

**T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

DANIŞMAN: Yard. Doç. Dr. GÖNÜL FİLOĞLU

**X KROMOZOMUNA BAĞLI 8 STR LOKUSUNUN
POLİMORFİZMİ VE ADLİ BİLİMLERDEKİ ÖNEMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog ERHAN AÇAR

İSTANBUL 2009

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje no: 1741

İstanbul, 13 Kasım 2009

**İ.Ü.ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA**

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 15.maddesi uyarınca Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nın yüksek lisans öğrencisi Erhan AÇAR'ın

"X Kromozomuna Bağlı 8 STR Lokusunun Polimorfizmi ve Adli Bilimlerdeki Önemi"

Adli tezi jürimizce tetkik edilmiş ve kendisine tez savunması yaptırılmıştır.

Yukarıda adı geçen tezin ve tez savunmasının kabul edilmesine oy birliğiyle karar verilmiştir.


Prof. Dr. Salih CENGİZ
Jüri Başkanı


Doç. Dr. İlhan ONARAN
Üye


Doç. Dr. Mehmet GÜVEN
Üye


Yard. Doç. Dr. Gökhan ERSOY
Üye


Y. Doç. Dr. Gonül FILOĞLU
Danışmanı

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın ortaya çıkmasındaki katkılarından dolayı İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü müdürü Prof. Dr. İmdat Elmas'a ve Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Salih Cengiz'e, Emeğini ve vaktini benim için harcayan tez danışmanım değerli hocam Yard. Doç. Dr. Gönül Filoğlu'na,

Çalıőmalarım süresince desteğini esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Havva Altunul'a ve araştırma görevlisi arkadaşım Özlem Bülbül'e,

Laboratuvar çalıőmasındaki yardımlarından ötürü ablam laborant Gülten Rayimoğlu'na,

Bu tezin ortaya çıkmasında her zaman yanımda olan çok değerli arkadaşlarım Muhammed Saqib Shahzad, Doruk Arga, Selda Darı, Gülden Onur Kondakçı, Fulya Özsoy, Hüsnü Salim Cangil, Nazlı Demirtaş, Yasemin Tiritöğlü ve Gürman Güneő'e,

Maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme,

ve varlığıyla beni teşvik eden O'na

Çok teşekkür ederim.

KISALTMALAR

bç	Baz çifti
BSA	Sığır serum albumini (Bovine Serum Albumine)
CODIS	Combined DNA Index System
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
f	frekans
FAM	6-karboksifluorescein
FBI	Federal Soruşturma Bürosu (Federal Bureau of Investigation)
FSS	Adli Bilimler Servisi Forensic Science Service
ISFH	Uluslararası Adli Hemogenetik Derneği (International Society of Forensic Hemogenetics)
HET	Beklenen heterozigotluk (Expected Heterozygosity)
HLA	İnsan lökosit antijeni (Human Leukocyte Antigens)
HPRTB	İnsan fosforibozil transferaz (Human Phosphoribosyl Transferase)
LR	Olasılık, olabirlik oranı (Likelihood Ratio)
MEC	Ortalama dışlama gücü (Mean Exclusion Chance)
MP	Uyum olasılığı (Matching Probability)
NED	2,7,8'-benzo-5'-fluoro-2',4,7-trikloro-5- karboksifluorescein

NRV	Rekombinasyona uğramayan Y bölgesi (Nonrecombining Y)
PAR	Pseudo otozomal bölge (Pseudo Autosomal Region)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
PD	Ayırım Gücü (Power of Discrimination)
PI	Kimliklendirme Gücü (Power of Identity)
PI	Babalık İndeksi (Paternity Index)
PIC	Polimorfik bilgi içeriği (Polymorphism Information Content)
RFLP	Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
rfu	relative fluorescent units
rpm	revolutions per minute
SGM	İkinci nesil çoklu sistem (Second Generation Multiplex)
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotid Polymorphism)
STR	Kısa ardışık tekrar (Short Tandem Repeat)
VNTR	Değişken sayıda ardışık tekrarlar (Variable Number of Tandem Repeats)

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. STR sistemleri

Tablo 2. Amelogenin lokusuna ait bilgiler

Tablo3. DXS8378 STR lokusuna ait bilgiler

Tablo 4. HPRTB STR lokusuna ait bilgiler

Tablo 5. DXS7423 STR lokusuna ait bilgiler

Tablo 6. DXS7132 STR lokusuna ait bilgiler

Tablo 7. DXS10134 STR lokusuna ait bilgiler

Tablo 8. DXS10074 STR lokusuna ait bilgiler

Tablo 9. DXS10101 STR lokusuna ait bilgiler

Tablo 10. DXS10135 STR lokusuna ait bilgiler

Tablo 11. Kimyasal malzemeler

Tablo 12. Cihazlar ve Gereçler

Tablo 13. PCR Programı

Tablo 14. Elektroforez koşulları, GeneScan D modül parametreleri

Tablo 15. DXS8378 lokusunun genel Türkiye toplumuna ait gen sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

Tablo 16. HPRTB lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

Tablo 17. HPRTB STR lokusunun çalışmamızda elde edilen alel sıklıkları ile diğer Türkiye (Aşıcıoğlu F.) populasyonu çalışmasının karşılaştırılması (Z değerleri).

Tablo 18. DXS7423 lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

Tablo 19. DXS7132 lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

Tablo 20. DXS10134 lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

Tablo 21. DXS10074 lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

Tablo 22. DXS10101 lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

Tablo 23. DXS10135 lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

Tablo 24. örnek aile 1 (babaanne, baba, anne, kız torun)

Tablo 25. örnek aile 2 (baba, anne, kız çocuk, X STR lokusları)

Tablo 26. örnek aile 2 (baba, anne, kız çocuk, somatik STR lokusları)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Bir STR Lokusu

Şekil 2. Kapiller elektroforez sistemi

Şekil 3. (a) GeneScan™ 500 (Applied Biosystems) (b) ILS600 (Promega)

Şekil 4. Mentype® Argus X–8 Alelik Ladder (alelik standart)

Şekil 5. THO1 lokusu

Şekil 6. Y kromozomu ve X kromozomu

Şekil 7. Babaanne ile kız torun arasındaki X kromozomu kalıtımının şematik gösterimi

Şekil 8. Tez konusu X-STR lokuslarının X Kromozomu üzerindeki yerleşimi ve p-telomerden uzaklığı

Şekil 9. Chelex® 100 izolasyon yöntemiyle elde edilen elektroforegram

Şekil 10. QIAamp®DNA Mini Kit ile elde edilen elektroforegram

Şekil 11. Chelex 100 için yapılan hassasiyet çalışmasına ait elektroforegram (0.25 ng/µl, 1 ng/µl ve 2 ng/µl).

Şekil 12. QIAamp®DNA Mini kit için yapılan hassasiyet çalışmasına ait elektroforegram (0.25 ng/µl, 0.5 ng/µl)

Şekil 13. Kitin önerdiği PCR miktarı (25 µl) ile elde edilen PCR ürününe ait elektroforegram.

Şekil 14. PCR miktarının % 50 azaltılması (12.55 µl) ile yapılan bir yürütmeye ait elektroforegram.

Şekil 15. PCR miktarının % 75 azaltılması (6.675 µl)ile yapılan bir yürütmeye ait elektroforegram.

Şekil 16. 1:1 oranında kadın-erkek karışımına ait elektroforegram

Şekil 17. 1:5 oranında kadın-erkek karışımına ait elektroforegram

Şekil 18. Kitin önerdiği miktara göre yürütülen alelik standarda ait elektroforegram

Şekil 19. 0.4 µl yükleme miktarına göre yürütülen alelik ladder

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. Genel Türkiye toplumu DXS8378 STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluamlarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

Grafik 2. HPRTB STR lokusunun çalışmamızla elde edilen alel sıklıkları ile diğer Türkiye (Aşıcıoğlu F.) populasyonu çalışmasının karşılaştırılması.

Grafik 3. Genel Türkiye toplumu HPRTB STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluamlarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

Grafik 4. Genel Türkiye toplumu DXS7423 STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluamlarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

Grafik 5. Genel Türkiye toplumu DXS7132 STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluamlarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

Grafik 6. Genel Türkiye toplumu DXS10134 STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluamlarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

Grafik 7. Genel Türkiye toplumu DXS10074 STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluamlarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

Grafik 8. Genel Türkiye toplumu DXS10101 STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluamlarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

Grafik 9. Genel Türkiye toplumu DXS10135 STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluamlarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ ve AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
1. Genetik İşaretler	3
2. Genetik Polimorfizm ve Kısa Ardışık Tekrarlar	4
3. STR'ların Adlandırılması	9
4. Cinsiyet Kromozomlarının Adli Bilimlerde Kullanımı	11
4.1. Y Kromozomu	11
4.1.1. Adli Bilimlerde Y Kromozomu	12
4.2. X Kromozomu	13
4.2.1. X Kromozomuna Bağlı Hastalıklar	15
4.2.1.1. Yapısal Düzensizlikler	15
4.2.1.2. Sayısal Düzensizlikler	15
4.2.1.2.1. Turner Sendromu	16
4.2.1.2.2. Klinefelter Sendromu	16
4.2.2. X Kromozomunun Adli Bilimlerdeki Tarihçesi	17
4.2.3. X Kromozomuna Bağlı Kısa Ardışık Tekrarlar	18
4.2.4. Tez Çalışmasında İncelenen X-STR Lokusları	20
4.2.4.1. Amelogenin	20
4.2.4.2. DXS8378 STR Lokusu	21
4.2.4.3. HPRTB (Human Fosforibozil Transferaz)	21
4.2.4.4. DXS7423 STR Lokusu	22
4.2.4.5. DXS7132 STR Lokusu	22
4.2.4.6. DXS10134 STR Lokusu	23
4.2.4.7. DXS10074 STR Lokusu	23
4.2.4.8. DXS10101 STR Lokusu	24
4.2.4.9. DXS10135 STR Lokusu	24
4.2.5. X-STR'ların İstatistiksel Hesaplamaları	24
III. GEREÇ ve YÖNTEMLER	28
1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	29

2. Kullanılan Gereçler ve Cihazlar	30
3. Kandan DNA İzolasyon Aşaması	31
3.1. Chelex® 100 DNA İzolasyon Yöntemi	31
3.2. QIAamp®DNA Mini Kit İle DNA İzolasyonu	31
4. DNA Miktar Tayin Aşaması	32
4.1. DNA İzolatlarının Florometre ile Miktarlarının Ölçülmesi	32
5. DNA Amplifikasyon Aşaması	32
6. Elektroforez Aşaması	33
6.1. ABI 310 Genetik Analizör'ün Elektroforeze Hazırlanması	33
6.2. PCR Ürünlerinin Elektroforez için Hazırlanması ve ABI 310 Genetik Analizör Cihazına Yüklenmesi	34
6.3. Elektroforegramların Değerlendirilmesi	34
7. Verilerin İstatistiksel Analizi	34
8. Mentype® Argus X-8 PCR Amplifikasyon Kiti'nin Optimizasyon Çalışmaları	34
8.1. DNA İzolasyon Yöntem Tayini	34
8.2. Optimum DNA Miktar Tayini	34
8.3. PCR Toplam Hacminin Azaltılması	35
8.4. Karışık Örneklerde Kitin Ayrım Gücünün Belirlenmesi	35
8.5. PCR Ürünün Elektroforez İçin Optimum Miktarının Belirlenmesi	35
IV. BULGULAR	36
1. Mentype® Argus X-8 PCR Amplifikasyon Kiti'nin Optimizasyon Çalışması	36
1.1. İzolasyon Yöntemlerine Göre Karşılaştırma	36
1.2. DNA Miktarlarına Göre Yapılan Hassasiyet Çalışması	37
1.3. PCR Toplam Hacimlerine Göre Karşılaştırma	38
1.4. Karışık Örneklerde X-STR Kitinin Ayrım Gücünün Belirlenmesi	40
1.5. Elektroforez Yükleme Miktarlarına Göre Karşılaştırma	41
2. DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135, HPRTB Lokuslarına Ait Genel Türkiye Toplumuna Ait Veriler	42
2.1. DXS8378 Lokusuna Ait Bulgular	42
2.2. HPRTB Lokusuna Ait Bulgular	44
2.3. DXS7423 Lokusuna Ait Bulgular	47

2.4. DXS7132 Lokusuna Ait Bulgular	49
2.5. DXS10134 Lokusuna Ait Bulgular	51
2.6. DXS10074 Lokusuna Ait Bulgular	53
2.7. DXS10101 Lokusuna Ait Bulgular	55
2.8. DXS10135 Lokusuna Ait Bulgular	57
3. Aile Çalışması	59
V. TARTIŞMA ve SONUÇ	60
ÖZET	66
SUMMARY	67
KAYNAKLAR	68
EK	75
ÖZGEÇMİŞ	76

I. GİRİŞ ve AMAÇ

Adli bilimlerde, kimliklendirme, babalık tayini ve diğer akrabalık ilişkilerin belirlenmesi çok önemlidir. Bunu yapabilmek için insanlar arasında farklılık gösteren özellikler araştırılır. Bunun için ilk olarak Karl Landsteiner tarafından bulunan kan grupları kullanılmıştır. Daha sonra gelişen teknolojiye bağlı olarak eritrosit enzimleri, serum proteinleri, hemoglobin ve lökosit antijenleri (Human Leukocyte Antigens,-HLA) kullanılmıştır. Bu sistemler ile şüpheliyi kesin olarak dışlamak mümkündür. Dışlanmama durumunda ise bir çok sistem bir arada çalışılmasına rağmen dahil etmede sorunlar yaşanmaktaydı. Ayrıca söz konusu sistemler ile her tür biyolojik materyal kullanılmamaktaydı. Alec Jeffreys'in 1985 yılında multilokus prob kullanarak insan DNA'sının çok değişken bölgelerini tanımlamasından sonra, adli bilimler alanında insan kan ve dokularından kimlik tespiti için DNA'nın polimorfik bölgelerinden yararlanılabileceği anlaşılmıştır.

Günümüzde adli DNA analizlerinde, DNA'nın milyonlarca kopyasının oluşmasını sağlayan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin gelişmesine bağlı olarak 1993 yılından bu yana DNA'nın tekrar eden bölgeleri çalışılmaktadır. Bütün insanlar aynı tip tekrarlar sahiptir, ancak tekrar sayıları bireyler arasında farklılık göstermektedir. Bu tür polimorfizm, ardışık tekrar eden dizi sayısının büyüklüğüne göre mikrosatellit (STR, Short Tandem Repeat) ve minisatellit (VNTR, Variable Number of Tandem Repeat) olarak ikiye ayrılır (Lewin B. 1997, Saferstein R. 2004). Uzun süre sadece otozomal STR'lar kimliklendirme ve babalık tayininde kullanılmış son yıllarda ise gonozomal STR'lar da adli amaçlı kimliklendirmede kullanılmaya başlanmıştır.

Adli DNA analizlerinde gonozomal STR'lar farklı olayların çözümünde kullanılmaktadır. Cinsel saldırı vakalarında karışık DNA örnekleri elde edilir ve Y kromozomuna bağlı STR'lar kullanılarak erkeğin DNA profiline ulaşmak mümkün olabilmektedir. Babanın bulunamadığı olgularda, çoğun erkek olması durumunda baba tarafından herhangi bir erkek akrabanın Y STR lokusları çalışılarak çocuğun o aileye ait olup olmadığı söylenebilir. Y kromozomu çalışmalarından sonra X kromozomunun da adli bilimlerde değişik olgularda kullanılabileceği ortaya konmuştur. Sadece annelik sorulduğunda otozomal STR'lara ek olarak ayırım gücü artırılabilir. Çocuğun kız olması koşuluyla akraba iki erkeğin baba adayları olduğu durumlarda (baba-oğul gibi) ve iki kız çocuğunun, aynı babadan

olup olmadığının araştırılması gibi durumlarda X-STR'lar kullanılabilir. Babanın bulunamadığı durumlarda çocuğun yine kız olması koşuluyla babaanne-kız torun arasında X-STR analizleri ile babalık davaları çözümlenebilir (Szibor R. 2003).

Bu tez çalışmasının amacı, X kromozomuna bağlı 8 STR lokusunun (DXS8378, HPRTB, DXS10074, DXS7132, DXS10101, DXS7423, DXS10134, DXS10135) Mentype® Argus X-8 PCR ticari kiti kullanarak, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik laboratuvarında optimizasyonu sağlamak ve Türkiye'deki polimorfizmini belirlemektir. Bunun için öncelikle kitin hangi DNA izolasyon yöntemi ile daha iyi sonuç verdiği araştırıldı. Daha sonra kit için optimum DNA miktarı belirlendi. PCR toplam hacmi ve elektroforez yükleme miktarları belirli oranlarda azaltılarak en uygun hangi miktarlarda sonuç verdiği belirlendi. Ayrıca erkek ve kadın karışık örnekler çalışılarak, bu tür örneklerdeki lokusların ayırım gücü belirlendi. Aile çalışması yapılarak X-STR lokuslarının babalık belirtimindeki etkinliği araştırıldı. Bu lokusların rutin vakalarda (kimliklendirme ve babalık belirtiminde) kullanılabilmesi için her bir lokusun Türkiye'deki alel sıklığını belirlemek gerekir. Bu amaca yönelik olarak Türkiye'nin bütün bölgelerini temsil edecek şekilde 130 kişiden alınan kan örnekleri kullanılarak, ilgili lokusların Türkiye popülasyonundaki alel sıklıkları belirlendi. Ayrıca her bir lokusun PIC, Het, PE, PI, PD ve MEC istatistiksel parametreleri hesaplanarak lokusların adli bilimlerdeki kullanım gücü değerlendirildi.

II. GENEL BİLGİLER

1. Genetik İşaretler

Kimliklendirme ve nesep tayinlerinde 1900'lü yılların başından itibaren öncelikle kan grupları (eritrosit antijenleri) ardından eritrosit enzimleri, serum proteinleri, hemoglobin ve lökosit antijenleri (Human Leukocyte Antigens,-HLA) düzeyinde ifade edilen genetik varyasyonlardan yararlanılmıştır (Stuart H. 1999). Söz konusu sistemlerin inceleme yöntemleri proteinlerin elektroforetik ayırımına, antijenlerin immünolojik reaksiyonlarına dayanmaktadır.

Bu polimorfik işaretler, adli bilimcilere değerli kanıtlar sağlamalarına karşın bazı dezavantajları vardı.

- a) Bu sistemler ile taze kan örnekleri ve kan lekeleri etkin olarak incelenebilmektedir.
- b) Varyasyon düzeylerinin sınırlı olması nedeniyle tek başlarına biyolojik tanımlayıcı olarak kullanılamamaktadırlar. Bireyin baba olma olasılığını söyleyebilmek için veya mahkemelere delil teşkil eden biyolojik materyalin zanlıya/mağdura ait olup ya da olamayacağını söyleyebilmek için tüm antijenik sistemlerin, polimorfik protein ve enzimlerin çalışılması gerekmektedir.
- c) Antijenik yapılar, proteinler ve enzimler, çevre koşullarına bağlı olarak kısa sürede yapısal değişikliğe uğrarlar.
- d) Bireye yapılan birkaç kan transfüzyonundan sonra nakledilen kana bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedirler.
- e) Söz konusu sistemlerin incelenmesinde kullanılan yöntemler ise eser miktardaki materyallerden sonuç alınabilecek kadar hassas değildir (Kobilinsky L. 2005, Kalsoğlu E. 2006).

Bu sistemler artık kullanılmadığından eski sistemler olup, yerini daha güvenilir olan DNA analizleri almıştır. Adli amaçlı DNA tiplmesi ilk olarak 1985 yılında İngiltere'de ve 1986'nın sonlarında da ABD'de delil olarak kullanılmıştır (Jeffreys A. ve ark. 1988).

Temel bilimler ve tıbbi bilimlerde rutinde çeşitli amaçlarla kullanılan DNA analizleri (Pehlivan S. 2007), adli bilimlerde de babalık, akrabalık ilişkilerinin saptanmasında kullanılmaktadır. Tek yumurta ikizleri dışında tüm insanların DNA'sı birbirinden farklıdır. Bu özellik kriminal tanı koymada temel faktördür. Bir diğer önemli özellik ise bir insanın DNA'sının her hücrede birebir aynı olmasıdır. Örneğin, bir insanın kan hücrelerinden alınan

DNA örneği, saç, kemik ya da sperm hücresindeki DNA ile aynıdır (Mozayani A. 2006, Shuller W. 2001).

2. Genetik Polimorfizm ve Kısa Ardışık Tekrarlar

Başlangıçta DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesine dayanan RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Sınırlı Parçacık Uzunluk Polimorfizmi) analizi polimorfik DNA bölgelerinin tespiti amacıyla kullanılmıştır. 1980'lerde adli bilimlerde kriminal olayların aydınlatılmasında kullanılmış ancak bir takım dezavantajları olduğu ortaya konmuştur. İş gücünü arttırması, analiz uzun sürmesi, radyoaktif madde ile çalışılması, fazla miktarda ve degrade olmamış (bozulmamış) DNA'ya ihtiyaç duyması, pahalı olması ve otomasyona uygun olmaması gibi nedenlerden dolayı RFLP'nin adli bilimlerde kullanımı sınırlı kalmıştır (Schanfield M. S. 2000, Lee H. 1998).

1983'te Kary Banks Mullis'in belirli bir DNA bölgesini milyonlarca kez çoğaltmaya yarayan ve bu sayede ona 1993 Nobel Kimya ödülünü kazandıracak olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nu (PCR) bulması ile birlikte adli amaçlı kimliklendirme hem daha kolay hem de daha kısa sürede gerçekleşmeye başlamıştır. PCR'ın eser miktarda bulunan biyolojik materyalden dahi DNA'nın istenen bölgesinin milyonlarca kopyasının yapılmasına imkan vermesi, DNA'nın adli amaçlı kullanımını artırmıştır (Kobilinsky L. 2005, Bartlett J. M. S. 2002).

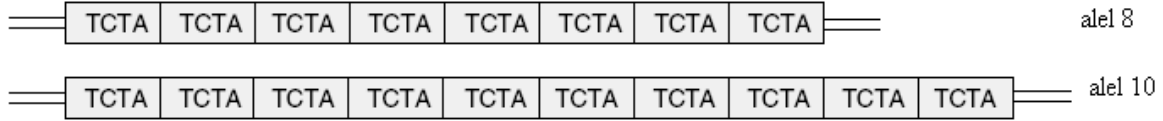
İnsan genomunda bulunan yaklaşık 3 milyar baz çifti, her biri farklı lokuslarda yer alan 25,000–30,000 geni kodlamaktadır. Protein kodlayan kısım tüm genomun yaklaşık %3'üdür. Geri kalan kısım protein kodlamaz ve bu kısmın büyük çoğunluğu da tekrarlardan oluşur (James H. S. 2003). Genlerin çoğu "alel" olarak adlandırılan birkaç farklı formda bulunabilmektedir. Bir toplumun genetik yapısındaki varyasyonların (değişimlerin) varlığı "genetik polimorfizm" olarak adlandırılır (Alikaşifoğlu M. 2006).

Bir lokusun polimorfik olarak adlandırılması için toplum içinde o lokusla ilgili iki veya daha fazla alelin bulunması gerekmektedir. Polimorfizmin ortaya çıkabilmesi için genomun belli bölgesindeki baz çiftleri dizininde varyasyonların olması, bu değişikliklerin o popülasyonda kalıcı olması ve sıklığının %1'den fazla olması gerekmektedir (Dib C. 1996). Polimorfizm gösteren bir gen için her birey, biri anneden diğeri babadan aktarılan iki farklı alel taşıyabilirken, bir popülasyon aynı gen için çok sayıda alele sahip olabilmektedir. Bu genetik polimorfizm adli amaçlı DNA analizlerinin temelini oluşturmaktadır.

Yapısal olmayan DNA bölgelerinde (intron), özellikle farklı uzunluklarda nükleotid dizilerinin değişik sayıda, ardarda tekrarlanmasıyla oluşan bölgeler polimorfizm açısından

büyük önem taşımaktadır. Bu polimorfik bölgelere ait aleller mutasyonları biriktirebilme özellikleri, evrim hızının hesaplanması ve gen göçünün seyri için tutarlı bilgi oluşturduğundan, bu bölgeler filogenetik çalışmalarda ve insan göç modellerinin oluşturulmasında bilgi kaynağı olarak kullanılmaktadırlar (Gomolka M. 1994). Ardışık olarak tekrar eden bu dizilerin tekrar sayıları, toplumu oluşturan bireyler arasında farklılıklar gösterdiği için bu polimorfizmlerden adli amaçlı kimliklendirmede yararlanılmaktadır (Schleif R. 1993).

İnsan genomundaki farklı sayıda birbiri ardına tekrarlayan bu polimorfik bölgelere VNTR'lar (Variable Number of Tandem Repeats) veya minisatellitler denilmektedir. 10–100 bç'lik tekrarlara sahip VNTR'lar nükleotid veya nükleotidlerin delesyon, insersiyon ve/veya eşit olmayan krosing-over'ı sonucu oluşabilmektedir. Bu lokuslar Mendel yasalarına göre kalıtılırlar. Yüksek ayırtılma gücüne sahiptirler (Conealy P.M. 1994). VNTR'ların bir alt grubu olan STR'lar (Short Tandem Repeats-STRs), yaklaşık 100–400 bç uzunluğunda, tekrar dizini 2–6 baz çifti arasında olup mikrosatellit olarak adlandırılırlar. İlk kez 1991 yılında Edwards ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu tekrar dizilerine genom boyunca ortalama her 6–10 kb (kilobaz)'da bir rastlanır. Genom boyunca yaklaşık bir milyon STR lokusu bulunur (International Human Genom Cons. 2001). STR dizileri basit ve karmaşık olarak ikiye ayrılırlar. Basit tekrarlar, tekrar eden ünite aynıdır. Karmaşık tekrarlar ise farklı tekrar ünitelerine sahiptirler. Genomda iki nükleotidli (dinükleotid) tekrarlara daha sık rastlanmaktadır. Ancak iki nükleotid tekrarlarındaki iki bazlık bir farkın ayırımı güç olduğundan adli amaçlı olarak genellikle tetranükleotid tekrarlar kullanılmaktadır (Butler M. J. 2003). STR'lar VNTR'lara göre daha kısa tekrar ünitelere sahip olduğundan, alelik varyasyonları minisatellitlere oranla az olup dolayısıyla ayırım güçleri daha düşüktür. Ancak STR sistemlerinin bu dezavantajı çok sayıda STR lokusunun bir arada amplifiye (çoğaltılması) edilebilmesi ile yok edilmiş olur. STR'lar günümüzde daha kısa DNA fragmanları (parçacıkları) içermesi nedeni ile kısmen degrade (bozunmuş) örneklerde dahi sonuç alınabilmesi, çalışma kolaylığı ve birçok lokusun bir arada amplifiye edilebilmesi, yüksek ayırım gücü göstermesi gibi üstün özellikleri sayesinde adli amaçlı kimliklendirmede ve nesep tayininde tercih edilen sistemler olmuştur (Butler J.M. 2005).



Şekil 1. Bir STR Lokusu

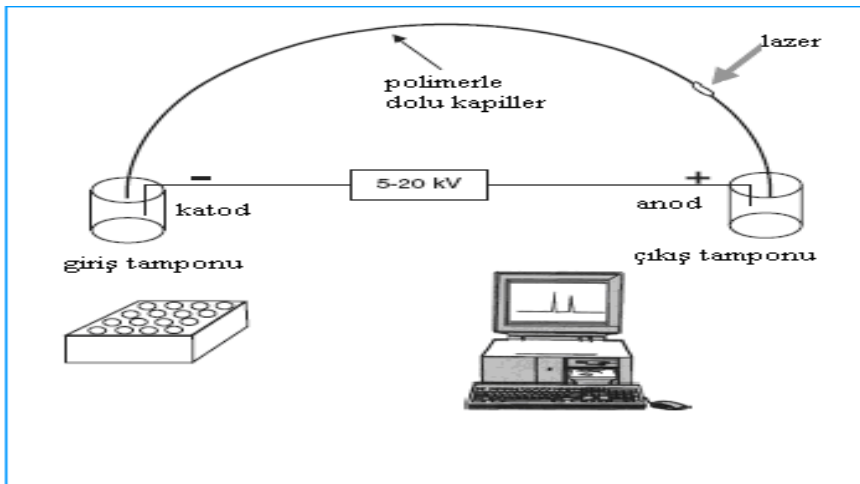
Adli amaçlı rutinde kullanılacak STR lokuslarının seçiminde; ayırım gücü, kromozomal yerleşimi, yapısı, diğer STR lokusları aynı anda ile tek bir PCR ile çoğaltılabilmesi (multipleks), güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesi gibi kriterler göz önüne alınmaktadır. Adli DNA analizlerinde PCR'a dayalı yöntemlerin 1990'larda kullanılmaya başlanmasıyla, eser miktarda DNA içeren örneklerin analizi dahi mümkün olmuştur. Devam eden çalışmalarla, özellikle STR lokuslarının PCR ile çoğaltılarak incelenebileceğinin gösterilmesi, adli amaçlı DNA analizinde yeni bir dönemin açılmasına neden olmuştur.

Adli amaçlı DNA analizlerinde çok sayıda STR lokusu çalışılmaktadır. Adli analizler için ilk STR tiplleme sistemini İngiltere'de Forensic Science Service (FSS) geliştirmiştir. Bu STR sistemi (QUAD) ile 4 lokus aynı anda çoğaltılabilmekteydi. Daha sonra FSS, ikinci nesil multipleks (SGM, second generation multiplex) olarak adlandırılan STR sistemini geliştirdi. İngiltere'de artık Applied Biosystems adlı ticari şirket tarafından üretilen The AmpF/STR® SGM Plus® kiti kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde ise adli analizlerde kullanılması için FBI tarafından CODIS (Combined DNA Index System) olarak adlandırılan 13 STR lokusu seçilmiştir. Günümüzde bu lokusları da içeren, Applied Biosystems'in geliştirdiği AmpF/STR® Identifiler® ve Promega şirketinin ürettiği PowerPlex® 16 adlı iki ticari kit bulunmaktadır (Goodwin W. 2007, Samuels J. E. 2000).

Tablo 1. STR sistemleri

QUAD	SGM	SGM Plus®	Identifiler®	PowerPlex® 16
vWA	Amelogenin	Amelogenin	Amelogenin	Amelogenin
TH01	vWA	D2S1338	D2S1338	D2S1338
F13A1	D8S1179	vWA	vWA	vWA
FES	D21S11	D16S359	D16S359	D16S359
	D18S51	D8S1179	D8S1179	D8S1179
	TH01	D21S11	D21S11	D21S11
	FGA	D18S51	D18S51	D18S51
		TH01	TH01	TH01
		FGA	FGA	FGA
			D13S317	D13S317
			CSF1PO	CSF1PO
			D7S820	D7S820
			TPOX	TPOX
			D5S818	D5S818
		D2S1338	D2S1338	Penta D
		D19S433	D19S433	Penta E

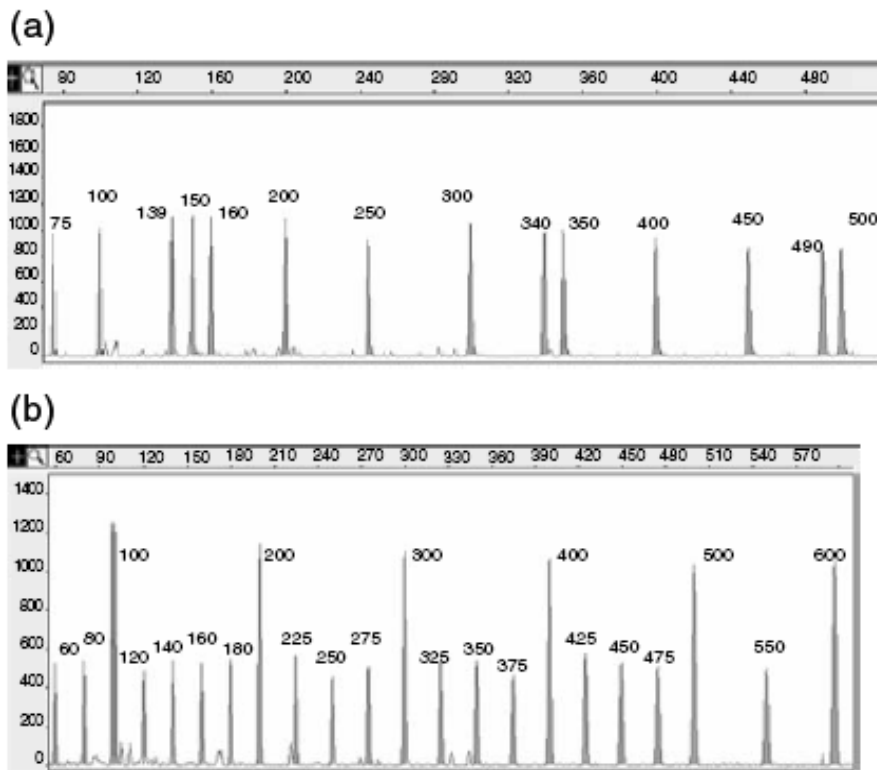
PCR ile çoğaltılan STR lokuslarının uzunluklarının ölçülmesi gerekir ki bazı STR alelleri arasında bir baz çiftlik fark vardır. PCR ürünlerinin jel elektroforezi için poliakrilamid jel kullanılarak 20–500 nükleotid uzunluğundaki DNA parçaları ayırımı gümüş boyama ile yapılabilmektedir. Bu elektroforezde çalışılan lokus sayısı sınırlıdır çünkü farklı lokusların alelik boyut (size) mesafeleri çakışabilmektedir. Bu sınırlama, adli bilimler topluluğu tarafından PCR ürünlerinin farklı floresans boyalar ile etiketlenmesi sağlanarak giderilmiştir. Bunun için bir seri boya geliştirilerek, bu boya ların PCR primerlerin her birinin 5' ucundan eklenerek elektroforez sırasında DNA parçalarının belirlenebilmelerini sağlamaktadır. Tek analizde boya ların sayısının 5'e kadar çıkarılması, daha fazla lokusun çalışılabilmesi olanak verir. Elektroforez sistemleri slab-jelden, DNA parçalarının polimer solüsyonuyla dar cam tüpten geçirilerek, iyon argon lazerle tespit edilebilmesine olanak veren kapiller elektroforeze geliştirilmiştir. Kapiller elektroforez çözelti içindeki partiküllerin elektriksel alan etkisi altında göç etmesi prensibine dayanan güçlü bir analitik ayırma tekniğidir. Kapiller jel elektroforezinde temel ayırma mekanizması; jelle doldurulmuş kapillerde gözeneklerden geçerek göç eden moleküllerin büyüklükleri arasındaki farka dayanır. Kapiller elektroforez, 5–20 kilovoltluk bir güç kaynağı, anot ve katot elektrotlar arasında bulunan bir kapiller tüp, sıcaklığı sabit tutacak bir ısıtıcı bölge ve anot uca yakın bir lazer ışık kaynağı ile CCD (charged coupled device) kameradan oluşur. Negatif yüklü DNA molekülü polimer içerisinde ve elektrik akımı altında anoda (+) doğru hareket eder. DNA örneği elektrokinetik yöntemle kapiller içerisine alınır, sabit voltaj ve sıcaklıkta anoda doğru hareket eden DNA parçacıkları kapillerde ilerlerken (detektör) lazer ışığı tarafından farklı floresans boya ile işaretli primere göre değişik dalga boylarında yansıtılarak CCD kamera tarafından algılanırlar (Goodwin W. 2007, Butler, J.M. 2005).



Şekil 2. Kapiller elektroforez sistemi (Forensic DNA Typing 2005)

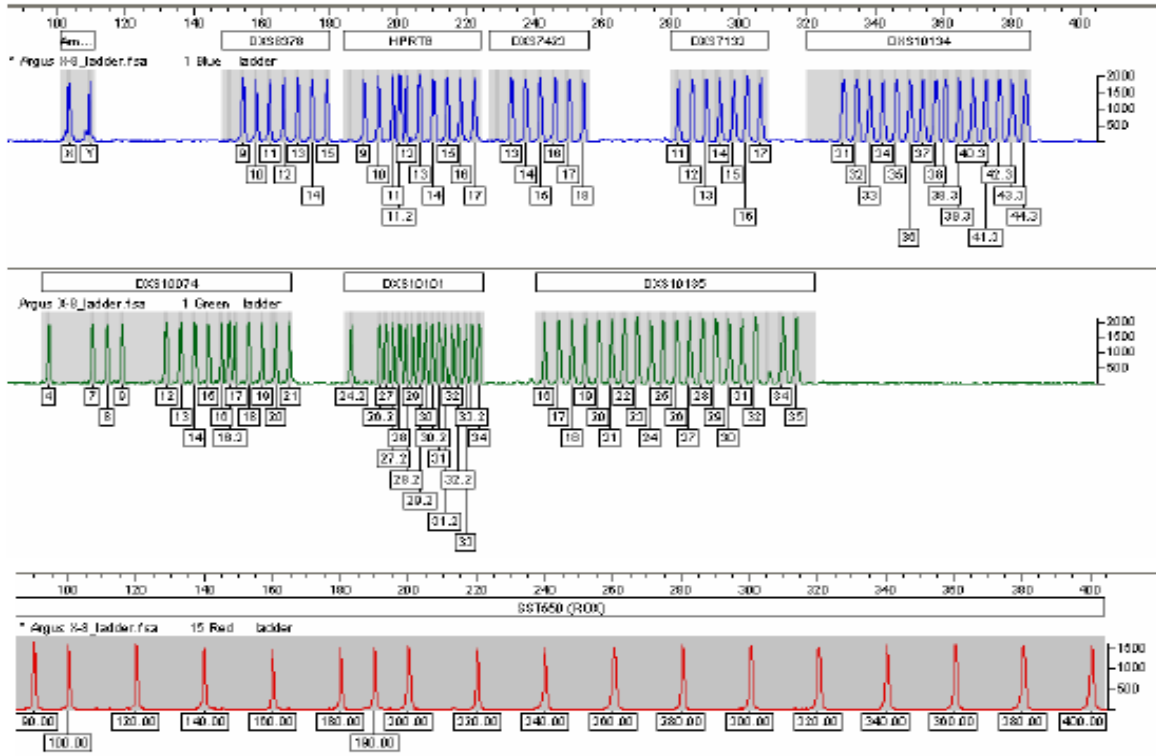
Applied Biosystems tarafından sağlanan kapiller elektroforez sistemleri çoklu renk dedeksiyonuna sahiptirler. ABI PRISM® 310 Genetik Analyzer cihazı bir yürütmede tek kapiller ile 48 PCR ürününü analiz edebilirken, ABI PRISM® 3100 ve Applied Biosystems 3130xl Genetik Analyzer cihazları 16 kapiller ile 1000'den fazla, ABI PRISM® 3700 ve Applied Biosystems 3730xl Genetik Analyzer cihazları 96 kapiller ile 4000'den fazla PCR ürününü analiz edebilmektedir.

Elektroforez sonrası STR profillerinin değerlendirilmesi, GeneScan®, GeneMapper™ ID veya GenoTyper® gibi programlarla gerçekleştirilir. PCR ürünlerinin boyutları, internal size standart kullanılarak belirlenir. Internal size standart, boyutları belli ve floresans boya ile işaretlenmiş DNA parçaları içerir ve bu DNA parçaları kapiller elektroforez yürütmesi esnasında PCR ürünleri ile birlikte lazer tarafından tespit edilir. En çok kullanılan ticari internal size standartları Applied Biosystems şirketinin ROX™ veya LIZ™ floresans boya ile işaretli GeneScan™ 500 standardı ve Promega'nın ILS600'dür (Goodwin W. 2007).



Şekil 3. (a) GeneScan™ 500 (Applied Biosystems) (b) ILS600 (Promega) (An Introduction to Forensic Genetics)

GeneScan gibi programlarla çalışılan STR lokusunun hangi alellere sahip olduğu boyut analizi ve alelik ladder ile karşılaştırılarak yapılır. Alelik ladder, STR lokusu için insan popülasyonunda mevcut olan tüm alellerin yapay olarak hazırlanmış halidir. Alelik ladder, çalışılan STR lokusunun hangi alellere sahip olduğunu kesin olarak belirlenmesini sağlar.



Şekil 4. Mentype® Argus X-8 Alelik Ladder (Argus X-8 Kılavuz Kitabı 2007)

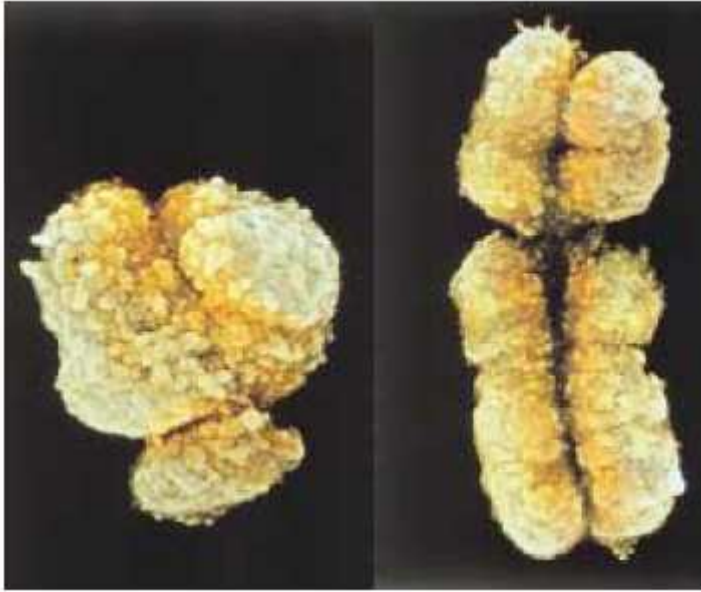
3. STR'ların Adlandırılması

STR'ların dünya çapında kullanımı için lokuslarının ve alellerinin adlandırılması standardize edilmiştir. Bu nedenle ISFH (International Society of Forensic Hemogenetics, Uluslararası Adli Hemogenetik Derneği) 1992 yılında lokus ve alellerin adlandırmasında uyulacak kuralları ortaya koymuştur. Bu kurallara göre STR lokuslarının isimlendirilmesi dört aşamada yapılmaktadır. İlk harf D; DNA'yı, ikinci sıradaki rakam; lokusun hangi kromozomda yerleşik olduğunu, üçüncü harf olan S (Single); bu lokusun DNA dizisinde tek olduğunu, en sonda yer alan sayı ise; lokusun o kromozomda yer alan diğer STR lokuslarından ayıran rakamı gösterir. Örneğin D5S21 bu kurallara göre isimlendirilen bir lokustur.

Alelik adlandırma ise her alelin içerdiği tekrar sayısına göre yapılmaktadır. Tekrar ünite dizilerinin bir kısmı sadece basit tekrarlardan oluşurken, bir kısmı ise iki ya da daha

4. Cinsiyet Kromozomlarının Adli Bilimlerde Kullanımı

Adli amaçlı DNA analizlerinde otozomal kromozomlar üzerinde bulunan, ayırım gücü dolayısıyla dışlama gücü ve heterozigotluk oranı yüksek olan somatik STR lokusları kullanılmaktadır. Son yıllarda adli genetik incelemeler gonozomal kromozomlar üzerindeki polimorfizme yönelmiştir ve bu çalışmalar ilk olarak Y kromozomu polimorfizminin incelenmesiyle başlamıştır.



Şekil 6. Y kromozomu ve X kromozomu (Biophoto Associates/Photo Researchers)

4.1. Y Kromozomu

İnsan Y kromozomu 21. kromozomdan sonraki en küçük kromozom olup akrosentrik bir yapıya sahiptir. Genomun sadece % 2 kadarı Y kromozom tarafından oluşturulur. Yaklaşık altmış milyon baz çifti içermektedir. Kromozomun uzun ve kısa kollarının distal bölümlerinde bulunan ve X kromozomu dizinleri ile homolog olan 2 adet psödootozomal bölge içerir (PAR1,PAR2). Bu bölgelerin dışında Y kromozomunun %95'i mayozda rekombinasyona uğramaz (NYR bölgesi) haploid şekilde bulunur ve baba tarafından erkek çocuğa değişmeden aktarılır (Butler, J.M. 2005, Ceylan G.G. 2007).

Y kromozomunun birkaç yüz gen içerdiği düşünülmektedir ve Y kromozomunun büyük bir bölümü fonksiyonel olmayan tekrar dizileri ve psödogenlerden oluşmuştur. Evrimsel olarak X ve Y kromozomları yaklaşık 240–320 milyon yıl önce, memelilerin kuşlardan ayrımı sırasında farklılaşmaya başlamıştır. Zamanla, uçlarda yer alan ve X

kromozomu ile homoloji gösteren PAR bölgeleri hariç, erkek cinsiyetiyle ilgili genlerin dışındaki dizilerin birçoğunu kaybetmiştir (Rustamov A. 2006). Y kromozomu, cinsiyet determinasyonu, erkek infertilitesi, testis determinasyonu gibi erkeğe özel çok önemli biyolojik fonksiyonlarla ilgili genetik bilgiyi üzerinde taşır (Cinnioglu C. 2001).

Y kromozomu rekombinasyona uğramadığından (NRY bölgesi- nonrecombining Y) ve sadece erkek ebeveyn tarafından kalıtıldığından aynı soydan gelen tüm erkeklerde yeni bir mutasyon olasılığı dışında birçok nesil boyunca aynı haplotip görülecektir. Bu özellik Y kromozomu polimorfizmini, göç yollarının araştırılmasında, antropolojik, evolüsyonel ve adli genetik alanında kullanılmasına neden olmuştur. Son yıllarda NRY' de ≥ 250 polimorfik lokus tanımlanmıştır. Bu polimorfik bölgeler üç grupta sınıflandırılmaktadır.

1) Düşük mutasyonlu bialelik işaretler. Bunlar insan evriminde ender mutasyon olaylarıyla (UMEs- unique mutation events) tanımlanan tek baz değişiklikleri (SNP- single nucleotide polymorphism).

2) Mikrosatellitler veya ardışık tekrar dizileri (STR). Bunların mutasyon hızının jenerasyon başına $\% 0,2 \times 10^{-3} - 9,3 \times 10^{-3}$ arasında değiştiği çalışmalarla gösterilmiştir.

3) Yüksek değişkenlik gösteren lokuslar. Bu lokuslar çok yüksek mutasyon hızına sahiptirler.

Bunların içinde STR'lar çalışma kolaylığı, mutasyon sıklığının çok fazla olmaması ve polimorfik olması bakımından en çok tercih edilen lokuslardır (de Knijff P. 2000).

4.1.1. Adli Bilimlerde Y Kromozomu

Adli genetik incelemelerde Y kromozomu STR polimorfizmi yaygın kullanım alanı bulmuştur. Kadın erkek DNA'larının karışmış olduğu cinsel saldırı olgularında Y-STR analizi oldukça etkilidir. Karışmış örneklerde sadece erkekte bulunan Y kromozomu üzerindeki bölgelere özgü primerler kullanılarak Y-STR analiz edilebilir (Yükseloğlu E.H. 2003). Babalık davalarında özellikle baba adayının bulunmadığı ya da baba adayının biyolojik materyalinden DNA elde edilemediği durumlarda çocuk erkek ise baba adayının soy ağacında yer alan herhangi bir erkeğin (baba tarafından herhangi bir erkek akrabası) Y-STR sonuçları kullanılarak fethi-kabire gerek duyulmadan babalık tayini yapılabilmektedir (Kayser M. 2001). Erkek kardeşlerin tayininde, ayrıca bir vakada şüpheli erkeği ve şüphelinin baba tarafından tüm erkek akrabalarını dışlamaktadır (Kayser M. 2007).

Vaginal penetrasyon iddiası olduğunda erkeğe ait epitel hücreleri Y-STR analizleriyle ortaya konabilir (Gunn A. 2006). Ancak Y-STR'lerin ayırım gücü otozomal STR'lardan düşüktür. Bir cinsel saldırıda semenin kaynağını şüpheye yer bırakmayacak şekilde

saptayamaz. Otozomal STR'larla desteklenmedikçe ancak o aileden bir erkeğin fail olduğu söylenebilir (Aşıcıoğlu F. 2006).

Y kromozomunda yer alan amelogenin geninde bir delesyon ya da primer bağlanma bölgesinde bir mutasyon meydana geldiğinde, Y kromozomuna ait pik alınmadığı için kişi yanlışlıkla kadın fenotipinde değerlendirilir. Y kromozomal STR'lar çalışılarak bu önenebilir (Roffey P.E. 2000).

4.2. X Kromozomu

Cinsiyet kromozomları veya gonozomlar, pek çok yönden otozom olarak adlandırılan diğer kromozomlardan farklıdır. X kromozomu, 153 milyondan fazla baza sahiptir. Kromozomal anomalisi olmayan normal erkek hücrelerinde cinsiyet kromozomları çiftler halinde bulunmaz. Erkekler bir X bir de Y kromozomu taşırlar. Bu sebeple X ve Y bölgeleri erkeklerde hemizigottur. Buna rağmen X ve Y kromozomu arasındaki homoloji aynı kaynaktan geliyor gibi görünür. Erkek gametogenezi esnasında, X ve Y kromozomları arasındaki rekombinasyon, psödootozomal bölgeler olarak adlandırılan küçük sub-telomerik bölgelerde ortaya çıkar. Bu bölgeler homologdur. Psödootozomal bölgelerdeki genler cinsiyet bağlantılı değildir. Bu bölgelerdeki rekombinasyon sıklığı otozom kromozomlara göre 20 kez daha yüksektir (Szibor R. 2007).

X kromozomunun, Xp ve Xq telomerleri olmak üzere PAR1 ve PAR2 olarak adlandırılan psödootozomal bölgeleri bulunmaktadır. Ayrıca ortak psödootozomal bölgelerine ek olarak X ve Y kromozomunda birçok homolog bölgeler vardır. Dişilerde X kromozomu homolog çift olarak bulunur ve bu özelliği ile otozomal kromozomlara benzer. Birden fazla X kromozomuna sahip bireylerin hücre başına sadece bir aktif X kromozomu vardır. İnaktif X kromozomu (cinsiyet kromatini – Barr Cisimciği) ilk defa 1949 yılında kedilerin sinir hücrelerinin morfolojileri üzerine incelemeler yapan Barr ve Bertram tarafından keşfedilmiştir. Bu araştırmacılar cinsiyet kromatininin yalnızca diş kedilerin sinir hücrelerinde bulunduğunu, erkek kedilerde bulunmadığını göstermişlerdir. Bugün bu araştırmacıların birinin adına atfen cinsiyet kromatinine Barr cisimciği (Barr body) denilmektedir. Moore 1953 yılında insanların dişilerinin de aynı kromatine sahip olduğunu göstermiştir. Cinsiyet kromatini, diş memelerinin somatik hücrelerinde interfazda görülen özel bir kromatindir. 0.7–1.4 µm çapında olup, nukleer membranın iç yüzeyine tutunmuş, koyu boyanan özel bir cisimciktir. Dişilerin lökositlerinde görülen Drum-stick (Davul tokmağı) inaktif X kromozomunun değişik bir görünüşüdür. Dr. M. F. Lyon, 1961 yılında Lyon hipotezini

farelerde X'e bağlı heterozigot genlerin fenotipik etkileri üzerine yaptığı çalışmalar sonucunda ortaya koymuştur. Lyon hipotezine göre;

- Dişi memeliler cinsiyet kromatini inaktif olan X kromozomundan oluşmaktadır. Yani dişilerde iki X kromozomundan biri genetik olarak inaktiftir. Eğer dişide  X kromozomu varsa bunlardan ikisi inaktive olur. Bu inaktivasyon embriyoda 12–16. günde meydana gelmektedir.
- İnaktivasyon rastgele ve bağımsız meydana gelir. Böylece bazı hücrelerde paternal X kromozomu, bazılarında maternal X kromozomu inaktif olur. X inaktivasyonu dişi somatik hücrelerde rastgele oluşsa da bu durumun bazı istisnaları vardır. Yapısal olarak anomali olan X kromozomunun tercihen inaktif olması bu istisnalardan birisidir.
- Embriyonik gelişimin erken evrelerinde meydana gelen inaktivasyon, geri dnşimszdr.

Bir dölde beklenmeyen ve belirlenemeyen anormal gonozomal karyotipler meydana gelebilir ve X'e bağlı markırlar kullanılarak yapılan akrabalık testinin doğruluğunu etkileyebilir. Örneğin Ullrich-Turner sendromu ile ilişkilendirilen gonozomal genotip XO, canlı dişi doğumlarında 2500'e 1 oranında ortaya çıkar (Clement-Jones M. 2000). Bir başka beklenmedik durum fenotipik olarak dişilerde XY karyotipinin ortaya çıkmasıdır (Wieacker P. F. 1998). Bu, androjen duyarsızlığı veya XY disgonozomisi şeklinde meydana gelir. Bu tür aksaklıklar genetik olarak erkeklerin kolay fark edilmeyen dişi fenotipi sergilemelerine neden olur. Fakat Y kromozomunun varlığı amelogenin analizi ile kolaylıkla anlaşılabilir.

4.2.1. X Kromozomuna Bağlı Hastalıklar

4.2.1.1. Yapısal düzensizlikler

- Alport sendromu
- Androjen duyarsızlığı sendromu
- Becker's müsküler distorfi
- Sentronükleer miyopati
- Charcot-Marie-Tooth hastalığı
- Coffin-Lowry sendromu
- Duchenne müsküler distrofi
- Fabry hastalığı
- Fragile X sendromu
- Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği
- Hemofili
- Menkes hastalığı
- Sentronükleer miyopati
- Sendromik olmayan sağırılık
- Ornithin transkarbamilaz yetmezliği
- Rett sendromu
- Renk körlüğü
- Spinal ve bulbar müsküler atrofi
- X'e bağlı kombine immun eksikliği
- X'e bağlı agammaglobulinemi
- X'e bağlı sideroblastik anemi

4.2.1.2. Sayısal Düzensizlikler

- Turner sendromu
- Klinefelter sendromu
- Trizomi X

4.2.1.2.1. Turner Sendromu

X kromozomu üzerindeki resesif bir genin etkisi sadece erkeklerde görülür. X'e bağlı genler resesif olsalar da erkeklerde hemizigot olduklarından fenotipik olarak etki gösterirler. X'e bağlı resesif bir hastalığın kadınlarda ortaya çıkabilmesi için ya homozigot durumda olması ya da hastalığı taşıyan kadın, X kromozomu monozomisi veya o gen bölgesi için parsiyel monozomisi olan Turner sendromlu kişi olabilir. Bunlara ek olarak kadın görünümü 46 XY kromozomlu testiküler feminizan bir hasta olabilir.

Hastalık ilk kez Henry Turner tarafından 1938 yılında tanımlanmıştır. Polani ve Wilkins böyle vakalarda 1954 yılında X kromatini olmadığını gösterdiler ve 1959'da Dr. Charles Ford, sendromun kromozom diziminin 45, X0 olduğunu bulmuştur. Avrupa'da genellikle Ullrich-Turner sendromu ya da Bonnevie-Ulrich-Turner sendromu olarak isimlendirilir (Tarkan Y. 1991).

X kromozomu taşımayan bir yumurta hücresinin X kromozomu taşıyan bir sperm ile döllemesi sonucu ya da eşey kromozomu taşımayan bir spermin normal bir yumurta hücresini döllemesiyle meydana gelir. Yaklaşık olarak Turner sendromlu gebeliklerin %98'i düşükle sonuçlanmaktadır. Turner sendromunun belirtileri; kısa boy, Limfodema, el ve ayaklarda şişkinlik, göğüs kafesi farklılığı ve meme ucu genişliği, düşük saç bitiş, düşük kulak çizgisi, kısırılık, Amenore (adet görmeme). Diğer belirtiler, dışa kıvrılan dirsek (kübitus valgus), perdeli boyun, yumuşak ve yukarı dönen tırnaklar, Simian çizgisi ve düşük gözkapaklarıdır. Turner sendromu bulguları kişiden kişiye farklılık gösterebilir (http://tr.wikipedia.org/wiki/Turner_sendromu 2009).

4.2.1.2.2. Klinefelter Sendromu

Klinefelter sendromu; hücre bölünmesi sırasında, eşeysel kromozom düzensizliklerinden kaynaklanan semptomların kişide görülmesi durumudur. Hastalığı, 1942'de Dr. Harry Klinefelter ilk olarak tanımlamıştır. Sendromlu hastaların %80'i 47, XXY karyotipine sahip iken vakaların %20'sinde 49, XXXXY; 48, XXXY; 48, XXYY; 47, XYY; 46, XX gibi farklı karyotipler görülebilmektedir (Aşıcıoğlu F. 2006). Bu kişiler genellikle erkek birey olarak görülürler. Uzun kol ve bacakları, kadınımsı kalça çıkıntıları ilk olarak göze çarpan özellikleridir. Testisleri küçük, kadınımsı göğüs (jinekomasti) ve kas gelişimleri vardır. Sesleri erkeklere nazaran daha incedir. Hipogonadizm görülebilir. Sakal ve bıyık gelişimleri çok az, vücut kıllanmaları kadınımsı görünümdeydir. Spermatogenez görülmez ve kısır bireylerdir. Canlı erkek doğan bireylerin 500 ya da 1000'inde 1 oranla görülür.

4.2.2. X Kromozomunun Adli Bilimlerdeki Tarihçesi

Adli çalışmalarda X kromozomu markırlarının geniş ölçüde kullanma fikri son yüzyılın ikinci yarısında yapılan klinik genetik deneylerden kaynaklanmaktadır. X kromozomuna bağlı renk körlüğü, hemofili, Duchenne müsküler distrofi, G6PD eksikliği, Lesch-Nyhan sendromu gibi birçok bilindik hastalık vardır. Fertil erkeklerde, bütün kız çocukları babadan gelen kusurlu X kromozomuna sahip olurlar ve bunu gelecek kuşağın yarısına aktarırlar. Bu bilgi sadece klinik genetikte değil aynı zamanda babalık testi içinde değerlidir. Yine de adli bilimlerde cinsiyet bağlantılı genetik markırların (belirteç) kavranması çok yavaş olmuştur (Szibor R. 2007).

Akrabalık ilişkilerin belirlenmesi bilindiği gibi başlangıçta sadece kan grubu markırları ile yapılmaktaydı. Daha sonra serum proteinleri ve enzimleri eklendi. X'e bağlı markırlarda ilk önemli başarı Xga kan grubunun Race ve Sanger'in araştırma grubu tarafından saptanması ile elde edilmiştir (Tippett P. 1998). Xga'nın X kromozom bağlantısı dişilerde ve erkeklerde Xga /Xg fenotip sıklıklarının karşılaştırılması ile kolayca bulunabilir (erkeklerde: 0.62/0.38; kadınlarda: 0.86/0.14). Xga kan grubu oldukça zayıf bir antijendir. Bu da Xga testinin akrabalık testi uygulamasında önemli bir yöntem olarak kullanılamamasının bir sebebi olabilir. Yine de Klinefelter ve Ullrich-Turner sendromundaki gibi kromozom anormallikleri, X kromozomunun serolojik Xga testi kullanılarak tanımlanmasıyla çözülmüştür (Tippett P. 1998).

DNA tekniği öncesinde adli bilimciler insan dokularında veya tek hücrelerde cinsiyet tayini için cinsiyet kromatinlerini kullandılar. Daha sonra bu teknik, erkek heterokromatininin floresans mikroskobu kullanılarak yapıldı.

1980'lerin başında klinik genetik uzmanları, doğum öncesi teşhisi amaçlayan gen bağlantı analizine başladılar (Davies K. E. 1985). Bazı X bağlantılı hastalıklar (Duchenne müsküler distrofi ve hemofili gibi) hedef alınmıştı. İlk aşamada; Southern ve RFLP tekniği ile tek nükleotid polimorfizmi (SNP) saptandı. Bu markırlar (Lalloz M. R. 1994), CA tekrar polimorfizmleri ve minisatellit St14 (DXS52) ile desteklendi (Oberlé I. 1985). Daha sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniğinin kullanıma girmesiyle diğer polimorfizm çeşitleri de incelenmiştir. Adli araştırmalarda X kromozomuna bağlı ilk çalışılan mikrosatellit lokusları HPRTB ve HUMARA'dır (Desmarais D. 1998, Szibor R. 2000).

4.2.3. X Kromozomuna Bağlı Kısa Ardışık Tekrarlar

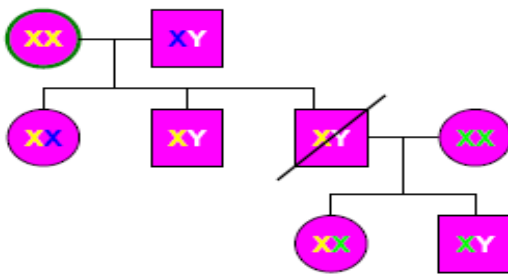
Mikrosatellit veya basit ardışık tekrarlar, tüm insan kromozomlarında homojen bir şekilde bulunur (Subramanian S. 2003). Yine de kromozom içindeki STR yoğunluğu önemli değişiklikler gösterebilir. Üç ve altı nükleotid tekrarlar eksonlarda oldukça fazla iken diğer tekrarlar intronlarda daha fazladır (McNeil J.A. 2006). Tri, tetra ve penta STR'ların analizi, adli bilimlerde oldukça yaygınlaşmış ve otozomal STR'lar, Y ve X kromozomal STR markırlarının uygulamalarından çok önce kullanılmaya başlanmıştır. X-STR'larda mutasyon oranları, otozomal STR'larda bildirilene benzer oranlarda ($2,09 \times 10^{-3}$) görülmektedir (Szibor R. 2007a, Aşıcıoğlu F. 2006).

X kromozomuna bağlı STR'ların adli amaçlı kullanılabilmesi durumları şöyledir:

- Biyolojik kanıtlarda X kromozomu markırlarının ayırım gücü (PD) değeri karşılaştırılacak kişinin cinsiyetine göre değişiklik gösterir. Bir kadın biyolojik materyali yine bir kadınla karşılaştırılacaksa, X'e bağlı markırların PD değeri otozomal markırlarinkine eşit olur. Eğer erkek biyolojik materyali bir erkekle karşılaştırıldığında, erkekte bir X kromozomu bulunduğu için, X'e bağlı markırların PD değeri otozomal markırlarinkinden daha az olacaktır. Karışık biyolojik örneklerde erkek varlığının tespiti için Y-STR'ların kullanılması uygunken, kadın varlığının tespiti için X-STR'ların kullanılması otozomal STR'lara oranla daha etkindir. Çünkü tesadüfen bir kişinin tüm X STR'ı homozigot olmadığı sürece, iki alel görmek mümkündür (Szibor R. 2007).
- Anne, çocuk ve şüpheli babanın olduğu babalık davalarında otozomal STR'ların kullanımı yeterlidir ve başka bir markırın kullanılmasına gerek duyulmaz. Baba/oğul ilişkisi belirlendiğinde X STR'lar kullanılamaz. Çünkü baba ve erkek çocuk arasında X kromozomu geçişi yoktur. Baba/kız ilişkisinde ise otozomal STR'lara ek olarak kullanılabilir. Kız çocuğun sahip olduğu X kromozomun birini annesinden alırken diğerini babasından alır (Szibor R. 2003, Gomes I. 2007).
- Akraba iki erkeğin (baba/oğul gibi) babalık davasında, çocuğun kız olması durumunda X STR'ların kullanılmasıyla babalık belirlenebilir. Çünkü şüpheli babalar farklı annelere sahip olduğundan farklı X kromozomlarına da sahip olacaklardır (Builes J.J. 2007). Erkek kardeşlerin babalık davalarında ise annelerinin ortak olması sebebiyle X STR'ların etkisi %50 oranında azalabileceğinden kullanımı uygun değildir.
- Cinsel tecavüz sonrasında sonra oluşan hamilelikler çoğunlukla kürtaj ile sonuçlandırılabilir. 6–8 haftalık kürtajlarda düşük materyali, maternal kan ve dokularla

birlikte bulunur ve bunları birbirinden ayırmak zordur. Bu durumda ki kürtaj materyali yani fetüs dişi ise, X-STR analizi ile babadan kalıtılan X kromozomunun varlığı tespit edilebilir. Ensest vakalarında, fetüsün dişi olması durumunda X-STR, tüm fetüs alelleri hamile kadının alelleri ile aynı ise ensest babalık kanıtlanır (Szibor R. 2007b).

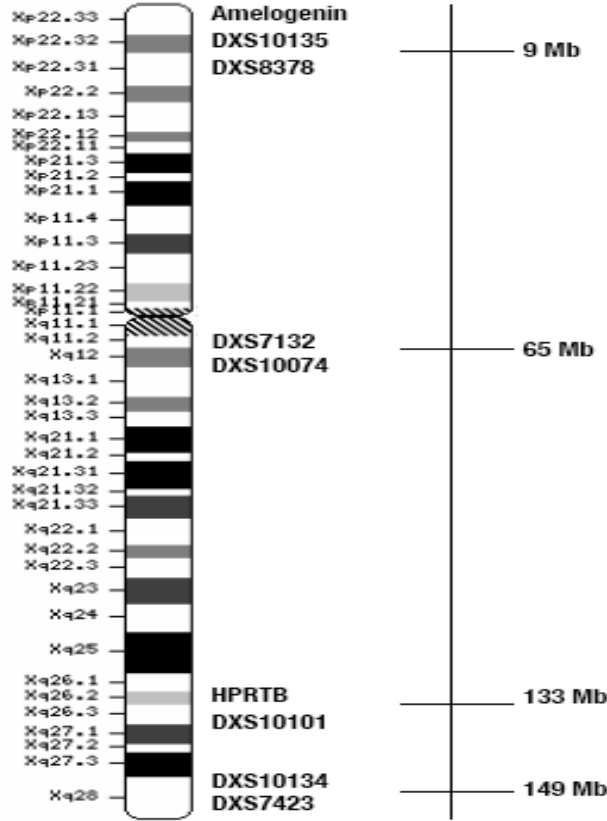
- Anne-çocuk testinin gerekli olduğu bazı durumlar olabilir. Annelik mitokondrial DNA (mtDNA) ile belirlenebilir. Ancak bu her zaman için kesin değildir. Örneğin mtDNA dizileri sadece kendi çocukları ile değil anne soyundaki yeğenler, kuzenler, teyzelerde de aynıdır. Ayrıca bu yöntemin zor ve pahalı oluşu yanında her toplumda henüz yeterli genetik popülasyon verisi olmaması gibi kısıtlayıcı nedenler de bulunmaktadır. Anne-oğul ikilisinde, çocuktaki X kromozomu maternal kaynaklı olduğundan, otozomal STR'lar ile X-STR'ların birlikte çalışılması anneliğin belirtimini kuvvetlendirecektir (Aşıcıoğlu F. 2007).
- Anneleri farklı veya aynı iki kız çocuğunun, aynı babadan olup olmadığının araştırılması ise yine babadan kalıtılan X kromozomun STR analizi ile bu tür babalık davalarında dahil etme olasılığını artacaktır (Ruivo D. 2008).
- Baba adayının ölmesi ya da bulunamaması durumlarda çocuğun kız olması koşulu ile babaanne-kız çocuk arasında X-STR analizleri ile babalık davaları çözümlenebilir. Şöyle ki çocuğun X kromozomlarından biri babasından gelmektedir ve babasının X kromozomu da onun annesinden gelmektedir. Sonuç olarak kız çocuktaki baba kaynaklı X kromozomu mutlaka babaannenin X kromozomlarından biri olacaktır (Aşıcıoğlu F. 2006).



Şekil 7. Babaanne ile kız torun arasındaki X kromozomu kalıtımının şematik gösterimi

4.2.4. Tez Çalışmasında İncelenen X-STR Lokusları

Bu tez çalışmasında kullanılan X kromozomuna özgü DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135, HPRTB lokusları ile cinsiyet belirlemek için Amelogenin lokusu çalışılmıştır.



Şekil 8. Tez konusu X-STR lokuslarının X Kromozomu üzerindeki yerleşimi ve p-telomerden uzaklığı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human> 2009).

4.2.4.1. Amelogenin

Amelogenin hem X hem de Y kromozomda bulunmaktadır. Bu nedenle amelogenin tayini cinsiyetin saptanmasında kullanılmaktadır. X ve Y kromozomlarında homolog olarak bulunan amelogenin geninin ürünü, gelişmekte olan diş minesinin temel bileşenlerini oluşturur. Diş minesindeki proteinlerin %90'ını oluşturur. Amelogenin bir STR lokusu değildir. Elektroforezde 212 bp'lik X kromozomuna özgü ve 218 bp'lik Y kromozomuna özgü bant gösterir. Yani X kromozomu amelogenin lokusunun birinci intronu, Y kromozomuna göre 6 bp'lik bir delesyonu vardır (Yıldız K. 2003).

Tablo 2. Amelogenin lokusuna ait bilgiler

Lokus	Gen bankası ulaşım numarası	Kromozomal yerleşimi
Amelogenin X	M55418	Xp22.1–22.3
Amelogenin Y	M55419	Yp11.2

4.2.4.2. DXS8378 STR Lokusu**Tablo 3.** DXS8378 STR lokusuna ait bilgiler

Lokus	Primer	Alel	Tekrar ünitesi	Kromozomal yerleşimi	Gen bankası ulaşım no
DXS8378	5'-TGATTAGGAATATCAAAGGCAAA- 3' 5'-CTTCTCTGGTTCTCTAGCTCACAT- 3'	(8–15)	[CTAT]	Xp22.31	G08098

DXS8378 STR lokusunun tekrar ünitesi CTAT olup tekrarlarla bağlı olarak uzunluğu 154,3–178,7 bç arasında değişmektedir. Alel sayısı (8–15) 8'dir. Ancak nadir olarak 7 (Aler M. ve ark. 2007) ve 17.ci alellere de rastlanmaktadır (Becker D. ve ark. 2007).

4.2.4.3. HPRTB (Human Fosforibozil Transferaz)**Tablo 4.** HPRTB STR lokusuna ait bilgiler

Lokus	Primer	Alel	Tekrar ünitesi	Kromozomal yerleşimi	Gen bankası ulaşım no
HPRTB	5'-AACTTTTTCTCTGTATGTAGTCGATT- 3' 5'-CTACATCAAAGTGAAAAGCCAT- 3'	(8–17)	[CTAT]	Xq26.2	M26434

HPRTB STR lokusunun tekrar ünitesi CTAT'dır ve tekrarlarla bağlı olarak uzunluğu 189.4–221.8 bç arasında değişmektedir. Alel sayısı (8–17) 10'dur. Ancak literatürde 6–7 (Edwards A. ve ark. 1991) ve 18–19.cu alellere de rastlanmaktadır (Zarrabeitia M.T. 2004).

4.2.4.4. DXS7423 STR Lokusu

Tablo 5. DXS7423 STR lokusuna ait bilgiler

Lokus	Primer	Alel	Tekrar ünitesi	Kromozomal yerleşimi	Gen bankası ulaşım no
DXS7423	5'-TGATGGGGGGGATAACGTTTC- 3' 5'-TGCTGAGGGGTAGATGGG-3'	(12-18)	[TCCA] ₃ TCTGTCCT [TCCA] _x	Xq28	AC109994

DXS7423 STR lokusunun tekrar ünitesi [TCCA]₃ TCTGTCCT [TCCA]_x'tir ve tekrarlarla bağlı olarak uzunluğu 232.7-253.5 bp arasında değişmektedir. Alel sayısı (12-18) 7'dir ancak literatürde 10 (Pereira R. ve ark. 2007), 19.cu alellere de rastlanmaktadır (Aler M. ve ark. 2007, Zalan A. ve ark. 2007).

4.2.4.5. DXS7132 STR Lokusu

Tablo 6. DXS7132 STR lokusuna ait bilgiler

Lokus	Primer	Alel	Tekrar Ünitesi	Kromozomal Yerleşimi	Gen Bankası Ulaşım No
DXS7132	5'-TGATTAGGAATATCAAAGGCAAA- 3' 5'-CTTCTCTGGTCTCTAGCTCACAT- 3'	(11-17)	[TCTA]	Xq11.2	G08111

DXS7132 STR lokusunun tekrar ünitesi TCTA'dır ve tekrarlarla bağlı olarak uzunluğu 281.3-305.5 bp arasında değişmektedir. Alel sayısı (11-17) 7'dir. Ancak literatürde 6 (Zalan A. ve ark. 2007) 8 (Chen M.Y. ve ark., 2004) 9 (Aler M. ve ark. 2007) 10 (Shin S.H. ve ark. 2005) 18 (Chen M.Y. ve ark. 2004, Shin S.H. ve ark. 2005, Becker D. ve ark. 2007) ve 19.cu (Chen M.Y. ve ark. 2004, Zalan A. ve ark. 2007) alellere de rastlanmaktadır.

4.2.4.6. DXS10134 STR Lokusu

Tablo 7. DXS10134 STR lokusuna ait bilgiler

Lokus	Primer	Alel	Tekrar Ünitesi	Kromozomal Yerleşimi	Gen Bankası Ulaşım No
DXS10134	5'-CAACATAGTGAGATCCCACCTTTAC -3' 5'-TAATATTCTATTGTATGGGCATGCTG -3'	(29-44,3)	[GAAA] ₃ GAGA [GAAA] ₄ AA [GAAA] GAGA [GAAA] ₄ GAGA [GACAGA] ₃ [GAAA] GTAA [GAAA] ₃ AAA [GAAA] ₄ AAA [GAAA] _x	Xq28	AL034384

DXS10134 STR lokusunun tekrar ünitesi [GAAA]₃GAGA [GAAA]₄AA[GAAA]GAGA[GAAA]₄ GAGA[GACAGA]₃ [GAAA] GTAA[GAAA]₃ AAA [GAAA]₄AAA[GAAA]_x ve tekrarlara bağlı olarak uzunluğu 330.1-383.6 bp arasında değişmektedir. Alel sayısı (29-44.3) 30'dur.

4.2.4.7. DXS10074 STR Lokusu

Tablo 8. DXS10074 STR lokusuna ait bilgiler

Lokus	Primer	Alel	Tekrar Ünitesi	Kromozomal Yerleşimi	Gen Bankası Ulaşım No
DXS10074	5'-TTATTATTTTGCCCTACCTCTCTGAGC -3' 5'-ATTTTCTCTCTGTCTTAGCTCCATA -3'	(4-21)	[AAGA]	Xq12	AL356358

DXS10074 STR lokusunun tekrar ünitesi [AAGA] ve tekrarlara bağlı olarak uzunluğu 97.5-167.6 bp arasında değişmektedir. Alel sayısı (4-21) 20'dir.

4.2.4.8. DXS10101 STR Lokusu

Tablo 9. DXS10101 STR lokusuna ait bilgiler

Lokus	Primer	Alel	Tekrar Ünitesi	Kromozomal Yerleşimi	Gen Bankası Ulaşım No
DXS10101	5'-TGTTTCAAATAATATGGGAGTTGG -3' 5'-TCTTTAATCTCTCACAGCCCCTAC -3'	(24.2–35)	[AAAG] ₃ GAAAGAAG [GAAA] ₃ A [GAAA] ₄ AAGA [AAAG] ₅ AAAAAGAA [AAAG] _x	Xq26.2	AC004383

DXS10101 STR lokusunun tekrar ünitesi [AAGA] ve tekrarlara bağlı olarak uzunluğu 189.9–223.3 bç arasında değişmektedir. Alel sayısı (24.2–35) 22'dir.

4.2.4.9. DXS10135 STR Lokusu

Tablo 10. DXS10135 STR lokusuna ait bilgiler

Lokus	Primer	Alel	Tekrar Ünitesi	Kromozomal Yerleşimi	Gen Bankası Ulaşım No
DXS10135	5'-TATTTTAAATAGAGACGGGGTTTCTC -3' 5'-GAGACCGAAAATGGTACTGAGG -3'	(14.1–36.2)	[AAGA] ₃ GAAAG [GAAA] _x	Xp22.31	AC003684

DXS10135 STR lokusunun tekrar ünitesi [AAGA]₃ GAAAG [GAAA]_x ve tekrarlara bağlı olarak uzunluğu 242.4-316.1 bç arasında değişmektedir. Alel sayısı (14.1–36.2) 33'dür. Ancak literatürde 13.cu (Becker D. ve ark. 2007) alele de rastlanmaktadır.

4.2.5. X-STR'ların İstatistiksel Hesaplamaları

Polimorfik bir kalıtsal özelliğin (gen) farklı tipleri biliniyorsa ve bu söz konusu tiplerden her birini taşıyan kişilerin sayısı ile populasyonun sayısı, o özelliğin her bir tipinin sıklığını verir. Bir biyolojik örnekten elde edilen DNA profili şüphelininki ile birebir

uyuşuyorsa, iki örneğin aynı kaynaktan geldiği düşünülür. Fakat iki farklı kişi aynı DNA profiline tesadüfen de olsa sahip olabilir. Bu rastlantısal eşleşme oranını belirleyebilmek için biyolojik delilden elde edilen profilin popülasyondaki sıklığını bilmek gerekir (Evet I.W. 1996). Bu sıklıklar popülasyonlar arasında farklılık gösterir. Bu farklılık birbirine yakın olan popülasyonlarda uzak olanlara oranla daha azdır (Beardmore J.A. 1983).

DNA profillemesinde kullanılan STR lokuslarının alel frekanslarının hesaplanması için toplumu temsil eden ve birbiri ile akrabalık ilişkisi bulunmayan rastgele seçilmiş en az 100 bireyin DNA tiplenişi yapılır. Alel frekansını hesaplamak içinse frekansı hesaplanacak alel sayısı toplam alel sayısına bölünür. Herhangi bir DNA profilinin sıklığı, DNA profilinde belirlenmiş olan aleller ile popülasyon veri tabanındaki sıklık değerlerinin yardımı ile hesaplanır (Goodwin W. 2007).

İki biyolojik örnek ile şüphelinin DNA özellikleri birbirini tutmadığında, yani bir dışlama gözlemlendiğinde herhangi bir teknik hata yapılmadığı, ya da örnekler karıştırılmadığı takdirde sorun çözülmüş ve şüphelinin sanılan kişi olmadığı kesin olarak söylenmiş olur. Buna karşılık incelenen örnekle karşılaştırılan arasında bir uyum görülmesi, DNA molekülünün tamamının baz dizini incelenmeyip sadece belirli bölgelerin özelliklerinin karşılaştırılmasını içerdiğinden, rastlantısal benzerliğin istatistiksel olarak hesaplanmasını gerekli kılar.

Bir popülasyondan seçilen rastgele iki kişinin bir lokus için aynı genotipi taşıma olasılığı, kimliklendirme gücü (power of identity, PI) ve tersine ise dışlama gücü (power of discrimination, PD) denir. Bu ikisi arasındaki matematiksel bağlantı ise

$$PD=1-PI$$

şeklinde ifade edilir. Kimliklendirme gücünün hesaplanması ise aşağıdaki formülle yapılır.

$$PI= \sum x_i^2$$

(x_i = söz konusu lokustaki genotip kombinasyonlarının frekansdır) (The Evaluation of Forensic DNA Evidence 1996).

Olay yerinden elde edilen DNA örneğinin şüpheli haricinde popülasyondan herhangi birine ait olma olasılığı hesaplanmak istendiğinde, o kişinin popülasyonun rastgele bir üyesi olduğu varsayılır ve DNA profilinin, popülasyonda bulunma sıklığına bakılarak hesap yapılır. Bu sıklık rastgele uyuşma olasılığı (Matching Probability, MP) olarak ifade edilir. Olasılık

oranı (Likelihood Ratio, LR) ise inceleme konusu örneğin DNA'sı ile mukayese DNA'nın aynı şahsa ait olması olasılığının, inceleme konusu örneğin DNA'sı ile mukayese DNA'nın iki farklı şahıstan gelmesi olasılığına oranıdır (Butler J.M. 2005).

İki gen sıklığı arasındaki anlamlılık testi (Z değeri);

$$Z = \frac{P1 - P2}{\sqrt{\frac{P1(1-P1)}{N} + \frac{P2(1-P2)}{N}}}$$

P1 = Birinci alelin gen sıklığı

P2 = İkinci alelin gen sıklığı

X kromozomuna özgü istatistiksel hesaplamalar farklı zamanlarda farklı araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. Polimorfik bilgi içeriği (PIC) hesaplama formülü Botstein ve arkadaşları tarafından 1980 yılında yayınlanmıştır. Hem otozomal markırlar hem X kromozomu markırları için kullanılabilen beklenen heterozigotluk (HET) değeri formülü 1974 yılında Nei ve Roychoudhury adlı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. 1968'de Krüger'in formüle ettiği Ortalama Dışlama Gücü (MEC) otozomal markırlar ve anne, baba ve çocuk üçlüsü için uygundu ancak babanın olmadığı eksik davalarda uygun değildi. Burada babanın eksikliğinin babaannenin X kromozomu markırları çalışılarak giderilebileceğinin görülmesi ile Kishida ve arkadaşları 1997 yılında MEC formülünü geliştirdiler. Kız çocuğunu da içeren üçlü (anne, baba ve çocuk) çalışmalarda, MEC Krüger değeri MEC Kishida ile karşılaştırıldığında X-STR'larda otozomal STR'lardan daha etkin olduğu görülmüştür. Son olarak X kromozomu ile ilgili istatistiksel hesaplamaları 1998'de Desmarais ve arkadaşları yayınlamıştır.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 - 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n f_i^2 f_j^2$$

$$HET = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{j=1}^K f_j^2 \right)$$

$$MEC_{Krüger} = \sum_i f_i^3 (1 - f_i)^2 + \sum_i f_i (1 - f_i)^3 + \sum_{i < j} f_i f_j (f_i + f_j) (1 - f_i - f_j)^2$$

$$MEC_{Kishida} = \sum_i f_i^3 (1 - f_i) + \sum_i f_i (1 - f_i)^2 + \sum_{i < j} f_i f_j (f_i + f_j) (1 - f_i - f_j)$$

$$MEC_{Desmarais} = 1 - \sum_i f_i^2 + \sum_i f_i^4 - (\sum_{i < j} f_i^2 f_j^2)$$

$$MEC_{Desmarais Duo} = 1 - 2 \sum_i f_i^2 + \sum_i f_i^3$$

$$PD_{female} = 1 - 2(\sum_i f_i^2)^2 + \sum_i f_i^4$$

$$PD_{male} = 1 - \sum_i f_i^2$$

PIC; Polimorfik bilgi içeriği (Polymorphism Information Content)

HET; Beklenen heterozigotluk (Expected Heterozygosity)

MEC; Ortalama Dışlama Gücü (Mean Exclusion Chance)

PD; Ayrım Gücü (Power of Discrimination)

f; alel frekansı

MEC (Kishida) anne, kız çocuk, şüpheli baba üçlüsü

MEC (Krüger) anne, kız çocuk, babaanne üçlüsü

MEC (Desmarais) anne, kız çocuk, şüpheli baba üçlüsü

MEC (Desmarais Duo) kız çocuk, şüpheli baba ikilisi veya şüpheli anne, erkek çocuk

(R. Szibor 2003, Mentype® Argus X-8 PCR Amplification Kit Kılavuz Kitabı)

III. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma için İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'ne babalık belirlenmesi nedeni ile başvuran kişiler, İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü yüksek lisans, doktora ve yaz dönemi stajyer öğrencilerden çalışmaya gönüllü katılmayı kabul eden sağlıklı ve aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan, Türkiye'nin bütün bölgelerini temsil edecek şekilde 55 erkek ve 75 kadından toplam 130 kişiden alınan taze kan örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca babaanne, baba, kız torun ve anneden oluşan bir aile ile baba, anne ve kız çocuktan oluşan 5 aile çalışılarak X-STR'ların babalık belirtimindeki etkinliği gösterilmeye çalışılmıştır. Kan örnekleri 5 mL'lik EDTA'lı tüplere alınmıştır.

Kanı alınan kişiler, çalışmanın amacı ve yöntemi hakkında bilgilendirilmiş, ayrıca yeterince bilgilendirildikleri ve kendi iradeleriyle bu çalışmaya katıldıklarını gösteren onam formu kişiler tarafından imzalanmıştır. Onam formu örneği ekte sunulmaktadır.

Bu çalışma İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma 3 aşamada gerçekleştirildi.

1. Mentype® Argus X-8 PCR Amplifikasyon Kiti'nin bu laboratuvar için optimizasyon çalışması yapıldı.
2. Aile çalışması yapılarak kitin ve dolayısıyla DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135 ve HPRTB lokuslarının akrabalık ilişkilerinin belirlenmesindeki etkinliği saptandı.
3. Söz konusu lokusların genel Türkiye toplumundaki alel sıklıkları belirlendi.

Kan örneklerinden ilk aşamada DNA izolasyonu yapıldı. Bunun için Chelex® 100 ve QIAamp®DNA Mini Kit ile iki farklı DNA izolasyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntemlerin hangisinin amplifikasyon (PCR, Polymerase Chain Reaction) için uygun olduğu belirlendi. DNA miktar tayini florometrik yöntemle yapıldı. DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135, HPRTB ve Amelogenin lokuslarının amplifikasyonu için, Mentype® Argus X-8 PCR Amplifikasyon Kiti kullanıldı. Başlangıç DNA miktarı değiştirilerek optimum DNA miktarı belirlendi. PCR toplam hacmi kitin kullanım kılavuzu önerilerine göre yapıldı. Daha sonra toplam hacim belli oranlarda azaltılarak PCR gerçekleştirildi. Kadın ve erkeğe ait DNA örnekleri ile karışım oluşturularak karışık örneklerdeki ayırım belirlenmeye çalışıldı. PCR ürünlerinin genetik analizöre yükleme

miktarı kitin kullanım kılavuzunda belirtilenle birlikte farklı yükleme miktarları denenerak optimize edildi. Mentype® Argus X–8 PCR Amplifikasyon Kiti'nin optimizasyonu yapıldıktan sonra 130 kişide 8 X-STR lokusunun tiplmesi yapılarak genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları tespit edildi.

1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Tablo 11. Kimyasal malzemeler

Kimyasal Malzeme	Markası	Kullanıldığı Aşama
Chelex ® 100	Sigma	DNA İzolasyonu
QIAamp®DNA Mini Kit	Qiagen	DNA İzolasyonu
Mentype® Argus X–8 PCR Amplifikasyon Kit(100)	Biotype	PCR Aşaması
Hi-Di Formamid	Applied Biosystems	Elektroforez Aşaması
Matriks Standard (DS–30) (6-FAM, HEX, NED, ROX)	Applied Biosystems	Elektroforez Aşaması
POP4	Applied Biosystems	Elektroforez Aşaması
10X EDTA tamponu	Applied Biosystems	Elektroforez Aşaması
Quant-it dsDNA HS	Invitrogen	Tek zinc. DNA Miktar Tayini
Quant-it ssDNA	Invitrogen	Çift zinc. DNA Miktar Tayini

Mentype® Argus X-8 PCR Amplifikasyon Kit (100 reaksiyon) içeriği:

Nuklease-free Water	3.0 mL
Reaksiyon Miks A (Mg, dNTP Mix, BSA)	500 µL
Primer Miks	250 µL
Kontrol DNA XY1	(2 ng/µL) 10 µL
Kontrol DNA XX74	(2 ng/µL) 10 µL
DNA Size Standard 550 (ROX)	50 µL
Alelik Ladder	10 µL
Taq DNA Polimeraz (hot start)	40 µL

2. Kullanılan Gereçler ve Cihazlar**Tablo 12.** Cihazlar ve Gereçler

Cihaz ve Gereç	Markası
Otomatik Pipet (2,5 µl) (20 µl) (100 µl) (1000µl)	Eppendorf
Vorteks (Karıştırıcı)	Nejat Çoşkuner
Etüv	Nüve EN 500
Mikrosantrifüj	Heraus Biofuge
Termomikser (Isıtıcı, Karıştırıcı)	İncekaralar
Buzdolabı ve Derin Dondurucu	Arçelik
Isı Döngü Cihazı, (GeneAmp PCR System 9700)	Applied Biosystems
Kapiller Elektroforez (ABI Prism 310 Genetic Analyzer)	Applied Biosystems
Florometre cihazı (Qubit)	Invitrogen

3. Kandan DNA İzolasyonu

3.1 Chelex® 100 DNA İzolasyon Yöntemi

Chelex reçinesi bakır, demir ve diğer ağır metallere çok güçlü bağlanma yeteneğine sahip bir maddedir. Hücrenin zarını parçalar ve DNA dışındaki hemen hemen bütün maddeleri kendine bağlar.

1. İçinde 1 ml steril deiyonize su bulunan mikrosantrifüj tüpüne 40 µl'lik EDTA'lı kan örneği eklenir.
2. Yavaşça karıştırılarak 30 dakika oda ısısında inkübe edilir.
3. 3 dakika 15000 rpm'de santrifüj edilir.
4. Tüpte 20–30µl kalacak şekilde üst faz atılır.
5. Son hacmi 200 µl olacak şekilde % 5 Chelex® 100 çözeltisi eklenir.
6. 20–30 dakika 56° C'de inkübe edilir.
7. 5–10 saniye yüksek hızda vortekslenir.
8. 8 dakika 100°C'de kaynatılır.
9. 5–10 saniye yüksek hızda vortekslenir.
10. 3 dakika 15000 rpm'de santrifüj edilir.

DNA izolatları 2–8 °C'de muhafaza edilir.

3.2 QIAamp®DNA Mini Kit ile DNA İzolasyonu

1. 200 µl'lik EDTA'lı kan 1,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpüne konulur. 20 µl proteinaz K ve 200µl AL tamponu eklenir ve 15 saniye vortekslenir.
2. 56°C'de 10 dakika inkübe edilir.
3. 200 µl %96-100'lük etanol eklenir. 15 saniye vortekslenir.
4. QIAamp® mini spin kolonu 2ml toplama tüpüne yerleştirilir ve 3. adımda elde edilen karışım kolona aktarılır. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Filtratı içeren tüp atılır.
5. Kolona 500 µl AW1 eklenir. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Filtratı içeren tüp atılır.
6. Kolona 500 µl AW2 eklenir. 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir. Filtratı içeren tüp atılır.
7. Kolon boş olarak 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.

8. QIAamp® mini spin kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir. 200 µl AE tamponu eklenir. Oda ısısında 1–2 dakika inkübe edilir. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.

4. DNA Miktar Tayini

4.1. DNA İzolatlarının Florometre ile Miktarlarının Ölçülmesi

DNA miktarları Qubit Florometre (Invitrogen) cihazında, QIAamp®DNA Mini Kit ile yapılan DNA izolasyonu için Quant-it dsDNA HS (High Sensitive) kiti, Chelex® 100 ile yapılan izolasyon için ise Quant-it ssDNA kiti kullanıldı. Floresans teknolojisine dayalı cihaz ile DNA miktarları 260 nm dalga boyunda, aşağıdaki adımlar izlenerek ölçülmüştür.

1. Her bir örnek için 199 µl kit tamponu ve 1 µl kit reaktif (reagent) ile karışımı hazırlandı.
2. Cihazın kalibrasyonu için her ölçümde Standart 1 ve Standart 2 kontrolleri kullanıldı. Bunun için cihaza özgü tüpe 200 µl'lik tampon-reagent karışımından 190 µl kondu ve üzerine 10 µl standart eklendi.
3. Örnekler için, cihaza özgü tüpe 200 µl'lik tampon-reagent karışımından 199 µl kondu ve üzerine 1 µl DNA izolatı eklendi. Tüpler birkaç saniye vortekslendi.
4. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
5. Standart 1 ve Standart 2 sırasıyla okutularak kalibrasyon yapıldı.
6. Örnek tüpleri cihaza yerleştirilerek okuma yapıldı.
7. DNA miktarları cihazda otomatik olarak hesaplandı.

5. DNA Amplifikasyonu

DNA izolatları Mentepe® Argus X-8 PCR Amplifikasyon Kiti kullanılarak DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135, HPRTB ve Amelogenin lokuslarının multipleks (çoklu) amplifikasyonu yapıldı. Bunun için aşağıdaki protokol izlendi.

Her bir örnek için PCR karışımının hazırlanması:

Nuclease-free Water	14,1 µl
Reaksiyon Miks A	5,0 µl
Primer Miks	2,5 µl
Taq DNA Polimeraz (hot start, 2.5 U/µL)	0,4 µl
DNA örneği	3,0 µl
<hr/>	
Toplam	25,0 µl

Tablo 13. PCR Programı

Sıcaklık Değeri	Bekleme Süresi	Döngü Sayısı	Uygulanan İşlem
94° C	4 dk.	1	Başlangıç denatürasyonu
94° C	30 sn.	30	Denatürasyon
58° C	120 sn.		Primer Bağlanması
72° C	75 sn.		Zincir Uzaması
68° C	60 dk.	1	Son uzama
10° C	∞		Bekletme

6. Elektroforez

PCR ürünlerinin elektroforezi, ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer cihazında gerçekleştirildi. Örnekler Gene Scan programında analiz edilebilmesi için cihaza DS 30 (Applied Biosystems) adı verilen ve dört floresans boya içeren (6-FAM, HEX, NED, ROX) matriks standardı yüklendi. Mavi renk veren 6-FAM, amelogenin, DXS8378, HPRTB, DXS7423, DXS7132 ve DXS10134 lokuslarını, yeşil renk veren HEX ise DXS1007, DXS10101 ve DXS10135 lokuslarının görünürleştirilmesinde kullanılmıştır. Kırmızı renk veren ROX ise internal size kontroldür.

6.1. ABI 310 Genetik Analizör'ün Elektroforeze Hazırlanması

PCR ürünlerini kapiller elektroforeze yüklemeyen önce Data Collection Software 3.0 (Applied Biosystems) kullanılarak örnek listeleri GeneScan D parametrelerine göre Tablo 14 'deki koşullar sağlanarak hazırlandı. Matrix Standards Set DS-30 kit (Applied Biosystems) yüklenerek yürütmeler bu standart ile yapıldı. 36 cm kapiller, POP 4 polimer ve DNA Size Standard 550 (ROX) internal size standart kullanıldı.

Tablo 14. Elektroforez koşulları, GeneScan D modül parametreleri

Modül	Inj.Süresi (sn)	Inj. kV	Yürütme kV	Yürütme Sıcaklığı °C	Yürütme Zamanı (dk)	Matriks	Size Standard
GS STR POP4 (1µL) D	5	5	15.0	60	28	DS30- 160109	GS400HD

6.2. PCR Ürünlerinin Elektroforez için Hazırlanması ve ABI 310 Genetik Analizör

Cihazına Yüklmesi

1. Örnek sayısı X 12 µl Hi-Di Formamid + 0,5 µl DNA Size Standard 550 (ROX) kullanılarak karışım elde edildi.
2. PCR ürünü için her tüpe, 1. maddede hazırlanan karışımdan 12 µl konularak üzerine 1 µl PCR ürünü eklendi.
3. Alelik ladder tüpü için 1. maddede hazırlanan karışımdan 12 µl ve 1 µl alelik ladder eklendi.
4. Örnekler önce 5 dk. 95 °C'de denatüre edildi ve daha sonra 5 dk. buzda bekletilerek cihaza yüklendi.

6.3. Elektroforegramların Değerlendirilmesi

Sonuçlar GeneScan Analysis software 3.1.2 (Applied Biosystems) kullanılarak analiz edildi. Kapiller elektroforezde yürütülen PCR ürünleri ve örnekler, alelik ladder ile üst üste karşılaştırılarak değerlendirildi.

7. Verilerin İstatistiksel Analizi

Lokuslara ait alel sıklıkları, POPGENE Version 1.32 programı ile hesaplandı. PIC, MEC, HET, PD değerleri adli kromozom X araştırma grubu (The Forensic ChrX Research Group) tarafından geliştirilen web sitesinde bulunan programla, alel sıklıkları girilerek otomatik olarak hesaplandı (www.chrx-str.org).

8. Mentype® Argus X-8 PCR Amplifikasyon Kiti'nin Optimizasyon Çalışmaları

8.1. DNA İzolasyon Yöntem Tayini

Chelex ®100 ve QIAamp®DNA Mini Kit izolasyon yöntemleri kullanılarak hangi yöntemin kit için uygun olduğu belirlendi.

8.2. Optimum DNA Miktar Tayini

Farklı DNA miktarları içeren 10 tane Chelex ®100 ve 10 tane QIAamp®DNA Mini Kit ile izole edilen DNA örnekleri (0.0025 ng/µl, 0.005 ng/µl, 0.015 ng/µl, 0.025 ng/µl, 0.05 ng/µl, 0.1 ng/µl, 0.25 ng/µl, 0.5 ng/µl, 1 ng/µl, 2 ng/µl) kullanılarak PCR için optimum DNA miktarı belirlenmeye çalışıldı.

8.3. PCR Toplam Hacminin Azaltılması

PCR reaksiyon miktarları orantısal olarak azaltılarak, optimum miktarlar belirlenmeye çalışıldı.

Nuclease-free Water	7,1 µl	3,6 µl
Reaksiyon Miks A	2,5 µl	1,25 µl
Primer Miks	1,25 µl	0,625 µl
Taq DNA Polimeraz (hot start, 2.5 U/µL)	0,2 µl	0,1 µl
DNA örneği	1,5 µl	1 µl
<hr/>		
Toplam	12,55 µl	6,675 µl

8.4. Karışık Örneklerde Kitin Ayrım Gücünün Belirlenmesi

Kadın ve erkeğe ait DNA izolatları belli oranlarda (1:1, 1:2, 1:5) karıştırılarak PCR yapıldı. PCR ürünleri ABI 310 Genetik Analizör’de yürütüldü.

8.5. PCR Ürünün Elektroforez İçin Optimum Miktarının Belirlenmesi

1. Örnek sayısı X 8 µl Hi-Di Formamid + 0,2 µl DNA Size Standard 550 (ROX) kullanılarak karışım elde edildi.
2. Örnek için her tüpe, 1. maddede hazırlanan karışımdan 8 µl ve 0,8 µl PCR ürünü eklendi. Alelik ladder için 1. maddede hazırlanan karışımdan 8 µl ve 0,4 µl alelik ladder eklendi.
3. Örnekler 5 dk. 95 °C’de denatüre edildi ve daha sonra 5 dk. buzda bekletilerek cihaza yüklendi.

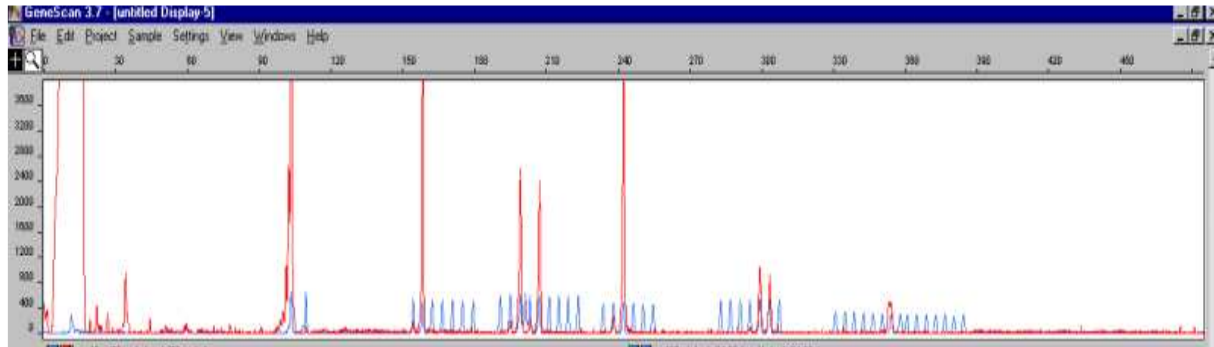
IV. BULGULAR

Bu tez çalışmasında Mentype® Argus X-8 PCR Amplifikasyon Kiti kullanarak 8 STR lokusunun (DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135 ve HPRTB) İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda optimizasyonu yapıldı. Daha sonra 130 kişide genel Türkiye toplumu ile ilgili alel sıklıkları belirlendi. Ayrıca 6 aile çalışılarak X-STR'ların babalık belirlemedeki etkinliği gösterildi.

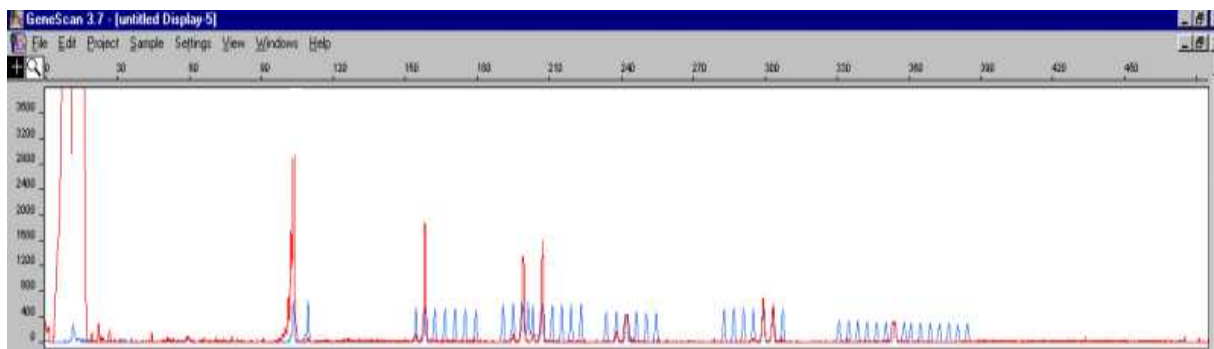
1. Mentype® Argus X-8 PCR Amplifikasyon Kiti'nin Optimizasyon Çalışması

1.1. DNA İzolasyon Yöntemlerine Göre Karşılaştırma

Bunun için ilk aşamada her iki DNA izolasyon yöntemi (Chelex® 100 ve QIAamp®DNA Mini Kit) denenerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. İzolatlar kitin kullanma kılavuzunda belirtilen PCR ve elektroforez koşullarına bağlı kalınarak çalışılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Her iki DNA izolasyon yönteminin amplifikasyon kiti için uygun olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Şekil 9 ve 10'da Chelex 100 ve QIAamp®DNA Mini Kit ile izole edilen iki örneğe ait elektroforegram görülmektedir.



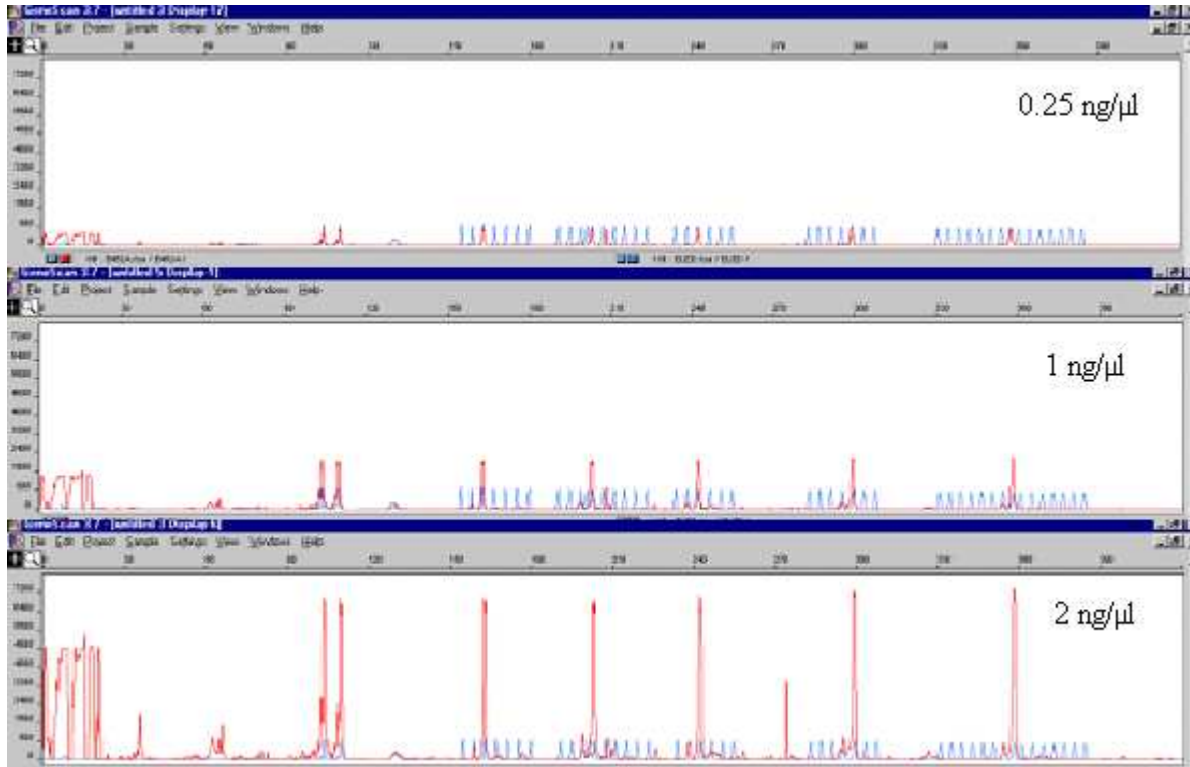
Şekil 9. Chelex® 100 izolasyon yöntemiyle elde edilen elektroforegram



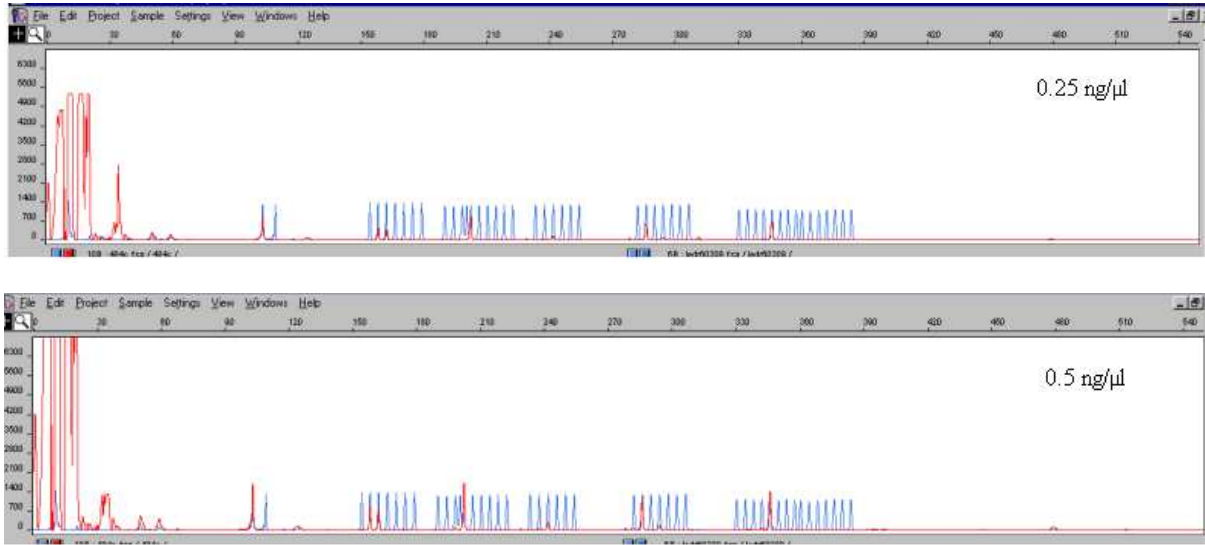
Şekil 10. QIAamp®DNA Mini Kit ile elde edilen elektroforegram

1.2. DNA Miktarlarına Göre Yapılan Hassasiyet Çalışması

PCR için optimum DNA miktarı, Chelex 100 ve QIAamp®DNA Mini kit ile her bir yöntem için 10 farklı DNA izolasyon miktarı (0.0025 ng/μl, 0.005 ng/μl, 0.015 ng/μl, 0.025 ng/μl, 0.05 ng/μl, 0.1 ng/μl, 0.25 ng/μl, 0.5 ng/μl, 1 ng/μl, 2 ng/μl) ile yapılan çalışmalarla belirlendi. Her iki izolasyon yönteminde de 0.25 ng/μl altındaki DNA miktarlarıyla yapılan PCR'da ya tüm lokuslarda ya da bir kaç lokusta çoğalma sağlanamamıştır. 2 ng/μl DNA miktarıyla yapılan çalışmada ise istenmeyen fazladan pikler gözlemlendi. En iyi sonuç 1 ng/μl olan DNA miktarıyla elde edildi. (Şekil 11).



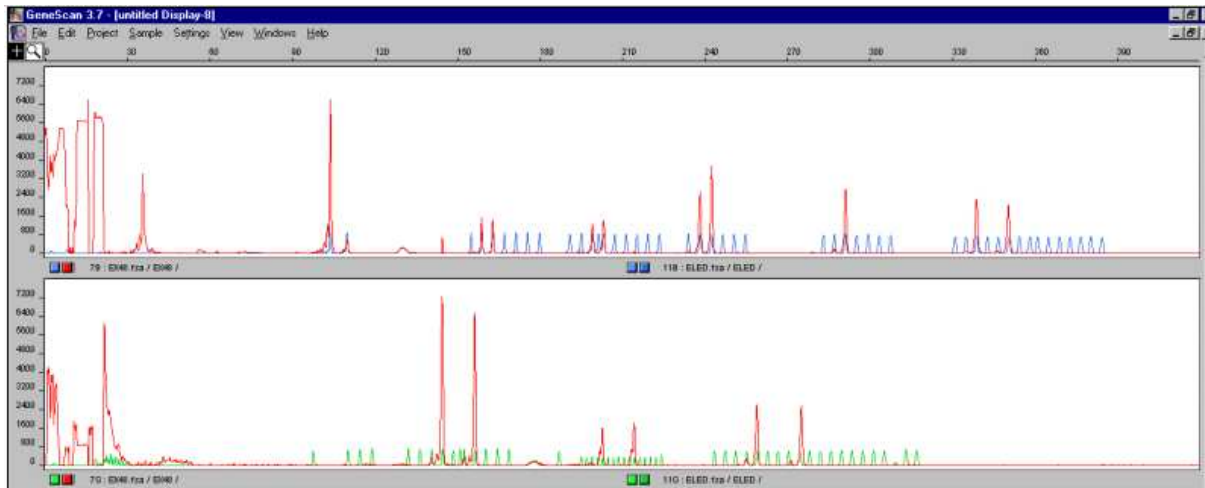
Şekil 11. Chelex 100 için yapılan hassasiyet çalışmasına ait elektroforegram (0.25 ng/μl, 1 ng/μl ve 2 ng/μl).



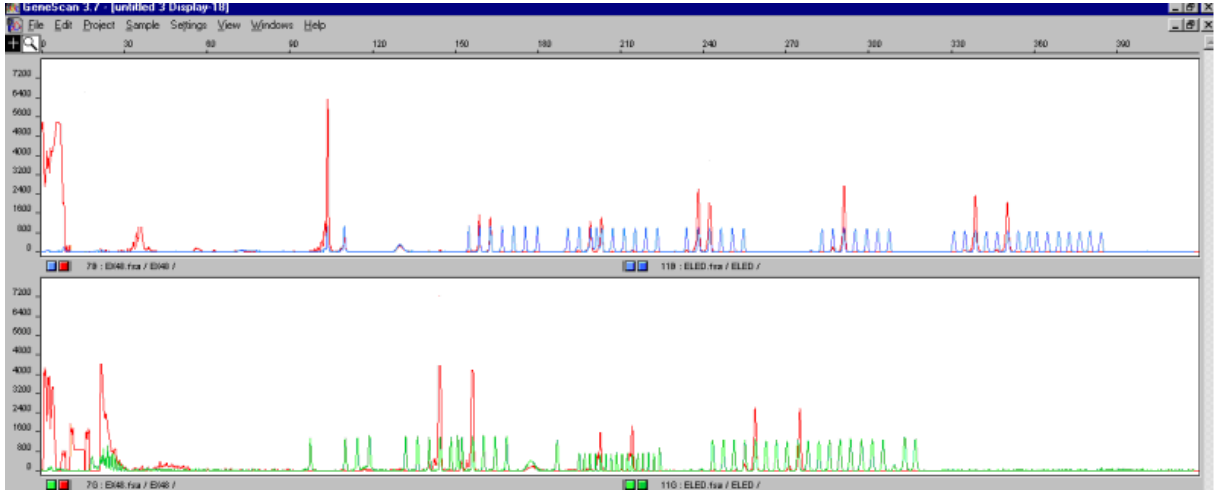
Şekil 12. QIAamp®DNA Mini kit için yapılan hassasiyet çalışmasına ait elektroforegram (0.25 ng/μl, 0.5 ng/μl)

1.3. PCR'in Toplam Hacmine Göre Karşılaştırma

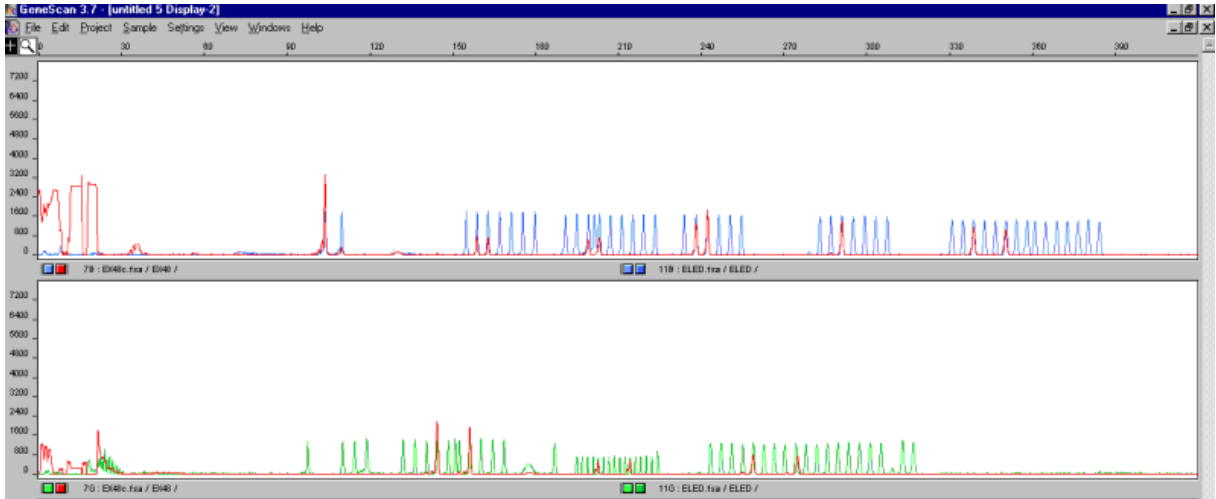
Bu aşamada Mentype® Argus X-8 PCR Amplifikasyon Kitinin PCR reaktiflerin miktarları değiştirilerek toplam PCR hacminin azaltılması amaçlanmıştır. PCR ürünlerinin kapiller elektroforeze yüklenme miktarı, kitin önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda PCR hacminin % 75 azaltılmasıyla dahi anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 13, 14 ve 15).



Şekil 13. Kitin önerdiği PCR miktarı (25 μl) ile elde edilen PCR ürününe ait elektroforegram.



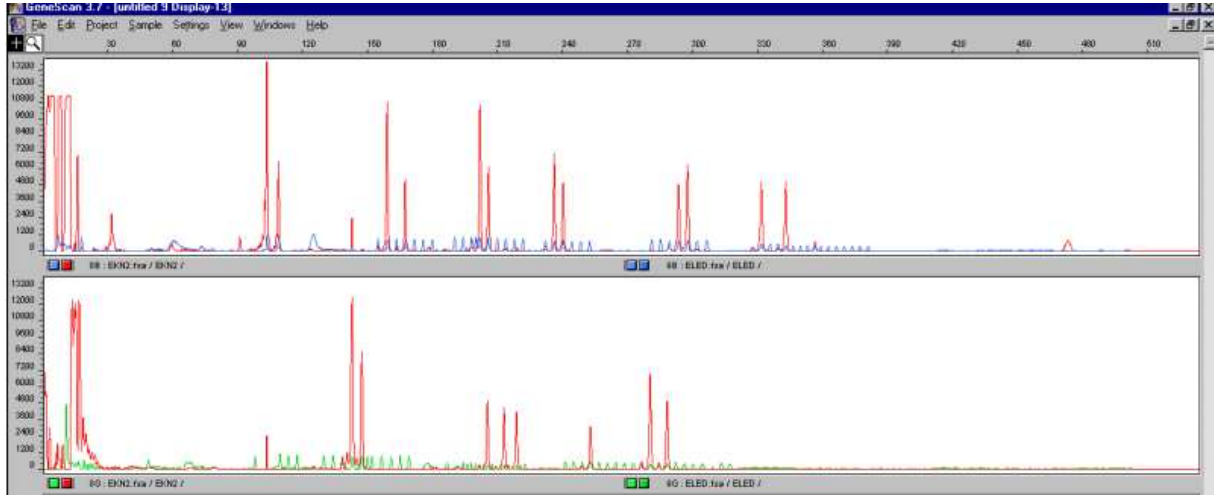
Şekil 14. PCR miktarının % 50 azaltılması (12.55 μ l) ile yapılan bir yürütmeye ait elektroforegram.



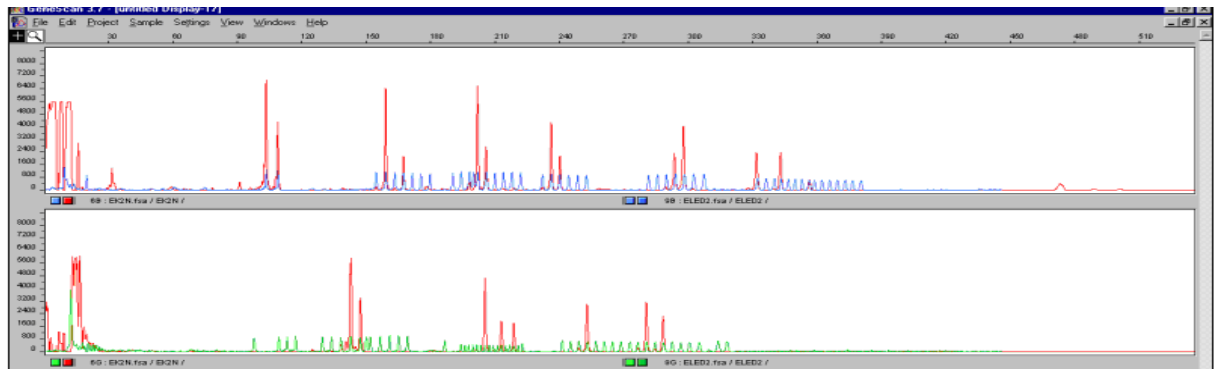
Şekil 15. PCR miktarının % 75 azaltılması (6.675 μ l) ile yapılan bir yürütmeye ait elektroforegram.

1.4. Karışık Örneklerde Mentype® Argus X-STR Kitinin Ayrım Gücünün Belirlenmesi

X-STR profilleri bilinen kadın ve erkeğe ait DNA izolatları belli oranlarda (1:1, 1:2 ve 1:5) karıştırılarak PCR yapıldı. Kadın ve erkeğe ait örnek karışımlarında en iyi sonuçlar 1:1 ve 1:2 oranlarda elde edilirken, 1:5 oranında iyi bir ayırım yapılamamıştır (şekil 16 ve 17).



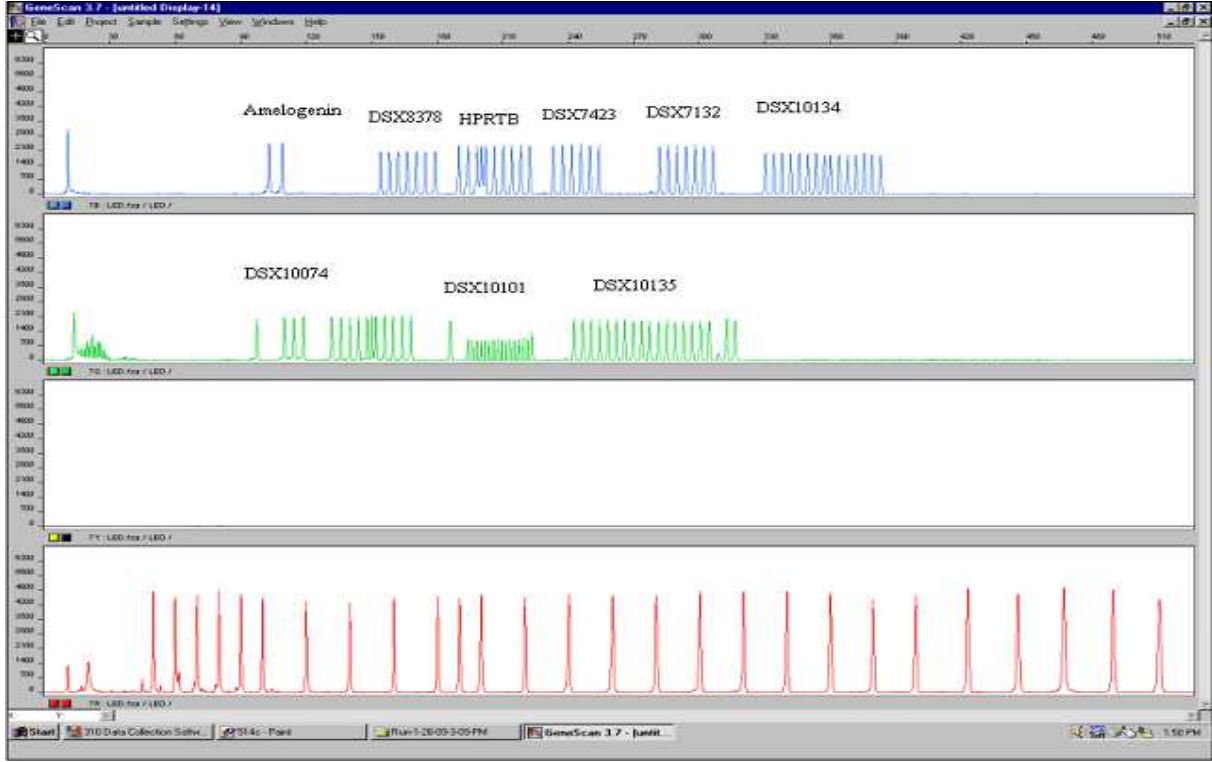
Şekil 16. 1:1 oranında kadın-erkek karışımına ait elektroforegram



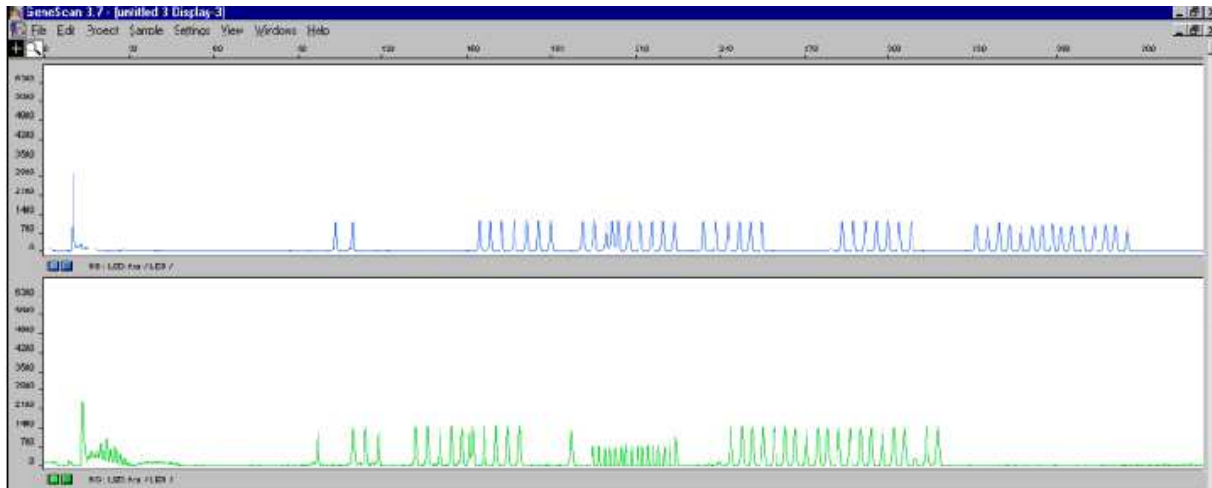
Şekil 17. 1:5 oranında kadın-erkek karışımına ait elektroforegram

1.5. Elektroferez Yükleme Miktarına Göre Karşılaştırma

Yapılan çalışmada PCR ürünlerinin ve alelik ladderın azaltılması yürütme sonucunu belirgin bir şekilde değiştirmedeği saptanmıştır (Şekil 18 ve 19).



Şekil 18. Kitin önerdiği miktara göre yürütülen alelik ladderla ait elektroferezgram



Şekil 19. 0.4 µl yükleme miktarına göre yürütülen alelik ladder

2. DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135, HPRTB Lokuslarına Ait Genel Türkiye Toplumuna Ait Veriler

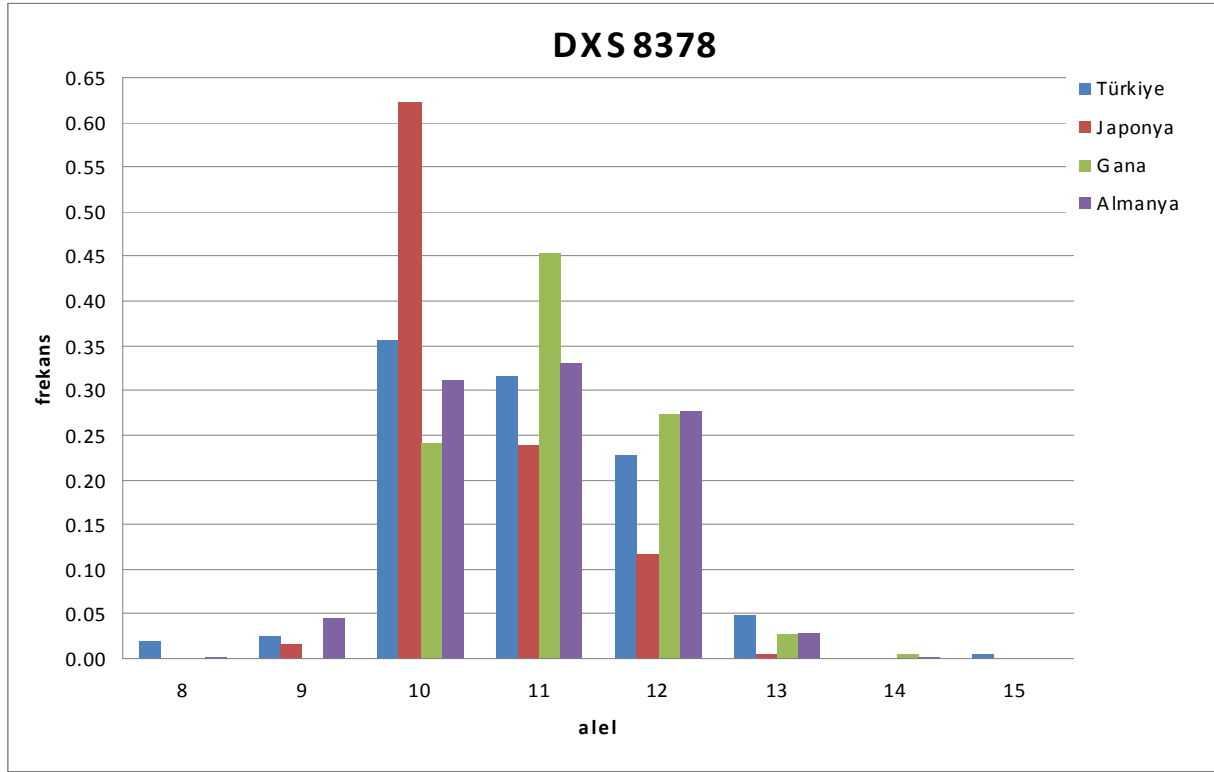
DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135 ve HPRTB lokusları 130 kişide genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları belirlendi Ancak bazı lokuslarda bir kaç kişiden sonuç alınmamıştır. Bunlar ilgili lokusun alel sıklığı tablosunda belirtilmiştir. Alel sıklıkları değişik ırklara ait toplumlara (Avrupa-Almanya, Asya-Japonya, Afrika-Gana) karşılaştırıldı. Irklar arasında büyük farklılıklar gözlenirken Alman toplumuyla yakın benzerlikler bulunmaktadır (grafik 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8). Bu çalışmada yer alan 8 lokustan sadece HPRTB lokusuna ait Türkiye popülasyonu alel sıklıkları bulunmaktadır. Türkiye popülasyonu alel sıklıkları karşılaştırılması yalnızca bu lokusta yapılmıştır.

2.1 DXS8378 Lokusuna Ait Bulgular

Genel Türkiye toplumunda DXS8378 lokusu için toplam 7 alel gözlenmiştir. En fazla görülen alel 10. aleldir. En az görülen alel ise 15. aleldir. 14. alel ise çalışmamızda gözlenmemiştir.

Tablo 15. DXS8378 lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

DXS8378	Erkek (n=55)	Kadın (n=74)	Toplam (n=129)
Alel	Sıklık	Sıklık	Sıklık
8	0.0000	0.0274	0.0198
9	0.0357	0.0205	0.0248
10	0.4107	0.3356	0.3564
11	0.3214	0.3151	0.3168
12	0.1964	0.2397	0.2277
13	0.0179	0.0616	0.0495
14	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.0179	0.0000	0.0050
PIC	0.666262	MEC Krüger	0.468376
Het	0.717287	MEC Kishida	0.666262
PE	0.455508	MEC Desmarais	0.666262
PI	0.141356	MEC Desmarais Duo	0.523589
PD _f	0.869049		
PD _m	0.717287		



Alel	8	9	10	11.0	12	13	14	15
Türkiye	0.0198	0.0248	0.3564	0.3168	0.2277	0.0495	0.0000	0.0050
Japonya	0.0000	0.0160	0.6220	0.2390	0.1180	0.0050	0.0000	0.0000
Gana	0.0000	0.0000	0.2407	0.4537	0.2731	0.0278	0.0046	0.0000
Almanya	0.0020	0.0460	0.3120	0.3320	0.2770	0.0290	0.0020	0.0000

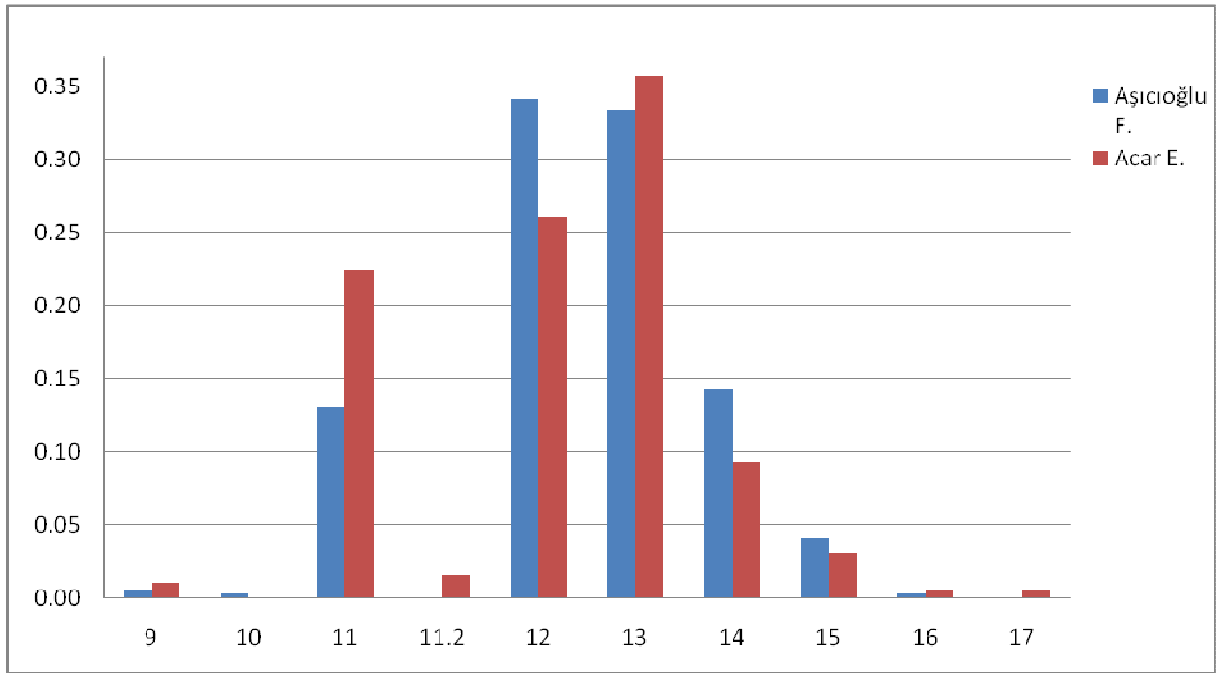
Grafik 1. Genel Türkiye toplumu DXS8378 STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluluklarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

2.2. HPRTB Lokusuna Ait Bulgular

Genel Türkiye toplumunda HPRTB lokusu için toplam 9 alel gözlenmiştir. En fazla görülen alel 13 no'lu aleldir. En az görülen aleller 16 ve 17 no'lu aleldir. 10. alel ise çalışmamızda görülmemiştir.

Tablo 16. HPRTB lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

HPRTB	Erkek (n=54)	Kadın (n=71)	Toplam (n=125)
Alel	Sıklık	Sıklık	Sıklık
9	0.0000	0.0141	0.0102
10	0.0000	0.0000	0.0000
11	0.2037	0.2324	0.2245
11.2	0.0000	0.0211	0.0153
12	0.2963	0.2465	0.2602
13	0.3704	0.3521	0.3571
14	0.0741	0.0986	0.0918
15	0.0556	0.0211	0.0306
16	0.0000	0.0070	0.0051
17	0.0000	0.0070	0.0051
PIC	0.702861	MEC Krüger	0.515827
Het	0.744622	MEC Kishida	0.702743
PE	0.500609	MEC Desmarais	0.702861
PI	0.127689	MEC Desmarais Duo	0.564519
PD _f	0.893021		
PD _m	0.744622		

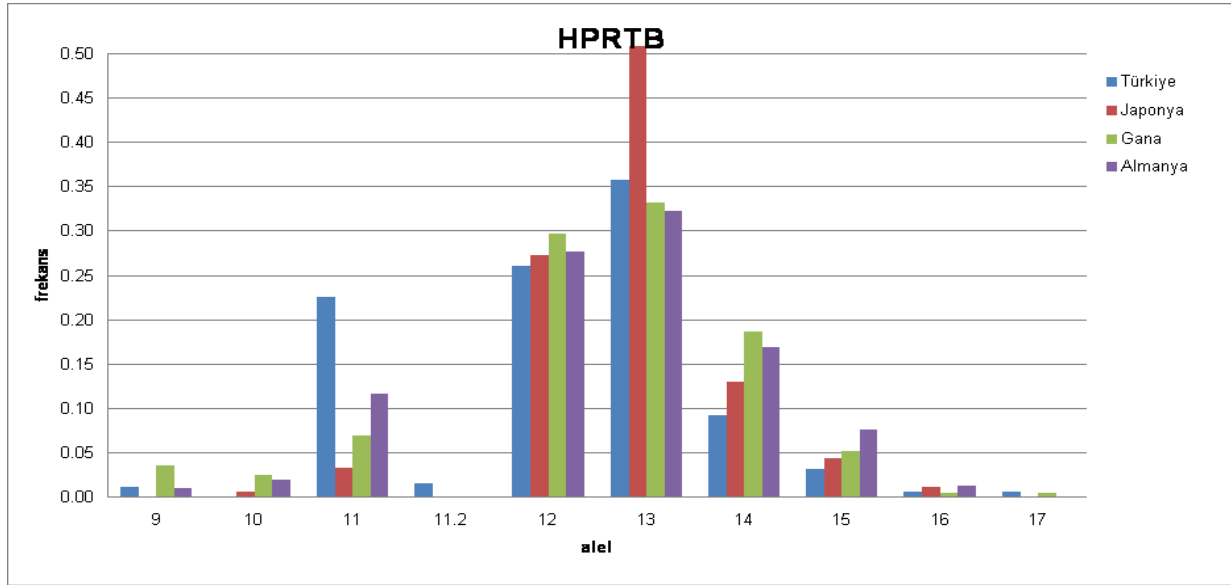


Alel	9	10	11	11,2	12	13	14	15	16	17
Türkiye (Aşıcıoğlu F.) (2006)	0,0051	0,0025	0,1298	-	0,3410	0,3333	0,1425	0,0407	0,0025	-
Türkiye	0,0102	0,0000	0,2245	0,0153	0,2602	0,3571	0,0918	0,0306	0,0051	0,0051

Grafik 2. HPRTB STR lokusunun çalışmamızda elde edilen alel sıklıkları ile diğer Türkiye (Aşıcıoğlu F.) popülasyonu çalışmasının karşılaştırılması.

Alel	9	11	12	13	14	15	16
Türkiye	0,0034	1,4465	-1,2787	0,1133	-0,4287	-0,0239	0,0009

Tablo 17. HPRTB lokusu alel sıklıklarının Türkiye (Aşıcıoğlu F.) popülasyonu ile karşılaştırılması (Z değerleri).



Alel	9	10	11	11.2	12	13	14	15	16	17
Türkiye	0.0102	0.0000	0.2245	0.0153	0.2602	0.3571	0.0918	0.0306	0.0051	0.0051
Japonya	0.0000	0.0050	0.032	0.0000	0.272	0.508	0.129	0.043	0.011	0.0000
Gana	0.0345	0.0241	0.069	0.0000	0.2966	0.331	0.1862	0.0517	0.0034	0.0034
Almanya	0.0100	0.0190	0.116	0.0000	0.276	0.322	0.169	0.076	0.012	0.0000

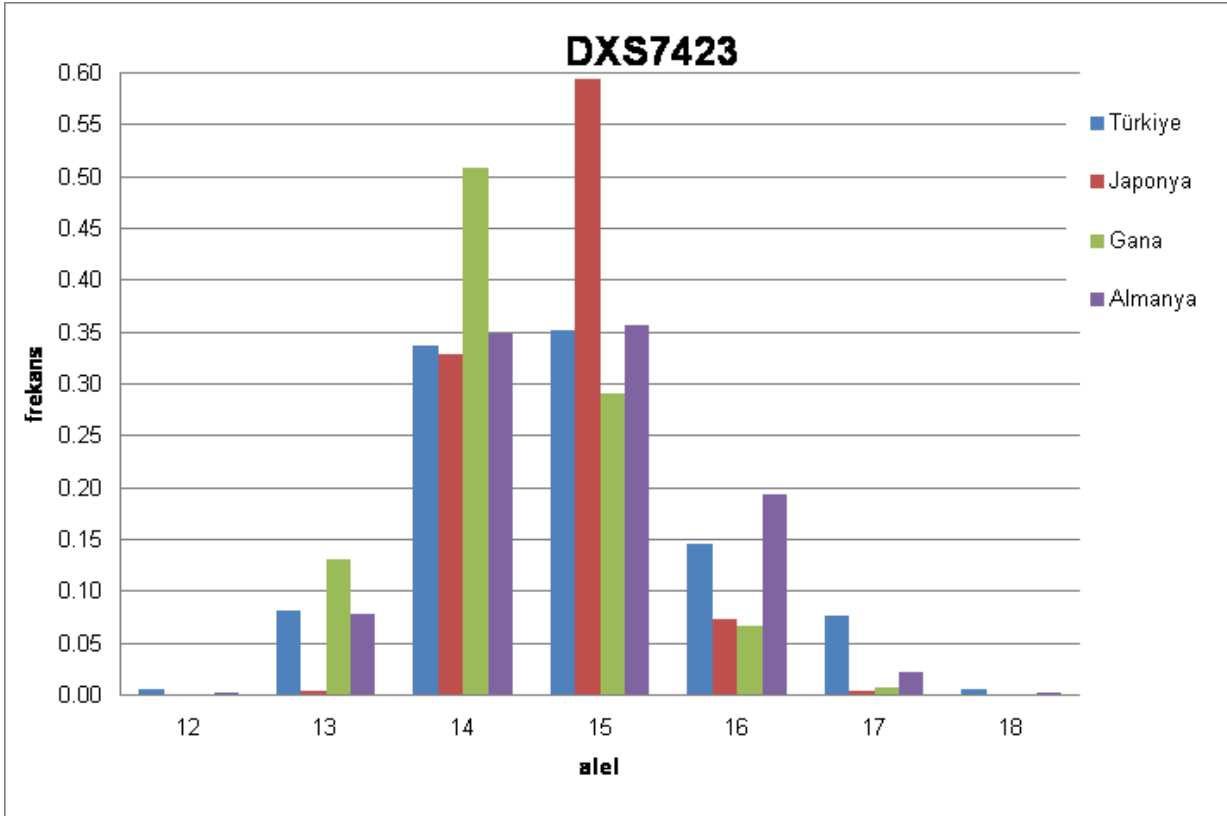
Grafik 3. Genel Türkiye toplumu HPRTB STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluamlarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

2.3. DXS7423 Lokusuna Ait Bulgular

Genel Türkiye toplumunda DXS7423 lokusu için toplam 7 alel gözlenmiştir. En fazla görülen aleller 14 ve 15. alellerdir. En az görülen alel 12 ve 18. alellerdir.

Tablo 18. DXS7423 lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

DXS7423	Erkek (n=55)	Kadın (n=72)	Toplam (n=127)
Alel	Sıklık	Sıklık	Sıklık
12	0.0000	0.0069	0.0050
13	0.0364	0.0972	0.0804
14	0.2727	0.3611	0.3367
15	0.4727	0.3056	0.3518
16	0.1636	0.1389	0.1457
17	0.0545	0.0833	0.0754
18	0.0000	0.0069	0.0050
PIC	0.684935	MEC Krüger	0.495862
Het	0.729442	MEC Kishida	0.684935
PE	0.475263	MEC Desmarais	0.684935
PI	0.135279	MEC Desmarais Duo	0.544636
PD _f	0.882291		
PD _m	0.729442		



Alel	12	13	14	15.0	16	17	18
Türkiye	0.0050	0.0804	0.3367	0.3518	0.1457	0.0754	0.0050
Japonya	0.0000	0.0030	0.3280	0.5930	0.0730	0.0030	0.0000
Gana	0.0000	0.1310	0.5069	0.2897	0.0655	0.0069	0.0000
Almanya	0.0020	0.0770	0.3480	0.3560	0.1930	0.0220	0.0020

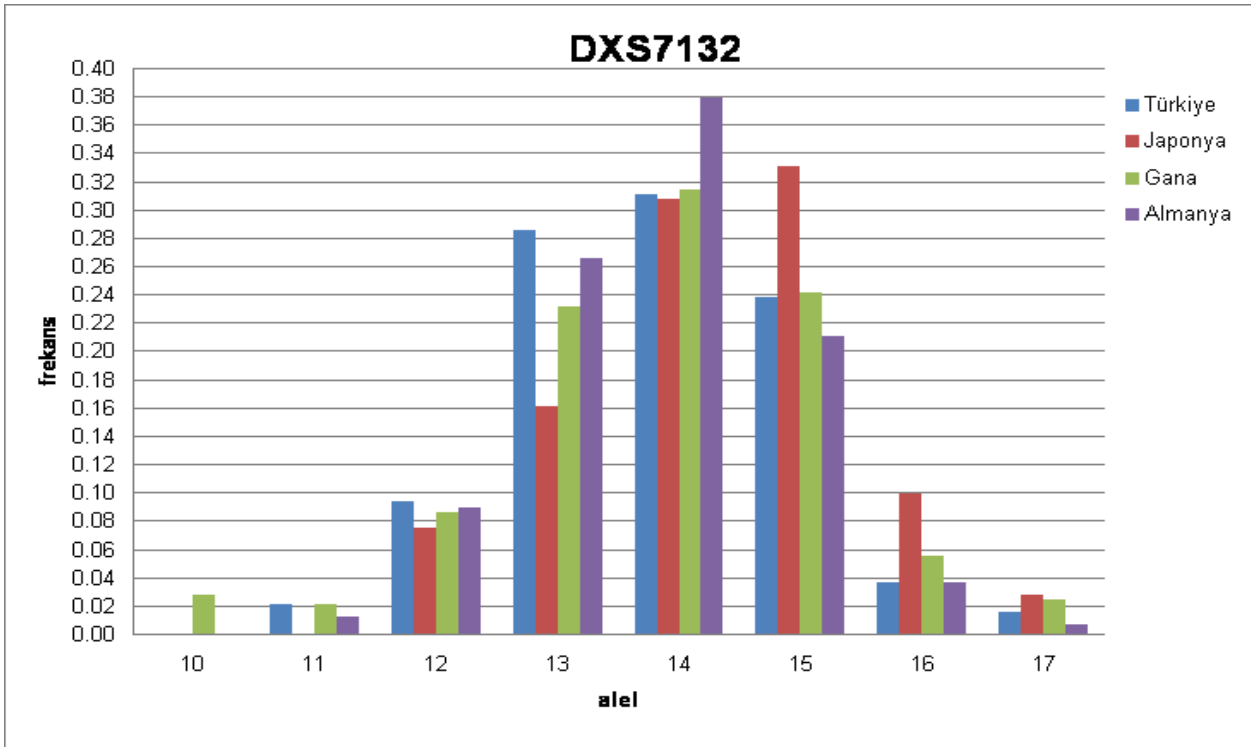
Grafik 4. Genel Türkiye toplumu DXS7423 STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluluklarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

2.4. DXS7132 Lokusuna Ait Bulgular

Genel Türkiye toplumunda DXS7132 lokusu için toplam 7 adet alel gözlenmiştir. En fazla görülen alel 14 no'lu aleldir. En az görülen alel 17. aleldir.

Tablo 19. DXS7132 lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

DXS7132	Erkek (n=55)	Kadın (n=69)	Toplam (n=124)
Alel	Sıklık	Sıklık	Sıklık
11	0.0364	0.0145	0.0207
12	0.0909	0.0942	0.0933
13	0.2545	0.2971	0.2850
14	0.3455	0.2971	0.3109
15	0.2364	0.2391	0.2383
16	0.0182	0.0435	0.0363
17	0.0182	0.0145	0.0155
PIC	0.713678	MEC Krüger	0.528044
Het	0.754638	MEC Kishida	0.713678
PE	0.517734	MEC Desmarais	0.713678
PI	0.122681	MEC Desmarais Duo	0.576881
PD _f	0.898838		
PD _m	0.754638		



Alel	10	11	12	13	14	15	16	17
Türkiye	0.0000	0.0207	0.0933	0.285	0.3109	0.2383	0.0363	0.0155
Japonya	0.0000	0.0000	0.075	0.161	0.307	0.331	0.099	0.027
Gana	0.0276	0.0207	0.0862	0.231	0.3138	0.2414	0.0552	0.0241
Almanya	0.0000	0.012	0.089	0.266	0.379	0.211	0.036	0.007

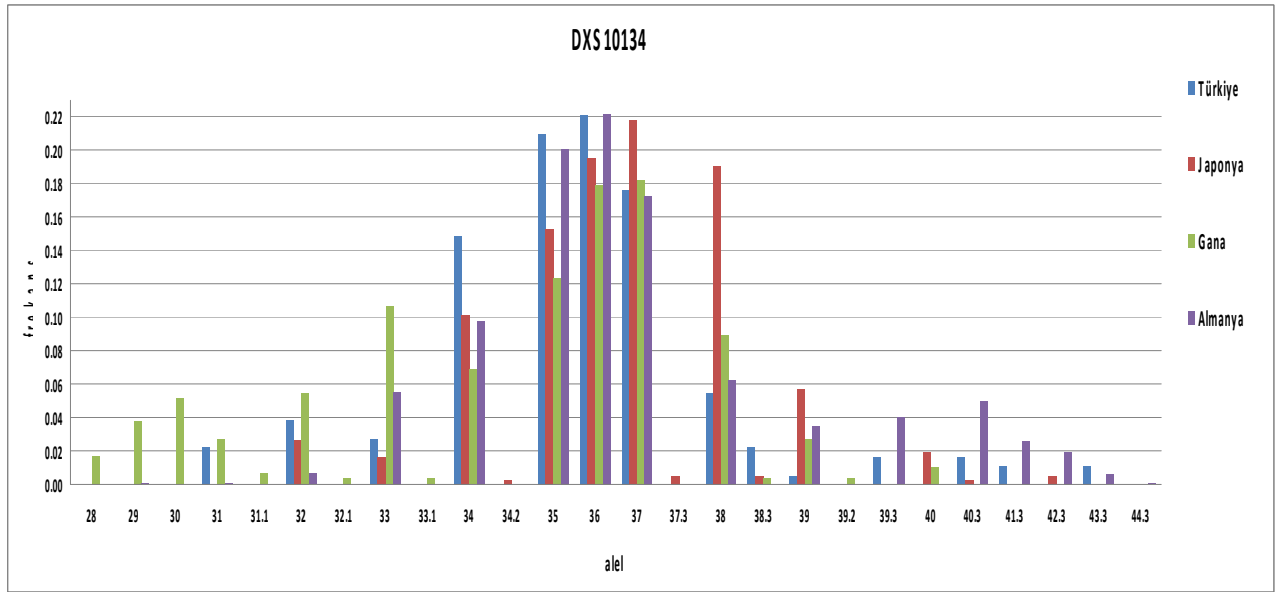
Grafik 5. Genel Türkiye toplumu DXS7132 STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluamlarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

2.5. DXS10134 Lokusuna Ait Bulgular

Genel Türkiye toplumunda DXS10134 lokusu için toplam 14 alel gözlenmiştir. En fazla görülen aleller 35 ve 36. alellerdir. En az görülen alel 39. aleldir. 42.3 ve 44.3 no'lu aleller ise çalışmamızda gözlenmemiştir.

Tablo 20. DXS10134 lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

DXS10134	Erkek (n=55)	Kadın (n=63)	Toplam (n=118)
Alel	Sıklık	Sıklık	Sıklık
31	0.0000	0.0317	0.0221
32	0.0182	0.0476	0.0387
33	0.0364	0.0238	0.0276
34	0.2000	0.1270	0.1492
35	0.2000	0.2143	0.2099
36	0.2545	0.2063	0.2210
37	0.1091	0.2063	0.1768
38	0.0909	0.0397	0.0552
38.3	0.0364	0.0159	0.0221
39	0.0000	0.0079	0.0055
39.3	0.0000	0.0238	0.0166
40.3	0.0364	0.0079	0.0166
41.3	0.0000	0.0159	0.0110
42.3	0.0000	0.0000	0.0000
43.3	0.0182	0.0079	0.0110
44.3	0.0000	0.0000	0.0000
PIC	0.828718	MEC Krüger	0.678108
Het	0.846475	MEC Kishida	0.809941
PE	0.687930	MEC Desmarais	0.828718
PI	0.076762	MEC Desmarais Duo	0.722121
PD _f	0.958672		
PD _m	0.846475		



Alel	Almanya	Gana	Japonya	Türkiye
28	0.000	0.0172	0.000	0.0000
29	0.001	0.0379	0.000	0.0000
30	0.000	0.0517	0.000	0.0000
31	0.001	0.0276	0.000	0.0221
31.1	0.000	0.0069	0.000	0.0000
32	0.007	0.0552	0.027	0.0387
32.1	0.000	0.0034	0.000	0.0000
33	0.056	0.1069	0.016	0.0276
33.1	0.000	0.0034	0.000	0.0000
34	0.098	0.0690	0.102	0.1492
34.2	0.000	0.0000	0.003	0.0000
35	0.201	0.1241	0.153	0.2099
36	0.222	0.1793	0.196	0.2210
37	0.173	0.1828	0.218	0.1768
37.3	0.000	0.0000	0.005	0.0000
38	0.062	0.0897	0.191	0.0552
38.3	0.000	0.0034	0.005	0.0221
39	0.035	0.0276	0.057	0.0055
39.2	0.000	0.0034	0.000	0.0000
39.3	0.040	0.0000	0.000	0.0166
40	0.000	0.0103	0.019	0.0000
40.3	0.050	0.0000	0.003	0.0166
41.3	0.026	0.0000	0.000	0.0110
42.3	0.019	0.0000	0.005	0.0000
43.3	0.006	0.0000	0.000	0.0110
44.3	0.001	0.0000	0.000	0.0000

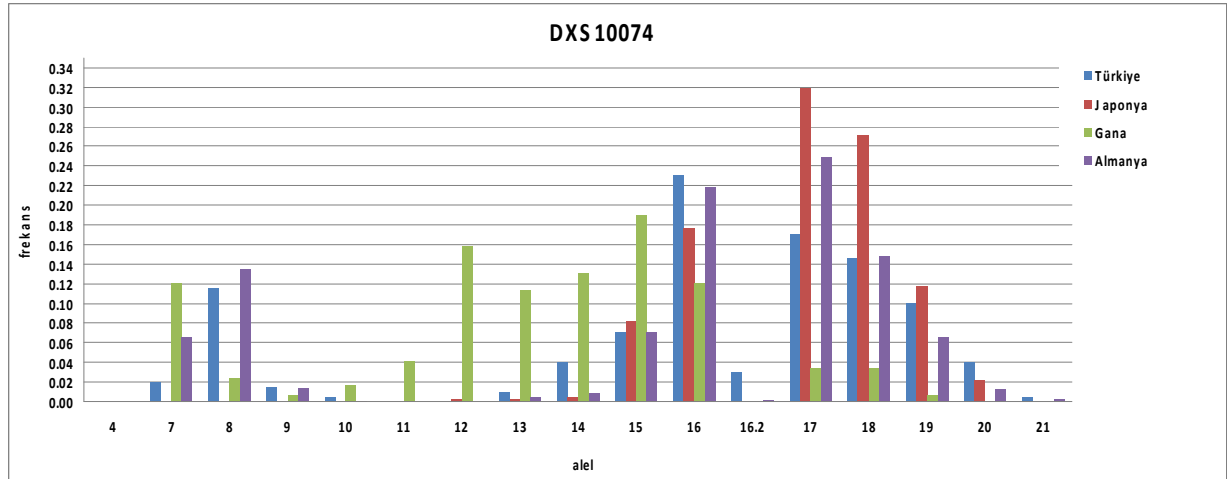
Grafik 6. Genel Türkiye toplumu DXS10134 STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluluklarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

2.6. DXS10074 Lokusuna Ait Bulgular

Genel Türkiye toplumunda DXS10074 lokusu için toplam 14 alel gözlenmiştir. En fazla görülen aleller 16 ve 17 no'lu, az görülen aleller ise 10 ve 21 no'lu alellerdir. 4, 11 ve 12. aleller ise çalışmamızda gözlenmemiştir.

Tablo 21. DXS10074 lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

DXS10074	Erkek (n=55)	Kadın (n=72)	Toplam (n=127)
Alel	Sıklık	Sıklık	Sıklık
4	0.0000	0.0000	0.0000
7	0.0364	0.0139	0.0201
8	0.1636	0.0972	0.1156
9	0.0182	0.0139	0.0151
10	0.0000	0.0069	0.0050
11	0.0000	0.0000	0.0000
12	0.0000	0.0000	0.0000
13	0.0364	0.0000	0.0101
14	0.0182	0.0486	0.0402
15	0.0364	0.0833	0.0704
16	0.2182	0.2361	0.2312
16.2	0.0182	0.0347	0.0302
17	0.1273	0.1875	0.1709
18	0.1455	0.1458	0.1457
19	0.1455	0.0833	0.1005
20	0.0182	0.0486	0.0402
21	0.0182	0.0000	0.0050
PIC	0.848473	MEC Krüger	0.727206
Het	0.862820	MEC Kishida	0.848250
PE	0.720282	MEC Desmarais	0.848473
PI	0.068590	MEC Desmarais Duo	0.749155
PD _f	0.966835		
PD _m	0.862820		



Alel	Almanya	Gana	Japonya	Türkiye
4	0.000	0.0000	0.000	0.0000
7	0.066	0.1207	0.000	0.0201
8	0.135	0.0241	0.000	0.1156
9	0.014	0.0069	0.000	0.0151
10	0.001	0.0172	0.000	0.0050
11	0.000	0.0414	0.000	0.0000
12	0.000	0.1586	0.003	0.0000
13	0.005	0.1138	0.003	0.0101
14	0.009	0.1310	0.005	0.0402
15	0.070	0.1897	0.081	0.0704
16	0.218	0.1207	0.177	0.2312
16.2	0.002	0.0000	0.000	0.0302
17	0.249	0.0345	0.319	0.1709
18	0.149	0.0345	0.272	0.1457
19	0.065	0.0069	0.118	0.1005
20	0.013	0.0000	0.022	0.0402
21	0.003	0.0000	0.000	0.0050

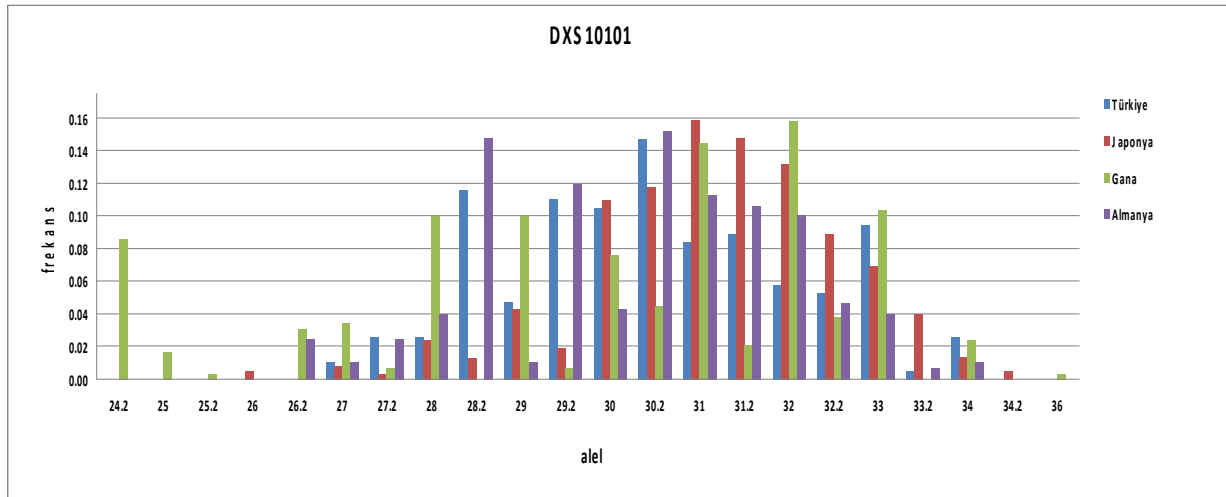
Grafik 7. Genel Türkiye toplumu DXS10074 STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluamlarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

2.7. DXS10101 Lokusuna Ait Bulgular

Genel Türkiye toplumunda DXS10101 lokusu için toplam 15. alel gözlenmiştir. En fazla görülen alel 30.2. aleldir. En az görülen alel 33.2. aleldir. 24.2 ve 26.2 no'lu aleller ise çalışmamızda gözlenmemiştir.

Tablo 22. DXS10101 lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

DXS10101	Erkek (n=52)	Kadın (n=69)	Toplam (n=121)
Alel	Sıklık	Sıklık	Sıklık
24.2	0.0000	0.0000	0.0000
26.2	0.0000	0.0000	0.0000
27	0.0000	0.0145	0.0106
27.2	0.0192	0.0290	0.0263
28	0.0192	0.0290	0.0263
28.2	0.0769	0.1304	0.1158
29	0.0192	0.0580	0.0474
29.2	0.1731	0.0870	0.1105
30	0.0769	0.1159	0.1053
30.2	0.0962	0.1667	0.1474
31	0.0962	0.0797	0.0842
31.2	0.0962	0.0870	0.0895
32	0.0577	0.0580	0.0579
32.2	0.1154	0.0290	0.0526
33	0.1346	0.0797	0.0947
33.2	0.0000	0.0072	0.0052
34	0.0192	0.0290	0.0263
PIC	0.899397	MEC Krüger	0.811089
Het	0.906917	MEC Kishida	0.899397
PE	0.809572	MEC Desmarais	0.899397
PI	0.046542	MEC Desmarais Duo	0.823771
PD _f	0.983815		
PD _m	0.906917		



Alel	Almanya	Gana	Japonya	Türkiye
24.2	0.000	0.0862	0.000	0.0000
25	0.000	0.0172	0.000	0.0000
25.2	0.000	0.0034	0.000	0.0000
26	0.000	0.0000	0.005	0.0000
26.2	0.025	0.0310	0.000	0.0000
27	0.011	0.0345	0.008	0.0106
27.2	0.025	0.0069	0.003	0.0263
28	0.040	0.1000	0.024	0.0263
28.2	0.148	0.0000	0.013	0.1158
29	0.011	0.1000	0.043	0.0474
29.2	0.120	0.0069	0.019	0.1105
30	0.043	0.0759	0.110	0.1053
30.2	0.152	0.0448	0.118	0.1474
31	0.113	0.1448	0.159	0.0842
31.2	0.106	0.0207	0.148	0.0895
32	0.101	0.1586	0.132	0.0579
32.2	0.047	0.0379	0.089	0.0526
33	0.040	0.1034	0.070	0.0947
33.2	0.007	0.0000	0.040	0.0052
34	0.011	0.0241	0.014	0.0263
34.2	0.000	0.0000	0.005	0.0000
36	0.000	0.0034	0.000	0.0000

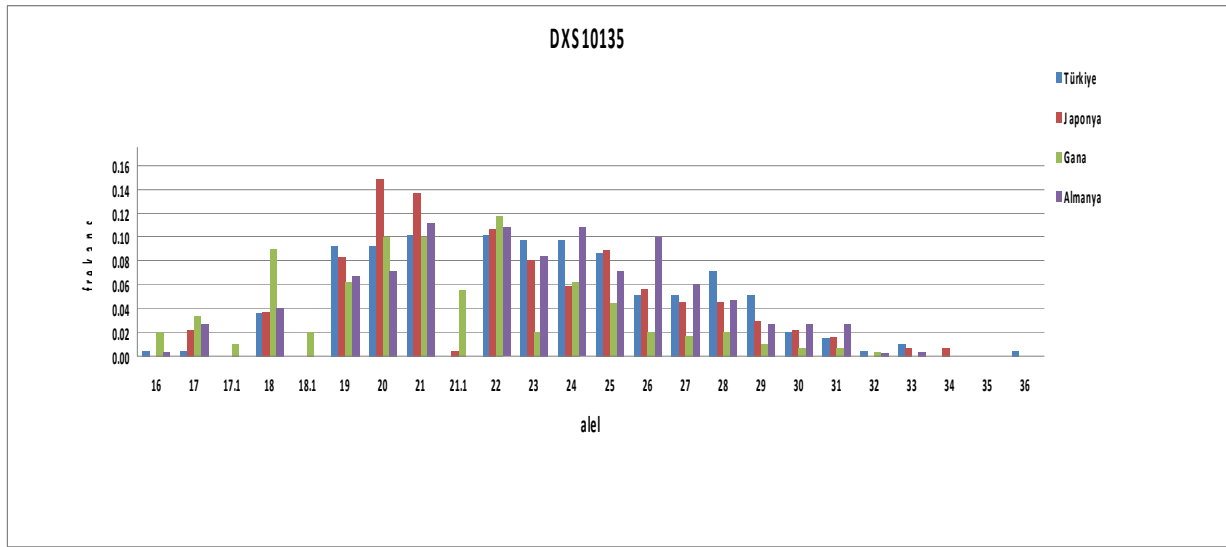
Grafik 8. Genel Türkiye toplumu DXS10101 STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluamlarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

2.8. DXS10135 Lokusuna Ait Bulgular

Genel Türkiye toplumunda DXS10135 lokusu için toplam 19 alel gözlenmiştir. En fazla görülen aleller 21 ve 22 no'lu alellerdir. En az görülen aleller 16, 17, 32 ve 36. alellerdir. 34 ve 35. aleller ise çalışmamızda görülmemiştir.

Tablo 23. DXS10135 lokusunun genel Türkiye toplumuna ait alel sıklıkları ve istatistiksel parametrelerine ait veriler.

DXS10135	Erkek (n=55)	Kadın (n=70)	Toplam (n=125)
ALEL	Sıklık	Sıklık	Sıklık
16	0.0182	0.0000	0.0051
17	0.0000	0.0071	0.0051
18	0.0364	0.0357	0.0359
19	0.0727	0.1000	0.0923
20	0.0364	0.1143	0.0923
21	0.1818	0.0714	0.1026
22	0.0909	0.1071	0.1026
23	0.0545	0.1143	0.0974
24	0.1273	0.0857	0.0974
25	0.0727	0.0929	0.0872
26	0.0727	0.0429	0.0513
27	0.0364	0.0571	0.0513
28	0.0545	0.0786	0.0718
29	0.0545	0.0500	0.0513
30	0.0182	0.0214	0.0205
31	0.0182	0.0143	0.0154
32	0.0182	0.0000	0.0051
33	0.0364	0.0000	0.0102
34	0.0000	0.0000	0.0000
35	0.0000	0.0000	0.0000
36	0.0000	0.0071	0.0051
PIC	0.914400	MEC Krüger	0.837283
Het	0.920126	MEC Kishida	0.914293
PE	0.836692	MEC Desmarais	0.914400
PI	0.039937	MEC Desmarais Duo	0.847331
PD _f	0.987894		
PD _m	0.920126		



Alel	Almanya	Gana	Japonya	Türkiye
16	0.004	0.0207	0.000	0.0051
17	0.028	0.0345	0.022	0.0051
17.1	0.000	0.0103	0.000	0.0000
18	0.040	0.0897	0.037	0.0359
18.1	0.000	0.0207	0.000	0.0000
19	0.068	0.0621	0.083	0.0923
20	0.072	0.1000	0.148	0.0923
21	0.112	0.1000	0.137	0.1026
21.1	0.000	0.0552	0.005	0.0000
22	0.108	0.1172	0.107	0.1026
23	0.084	0.0207	0.081	0.0974
24	0.108	0.0621	0.059	0.0974
25	0.072	0.0448	0.089	0.0872
26	0.100	0.0207	0.056	0.0513
27	0.060	0.0172	0.046	0.0513
28	0.048	0.0207	0.046	0.0718
29	0.028	0.0103	0.030	0.0513
30	0.028	0.0069	0.022	0.0205
31	0.028	0.0069	0.016	0.0154
32	0.003	0.0034	0.000	0.0051
33	0.004	0.0000	0.008	0.0102
34	0.000	0.0000	0.008	0.0000
35	0.000	0.0000	0.000	0.0000
36	0.000	0.0000	0.000	0.0051

Grafik 9. Genel Türkiye toplumu DXS10135 STR lokusu alel sıklıklarının ile diğer ülke topluamlarıyla (Almanya, Japonya, Gana) karşılaştırılması.

3. AİLE ÇALIŞMASI

Bu tez çalışmasında kullanılan babaanne, anne, baba ve kız çocuktan oluşan aile ile ilgili X-STR'lerin kalıtımını gösteren tablo aşağıdadır.

Tablo 24. örnek aile 1 (babaanne, baba, anne, kız torun)

	AMEL.	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
Babaanne	XX	10-11	11-13	14-16	12-15	35-36	8-18	29.2-30	22-28
Baba	XY	10	13	16	12	36	8	30	22
Anne	XX	8-11	12-13	13-15	13-15	37-39.3	14-15	28,2-28,2	19-23
Kız torun	XX	8-10	13-13	15-16	12-15	36-39.3	8-14	28.2-30	19-22

Tablo 25. örnek aile 2 (baba, anne, kız çocuk, X STR lokusları)

	AMEL.	DXS8378	HPRTB	DXS7423	DXS7132	DXS10134	DXS10074	DXS10101	DXS10135
Baba	XY	10	13	16	12	36	8	30	22
Anne	XX	8-11	12-13	13-15	13-15	37-39.3	14-15	28,2-28,2	19-23
Kız çocuk	XX	8-10	13-13	15-16	12-15	36-39.3	8-14	28.2-30	19-22

PI (Paternity Index, Babalık İndeksi) = 2355906
Olasılık (P): 0.999995

Tablo 26. Örnek aile 2 (baba, anne, kız çocuk, somatik STR lokusları)

DNA Lokusları	Anne	Baba	Kız çocuk
D81179	13-15	13-14	14-15
D21S11	30-33	29-30	29-30
D7S820	10-11	8-10	8-11
CSF1PO	10-12	11-12	10-11
D3S1358	15-17	16-16	16-17
THO1	6-6	6-6	6-6
D13S317	11-13	12-12	11-12
D16S539	12-13	11-13	12-13
D2S1338	23-23	17-22	17-23
TPOX	8-12	8-11	8-8
D18S51	17-18	17-17	17-18
D5S818	11-11	10-11	11-11
FGA	21-23	22-24	23-24

PI (Paternity Index, babalık indeksi) = 690073
Hummel'e Göre Essen Möller oranı W = 0.999999

V. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kimliklendirme ve nesep tayini, bireylerin moleküler düzeyde farklılıklar göstermesine yani genetik polimorfizme dayanır. DNA molekülünün tek yumurta ikizleri dışında polimorfik özelliği aynı olan iki kişinin bulunmaması bu molekülün kimliklendirmede kullanılabilmesine imkan verir. Bir lokusun polimorfik olarak adlandırılabilmesi için toplum içinde o lokusla ilgili iki veya daha fazla alelin bulunması gerekir. Polimorfizmin ortaya çıkabilmesi için genom dizininde varyasyonların olması, bu değişikliklerin o popülasyonda kalıcı olması ve sıklığının %1'den fazla olması gerekmektedir (Dib,1996).

Günümüzde adli DNA analizlerinde kullanılan STR lokusları gösterdikleri polimorfizm ve multipleks (çoklu) PCR'a uygun olmaları nedeni ile tercih edilmektedirler. Adli bilimlerde, geliştirilen ticari kitlerle çalışılan STR lokus sayısı 15'e çıkmıştır. Ancak bu kitler otozomal STR lokuslarını içermektedir. Farklı Adli olayların çözümünde örneğin tecavüz vakalarında gonozomal STR'ların otozomal STR'lardan daha etkili olduğunun görülmesi araştırmacıları gonozomal STR'lara yönlendirmiştir. İlk önce Y kromozomuyla başlayan çalışmalar daha sonra X kromozomu ile devam etmiştir. X kromozomuna bağlı STR'lar, otozomal STR'lara ek olarak, çocuğun kız olması durumunda babalık davalarında kullanılabilirliğinin gösterilmesi ile Biotype şirketi tarafından Mentype® Argus X-8 PCR amplifikasyon kiti geliştirilmiştir. Bu çalışmamızda bu kit kullanılarak DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135, HPRTB lokuslarının Türkiye toplumundaki alel sıklıkları belirlendi. Bunun için ilk önce kitin İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik laboratuvarında optimizasyon çalışması yapıldı. Bunun için söz konusu lokusların analizi için en uygun DNA izolasyon yönteminin seçimi, optimum DNA miktarının tayini, PCR toplam hacmi, PCR ürünün elektroforez için optimum miktarı belirlendi. Ayrıca kadın erkek karışmış örneklerde kitin ayırım gücü belirlendi. Aile çalışmasıyla da X kromozomuna bağlı STR'ların ebeveynlerden kız çocuklarına aktarımı gösterilmiştir.

Kandan DNA izolasyonu için Chelex®100 ve QIAamp®DNA Mini Kit kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarla her iki yöntemin de kit için uygun olduğu elektroforez sonrası elde edilen elektroforegramlarla görüldü.

PCR için optimum DNA miktar tayini için 10 tane Chelex ®100 ve 10 tane QIAamp®DNA Mini Kit ile izole edilen DNA örnekleri (0.0025 ng/µl, 0.005 ng/µl, 0.015 ng/µl, 0.025 ng/µl, 0.05 ng/µl, 0.1 ng/µl, 0.25 ng/µl, 0.5 ng/µl, 1 ng/µl, 2 ng/µl) kullanılarak hassasiyet çalışmaları yapıldı. 0.25 ng/µl DNA örneği ile sonuç alınabildiği ancak elde edilen

piklerin 1000 rfu düzeyinde olduğu gözlemlendi. 1 ng/μl DNA örneği ile ise 7000 rfu'ya kadar pikler alınabildiği, 2 ng/μl DNA'da ise artefakt piklerin oluştuğu görülmüştür. Gehrig ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 0.04 ng/μl DNA ile de okunabilir pikler elde ettiklerini belirtmişlerdir. Çalışmamız sonucu 1 ng/μl DNA'nın en uygun miktar olduğunu söyleyebiliriz.

Optimizasyonun üçüncü aşamasında toplam PCR hacmi azaltılarak sonuç alınabilecek en uygun PCR miktarı belirlendi. İlk olarak PCR reaktiflerinin miktarları %50 (12,55 μl) daha sonra %75 (6,675 μl) oranında azaltıldı. Gehrig ve arkadaşlarının çalışmalarında PCR hacminin 10 μl'e kadar azaltılmasıyla da iyi sonuçlar alabildikleri, bizim çalışmamızda ise %25 (6,675 μl) azaltılmasıyla bile elektroforegram sonuçlarının okunabildiği görüldü. Çalışmamızda en iyi sonuç 1 ng/μl DNA için optimum PCR hacmi 6,675 μl olarak belirlendi.

Dördüncü aşamada ABI 310 Genetik Analizör'e yükleme miktarları (elektroforez yükleme miktarı) değiştirilerek optimum miktar belirlendi. Elektroforez miktarları, Hi-Di Formamid 12 μl'den 8 μl'ye, DNA Size Standard 550 (ROX) 0.5 μl'den 0.2 μl'ye düşürülerek elde edilen karışımdan 8 μl alınarak üzerine 0.8 μl PCR ürünü veya 0.4 μl alelik ladder eklenmiştir. Sonuç olarak toplam hacim 13 μl'den PCR ürünleri için 8.5 μl'ye alelik ladder için 8.4 μl'ye düşürülmüştür. Elektroforez sonrası elde edilen elektroforegramlarda pik boyları arasında belirgin bir düşüş görülmemiştir.

Son aşamada ise kitin dolayısıyla X-STR'ların kadın-erkek karışımlarındaki ayırım gücü saptanmıştır. 1:1, 1:2 ve 1:5 oranlarında, X-STR profilleri bilinen kadın-erkek DNA izolatları karıştırılarak elde edilmiş karışım örnekleri çalışılmıştır. Karışık örneklerde üç X kromozomu bulunduğundan elektroforegramlarda, aynı alellere sahip olmadıkları bilinen lokuslarda üç pik gözlenmesi gerekir. Bu bilgi ışığında 1:1 ve 1:2 oranlarında yapılan karışım profillerinde bu üç pik gözlenmesine rağmen, 1:5 oranındaki karışımda bu gerçekleşmemiştir.

Aile çalışmasında, X-STR'ların kalıtımı ve babalık belirtimindeki etkinliği belirlenmiştir. Bunun için çalışılan 6 aileden ikisi tablo 24, 25, 26'da örnek olarak sunulmaktadır. Birinci örnek ailede babaanneden kız toruna X-STR'ların aktarımı gösterildi (Tablo 24). Babaannenin erkek oğluna aktardığı X-STR profili, babanın kızına aktardığı profil ile aynıdır. Bu şekilde aktarım, çocuğun kız olması koşulu ile babanın bulunmadığı babalık vakalarında babaannenin X-STR profilinden yararlanarak babalık belirlenebilir. İkinci örnek ailede ise rutinde çalışılan STR lokusları ile X-STR lokusları arasında babalık indeksi ve olasılığı karşılaştırıldı. Rutin çalışılan STR lokusları ile elde edilen oranlar, çalışılan lokusların (13) fazlalığı nedeniyle daha yüksek olduğu görülmektedir fakat X-STR lokusları ile elde edilen sonuçlarda da gereken oran (0.999) tutturulabilmektedir (Tablo 25,26). Babalık

davalarında somatik STR lokusları ile birlikte X-STR lokusları da kullanılabilir. Şöyle ki, çocuğun kız olduğu ve somatik STR lokusları ile en fazla iki lokusla dışlama rastlandığı babalık vakalarında, X-STR lokusları kullanılarak dışlanan lokus sayısı arttırılabilir.

Son olarak çalışılan DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135, HPRTB X-STR lokuslarının Türkiye popülasyonundaki alel sıklıkları belirlendi. Bunun için 130 kişi çalışıldı ancak bazı lokuslarda PCR’da çoğalma gerçekleşmediği için tiplendirme yapılamamıştır. Elde edilen sonuçlarla alel sıklıkları POPGENE Version 1.32 programı ile hesaplandı. PIC, MEC, HET, PD değerleri, elde edilen alel sıklıklarının, adli X kromozomu araştırma grubu (The Forensic ChrX Research Group) tarafından geliştirilen ve kendi web sitelerinde (www.chrx-str.org) bulunan programa girilmesi ile belirlendi. Olgu çözümünde hangi lokusun daha yararlı olduğunu anlayabilmek için, her lokusun PIC, HET, PD ve MEC değerlerini bilmek gerekmekte ve bir lokusun PIC, HET, PD ve MEC değerlerinin yüksekliği o lokusun adli genetik açıdan üstünlüğünü göstermektedir.

Genel Türkiye popülasyonunda DXS8378 lokusu alel sıklıkları belirlenmesi için 130 kişi çalışıldı. Ancak bir örnek PCR’da çoğalma olmadığı için 129 kişide sonuç alınabilmiştir. DXS8378 lokusu için alel sıklıkları ve istatistiksel veriler (PIC, MEC, HET, PD) tablo 15’de görülmektedir. Çalışmada 7 (8,9,10,11,12,13 ve15) alel gözlenmiştir. 14. alel gözlenmemiştir. Alel sıklığı en az 15. alelde, en fazla 10, 11 ve 12. alellerde görülmüştür. Çalışmamız diğer popülasyonlarla karşılaştırılmış ve grafik 1’de gösterilmiştir. J. Edelmann ve arkadaşlarının Alman popülasyonunda yaptığı çalışmada 8–14 arasındaki alellere rastlanmış ve alel dağılımları bizim çalışmamızla benzer olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel verilerin ise bu lokus için bizim çalışmamızla hemen hemen aynı olduğu görülmektedir. M. Hashiyada ve arkadaşlarının Japon popülasyonunda yaptığı çalışmada yalnızca 9–13 arasındaki aleller görülmüş ve 0.6 gibi bir değerle en fazla 10. alel saptanmıştır. K. Thiele ve arkadaşlarının Gana popülasyonunda yaptığı çalışmada 10–14 arasındaki aleller görülürken en fazla görülen 11. aleldir. Bu bulgular ışığında DXS8378 lokusunun Türkiye toplumdaki alel sıklıklarının Avrupa popülasyonlarınınki ile benzer olduğu Asya ve Afrika’dan ise farklı olduğu saptanmıştır.

HPRTB lokusu için Türkiye genelinde 125 kişide yaptığımız çalışmada alel sıklıkları ve istatistiksel veriler (PIC, MEC, HET, PD) tablo 16’da görülmektedir. Çalışmada 9 (9, 11, 11.2, 12, 13, 14, 15, 16 ve17) alel gözlenmiştir. En fazla görülen alel 13. aleldir. En az görülen aleller 16. ve 17. alellerdir. 10. alel ise çalışmamızda görülmemiştir. F. Aşıcıoğlu’nun HPRTB lokusu ile ilgili Türkiye popülasyonuna ait yaptığı çalışma ile karşılaştırıldığında

(Grafik 2), iki gen arasındaki anlamlılık derecesini belirleyen Z değerlerine göre aleller arasında anlamlı derecede farklılığın olmadığı ortaya konmuştur (tablo 17). Diğer populasyonlar arasındaki karşılaştırmada ise, Japon populasyonunda M. Hashiyada ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 9, 10, 11.2 ve 17 no'lu aleller gözlenmezken yüksek oranda (0.5) 13. alel gözlenmiştir. K. Thiele ve arkadaşlarının Gana populasyonunda yaptığı çalışmada 11.2. alel gözlenmezken en fazla 13. alel görülmektedir. J. Edelman ve arkadaşlarının Alman populasyonunda yaptığı çalışmada ise 11.2 ve 17 nolu aleller görülmemiş bizim çalışmamızla benzer olarak en fazla 13 nolu alel gözlenmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda HPRTB lokusunun Türkiye populasyonunda görülme sıklığının diğer populasyonlarla arasında büyük farklılıklar olmadığı anlaşılmaktadır.

DXS7423 lokusu için Türkiye genelinde 127 kişide yaptığımız çalışmada alel sıklıkları ve istatistiksel veriler (PIC, MEC, HET, PD) tablo 18'de görülmektedir. Yaptığımız çalışmada toplam 7 (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18) alel gözlenmiştir. En fazla görülen aleller 14 ve 15. alellerdir. En az görülen alel 12 ve 18. alellerdir. M. Hashiyada ve arkadaşlarının Japon populasyonunda yaptığı çalışmada 12 ve 18. aleller gözlenmezken 15. alel yüksek oranda (0.6) görülmüştür. K. Thiele ve arkadaşlarının Gana populasyonunda yaptığı çalışmada 12 ve 18. aleller gözlenmezken 15. alel yüksek oranda (0.5) görülmüştür. J. Edelman ve arkadaşlarının Alman populasyonunda yaptığı çalışmada alellerin görülme sıklığı bizim verilerimizle hemen hemen aynıdır. En az 12 ve 18 no'lu aleller gözlenirken en fazla 14 ve 15 no'lu aleller gözlenmektedir.

DXS7132 lokusu için Türkiye genelinde 124 kişide yaptığımız çalışmada alel sıklıkları ve istatistiksel veriler (PIC, MEC, HET, PD) tablo 19'da görülmektedir. Yaptığımız çalışmada toplam 7 adet (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17) alel gözlenmiştir. En fazla görülen alel 14. aleldir. En az görülen alel 17. aleldir. M. Hashiyada ve arkadaşlarının Japon populasyonunda yaptığı çalışmada 11 no'lu alel gözlenmezken en fazla 15. alel görülmektedir. K. Thiele ve arkadaşlarının Gana populasyonunda yaptığı çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak 10 no'lu alel görülmektedir. Gana populasyonunda bizim verilerle benzer olarak en fazla 14 no'lu alel görülürken en az 11 ve 17 no'lu alel görülmektedir. J. Edelman ve arkadaşlarının Alman populasyonunda yaptığı çalışmada ise yine bizim verilerle benzer olarak en fazla 14. alel görülürken en az 11 ve 17. aleller görülmektedir.

DXS10134 lokusu için Türkiye genelinde 124 kişide yaptığımız çalışmada alel sıklıkları ve istatistiksel veriler (PIC, MEC, HET, PD) tablo 20'de görülmektedir. Yaptığımız çalışmada toplam 14 (32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 38.3, 39, 39.3, 40.3, 41.3, 43.3) alel

gözlenmiştir. En fazla görülen aleller 35 ve 36. alellerdir. En az görülen alel 39. aleldir. 42.3 ve 44.3. aleller ise çalışmamızda görülmemiştir. M. Hashiyada ve arkadaşlarının Japon popülasyonunda yaptığı çalışmada 28, 29, 30, 31, 31.1, 32.1, 33.1, 39.2, 39.3, 41.3, 43.3, 44.3 aleller gözlenmezken bizim çalışmamızdan farklı olarak 34.2, 37.3, 40, 42.3 no'lu aleller görülmektedir. En fazla 37. alel görülmektedir. K. Thiele ve arkadaşlarının Gana popülasyonunda yaptığı çalışmada 34.2, 37.3, 39.3, 40.3, 41.3, 42.3, 43.3, 44.3 no'lu aleller gözlenmezken bu tez çalışmasından farklı olarak 28, 29, 30, 31.1, 32.1, 33.1, 40 no'lu aleller görülmektedir. En fazla 37 nolu alel görülmektedir. J. Edelmann ve arkadaşlarının Alman popülasyonunda yaptığı çalışmada 28, 30, 31.1, 32.1, 33.1, 34.2, 37.3, 38.3, 39.2, 40 no'lu aleller görülmemiş bizim çalışmamızda gözlemlenmemiş 29, 42.3, 44.3 no'lu aleller ise görülmüştür. Alman popülasyonunda en fazla 36. alele rastlanmaktadır.

DXS10074 lokusu için Türkiye genelinde 127 kişide yaptığımız çalışmada alel sıklıkları ve istatistiksel veriler (PIC, MEC, HET, PD) tablo 21'de görülmektedir. Bu çalışmada toplam 14 (7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 16.2, 17, 18, 19, 20, 21) alel gözlenmiştir. En fazla görülen alel 16 ve 17. alellerdir. En az görülen aleller 10 ve 21. alellerdir. 4, 11 ve 12. aleller ise çalışmamızda görülmemiştir. Japon popülasyonunda, bizim çalışmamızda rastlamadığımız 12. allele birlikte sadece 9 alel görülürken, en fazla 17. alel görülmektedir. Gana popülasyonunda alellerin görülme sıklığı eşit dağılım göstermekle birlikte çalışmamızda görülmeyen 11 ve 12. alellere rastlanmakta 16.2, 20 ve 21. alellere rastlanmamaktadır. Alman popülasyonunda ise çalışmamızla aynı aleller görülmüş ve onlarda da en fazla 16 ve 17. alellere rastlanılmıştır.

DXS10101 lokusu için Türkiye genelinde 121 kişide yaptığımız çalışmada alel sıklıkları ve istatistiksel veriler (PIC, MEC, HET, PD) tablo 22'de görülmektedir. Bu çalışmada toplam 15 (27, 27.2, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34) alel gözlenmiştir. En fazla görülen alel 30.2. alel, en az görülen alel ise 33.2. aleldir. 24.2 ve 26.2 no'lu aleller ise çalışmamızda görülmemiştir. Japon popülasyonunda, bizim çalışmamızdan farklı olarak 26 ve 34.2 no'lu alellere rastlanılırken, en fazla 31. alel görülmektedir. Gana popülasyonunda 24.2, 25, 25.2, 26.2 ve 36 no'lu alellere rastlanırken bizim çalışmamızda gördüğümüz 28.2 ve 33.2 alellere rastlanmamakta ve en fazla 32. alel görülmektedir. Alman popülasyonunda, yaptığımız çalışmayla benzer alel dağılımı görülmekle birlikte bu çalışmada rastlanmayan 26.2. alele Alman popülasyonunda rastlanmaktadır.

DXS10135 lokusu için Türkiye genelinde 125 kişide yaptığımız çalışmada alel sıklıkları ve istatistiksel veriler (PIC, MEC, HET, PD) tablo 23'de görülmektedir. Bu

çalışmada toplam 15 (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 36) alel gözlenmiştir. En fazla görülen aleller 21 ve 22. alellerdir. En az görülen aleller 16, 17, 32 ve 36. alellerdir. 34 ve 35. aleller ise çalışmamızda görülmemiştir. Japon popülasyonunda, çalışmamızdan farklı olarak 21.1. ara alel ve 34. alel görülürken, 16, 32 ve 36 no'lu aleller görülmemektedir. Japon popülasyonunda en fazla 20 ve 21 no'lu alellere rastlanmaktadır. Gana popülasyonunda 17.1, 18.1 ve 21.1 no'lu ara alellere rastlanırken 33, 34 ve 36 no'lu alellere rastlanmamaktadır. Gana popülasyonu içinde en fazla 22. alel görülmektedir. Alman popülasyonu ile, yaptığımız çalışma arasındaki alel dağılımı açısından tek fark 36. alelin onlarda görülmemesidir. Alman popülasyonunda bu çalışmadaki bulgulara benzer olarak en fazla 21, 22 ve ayrıca 24 no'lu aleller görülmektedir.

Sonuç olarak; X'e bağlı STR lokuslarının genel Türkiye popülasyonunda alel sıklıklarının Avrupa popülasyonları alel sıklıklarıyla büyük uyumsuzluk gözlenmezken ırklar arasında çoğu lokusta (DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135) büyük farklılıklar gözlenmiştir. Bu çalışma ile söz konusu lokusların Mentype® Argus X-8 PCR amplifikasyon kiti kullanılarak optimizasyonu ve genel Türkiye popülasyonundaki alel sıklıkları belirlenmiştir. Ancak Türkiye'de rutin adli bilimler laboratuvarlarında söz konusu lokus alel sıklıklarının kullanılabilmesi için çalışılan kişi sayısının artırılması daha uygun olacaktır.

ÖZET

Adli bilimlerde kimliklendirme ve nesep tayinlerinde somatik STR lokusları kullanılmaktadır. Son yıllarda ise gonozomal STR lokusları kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada X kromozomuna özgü 8 STR lokusu (DXS8378, HPRTB, DXS7423, DXS7132, DXS10134, DXS10074, DXS10101 ve DXS10135) ve cinsiyet belirtimi için Amelogenin lokusu içeren ticari Mentype® Argus X-8 kiti kullanıldı. Öncelikle kitin İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik laboratuvarında optimizasyonu gerçekleştirildi. Optimizasyon 4 aşamada gerçekleşti. X-STR kiti için uygun DNA izolasyon yöntemleri belirlenmiş, DNA miktar tayinleri florimetre (Invitrogen Qubit) ile ölçülmüş ve daha sonra hassasiyet çalışması ile kitin hangi DNA miktarında iyi sonuçlar verdiği saptanmıştır. Bunu takiben PCR reaktiflerinin miktarları belli oranlarda azaltılarak optimum PCR toplam hacmi, PCR ürünlerinin miktarları da azaltılarak ABI 310 genetik analizör için uygun elektroforez yükleme hacmi ortaya konmuştur. Daha sonra kitin karışık örneklerde (erkek-kadın) ayırım gücünün saptanması için 1:1, 1:2, 1:5 oranlarında karışık örnekler çalışıldı. 1:1, 1:2'lik karışım örneklerinde ayırım yapılabilirken, 1:5 oranındaki örnekte ayırım yapılamıştır. Aile çalışması ile de X-STR'ların babaanne, baba, anne ve kız çocuk arasındaki kalıtımı gösterilmiştir.

Populasyon çalışmasında ise X'e özgü 8 STR lokusunun Türkiye toplumundaki alel sıklığı hesaplanmıştır. Bunun için bütün Türkiye'yi temsil edecek şekilde 130 gönüllü kişiden alınan kanlar ile izolasyon yapılmıştır. Elde edilen verilerle alel sıklığı POPGENE Version 1.32 programı kullanılarak hesaplanmıştır. PIC, MEC, HET, PD değerleri gibi istatistiksel değerler adli kromozom X araştırma grubu (The Forensic ChrX Research Group) tarafından geliştirilen web sitesinde bulunan programla, alel sıklıkları girilerek bulunmuştur. Daha sonra Türkiye populasyonuna ait veriler Alman, Japon ve Gana populasyonları ile karşılaştırıldı. Sonuçta populasyonlar arasındaki karşılaştırmada Türkiye populasyonunun Avrupa populasyonuna benzerlik gösterdiği saptandı.

Anahtar kelimeler: X-STR, babalık, optimizasyon

SUMMARY

Autosomal short tandem repeat (STR) markers are widely applied to forensic individual identification and kinship testing. Nowadays, gonosomal markers are used to forensic applications. The Mentype[®] Argus X-8 kit is a commercial multiplex system which contains Amelogenin for gender determination as well as gonosomal STR markers (DXS8378, HPRTB, DXS7423, DXS7132, DXS10134, DXS10074, DXS10101 and DXS10135). Optimization studies take form 4 steps at Molecular Genetic Laboratory of Forensic Science Institute, İstanbul University. In this study, the following parameters were taken under consideration for optimization studies: DNA extracted using different protocols, quantitated by using commercially available Invitrogen Qubit Fluorometer, sensitivity tests, reaction volume optimization of Master Mix ABI 310 genetic analyser parameters. Analysis of mixture samples (male-female, 1:1, 1:2, 1:5) were performed. We study family that is included grandmother, father, mother and daughter for X-STRs' inheritance.

Allele frequency distribution and analysis of biostatistical parameters of eight X-chromosome STR loci, determined in a sample of 130 unrelated volunteer individuals (male and female) from Turkey. Allele frequencies were calculated with program POPGENE Version 1:32. PIC, MEC, HET, PD values were calculated automatically by entering allele frequencies, using the software in the web page that has been developed by forensic chromosome X research group (ChrX The Forensic Research Group). These gene loci were compared between general Turkish gene frequencies and different races such as; Europe-Germany, Asia-Japan, Africa-Ghana. It has been observed that there is a huge difference between races but with German population similarities has been observed.

Keywords: X-STR, paternity, optimization.

KAYNAKLAR

- Akgüneş E. (2008) Adli Kimliklendirmede VNTR ile STR Sistemlerinin Ayrım Güçlerinin Karşılaştırılması, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul
- Aler M., Sanchez-Diz P., Gomes I., Gisbert M., Carracedo A., Amorim A., Gusmao L. (2007) Genetic data of 10 X-STRs in a Spanish population sample, *Forensic Sci. Int.*, 173: 193–196.
- Alikaşifoğlu M. (2006) Genotipleme Çalışmalarında Kullanılan İleri Teknik Yöntemler, Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Genetik ABD., Türk Farmakoloji Derneği Eğitim Sempozyumu, 100.Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Van.
- Altunçul H. (2001) Kemik Dokudan DNA Çekitleme ve Tipleme Yöntemleri, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul
- Asamura, H., Sakai, H., Kobayashi, K., Ota, M. ve Fukishima H. (2006) Mini X-STR multiplex system population study in Japan and application to degraded DNA analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 11: 1–8
- Asamura, H., Sakai, H., Ota M., Fukishima H. (2006) Japanese population data for eight X-STR loci using two new quadruplex systems, *Int J Legal Med.* 120: 303–309
- Aşıcıoğlu F. (2006) X-Kromozomal STR Polimorfizmi (DXS8377, DXS101, DXS6789, STRX-1, HUMHPTB) ve Türk Toplumundaki Alel Frekansları, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul
- Aşıcıoğlu F. (2007) X-STR Polimorfizminin Adli DNA Analizlerindeki Önemi, *Adli Bilimler Dergisi*, 6(2): 58–67.
- Bär W., Brinkmann B., Budowle B., Carracedo A., Gill P., Lincoln P., Mayr W., Olaisen B. (1997) DNA Recommendations Further Report of the DNA Commission of the ISFH Regarding the Use of Short Tandem Repeat Systems. *Int. J. Legal Med.* 110: 175–176.
- Barbaro A., Cormaci P., Barbaro A. (2006) X-STR typing for an identification casework, *International Congress Series* 1288: 513– 515
- Bartlett J. M. S., Stirling D. (2002) A Short History of the Polymerase Chain Reaction, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 226: PCR Protocols, Second Edition, pp. 3-6, Humana Press Inc., Totowa, NJ
- Beardmore, J. A. (1983) Extinction, survival and genetic variation, pp. 125-151, C. M. Schonewald-Cox, S. M. Chambers, B. MacBryde, and W. L. Thomas (eds.) *Genetics and Conservation: A Reference for Managing Wild Animal and Plant Populations*. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Menlo Park, CA.
- Becker D., Rodig H., Augustin C., Edelmann J., Götz F., Hering S., Szibor R., Brabetz W. (2008) Population genetic evaluation of eight X-chromosomal short tandem repeat loci using Mentype Argus X-8 PCR amplification kit, *FSI Genetics Supplement Series*, 2: 69–74.

Bobillo C., Marino M., Sala A., Gusmao L., Corach D. (2008) X-STRs: Relevance in complex kinship cases, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series 1*: 496–498.

Butler, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing. Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*, 2nd edition, pp. 87-117, Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press.

Castella V., Dimo-Simonin N., Morerod M.-L., Mangin P. (2006) In-house validation of the PCR amplification kit Mentype® Argus X-UL, *International Congress Series 1288*: 310–312

Ceylan G. G. (2007) Türk Populasyonunda Erkek Faktörlü İnfertilitede Kromozomal Anomali ve Y Kromozom Mikrodelesyonları İnsidansının Belirlenmesi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Elazığ

Chen M.Y., Pu C.E. (2004) Population data on the X chromosome short tandem repeat loci DXS10011, DXS101, DXS6789, DXS7132, DXS8377, and DXS9895 in Taiwan. *Forensic Sci. Int.* 146: 65–67

Cinnioglu C. (2001) Y kromozomu varyasyonlarının analizi ve adli bilimler alanında kullanımı. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı, İstanbul

Clement-Jones M., Schiller S., Rao E. (2000) The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome. *Hum. Mol. Gen.* 9: 695–702

Committee on the DNA Forensic Science of National Research Council (1996) pp. 32–35, *The Evaluation of Forensic DNA Evidence*. Washington, DC: National Academy Press..

Connealy P.M. (1994) *Human Genetic Polymorphism. Genetic Stability And Recombinant Product Consistency Dev. Biol Stand.* Basel, Karger. Edited By Brown F. Lubinieck A.S. Vol 83: 107–110

Davies K. E. (1985) Molecular genetics of the human X chromosome. *Journal of Medical Genetics* 22: 243-249

De KNIJFF P., Kayser M. (1997) Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. *Int. J. Legal Med.* 110: 134–140.

De KNIJFF P. (2000) Messages through bottlenecks: On the combined use of slow and fast evolving polymorphic markers on the human Y chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 1055–1061.

Desmarais D., Zhong Y., Chakraborty R., Perreault C., Busque L. (1998) Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA), *Journal of Forensic Sciences*, 43: 1046–1049.

Dib C. (1996) A comprehensive genetic map of the human genom based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380: 152-154.

- Edelmann J., Deichsel D., Hering S., Plate I., Szibor R. (2002) Sequence variation and allele nomenclature for the X-linked STRs DXS9895, DXS8378, DXS7132, DXS6800, DXS7133, GATA172D05, DXS7423 and DXS8377. *Forensic Science International*, 129: 99–103
- Edelmann J., Reinhard S. (2005) Validation of the X-linked STR DXS6801. *Forensic Science International*, 148: 219–220
- Edelmann, J., Szibor R. (2003) The X-linked STRs DXS7130 and DXS6803. *Forensic Science International*, 136: 73–75.
- Edelmann, J., Szibor R. (2001) DXS101: a highly polymorphic X-linked STR, *International Journal of Legal Medicine* 114: 301–304.
- Edelmann J., Hering S., Michael M., Lessig R., Deichsel D., Sundhausen G.M., Roewer L., Plate I., Szibor R. (2001) 16 X-chromosome STR loci frequency data from a German population, *Forensic Science International*, 124: 215–218.
- Edwards A., Civitello A., Hammond H., Caskey C.T. (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, 49: 746-756.
- Ersi A. K. (2006) Adli Biyoloji Ders Notları
- Evet I.W., Gill P.D., Scranage J.K., Weir B.S. (1996) Establishing the Robustness of Short Tandem Repeat Statistics for Forensic Applications. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 398-407.
- Evet I.W., Lambert J.A., Knight S.D., Fairley M., Lee L.D. (1998) A Study of Independence Between STR and Conventional Blood Type Loci. *Forensic Science International*, 79: 163-166.
- Filoğlu G. (1999) 7 Tetramerik STR lokusunun Kriminal identifikasyondaki önemi, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul
- Gehrig C., Teyssier A. (2006) Validation of the Mentype® Argus X-UL kit, *International Congress Series* 1288: 325– 327
- Gill P., Jeffreys A.J., Werrett D.J.(1985) Forensic application of DNA “fingerprints”. *Nature*, 318: 577-579.
- Goodwin W., Linacre A., Hadi S. (2007) An Introduction to Forensic Genetics, John Wiley & Sons Ltd.
- Gomolka M., Hundrieser J., Nürnberg P., Roewer L., Epplen J. T., Epplen C. (1994) Selected Di- And Tetranucleotide Microsatellites From Chromosomes 7, 12, 14, And Y In Various Eurasian Populations. *Hum. Genet.* 93: 592–596.
- Gunn A. (2006) Essential Forensic Biology, pp 50–51, John Wiley & Sons, Ltd.
- International Human Genom Consortium (2001) Initial Sequencing and Analysis of Human Genom, *Nature* 409: 860–921

- Hashiyada M., Itakura Y., Funayama M. (2008) Polymorphism of eight X-chromosomal STRs in a Japanese population, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*
- James H.S., Nordby J.J. (2003) Forensic Science: An Intraduction to Scientific And Investigative Techniques, pp. 115-134, CRC Press Florida
- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985) Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA, *Nature* 314:67–73.
- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985) Individual specific “fingerprints” of human DNA. *Nature*, 316: 75–79.
- Jeffreys A.J., Royle N.J., Wilson V., Wong V. (1988) Spontaneous Mutation Rates to New Length Alleles at Tandem-Repetitive Hypervariable Loci in Human DNA. *Nature*, 332: 278-281.
- Kayser M., Sajantila A. (2001) Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis, *Forensic Science International*, 118:1 16-121
- Kayser M. (2007) Y-Chromosomal markers in forensic genetics, *Molecular Forensics* (R. Rapley, D. Whitehouse, Eds), pp. 141–157, John Wiley & Sons, Ltd.
- Kishida T., Tamaki Y. (1997) Japanese population data on Xchromosomal STR locus AR, Japanese. *Journal of Legal Medicine*, 51: 376–379.
- Kobilinsky L., Liotti T. F., Oeser-Sweat J. (2005) Forensic DNA Analysis Methods, DNA: Forensic and Legal Applications, pp 70-73, John Wiley & Sons, Inc.
- Kobilinsky L., Levine L., Margolis-Nunno H. (2007) Forensic DNA Analysis, Chelsea House by Infobase Publishing
- Koçias Y. (2008) DNA Düzeyinde Soybağı Belirtimi Yapılan Laboratuarlarda Uluslararası Kalite Güvencesi, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul
- Lalloz M. R., Schwaab R., McVey J. H., Michaelides K., Tuddenham E. G. (1994) Haemophilia A diagnosis by simultaneous analysis of two variable dinucleotide tandem repeats within the factor VIII gene, *Br J Haematol* 86: 804–809.
- Lee H., Laad C., Scherezinger C.A., Bourke M.T. (1998) Forensic Applications of DNA Typing. *Am. J. Forensic Medicine and Path.* 19:10,10-18.
- Lewin B. (1997), Simple Sequence DNA. GENES VI., Chapter 25 pp. 727–741, Oxford University Press Oxford, New York, Tokyo
- Lyon M.F. (1961) Gene Action in the X-chromosome of the Mouse, *Nature*.190, 372–374
- McNeil J.A., Smith K.P., Hall L.L. (2006) Word frequency analysis reveals enrichment of dinucleotide repeats on the human X chromosome and [GATA]_n in the X escape region. *Genome Res.* 16: 477–484

- Mentype® Argus X–8 PCR Amplification Kit Manuel (2007) Dresden (Germany): Biotype AG.
- Mozayani A., Noziglia C. (2006) *The Forensic Laboratory Handbook Procedures And Practice*, Humana Press Inc.
- Oberlé I., Drayna D., Camerino G., White R., Mandel J.L. (1985) The telomeric region of the human X chromosome long arm: presence of a highly polymorphic DNA marker and analysis of recombination frequency. *Proc Natl Acad Sci. USA* 82(9): 2824-8.
- Ocak K. S. (2005) Adli Tıp Uzmanının DNA İncelemelerindeki Yeri, Marmara Üni. Tıp Fakültesi Adli Tıp A.B.D., Uzmanlık Tezi, İstanbul.
- Pehlivan S. (2007) Tıpta Moleküler Tanı Ve Genetik Uygulamalar, Gaziantep Üniversitesi Tıp Dergisi 1: 17–21
- Pereira R., Gomes I., Amorim A., Gusmão L. (2007) Genetic diversity of 10 X chromosome STRs in northern Portugal. *Int. J. Legal Med.* 121: 192–197
- Roffey P.E., Eckhoff C.I., Kuhl J.L. (2000) A Rare mutation in the amelogenin gene and its potential investigative ramifications. *Journal of Forensic Sciences*, 45: 1016–1019.
- Rustamov A. (2006) Türkiye’de Y Kromozomuna Özgü 12 STR Lokusu Polimorfizmi İncelenmesi Ve Haplotip Sıklığının Belirlenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Ruivo D., Ribeiro T., Espinheira R., Geada H. (2008) Use of eight X-chromosomal STRs in paternity investigation. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1:522–4
- Saferstein R. (2004) *Criminalistics: An Introduction To Forensic DNA Analyses*. 2. Edition, pp. 34–50, Pearson Prentice Hall New Jersey.
- Salaru R.N.N. (1993) Paternity investigation among known false trios: ABO, Rh, MNSs, Kell, Duffy, Kidd and HLA systems. *Journal of Forensic Sciences*, 38(6): 1482–1487.
- Samuels J. E. (2000) *The Future of Forensic DNA Testing* U.S. Department of Justice
- Schanfield M. S. (2000) Deoxyribonucleic Acid, *Encyclopedia of Forensic Sciences* (J. Siegel G. Knupfer, P. Saukko, Eds), pp 479–497, Elsevier.
- Schleif R. (1993) *Genetics and Molecular Biology*, The Johns Hopkins University Press.
- Shin S. H., Yu J.S., Park S.W., Min G. S., Chung K.W. (2005) Genetic analysis of 18 X-linked short tandem repeat markers in Korean population. *Forensic Science International* 147: 35–41.
- Shuller W., Fereday L., Sheithauer R. (2001) *The Interpol Handbook on DNA Data Exchange and Practice*, Interpol.

Stuart H., James William G. E. (1999) Interpretation of Bloodstain Evidence at Crime Scenes CRC Press LLC

Subramanian S., Mishra R.K., Singh L. (2003) Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. *Genome Biol.* 4: R13.

Szibor R., Lautsch S., Plate I., Beck N. (2000) Population data on X-chromosome short tandem repeat locus HumHPRTB in two regions of Germany. *Journal of Forensic Sciences*, 45: 231–233.

Szibor R., Krawzak M., Hering S., Edelmann J., Kuhlisch E., Krause D. (2003) Use of X-Linked markers for Forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine*, 117: 67–74.

Szibor R., Hering S., Edelmann J. (2005) A new Web site compiling forensic chromosome X research is now online. *International Journal of Legal Medicine*, 25: 1–3.

Szibor R. (2007a) X-chromosomal markers: Past, present and future, *Forensic Science International: Genetics* 1: 93–99

Szibor R. (2007b) The X-chromosome in forensic science: past, present and future, *Molecular Forensics* (R. Rapley, D. Whitehouse, Eds), pp. 103–126, John Wiley & Sons, Ltd.

Thiele K., Löffler S., Löffler J. (2008) Population data of eight X-chromosomal STR markers in Ewe individuals from Ghana, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1: 167–169

Tippett P., Ellis N.A. (1998) The Xg Blood Group System: a Review. *Transfus. Med. Rev.* 12: 233–257

Uçar F. (1990) Cinsiyet Kromatini (Barr Cisimciği) Tayini ve Non-fonksiyonel X Kromozomlarının Klinik Tanıda Kullanılması ve Önemi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.B.D., Yüksek Lisans Tezi, Trabzon.

Wieacker P. F., Knoke I., Jakubiczka S. (1998) Clinical and moluculer aspects of androgen receptor defects. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 106: 285–287

Wiegand P., Berger B., Edelmann J., Parson W. (2003) Population genetic comparisons of three X-chromosomal STRs, *International Journal of Legal Medicine*, 117: 62–65

Yıldız K. (2003) Olay Yerinde Bulunabilecek Biyolojik Materyalden, Amelogenin DNA Lokusunun İncelenmesi ile Cinsiyet Tayini, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.

Yükseloğlu E. H. (2003) Y Kromozomu STR Polimorfizminin Babalık Tayini ve Adli İdantifikasyonda Kullanımı, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.

Zalan A., Volgyi A., Brabetz W., Schleinitz D., Pamjav H. (2008) Hungarian Population data of eight X-linked markers in four linkage groups, *Forensic Sci. Int.*, 175: 73–78.

Zarrabeitia M.T., Amigo T., Sañudo C., Zarrabeitia A., Lamuño D.G., Riach J.A. (2002) A New Pentaplex System to Study Short Tandem Repeat Markers of Forensic Interest on X Chromosome. *Forensic Science International*, 129: 85–89.

Zhang, M. Lv. L., Liang, W.B., Zhou, B., Liao, M., Wu, M.Y. (2004) Allele frequency distribution of two X-chromosomal STR loci in the Han population in China. *Forensic Science International*, 1261: 145–147

http://tr.wikipedia.org/wiki/Turner_sendromu (02/03/2009)

<http://www.chrx-str.org> (31/10/2008)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human> (05/03/2009)

EK

X KROMOZOMUNA BAĞLI 8 STR LOKUSUNUN POLİMORFİZMİ VE ADLİ BİLİMLERDEKİ ÖNEMİ
adlı tez projesi için

AYDINLATILMIŞ RIZA FORMU

Tez Projenin Amacı

Adli bilimlerde biyolojik örneklerden kimliklendirme ve nesep tayini ABO kan grubu ile başlamış daha sonra alt kan grupları, polimorfik serum proteinleri, polimorfik eritrosit enzimleri, HLA (insan lökosit antijenleri) ile devam etmiştir. Adli bilimlerde kimliklendirmede ve nesep tayininde, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin gelişmesine bağlı olarak 1993 yılından bu yana DNA üzerindeki Kısa Ardışık Tekrar Dizinleri (STR) kullanılmaktadır. Otozomal STR'ler ile başlayan kimliklendirme gonozomal STR'lerin özellikle de Y kromozomundaki STR'lerin kullanımı ile devam etmiştir. Son yıllarda ise Dünya'da X kromozomuna bağlı STR'lerin adli amaçlı kullanımı için çalışmalar hız kazanmıştır. X kromozomuna bağlı STR'ler özellikle nesep tayininde, baba adayının bulunamadığı durumlarda ve akrabalık ilişkilerinin ortaya konması gibi adli olgularda, X kromozomunun kalıtımına bağlı olarak, kullanılabilineceği görülmüştür. Ülkemizde nesep tayinlerinde, adli laboratuvarlarda rutinde kullanılabilmesi için uygun bir yöntemin geliştirilmesi ve X kromozomuna bağlı STR'lerin Türk toplumundaki polimorfizminin ortaya konması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında X kromozomuna bağlı 8 STR lokusunun (DXS8378, HPRTB, DXS10074, DXS7132, DXS10101, DXS7423, DXS10134, DXS10135) kriminal amaçlı ve nesep tayininde kullanılabilmesi için, bu lokusların Türk popülasyonundaki gen frekanslarının belirlenmesi gerekir. Ancak bunu yapmadan önce söz konusu lokusların laboratuvarda validasyonu ve standardizasyonu sağlanmalıdır. Bu amaca yönelik olarak bu tez çalışmasında söz konusu lokuslarda yöntem geliştirilmesi ve standardizasyon sağlanması amaçlanmıştır.

Bu uygulamada elde edilecek olan bulgular, tümü ile anonim olarak kullanılacaklardır.

Bu proje İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun oluru ile uygulanmaktadır.

Katkılarınız için teşekkür ederiz.

Çalışmaya katılmayı kabul ediyorum.

Adı, soyadı:

İmza:

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi : 04.05.1982

Doğum Yeri : İstanbul

Uyruğu : T.C.

Eğitim Durumu :

2006 - 2009 İstanbul Üniversitesi
Adli Tıp Enstitüsü Yüksek Lisans Eğitimi

2000 – 2005 İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

1994 – 2000 Zonguldak Atatürk Anadolu Lisesi

1989 – 1994 Yeşilgiresun İlköğretim Okulu (Giresun)

Yabancı Dil: İngilizce
(İyi Seviyede)

Staj:

2003 Özel Bayrampaşa Hastanesi (1 ay)

2004 T.C. Sağlık Bakanlığı Zonguldak Halk Sağlığı laboratuvarı (1 ay)

Yayınlar:

1.Acar E., Filoglu G., Altuncul H., Bulbul O., Argac D. Shahzad M.S. Optimization and Validation Studies Of The Mentype Argus X- Kit For Forensic Cases 23rd World Congress, International Society for Forensic Genetics, Buenos Aires, Argentina, September 14-18, 2009

2.Bulbul O., Phillips C., Argac D.,Shahzad M.S., Acar E., Filoglu G., Altuncul H. Internal Validation Of autosomal SNP – Multiplex With ABI 310 Genetic Analyzer. 23rd World Congress, International Society for Forensic Genetics, Buenos Aires, Argentina, September 14-18, 2009

3.Argac D.,Bulbul O., Shahzad M.S., Acar E., Altuncul H. Filoglu G. Optimiztion And Validation Of 10 Mitochondrial DNA SNP Using SNaPshot Kit. 23rd World Congress, International Society for Forensic Genetics, Buenos Aires, Argentina, September 14-18, 2009