

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ADLI TIP ANABİLİM DALI

86744

**ÇUKUROVA YÖRESİNDE HUMVWA LOKUSU
ALLEL FREKANS DAĞILIMI**

Bil.Uz. Ayşe ALTUN

DOKTORA TEZİ

T 86744

DANIŞMANI

Prof.Dr.Serpil SALAÇIN

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
SBE 97-D-5 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 86744

ADANA-1999

TC
M

1999

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Adli Tıp Doktora programı çerçevesinde yürütölmüş olan “Çukurova Yöresinde HumvWA Lokusu Allel Frekans Dağılımı” adlı çalışma, aşğıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:02/07/1999



Jüri Başkanı

Prof.Dr.Serpil SALAÇIN



Prof.Dr. Beyhan EGE



Doç.Dr.Behnan ALPER

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun 31.8.1999.. tarih ve 17/17-14.. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Prof.Dr.Kadri ÖZCAN
Enstitü Müdürü

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

TEŞEKKÜR

Eğitimimde yol göstericiliği ile gereksinim duyduğum desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden yararlanabilme fırsatı bulduğum Prof.Dr. Serpil Salaçin'e,

Tezimin hazırlık ve çalışma aşamasında değerli bilgi ve deneyimleri ile yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Behnan Alper'e,

Eğitim ve tez dönemi içerisinde gösterdikleri ilgi ve destekleri için Anabilim Dalımızın tüm öğretim üye ve çalışanlarına,

SBE-97-D-5 nolu proje olarak bu çalışmanın gerçekleştirilmesindeki maddi katkıları nedeniyle Ç.Ü. Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Uz.Bio.Ayşe ALTUN

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Tarihçe	4
2.2 STR Lokusları	5
2.2.1 Adli Serolojide DNA Polimorfizmlerinin Kullanımı ve VNTR DNA Polimorfizmleri (VNTR, AMP-FLP ve STR)nin Karşılaştırılması	7
2.2.2 Adli Amaçlı Kullanılan STR Lokusları	9
2.2.3 STR Lokusu Allellerinin Adlandırılması	11
2.3 HumvWA Lokusu	11
2.3.1 HumvWA Lokusunun Lokalizasyonu ve Yapısı	11
2.3.2 HumvWA Lokusunun Adli Analizlerde Etkinliği	13
2.3.2.1 Hassasiyet	14
2.3.2.2 HumvWA Allellerinin Tanımlanmasında Olumsuz Çevre Koşullarının ve Eski Örneklerin Etkisi	14
2.3.2.3 Somatik Stabilitate	15
2.3.2.4 Özgünlük (Tür Spesifiklik)	15
2.3.2.5 Karışık Örneklerden HumvWA Allellerinin Tanımlanması	16
2.3.2.6 Mutasyon Oranları	16
2.4 Chelex 100 ile DNA Ekstraksiyonu	16
2.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1 Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler	22
3.2 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.3 Deneylerde Kullanılan Solüsyonlar	24
3.3.1 Chelex 100 ile DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Solüsyonlar	24
3.3.2 Poliakrilamid Jellerin Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonlar	24
3.3.3 Agar Plaklarının Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonlar	25
3.3.4 Gümüş Boyamada Kullanılan Solüsyonlar	25
3.4 Deneyler	26
3.4.1 Örneklerin Hazırlanması	26
3.4.2 %5'lik Chelex 100 Solüsyonu ile DNA Ekstraksiyonu	26
3.4.3 HumvWA Allellerinin PCR ile Çoğaltılması	27
3.4.4 %8'lik Poliakrilamid Jelin Hazırlanması	29

3.4.5 %2'lik Agar Plaklarının Hazırlanması	29
3.4.6 %8'lik Poliakrilamid Jele Aplikasyon ve Elektroforez	30
3.4.7 Jelde Yürütülen DNA Parçalarının Boyanması	31
3.4.8 %6'lık Poliakrilamid Jelin Hazırlanması	32
3.4.9 %6'lık Poliakrilamid Jele Aplikasyon ve Elektroforez	32
3.5 İstatistiksel Hesaplamalar	33
4. BULGULAR	35
4.1 Çukurova Yöresinde Saptanan HumvWA Fenotipleri	35
4.2 Çukurova Yöresinde Saptanan HumvWA Allelleri ve Allel Frekansları	36
4.3 Hardy-Weinberg Dengesi	37
4.4 HumvWA Lokusunun Çukurova Yöresi İçin Saptanan Adli Etkinlik Değerleri	38
5. TARTIŞMA	39
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	45
7.KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	56



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 İnsan genomundaki VNTR DNA polimorfizmi.	6
Şekil 2.2 HumvWA lokusunda tanımlanan 2 tip 12 alleli.	13
Şekil2.3 PCR döngüsü.	18
Şekil3.1 (A) Bilgilendirme ve Rıza formu örneği. (B) Kayıt formu örneği.	20 21
Şekil 3.2 Bu çalışmada kullanılan PCR döngü aleti.	28
Şekil 3.3 Bu çalışmada kullanılan elektroforez tankı, güç kaynağı ve soğutma tankı.	31
Şekil 4.1 hd-PAGE sonrası gümüş boya ile boyanan HumvWA allelleri ile allelik ladderların görüntüsü.	36
Şekil 5.1 Örneklerin yürüme noktaları arasındaki farklılıklar.	42
Şekil 5.2 STR lokusu allelik ladderları ile örneklerin jelde aplikasyon sıraları ve büyüklüklerine bağlı olarak katottan anoda sıralanışı.	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Adli analizlerde kullanılan AMP-FLP/STR ve VNTR lokuslarının tanımlanma yöntemlerinin karşılaştırılması.	9
Çizelge 2.2 Adli amaçlı kullanılan STR lokusları.	10
Çizelge 2.3 HumvWA allellerinin PCR ürün uzunlukları ile tekrar bölgenin baz dizilimi.	12
Çizelge 4.1 Çukurova yöresinde yaşayan 110 kişide saptanan HumvWA fenotipleri ve fenotip frekansları.	35
Çizelge 4.2 Çukurova yöresinde yaşayan 110 kişide saptanan HumvWA allelleri ve allel frekansları.	36
Çizelge 4.3 HumvWA allel grupları ve allel frekans dağılımı.	37
Çizelge 4.4 HumvWA allel frekans dağılımının Hardy-Weinberg Dengesine uyumu.	37
Çizelge 4.5 HumvWA lokusu allellerinin Çukurova yöresi için saptanan adli etkinlik değerleri (Obs-H, Exp-H, MEC ve PD).	38
Çizelge 5.1 Çeşitli populasyonlar için rapor edilen HumvWA lokusu allel frekans dağılımı ile adli etkinlik değerleri(Obs-H, MEC, PD).	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMP-FLP: Amplification Fragment Length Polymorphism

CHES: [2-(N-Cyclohexylamino)ethane-sulfonic acid]

df: Degrees of freedom (Serbestlik derecesi)

DNA: Deoksiribonucleic Acid (Deoksiribonükleik asit)

EDNAP: European DNA Profiling Group (Avrupa DNA Profillendirme Grubu)

EDTA: Etilendiamintetraacetic acid

Exp-H: Expected Heterozygosity (Beklenen heterozigotluk)

HumACTBP2: Human beta actin pseudogene

HumCSF1PO: Human c-fms protooncogene CFS1 receptor gene

HumF13A: Human coagulation factor 13 A

HumF13B: Human coagulation factor 13 B

HumFES/FPS: Human c-fes/fps protooncogene

HumHPRTB: Human hypoxantine phosforybosil transferase gene

HumLIPOL: Human lipoprotein lipase gene

HumTHO1: Human thyrosine hydroxylase gene

HumTPOX: Human throid peroxydase gene

HumvWA: Human von Willebrand factor gene

ISFH: International Society of Forensic Haemogenetics (Uluslararası Adli Hemogenetik Derneği)

MEC: Mean Exclusion Change (Ortalama Dışlama Şansı)

n: örnek sayısı

Obs-H: Observed Heterozygosity (Gözlenen Heterozigotluk)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PD: Power of Discrimination (Ayırt Etme Gücü)

PAGE: Polyacrylamid Gel Electrophoresis (Poliakrilamid Jel Elektroforezi)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)

SD: Standart Deviation (Standart Sapma)

STR: Short Tandem Repeat

Taq: Thermus aquaticus

TE: Tris-EDTA

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylenediamine

TÜBİTAK: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu

VNTR: Variable Number of Tandem Repeat

ÖZET

Çukurova Yöresinde HumvWA Lokusu Allel Frekans Dağılımı

Short tandem repeat (STR) lokusları, insan genomunda 2-6 baz çifti uzunluğundaki DNA dizilerinin birbirlerine baş-kuyruk olacak şekilde ardarda tekrar ettiği bölgelerdir. Bu bölgeler tekrar ünite sayılarındaki varyasyonlara bağlı olarak uzunluk polimorfizmi oluşturmaktadır.

STR lokuslarının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile analizi biyolojik vücut sıvı ve lekelerinin adli identifikasyonunda tercih edilmektedir. İnsan genomunda çok fazla miktarda STR lokusu bulunması, adli amaçlı kullanımda seçme şansını artırmaktadır. Amplifikasyon esnasında enzim kayması sonucu oluşan artık ürünlerin daha az olması nedeniyle, genellikle tetramerik STR lokusları kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Çukurova yöresinde yaşayan bireylerden alınan kan örneklerinde HumvWA lokusu allel frekans dağılımının saptanması ve veri tabanı oluşturulması amacıyla 110 kan örneği kullanıldı. Rastgele seçilen ve aralarında akrabalık bağı bulunmayan sağlıklı vericilerden alınan örneklerde; PCR, horizontal discontinuous PAGE ve gümüş boyama yöntemleri ile 8 (13-20) HumvWA alleli ile 23 farklı HumvWA fenotipi saptandı. Gözlenen fenotip frekans dağılımının Hardy-Weinberg Dengesine uyumu χ^2 testi ile değerlendirildiğinde, gözlenen fenotip frekans dağılımının Hardy-Weinberg Dengesi ile uyumlu olduğu saptandı ($\chi^2=8.9365$, d.f=14, $p>0.05$). Ayrıca HumvWA lokusunun adli etkinlik değerleri (gözlenen heterozigotluk yüzdesi 0.7182, ortalama dışlama şansı 0.56822 ve ayırt etme gücü 0.92149) saptandı.

İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda, Çukurova yöresinde HumvWA lokusunun PCR'a dayalı allel frekans dağılımlarının kimliklendirme değerlendirmelerinde veri tabanı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Adli etkinlik, Çukurova yöresi, HumvWA, PCR, popülasyon genetiği.

ABSTRACT

Allel Frequency Distribution of HumvWA Locus in Çukurova Region

Short tandem repeat (STR) loci consist of tandemly repeated sequences, between 2 to 6 base pairs (bp) in length, which exhibit a high degree of polymorphism due to variation in the number of repeat units.

The analysis of STR loci by polymerase chain reaction (PCR) and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) is becoming the method of choice for forensic identification of biological body fluids and stains. The high abundance of STR loci in human genome has resulted in a wide choice of loci. The most useful marker for forensic analysis consist of repeat units of at least 4 bp since amplification artefacts due to enzyme slippage are reduced.

In this study, allele frequencies for HumvWA locus has been determined in a population sample from Çukurova region using PCR. After horizontal discontinuos PAGE and silver staining 8 (13-20) common allele were identified for HumvWA in a sample of 110 unrelated individuals. According to χ^2 test performed with observed and expected phenotypes, no significant deviation from Hardy Weinberg Equilibrium was found for Çukurova population sample ($\chi^2= 8.9365$, d.f= 14, $p>0.05$). The forensic efficiency of the HumvWA locus was obtained (observed heterozigosity= 0.7182, discrimination power= 0.92149 and mean exclusion change = 0.56822).

It is determined that the frequencies of a PCR-based HumvWA locus from Çukurova region database can be used in identity testing.

Key Words: Çukurova region, forensic efficiency, HumvWA, PCR, population genetics.

1. GİRİŞ

19.yüzyılın ortalarında fizik, kimya, biyoloji ve tıpta sağlanan gelişme, modern Adli Bilimler ve onların uygulama alanlarını genişletmiş ve çok sayıda bilim dalı Adli Bilimler bünyesinde yer almıştır^{1,2}.

Bu bilim dallarından biri 20.yüzyılın başlarında işlev kazanan Adli Serolojidir. Adli Seroloji her türlü biyolojik doku ve sıvılar ile bunlara ait lekelerin kimliklendirilmesi ve akrabalık ilişkilerinin tayinini gerçekleştirmektedir. Bu amaçla genetik kontrollü polimorfik işaretler kullanılmaktadır. Genetik kontrollü işaretlerin kimliklendirme ve paternite tayininde kullanılabilmesi, kullanılan genetik işaretlerin popülasyonda bireyler arasında çeşitlilik göstermesine ve Mendel Kalıtımına uygun olarak ebeveynlerden çocuklarına aktarılabilmesine bağlıdır^{1,2}.

Serolojide kimliklendirme ve akrabalık ilişkilerinin saptanması öncelikle ana kan grup ve subgrupların tanımlanması ile başlamış, ardından çeşitli polimorfik eritrosit enzim ve serum proteinleri ile insan lökosit antijenleri de bu amaçla kullanılmıştır. Gen ürünlerinin oluşturduğu ve popülasyonda polimorfizm gösteren bu yapılar halen günümüzde kimliklendirme ve paternite tayininde rutin olarak kullanılmaktadır^{1,2}.

Deoksiribonükleik asit (DNA) düzeyindeki incelemeler ise ilk kez 1978 yılında hemoglobinin genetik varyantlarının Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) tekniği ile tanımlanmasıyla başlamıştır. Çeşitli genetik hastalıkların tanısında kullanılan RFLP tekniği ile DNA düzeyinde diamorfik polimorfizmler belirlenmiştir. Saptanan polimorfik özelliklerin ayırt etme gücü çok yüksek olmasa da, kimliklendirme ve paternite tayininde kullanım alanı bulmuştur¹⁻⁴.

Son dönemlerde, moleküler biyoloji ve popülasyon genetiği Adli Bilimlerde DNA teknolojisinin yeni uygulamalarında destekleyici ve geliştirici rol oynamıştır.

Kimliklendirme ve paternite tayininin DNA düzeyinde kapsamlı incelenmesi 1985 yılında Jeffreys et al⁵ tarafından minisatellit DNA'ların tanımlanmasından sonra başlamıştır. Ardından polimorfik Variable Number of

Tandem Repeat (VNTR), Amplification Fragment Length Polymorphism (AMP-FLP) ve Short Tandem Repeat (STR) lokuslarının tanımlanması ve kimliklendirmede geleneksel sistemlere olan üstünlüğünün belirlenmesiyle DNA analizi çalışmaları yoğunlaşmıştır. Bu gelişmeler sonrasında Adli Seroloji Bilim Dalı yeni içerik ve uygulama alanları doğrultusunda Adli Seroloji ve Hemogenetik Bilim Dalı olarak düzenlenmiştir⁶⁻¹².

Tanımlanan genetik işaretlerin sayısının artması, adli amaçlı kullanılabilecek genetik işaretleri seçme şansı sunmuştur. Bu seçimde ilgili sistemin ayırt etme gücü, olumsuz çevre koşullarına dayanıklılığı, hassasiyeti, spesifikliğı, kolay ve hızlı tanımlanabilmesi, tanımlanması esnasında hata payının düşük olması gibi çok sayıda parametre dikkate alınmaktadır¹²⁻¹⁵.

Özellikle adli amaçlı kimliklendirme için kullanılan örneklerin genellikle çok az miktarda olması ve sağlıksız çevre koşullarından toplanan örneklerdeki DNA'nın bütünlüğünün aşırı bozulması dikkate alındığında, kimliklendirmenin en iyi STR lokuslarının tanımlanması ile mümkün olabildiğı belirtilmektedir¹²⁻¹⁸.

Genel olarak adli amaçlı rutinde kullanıma başlanmış ve halen çalışmalarına devam edilen lokusların tirozin hidroksilaz geninde bulunan HumTHO1, von Willebrand faktör geninde bulunan HumvWF31A (HumvWA), beta-actin pseudogende bulunan HumACTBP2, koagülasyon faktör XIII geninde bulunan HumF13A ve HumF13B, c-fes/fps proto-oncogen'de bulunan HumFES/FPS, tiroid peroksidaz geninde bulunan HumTPOX, c-fms proto-oncogen CSF1 reseptör geninde bulunan CSF1PO, hypoxantin fosforiboziltransferaz geninde bulunan HumHPRTB, lipoprotein lipaz geninde bulunan HumLIPOL lokusları olduğu bildirilmektedir¹⁹⁻²⁶.

Avrupa DNA Profillendirme Grubu (EDNAP; European DNA Profiling Group)'nun STR lokuslarının tanımlanmasında laboratuvar hata payını minimum düzeye düşürmek amacıyla yaptıkları standardizasyon çalışmalarında, HumTHO1 STR lokusundan sonra uygulamada en az hata oranının HumvWA lokusunda olduğu rapor edilmiştir. HumTHO1 lokusu Ç.Ü. Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nda bir başka proje kapsamında çalışılmış ve Çukurova yöresinde kimliklendirme ve paternite tayininde kullanılabilişliğı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle bu çalışmada uygulamada en

az hata oranı sıralamasında ikinci sırayı alan HumvWA lokusu tercih edilmiştir²⁷⁻²⁹.

Bu çalışmada; Çukurova yöresinde yaşayan bireylerden alınan örneklerde HumvWA STR lokusunun allel sıklıkları ve kimliklendirme potansiyeli belirlenerek, Anabilim Dalımız Laboratuvarında adli amaçlı paternite ve kimliklendirme tayininde kullanılabilirliği istatistiksel olarak değerlendirilecektir. Ayrıca, yapılan çalışma sonuçları diğer populasyon çalışma sonuçları ile karşılaştırılacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

Evrimsel süreç içinde türler arasında ve türler içinde mutasyonlara bağlı olarak genetik farklılıkların oluştuğu ve oluşan bu genetik farklılığın bir bireyi diğerinden tamamiyle ayırabilecek özellikte (tek yumurta ikizleri hariç) olduğu belirtilmektedir. Bireyler arasındaki bu genetik farklılık DNA polimorfizmi olarak adlandırılmaktadır. DNA polimorfizmleri hem DNA'nın protein kodlamada görev alan "kodlanan DNA bölgesinde (ekson)" hem de protein kodlamada fonksiyonu olmayan "kodlanmayan DNA bölgesinde (intron)" oluşabilmektedir^{10,30-32}.

Kodlanmayan DNA bölgesinde bulunan ve bireyler arasında farklılıklar gösteren ardarda tekrar DNA dizileri ilk olarak 1980 yılında Wyman and White³⁰ tarafından tanımlanmıştır. Bu çalışmada sekiz homolog restriksiyon parçasında bulunan bazların her bir restriksiyon parçasında farklı dizilimler oluşturduğu belirlenmiş ve bu diziler değişken uzunluk polimorfizmi (variable length polymorphism) olarak adlandırılmıştır. Ardından alfa-related gen, insan insülin geni, tip II kollajen gen ve c-Harvey Ras oncogen'de benzer polimorfik bölgeler rapor edilmiştir^{10,30-32}.

Ancak adli amaçlı analizler için önemli gelişme 1985 yılında Jeffreys et al⁵'un multilokus DNA probu kullanarak yaptıkları hibridizasyon çalışmalarıyla başlamıştır. Bu çalışma grubu, insan genomu boyunca dağılmış olan 15-20 baz çifti uzunluğundaki çekirdek DNA dizilerinin birbirlerine baş-kuyruk oluşturacak şekilde tekrarladığını ve bu tekrarların sayısının bireyler arasında farklılıklar gösterdiğini saptamışlardır. Genom boyunca dağılan çok sayıda çekirdek sıranın tekrarından oluşan bu diziler minisatellit, minisatellitlerin tanımlanmasında kullanılan teknik de DNA Parmakizi (DNA Fingerprinting) olarak adlandırılmıştır^{5,6}.

Nakamura et al³³ ise 1987 yılında single lokus DNA probu kullanmışlar ve insan genomu boyunca dağılan, ancak DNA parmakizinden farklı olarak her biri belirli bir lokusta bulunan ardarda tekrar DNA dizilerini saptamışlardır. Bu konuda devam eden çalışmalarda insan genomunda çok sayıda ardarda tekrar DNA dizilerinin bulunduğu rapor edilmiştir. 11-60 baz çiftinden oluşan baz

dizilimlerinin çeşitli sayılarda ve birbirlerine baş-kuyruk oluşturacak şekilde ardarda tekrarıyla oluşan bu lokuslar VNTR lokusları olarak anılmaktadır. Nükleotid veya nükleotidlerin delesyonu, insersiyonu ve/veya eşit olmayan krosing-over sonucu olabileceği ileri sürülen bu yapıların popülasyondaki varyasyonlarının çok yüksek olması ve yapılan mayoz çalışmalarla Mendel Kalıtımına uygun olarak kalıtım göstermesi ile mutasyon oranları belirlenerek kimliklendirme ve paternite tayininde rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır³³⁻³⁶.

Araştırmaların devamı ile tanımlanan VNTR lokusu sayısı artmış ve adli amaçlı kullanılabilecek lokuslarda seçme şansı yükselmiştir. Özellikle lekelerin kimliklendirilmesinde parça uzunlukları daha kısa tekrar baz dizilerini içeren lokusların Polymerase Chain Reaction (PCR) ile çoğaltılabilmesi nedeniyle araştırmacılar bu tip lokusları tercih etmek durumunda kalmıştır. PCR ile kopya edilebilen VNTR lokusları AMP-FLP adıyla anılmaktadır³⁷⁻⁴¹.

1990'lı yıllara ulaşıldığında AMP-FLP'den daha kısa parça uzunluk polimorfizmi oluşturan ve STR olarak adlandırılan VNTR lokusları ile özellikle lekelerin kimliklendirilmesinde yukarıda belirtilen minisatellit lokuslara oranla daha hassas, güvenilir ve hızlı sonuçlar alınabilmiş ve kimliklendirmede bütün ilgi bu lokuslar üzerine yoğunlaşmıştır¹²⁻¹⁹.

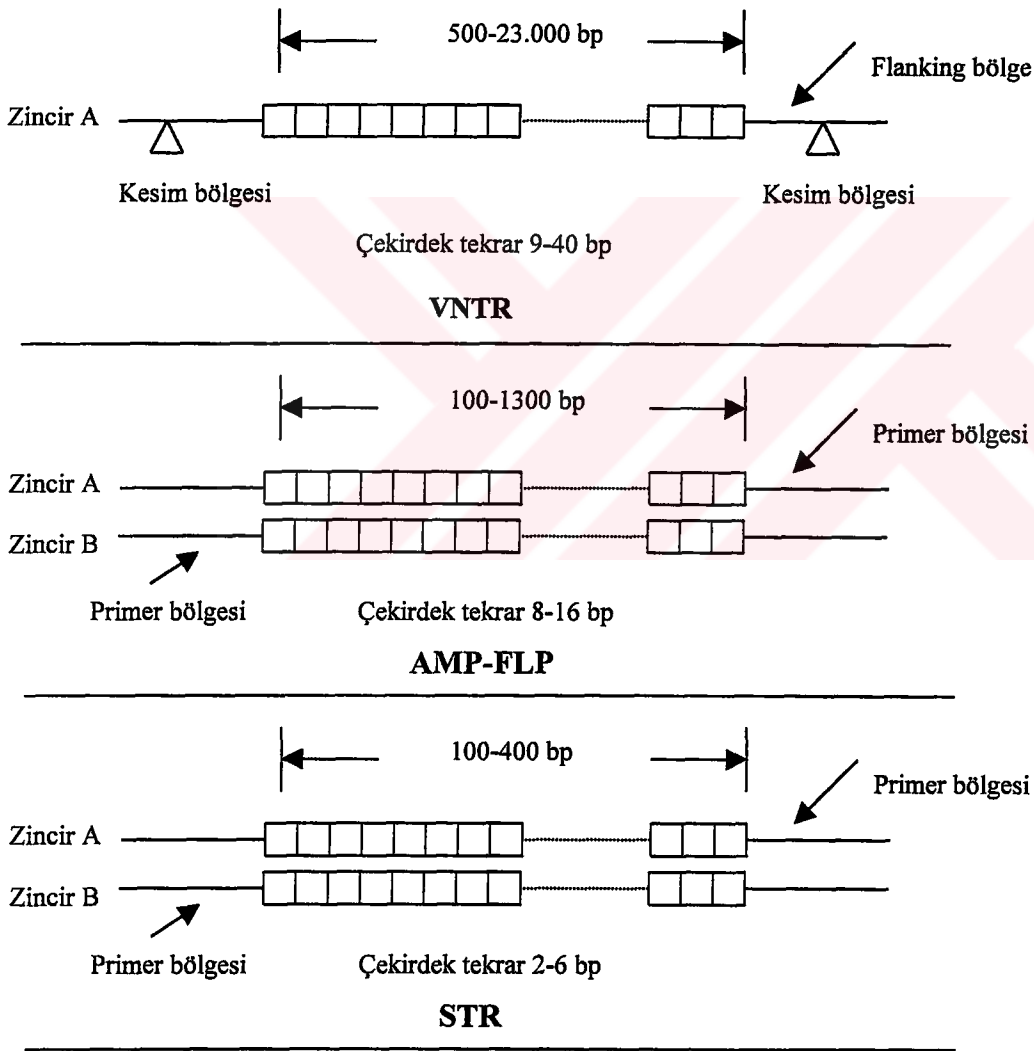
2.2 STR Lokusları

İlk olarak 1987 yılında tanımlanan ve zamanla sayıları artan VNTR lokusları çekirdek dizinin uzunluğu ve buna bağlı olarak oluşan baz dizisinin uzunluğu dikkate alınarak alt gruplara ayrılmıştır. Bu gruplardan biri STR lokuslarıdır^{1,33}. Şekil 2.1'de insan genomundaki VNTR DNA polimorfizmlerinin sınıflandırılması şematik olarak sunulmuştur.

STR lokusları insan genomunda 2-6 baz çifti uzunluğundaki DNA dizilerinin birbirlerine baş-kuyruk oluşturacak şekilde ardarda tekrarıyla, 100-400 baz çifti uzunluğunda baz dizimleri içeren bölgelerdir. Bu bölgeler tekrar ünite sayılarındaki varyasyonlara bağlı olarak çok fazla miktarda uzunluk polimorfizmi oluşturmaktadır. İnsan genomu boyunca her 6-10 kilobaz aralıklarla bir STR lokusunun bulunduğu ve genomda yaklaşık 4×10^8 STR lokusu bulunduğu belirtilmektedir^{1,19,42,43}.

STR lokusları genetik haritanın ortaya çıkarılması, antropolojik çalışmalar ve adli amaçlı kimliklendirme ve paternite tayininde kullanılmaktadır.

STR lokuslarının bazıları basit tekrar yapılar halinde bulunurken (HumTHO1, HumF13B, Hum FES/FPS), bazıları (HumvWA, HumCD4) bileşik tekrar yapılara ve diğer bazıları ise (HumD21S11) çeşitli tekrar bloklarının değişken sayıda tekrarından oluşan daha kompleks bir yapıya sahiptir^{1,12}.



Şekil 2.1 İnsan genomundaki VNTR DNA polimorfizmlerinin sınıflandırılması¹.

2.2.1 Adli Serolojide DNA Polimorfizmlerinin Kullanımı ve VNTR DNA Polimorfizmleri (VNTR, AMP-FLP ve STR)'nin Karşılaştırılması

Polimorfik DNA lokusların kimliklendirme ve paternite tayininde genetik işaret olarak kullanımından önce seçilen polimorfik lokusun bazı temel özellikler göstermesi gerekmektedir. Bu özellikler;

1. İlgili lokusun Mendel Kalıtımı göstermesi,
2. Lokusun kromozomal lokalizasyonu ve allellerin genetik dengede olup olmadığının saptanması,
3. Mutasyon oranlarının saptanması,
4. İlgili popülasyonda allel frekans dağılımlarının hesaplanması.

1. Mendel Kalıtımı: Yeni tanımlanan polimorfik DNA lokusunda genellikle yapılan ilk şey lokusun bağımsız kodominant alleller taşıyıp taşımadığının belirlenmesidir. Bu tespit ailelerle yapılan kalıtım çalışmaları ile mümkün olmaktadır. Bu tip bir analiz aynı zamanda null allellerinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır^{2,4,44}.

2. Kromozomal lokalizasyon ve bağlantı: Bağımsız olarak kalıtılan lokusların rastgele seçilen iki bireyde aynı genotipe sahip olma şansının istatistiksel olarak doğru hesaplanması ve sonuçların yorumlanmasını kolaylaştırmak için seçilen polimorfik lokusların birbiri ile yakın ilişkili olmaması gerekmektedir⁴⁴.

3. Mutasyon oranları: DNA'nın bazı bölgelerindeki baz dizilerinin çok fazla polimorfizme sahip olmasının bu bölgelerin yüksek oranda mutasyona uğramasından kaynaklanmış olabileceği belirtilmektedir. Yeni mutasyonların kimliklendirme değerlendirmesinde problem yaratmadığı, ancak akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde yanlışlıkla reddedilmelere sebep olabildiği belirtilmektedir. Mutasyon sıklığının belirlenmesine yönelik çalışmalarda bu olasılığın çok düşük olduğu, ancak akrabalık ilişkilerinin reddinin ikinci bir lokusla doğrulanmasının daha uygun olacağı ifade edilmektedir. ISFH üyeleri DNA düzeyinde polimorfik sistemlerin paternite analizlerinde kullanılmadan önce, en az 500 mayoz çalışma yapılması gerektiğini rapor etmişlerdir^{42,45}.

4. Populasyon genetiği çalışmaları: Populasyonda bulunan özel gen kombinasyonlarının olasılığını hesaplamak için ilgili popülasyonda seçilen

lokusun allel sıklığının bilinmesi gerekmektedir. Bir lokus bir popülasyonda güçlü bir ayırım gücüne sahipken, bir başka popülasyonda aynı oranda ayırım gücüne sahip olmayabilir⁴³⁻⁴⁶.

Geçmişte yapılan tanımlama yöntemlerinden ana kan grup ve subgruplar ile %78.6; bu gruba çeşitli polimorfik eritrosit enzim ve serum proteinleri ile HLA antijenleri dahil edildiğinde %99.8'in üzerinde bir ayırım gücüne ulaşılmaktadır. Bu oran 4 VNTR sisteminin tanımlanması ile %99.999 oranına ulaşmaktadır. Benzer şekilde, bir tek STR lokusunun tanımlanması ile %90'ın üzerinde, 6 STR sisteminin tanımlanması ile de %99.999 oranının da üzerinde ayırım gücüne ulaşılabilir^{11,47-51}.

Özellikle lekelerin kimliklendirilmesinde polimorfik antijen, enzim ve protein sistemlerinin tanımlanmasının çok güç olduğu; bu sistemlerin biyolojik materyaller için uygun olmayan çeşitli çevre koşullarında -ısı, ışık, nem, kontaminasyon- aktivitelerini uzun süre koruyamadıkları saptanmıştır¹.

DNA düzeyinde yapılan incelemelerde minisatellit DNA'ların parçalanmamış bir tek çekirdekli hücreden tanımlanabildiği belirtilmektedir. Ancak kanıt olarak toplanan örneklerde, olumsuz çevre koşullarına bağlı olarak antijenik ve enzimatik aktivitelerin kaybolması yanında, DNA bütünlüğünün de bozulduğu, bu nedenle lekelerde minisatellit lokusların tanımlanmasının çoğunlukla mümkün olamadığı ifade edilmektedir^{1,52,53}.

VNTR/RFLP sistemlerinin parçalanma oranı düşük DNA örneklerinde tanımlanabildiği belirtilmektedir. Ancak parçalanma oranı dışında VNTR allellerinin tanımlanmasında bazı sorunlar bildirilmektedir. Uzunluk polimorfizmi yüksek ve allel sayısı fazla olan VNTR lokuslarında, daha çok tekrar baz dizisi içeren DNA parçalarının sinyal hassasiyetinin yüksek olduğu, bu nedenle sinyal hassasiyeti düşük olan allellerin tanımlanmasının gözden kaçabildiği; ayrıca elektroforez süresinde küçük DNA parçalarının elektroforez mesafesini büyük parçalardan önce tamamlayıp jelin dışına çıkmasının mümkün olabildiği belirtilmektedir^{11,34,35}.

AMP-FLP ve STR sistemleri ile ise parçalanmış DNA örnekleri ile tanımlama yapılabilir; bu iki sistem karşılaştırıldığında STR lokuslarının AMP-FLP lokuslarına oranla 10 kat daha hassas olduğu saptanmıştır. Ayrıca STR

lokuslarının DNA parça uzunluklarının kısa olması nedeniyle PCR ürünlerinin poliakrilamid jellerde parça uzunluklarının tam olarak tanımlanabildiği belirtilmektedir. Bu nedenle adli analizlerde daha sağlıklı sonuçlar verdiği bildirilmektedir^{1,11,35,52-53}.

Bundan başka STR lokuslarının otomasyona izin vermesi, birden fazla lokusun aynı anda çalışılabilmesi, analiz için ihtiyaç duyulan kimyasal madde miktarını da azaltacağından ilave araştırmalarda ihtiyaç duyulan madde miktarına da katkı sağlayacağı belirtilmektedir. Kanıt olarak kullanılan kan, kıl, yumuşak doku, tükürük, parafinlenmiş doku, kemik gibi çekirdekli hücre içeren bütün biyolojik materyallerden sağlıklı DNA izolasyonu ve amplifikasyonunun yapılabildiği belirtilmektedir. Çizelge 2.1’de adli amaçlı kullanılan iki analiz yöntemi ve bu yöntemler ile tanımlanan polimorfik DNA lokuslarının karşılaştırılması yapılmıştır^{12-18,54-58}.

Çizelge 2.1 Adli analizlerde kullanılan AMP-FLP/STR ve VNTR lokuslarının tanımlanma yöntemlerinin karşılaştırılması¹.

	AMP-FLP, STR/PCR	VNTR/RFLP
Kullanılan DNA örneği	Yaşlı, parçalanmış veya parçalanmamış olabilir	Parçalanmamış daha büyük DNA dizileri
Hedef DNA dizi uzunluğu	100-3000 bp	3000-23.000 bp
Kullanılan DNA miktarı	1-25 ng	50 ng
Analiz süresi	2-3 gün	İzotopik analizlerde 6-8 hafta
Ayırt etme gücü	Ortalama 6 lokus	Ortalama 4-5 lokus
Lokusun allel büyüklüğü	8-22 allel	250-1000 allel

2.2.2 Adi Amaçlı Kullanılan STR Lokusları

STR lokuslarının adli amaçlı kimliklendirme ve paternite tayininde kullanılabilmesi için bazı kriterler dikkate alınmaktadır. Bunlar;

1. Kullanılan lokusunun ayırım gücünün (Power of Discrimination=PD) %90’ın üzerinde ve gözlenen heterozigotluğun (Observed Heterozygosity=Obs-H) %70’in üzerinde olması,
2. Allelerin tahmin edilen uzunluklarının 90-500 baz çifti arasında olması,
3. Hassasiyeti yüksek olan lokusların seçilmesi,

4. Biyolojik örnekler için uygun olmayan çevre koşullarından toplanan örneklerden sağlıklı sonuçlar alınabilmesi,
5. Farklı biyolojik materyallerden elde edilen DNA örneklerinden incelemelerin sağlıklı yapılabilmesi⁴⁶.

Bu değerlendirmeler dikkate alındığında, kimliklendirme ve paternite tayininde genellikle tetramerik STR lokuslarının tercih edildiği belirtilmektedir. Ayrıca, tetramerik STR lokuslarının dimerik ve trimerik STR lokuslarına oranla tanımlanması esnasında hata payının düşük olması, jel üzerinde ayrımının kolay yapılması ve amplifikasyonu yapılan örneklerin elektroforezinde artık ürün oluşumunun daha az olması gibi avantajlarının olduğu bildirilmektedir¹²⁻¹⁸. Adli amaçlı kullanılan STR lokusları Çizelge 2.2’de sunulmuştur.

Çizelge 2.2 Adli amaçlı kullanılan STR lokusları⁵⁴.

STR lokusu	Bulunduğu Kromozom	Genbankası adlandırması	Tekrar sıra 5’-3’	Allel Uzunlukları	Yaygın Alleller
THO1	11p15.5	HUMTHO1	AATG	179-203	5,6,7,8,9,10,11
VWA	12p12-pter	HUMVWFA31	AGAT	139-167	13,14,15,16, 17,18,19,20
F13A	6p24.3-p25.1	HUMF13A01	AAAG	283-331	4,5,6,7,8,9, 11,12,13,14,15
F13B	1q31-q32.1	HUMBFXIII	AAAT	169-189	6,7,8,9,10,11
FESFPS	15q25-qter	HUMFESFPS	AAAT	222-250	7,8,9,10,11, 12,13,14
TPOX	2p25.1-pter	HUMTPOX	AATG	224-252	6,7,8,9, 10,11,12,13
CSF1PO	5q33.3-q34	HUMCSF1PO	AGAT	295-327	7,8,9,10, 11,12,13,14,15
HPRTB	Xq26	HUMHPRTB	AGAT	259-303	6,7,8,9,10,11,12, 13,14,15,16,17
LPL	8p22	HUMLIPOL	AAAT	105-133	7,8,9,10, 11,12,13,14

2.2.3 STR Lokusu Allellerinin Adlandırılması

Adli amaçlı kullanılan tanımlayıcıların aynı adla anılması, hem çalışan kişiler arasında ortak bir dil oluşturma, hem de yargıya sunulan sonuçların uyumu açısından önem kazanmaktadır. Bu amaçla Uluslararası Adli Hemogenetik Derneği (ISFH; International Society of Forensic Haemogenetics) 1992 yılında yayınladıkları bir raporla ortak bir adlandırma önerisi sunmuştur. Öneride ilgili allelin ardarda tekrar baz dizilim sayısının yazılması; eğer tamamlanmamış veya yarım kalmış tekrar baz dizilimi varsa, tamamlanmış tekrar sayısının yazılarak ondalık işaretle ayrılması ve tamamlanmamış tekrarın baz sayısının yazılması gerektiği belirtilmektedir^{59,60}. Örnek: HumTHO1 STR lokusu⁶¹.

	<u>Alleller</u>	<u>Tekrar diziler</u>
HumTHO1	5-11	[AATG] ₅₋₁₁
HumTHO1	9.3	[AATG] ₆ [-ATG] [AATG] ₃

2.3 HumvWA Lokusu

2.3.1 HumvWA Lokusunun Lokalizasyonu ve Yapısı

HumvWA lokusu 12. kromozomun kısa kolu üzerinde (12p-12pter), von Willebrand Faktör geninin 40. intronunda bulunmaktadır (Gen bankası numarası: M25858)^{20,61,62}.

Timin-Citozin-Timin-Adenin (TCTA) ve Timin-Citozin-Timin-Guanin (TCTG) baz dizilerinin ardarda tekrarlarıyla oluşan HumvWA lokusunun polimorfik yapısı bileşik tekrar olarak tanımlanmakta ve kısaca (TCTR)n ile gösterilmektedir. Tekrar sayısı n ile belirtilirken; R, A veya G bazı yerine kullanılmaktadır. HumvWA lokusunda birbirlerinden 4 baz çiftiyle farklılaşan 135-167 baz çifti arasında yaygın 9 allel tanımlanmıştır. Alleller küçükten büyüğe doğru 13-21 olarak adlandırılmıştır. Çizelge 2.3'te yaygın dağılım gösteren 9 HumvWA allelinin baz dizileri gösterilmiştir. Allellerin 5' flanking bölgesinde 43 baz çifti, 3' flanking bölgesinde 39 baz çiftinin bulunduğu saptanmıştır^{20,63-65}.

Çizelge 2.3 HumvWA allellerinin PCR ürün uzunlukları ile tekrar bölgesinin baz dizilimi^{61,63,65}.

Allel no	Parça uzunlukları ortalama (min-max)	Tekrar dizileri
13	135 (133.4-136.1)	TCTA (TCTG)4 (TCTA)8
14	139 (137.4-140.1)	TCTA TCTG TCTA (TCTG)4 (TCTA)3 TCCA (TCTA)3
15	143 (141.4-144.1)	TCTA (TCTG)4 (TCTA)10
16	147 (145.5-148.2)	TCTA (TCTG)4 (TCTA)11
17	151 (150.5-152.2)	TCTA (TCTG)4 (TCTA)12
18	155 (153.6-156.3)	TCTA (TCTG)4 (TCTA)13
19	159 (157.7-160.4)	TCTA (TCTG)4 (TCTA)14
20	163 (161.9-164.6)	TCTA (TCTG)4 (TCTA)15
21	167 (166.0-168.7)	TCTA (TCTG)4 (TCTA)16

HumvWA allellerinde TCTA ve TCTG tekrarından oluşan 2 temel tetranükleotid yapının yanında elektroforetik olarak ayrımı yapılamayan ancak dizi analizi ile belirlenebilen 2 majör farklılık belirlenmiştir⁶⁵.

1- TCTA (TCTG)4 (TCTA)n

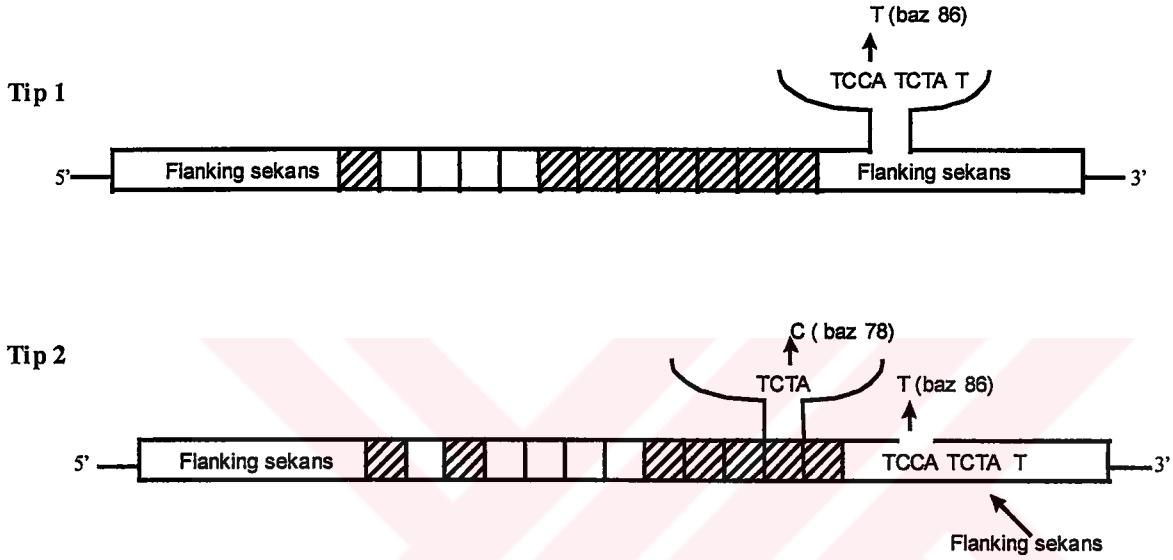
2- TCTA (TCTG)3 (TCTA)n

Allel baz dizimleri incelendiğinde allel 14 hariç diğer bütün allellerin (13-21) aynı tekrar yapıdan oluştuğu [TCTA (TCTG)n (TCTA)n], ancak allel 14'ün baz dizisinde diğer allellerden farklı olarak 3 ayrı bölgede oluşan 3 farklı yapı bulunduğu saptanmıştır. Bu farklılıklardan biri 5' bölgeden okuma yapıldığında temel tekrar yapıdan önce 2 tetranükleotid yapının ilavesi, diğeri TCTA'nın 4. tekrarında Timin bazının yerine Sitozin bazının bulunması ve sonuncusu 3' flanking bölgede Timin-Sitozin yer değişikliğinin oluşmasıdır. Allel 14 saptanan ve rastgele seçilen 12 bireyin kontrol analizlerinde; bu yapısal farklılığın 12 birey için de aynı olduğu ifade edilmektedir⁶⁵.

Horst et al⁶⁶ yukarıda tanımlanan diziye uymayan ve TCTA (TCTG)3 (TCTA)10 dizisinden oluşan nadir bir 14 alleli ile; Karger et al⁶⁷ native jelde allel 15 olarak belirlenen, ancak dizi analizinde moleküler yapısı allel 14 ile uyumlu olan 14+4 allelini bildirmişlerdir.

Belirtilen 9 yaygın allel dışında çok nadir bulunduğu belirtilen 127 baz çiftlik 11, 144 baz çiftlik 15.2, 171 baz çiftlik 22 ve 131 baz çiftlik 12 alleli rapor

edilmiştir. Tanımlanan 11, 15.2 ve 22 allellerinin yaygın HumvWA allelleri ile aynı tekrar yapı ve flanking bölgeye sahip olduğu, ancak 12 allelinin farklı olduğu belirtilmektedir. HumvWA lokusunda 12 alleli saptanan örneklerin dizi analizinde iki tip allel 12 bildirilmiştir^{12,68,69}. Şekil 2.2’de bu iki tip 12 alleli ve tekrar üniteleri şematik olarak sunulmuştur.



Şekil 2.2 HumvWA lokusunda tanımlanan 2 tip 12 alleli⁶⁹.

131 baz çiftinden oluşan tip 1'in 14 tekrar ünitesini takiben 3' flanking bölgede 86. bazda Timin-Citozin yer değişikliği sonucu flanking bölgeden 8 baz çiftinin tekrar bölgeye katıldığı; tip 2'de ise 78. bazda Citozin-Timin, 86. bazda Timin-Citozin yer değişikliği saptanmıştır⁶⁹.

2.3.2 HumvWA Lokusunun Adli Analizlerde Etkinliği

Araştırmacılar adli amaçlı kullanılan lokusların kromozomal lokalizasyonu ile, ilgili popülasyondaki heterozigotluk oranı ve ayırım gücü yanında; örneklerin parçalanması ve yaşlanması durumunda gösterilebilme şansı, karışık örneklerden tanımlanabilme şansı, tür identifikasyonunda spesifikliğı ve başarı oranlarını içeren geniş bir yelpazede incelemeye almışlardır.

2.3.2.1 Hassasiyet

Çalışılan DNA miktarı bir lokus veya birden fazla lokusun aynı anda çalışıldığı multilokus tiplendirmeye bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Lygo et al⁶³ HumvWA lokusunun da dahil olduğu multiplex DNA amplifikasyonu için 1 ng DNA örneğinden başarı ile amplifikasyon yapılabildiğini belirtmişlerdir. Dört lokusun aynı anda çalışıldığı bir başka araştırmada parçalanma olmayan 100 pg'lık genomik DNA'da tanımlama yapılabildiği ifade edilmektedir. 50 pg veya daha az konsantrasyonlardaki DNA örneklerinde yapılan amplifikasyon çalışmalarında PCR ürünlerinin jelde bant yoğunluğunun azaldığı ve tanımlamanın güç olduğu belirtilmektedir^{58,70}.

2.3.2.2 HumvWA Allellerinin Tanımlanmasında Olumsuz Çevre Koşullarının ve Eski Örneklerin Etkisi

Adli örnekler genellikle biyolojik materyaller için uygun olmayan sağlıklı çevre koşulları (ısı, ışık, nem, kontaminasyon, ultraviyole ışığı)'ndan toplandığından, olumsuz çevre koşullarından toplanmış veya eski örneklerden ne kadar süreyle sağlıklı DNA analizi yapılabilme şansının belirlenmesi gerekmektedir^{13,71-73}.

Yapılan çalışmalarda olumsuz çevre koşullarına bağlı olarak DNA örneğinin parçalanma süresinin örnek tipine bağlı olarak değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Kan lekesi, semen lekesi, tükürük lekesi ve kıl kökü ile yapılan deneysel çalışmalarda en dayanıksız materyalin tükürük, en dayanıklı materyalin kıl kökü olduğu ifade edilmektedir. Deneysel olarak hazırlanan ve 37°C'de nemli bir kutu içinde 0-90 gün bekletilen örneklerden tükürük lekesinde en fazla 17 gün içinde tüm profillerin kaybolduğu, bazı kan ve semen lekelerinde 60 günün üzerinde tüm profillerin tanımlanabildiği, buna karşın kıl kökünde bu sürenin 90 günün üzerine çıktığı belirtilmektedir¹³.

Diş kökünde yapılan başka bir çalışmada DNA konsantrasyonunun bu materyalin toprakta kalma süresiyle doğru orantılı olarak azaldığı, deneysel olarak toprağa gömülen 6-8 haftalık 12 örnekten 7 tanesinde HumvWA allellerinin tanımlanabildiği, bu süre 18 haftayı geçtiğinde ise 2 tanesinde tanımlama yapılabildiği belirtilmektedir. Bununla birlikte, 16 yıllık iskelet

kalıntılarında yapılan çalışmalarda HumvWA allellerinin tanımlanabildiği belirtilmektedir^{71,72}.

Ultraviyole (UV) ışığının biyolojik materyallerden elde edilen DNA'ya etkisinin araştırıldığı bir çalışmada UV-ışığının DNA'nın parçalanmasını kolaylaştırdığı ifade edilmektedir. 30 dakikalık farklı ışık kaynaklarında bekletilen kan örneklerinden RFLP DNA analizi çalışmalarında DNA profillendirmenin yapılamadığı, ancak PCR'a dayalı STR lokuslarının analizlerinde HumvWA lokusunun da dahil olduğu bazı STR lokuslarının tanımlanabildiği belirtilmektedir⁷³.

2.3.2.3. Somatik Stabilité

Kanıt olarak toplanan örnekler bazı durumlarda farklı doku ve vücut sıvısına ait olduğundan aynı bireyin kan, tükürük, kıl kökü, semen veya vajinal sıvı gibi farklı vücut sıvı ve dokularından elde edilen DNA'larda aynı DNA profillerinin bulunması gerekmektedir. Bu nedenle bu tür değişikliklerin çalışılan lokuslara etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Aynı bireylerin çeşitli dokularından alınan DNA örneklerinden HumvWA STR lokusu ile yapılan deneysel çalışmalarda, bütün doku tiplerinde aynı DNA profili saptanmıştır^{55,70}.

2.3.2.4 Özgünlük (Tür spesiflik)

Özgünlük, insan kaynaklı olmayan DNA ile insan spesifik primerlerin reaksiyon oluşturmamasına bağlıdır. Yapılan özgünlük testlerinde, çok çeşitli hayvan türlerinden elde edilen DNA'nın HumvWA primerleriyle amplifiye olabildiği araştırılmıştır. Türler arasında maya ve bakterilerden yüksek organizmalı hayvanlara kadar uzanan amplifikasyon çalışmalarında, HumvWA primerleri ile insan kaynaklı olmayan DNA'ların amplifikasyonunun mümkün olmadığı rapor edilmiştir. Bu nedenle, kimliklendirmede aynı zamanda tür spesifik testlerin yapılmasına gerek kalmadığı ifade edilmektedir. Ancak Sajantila et al⁴⁵ şempanze DNA'ları ile HumvWA primerlerinin amplifiye olabildiğini ve amplifiye olan PCR ürünlerinin insan allellik ladderları ile karşılaştırıldığında aynı büyüklükte amplifiye ürünler ile ilave bantların bulunduğu ifade etmişlerdir^{13,63,74}.

2.3.2.5 Karışık Örneklerden HumvWA Allellerinin Tanımlanması

Deneyisel olarak hazırlanan kan-kan, semen-tükürük, DNA-DNA örneklerinin 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 10:1, 5:1 ve 2:1 karışımlarından her iki örneğin allellerinin tanımlanıp tanımlanamayacağı araştırılmıştır. Genellikle 1:10 oranındaki karışımda minör komponentin tanımlanamadığı belirtilmektedir^{13,63}.

2.3.2.6 Mutasyon Oranları

HumvWA lokusundaki mutasyon oranının 453 aileyle yapılan bir mayoz çalışmada % 0.2, 383 aileyle yapılan bir başka çalışmada % 0.5 olduğu belirtilmektedir. Bu iki çalışma sonucu HumvWA lokusu için belirlenen mutasyon oranının % 0.36 olduğu bildirilmektedir^{70,75}.

HumvWA allellerinin uzunluk polimorfizmiyle oluşturduğu varyasyonların yanında, sekans polimorfizmi ile de varyasyon oluşturmalarının HumvWA allellerinin dizi analizi yapılarak daha yüksek bir ayırım gücüne ulaşılmasının mümkün olacağı ifade edilmektedir. Ancak, bu gibi varyasyonların allellerin tam ve doğru olarak tanımlanmasını, aynı zamanda güvenilirliğini ciddi biçimde etkileyebileceği; bu nedenle bu tip mikroheterojenitelerin tam olarak belirlenmesinin bütün allel sistemlerinde allelik ladder'ların tanımlanması için önceden gerekli olduğu belirtilmektedir. Diğer yandan ISFH flanking bölge veya tekrar bölgede delesyon veya insersiyona bağlı olarak tekrar sayıda veya sırada farklılık oluşabileceğini, ancak bunun kimliklendirme ve veri tabanı oluşturmada bir problem yaratmayacağını ifade etmektedir^{60,76}.

2.4 Chelex 100 İle DNA Ekstraksiyonu

Chelex 100 polyvalent metal iyonlarına karşı yüksek afiniteye sahip kelatlaştırıcı bir reçinedir. Chelex reçinesi chelator grup olarak görev yapan iminodiasetat iyonlarını içeren styrene divinil benzen kopolimerlerden oluşmaktadır. Chelex'in fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, düşük iyonik güçlü solüsyonlarda ve yüksek ısıda DNA'nın kırılmasında katalitik etki yapan metal iyonlarını tutarak DNA'nın parçalanmasını engellediği belirtilmektedir. Kaynamanın etkisi ile hücre membranı bozularak DNA denatüre olmaktadır. Bu nedenle bu yöntem tüm DNA gerektiren çalışmalarda

kullanılmamaktadır. Ancak spesifik lokusların çalışıldığı ve hedef bölgenin intact kalmasının yeterli olduğu çalışmalarda kullanılabilir⁷⁷⁻⁷⁹.

Chelex ile ekstraksiyon metodu özellikle adli amaçlı kullanılan STR lokuslarının analizinde yaygın kullanım alanı bulmuştur^{13,14,79-82}.

2.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İlk olarak 1985 yılında Saiki et al⁸³ tarafından orak hücre anemili hastaların tanısında kullanılan PCR tekniği günümüzde birçok kalıtsal hastalığın tanısı, gen haritasının çıkarılması, antropolojik çalışmalar, ziraat ve zootekni, kimliklendirme ve paternite tayini gibi canlı organizma ile uğraşan bütün bilim dallarında yaygın kullanım alanı bulmuştur⁸³⁻⁸⁷.

PCR kısaca in vitro DNA replikasyonu olarak adlandırılmaktadır. Canlı hücrede gerçekleşen DNA replikasyonunun in vitro koşullara adapte edilmesiyle, hedef DNA dizisinin milyonlarca kopyası yapılabilir.

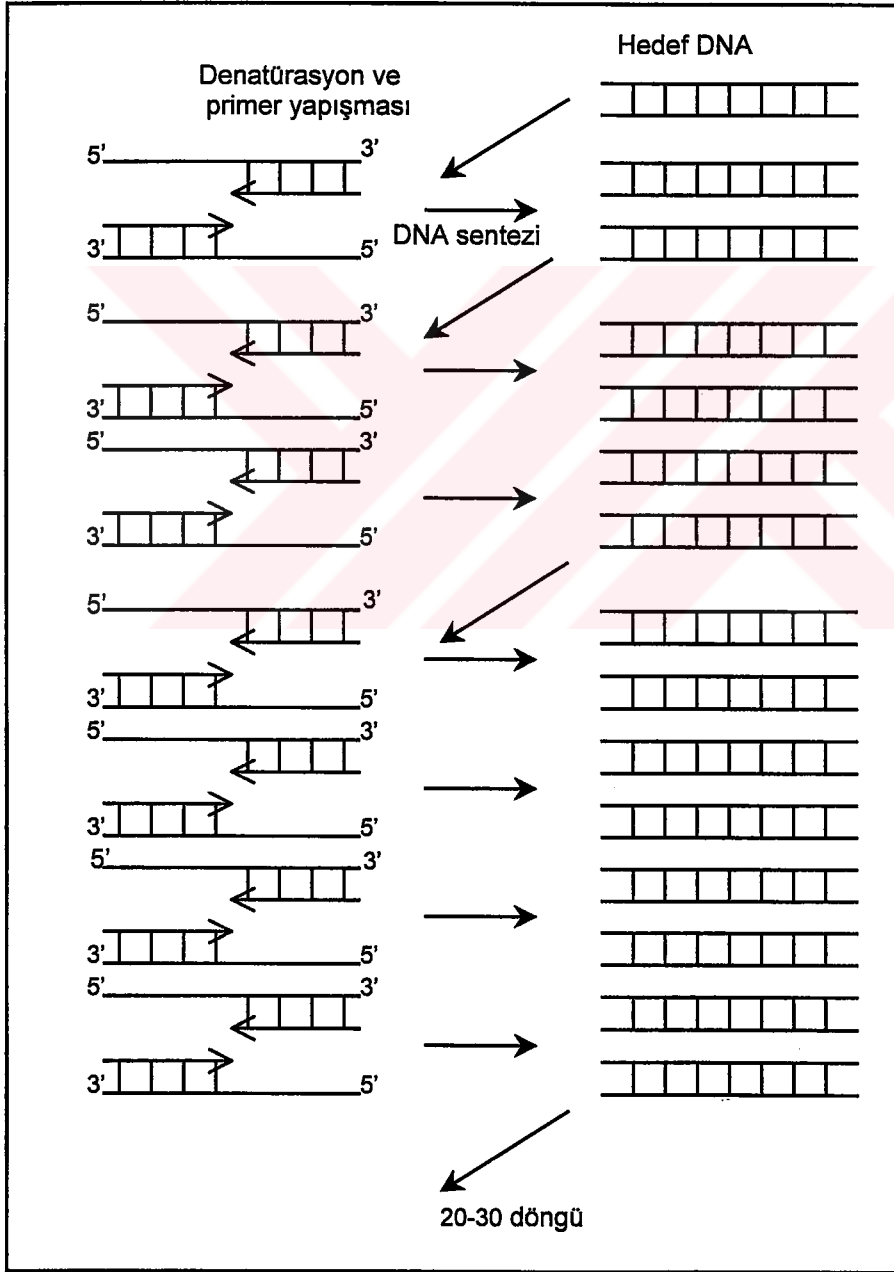
Yöntem, DNA'nın ısı ile denatüre edilerek çift iplikçinin birbirinden ayrılmasını (denatürasyon, 90-95°C) takiben, primer olarak adlandırılan kısa oligonükleotid dizilerin templat DNA'ya yapışması (primer annealing, 55-60°C) ve DNA polimeraz enzimi varlığında yapışan primerin templat DNA'ya komplementer olarak uzaması (primer extension, 70-75°C) aşamalarından oluşmaktadır. Bu üç aşama bir döngü olarak kabul edilmektedir. Döngü sayısı araştırılan hedef DNA dizisinin kullanım amacına bağlı olarak belirlenmektedir. Şekil 2.3'te PCR döngüsü şematik olarak gösterilmiştir^{1,86-88}.

PCR, başlangıçta *Escherichia coli* bakterisinden elde edilen DNA polimeraz enzimi ile yapılmaktaydı. Ancak kullanılan enzim ısıya dayanıksız olduğundan, her döngü için ortama yeniden enzim eklemek gereksinimi nedeniyle PCR'in zor, pahalı ve uzun olduğu görülmüştür⁸⁷⁻⁸⁹.

Thermus aquaticus adlı sıcağa dayanıklı bir mikroorganizmadan elde edilen ve kısaca Taq polimeraz olarak adlandırılan bir başka enzimin saptanması, PCR'in çok daha kolay, hızlı ve güvenilir yapılmasını sağlamıştır. Taq polimeraz enziminin 96°C'ye 6 dakika dayanabildiği belirtilmektedir. DNA çalışmalarının son 15 yılda hızlı gelişmesinin Taq polimeraz enziminin kullanımı ile PCR'in otomasyonunun sağlanmasına, böylece hedef DNA dizilerinin çok

hızlı, kolay ve güvenilir bir şekilde çoğaltılabilmesine bağlı olduğu belirtilmektedir⁸⁷⁻⁹⁰.

PCR ile hedef baz dizisinin istenilen miktarda çoğaltılabilmesi nedeni ile Adli amaçlı kimliklendirme ve paternite tayininde çok özel bir yere sahip olmuştur. Adli amaçlı kanıt olarak gönderilen çok az miktardaki kan, semen, vajinal sıvı, tükürük, kıl kökü ve kemik gibi biyolojik örneklerden elde edilen çok az miktardaki DNA'dan sağlıklı DNA analizleri yapılabilmiştir⁸⁰⁻⁸².



Şekil 2.3 PCR döngüsü⁸⁸.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Rastgele seçilen ve aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan sağlıklı 200 kişiden alınan kan örnekleriyle yapılması planlanan bu çalışmaya başlamadan önce hazırlanan proje Çukurova Üniversitesi Etik Kurulu'na sunulmuş ve görüş alınmıştır.

Bu projede 200 kan örneğinin çalışılması planlanmış, ancak eldeki mevcut kimyasal madde miktarının az olması nedeniyle çalışma 110 kan örneği ile tamamlanmıştır. Bu çalışma Ç.Ü. Araştırma Fonu tarafından SBE 97-D-5 nolu proje çerçevesinde maddi olarak desteklenmiştir.

Kan almadan önce gönüllü vericilere bilgilendirme formu okutulmuş ve kişilere kan örneklerini gönüllü verdiklerini beyan eden rıza formları imzalatılmıştır. Şekil 3.1'de bilgilendirme ve rıza formu ile kayıt formu örneği bulunmaktadır.

BİLGİLENDİRME FORMU

Bu çalışmanın amacı; Çukurova yöresinde yaşayanların genetik tanıtıcılarını DNA analizi ile ortaya koymaktır.

Gönüllü olarak katılacak kişilerden 2 cc venöz kan alınarak, bu kanlarda analiz yapılacaktır. Bu çalışmada elde edilecek bilgiler ile, toplumdaki 4 STR sistemine rastlanma sıklığı saptanacaktır. Elde edilen sonuçlar, Adli Tıp Anabilim Dalı'nca yapılacak çalışmalarda "Kişilerin adı, soyadı veya onları tanıttıcı herhangi bir işaret belirtilmeden" veri olarak kullanılabilecektir. Sonuçlar çalışmaya katılan kişilere, istedikleri takdirde yazılı olarak bildirilecektir.

Kan alma işlemi öncesi, bu çalışmaya gönüllü olarak katılmak istediğinize dair rıza formunu imzalamanız gerekmektedir.

RIZA FORMU

Aşağıda imzası bulunan ben, DNA analizi ile genetik tanıtıcıların ortaya konması çalışması hakkında tam olarak bilgi aldım.

Gönüllü olarak kol damarımdan vereceğim 2 cc kanda yapılacak çalışma sonuçlarının; adım, soyadım veya beni tanıttacak herhangi bir işaret belirtilmeden yayınlanabileceği ve istediğim takdirde bilgilerin yalnızca bu araştırma amacına yönelik olarak saklanacağı bildirildi.

Bu bilgileri aldıktan sonra, bu çalışmaya gönüllü olarak katıldığımı beyan ederim.

Gönüllünün Adı ve Soyadı:

Yaşı:

Tarih:

İmza:

Bilgi için:

Ç.Ü.T.F. Adli Tıp Anabilim Dalı

Tlf: 338 60 60/34 29

Şekil 3.1 (A) Bilgilendirme ve Rıza Formu Örneği

KAYIT FORMU

Adınız, Soyadınız :

Yaşınız :

Cinsiyetiniz :

Doğum Tarihiniz :

Doğum Yeriniz :

Adresiniz :

Telefon :

Anneniz ile babanız arasında akrabalık var mı ? :

Bilinen sistemik hastalıklarınız var mı ? :

Şu ana kadar herhangi bir tedavi gördünüz mü ?:

- İlaç
- Radyoterapi
- Kemoterapi
- Diğer

Şekil 3.1 (B) Kayıt Formu Örneği

3.1 Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler

- 1- Thermocycler cihazı (Progene, FPRG05D).
- 2- Soğutma tankı (Heto, CB 8-30 E).
- 3- Elektroforez tankı (Bio-Rad, Biophoresis horizontal gel electrophoresis cell).
- 4- Güç kaynağı (Bio-Rad, Power PAC 3000).
- 5- Analitik terazi (Ohaus, TP200S).
- 6- Vorteks (Electro.mag, M16).
- 7- Otomatik mikropipet takımı: 0-10 µL, 2- 20 µL , 20-200 µL ve 200-1000 µL kapasiteli, ayarlanabilir mikropipetler (Gilson P10, Gilson P20, Gilson P200 ve Gilson P1000).
- 8- Derin dondurucu (Bosch, GSD2616ID): İç sıcaklığı -20°C'ye ayarlanabilen derin dondurucu.
- 9- Buzdolabı (AEG): İç sıcaklığı +4°C'ye ayarlanabilen buzdolabı.
- 10- Su banyosu (Mettler, WB14 dijital göstergeli) ve (Electro.mag, KB6)
- 11- Manyetik karıştırıcı (Ikamag, RH).
- 12- Çalkalayıcı (IKALabortechnik, KS125 basic).
- 13- Mikrosantrifüj cihazı (Hettich Universal 12 F): Eppendorf tüplerin santrifügasyonuna uygun rotor başlığı bulunan ve 15.000 devir/dakika hıza ulaşabilen mikrosantrifüj cihazı.
- 14- pH Metre (Hanna, HI9321).
- 15- Su distilasyon cihazı (Electro.mag, M3).
- 16- Eppendorf tüpleri: 0.5 mL ve 1.5 mL hacim kapasiteli eppendorf tüpler.
- 17- Pipet uçları: 0.5-10 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL kapasiteli pipet uçları.
- 18- Steril eldiven.
- 19- Makas: Paslanmaz çelikten yapılmış ince uçlu makas.
- 20- Pens: Paslanmaz çelikten yapılmış dişsiz pens.
- 21- Mikrodalga fırın (AEG).
- 22- Filtre kağıdı: Whatmann no:3.
- 23- Cam plak: (12 x26 cm boyutlarında).
- 24- Cam bandı.
- 25- Alüminyum folyo.

3.2 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

1- Chelex 100	Sigma	C-7901
2- Proteinaz-K	Boehringer	745723
3- Tris Baz (%99.9) [Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Sigma	T-1503
4- Etilendiamintetraasetik asit dihidrat tuzu (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O)	Sigma	ED2SS
5- Hidroklorik asit (%99) (HCl)	Merck	8280
6- Taq polimeraz (5ü/µL)	Boehringer	1418432
7-10xprimer çifti (HumVWA primerleri)	Promega	DK613B
8- 10xSTR tamponu	Promega	DM221A
9- Mineral yağ	Sigma	M-5904
10- K562 DNA	Promega	DD208A
11- Akrilamid (%99.9)	Bio-Rad	161-0101
12- Bisakrilamid(%99.9) (N,N'-Methylene-bis-acrylamide)	Bio-Rad	161-0201
13- CHES (%99) [2-(N-Cyclohexylamino)ethane-sulfonic acid]	Sigma	C-2885
14-TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine)	Bio-Rad	161-0801
15-Sülfirik asit (%95-98) (H ₂ SO ₄)	Merck	713,25
16-Formik asit (%98-100) (HCOOH)	Merck	263
17- Amonyumpersülfat	Bio-Rad	161-0700
18- Borik asit (%99.5) (H ₃ BO ₃)	Sigma	B-0252
19- Bromfenol mavisi (3',3'',5',5''-Tetrabromphenol-sulfonephthalein)	Sigma	B-8026
20- Agaroz (%99)	Promega	V312A
21- vWA allelik ladder	Promega	DG204B
22- Gümüşnitrat (%99.8) (AgNO ₃)	Merck	1510
23- Nitrik asit (%65) (HNO ₃)	Merck	443
24- Asetik asit (%100) (CH ₃ COOH)	Merck	56
25- Sodyum karbonat (%98-100) (Na ₂ CO ₃)	Merck	6398
26- Formaldehit (%37) (HCHO)	Merck	4002
27- Gliserol (%87)	Merck	4091
28- Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck	6462
29- Gel Bond (polyacrylamide gel support medium Kalınlık: 0.2 mm)	Bio-Rad	54727

3.3 Deneylerde Kullanılan Solüsyonlar

3.3.1 Chelex 100 ile DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Solüsyonlar

1- Tris-EDTA (TE) tamponu (1 L)

Tris baz	1.21 gr
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.037 gr

Tris baz ve Na₂EDTA.2H₂O 900 mL bidistile suda çözüldükten sonra konsantre HCl ile pH 7.4'e ayarlandı ve hacim 1 L'ye tamamlandı.

2- Proteinaz-K 2mg/mL (50 mL)

Proteinaz-K	100 mg
TE Tamponu	50 mL

TE tamponunda çözülen proteinaz-K 56°C'de 10 dakika, 37°C'de 1 saat bekletildi. Filtre kağıdında süzülen çözelti eppendorf tüplere aktararak kullanılabilece kadar -20°C'de saklandı.

3- %5'lik Chelex 100 solüsyonu (100 mL)

Chelex	5 gr
Bidistile su	100 mL

5 gr chelex tartıldı ve 100 mL bidistile su ile karıştırıldı. Buzdolabında saklandı.

3.3.2 Poliakrilamid Jellerin Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonlar

1- 1x Tris-sülfat tamponu (35 mM) (100 mL)

Sülfirik asit	0.215 mL
Tris baz	4.54 gr

4.54 gr Tris baz tartıldı ve 50 mL bidistile suda çözüldü. Çözeltiye 0.215 mL sülfirik asit eklendikten sonra hacim 100 mL'ye tamamlandı.

2- %30'luk Akrilamid-bisakrilamid solüsyonu (100 mL)

Akrilamid	29.1 gr
Bisakrilamid	0.9 gr

tartıldı ve hacim 100 mL olacak şekilde bidistile su eklendi.

3- %10'luk Amonyumpersülfat:

0.5 mg Amonyumpersülfat tartılıp 1000 µL bidistile suda çözöldü. Her çalışma öncesi taze hazırlandı.

4- CHES solüsyonu (0.28M), 100 mL, pH:9.0

CHES	5.84 gr
Tris baz	5 gr

tartıldı ve 100 mL bidistile su içinde çözöldü.

5- Tris-formiat tamponu (500 mM) 100 mL

Tris baz	6.055 gr
Formik asit	2.3 mL

6.055 gr tris baz tartıldı ve 50 mL bidistile suda çözöldü. Karışım formik asit eklendikten sonra hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Poliakrilamid jel için hazırlanan çözelti buzdolabında saklandı.

3.3.3 Agar Plaklarının Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonlar

1- 2xTris-borat tamponu pH: 9.0 (1 L)

Tris baz	60.55 gr
Borik asit	17.312 gr
Bromfenol mavisi	0.0001 gr

tartıldı ve 800 mL bidistile su içinde çözöldü. Konsantre HCl ile pH=9.0'a ayarlanarak hacim 1 L'ye tamamlandı.

3.3.4 Gümüş Boyamada Kullanılan Solüsyonlar

1- %1'lik Nitrik asit (1L)

%65'lik nitrik asit	20 mL
Bidistile su	980 mL

2- %2'lik Gümüşnitrat çözeltisi (1 L)

Gümüşnitrat	2 gr
Bidistile su	1000 mL

2 gr gümüşnitrat tartılıp 1000 mL bidistile suda çözöldü ve renkli cam şişede saklandı.

3- Sodyum karbonat çözeltisi (0.25 M) (100 mL)

Sodyum karbonat	2.968 gr
%37'lik Formaldehit	1 mL

alınarak bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Kullanılmadan hemen önce hazırlandı.

4- %10'luk Asetik Asit (1 L)

%100'lük Asetik asit	100 mL
Bidistile su	900 mL

5- %5'lik Gliserol solüsyonu (1 L)

Gliserol	50 mL
Bidistile su	950 mL

Gümüş boyama yöntemi için hazırlanan çözeltiler oda ısısında saklandı.

3.4 Deneyler

Bu çalışmada ayrıntılı olarak belirtilen deneyin tüm basamakları, daha önce Anabilim Dalımızda katılımı ile Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) projesi çerçevesinde yürütülen çalışmanın yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir⁹¹.

3.4.1 Örneklerin Hazırlanması

Ç.Ü. Balcalı Hastanesinin çeşitli birimlerinde çalışan kişilerden rastgele seçilen ve aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan sağlıklı 110 kişiden steril plastik enjektörler ile 2'şer cc venöz kan örneği alındı. Önceden hazırlanan ve her birine ayrı protokol numaraları verilen kurutma kağıtları üzerine kan lekeleri oluşturuldu. Örnekler oda ısısında 1 gün süreyle kurutulduktan sonra kağıt zarflara yerleştirildi ve deneyler başlayana kadar -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

3.4.2 %5'lik Chelex 100 Solüsyonu ile DNA Ekstraksiyonu

1- Gönüllü vericilerden alınan ve deneysel olarak kurutma kağıtları üzerine oluşturulan kan lekelerinden 3 mm² büyüklüğündeki parça makasla

kesilerek 1.5 mL'lik eppendorf tüplerine aktarıldı ve üzerine 1000 µL bidistile su eklendi.

- 2- Tüpler oda ısında 30 dakika bekletildikten sonra vorteksle karıştırılıp 15.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
- 3- Santrifüj tamamlandıktan sonra tüpün dip kısmında 30 µL kalacak şekilde üst fazdan 970 µL uzaklaştırıldı.
- 4- 30 µL'lik örnek üzerine manyetik karıştırıcı ile sürekli karışmakta olan %5'lik chelex solüsyonundan 150 µL, 2 mg/mL konsantrasyondaki proteinaz-K solüsyonundan 50 µL ilave edildi.
- 5- Karışım 56°C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 dakika inkübe edildikten sonra 5-10 saniye yüksek hızda vortekslendi.
- 6- 95°C'ye ayarlanan bir başka su banyosunda 8 dakika inkübe edilen örnekler tekrar 5-10 saniye vortekslenip 15.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve PCR için hazırlanmış oldu.
- 7- PCR için hazır hale getirilen örnekler amplifikasyonun hemen yapılmadığı zamanlarda +4°C'de saklandı.
- 8- Bekletilip daha sonra kullanılmak üzere buzdolabı veya derin dondurucuda saklanan örnekler amplifikasyondan hemen önce tekrar vortekslenip santrifüj edildikten sonra kullanıldı⁷⁷.

3.4.3 HumvWA Allellerinin PCR ile Çoğaltılması

Bu çalışmanın PCR basamağında Promega GenePrint STR sistemi kit protokolü uygulanmıştır⁵⁴. Her bir örnek ile pozitif ve negatif kontrol için ayrı ayrı işaretlenen 0.2 mL'lik eppendorf tüplerine bir örnek için koyulan miktarlar;

<u>Kullanılan maddeler</u>	<u>Miktar</u>
Bidistile su	17.45 µL
10 xSTR tamponu	2.50 µL
10x Primer çifti	2.50 µL
Taq polimeraz	0.05 µL
(5ü/µL)	

Bir örnek için kullanılan bu karışımdan her bir örnek için ayrı ayrı hazırlandı ve bütün tüplere konuldu. Ardından pozitif kontrol için işaretlenmiş

tüpe 2.5 µL K562 DNA, negatif kontrol için işaretlenmiş tüpe 2.5 µL bidistile su ve diğer tüplere ekstrakte edilen örneklerden sırayla 2.5 µL DNA örneği konuldu. Son olarak bütün tüplere örnek yüzeyini kaplayacak şekilde mineral yağ damlatıldı.

Thermocycler cihazına yerleştirilen tüplerin üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak amplifikasyon için uygun sıcaklıklar kodlandı ve program başlatıldı. PCR için kullanılan PCR döngü aleti Şekil 3.2'de gösterilmektedir.

HumVWA allellerinin amplifikasyonu için kullanılan amplifikasyon parametreleri:

96°C'de	2 dakika	} → 10 döngü
94°C	1 dakika	
60°C	1 dakika	
70°C	1 dakika	
90°C	1 dakika	} → 20 döngü
60°C	1 dakika	
70°C	1.5 dakika	



Şekil 3.2 Bu çalışmada kullanılan PCR döngü aleti.

Amplifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra örneklerde hedef DNA dizilerin amplifiye olup olmadığının kontrolü için %8'lik poliakrilamid jelde elektroforezi yapıldı. Bu amaçla %8'lik poliakrilamid jel ile %2'lik agar plakları hazırlandı^{92,93}.

3.4.4 %8'lik Poliakrilamid Jelin Hazırlanması

- 1- 12 cm x 26 cm boyutlarındaki 2 cam plak yaklaşık 30 dakika %10'luk NaOH solüsyonunda bekletildikten sonra non-iyonik bir deterjanla yıkandı. Cam plaklar bidistile sudan geçirildikten sonra kağıt havlu ile kurulandı.
- 1- Cam plaktan birinin kenar yükseklikleri 0.45 mm olacak şekilde ve bir köşesinde 1 cm boşluk kalacak şekilde ince bir cam bandı ile bantlandı. Diğer cam plağın üzeri bidistile su ile hafifçe ıslatılarak üzerine aynı büyüklükte jel bond (jel fix) konuldu.
- 2- Diğer yandan bir erlen içine balık koyularak manyetik karıştırıcı üzerine alındı.

Erlen içine;

Kullanılan maddeler

Miktar

%30 Akrilamid bisakrilamid solüsyonu

4 mL

Bidistile su

8 mL

35 mM Tris sülfat tamponu

3 mL

%10'luk amonyumpersülfat

105 µL

TEMED

5.3 µL

konuldu ve hazırlanan karışım cam bandı ile kenarları yükseltilen plak üzerine döküldü.

- 3- Diğer cam plağın jel bond koyulmuş tarafı jele temas edecek şekilde ve arada hava kabarcığı bırakmadan dökülen jel üzerine yavaşça kapatıldı.
- 4- Yaklaşık 20 dakika oda ısısında bekletilen jel kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı.

3.4.5 %2'lik Agar Plaklarının Hazırlanması

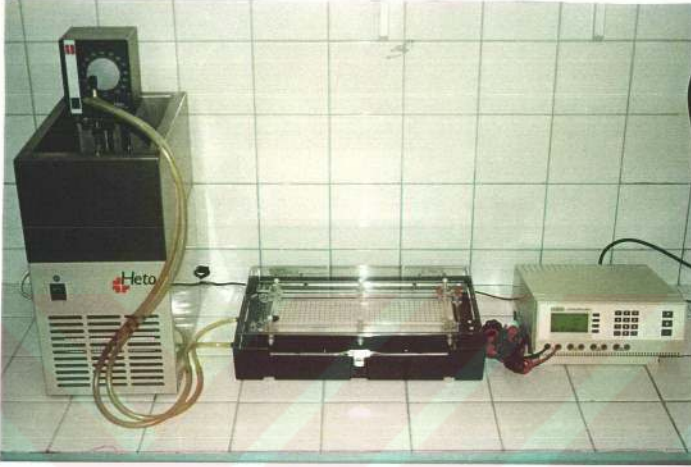
- 1- 2 gr agaroz tartıldı ve 100 mL 2xTris-borat tamponu ile karıştırıldı. Agarozun tamamen çözünmesi için mikrodalga fırında kaynayana kadar bekletildi.

- 2- Hazırlanan karışım 1 cm x 0.5 cm x 25 cm boyutlarında hazırlanmış plak üzerine döküldü ve soğumaya bırakıldı.
- 3- Soğuyan jel 2xTris-borat tamponu bulunan bir küvet içine alındı.
- 4- Hazırlanan jel plakları kullanılana kadar bu solüsyon içinde tutuldu.

3.4.6 % 8'lik Poliakrilamid Jele Aplikasyon ve Elektrophorez

- 1- Elektrophorez tankı açıldı ve soğuması için termostatik sirkülatör +4°C'ye ayarlandı.
- 2- Buzdolabından çıkarılan cam plak açılarak aradaki jel-bond'a yapışmış jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı.
- 3- Daha önce yaklaşık 2x3 mm boyutlarında kesilmiş kurutma kağıtları jelin uzun kenarı ve bu kenarın 1 cm yüksekliği belirlenerek 1'er cm arayla yerleştirildi.
- 4- Kurutma kağıtları üzerine sırasıyla pozitif kontrol, negatif kontrol ve amplifiye edilen örneklerden her biri bir kurutma kağıdına olmak üzere 6'şar µL aplike edildi.
- 5- Aplikasyonu takiben elektrophorez tankı hafif nemlendirilerek, jel tanka horizontal olarak yerleştirildi.
- 6- Jelin katod ve anod kısmına daha önceden hazırlanmış %2'lik agar plakları yerleştirildi.
- 7- Üzerinden akım geçecek şekilde ve elektrophorez katottan anoda olacak şekilde elektrotlar agar plakları üzerine yerleştirildi ve tankın kapağı kapatıldı.
- 8- Güç kaynağı 1000 V, 20 mA ve 10 W'a ayarlandı ve elektrophorez başlatıldı. Elektrophorez agar plaklarında bulunan bromfenol mavisi anoda birkaç mm yakınlığa ulaşınca kadar devam edildi. Bu işlem yaklaşık 35-45 dakikada tamamlandı.

Bu çalışmada kullanılan elektrophorez tankı, güç kaynağı ve soğutma tankı Şekil 3.3'te gösterilmektedir.



Şekil 3.3 Bu çalışmada kullanılan elektroforez tankı, güç kaynağı ve soğutma tankı.

3.4.7 Jelde Yürütülen DNA Parçalarının Boyanması

Bu amaçla gümüş boyama yöntemi kullanıldı^{92,93}.

- 1- Cam küvet içine alınan jel üzerine 100 mL %1'lik nitrik asit eklendi ve 3 dakika çalkalayıcı üzerinde çalkalandı.
- 2- 3 dakika sonunda nitrik dökülerek jel 2-3 kez bidistile su ile yıkandı.
- 3- Son yıkamadan sonra jel üzerine 100 mL %2'lik gümüş nitrat solüsyonu eklendi. İçinde jel bulunan küvet çalkalayıcı üzerinde 20 dakika bekletildikten sonra jel bu solüsyondan çıkarıldı ve 2-3 kez bidistile su ile yıkandı.
- 4- Yıkama sonunda jel üzerine 100 mL sodyum karbonat solüsyonu eklenerek bantlar görünür hale gelinceye kadar bekletildi.
- 5- Bantların belirginleşmesi ile sodyum karbonat solüsyonu boşaltılıp, 3 dakika %10'luk asetik asite alındı.
- 6- Tekrar bidistile su ile yıkanan jel 5 dakika %5'lik gliserol içinde bekletildi.

- 7- Amplifiye olan örnekler belirlendikten sonra, allellerin tanımlanması için %6'lık poliakrilamid jel hazırlandı.

3.4.8 %6'lık Poliakrilamid Jelin Hazırlanması

- 1- 12 cm x 26 cm boyutlarındaki 2 cam plak yaklaşık 30 dakika %10'luk NaOH'te bekletildi. Daha sonra non-iyonik bir deterjanla yıkanan plaklar bidistile sudan geçirildi ve kağıt havlu ile kurulandı. Plaklardan birinin kenar yükseklikleri 0.75 mm ve bir köşede 1 cm boşluk kalacak şekilde bantlandı. Diğer cam plağın üzeri bidistile su ile hafifçe ıslatılarak üzerine aynı büyüklükte jel bond konuldu.
- 2- Diğer yandan bir erlen içine balık koyularak manyetik karıştırıcı üzerine alındı.

Erlen içine;

<u>Kullanılan maddeler</u>	<u>Miktar</u>
%30 Akrilamid bisakrilamid solüsyonu	4.35 mL
Bidistile su	10.5 mL
0.28 M CHES	2 mL
500 mM Tris formiat tamponu	3.3 mL
%10'luk amonyumpersülfat	150 µL
TEMED	7.75 µL

konuldu ve hazırlanan karışım cam bandı ile kenarları yükseltilen plak üzerine döküldü.

- 3- Diğer cam plak jel bond jele temas edecek şekilde ve arada hava kabarcığı kalmayacak şekilde dökülen jel üzerine yavaşça kapatıldı.
- 4- Yaklaşık 20 dakika oda ısısında bekletilen jel kullanılabilecek kadar buzdolabında saklandı.

3.4.9 %6'lık Poliakrilamid Jele Aplikasyon ve Elektroforez

Amplifiye PCR ürünlerinin ayrıştırılmasında horizontal discontinuous poliakrilamid jel elektroforezi (hd-PGE) uygulandı^{92,93}.

- 1- Elektroforez tankı açıldı ve termostatik sirkülatör +4°C'ye ayarlandı.

- 2- PCR ürünleri 96°C'de 2 dakika bekletildi ve hemen buz üzerine konuldu.
- 3- Buzdolabından çıkarılan cam plak açılarak aradaki jel-bond'a yapışmış jel çıkarıldı.
- 4- Daha önce 2x3 mm boyutlarında kesilmiş kurutma kağıtları jelin kısa kenarı ve bu kenarın 1 cm yüksekliği belirlenerek 1'er cm arayla yerleştirildi.
- 5- Kurutma kağıtları üzerine örneklerin sağdan veya soldan karşılaştırma yapılabileceği şekilde -iki örnek, 1 vWA allelik ladder, iki örnek ve 1 vWA allelik ladder- 6 µL'lik hacimlerde tek tek applike edildi.
- 6- Aplikasyonu takiben elektroforez tankı hafif nemlendirilerek jel tanka horizontal olarak yerleştirildi.
- 7- Jelin katod ve anod kısmına gelecek şekilde daha önceden hazırlanmış %2'lik agar plakları yerleştirildi.
- 8- Üzerinden akım geçecek şekilde ve elektroforez katodtan anoda olacak şekilde elektrotlar agar plakları üzerine yerleştirildi ve tankın kapağı kapatıldı.
- 9- Güç kaynağı 1000 V, 20 mA ve 5 W'a ayarlandı ve elektroforez başlatıldı. 90 dakika sonunda güç kaynağı 1000 V, 20 mA ve 10 W'a ayarlandı ve 90 dakika elektroforez yapıldı.
- 10-İkinci 90 dakika sonunda güç kaynağı 1000 V, 20 mA ve 15 W'a ayarlandı ve bromfenol mavisini anoda birkaç mm yakınlığa ulaşıncaya kadar elektroforeze devam edildi^{93,94}.
- 11-Elektroforez tamamlandıktan sonra jel 3.4.7'de aktarılan gümüş boyama yöntemi ile boyandı.

3.5 İstatistiksel Hesaplamalar

Genetik profilendirme sonuçlarının adli amaçlı kimliklendirme değerlendirmelerinde kullanılabilmesi için gözlenen ve beklenen fenotip frekanslarının uyumu ile lokusun adli etkinlik değerlerinin belirlenmesinde aşağıda aktarılan istatistiksel hesaplamalar kullanılmıştır.

- 1- Allel frekansı².

$$p = \frac{2X+Y}{2n}$$

X: Polimorfik sistemde p allelinin tanımlandığı homozigot fenotip sayısı.

Y: Polimorfik sistemde p allelinin tanımlandığı heterozigot fenotip sayısı.

n: Örnek popülasyondaki toplam kişi sayısı.

2- Beklenen fenotip frekansı⁹⁶.

homozigot alleller için; p^2

heterozigot alleller için; $2pq$

p,q: Polimorfik sistemde tanımlanan allel frekansları.

3- Heterozigotluk yüzdesi⁹⁷.

$$H = \frac{\sum h}{n}$$

$\sum h$: Örnek popülasyonda tanımlanan toplam heterozigot kişi sayısı.

n: Örnek popülasyondaki toplam kişi sayısı.

4- Kimliklendirme potansiyeli⁹⁸.

$$P_i = \sum x_i^2$$

x_i : Polimorfik sistemde tanımlanan i kadar fenotipin frekansı.

5- Ayırt etme gücü⁹⁹.

$$PD = 1 - \sum x_i^2$$

6- Hardy-Weinberg Dengesi².

$$\chi^2 = \sum \frac{(G - B)^2}{B}$$

G: Polimorfik sistemde gözlenen fenotip sayısı.

B: Polimorfik sistemde beklenen fenotip sayısı.

7- Standart Sapma¹⁰⁰.

$$SD = \sqrt{\frac{p(1-p)}{2n}}$$

n: Örnek popülasyondaki toplam kişi sayısı.

p: Allel frekansı.

8- Ortalama dışlama şansı⁹⁴.

$$MEC = \sum_i p_i^3 (1-p_i)^2 + \sum_i p_i (1-p_i)^3 + \sum_{i < j} p_i p_j (p_i + p_j) (1-p_i - p_j)^2$$

p_i, p_j : Örnek popülasyonda i'den j'ye kadar tanımlanan allel frekansları

9- Hardy-Weinberg Equilibrium bilgisayar analiz programı¹⁰¹.

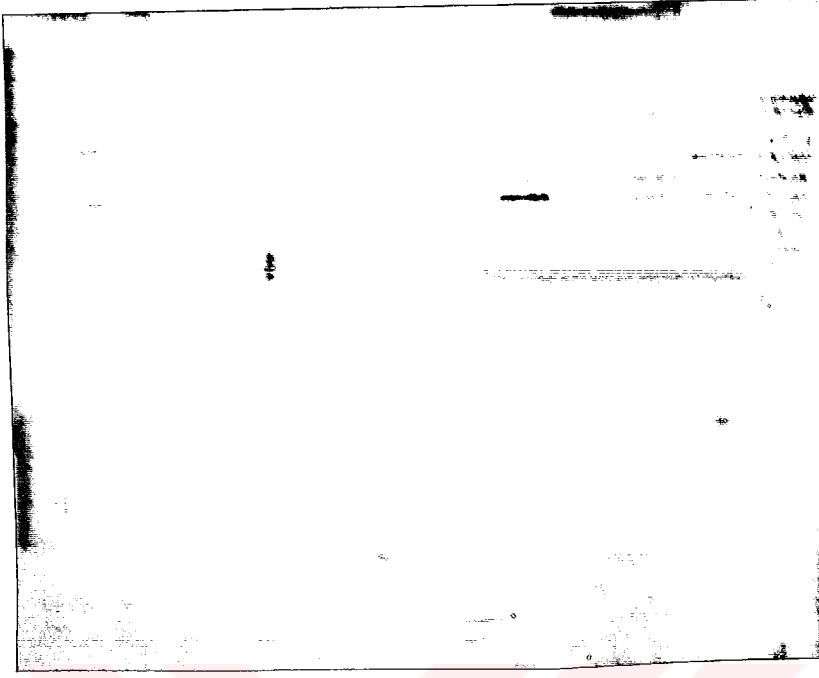
4. BULGULAR

4.1 ukurova Yöresinde Saptanan HumvWA Fenotipleri

Bu çalışmada Çukurova yöresinde yaşayan ve rastgele seçilen 110 kişiden alınan kan örneklerinden deneysel olarak oluşturulan kan lekelerinde, PCR ve hd-PAGE ile 23 farklı HumvWA fenotipi saptandı. 110 kişide saptanan 23 farklı HumvWA fenotipi ve fenotip frekansları, izelge 4.1'de; hd-PAGE sonrası gümüş boya ile tanımlanan HumvWA allellerinin poliakrilamid jelde elde edilen görüntüsü Şekil 4.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 Çukurova yöresinde yaşayan 110 kişide saptanan HumvWA fenotipleri ve fenotip frekansları.

Fenotipler	Sayı	Frekans
13-16	1	0.009
13-17	1	0.009
14-14	1	0.009
14-15	1	0.009
14-16	3	0.027
14-17	8	0.073
14-18	3	0.027
14-19	1	0.009
15-16	6	0.055
15-17	5	0.045
15-18	2	0.018
15-19	1	0.009
16-16	8	0.073
16-17	14	0.127
16-18	6	0.055
16-19	4	0.036
16-20	1	0.009
17-17	15	0.136
17-18	13	0.118
17-19	6	0.055
17-20	1	0.009
18-18	7	0.064
18-19	2	0.018



Şekil 4.1 hd-PAGE sonrası gümüş boya ile boyanan HumvWA allelleri ile allelik ladderların görüntüsü (1, 4, 7, 10, 13. sıra: allelik ladder; 2.sıra: 15-18; 3 ve 11.sıra: 17-18; 5 ve 6.sıra: 14-16; 8 ve 12. sıra: 16-18; 9.sıra: 18-18).

4.2 Çukurova Yöresinde Saptanan HumvWA Allelleri ve Allel Frekansları

Bu çalışmada toplam 8 allel gözlenmiştir. Çalışma yapılan Çukurova yöresinde allel frekansları en yüksek olan 3 allel 16, 17 ve 18'dir. Saptanan alleller ve allel frekansları Çizelge 4.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.2 110 kişide saptanan HumvWA allelleri ve allel frekansları.

Allel Adı	Allel Frekansları
13	0.009
14	0.082
15	0.068
16	0.232
17	0.355
18	0.182
19	0.064
20	0.009

4.3 Hardy-Weinberg Dengesi

Çalışma sonuçlarının Hardy-Weinberg Dengesine uyumu χ^2 testi ile test edildi. Gözlenen toplam 8 allelin 110 kişide beklenen fenotip frekans dağılımı ve beklenen fenotip sayıları ile χ^2 değerlerini hesaplamak için alleller 5 gruba ayrıldı^{11,94}. Bu gruplar ve allel frekansları Çizelge 4.3'te; beklenen fenotip sayıları ve frekansları ile χ^2 değerleri Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3 HumvWA allel grupları ve allel frekans dağılımı.

Grup numarası	Alleller	Allel frekansları
Grup 1(A)	13,14,15	0.159
Grup 2 (B)	16	0.232
Grup 3 ©	17	0.355
Grup 4 (D)	18	0.182
Grup 5 (E)	19,20	0.073

Çizelge 4.4 HumvWA allel frekans dağılımının Hardy-Weinberg Dengesine uyumu.

Fenotipler	Gözlenen sayı	Beklenen frekans	Beklenen sayı	χ^2
A,A	2	0.025	2.75	0.2045
A,B	10	0.074	8.14	0.4250
A,C	14	0.113	12.43	0.1983
A,D	5	0.058	6.38	0.2985
A,E	2	0.023	2.53	0.1110
B,B	8	0.054	5.94	0.7144
B,C	14	0.165	18.15	0.9489
B,D	6	0.084	9.24	1.136
B,E	5	0.034	3.74	0.4245
C,C	15	0.126	13.86	0.0938
C,D	13	0.129	14.19	0.0998
C,E	7	0.052	5.72	0.2864
D,D	7	0.033	3.63	3.1286
D,E	2	0.027	2.97	0.3168
E,E	0	0.005	0.55	0.55
			χ^2 Toplam= d.f. =	8.9365 14

Gözlenen ve beklenen fenotiplerle χ^2 testine göre bu çalışma sonuçlarının Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olduğu saptandı ($\chi^2= 8.9365$, $df= 14$, $p>0.05$).

4.4 HumvWA Lokusunun Çukurova Yöresi İçin Saptanan Adli

Etkinlik Değerleri

İstatistiksel analizlerle, 110 kişilik populasyon örneğinde Çukurova yöresi için saptanan adli etkinlik değerleri Çizelge 4.5'te sunulmuştur.

Çizelge 4.5 HumvWA lokusu allellerinin Çukurova yöresi için saptanan adli etkinlik değerleri (Obs-H, Exp-H, MEC ve PD).

	HumvWA
Obs-H	0.7182
Exp-H	0.77555 ±0.0294
MEC	0.56822
PD	0.92149

Bu çalışmada saptanan sonuçların kontrolü ve confirmasyonu amacıyla tüm örnekler Almanya-Münster Westfälische Wilhelms Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsüne gönderilerek, Enstitü direktörü Prof.Dr.B. Brinkmann'ın yardımları ile laboratuvar teknik aşamaları tekrar ettirilmiş ve bulgular karşılaştırıldığında aynı sonuçlara ulaşıldığı saptanmıştır. Gereç ve yöntemde aktarılan istatistiksel yöntemler kullanılarak hesaplanan adli etkinlik değerleri, Almanya'daki aynı Enstitünün katkılarıyla "Hardy-Weinberg Dengesi" bilgisayar analiz programı ile kontrol edilmiştir.

5.TARTIŞMA

Olay yeri incelemelerinde, kanıt olarak toplanan örnekler genellikle biyolojik materyaller için uygun olmayan ortamlarda bulunmakta ve biyolojik bütünlüğü bozulan ve çok az miktarda bulunan bu örneklerin antijenik ve enzimatik aktiviteleri yanında, DNA bütünlüğü de bozulduğundan, geleneksel DNA analizi yöntemleri ile tanımlamalar yetersiz kalmaktadır.

Teknolojik gelişmeye paralel olarak, çok az miktarda ve parçalanmış örneklerde STR lokusu allellerinin PCR'a dayalı profillendirmesinin yapılabilmesi olay yerinden toplanan kanıtların değerlendirilmesinde önemli gelişmeler sağlamıştır.

Günümüzde gelişmiş ülkelerin Adli Seroloji ve Hemogenetik Laboratuvarlarında, geleneksel DNA analizi yöntemlerinin yerini PCR'a dayalı STR lokuslarının tanımlanması almıştır. Geleneksel tanımlama yöntemlerine alternatif olacağı belirtilen ileri DNA analizi yöntemlerinin ülkemizde de kimliklendirme ve paternite tayininde kullanılabilmesi ve hukuk sistemimize objektif kanıtlar sunulabilmesi için yapılan bu çalışmada, Çukurova yöresinde yaşayan bireylerden alınan örneklerde, HumvWA lokusunun PCR'a dayalı DNA profillendirmesi yapılmıştır.

110 kişi ile yaptığımız bu çalışmada 8 HumvWA alleli tanımlanmış ve lokusunun Çukurova yöresi için ayırım gücü %92, gözlenen heterozigotluk %72 bulunmuştur. Bu sonuçlarla paternite ve kimliklendirme için bildirilen en az %90 ayırt etme gücü ve en az %70 heterozigotluk oranının üzerine çıkıldığı görülmüştür.

Adli amaçlı kullanılan lokusların istatistiksel değeri yanında, kullanılan yöntemlerin zaman ve kullanılan malzemede ekonomi sağlaması önemli kriterler olarak kabul edilmektedir. Zaman, adli soruların bir an önce aydınlanması; ekonomi, en iyi yöntem seçilirken ülke koşullarında uygulanabilme şansının olması şeklinde değerlendirilmektedir.

Minisatellit DNA'lar ile STR lokuslarının tanımlanma süresi karşılaştırıldığında, minisatellit DNA'ların özellikle izotopik incelemelerde 6-8 haftaya kadar uzayabilen bir sürede tanımlanabildiği belirtilmektedir. STR

lokusları için harcanan süre bütün solüsyon ve materyalin önceden hazır bulunması koşuluyla 1 günü geçmemektedir. Bu sürede geliştirilen modifiye yöntemlerle 4 STR lokusunun aynı anda tanımlanması mümkün olabilmektedir. Böylece hem zaman, hem de kullanılan malzemede ekonomi sağlanmaktadır¹.

Günümüzde birçok gelişmiş ülkede adli amaçlı kimliklendirme ve paternite tayininde tetramerik STR lokuslarının kullanımı başlamıştır. Ancak DNA'nın ekstraksiyon basamağından görüntülenme basamağına kadar kullanılan yöntemlerde farklılıklar bulunmaktadır.

Ekstraksiyon fenol-kloroform, tuzla uzaklaştırma veya chelex ile yapılabilmektedir¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Chelex ile ekstraksiyonun STR lokuslarının tanımlanmasında kolay, hızlı ve kontaminasyon riski düşük bir yol olduğu rapor edilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada chelex ekstraksiyon yöntemi tercih edilmiştir. Ekstraksiyonda DNA verimini artırmak ve elektroforez sonrası artık ürün oluşumunu azaltmak için chelex/ proteinaz-K veya chelex/diatom kombinasyonu kullanılabilir. Bu çalışmada chelex/proteinaz-K kombinasyonu kullanılmış ve amplifikasyon için yeterli miktarda DNA elde edilebilmiştir^{80,81,105,106}.

Chelex ile ekstraksiyonda sıvı fazın uzaklaştırılması esnasında, taze kan örneklerinde gözle görülebilen lökositlerin sıvı fazdan ayrılması kolaylıkla yapılabilmektedir. Ancak lekede ekstraksiyon yaparken bazen DNA'nın da bulunduğu fazın alınarak ortamdan uzaklaştırılması mümkün olabilmektedir. Bunun için santrifüj sonrası sıvı fazı uzaklaştırırken tüplerin sallanmaması ve pipet ucunun sıvıya dikkatli bir şekilde daldırılması gerekmektedir. Benzer şekilde, ekstrakte edilmiş örnekten amplifikasyon için ekstrakte DNA örneği alırken santrifüj sonrası tüplerin sallanmaması ve pipetlemenin dikkatli yapılması gerektiği bizim çalışmamızda da gözlenmiştir^{77,78}.

Kullanılan tampon sistemleri ve PCR döngü parametrelerinde farklılıklar bulunmaktadır. PCR döngü parametreleri kullanılan primerlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Çalışmamızda promega primerleri kullanılarak kitte önerilen parametreler uygulanmış ve etkili amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Bu parametrede önerilen 96°C'de 2 dakikalık başlangıç ısısı primer-dimer

oluşumunu engellemek ve amplifikasyonun etkinliğini artırmak için uygulanmıştır.

Amplifikasyonda pozitif kontrol için yüksek moleküler ağırlıklı DNA (K562), negatif kontrol için bidistile su kullanılmıştır. Amplifikasyonda mineral yağ kullanılmayıp üstten ısıtmalı thermocycler cihazı kullanıldığında, amplifikasyonun etkinliğinin azaldığı izlenmiştir.

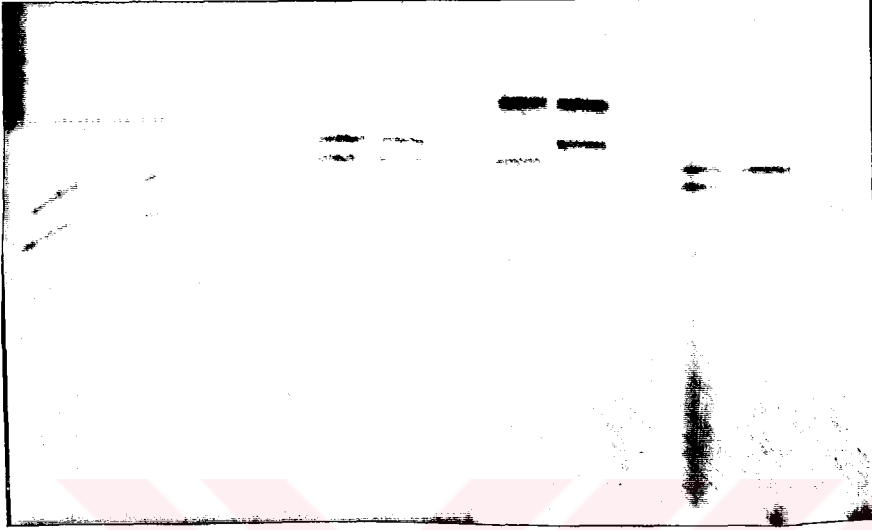
Ayrıca, elektroforetik ayırıştırma için kullanılan jel sistemlerinde yapılan küçük modifikasyonlardan bahsedilmektedir. Elektroforetik ayırıştırmada başta rezolüsyonu artırmak amaçlı olmak üzere kolay, hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için hd-PAGE, vertikal discontinuous veya continuous PAGE çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda bir baz çiftlik farklılıkla oluşan uzunluk polimorfizmlerinin ayrımının yapılabildiği belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda hd-PAGE kullanılmıştır¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Diğer bir farklılık çoğaltılan hedef DNA dizilerinin görüntülenme farklılığıdır. STR allelleri radyoaktif işaretli primer, flouresan işaretli primer kullanılarak veya gümüş boya ile görünür hale getirilebilmektedir. Bu yöntemlerden gümüş boyama yönteminin ucuz ve non-mutajenik olması, PCR ürünlerinin elektroforez sonrası otoradyografik incelemeye gerek kalmadan çıplak gözle incelenebilmesi avantajları bulunmaktadır. Ayrıca, otoradyografik çekim yerine direk fotoğraflama veya jellerin streç film ile sarılarak görüntüsü bozulmadan yıllarca saklanabilmesi mümkün olabilmektedir^{15,92,93,110,111}.

HumvWA allellerinin saptanmasında çoğu kaynakta belirtildiği gibi artık ürün oranı yüksek bulunmuştur. Ancak bu artık ürünler allellerin yürüme noktasının çok altında bulunduğundan değerlendirmede problem yaratmamıştır. Möller et al⁹⁵ HumvWA lokusunda gözlenen kuyruk bantların denatüre jeller kullanılarak elimine edilebildiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, ISFH üyeleri STR lokusu allellerinin tanımlanmasında hem native hem de denatüre poliakrilamid jellerin kullanılabileceğini bildirmektedir⁶⁰.

Çalışmamızda jelin başlangıç noktası ve sonuna aplike edilen örneklerin yürüme noktaları arasında farklılıklar izlenmiştir (Şekil 5.1). Aplikasyon noktası, jelin homojenitesi ve elektroforez koşullarına bağlı olarak oluşan bu farklılık, allelik ladder'ların aplikasyon noktalarının jelde yürütülen her örneğin sağında

veya solunda olacak şekilde düzenlemesi ile çözümlenmektedir¹¹²⁻¹¹⁴. Şekil 5.2'de allelik ladder ve örneklerin aplikasyon sırası ve elektroforez sonrası görüntüsü şematik olarak sunulmuştur.



Şekil 5.1 Örneklerin yürüme noktaları arasındaki farklılıklar.

Allelik ladder	Örnek 1	Örnek 2	Allelik ladder
13			13
14			14
15			15
16			16
17			17
18			18
19			19
20			20

Anod (+)
Katod (-)

Şekil 5.2 STR lokusu allelik ladderları ile örneklerin jelde aplikasyon sıraları ve büyüklüklerine bağlı olarak katottan anoda sıralanışı.

Çizelge 5.1'de çeşitli populasyonlarda rapor edilen HumvWA allel sıklıkları ile HumvWA lokusunun ayırt etme gücü ve gözlenen heterozigotluk oranı görülmektedir. Populasyon çalışması yapılan kaynaklar incelendiğinde, tanımlanan alleller içinde en sık rastlanılan allelin 17, en sık rastlanılan allel çiftinin 16,17 olduğu izlenmektedir. Ancak populasyonlar arasındaki allel frekans dağılım oranları arasında farklılıklar bulunmaktadır^{49,66,80,115-122}.

Çeşitli populasyonlar arasındaki allel frekans dağılım oranları incelendiğinde, allel frekans dağılım oranlarının kıtalar içinde benzerlikler, kıtalar arasında önemli farklılıklar gösterdiği izlenmiştir^{57,94,115-122}.

Filogenetik incelemelerde populasyonlar arasındaki genetik uzaklığı belirleyen genetik farklılıkların STR lokuslarına bağlı olarak değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Genellikle 5-15 tekrar sayısı bulunan basit tekrar diziyeye sahip lokusların populasyonlar arasında düşük mikrovaryasyonlar gösterdiği, HumvWA lokusu gibi bileşik tekrar dizilerden oluşan lokusların populasyonlar arasında orta derecede mikrovaryasyonlar gösterdiği belirtilmektedir¹²³. HumvWA lokusu için orta derecede mikrovaryasyon olarak tanımlanan bu farklılık Çizelge 5.1'de açık bir şekilde izlenmektedir.

Bizim çalışmamızda saptanan allel frekans dağılım oranları diğer çalışma sonuçları ile karşılaştırıldığında, minor farklılıklarla birlikte Avrupa populasyonundaki Caucasian'larda saptanan allel frekans dağılım oranları ile benzerlik göstermektedir.

Populasyonlar arasında gözlenen heterozigotluk oranı 0.73-0.86, ortalama dışlama şansı 0.59-0.78 ve ayırt etme gücü 0.92-0.94 arasında değişiklik göstermektedir^{49,66,80,115-122}.

Yaptığımız çalışma ile karşılaştırıldığında, gözlenen heterozigotluk değerinin diğer çalışma sonuçlarına oranla daha düşük olduğu saptandı.

HumvWA STR lokusu ile ilgili Türkiye populasyon örneklerinden gerçekleştirilmiş birkaç çalışma bulunmaktadır. Alper et al⁸⁰'un Çukurova populasyonunda yaptıkları çalışma ile aynı populasyon için bizim yaptığımız çalışma sonuçları arasında minimal farklılıklar saptanmıştır. Bu farklılıkların çalışma grubu sayısı ve/veya örnekleme etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. ISFH üyeleri 100 kişilik çalışma gruplarında populasyon çalışması yapılabileceğini, ancak istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar için en az 200 kişilik bir populasyon çalışmasının yapılması gerektiğini belirtmektedirler. Çalışmamızın 200 kişilik bir populasyon ile yapılması planlanmış, ancak eldeki kimyasal madde yetersizliği nedeniyle 110 kişiyle sonuçlanmıştır^{42,80,124,125}.

Çizelge 5. 1 Çeşitli popülasyonlar için rapor edilen HumvWA lokusu allel frekans dağılımı ile adli etkinlik değerleri (Obs-H, MEC, PD)^{49,66,80,115-122}

Allel adı	Çukurova n=110	Türkiye n=203	İtalya n=118	Fransa n=484	İspanya n=120	Macaristan n=105	Polonya n=185	Japonya n=493	Çin n=196	Filipinler n=103	Tayland n=127	Kanada n=428	Mısır n=200	Yemen n=200
13	0.009			0.002			0.005	0.003	0.005			0.011		
14	0.082	0.079	0.097	0.103	0.163	0.119	0.065	0.186	0.240	0.180	0.262	0.106	0.085	0.055
15	0.068	0.096	0.123	0.097	0.129	0.081	0.097	0.032	0.051	0.092	0.004	0.100	0.095	0.075
16	0.232	0.237	0.225	0.231	0.208	0.152	0.195	0.194	0.179	0.146	0.194	0.207	0.270	0.205
17	0.355	0.315	0.267	0.267	0.242	0.296	0.286	0.284	0.301	0.286	0.202	0.254	0.240	0.345
18	0.182	0.185	0.182	0.182	0.163	0.171	0.232	0.213	0.138	0.214	0.194	0.214	0.185	0.185
19	0.064	0.071	0.089	0.101	0.096	0.129	0.095	0.071	0.076	0.068	0.087	0.095	0.095	0.105
20	0.009	0.017	0.017	0.015		0.033	0.024	0.017	0.010	0.015	0.012	0.013	0.025	0.020
21				0.002		0.019					0.004	0.001	0.005	0.010
Obs-H	0.72	0.75	0.80	0.81	0.73	0.87	0.79	0.79	0.79	0.80	0.81	0.82	0.84	0.72
MEC	0.56	0.59	0.63	-	-	0.65	0.78	0.60	0.59	0.61	-	0.64	0.63	0.59
PD	0.92	0.93	0.93	0.94	0.94	0.94	0.93	0.93	0.92	0.93	0.93	0.94	0.94	0.92

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1- Çukurova yöresinde yaşayan ve rastgele seçilen sağlıklı 110 kişiden alınan kan örneğinde; 8 HumvWA alleli ve bu allellerin kombinasyonu ile 23 farklı fenotip gözlemlendi. HumvWA allellerinin allel frekansları,

13	0.009
14	0.082
15	0.068
16	0.232
17	0.355
18	0.182
19	0.064
20	0.009

bulundu.

- 2- Bu çalışmada 110 kişide gözlenen fenotip dağılımının Hardy-Weinberg Dengesine uyumu χ^2 testi ile test edildi. Gözlenen ve beklenen fenotiplerle χ^2 testine göre bu çalışma sonuçlarının Hardy-Weinberg Dengesi ile uyumlu olduğu saptandı.

($\chi^2= 8.9365$, $df= 14$, $p > 0.05$).

- 3- HumvWA lokusunun Çukurova populasyonundaki adli etkinlik değerleri saptandı. Bu değerlerin STR lokuslarının adli amaçlı kullanımı için belirtilen adli etkinlik değerlerini yansıttığı saptandı.

Obs-H= 0.7182

PD = 0.92149

MEC = 0.56822

- 4- STR lokuslarının tanımlanmasında kullanılan PCR, hd-PAGE ve gümüş boyama yöntemlerinin hassas, güvenilir, aynı zamanda zaman ve kullanılan malzemede ekonomik kazanç sağladığı saptandı.
5. HumvWA allellerinin tanımlanmasında kullanılan chelex ile ekstraksiyon, PCR, hd-PAGE ve gümüş boyama yöntemlerinin Ç.Ü.Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nda uygulamaya geçmesi bu konularda bilgi, beceri ve deneyim kazancı yanında, laboratuvarın kimyasal malzeme ve araç gereç sayısının artmasına katkı sağlamıştır.

- 6- Kimyasal malzeme ve araç-gereç katkısı; kazanılan bilgi, beceri ve deneyimle birleştirilerek adli amaçlı kullanılan diğer STR lokuslarının Ç.Ü.Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nda rutin uygulamaya alınmasını kolaylaştıracaktır.
7. Anabilim Dalı'mızda çalışılan lokus sayısının artırılması ve rutin hizmete geçilebilmesi ile Hukuk Sistemimize istatistiksel olarak anlamlı ve objektif kanıtlar sunulabilecektir.

Ülkemizde paternite ve kimliklendirme amaçlı hizmet veren birimler, Üniversitelerin Adli Tıp Anabilim Dalları ile Adalet Bakanlığına bağlı Adli Tıp Kurumlarıdır. Ancak, bu birimlerde teknik alt yapı ve uzman eleman eksikliği nedeniyle rutin hizmette sıkıntılar yaşanmaktadır.

Biyolojik kanıtların toplanmasında yaşanan aksaklıklardan başlayan ve ilgili laboratuvarlarda değerlendirmesi eksik kalan kanıtların gelişmiş ülke standartlarına uygun bir şekilde değerlendirilebilmesi için; teknik alt yapının teknolojik yeniliklere uygun olarak oluşturulması ve standardize edilerek hayata geçirilmesi, aynı zamanda uzman eleman açığının bir an önce giderilmesi gerektiği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- 1- **Duncan GT, Tracey ML.** Serology and DNA typing. In: Eckert WG. Eds. *Introduction to Forensic Sciences*. 2 th Ed, USA:CRS press, **1997**: 233-293.
- 2- **Sensabaugh GF.** Biochemical markers of individualization. In: Saferstein R. Eds. *Forensic Science Handbook*. New Jersey: A Simon and Schuster Company, **1982**: 338-403.
- 3- **Krause D, Szibor R, Kuchheuser W, Brückner R.** The practical significance of human genetic RLFP-systems in paternity testing. In: Berghaus G, Brinkmann B, Rittner C, Staak M. Eds. *DNA-Technology and Its Forensic Application*. Germany: Springer-Verlag, **1991**: 153-156.
- 4- **Fowler C.** Polymorphism in the major human repetitive DNA sequences: theory, practice and comparison with other methods of measuring human genome variation. In: Robertson J, Ross AM, Burgoyne LA. Eds. *DNA in Forensic Science (Theory, Techniques and Applications)*, 1th Ed, England: Ellis Horwood Ltd, **1990**: 87-111.
- 5- **Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL.** Hipervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, **1985**; 314: 67-73.
- 6- **Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL.** Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, **1985**; 316: 76-79.
- 7- **Jeffreys AJ, Brookfield JFY, Semeonoff R.** Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*, **1985**; 317: 818-819.
- 8- **Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ.** Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*, **1985**; 318: 577-579.
- 9- **Morling N, Hansen HE.** Paternity testing with VNTR DNA systems. *Int J Leg Med*, **1993**; 105: 189-196.
- 10- **Fowler JCS, Burgoyne LA, Scott AC, Harding HWJ.** Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) and human genome variation- a concise review relevant to forensic biology. *J Forensic Sci (JFSCA)*, **1988**; 33(5): 1111-1126.
- 11- **Rand S, Puers C, Skowasch K, Wiegand P, Budowle B, Brinkmann B.** Population genetics and forensic efficiency data of 4 AMPFLP's. *Int J Leg Med*, **1992**; 104: 329-333.
- 12- **Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P.** Variation in short tandem repeat sequences- a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Leg Med*, **1994**; 107: 13-20.
- 13- **Sparkes R, Kimpton C, Watson S, Oldroyd N, Clayton T, Barnett L, Arnold J, Thompson C, Hale R, Chapman J, Urquhart A, Gill P.** The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework: (I) mixtures, ageing, degradation and species studies. *Int J Leg Med*, **1996**; 109:186-194.
- 14- **Sparkes R, Kimpton C, Gilbard S, Carne P, Andersen J, Oldroyd N, Thomas D, Urquhart A, Gill P.** The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework: (II) artefacts, casework studies and succes rates. *Int J Leg Med*, **1996**; 109: 195-204.

- 15- **Fregéau CJ, Fournery RM.** DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification. *BioTechniques*, **1993**; 15(1): 100-119.
- 16- **Sajantila A, Ström M, Budowle B, Karhunen PJ, Peltonen L.** The polymerase chain reaction and postmortem forensic identity testing: application of amplified D1S80 and HLA-DQ alpha loci to the identification of fire victims. *Forensic Sci Int*, **1991**; 51: 23-34.
- 17- **Schmitt C, Benecke M.** Five cases of forensic short tandem repeat DNA typing. *Electrophoresis*, **1997**; 18: 690-694.
- 18- **Schmitt C, Schmutzler A, Prinz M, Staak M.** High sensitive DNA typing approaches for the analysis of forensic evidence: comparison of nested variable number of tandem repeats (VNTR) amplification and a short tandem repeats (STR) polymorphism. *Forensic Sci Int*, **1994**; 66:129-141.
- 19- **Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT.** DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet*, **1991**; 49:746-756.
- 20- **Kimpton CP, Walton A, Gill P.** A further tetranucleotide polymorphism in the vWF gene. *Hum Mol Genet*, **1992**; 1: 28.
- 21- **Polymeropolous MH, Rath DS, Xiao H, Merrill CR.** Tetranucleotide repeat polymorphism at the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2). *Nucleic Acids Res*, **1992**; 20:1432.
- 22- **Nishimura DY, Murray JC.** A tetranucleotide repeat for the F13B locus. *Nucleic Acids Res*, **1992**; 20: 1167.
- 23- **Polymeropolous MH, Rath DS, Xiao H, Merrill CR.** Tetranucleotide repeat polymorphism at the human c-fes/fps proto-oncogene (FES). *Nucleic Acids Res*, **1991**; 19: 4018.
- 24- **Polymeropolous MH, Rath DS, Xiao H, Merrill CR.** Tetranucleotide repeat polymorphism at the human coagulation factor XIIIa subunit gene (F13A1). *Nucleic Acids Res*, **1991**; 19: 4036.
- 25- **Polymeropolous MH, Rath DS, Xiao H, Merrill CR.** Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene (TH). *Nucleic Acids Res*, **1991**; 19: 3753.
- 26- **Urquhart A, Kimpton CP, Gill P.** Sequence variability of the tetranucleotide repeat of the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2) locus. *Hum Genet*, **1993**; 92: 637-638.
- 27- **Gill P, Kimpton C, D'Aloja E, Andersen JF, Bär W, Brinkmann B, Holgersson S, Johnsson V, Kloosterman AD, Lareu MV, Nellesmann L, Pfitzinger H, Phillips CP, Schmitter H, Schneider PM, Stenersen M.** Report of the European DNA profiling group (EDNAP)- towards standardisation of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Sci Int*, **1994**; 65:51-59.
- 28- **Wiegand P, Ambach E, Augustin C, Bratzke H, Cremer U, Edelmann J, Eriksen B, Germann U, Haas H, Henke L, Holtz J, Keil W, Kreike J, Nagy M, Prinz M, Rand S, Rothämel T, Scheithauer R, Schneider HR, Schürenkamp M, Teifel-Greding J, Bär W.** GEDNAP IV and V. The 4th and 5th stain blind trials using DNA technology. *Int J Leg Med*, **1995**; 108:79-84.

- 29- **Gómez J, Rodríguez-Calvo MS, Albarrán C, Amorim A, Andradás J, Cabrero C, Calvet R, Corach D, Crespillo M, Doutremépuich C, García O, Greada H, Gené M, Jiménez S, Lorente JA, Marques-Santos SM, Martínez-Jarreta B, Martínez de Pancorbo M, Montes F, Ruiz de la Cuesta JM, Sanz P, Terra-Pinheiro MF, Vide MC, Carracedo A.** A review of the collaborative exercises on DNA typing of the Spanish and Portuguese ISFH working group. *Int J Leg Med*, **1997**; 110:273-277.
- 30- **Wyman AL, White PH.** A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Natl Acad Sci*, **1980**; 77: 6750-6754.
- 31- **Geursen A.** Hypervariant probes and DNA 'fingerprinting'. In: Robertson J, Ross AM, Burgoyne LA. Eds. *DNA in Forensic Science (Theory, Techniques and Applications)*. 1th Ed, England: Ellis Harwood Ltd, **1990**: 74-86.
- 32- **Gill P, Sullivan K, Werrett DJ.** The analysis of hypervariable DNA profiles: problems associated with the objective determination of the probability of a match. *Hum Genet*, **1990**; 85: 75-79.
- 33- **Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, White R.** Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*, **1987**; 235: 1616-1622.
- 34- **Budowle B, Baechtel FS, Giusti AM, Monson KL.** Applying highly polymorphic variable number of tandem repeats loci genetic markers to identity testing. *Clin Biochem*, **1990**; 23:287-293.
- 35- **Budowle B, Giusti AM, Waye JS, Baechtel FS, Fournay RM, Adams DE, Presley LA, Deadman HA, Monson KL.** Fixed-bin analysis for statistical evaluation of continuous distributions of allelic data from VNTR loci, for use in forensic comparisons. *Am J Hum Genet*, **1991**; 48: 841-855.
- 36- **Horn GT, Richards B, Klinger KW.** Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, **1989**; 17: 2140.
- 37- **Kasai K, Nakamura Y, White R.** Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science. *J Forensic Sci (JFSCA)*, **1990**; 35(5): 1196-1200.
- 38- **Boerwinkle E, Xiong W, Fourest E, Chang L.** Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc Natl Acad Sci*, **1989**; 86: 212-216.
- 39- **Priestley C, Kumar D, Sykes B.** Amplification of the COL2A1 3' variable region used for segregation analysis in a family with Sticker syndrome. *Hum Genet*, **1990**; 85: 525-526.
- 40- **Deka R, DeCroo S, Yu LM, Ferrell RE.** Variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism at locus D17S5 (YNZ22) in four ethnically defined human populations. *Hum Genet*, **1992**; 90: 86-90.
- 41- **Deka R, Chakraborty R, DeCroo S, Rothhammer F, Barton SA, Ferrell RE.** Characteristics of polymorphism at a VNTR locus 3' to the Apolipoprotein B gene in five human population. *Am J Hum Genet*, **1992**; 51: 1325-1333.
- 42- **1991 report concerning recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of DNA polymorphisms.** *Forensic Sci Int*, **1992**;52:125-130.

- 43- **Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R.** Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, **1992**; 12: 241-253.
- 44- **Balazs I.** Properties of hypervariable single locus polymorphisms and their application to identity testing. In: Robertson J, Ross AM, Burgoyne LA. Eds. *DNA in Forensic Science (Theory, Techniques and Applications)*. 1th Ed, England: Ellis Harwood Ltd, **1990**: 112-124.
- 45- **Sajantila A, Pacek P, Lukka M, Syvänen AC, Nokelainen P, Sistonen P, Peltonen L, Budowle B.** A microsatellite polymorphism in the von Willebrand Factor gene: comparison of allele frequencies in different population samples and evaluation for forensic medicine. *Forensic Sci Int*, **1994**; 68: 91-102.
- 46- **Gill P, Urquhart A, Millican E, Oldroyd N, Watson S, Sparkes R, Kimpton CP.** A new method of STR interpretation using inferential logic-development of a criminal intelligence database. *Int J Leg Med*, **1996**; 109: 14-22
- 47- **Grunbaum BW.** *Handbook for Forensic Individualization of Human Bloodstains*. Göttingen: Sartorius GmbH, **1981**: 160-176.
- 48- **Busque L, Desmarais D, Provost S, Schumm JW, Zhong Y, Chakraborty R.** Analysis of allele distribution for six short tandem repeat loci in the French Canadian population of Québec. *J Forensic Sci*, **1997**; 42(6): 1147-1153.
- 49- **Rousselet F, Pfitzinger H, Mangin P.** French Caucasian population data obtained from fluorescently detected HumvWFA31/A and HumF13A01 short tandem repeat loci. *Int J Leg Med*, **1996**; 109:5-9.
- 50- **García O, Martin P, Budowle B, Uriarte J, Albarrán C, Alonso A.** Basque Country autochthonous population data on 7 short tandem repeat loci. *Int J Leg Med*, **1998**; 111:162-164.
- 51- **Rousselet F, Pfitzinger H, Mangin P.** A pentaplex automated fluorescent typing system for forensic identification and French Caucasian population data. *J Forensic Sci*, **1997**; 42(3): 500-503.
- 52- **Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA.** DNA typing from single hairs. *Nature*, **1988**; 332:543-546.
- 53- **Jeffreys AJ, Poyle NJ, Patel I, Armour JAL, Mcleod A, Collick A, Gray IC, Neumann R, Gibbs B, Croiser M, Hill M, Signer E, Mankton D.** Principles and recent advances in DNA fingerprinting. In: Berghaus G, Brinkmann B, Rittner C, Staak M. Eds. *DNA Technology and Its Forensic Application*, Germany: Springer Verlag Berlin Heidelberg, **1991**: 3-20.
- 54- **GenePrint™ STR system (silver staining detection).** *Technical Manuel*. **1998**: 6-20.
- 55- **Hagelberg E, Gray IC, Jeffreys AJ.** Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature*, **1991**; 352:427-429.
- 56- **Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E, Sonnberg A.** Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *Forensic Sci Int*, **1992**; 56:65-76.
- 57- **Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K.** Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet*, **1994**; 6:130-135.

- 58- **Kimpton CP, Fisher D, Watson S, Adams M, Urquhart A, Lygo J, Gill P.** Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *Int J Leg Med*, **1994**; 106: 302-311.
- 59- DNA recommendations- 1992 report concerning recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use PCR-based polymorphisms. *Int J Leg Med*, **1992**; 105:63-64.
- 60- DNA recommendations- 1994 report concerning further recommendations of the DNA Commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) systems. *Int J Leg Med*, **1994**; 107:159-160.
- 61- **Lins AM, Micka KA, Sprecher CJ, Taylor JA, Bacher JW, Rabbach DR, Bever RA; Creacy SD, Schumm JW.** Development and population study of an eight-locus short tandem repeat (STR) multiplex system. *J Forensic Sci*, **1998**; 43(6): 1168-1180.
- 62- **Mansuco DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Alevy YG, Sadler JE.** Structure of the gene for human von Willebrand Factor. *J Biol Chem*, **1989**; 264(33): 19514-19527.
- 63- **Lygo JE, Johnson PE, Holdaway DJ, Woodroffe S, Whitaker JP, Clayton TM, Kimpton CP, Gill P.** The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *Int J Leg Med*, **1994**; 107:77-89.
- 64- Recommendations of the DNA commission of the international society for forensic haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphisms. *Forensic Sci Int*, **1992**; 55:1-3.
- 65- **Möller A, Meyer E, Brinkmann B.** Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11. *Int J Leg Med*, **1994**; 106:319-323.
- 66- **Horst B, Eigel A, Sanguansermsri T, Rolf B.** Analysis of the short tandem repeat systems HumVWA and HumF13B in a population sample from northern Thailand. *Int J Leg Med*, **1997**; 110:235-237.
- 67- **Karger B, Meyer E, DuChesne A.** STR analysis on perforating FMJ bullets and a new VWA variant allele. *Int J Leg Med*, **1997**; 110:101-103.
- 68- **Asmundo A, Crinò C.** Population study of the short tandem repeat polymorphisms HumTHO1, HumVWA31, HumFESFPS and HumF13A1 in Sicily (Southern Italy). *Int J Leg Med*, **1998**; 111: 281-283.
- 69- **Barber MD, Piercy RC, Andersen JF, Parkin BH.** Structural variation of novel alleles at the Hum vWA and Hum FES/FPS short tandem repeat loci. *Int J Leg Med*, **1995**; 108:31-35.
- 70- **Ambach E, Parson W, Neiderstätter H, Budowle B.** Avustrian Caucasian population data for the quadruplex plus amelogenin: refined mutation rate for HumVWFA31/A. *J Forensic Sci*, **1997**; 42(6): 1136-1139.
- 71- **Pfeiffer H, Hühne J, Seitz B, Brinkmann B.** Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. *Int J Leg Med*, **1999**; 112:142-144.
- 72- **Yamamoto T, Uchihi R, Kojima T, Nozawa H, Huang X-L, Tamaki K, Katsumata Y.** Maternal identification from skeletal remains of an infant kept by the alleged mother for 16 years with DNA typing. *J Forensic Sci*, **1998**; 43(3):701-705.

- 73- **Andersen J, Bramble S.** The effects of fingerprint enhancement light sources on subsequent PCR-STR DNA analysis of fresh bloodstains. *J Forensic Sci*, **1997**; 42(2): 303-306.
- 74- **Budowle B, Moretti TR, Keys KM, Koons BW, Smerick JB.** Validation studies of the CTT STR multiplex system. *J Forensic Sci*, **1997**; 42(2): 701-707.
- 75- **Brickmann B, Möller A, Wiegand P.** Structure of new mutations in 2 STR systems. *Int J Leg Med*, **1995**; 197(4): 201-203.
- 76- **Möller A, Brinkmann B.** PCR-VNTRs (PCR-Variable Number of Tandem Repeats) in forensic science. *Cell Mol Biol*, **1995**; 41(5):715-724.
- 77- **Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R.** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, **1991**; 10(4):506-513.
- 78- **Jung JM, Comey CT, Baer DB, Budowle B.** Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for amplification and typing of the HLA-DQ gene. *Int J Leg Med*, **1991**; 104:145-148.
- 79- **Singer-Sam J, Tanguay R, Riggs A.** Use of chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications*, **1989**; 3:11.
- 80- **Alper B, Wiegand P, Brinkmann B.** Frequency profiles of 3 STRs in a Turkish population. *Int J Leg Med*, **1995**; 108:110-112.
- 81- **Sweet D, Lorente JA, Valenzuela A, Lorente M, Villanueva E.** PCR-based DNA typing of saliva stains recovered from human skin. *J Forensic Sci*, **1997**; 42(3):447-451.
- 82- **Romero RL, Juston AC, Ballantyne J, Henry BE.** The applicability of formalin fixed paraffin embedded tissues in forensic DNA analysis. *J Forensic Sci*, **1997**; 42(4): 708-714.
- 83- **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich HA, Arnheim N.** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **1985**; 230: 1350-1354.
- 84- **Mullis K, Faloona F.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **1987**; 155: 335-350.
- 85- **Giorgetti R, Tagliabracci A, Agostini A, Cingolani M, Ferrara SD.** Suitability of PCR methods for forensic investigation. *Int J Leg Med*, **1991**; 104:243-246.
- 86- **Von Beroldingen CH, Blake ET, Higuchi R, Sensabaugh GF, Erlich H.** Applications of PCR to the analysis of biological evidence. In: Erlich HA. Eds. *PCR Technology*. New York: Stockton Press; **1989**: 209-223.
- 87- **Westwood SA, Werrett DJ.** An evaluation of the polymerase chain reaction method for forensic applications. *Forensic Sci Int*, **1990**; 45:201-215.
- 88- **Ross WD.** Polymerase Chain Reaction. *Arch Pathol Lab Med*, **1990**; 114: 627.
- 89- **Gelfand DH.** Taq DNA polymerase. In: Erlich HA. Eds. *PCR Technology*. New York: Stockton Press; **1989**: 3-11.
- 90- **Saiki RK, Gelfand DH, Shoffel S, Higuchi RH, Horn GT, Mullis KB.** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **1988**; 239:487-491.

- 91- **Salaçin S.** Adli amaçlı kimliklendirme ve paternite tayininde short tandem repeat (STR) sistemlerinin kullanımı. SBAG-1573, (Yayınlanmamış TÜBİTAK proje sonuç raporu), Nisan-1999.
- 92- **Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC.** Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high resolution PAGE. *Am J Hum Genet*, 1991; 48: 137-144.
- 93- **Allen RC, Graves G, Budowle B.** Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *BioTechniques*, 1989; 7:736-744.
- 94- **Wiegand P, Budowle B, Rand S, Brinkmann B.** Forensic validation of the STR systems SE 33 and TC 11. *Int J Leg Med*, 1993; 105:315-320.
- 95- **Möller A, Wiegand P, Grüşchow C, Seuchter SA, Baur MP, Brinkmann B.** Population data and forensic efficiency values for the STR systems HumVWA, HumMBP and HumFABP. *Int J Leg Med*, 1994; 106:183-189.
- 96- **Jankowski LB, Budowle B, Swec NT, Pino JA, Freck-Tootell S, Corey HW, Schwartz R, LaRue EJ, Rochin WL, Kearney CJ, Tarver ML.** New Jersey Caucasian, African American, and Hispanic population data on the PCR-based loci HLA-DQA1, LDRL, GYPA, HBGG, D7S8, and Gc. *J Forensic Sci*, 1998; 43(5):1037-1040.
- 97- **Cooper DN, Smith BA, Cooke HJ, Niemann S, Schmidtke J.** An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Hum Genet*, 1985; 69:201-205.
- 98- **Puers C, Lins AM, Sprecher CJ, Brinkmann B, Schumm JW.** Analysis of polymorphic short tandem repeat loci using well-characterized allelic ladders. *Proceedings From The 4th International Symposium on Human Identification*. Scottdale (AZ): Promega Corporation. 1994: 161-172.
- 99- **Garofano L, Lago G, Vecchio C, Pizzamiglio M, Zanon C, Virgili A, Albonici L, Manzari V, Budowle B.** Italian population data on the polymarker system and on the five short tandem repeat loci CSF1PO, TPOX, THO1, F13B, and vWA. *J Forensic Sci*, 1998; 43(4): 837-840,
- 100- **Iriondo M, Manzano C, de la Rúa C.** HLA-DQA1 in autochthonous Basques: description of a genocline for the Dqa1*0201 allele in Europa. *Int J Leg Med*, 1996; 109(4):181-185.
- 101- **Puers C.** *HWE analysis programme for Windows*, Version 3.2, Münster: University of Münster, 1995.
- 102- **Lorente M, Entrala C, Lorente JA, Alvarez JC, Villanueva E, Budowle B.** Dandruff as a potential source DNA in forensic casework. *J Forensic Sci*, 1998; 43(4): 901-902.
- 103- **Tagliabracci A, Buscemi L, Bianchi F, Sassaroli C, Ricci U, Neri TM, Rodriguez D.** Polymorphism and sequence variations of the HumCD4 pentameric microsatellite in an Italian Population sample. *J Forensic Sci*, 1998; 43(4): 841-844.
- 104- **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1998; 16(3): 1215.
- 105- **Günther S, Herold J, Patzelt D.** Extraction of high quality DNA from bloodstains using diatoms. *Int J Leg Med*, 1995; 108: 154-156.

- 106- **Alper B, Meyer E, Schürenkamp M, Brinkmann B.** HumFES/FPS and HumF13B: Turkish and German population data. *Int J Leg Med*, **1995**; 108: 93-95.
- 107- **Sajantila A, Lukka M.** Improved separation of PCR amplified VNTR alleles by a vertical polyacrylamide gel electrophoresis. *Int J Leg Med*, **1993**; 105: 355-359.
- 108- **Lorente M, Lorente JA, Wilson MR, Budowle B, Villanueva E.** Composite PAGE: an alternate method for increased separation of amplified short tandem repeat alleles. *Int J Leg Med*, **1993**; 106: 69-73.
- 109- **Schneider HR, Rand S.** High-resolution PAGE: an alternative electrophoretic system with multiple forensic applications. *Int J Leg Med*, **1996**; 108: 276-279.
- 110- **Sullivan KM, Pope S, Gill P, Robertson JM.** Automated DNA profiling by fluorescent labeling of PCR products. *PCR Methods Appl*, **1992**; 2:34-40.
- 111- **Hochmeister MN, Jung JM, Budowle B, Borer UV, Dirnhofer R.** Swiss population data on three tetrameric short tandem repeat loci-VWA, HumTHO1 and F13A1-derived using multiplex PCR and laser fluorescence detection. *Int J Leg Med*, **1994**; 107:34-36.
- 112- **Bär W, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayer W, Olaisen B.** DNA recommendations. Further report of the DNA commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J Leg Med*, **1997**; 110(4): 175-176,
- 113- **Puers C, Hammond HA, Caskey CT, Lins AM, Sprecher CJ, Brinkmann B, Schumm JW.** Allelic ladder characterization of the short tandem repeat polymorphism located on the 5' flanking region to the human coagulation factor XIII A subunit genes. *Genomics*, **1994**; 23: 260-264.
- 114- **Puers C, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Schumm JW.** Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HumTHO1 [AATG]_n and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder. *Am J Hum Genet*, **1993**; 53: 953-958.
- 115- **Piccinini A, Waterkamp K, Meyer E.** Short tandem repeat HumACTBP2 (SE33) and HumVWA: population genetic study on a North Italian population. *Int J Leg Med*, **1997**; 110:292-294.
- 116- **Lorente JA, Lorente M, Budowle B, Wilson MR, Villanueva E.** Analysis of short tandem repeat (STR) HUMVWA in the Spanish population. *Forensic Sci Int*, **1994**; 65: 169-175.
- 117- **Csete K, Schürenkamp M, Varga T.** The STR systems HumVWA and HumACTBP2 in a Hungarian population. *Int J Leg Med*, **1996**; 108:316-317.
- 118- **Pawlowski R, Maciejewska A, Paszkowska R.** Frequencies for five short tandem repeat (STR) systems in a population from North Poland. *Int J Leg Med*, **1997**; 110:10-13.
- 119- **Nagai A, Yamada S, Watanabe Y, Bunai Y, Ohya I.** Analysis of the STR loci HumF13A01, HumFXIIIB, HumLIPOL, HumTHO1, HumTPOX and HumVWFA31 in a Japanese population. *Int J Leg Med*, **1996**; 109:34-36.
- 120- **Xiao FX, Gilissen A, Gu XX, Cassiman JJ, Decorte R.** Genetic data obtained for two Chinese Han populations with a quadruplex fluorescent STR typing system (HumvWA, HumTHO1, D21S11 and HPRT). *Int J Leg Med*, **1998**; 111: 343-345.

- 121- Halos SC, Fortuno III ES, Ferreon ACM, Chu JY, Miranda J, Harada S, Benecke M. Allele frequency distributions of the polymorphic STR loci HumVWA, HumFES, HumF13A01 and the VNTR D1S80 in a Filipino population from Metro Manila. *Int J Leg Med*, 1998; 111: 224-226.
- 122- Klintschar M, Al-Hammadi N, Lux T, Reichenpfader B. Genetic variation at the short tandem repeat loci HumvWA, HumFXIII B, and HumFES/FPS in the Egyptian and Yemenian populations. *J Forensic Sci*, 1998; 43(4): 850-853.
- 123- Brinkmann B, Junge A, Meyer E, Wiegand P. Population genetic diversity in relation to microsatellite heterogeneity. *Hum Mutat*, 1998; 11(2): 135-144.
- 124- Iwasa M, Wiegand P, Rand S, Schürenkamp M, Atasoy S, Brinkmann B. Genetic variation at five STR loci in subpopulations living in Turkey. *Int J Leg Med*, 1997; 110:170-172.
- 125- Atasoy S, Kalsoğlu (Abacı) E, Brinkmann B, Wiegand P, Schürenkamp M. Babalık belirlimi ve kriminal identifikasyonda STR-Hum vWA DNA lokusu polimorfizminin değeri. 8. *Ulusal Adli Tıp Günleri*, Antalya, 16-20 Ekim 1995: 171-173.



ÖZGEÇMİŞ

Ayşe Altun, 1969 yılında İçel'in Anamur ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Anamur'da tamamladıktan sonra 1983-86 yılları arasında Ç.Ü.Tıp Fakültesi Sağlık Koleji'nde hemşirelik eğitimi, 1987-91 yılları arasında Ç.Ü.Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde biyoloji eğitimi aldı.

1991-92 eğitim yılında Ç.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü Adli Tıp Anabilim Dalı'nın açmış olduğu Adli Seroloji Yüksek Lisans eğitim programına katıldı. 1995 yılında "Adli Amaçlarla Lewis, Kell, Kidd, Duffy ve Lutheran Antijenlerinin Microtyping (Mikro Tiplendirme) Yöntemlerle Fenotiplendirilmesi" adlı tez projesi ile Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. Aynı dönem Ç.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü Adli Tıp Anabilim Dalı'nda Adli Tıp Doktora eğitim programına katıldı.

Halen Ç.Ü.Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nda biyolog olarak görev yapmaktadır.

Evlidir.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**