maruziyet polipeptitlerin yapısını bozar. Dolayısıyla termalstabilite reaksiyonun verimli sonuçlanabilmesi amacıyla polimeraz seçiminde önemli bir etkidir.

Uzama oranı (baz/sn), Enzimin her bağlanmada saniye başına baz bağlama oranıdır.

Doğruluk (Fidelity, polimeraz hata olasılığı), Yanlış eşleşmiş nükleotidleri düzeltme kabiliyeti.

İşleyebilirlik (Processivity), Kalıptan ayrılmadan kalıba ilave ettiği nükleotid sayısı.

Reaksiyonda denatürasyon basamağından önce istenmeyen bölgelere bağlanan primerlerden uzama görülebilir. Bu sebeple D'Aquila, R. T. (1991) ekibiyle yaptığı çalışmada sıcak ortamda başlatılan reaksiyonun istenmeyen ampikon görülmesini engellediğini ortaya koymaktadır. 1992 yılında Quin Chou ve ekibi tarafından benzer başka bir çalışma ise bu fikri desteklemektedir. Quin Chou ve ekibi PZR tüpünün dibine primer ve magnezyum karışımı eklemiş, üstünü ise bir mumsu bariyer ile kaplamış ardından tüpün üstüne tampon, DNA ve polimeraz eklemiştir. Ancak tüp 94°C de bir süre ısıtılıp mumsu tabaka tüpün üst fazına çıkınca reaksiyon gerçekleşmektedir. Yüksek sıcaklıkta istenmeyen hibritleşmeler olmadığından reaksiyon spesifitesi artmaktadır.

Günümüz teknolojisi ile modifiye edilen hot-start DNA polimeraz enzimlerinin üretilmesi bahsi geçen tüm adımların tarihe karışmasına neden olmuştur. Aç-kapat-ekle yapmak kontaminasyon riskini arttıracaktır. Reaksiyonu modifiye

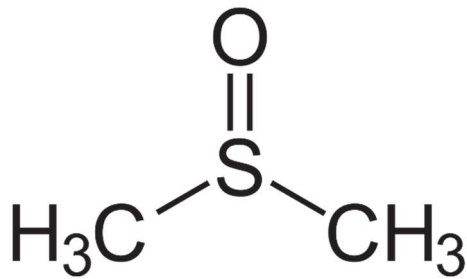
edilmiş rekombinant Hot-Start Polimeraz ile gerçekleştirmek kontaminasyon riskini düşürecektir(Kainz vd., 2000; Qiagen, 2010a).

3.2.4 Tampon/Reaksiyon Koşulları

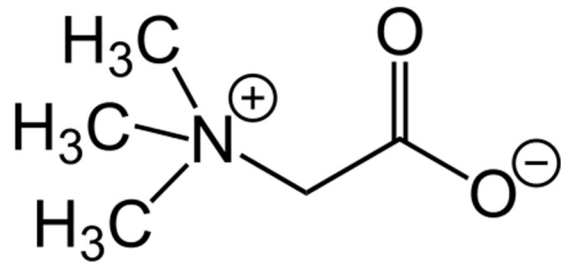
Kimyasal reaksiyonlarda ortam koşulları direkt veya indirekt şekilde reaksiyonu etkiler. Polimeraz zincir reaksiyonu da kimyasal reaksiyon olduğu göz önüne alındığında nükleusta doğal koşullarda sentez yapan polimeraza uygun ortam sağlanmalıdır(Henegariu vd., 1997; Markoulatos vd., 2002). Monovalent tuzlar, asidik/bazik ortam, elektrolit dengesi gibi değişkenler enzimin çalışmasını etkiler ve reaksiyonu inhibe edebilir.

Ek Katkı Maddeleri ile Optimizasyon

Reaksiyona ek katkı maddeleri dahil edilebilir. Yaygın bir sorun olarak bazı DNA bölgelerinde güçlü sekonder yapı oluşumları görülür. Bu bölgelerde GC açısından zengin DNA dizilerinin bulunduğu ve amplifikasyon için optimizasyon gereken bölgelerdir(Karunanathie vd., 2022). GC açısından zengin diziler, kararlı ikincil yapıların oluşmasına izin veren yüksek dubleks erime sıcaklığı nedeniyle, yüksek termal ve yapısal stabiliteye sahiptir, böylece güvenilir bir replikasyonun tamamlanmasını engeller. Örneğin, hedef bölge guanin sitozince zenginse amplifikasyon verimi düşük olabilir.



DMSO (Dimetil Sülfoksit)



Betain (N,N,N-trimetilglisin)

Şekil 3.2 DMSO (Dimetil Sülfoksit) ve Betain (N,N,N-trimetilglisin) ajanlarının kimyasal yapısı.

Arttırmak için betain veya DMSO kullanılabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Betain(N,N,N-trimetilglisin) ve DMSO(Dimetil Sülfoksit) PZR'de verim arttırıcı olarak en yaygın kullanılan ajanlardır. Sıklıkla PCR amplifikasyonlarının standart optimizasyonunun bir parçası olarak reaksiyona katılırlar. Bu ajanların her ikisi de iplik ayrılmasını kolaylaştırır; DMSO baz eşleşmesini bozarken, bir izostabilize edici ajan olan betain, GC- ve AT-baz eşleşmesinin DNA dupleksinin stabilitesine etkisini dengeler(Frackman vd., 1998; Henke vd., 1997).

Hali hazırda mevcut olan bilgilerle, belirli bir hedef için hangi güçlendirici ajanın en iyi olduğunu tahmin etmek mümkün değildir, bu nedenle birkaç farklı katkı maddesinin ve kombinasyonunun test edilmesi gerektiği bildirilmiştir.

3.2.5 dNTP Karışımı

DNA'nın doğal yapısında bulunan nükleotidler, hücrede serbest bulunan formu olan deoksinükleotid tri-fosfat (dNTP)'lar reaksiyona dahil edilir. Polimerizasyonun monomerleridir. Karışımın içinde; adenin tri-fosfat, Guanin tri-fosfat, timin tri-fosfat ve sitozin tri-fosfatlar bulunur. Nükleotidler tek yönde (5'-3') zincire bağlanır. Konvensiyonel PCR'da kalıp DNA'ya komplementer uzama sürdükçe bağlanan nükleotid 3'OH bağlanma bölgesi sağlar. Fakat reaksiyon amacına göre modifiye edilmiş formları mevcuttur. Uzun amplicon amplifikasyonunda dNTP miktarı arttırılmalıdır(Markoulatos vd., 2002).

3.2.6 Polimeraz Kofaktörü-Magnezyum

Taq DNA polimeraz magnezyum-bağımlı çalışan bir enzimdir. Reaksiyonun çalışması ve verim için Mg konsantrasyonu kritik bir öneme sahiptir. Optimum Mg konsantrasyonu dNTP konsantrasyonu, DNA polimeraz ve primer/kalıp DNA'ya göre değişkenlik gösterir(Yang vd., 2013). Aşırı Mg konsantrasyonunun kullanılması, DNA çift sarmalını stabilize eder ve DNA'nın denatürasyonunu önler. Ayrıca primerlerin tutunmasını yanlış doğru fark etmeksizin stabilize eder. Yanlış bağlanma durumunda özgünlüğü azaltır. Tüm bunlar karşın yetersiz Mg konsantrasyonu yetersiz amplicon ürününün sentezine neden olarak verimi düşürür(Markoulatos vd., 2002; Roux, 2009).

Bileşenler polimeraz zincir reaksiyonunun olmazsa olmalarıdır. Ancak bu bileşenlerdeki küçük büyük değişimler reaksiyonun tanımlamasını da değiştirir. Amplikon boyutu, sayısı, kesilerek veya izole edilerek hazırlanan kalıp veya amplikon kesimi ve hatta birden fazla primer çifti içeren reaksiyon kombinasyonları gibi birçok değişken reaksiyonun türünü ve protokolünü değiştirir. Örneğin, tezin konusu da olan PZR türü çoklu(multipleks) PZR birden fazla primer çiftinin gerçekleştirdiği reaksiyondur.(Markoulatos vd., 2002)

3.3 Multipleks (Çoklu) Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İlk tanımlanması mltipleks DNA amplifikasyonu şeklinde olan mPZR, 1988 yılında Chamberlain ve ekibi tarafından yayımlanan makalede tanımlanmıştır. 1988 yılında bildirilen ilk makalede 60 ekzona sahip *DMD*'nin, prenatal ve postnatal tanıda yaşanan teknik kısıtlılığının daha kısa ve basit bir mltipleks DNA amplifikasyonu ile aşılabileceği bahsedilir. (İnsan genomunun en uzun genlerinden olan *DMD* geni NCBI veri bankasında bildirilen *NM_004006.3* kodlu güncel referans dizisine göre 79 ekzona sahiptir.) Chamberlain ve arkadaşları belirledikleri 6 delesyon bölgesine spesifik primer tasarlamışlar ve ilgili amplikon jelde görüntülenememesinin delesyon varlığının bir kanıtı olarak öne sürmüşlerdir (Chamberlain vd., 1988).

Günümüzde mPCR enfeksöz tanısı, Yeni Nesil Dizileme gibi çeşitli alanlarda kullanılır. Çünkü zaman, sarf, maliyet konusunda daha kazançlı bir tercihtir. Tekli polimeraz zincir reaksiyonu, klasik bir PZR cihazında yalnızca 96 reaksiyon gerçekleştirilebilir. Ancak çoklu PZR ile tek bir tüpte çok sayıda reaksiyon aynı anda gerçekleştirilebilecektir. Böylece el manipülasyonu ve kontaminasyon riski de düşecektir. Tek tüpte birden fazla reaksiyonun gerçekleştirilmesi birden fazla optimizasyon basmağı içermektedir (Edwards & Gibbs, 1994; Sint vd., 2012).

4.1 Materyal**4.1.1 Kullanılan Kitler/Kimyasallar**

	Katalog Numarası
VitaTaq HS Multiplex Kit	test sample
Thermo Scientific™-Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/ μ l)	EP0401
Qiagen-HotStarTaq DNA Polymerase (5000 U)	203207
Betain Solüsyonu	CAS Numarası: 107-43-7 (sigmaaldrich.com)
DMSO (Dimetil sulfoksit)	CAS Numarası: 67-68-5 (sigmaaldrich.com)

4.1.2 Kullanılan Genetik Materyal

	Katalog Numarası/Kodu
Human Reference DNA, Female	5190-3797 agilent

4.1.3 Kullanılan Biyoinformatik Araçlar

Ensembl Genome Browser-	https://www.ensembl.org/index.html
Primer3web version 4.1.0	https://primer3.ut.ee/
Sequence Manipulation Suite:PCR Primer Stats	https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html

UCSC In-Silico PCR <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>

MFEprimer 3.1 <https://mfeprimer3.igenetech.com/spec>

IGV - Integrative Genomics Viewer <https://igv.org/>

İmageJ – İmage Processing And Analysis in Java <https://imagej.nih.gov/ij/>

DNA: DNA Materyali, denemelerde DNA farkı bir parametre olarak etki etmemesi açısından sağlıklı kadın referans DNA'sı kullanıldı. Bu sebeple DNA kaynağı etik bir kaygı oluşturmamaktadır.

Primerler: Primerlerin in siliko optimizasyonu ardından primer sentezi Macrogen firması tarafından gerçekleştirildi. Primerler liyofilize halde teslim alındı. Stok primerler 25 nmol'den 5 nmol hacme sulandırılarak kullanıldı.

4.2 Metod

Çalışma *in-siliko* tasarım ve ardından *in-vitro* uygulamaları içermektedir. 3 ana başlık ve çeşitli alt uygulama başlıklarından oluşmaktadır.

Genel Çalışma Planı;

1. Biyoinformatik Tasarım
 - 1.1. Gen/Gen Dizisi Belirleme
 - 1.2. Primer Tasarımı ve Primer Havuzu oluşturma
 - 1.3. Primer Analizi
2. *İn-Siliko* Optimizasyon
 - 2.1. *İn-Siliko* Multipleks PZR ile primer/tüp dağılımı
3. *İn-Vitro* Optimizasyon
 - 3.1. *İn-Vitro* primer kontrolü:
 - 3.2. *İn-Vitro* Multipleks Polimeraz zincir Reaksiyonları:
 - 3.3. PZR Ürünlerinin Konfirmasyonu

İn-Siliko Tasarım; biyoinformatik tasarım ve in siliko optimizasyon aşamasını içeren ıslak laboratuvar uygulaması öncesindeki hazırlık aşamasıdır.

4.2.1 Biyoinformatik Tasarım

Biyoinformatik tasarım aşaması belirlenen hastalık ile ilişkilendirilmiş 4 genin güncel referans dizilerine komplementer primer çiftlerinin tasarlandığı, primer havuzunun oluşturulduğu ve reaksiyona uyumunun değerlendirildiği aşamadır.

4.2.1.1 Gen dizisi belirleme (Ensembl Genome Browser- <https://www.ensembl.org/index.html>)

- Hastalık tanısı ile uyumlu genlerin belirlenmesi amacıyla literatür taraması yapıldı.

Literatüre uyumlu olarak ilgili genlerin en güncel dizi aşağıdaki tablodaki verildiği şekliyle belirlendi.

Tablo 4.1 MODY ile ilişkilendirilmiş 4 gen için belirlenen referans diziler.

Gen Adı	Ekzon sayısı	Transkript (Ensembl)	NCBI Referans sekans	Ensembl ID
<i>GCK</i> (Glukokinaz)	10	<i>GCK-202-</i> ENST00000345378.7	NM_000162.5	ENSG00000106633
<i>HNF-1α</i>	10	<i>HNF-1A</i> -201 ENST00000257555.11	NM_000545.8	ENSG00000135100
<i>HNF-1β</i>	9	<i>HNF-1B-201</i> ENST00000613727.4	NM_000458.4	ENSG00000275410
<i>HNF-4α</i>	10	<i>HNF-4A</i> -201 ENST00000316099.9	NM_000457.5	ENSG00000101076

4.2.1.2 Primer Tasarımı ve Primer Havuzu Oluşturma (<https://primer3.ut.ee/>)

- Dizilere komplementer olan, aynı reaksiyon koşullarında çalışmaya uyumlu;
- Uyumlu erime (Tm) sıcaklığına sahip
- Primerlerin 18-22 nt aralığında ve ampikonların yakın uzunluklarda olmasına özen gösterildi.

Web tabanlı primer tasarımı programı olarak, Primer3web aracı kullanıldı (Köressaar vd., 2018). Ekzon bölgelerinin ve intronların ekzona yakın minimum 30 nükleotid içeren bölgelerini içerecek şekilde her bir ekzon için birden fazla primer çifti içeren primer havuzu oluşturuldu. Primerlerin erime sıcaklıklarının denk ve 60°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) olmasına özen gösterildi.

4.2.1.3 Primer Analizi:

- Primer çiftlerinin reaksiyona uyumunun değerlendirildi. (https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html)

Primer çiftlerinin, Primer Stats adlı algoritma ile PZR'ye uygun özelliklere sahip olup olmaması, erime sıcaklığı (T_m), GC(Guanin/Sitozin) yoğunluk yüzdesi değerlendirildi. Algoritma ile primer çiftleri arasında oluşabilecek sekonder yapı tahmini yapıldı. Olası sekonder yapı oluşturacak ve fragmana bağlanma afinitesini arttıracak yüksek GC yoğunluğuna sahip primerler primer havuzundan çıkarıldı (Stothard, 2000).

- In Siliko PZR: Primerlerin hedef diziye spesifitesinin değerlendirildi. (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>)

İnternet tabanlı in siliko PZR ile her bir ekzon için primer çiftlerinin genom üzerinde tek bir hedefe spesivitesi kontrol edildi(Kent vd., 2002). Bu aşamada UCSC In-Silico PCR veritabanında en güncel insan genomu olan 2013 (GRSh38/hg38) verisi kullanıldı. Güncel insan genom verisinden elde edilen amplikon boyutu ve 57-63°C T_m sıcaklığına sahip primer çiftleri belirlendi. Primerlerin T_m sıcaklığı ve amplikon boyutu ilgili değerlendirme sonucuna göre primer havuzu tablosuna eklendi.

4.2.2 In Siliko mPZR Optimizasyonu:

Primer Seçimi amacıyla *in-siliko* Çoklu PZR yapıldı(Shen vd., 2010; Wang vd., 2019).(<https://mfprimer3.igenetech.com/spec>)

- Primer havuzundan uyumlu T_m sıcaklığındaki primerler seçildi.
- Çeşitli kombinasyonlar ile uyumlu primerler belirlendi.

Multipleks PZR'ye in siliko olarak optimum primer listesi tablo 4.2, tablo 4.3, tablo 4.4 ve tablo 4.5'te verildi.

Tablo 4.2 Sentezlenen GCK (glukokinaz) primerleri.

PRİMER ADI	AMPLİKON BOYUTU (bç)	PRİMER DİZİSİ	Tm DEĞERİ(°C)
GCK-1F		ctgaacctcaaaccccaaac	59,4
GCK-1R	327	ctggcaagacccttctcaaa	60,4
GCK-2F		ggggtcagaagacagaagga	59,2
GCK-2R	473	aggagccaagggtgagaact	60,3
GCK-3F		tgccttcctctctctct	59,9
GCK-3R	400	ctgaggctgggtgtctct	61,3
GCK-4F		cggaagaggagaggaaact	59,8
GCK-4R	382	ccagatctccttctgagca	60,5
GCK-5-6F		cgttcccaaacctctcaaa	60,1
GCK-5-6R	594	accaggctctgctctgacat	60
GCK-7F		cactgaagcaaccaggctct	60,3
GCK-7R	476	cagtttgcttttccccagag	59,8
GCK-8F		gagggaagacgtgaaccag	59,7
GCK-8R	438	aggcctagtttcccatcc	60,3
GCK-9F		gctcagcgagggaagag	58,8
GCK-9R	482	gggggacgagaagaggacta	60,6
GCK-10F		ggttccaagctccaagatt	60,4
GCK-10R	447	ctctgttccccagcggtat	60,1

Tablo 4.3 Sentezlenen *HNF-1A* primerleri.

PRİMER ADI	AMPLİKON BOYUTU (bp)	PRİMER DİZİSİ	T_m DEĞERİ(°C)
<i>HNF-1A -1F</i>		tgcaaggagtttggtttgtg	59,7
<i>HNF-1A -1R</i>	528	tggggactcaactcagaagg	60,2
<i>HNF-1A -2F</i>		tgcaaggagtttggtttgtg	59,7
<i>HNF-1A -2R</i>	370	tggggactcaactcagaagg	60,2
<i>HNF-1A -3F</i>		aagaatcaagggaaggctca	59,7
<i>HNF-1A -3R</i>	372	ggcaactggacagcctttta	60,2
<i>HNF-1A -4F</i>		ggcagagctcagcttctcag	60,6
<i>HNF-1A -4R</i>	455	catgaatggaatggaaccaa	59,2
<i>HNF-1A -5-6F</i>		<i>gcctaagcaaaccaatggag</i>	<i>59,7</i>
<i>HNF-1A -5-6R.</i>	669	atgagtcccagtggtcttc	59,3
<i>HNF-1A -7F</i> ¹		ctctgggaaggagaggtggt	60,6
<i>HNF-1A -7R</i>	397	gtcccagagacacatgcaga	59,8
<i>HNF-1A -8-9F</i>		agtcttgaggcctgggacta	58,9
<i>HNF-1A -8-9R</i>	499	agaaggggtgggaccaaca	62,7
<i>HNF-1A -10F</i>		tgagtaccctagggacagg	59
<i>HNF-1A -10R</i>	355	gatgcatcagagcagagtgg	59,5

¹ HNF-1A-7F ve HNF4A-4F primerleri dimer oluşturmaktadır.

Tablo 4.4 Sentezlenen *HNF-1B* primerleri.

PRİMER ADI	AMPLİKON BOYUTU (bp)	PRİMER DİZİSİ	T_m DEĞERİ(°C)
<i>HNF-1B-1F</i>		atttggggtttgcttgtaa	60,3
<i>HNF-1A-1R</i>	580	ggtgtgggagagaagcaga	60,4
<i>HNF-1B-2F</i>		aggtagcaccctagaaaaag	60,0
<i>HNF-1B-2R</i>	443	atccattgtacagcaaccacc	59,7
<i>HNF-1B-3F</i>		tcgtccgttgctgtctgtc	59,9
<i>HNF-1B-3R</i>	492	attggggttctgtggaacat	59,1
<i>HNF-1B-4F</i>		gattggccttttctctgcat	59,3
<i>HNF-1B-4R²</i>	599	aatggctgaaccaggagttg	60,1
<i>HNF-1B-5F</i>		ctggagaaaagcagccgata	60,5
<i>HNF-1B-5R</i>	481	ctgggtcaccagcactacct	60,2
<i>HNF-1B-6F</i>		accatgccagccaataat	60,2
<i>HNF-1B-6R</i>	498	ggatccaaatccattccaca	60,5
<i>HNF-1B-7F</i>		tccaagtctccgtttctttaca	58,9
<i>HNF-1B-7R</i>	500	tgagaaattgtcttagtcggttga	60,2
<i>HNF-1B-8F³</i>		gtctctccctcacagccaag	60
<i>HNF-1B-8R</i>	481	aggattcccttgcaaaaa	59,5
<i>HNF-1B-9F</i>		gaagtgtgcctcagcatgaa	60
<i>HNF-1B-9R</i>	470	aggttccttgctctccacct	60

² *HNF-1B-4R* ve *HNF4A-7F* primerleri dimer oluşturmaktadır.

³ *HNF-1B-8F* ve *HNF4A-9F* primerleri dimer oluşturmaktadır.

Tablo 4.5 Sentezlenen *HNF-4A* primerleri.

PRİMER ADI	AMPLİKON BOYUTU (bp)	PRİMER DİZİSİ	Tm DEĞERİ(°C)
<i>HNF4A-1F</i>		cctccacccttcacagag	60,7
<i>HNF4A-1R</i>	387	attctctcccaccccaaag	62,5
<i>HNF4A-2F</i>		ggaggtgatggagtgggaac	61,7
<i>HNF4A-2R</i>	440	acaaaaccagaagagccttga	59
<i>HNF4A-3F</i>		atgagagcactgaggttggg	60,3
<i>HNF4A-3R</i>	370	ccgctccctatggtcagatt	61,4
<i>HNF4A-4F</i> ¹		ctgatgtgggctgttctct	60,3
<i>HNF4A-4R</i>	393	gcaaactgggccatgtgaaa	64,2
<i>HNF4A-5F</i>		caccactatccagcccc	61,3
<i>HNF4A-5R</i>	374	aaaatcaagccagtccacgg	62,3
<i>HNF4A-4-5F</i>		ctgatgtgggctgttctct	60,3
<i>HNF4A-4-5R</i>	1192	aaaatcaagccagtccacgg	62,3
<i>HNF4A-6F</i>		caggcaggtagaggcagag	58,7
<i>HNF4A-6R</i>	300	acccttgcattgccacat	62,4
<i>HNF4A-7F</i> ²		caccagctatcttgccaact	58
<i>HNF4A-7R</i>	373	cctctctggctgtcgtaa	60,4
<i>HNF4A-8F</i>		tggttgttgaggtccctgaa	61,5
<i>HNF4A-8R</i>	470	caaggagctgaggggtgag	60,9
<i>HNF4A-9F</i> ³		ttggatgggctggttgattg	64,1
<i>HNF4A-9R</i>	368	accagaaaactgttgcattcc	61,3
<i>HNF4A-10F</i>		gggtgggaggggagaact	61,3
<i>HNF4A-10R</i>	390	ccttaggccatgttctcggg	64

- *İn-Siliko* Multipleks PZR ile primer/tüp dağılımı belirlendi. İstenmeyen sekonder yapı oluşturması olası primerler ayrı tüplere alındı. Hazırlanan primer/tüp dağılım tablosu tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6 Primer/tüp dağılım tablosu.

1. TÜP	2. TÜP	3. TÜP	4. TÜP	5. TÜP	6. TÜP	7. TÜP
<i>HNF4A</i> -6 300	<i>HNF4A</i> -9 368	<i>HNF1A</i> -2 370	<i>HNF4A</i> -3 370	<i>HNF1A</i> -3 372	<i>HNF4A</i> -7 373	<i>GCK</i> -1 327
<i>HNF1A</i> -10 355	<i>GCK</i> -4 382	<i>HNF4A</i> -4 393	<i>HNF1A</i> -7 397	<i>HNF4A</i> -10 390	<i>GCK</i> -3 400	<i>HNF4A</i> -5 374
<i>HNF4A</i> -1 387	<i>GCK</i> -10 447	<i>GCK</i> -8 438	<i>HNF4A</i> -8 470	<i>HNF1B</i> -9 470	<i>GCK</i> -2 473	<i>HNF1A</i> -4 455
<i>HNF4A</i> -2 440	<i>HNF-1B</i> -5 481	<i>HNF-1B</i> -8 481	<i>HNF1B</i> -3 492	<i>HNF1B</i> -6 498	<i>HNF1A</i> 5-6 499	<i>GCK</i> -7 476
<i>GCK</i> -9 482	<i>HNF-1B</i> -4 599	<i>HNF1A</i> -1 580	<i>HNF4A</i> -1 528	<i>HNF1B</i> -2 441	<i>HNF1A</i> 8-9 669	<i>HNF1B</i> -7 500
						<i>GCK</i> -5-6 594
Ortalama T _m (°C) 60,29	Ortalama T _m (°C) 60,63	Ortalama T _m (°C) 60,46	Ortalama T _m (°C) 60,34	Ortalama T _m (°C) 60,74	Ortalama T _m (°C) 59,97	Ortalama T _m (°C) 60,27

Tablo 4.6'da verilen renkli amplikonların MFEprimer algoritmasında muhtemel sekonder yapı oluşturacağı belirlendi. Bu sebeple ayrı tüplere alındı. *HNF-4A* -7F ve *HNF-4A* -4F; *HNF-1B*-4R ve *HNF-1A* -7F; *HNF-1B*-8F ve *HNF-4A* -9F primerleri dimer oluşturmaktadır.

Primer çiftinin dimer oluşturma olasılığı artan primer sayısı ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Bu sebeple Çoklu PZR'lerde primerlerin beraber uyum içinde çalışması çok önemlidir. Primerlerin çoklu reaksiyonu uyumluluğu MFEprimer3.1 (<https://mfepimer3.igenetech.com/spec>) ile analiz edildi (Shen vd., 2010; Wang vd., 2019). Spesifite, dimer ve sekonder yapı analizi dışında belirli sıcaklık aralığında oluşabilecek spesifik olmayan amplikonlar analizi ile en uyumlu tüp/primer dağılımı belirlendi

4.2.3 *In Vitro* Optimizasyon:

Çalışmanın ıslak laboratuvar uygulamasını içeren aşamadır. Literatür desteği ve elde edilen sonuçlar ışığında oluşturulan uygulama basamaklarını içermektedir.

İn-Vitro Optimizasyon aşaması basamakları;

1. *İn-Vitro* primer kontrolü:
 - 1.1. Katkısız Tek-Lokus PZR:
 - 1.2. Betain(N,N,Ntrimetilglisin) Katkılı Tek Lokus PZR:
2. *İn-Vitro* Multipleks Polimeraz zincir Reaksiyonları:
 - 2.1. İlk *in-vitro* mPZR denemesi:
 - 2.2. Qiagen HotStartTaq DNA Polimeraz ile deneme:
 - 2.3. Thermo scientific Rec. Taq Polimeraz ile deneme:
 - 2.3.1. 61°C ve 63°C tutunma ısısı denemesi:
 - 2.3.2. Farklı Primer/Tüp Kombinasyon denemesi:
 - 2.3.3. DMSO katkılı mPZR denemesi:
 - 2.3.4. Betain katkılı mPZR denemesi:
3. PZR ÜRÜNLERİNİN KONFİRMASYONU
 - 3.1. Agaroz jel elektroforezi
 - 3.2. Poliakrilamid jel elektroforezi
 - 3.3. Dizileme

4.2.3.1 *In Vitro* Primer Kontrolü Optimizasyon:

a. Katkısız Tek-Lokus PZR:

Sentezlenen primer çiftleri *in-vitro* çalışmaya uygunluk açısından ilk PZR denemesi yapıldı. 36 primer, tek tek PZR yapılarak, spesifite, ampikon boyutu, Tm değeri ve betain gereksinimi değerlendirildi. İlk kontrol aşamasında aşağıda açıklanan PZR kurulum protokolü uygulandı.

Tablo 4.7 Katkısız Tek Lokus PZR reaksiyon içeriği ve döngü koşulları

BİLEŞEN		SON HACİM
10X Reaksiyon Tamponu		2,5 µl
dNTP Karışımı (10 mM herbirinden)		2,5 µl
Primer(F/R)		1 µl-1 µl
Rec. Taq DNA Polimeraz		0,2 µl
Kalıp DNA (30 ng / µl)		3 µl
Mg		1,5 µl
dH2O		13,8 µl
Toplam Hacim		25 µl
DÖNGÜ KOŞULLARI	SICAKLIK	SÜRE
Denatürasyon	95°C	5 dk
Denatürasyon	95°C	30 sn
Tutunma	61°C	45 sn
Uzama	72°C	1 dk
Son Uzama	72°C	10 dk
Sonlanma	4°C	∞

35x Tekrar

Hazırlanan PZR tüpleri tablo 4.7’de verilen reaksiyon koşulunda amplifiye edildi. PZR cihazından alınan numuneler %1’lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. Agaroz jel elektroforezi protokolüne PZR ürünlerinin konfirmasyonu aşamasında yer verildi (Bkz. Sayfa 40).

b. Betain (N,N,Ntrimetilglisin) Katkılı Tek Lokus PZR

Literatürde daha önce bildirilen çalışmalar ışığında ek katkı maddesi olarak tek lokus PZR çalışmasında Betain kullanıldı. Hazırlanan PZR tüpleri aşağıda verilen tablo 4.8'e göre amplifiye edildi.

Tablo 4.8 Katkılı Tek Lokus PZR reaksiyon içeriği ve döngü koşulları

BİLEŞEN		SON HACİM
10X Reaksiyon Tamponu		2,5 µl
dNTP Karışımı (10 mM herbirinden)		2,5 µl
Primer(F/R)		1 µl-1 µl
Rec. Taq DNA Polimeraz		0,2 µl
Kalıp DNA (30 ng / µl)		3 µl
Mg		1,5 µl
Betain		5
dH ₂ O		8,8 µl
Toplam Hacim		25 µl

DÖNGÜ KOŞULLARI	SICAKLIK	SÜRE	
Denatürasyon	95°C	5 dk	
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Tutunma	61°C	45 sn	35x Tekrar
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	10 dk	
Sonlanma	4°C	∞	

PZR cihazından alınan numuneler %1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. Protokole PZR ürünlerinin konfirmasyonu aşamasında yer verildi. (Bkz. Sayfa 40)

4.2.3.2 *İn-Vitro* Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonları

c. İlk *in-vitro* mPZR denemesi

İlk çoklu PZR uygulaması VitaTaq HS Multiplex PCR deneme kiti ile gerçekleştirildi. İçerik ve döngü koşulları kit talimatları ile uyumlu tablo 4.9'daki biçimde uygulandı.

Tablo 4.9 VitaTaq HS Multiplex PZR reaksiyon içeriği ve döngü koşulları

BİLEŞEN	Son Hacim (ilk 6 tüp)	Son Hacim (7.Tüp)
5X Reaksiyon Tamponu	10 µl	10 µl
Primer Karışımı (ilk 6 tüp için 5 çift primer,7.tüp için 6 çift)	0,5 µl (Toplam 5 µl)	0,5 µl (Toplam 6 µl)
Kalıp DNA (30 ng / µl)	5 µl	5 µl
50X Enzim Solüsyonu	1 µl	1 µl
dH ₂ O	29 µl	28 µl
Toplam Hacim	50 µl	50 µl
DÖNGÜ KOŞULLARI	SICAKLIK	SÜRE
Denatürasyon	95°C	5 dk
Amplifikasyon	95°C	10 sn
	57°C	90 sn
Son Uzama	57°C	5 dk
Sonlanma	4°C	∞

d. Qiagen HotStartTaq DNA Polimeraz ile Deneme

Literatürdeki çalışmalar ışığında sıcak başlangıçlı polimeraz türü olan Qiagen HotStartTaq DNA Polimeraz(Cat. No. / ID: 203205) ile deneme yapıldı. Bu amaç doğrultusunda 50 µl toplam hacimde PZR kit reaksiyon kurulum talimatına uygun olarak aşağıdaki toplo 4.10'da verildiği biçimde uygulandı.

Tablo 4.10 Sıcak Başlangıçlı mPZR reaksiyon içeriği ve döngü koşulları.

BİLEŞEN	Son Hacim (ilk 6 tüp)	Son Hacim (7.Tüp)
10X Reaksiyon Tamponu	5 µl	5 µl
5x Q-Solüsyonu	2,5 µl	2,5 µl
dNTP Karışımı (10 mM herbirinden)	5 µl	2,5
Primer Karışımı (ilk 6 tüp için 5 çift primer,7.tüp için 6 çift)	10 µl (1 µl herbirinden)	12 µl (1 µl herbirinden)
HotStarTaq DNA Polimeraz (2,5 U/Rxn)	2,5 µl	2,5 µl
Kalıp DNA (30 ng / µl)	5 µl	5 µl
dH2O	20 µl	18 µl
Toplam Hacim	50 µl	50 µl
DÖNGÜ KOŞULLARI	SICAKLIK	SÜRE
Denatürasyon	95°C	15 dk
Denatürasyon	95°C	45 sn
Tutunma	60°C	45 sn
Uzama	72°C	1 dk
Son Uzama	72°C	10 dk
Sonlanma	4°C	∞

35x Tekrar

e. Thermo scientific Rec. Taq Polimeraz ile Deneme

Rekombinant Taq. Polimeraz(Thermo Scientific™ EP0402) ile aşağıdaki tabloda verilen biçimde 50 µl toplam hacimde katkısız reaksiyon kuruldu. Reaksiyon koşulları tablo 4.11’de verildi.

Tablo 4.11 Thermo Scientific Taq. Polimerazlı mPZR toplam hacim 50 µl’lik reaksiyon içeriği ve döngü koşulları.

BİLEŞEN	Son Hacim (ilk 6 tüp)	Son Hacim (7.Tüp)
10X Reaksiyon Tamponu	5 µl	5 µl
dNTP Karışımı (10 mM herbirinden)	5 µl	5 µl
Primer Karışımı (ilk 6 tüp için 5 çift primer,7.tüp için 6 çift)	10 µl (1 µl herbirinden)	12 µl (1 µl herbirinden)
Rec. Taq DNA Polimeraz	0,4 µl	0,4 µl
Kalıp DNA (30 ng / µl)	5 µl	5 µl
Mg	3 µl	3 µl
dH2O	21,6 µl	19,6 µl
Toplam Hacim	50 µl	50 µl

DÖNGÜ KOŞULLARI	SICAKLIK	SÜRE	
Denatürasyon	95°C	15 dk	
Denatürasyon	95°C	45 sn	35x Tekrar
Tutunma	60°C	45 sn	
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	10 dk	
Sonlanma	4°C	∞	

f. Farklı Primer/Tüp Kombinasyon Denemesi

MFEprimer3.1 aracı ile farklı primer/Tüp kombinasyonu oluşturuldu. 393 baz çifti ve 374 baz çifti uzunluğundaki *HNF-4A* -4 VE *HNF-4A* -5 ampliconları birleştirilerek 1192 baz çifti uzunluğunda *HNF-4A* -4-5 ampliconu reaksiyona dahil edildi. Böylece tüm tüplerin amplicon sayısı eşitlendi.

Tablo 4.12 *İn-Siliko* optimizasyon basamağında hazırlanan ilk primer/tüp dağılımı.

1. TÜP	2. TÜP	3. TÜP	4. TÜP	5. TÜP	6. TÜP	7. TÜP
<i>HNF4A</i> -6 300	<i>HNF4A</i> -9 368	<i>HNF1A</i> -2 370	<i>HNF4A</i> -3 370	<i>HNF1A</i> -3 372	<i>HNF4A</i> -7 373	<i>GCK</i> -1 327
<i>HNF1A</i> -10 355	<i>GCK</i> -4 382	<i>HNF4A</i> -4 393	<i>HNF1A</i> -7 397	<i>HNF4A</i> -10 390	<i>GCK</i> -3 400	<i>HNF4A</i> -5 374
<i>HNF4A</i> -1 387	<i>GCK</i> -10 447	<i>GCK</i> -8 438	<i>HNF4A</i> -8 470	<i>HNF1B</i> -9 470	<i>GCK</i> -2 473	<i>HNF1A</i> -4 455
<i>HNF4A</i> -2 440	<i>HNF1B</i> -5 481	<i>HNF1B</i> -8 481	<i>HNF1B</i> -3 492	<i>HNF1B</i> -6 498	<i>HNF1A</i> 5-6 499	<i>GCK</i> -7 476
<i>GCK</i> -9 482	<i>HNF1B</i> -4 599	<i>HNF1B</i> -1 580	<i>HNF1A</i> -1 528	<i>HNF1B</i> -2 441	<i>HNF1A</i> 8-9 669	<i>HNF1B</i> -7 500
						<i>GCK</i> -5-6 594
Ortalama T _m (°C) 60,29	Ortalama T _m (°C) 60,63	Ortalama T _m (°C) 60,46	Ortalama T _m (°C) 60,34	Ortalama T _m (°C) 60,74	Ortalama T _m (°C) 59,97	Ortalama T _m (°C) 60,27

Tablo 4.13 *İn-Vitro* uygulamalar sonrasında güncellenen ikinci primer/tüp dağılımı

1. TÜP	2. TÜP	3. TÜP	4. TÜP	5. TÜP	6. TÜP	7. TÜP
<i>HNF4A</i> -6 300	<i>HNF4A</i> -9 368	<i>HNF1A</i> -2 370	<i>HNF4A</i> -3 370	<i>HNF1A</i> -3 372	<i>HNF4A</i> -7 373	<i>GCK</i> -1 327
<i>HNF1A</i> -10 355	<i>GCK</i> -4 382	<i>GCK</i> -8 438	<i>HNF1A</i> -7 397	<i>HNF4A</i> -10 390	<i>GCK</i> -3 400	<i>GCK</i> -10 447
<i>HNF4A</i> -1 387	<i>HNF1A</i> -4 455	<i>HNF1B</i> -6 498	<i>HNF4A</i> -8 470	<i>HNF1B</i> -2 441	<i>GCK</i> -2 473	<i>GCK</i> -7 476
<i>HNF4A</i> -2 440	<i>HNF1B</i> -5 481	<i>HNF1B</i> -1 580	<i>HNF1B</i> -3 492	<i>HNF1B</i> -9 470	<i>HNF1A</i> 5-6 499	<i>HNF1B</i> -7 500
<i>GCK</i> -9 482	<i>HNF1B</i> -4 599	<i>HNF4A</i> -5 1192	<i>HNF1A</i> -1 528	<i>HNF1B</i> -8 481	<i>HNF1A</i> 8-9 669	<i>GCK</i> -5-6 594
Ortalama T _m (°C) 60,29	Ortalama T _m (°C) 60,63	Ortalama T _m (°C) 60,46	Ortalama T _m (°C) 60,34	Ortalama T _m (°C) 60,74	Ortalama T _m (°C) 59,97	Ortalama T _m (°C) 60,27

Tablo 4.12’te verilen ilk kombinasyon deneysel gözlemler sonucunda tablo 4.13’teki şekilde güncellenmiştir.

g. DMSO (Dimetil Sülfoksit) Katkılı mPZR Denemesi

Reaksiyon %8 DMSO içerecek biçimde gerçekleştirildi. Reaksiyonun döngü koşulları ve reaksiyon içeriği tablo 4.14'te verildi.

Tablo 4.14 DMSO katkılı mPZR reaksiyon içeriği ve döngü koşulları.

BİLEŞEN		Son Hacim
10X Reaksiyon Tamponu		5 µl
dNTP Karışımı (10 mM herbirinden)		5 µl
Primer Karışımı (ilk 6 tüp için 5 çift primer,7.tüp için 6 çift)		12 µl (1 µl herbirinden)
Rec. Taq DNA Polimeraz		0,4 µl
Kalıp DNA (30 ng / µl)		5 µl
Mg		3 µl
DMSO		4 µl
dH2O		17,6 µl
Toplam Hacim		50 µl
DÖNGÜ KOŞULLARI	SICAKLIK	SÜRE
Denatürasyon	95°C	5 dk
Denatürasyon	95°C	30 sn
Tutunma	61°C	90 sn
Uzama	72°C	1 dk
Son Uzama	72°C	10 dk
Sonlanma	4°C	∞

35x Tekrar

h. Betain katkılı mPZR Denemesi

1mM Betain içeren aşağıdaki tabloda verilen şekilde reaksiyon kurulumu gerçekleştirildi (tablo 4.15).

Tablo 4.15 Betain katkılı mPZR reaksiyon içeriği ve döngü koşulları.

BİLEŞEN		Son Hacim
10X Reaksiyon Tamponu		5 µl
dNTP Karışımı (10 mM herbirinden)		5 µl
Primer Karışımı (ilk 6 tüp için 5 çift primer,7.tüp için 6 çift)		10 µl (1 µl herbirinden)
Rec. Taq DNA Polimeraz		0,4 µl
Kalıp DNA (30 ng / µl)		5 µl
Mg		3 µl
Betain		10 µl
dH ₂ O		11,6 µl
Toplam Hacim		50 µl

DÖNGÜ KOŞULLARI	SICAKLIK	SÜRE	
Denatürasyon	95°C	5 dk	
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Tutunma	61°C	90 sn	35x Tekrar
Uzama	72°C	1 dk	
Son Uzama	72°C	10 dk	
Sonlanma	4°C	∞	

i. mPZR'de Farklı Tutunma Isısı ile Deneme

Betain katkılı mPZR uygulamasında verilen reaksiyon kurulum protokolü tutunma ısısı 61°C ve 63°C olarak tekrar edildi.

4.2.4 PZR Ürünlerinin Konfirmasyonu

PZR sonrası ampikonların analiz edilmesi yöntemin optimizasyon başarısının gözlemlenebilir olması amacıyla önemli bir adımdır. Bu amaç doğrultusunda üç ayrı yöntem tercih edildi.

1. Agaroz Jel Elektroforezi
2. Poliakrilamid Jel elektroforezi
3. Dizileme

4.2.4.1 Agaroz Jel Elektroforezi

Tek Lokus PZR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (tablo4.16). 120 V'da yaklaşık 1 saat (± 10 dk) yürütüldü.

Tablo 4.16 %1(W/V) 'lik agaroz jel içeriği.

Bileşen	
1xTBE Tamponu	100 ml
Agaroz	1 g
Etidyum Bromür (10mg/ml)	5 μ l

Tablo 4.17 %2(W/V) 'lik agaroz jel içeriği.

Bileşen	
1xTBE Tamponu	100 ml
Agaroz	2 g
Etidyum Bromür (10mg/ml)	5 μ l

Multipleks PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (tablo 4.17)(Qiagen, 2010b). İlk 20-30 dk maksimum 300 voltaj(V) akım uygulanarak bantların hızlı ayrılması sağlandı. Jel her 10 dk'de incelenerek ince bantların ısınan tamponda buharlaşmaması amacıyla voltaj 120 V'a indirildi. Bantlar ayrılana kadar 10 dk'lık periyotlar ile jel UV ışık altında incelendi. Genellikle 1 saat içinde en net görüntü elde edildi.

4.2.4.2 Poliakrilamid Jel elektroforezi

Denatüre edici olmayan DNA poliakrilamid jel elektroforezi(PAGE) yöntemi kullanıldı(Thermo Scientific, y.y.). Literatürde bildirildiği üzere ampikon boylarına %8'lik PAGE elektroforez kullanıldı (tablo 4.18).

Tablo 4.18 Thermo Scientific web sayfasından elde edilen denatüre edici olmayan PAGE protokolü.

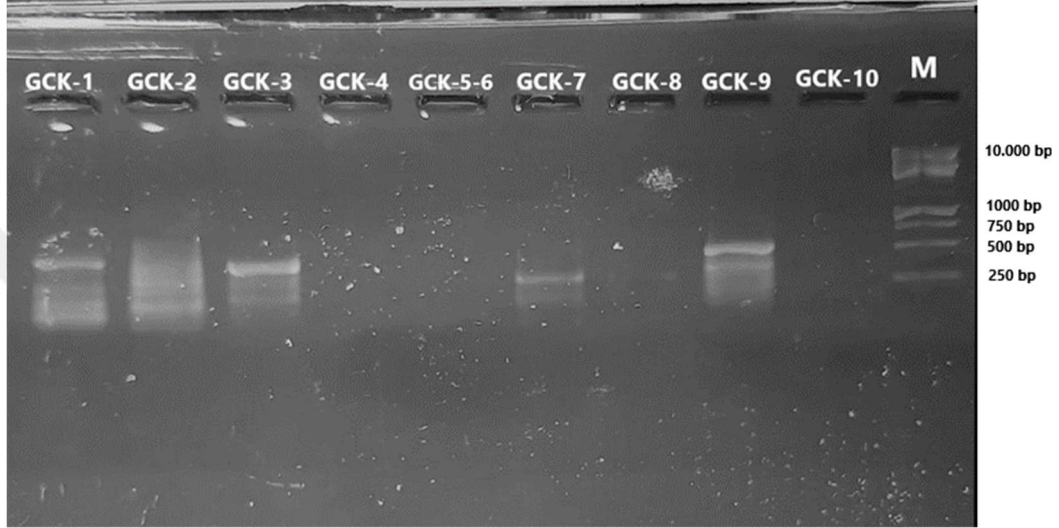
Bileşen	
10xTBE Tamponu	2 ml
20% acrylamide/bisacrylamide solüsyonu	8 ml
dH2O	10 ml
TEMED	24 µl
10% (W/V) APS	240 µl

4.2.4.3 Dizileme

Reaksiyonların dizileme işlemi için Next Genetic Center firmasından profesyonel hizmet alımı yapıldı. Dizileme işlemi Illumina MiniSeq sistemi kullanılarak yapıldı. Veriler BAM dosyası olarak teslim alındı. Dizileme verileri IGV-Integrative Genomics Viewer (<https://igv.org/>) programında incelendi. Dizilenen ampikonların okuma değerlerine göre hazırlanan protokol analiz edildi.

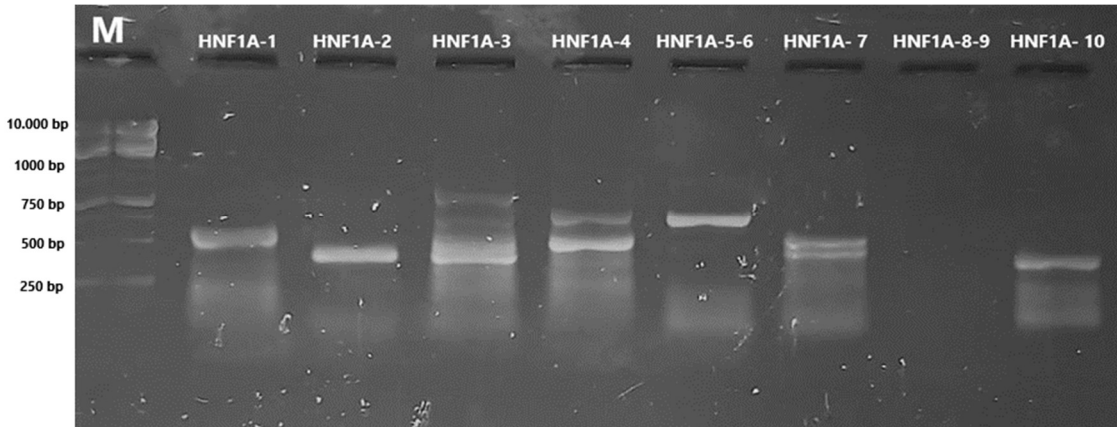
4.3 *İn-Vitro* Tek Lokus PZR Sonucu

GCK-Glukokinaz geninin *in-vitro* Tek Lokus PZR uygulaması sonucunda %1'lik agaroz jel elektroforezinde şekil 5.1'deki biçimde görüntülendi.



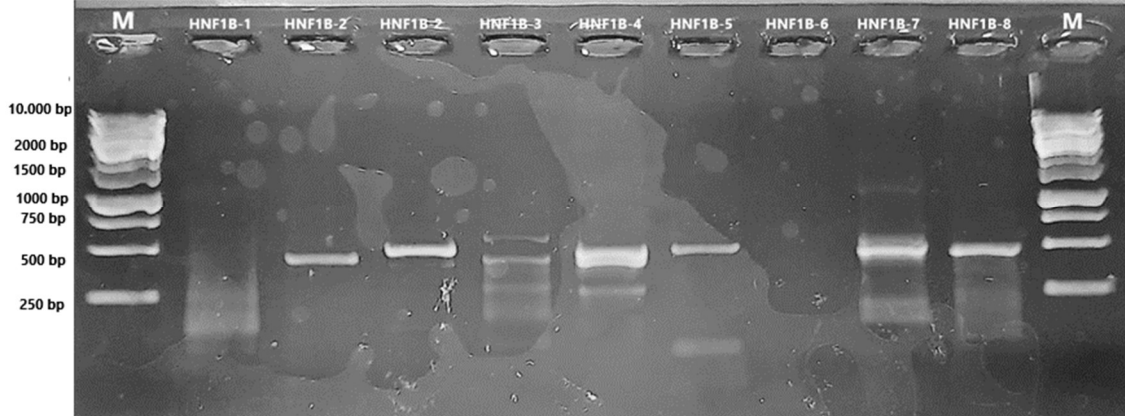
Şekil 5.1 *GCK*-Glukokinaz geninin katkısız Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.

HNF-1A geninin *in-vitro* Tek Lokus PZR uygulaması sonucunda %1'lik agaroz jel elektroforezinde şekil 5.2'deki biçimde görüntülendi.



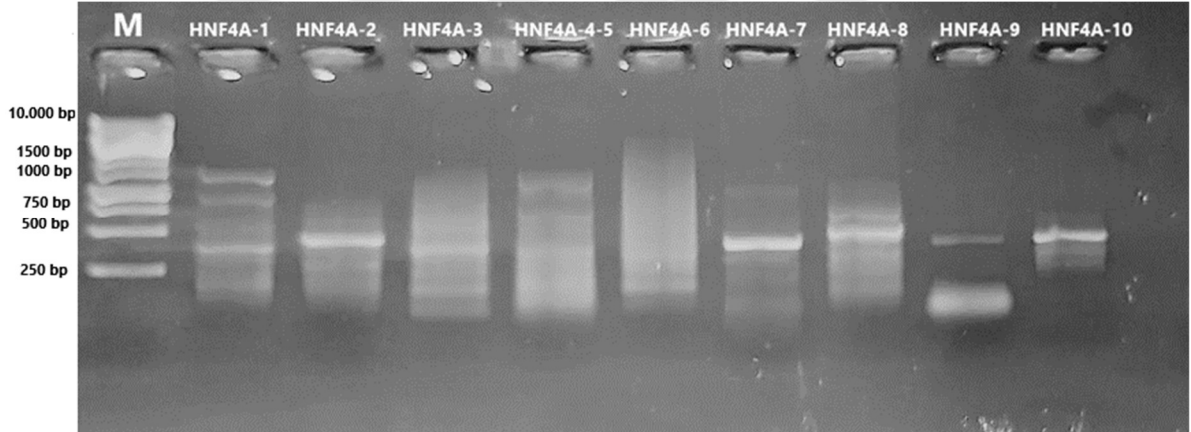
Şekil 5.2 *HNF-1A* geninin katkısız Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.

HNF-1B geninin *in-vitro* Tek Lokus PZR uygulaması sonucunda %1'lik agaroz jel elektroforezinde şekil 5.3'teki biçimde görüntülendi.



Şekil 5.3 *HNF-1B* geninin katkısız Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.

HNF-4A geninin *in-vitro* Tek Lokus PZR uygulaması sonucunda %1'lik agaroz jel elektroforezinde şekil 5.4'teki biçimde görüntülendi.

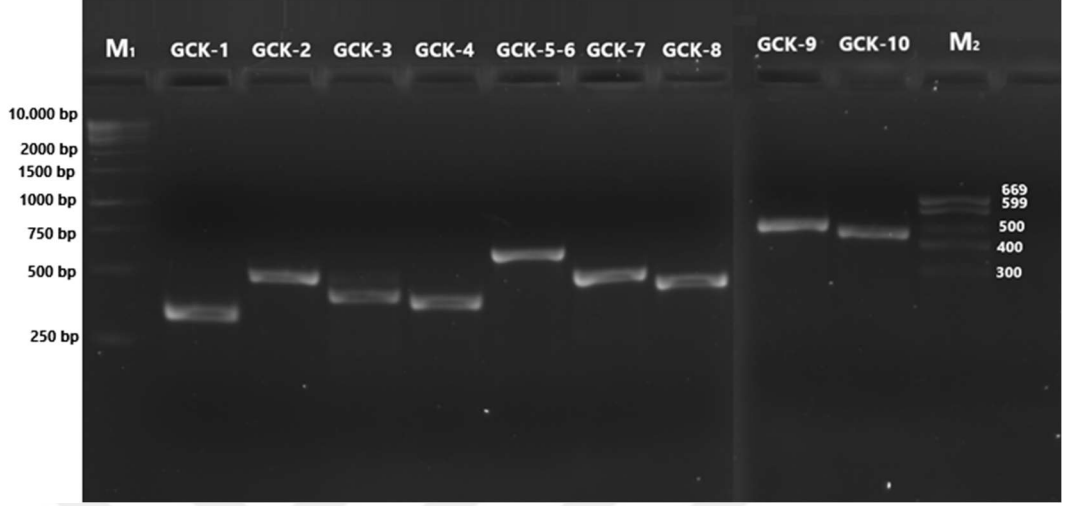


Şekil 5.4 *HNF-4A* geninin katkısız Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.

Katkısız Tek Lokus PZR sonucunda elde edilen görüntülerde birden fazla bant ve sürüntü görüntülerinin oluştuğu görülmektedir. Tanı açısından anlamlı yalnızca 4 bant (*HNF-1B-2*, *HNF-1B-3*, *HNF-1B-6*, *HNF-1A -5-6*) elde edildi. 6 reaksiyondan hiçbir bant görüntüsü elde edilemedi. Kalan reaksiyonlarda sürüntü ve birden fazla bantlaşma olduğu gözlemlendi.

4.4 Betain(N,N,Ntrimetilglisin) Katkılı Tek Lokus PZR

GCK-Glukokinaz geninin 1mM Betain katkılı tek lokus PZR uygulaması sonucunda %1'lik agaroz jel elektroforez yöntemi ile şekil 5.5'teki biçimde görüntülendi.



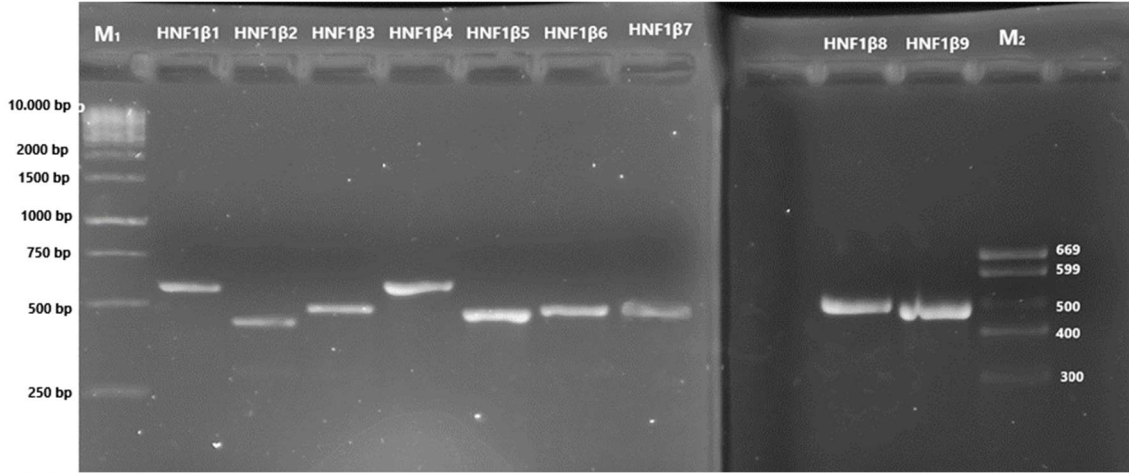
Şekil 5.5 *GCK*-Glukokinaz geninin betain katkılı Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.

HNF-1A geninin 1mM betain katkılı tek lokus PZR uygulaması sonucunda %1'lik agaroz jel elektroforez yöntemi ile şekil 5.6'teki biçimde görüntülendi.



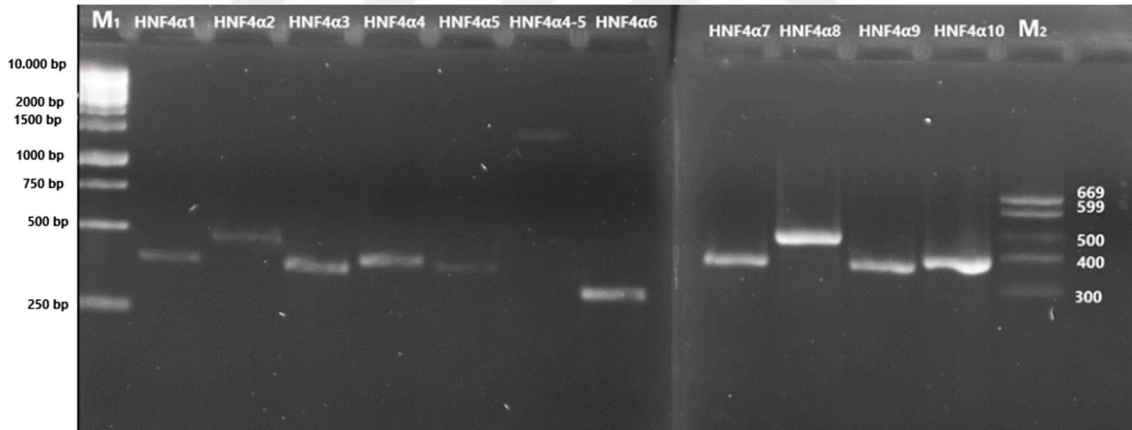
Şekil 5.6 *HNF-1A* geninin betain katkılı Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.

HNF-1B geninin 1mM betain katkıli tek lokus PZR uygulaması sonucunda %1'lik agaroz jel elektroforez yöntemi ile şekil 5.7'teki biçimde görüntüledi.



Şekil 5.7 *HNF-1B* geninin betain katkıli Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.

HNF-4A geninin 1mM betain katkıli tek lokus PZR uygulaması sonucunda %1'lik agaroz jel elektroforez yöntemi ile şekil 5.8'teki biçimde görüntüledi.



Şekil 5.8 *HNF-4A* geninin betain katkıli Tek Lokus PZR agaroz jel görüntüsü.

GCK, *HNF-4A*, *HNF-1B* ve *HNF-4A* genlerinin beklenen tüm PZR amplifikasyonları tek bant halinde başarıyla görüntülenmiştir. Görüntülenen tüm bantların kontrolü için İmageJ programı kullanıldı. Elde edilen değerler tablo 5.1'de verildi.

Tablo 5.1 Agaroz jelde görüntülenen bantların beklenen boyut ile uyumunun İmage-J analizi⁴ ile doğrulama.

AMPLİKON	BOYUT (bp)	IMAGE-J ANALİZİ	AMPLİKON	BOYUT (bp)	IMAGE-J ANALİZİ
<i>GCK-1</i>	327	324,956	<i>HNF-1A -1</i>	528	528,0481
<i>GCK-2</i>	473	476,112	<i>HNF-1A -2</i>	370	369,2283
<i>GCK-3</i>	400	403,539	<i>HNF-1A -3</i>	372	372,6039
<i>GCK-4</i>	382	393,017	<i>HNF-1A -4</i>	455	453,1194
<i>GCK-5-6</i>	594	606,156	<i>HNF-1A -5-6</i>	669	676,6589
<i>GCK-7</i>	476	473,666	<i>HNF-1A -7</i>	397	399,9723
<i>GCK-8</i>	438	435,226	<i>HNF-1A -8-9</i>	499	501,2622
<i>GCK-9</i>	482	486,973	<i>HNF-1A -10</i>	355	360,0396
<i>GCK-10</i>	447	446,754			
<i>HNF-1B-1</i>	580	584,56	<i>HNF4A-1</i>	387	393,7506
<i>HNF-1B-2</i>	443	448,636	<i>HNF4A-2</i>	440	437,1022
<i>HNF-1B-3</i>	492	501,882	<i>HNF4A-3</i>	370	366,0565
<i>HNF-1B-4</i>	599	602,772	<i>HNF4A-4</i>	393	402,4036
<i>HNF-1B-5</i>	481	489,367	<i>HNF4A-5</i>	374	370,2753
<i>HNF-1B-6</i>	498	501,882	<i>HNF4A-4-5</i>	1192	1183,377
<i>HNF-1B-7</i>	500	493,523	<i>HNF4A-6</i>	300	307,0138
<i>HNF-1B-8</i>	481	489,172	<i>HNF4A-7</i>	373	369,7471
<i>HNF-1B-9</i>	470	476,123	<i>HNF4A-8</i>	470	478,6207
			<i>HNF4A-9</i>	368	371,8612
			<i>HNF4A-10</i>	390	384,6254

⁴ İmage-J Programında agaroz jel elektroforezi yönteminin bir kısıtı olarak bant kalınlığı elde edilen analiz sonucunu etkileyebilmektedir.

Tablo 5.1’de verilen İmage-J programı analizi ile görsellerde yer alan her iki jel için;

- **GCK** $y = -1143\ln(x) + 1444,9$; ($R^2 = 0,9806$) ve $y = -781,6\ln(x) + 962,29$; ($R^2 = 0,998$),
- **HNF-1A** $y = -1146\ln(x) + 7049,2$; ($R^2 = 0,9917$) ve $y = -714,1\ln(x) + 4154,2$; ($R^2 = 0,9989$),
- **HNF-1B** $y = -1120\ln(x) + 6759,6$; ($R^2 = 0,977$) ve $y = -653,7\ln(x) + 4093,3$; ($R^2 = 0,9872$),
- **HNF-4A** $y = -1186\ln(x) + 1329,4$; ($R^2 = 0,965$) ve $y = -813,6\ln(x) + 979,14$; ($R^2 = 0,9984$) logaritmik eğri denklemleri elde edilmiştir.

Tablo 5.1’de görüldüğü üzere amplikonların boya boyutu ile kıyaslamasında beklenen boyutlara uyumlu bantların sentezlendiği görüldü. Tasarlanan primerlerin spesifitesi gerçekleştirilen dizileme ile de doğrulandı.

4.5 VitaTaq® HS Multiplex Kit mPZR Uygulaması

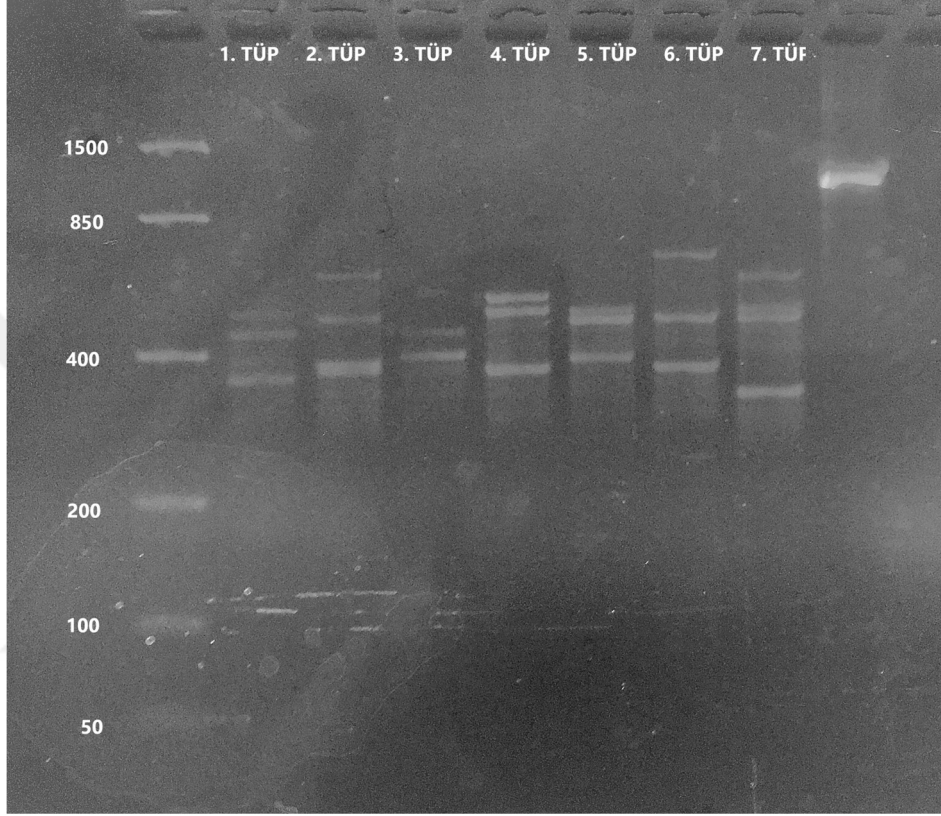
İlk mPZR denemesi amacıyla kullanılan VitaTaq® HS Multiplex deneme kitiyle şekil 5.9’da görüldüğü gibi başarısız bir sonuç elde edilmiştir. Jelde hiçbir bant görüntülenememiştir.



Şekil 5.9 VitaTaq® HS Multiplex Kitiyle gerçekleştirilen mPZR jel görüntüsü.

4.6 Qiagen HotStartTaq mPZR Uygulaması

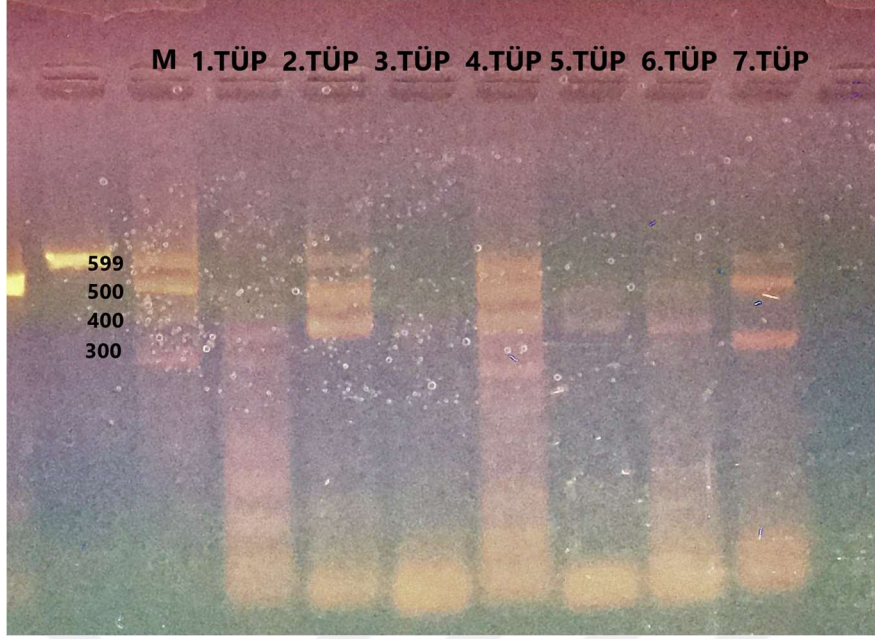
Sıcak başlangıçlı polimerazlardan olan Qiagen HotStartTaq DNA Polimeraz ile yapılan çalışmanın jel görüntüsü şekil 5.10'de verilmiştir. Görüntülenmesi beklenen 36 banttın 24 tanesi çıplak göz ile görüntülenebilmektedir. 3.tüp, 5.tüp ve 6.tüplerin reaksiyon sonucu diğer tüplere göre daha zayıftır.



Şekil 5.10 Qiagen HotStartTaq DNA Polimerazlı mPZR agaroz jel görüntüsü.

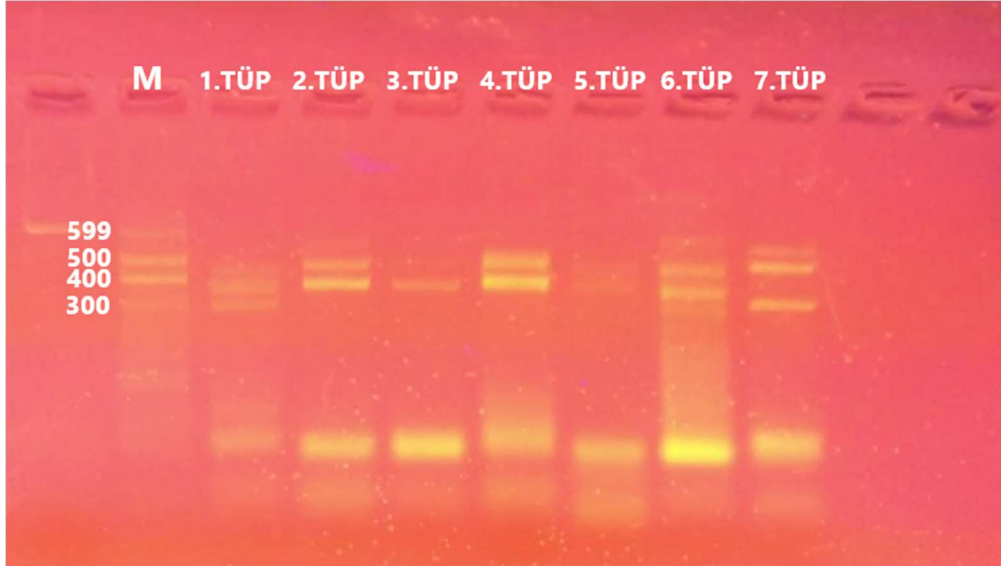
4.7 Thermo scientific Rec. Taq Polimeraz mPZR Uygulaması

Maliyeti düşürmek amacıyla Thermo scientific Rec. Taq Polimeraz ile gerçekleştirilen iki farklı hacimdeki mPZR ürünleri agaroz jelde görüntülenmiştir. 25 μ l hacimde gerçekleştirilen reaksiyonun jel görüntüsüne göre; 1.tüp,2.tüp,5.tüp ve 6.tüpte gerçekleşen reaksiyonlar verimli ve tanı koymaya elverişli değildir. 7 tüpte genel görüntü siliktir ve bant ayrımı yapılamamaktadır (Şekil 5.11).



Şekil 5.11 Toplam hacim 25 μ l olarak gerçekleştirilen Thermo Scientific Rec. Taq mPZR jel görüntüsü.

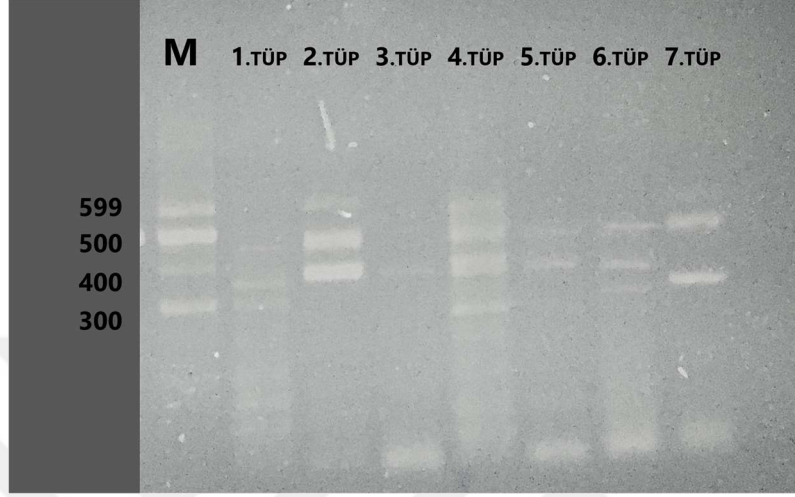
50 μ l hacimde gerçekleştirilen reaksiyonlarda 3. ve 5.tüp bantlar silik görüntülenmiştir. Ancak genele bakıldığında 7 tüpte gerçekleşen reaksiyonlar 25 μ l'ye göre daha verimlidir. Jel görüntüsü daha açık ve bant ayrımı daha net yapılabildiği görüntülenmektedir (Şekil 5.12).



Şekil 5.12 Toplam hacim 50 μ l olarak gerçekleştirilen Thermo Scientific Rec. Taq mPZR jel görüntüsü.

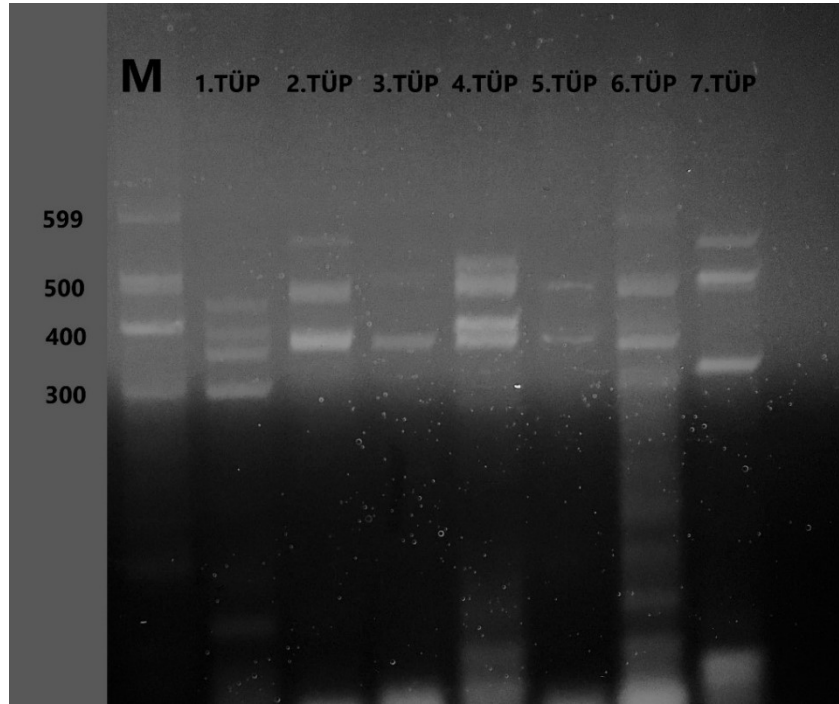
4.8 mPZR'de Farklı Tutunma Isısı Uygulama

Beklenen verim gözlenemeyen 3.tüp ve 5.tüpte verimi arttırmak amacıyla tutunma(annealing) ısısı 61°C ve 63°C olacak şekilde gerçekleştirilen deneme sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüleri şekil 5.13 ve şekil 5.14'te verilmiştir.



Şekil 5.13 Tutunma(annealing) ısısı 61°C olan mPZR jel görüntüsü.

Şekil 5.14'te görüldüğü üzere 63°C-mPZR'lerde, literatürün aksine, istenmeyen kısa spesifik olmayan ampikonlar 61°C-mPZR görüntüsüne göre fazladır.



Şekil 5.14 Tutunma(annealing) ısısı 63°C olan mPZR jel görüntüsü.

Tutunma ısı 61°C ve 63°C olan reaksiyonların agaroz jel görüntüsüne bakıldığında 63°C'lik reaksiyonlarda bantlar daha kalın ve ayırt edilebilir görülmektedir. Fakat dizileme sonucuna bakıldığında 61°C-mPZR'lerde 29 bant tanı konulabilir düzeyde amplifiye olmuş iken; 63°C-mPZR'lerde 25 bant tanı için anlamlıdır.

4.9 Farklı Primer/Tüp Kombinasyon Uygulaması

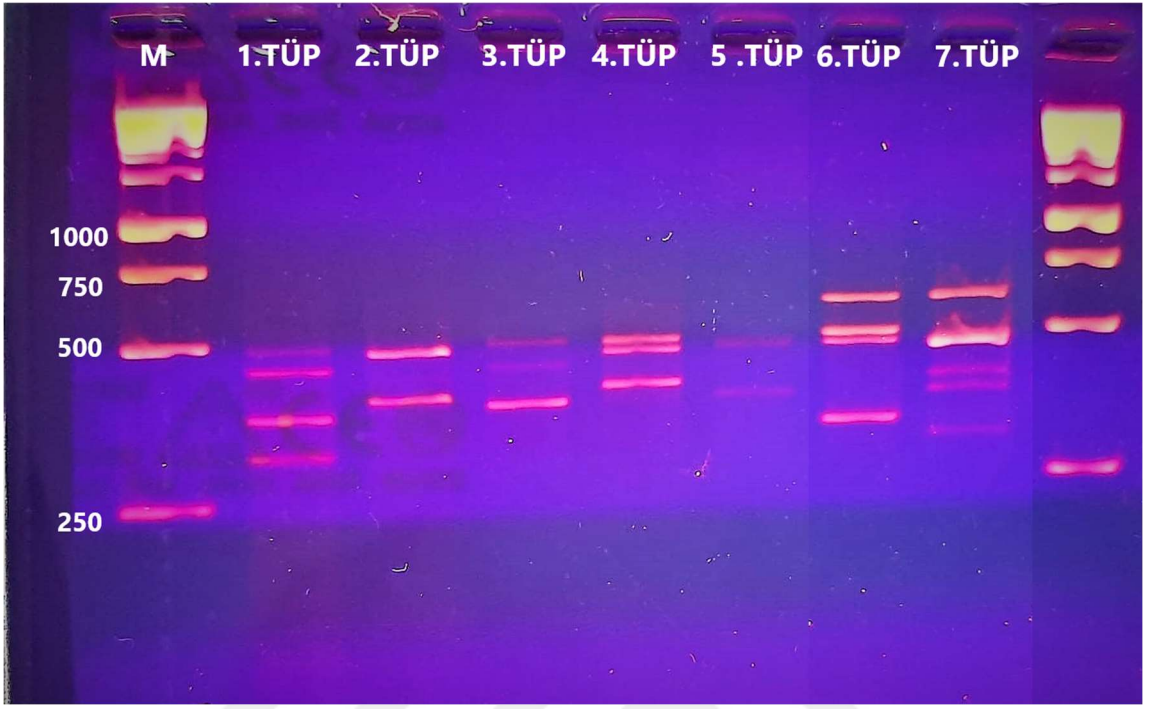
Polimeraz ve döngü koşullarındaki değişikliğe rağmen 3.tüp, 5.tüp ve 6.tüpteki düşük verim sonucu bildirilen jel görüntülerinde açıkça görülmektedir. Bu bağlamda devam eden uygulamalarda kullanılan yeni primer/tüp kombinasyonu tablo 4.14'te verilmiştir.

4.10 DMSO-Betain katkılı mPZR Uygulaması

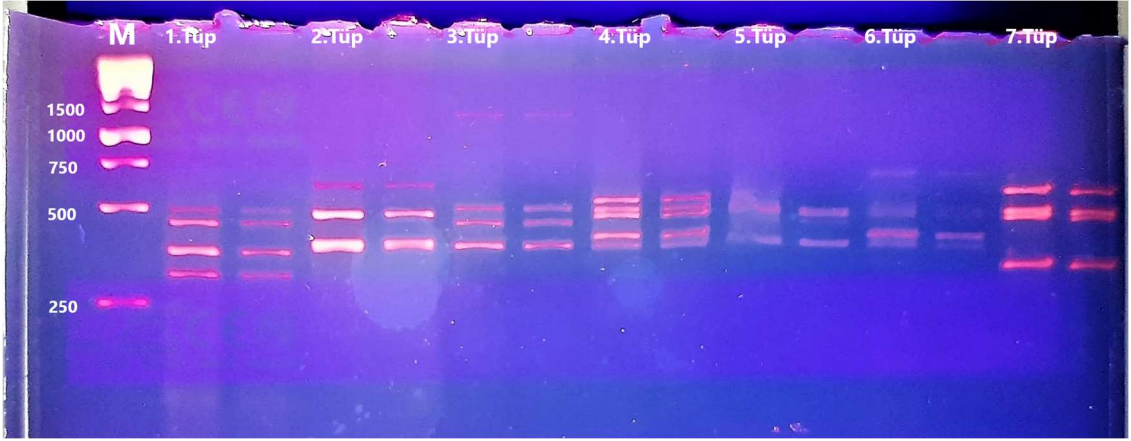
Güncel primer/tüp kombinasyonlu DMSO katkılı mPZR agaroz jel görüntüsü şekil 5.15'te verilmiştir. DMSO'lu mPZR sonucunda 23 bant net ve ayırt edilebilir biçimde görülmektedir. Amplifikasyonu beklenen uzun amplikonların bantları jelde görüntülenemedi.

Betain'li mPZR jel görüntüsü şekil 5.16'de verilmiştir. Betainli mPZR sonucunda jelde 28 bant açıkça görülmektedir. Uzun amplikonların [*HNF-1B-4* (599 bç/2.tüp), *HNF-4A-4-5* (1192 bç/3.tüp)] betain katkılı mPZR uygulaması ile amplifiye edilebildiği görüldü.

Her iki jel görüntüsünde de kalın ayırt edilmesi zor olan bantlar görüldü. Bu sebeple şekil 5.16'da görüldüğü üzere kuyulara 6 µl ve 12 µl'lik iki hacimde yükleme yapılmasına karşın açıkça ve kolayca bant ayrımı yapılamadığı görüldü.



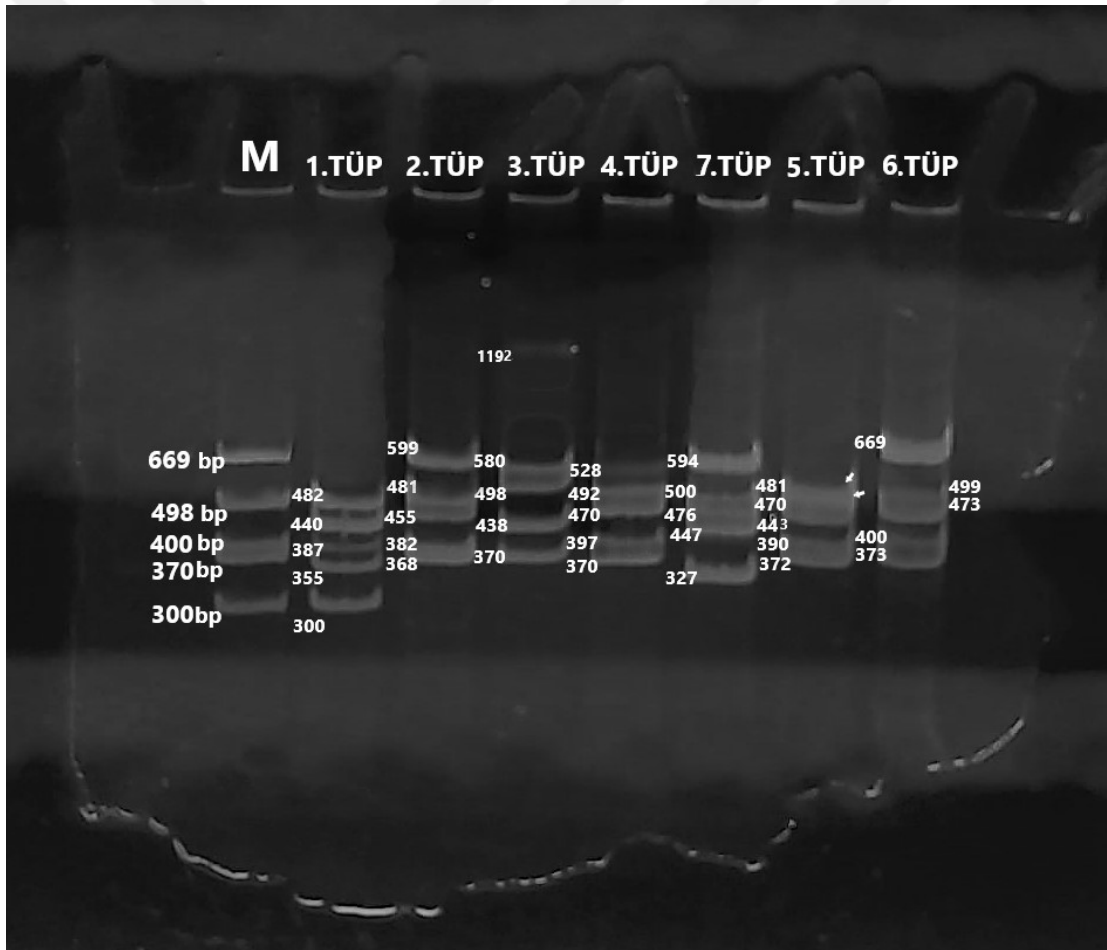
Şekil 5.15 DMSO katkılı mPZR agaroz jel görüntüsü.



Şekil 5.16 Betain katkılı mPZR agaroz jel görüntüsü.

4.11 Sonuç Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Görüntüleme

Gerçekleştirilen reaksiyonların sonucunda 50 μ l toplam hacimde %5 Betain (5 mM stoktan) katkılı Thermo scientific rec. Taq Polimeraz kiti ile hazırlanan mütipleks polimeraz zincir reaksiyonlarının DNA-PAGE ile elde edilen görüntüsü şekil 5.17’de verilmiştir. Elde edilen jel görüntüsünde hazırlanan primer/tüp kombinasyonu tablosu ile uyumlu boyutlarda ampliconlar görüntülenmektedir. Gerçekleştirilen tüm tüm uygulamaların sonucunda elde edilen protokolün çalışmanın amacına uyumlu olarak; rutin genetik tanıda kullanılmaya uygun, verimli ve düşük maliyetli protokol olduğu sonucuna ulaşıldı.



Şekil 5.17 Son mPZR poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü.

4.12 Yeni Nesil Dizileme (NGS) Analizi

Agaroz jel görüntüsü elde edilebilen 20 uygulama İllumina MiniSeq cihazı ile dizilenmiş ve BAM dosyası çıktısı olarak elde edilmiştir. Elde edilen BAM ve BAI dosyaları IGV programı ile analiz edilmiş ve elde edilen jel görüntüleri bu sonuçlarla desteklenerek analiz edilmiştir. Geliştirilen protokolün agaroz jel görüntüsünün analizi IGV-tools aracı ile ortalama okuma değerleri TDF formatına dönüştürüldü. TDF formatı ile elde edilen sonuçlar tablo 5.2 ve tablo 5.3'te verildi.

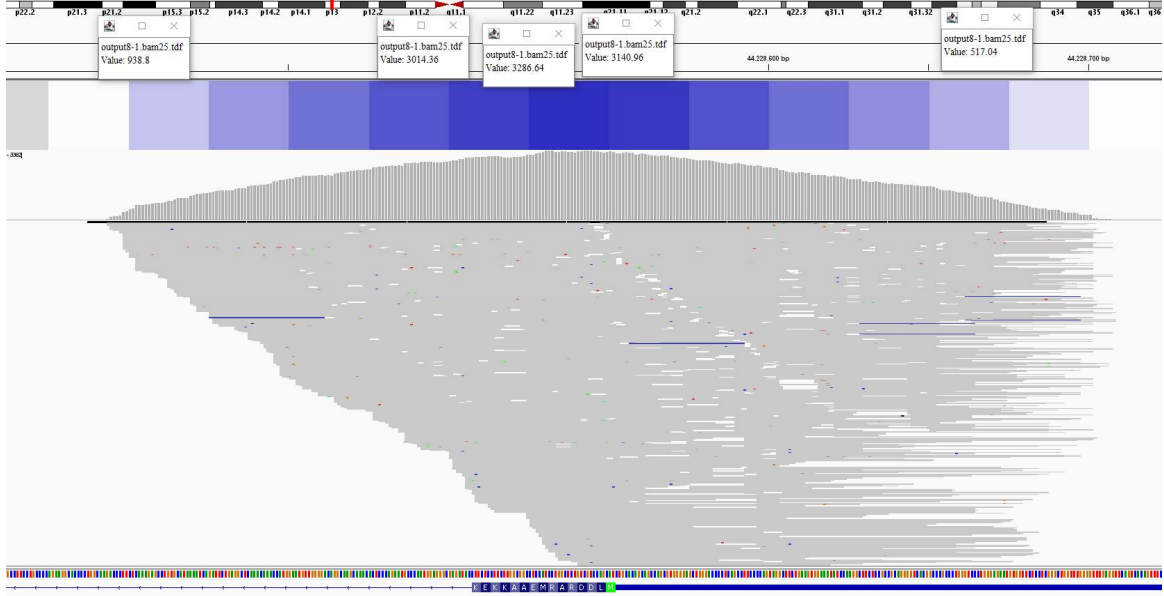
Tablo 5.2 Başarıyla sonuçlanan panel mPZR ürünlerinin NGS analizi.

Ekzon	Boyutu (bp)	Ortalama Okuma	Min.	Maks.	IGV'deki Amplikon Boyutu (bp)
<i>GCK-1</i>	327	1591,98	517,04	3140	327
<i>GCK-2</i>	473	645,73	48,08	1154,52	471
<i>GCK-3</i>	400	589,57	83,12	789,64	393
<i>GCK-4</i>	382	1580,50	234,12	2461,24	382
<i>GCK-5-6</i>	594	859,36	85,08	1352,44	590
<i>GCK-7</i>	476	805,17	102,44	1170,24	470
<i>GCK-8</i>	438	1282,81	176,68	2178,2	432
<i>GCK-9</i>	482	96,5	29,92	130,52	454
<i>GCK-10</i>	447	40,63	33,3	58,8	365
<i>HNF1A-1</i>	528	538,654	79,76	780,84	525
<i>HNF1A-2</i>	370	2331,33	472,2	3074,2	369
<i>HNF1A-3</i>	372	1076	288,12	1835,44	365
<i>HNF1A-4</i>	455	106,5	65,5	135,2	450
<i>HNF1A-5-6</i>	669	485,015	115,16	760,7	664

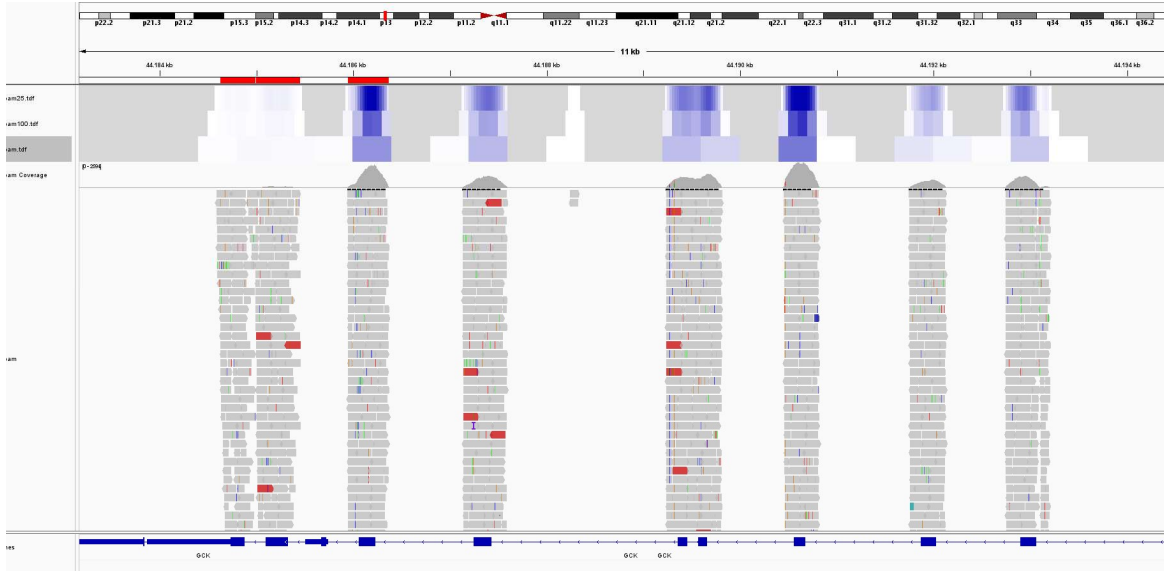
Tablo 5.3 Başarıyla sonuçlanan panel mPZR ürünlerinin NGS analizi(devamı).

Ekzon	Boyutu (bp)	Ortalama Okuma	Min.	Maks.	IGV'deki Amplikon Boyutu (bp)
<i>HNF1A-7</i>	397	2196,898	526,56	3406	392
<i>HNF1A-8-9</i>	499	683	155,36	1220,2	492
<i>HNF1A-10</i>	355	653,82	110	1151,88	341
<i>HNF-1B-1</i>	580	209,4	55,56	350,4	570
<i>HNF-1B-2</i>	443	320,27	67,12	613,6	418
<i>HNF-1B-3</i>	492	769	124,96	1091,56	490
<i>HNF-1B-4</i>	599	556,494	98,76	788,92	592
<i>HNF-1B-5</i>	481	1233,9	151,32	1589,6	477
<i>HNF-1B-6</i>	498	50,46	30,42	66,4	493
<i>HNF-1B-7</i>	500	2088,2	334,36	2348,72	498
<i>HNF-1B-8</i>	481	531,64	90,16	844,04	475
<i>HNF-1B-9</i>	470	1155,94	104,56	1727,76	461
<i>HNF4A-1</i>	387	203,66	48,93	389,68	289
<i>HNF4A-2</i>	440	298,2825	77,36	328,84	402
<i>HNF4A-3</i>	370	810	240,28	1605,72	366
<i>HNF4A-4-5</i>	1192	222,49	43,84	276,68	1190
<i>HNF4A-6</i>	300	944,81	120,92	1209,64	282
<i>HNF4A-7</i>	373	1653,2	52,24	2799,36	369
<i>HNF4A-8</i>	470	736,8	141,5	1332,2	470
<i>HNF4A-9</i>	368	1202,893	218,84	2684	364
<i>HNF4A-10</i>	390	616,74	91,76	794,48	385

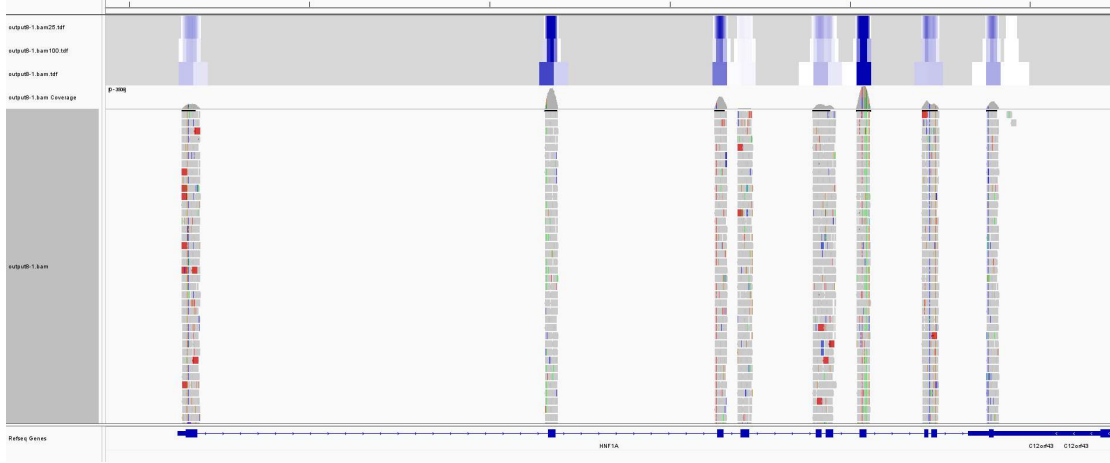
IGV programında dizilenen ampikonlarının tamamı IGV aracında başarıyla görüntülendi. Tüm genlerin BAM dosyalarının IGV programındaki görüntüsü şekil 5.18 – şekil 5.25’de verilmiştir. Ampikonların insan genomunda beklenen genler ile hizalandığı mPZR amplifikasyonunun verimli çalıştığı görülmektedir.



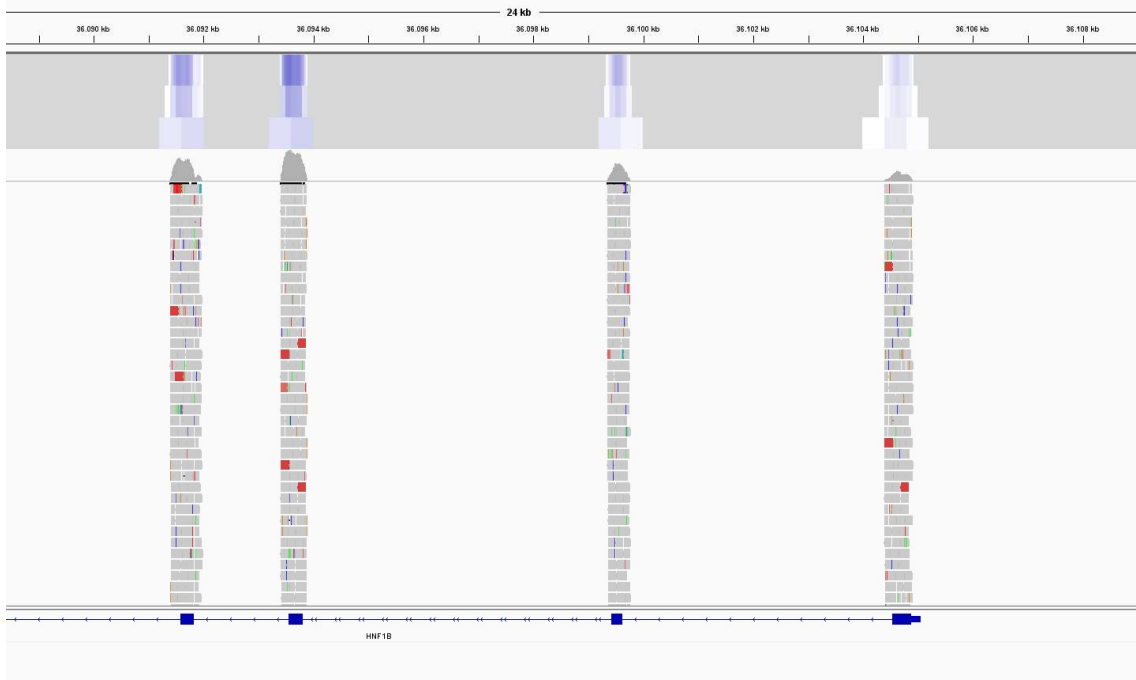
Şekil 5.18 GCK-1'in NGS sonucunun yakın gösterimi



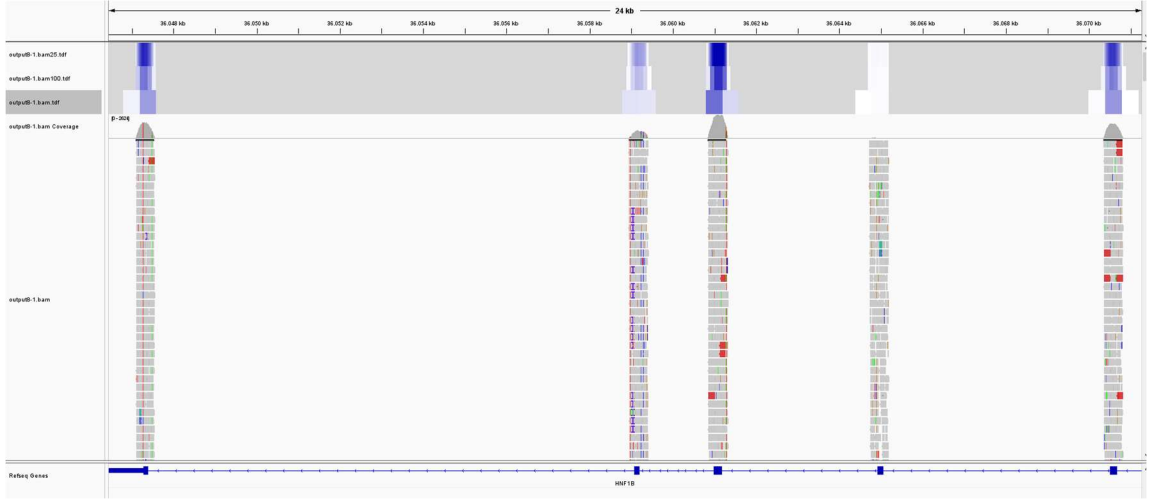
Şekil5.19 GCK-2 – GCK-10 ekzonlarının NGS dosyasının IGV görüntüsü.



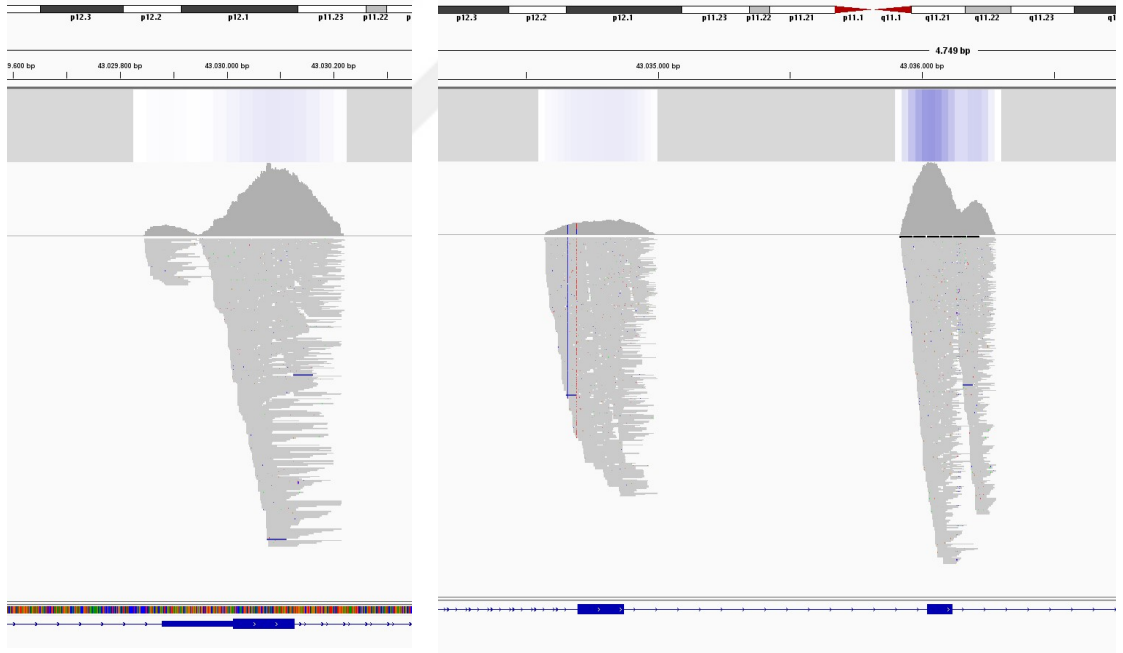
Şekil 5.20 *HNF-1A* -1 – *HNF-1A* -10 ekzonlarının NGS dosyasının IGV görüntüsü.



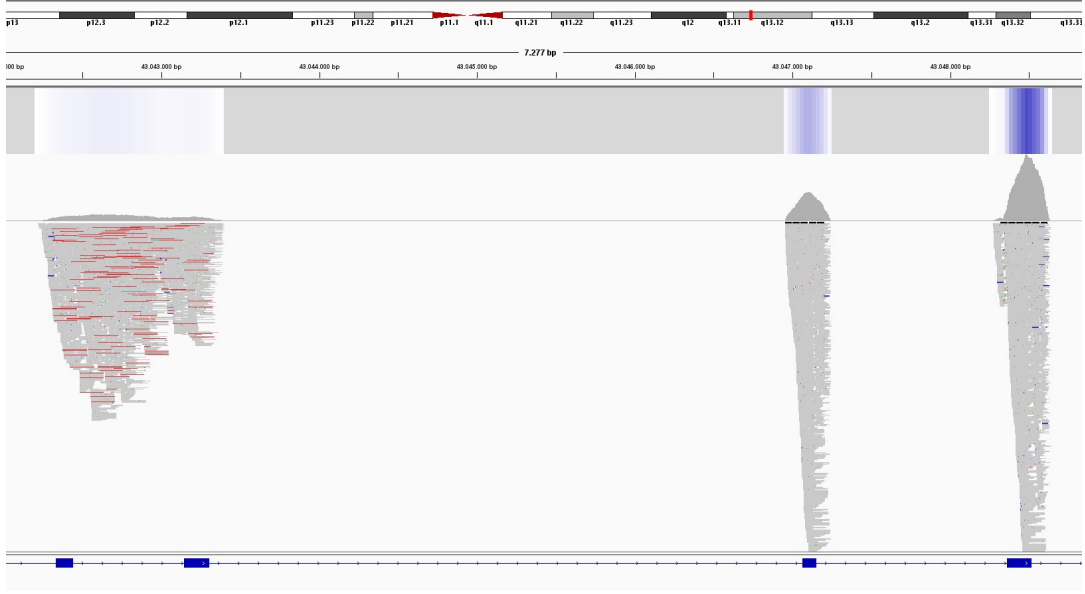
Şekil 5.21 *HNF-1B*-1 – *HNF-1B*-4 ekzonlarının NGS dosyasının IGV görüntüsü.



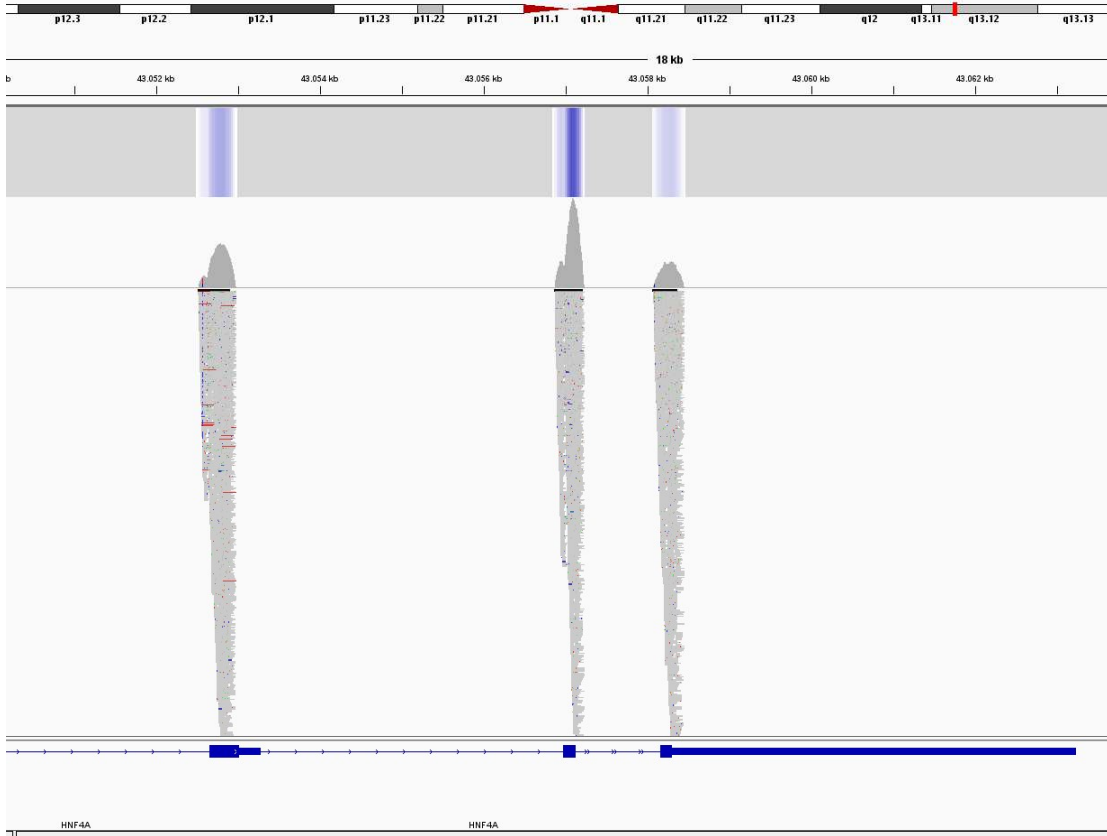
Şekil 5.22 *HNF-1B-5 – HNF-1B-9* ekzonlarının NGS dosyasının IGV görüntüsü.



Şekil 5.23 *HNF-4A -1 – HNF-4A -3* ekzonlarının NGS dosyasının IGV görüntüsü.



Şekil 5.24 *HNF-4A* -4-5 – *HNF-4A* -7 ekzonlarının NGS dosyasının IGV görüntüsü.



Şekil 5.25 *HNF-4A* -8 – *HNF-4A* -10 ekzonlarının NGS dosyasının IGV görüntüsü.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Amplikon konfirmasyonu amacıyla agaroz jel elektroforezi kullanımı amplikon bantlarının net ve anlaşılır ayırt edilmesinde kısıtlı kalmıştır. Çalışmamızda edindiğimiz tecrübe ile anlaşıldığı üzere agaroz jel elektroforezinde 30nt'ten kısa uzunluk farkı agaroz jel elektroforezi ile net ve kolay biçimde ayırt edilememektedir. Bu yöntem kısıtını ortadan kaldırmak amacıyla dizileme ve poliakrilamid jel elektroforezi ile doğrulama yöntemi de kullanılarak konfirmasyonlar yapılmıştır.

İn-siliko optimizasyon basamağında “tercih edilen yakın boyutlar benzer reaksiyon koşulunda optimum amplifiye edilir” savına göre protokol tasarlanmıştır. Bu kısıtı ortadan kaldırmak, ilk basamaklardan olan *in-siliko* optimizasyon basamağında boyut farkı daha uzun olan amplikonlar seçilerek ortadan kaldırılabilceği düşünülmektedir. Fakat tüp içerisinde minimum maksimum amplikonlar arasındaki boyut farkı makası çok açılmaması gerektiği düşünülmektedir.

Çalışmamızın kit olarak satılabilmesi için tüp-primer dağılımına uyumlu primer karışımlarının hazırlanabilmesi gerekmektedir. Önceden hazırlanan ve uzun süre -20°C'de muhafaza edilen primer karışımlarında verimin düştüğü ve jelde sürüntü oluşumunun daha sık gözlemlendiği düşünülmektedir. Bu sorunu hazır kitlerin nasıl çözdüğü literatürde bildirilmemiştir. Fakat literatür taramasında LNA (Locked Nucleic Acid/Kilitli Nükleik Asit) olarak adlandırılan moleküllerin primer yapısında kullanılmasının bu sorunu ortadan kaldıracağı düşünülmektedir. LNA yapısı sıcak başlangıçlı polimerazlar gibi sıcak ortamda halkalı yapısını bozarak lineer yapı kazanır. Böylece primer kırıklarının, sekonder yapı oluşumlarının ve istenmeyen bağlanmaların önüne geçileceği düşünülmektedir.

Geliştirilen protokol satılabilir bir ürün olması için MODY spesifik tanı kitleri ile rekabet edebilir düzeye gelmelidir. Örneğin; MR-0100.024 katalog numaralı kit ek olarak *ABCC8*, *INS* ve *KCNJ11* genlerini içermektedir ve 5 pleks ile reaksiyon gerçekleştirmektedir. Kit'in artıları mevcuttur ancak kapalı sistem olarak yüksek maliyete sebep olması günümüz koşullarında genetik tanı merkezlerini mali anlamda ciddi etkilemektedir. Ek olarak, yerli bir kit olmaması ülkemiz açısından bir eksikliktir. Bu eksikliğin giderilmesi için yerli çalışmalar hız kazanmalıdır.

Çin menşeli CN106011268A kodlu MODY tanı kiti patent bulunmaktadır. Ancak kit şu anda askıya alınmış (pending) durumdadır. WO kodlu olmaması Dünya'da patentlenebilir olmasına engel oluşturmamaktadır. Kit protokolü *HNF-4A* , *GCK* ve *KCNJ11* genlerini içermektedir. Bir patentin bulunması aslında anlamlı pazar oluşturabilecek potansiyele sahip bir ürün olduğunu göstermektedir. İçeriğine bakıldığında aynı genleri içermemektedir. Fakat hazır bir çalışma olması ilgili çalışma açısından dezavantaj değil avantaj oluşturmaktadır. Patentte bildirilen deneysel bölüm çalışmamızın deneysel kurgusu için örnek bir kaynak görevi görmüştür.

- An, A., & Abac, A. (2015). *Review article Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update*. *28*(12), 251–263. <https://doi.org/10.1515/jpem-2014-0384>
- Anik, A., Çatli, G., Abaci, A., & Böber, E. (2015). Maturity-onset diabetes of the young (MODY): An update. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, *28*(3–4), 251–263. <https://doi.org/10.1515/jpem-2014-0384>
- Carmody, D., Støy, J., Greeley, S. A. W., Bell, G. I., & Philipson, L. H. (2016). A Clinical Guide to Monogenic Diabetes. İçinde *Genetic Diagnosis of Endocrine Disorders* (ss. 21–30). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800892-8.00002-6>
- Cereghini, S. (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *The FASEB Journal*, *10*(2), 267–282. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.2.8641560>
- Chamberlainl, J. S., Gibbs, R. A., Ranierl, J. E., Nguyen, P. N., & Thomas, C. (1988). *Nucleic Acids Research Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification Nucleic Acids Research*. *16*(23), 11141–11156.
- CN106011268A - MODY type diabetes gene detection kit and mutation site - Google Patents. (2016). <https://patents.google.com/patent/CN106011268A/en>
- Edwards, M. C., & Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR: Advantages, development, and applications. *Genome Research*, *3*(4). <https://doi.org/10.1101/gr.3.4.S65>
- Fajans, S. S., Bell, G. I., & Polonsky, K. S. (2001). Molecular Mechanisms and Clinical Pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young. *New England Journal of Medicine*, *345*(13), 971–980.

<https://doi.org/10.1056/NEJMRA002168>

Federation, I. D. (2017). Eighth edition 2017. İçinde *IDF Diabetes Atlas, 8th edition*. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8).

Federation, I. D. (2019). *Idf diabetes atlas*.

Frackman, B. S., Kobs, G., Simpson, D., Storts, D., & Corporation, P. (1998). Betaine and DMSO : Enhancing Agents for PCR. *Promega Notes*, 65(65), 9–12. http://taq.ch/pnotes/65/6921_27/6921_27_core.pdf

Gloyn, A. L. (2003). Glucokinase (GCK) Mutations in Hyper- and Hypoglycemia: Maturity-Onset Diabetes of the Young, Permanent Neonatal Diabetes, and Hyperinsulinemia of Infancy. *Human Mutation*, 22(5), 353–362. <https://doi.org/10.1002/HUMU.10277>

Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (1997). Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, 23(3), 504–511. <https://doi.org/10.2144/97233rr01>

Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D., & Loening, S. A. (1997). Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic acids research*, 25(19), 3957–3958. <https://doi.org/10.1093/NAR/25.19.3957>

Jahangir Moini, M.D., M. P. . (2019). Epidemiology of Diabetes. İçinde *Journal of Chemical Information and Modeling* (C. 53, Sayı 9).

Jeong, J. C., Song, J. G., Ki, H. N., Jong, I. L., Bae, H., Kim, G. A., Sun, Y., & Kwon, S. T. (2008). Unique substrate spectrum and PCR application of Nanoarchaeum equitans family B DNA polymerase. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6563–6569. <https://doi.org/10.1128/AEM.00624-08>

Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2011). POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81–97. <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>

- Kainz, P., Schmiedlechner, A., & Strack, H. B. (2000). Specificity-enhanced hot-start PCR: Addition of double-stranded DNA fragments adapted to the annealing temperature. *BioTechniques*, 28(2), 278–282. <https://doi.org/10.2144/00282st04>
- Karunanathie, H., Kee, P. S., Ng, S. F., Kennedy, M. A., & Chua, E. W. (2022). PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie*, 197, 130–143. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2022.02.009>
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., & Haussler, and D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome research*, 12(6), 996–1006. <https://doi.org/10.1101/GR.229102>
- Köressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R., & Remm, M. (2018). Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 34(11), 1937–1938. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTY036>
- Lau, H. H., Ng, N. H. J., Loo, L. S. W., Jasmen, J. B., & Teo, A. K. K. (2018). The molecular functions of hepatocyte nuclear factors – In and beyond the liver. *Journal of Hepatology*, 68(5), 1033–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.026>
- Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). *Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach*. 51(October 2001), 47–51. <https://doi.org/10.1002/jcla.2058>
- Matschinsky, F. M., & Wilson, D. F. (2019). The central role of glucokinase in glucose homeostasis: A perspective 50 years after demonstrating the presence of the enzyme in islets of Langerhans. *Frontiers in Physiology*, 10(MAR), 148. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.00148/BIBTEX>
- McKerrecher, D., & Waring, M. J. (2013). Property-based design in the optimisation of benzamide glucokinase activators: From hit to clinic. *Progress in Medicinal Chemistry*, 52, 1–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62652-3.00001-6>

- Mullis, K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
- MULLIS, K. B., & FALOONA, F. A. (1989). Specific Synthesis of DNA *in-Vitro* via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. İçinde *Recombinant DNA Methodology*. Academic Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-765560-4.50015-0>
- Mullis, Kary B. (1994). The Polymerase Chain Reaction (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33(12), 1209–1213. <https://doi.org/10.1002/anie.199412091>
- Murphy, R., Ellard, S., & Hattersley, A. T. (2008). *Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic β -cell diabetes*. 4(4), 200–213. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0778>
- Najafov, A., & Hoxhaj, G. (2016). PCR Guru: An Ultimate Benchtop Reference for Molecular Biologists. İçinde *PCR Guru: An Ultimate Benchtop Reference for Molecular Biologists*.
- Naylor, R., Johnson, A. K., & Gaudio, D. del. (2018). Maturity-Onset Diabetes of the Young Overview. *GeneReviews®*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500456/>
- Qiagen. (2010a). Multiplex PCR multiplex PCR. *Qiagen ®, October*, 1–48. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2011.00825.x>
- Qiagen. (2010b). Multiplex PCR multiplex PCR. *Qiagen ®, October*, 1–48.
- Roux, K. H. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(4). <https://doi.org/10.1101/pdb.ip66>
- Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., Ogurtsova, K., Shaw, J. E., & Bright, D. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045 : Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas , 9 th edition. *Diabetes Research and Clinical*

- Practice*, 157, 107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>
- Shen, Z., Qu, W., Wang, W., Lu, Y., Wu, Y., Li, Z., Hang, X., Wang, X., Zhao, D., & Zhang, C. (2010). MPprimer: A program for reliable multiplex PCR primer design. *BMC Bioinformatics*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-143>
- Sint, D., Raso, L., & Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: Balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(5), 898–905. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x>
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques*, 28(6). <https://doi.org/10.2144/00286IR01>
- Tajudeen O. Yahaya ;Ufuoma, S. B. (2020). *Genetics and Pathophysiology of Maturity-onset Diabetes of the Young (MODY): A Review of Current Trends 1*. 35(3). <https://doi.org/10.5001/omj.2020.44>
- TEMĐ. (2020). *DİABETES MELLİTUS VE KOMPLİKASYONLARININ TANI, TEDAVİ VE İZLEM KILAVUZU 2020* (14. baskı).
- Thermo Scientific. (y.y.). *Non-denaturing PAGE*. Tarihinde 03 Haziran 2022, adresinden erişildi http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012740_Nondenaturing_PAGE_UG.pdf
- Thomas, E. R., Brackenridge, A., Kidd, J., Kariyawasam, D., Carroll, P., Colclough, K., & Ellard, S. (2016). Diagnosis of monogenic diabetes: 10-Year experience in a large multi-ethnic diabetes center. *Journal of Diabetes Investigation*, 7(3), 332–337. <https://doi.org/10.1111/JDI.12432>
- Valkovicova, T., Skopkova, M., Stanik, J., & Gasperikova, D. (2019). *Novel insights into genetics and clinics of the HNF1A-MODY*. 53(2), 110–134. <https://doi.org/10.2478/enr-2019-0013>
- Walker, J. M., Ditor, S. E. E., Protocols, D. C., Henderson, D. S., An, A., Abac, A., Federation, I. D., Innis, M., Gelfand, D., Zasyonu, P. C. R. O. P. T. İ. M. İ., Lau,

- H. H., Hui, N., Ng, J., Sai, L., Loo, W., Jasmen, J., Kee, A., Teo, K., Lorenz, T. C., ... Ufuoma, S. B. (1999). Optimization of Pcr Conversations Between Michael and David. *PCR applications*;, 4(4), 3,22.
<https://doi.org/10.3791/3998>
- Wang, K., Li, H., Xu, Y., Shao, Q., Yi, J., Wang, R., Cai, W., Hang, X., Zhang, C., Cai, H., & Qu, W. (2019). MFEprimer-3.0: quality control for PCR primers. *Nucleic acids research*, 47(W1), W610–W613.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz351>
- Wu, G., Bohn, S., & Ryffel, G. U. (2004). *The HNF1 b transcription factor has several domains involved in nephrogenesis and partially rescues Pax8 / lim1-induced kidney malformations.* 3728, 3715–3728.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04312.x>
- Yang, R., Zhang, J. H., & Yuan, G. Y. (2013). Establishment of an optimized PCR method using sequence-specific primers for screening multiple gene polymorphisms simultaneously. *Molecular Medicine Reports*, 7(1), 201–204.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2012.1122>

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

Dörter, D., & Müslümanoğlu, M. H. (2022). 6 Th International Academic Student Studies Congress (P. D. E. Güneş, P. D. Ü. Sevil, D. D. A. S. Yücel, & D. Ö. Ü. S. Yalçinkaya (Ed.); S. 404). Güven Plus Grup A.Ş. Yayınları.
<https://www.akademikogrencikongresi.org/bildiriayrinti/yeni-nesil-dizilemedengs-mody-genclerin-eriskin-baslangicli-diyabeti-hastaligi-ile-iliskilendirilmis-4-gen-icin-mpzr-optimizasyon-calismasi/419>

