



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



HERC2 GEN POLİMORFİZMİNİN GÖZ RENGİ ÜZERİNE ETKİSİ

Yasemin KARTAL

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI**

2012- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HERC2 GEN POLİMORFİZMİNİN GÖZ RENGİ ÜZERİNE
ETKİSİ**

Yasemin KARTAL

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr Zeliha KAYAALTI

2012-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Kimya ve Adli Toksikoloji

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

02.08.2012



Jüri Başkanı

Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU
A.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü



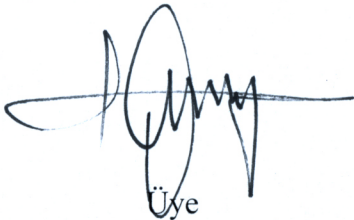
Üye

Prof. Dr. Gülin GÜVENDİK
A.Ü. Eczacılık Fakültesi



Üye

Prof. Dr. Ahmet SAYAL
G.AT.A



Üye

Prof. Dr. Şayeste DEMİREZEN
H.Ü. Fen Fakültesi



Üye

Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI
A.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Göz (Organum Visuale)	1
1.1.1. Gözün Anatomisi	1
1.2. İnsan Pigmentasyonu ve Genetik Temeli	3
1.2.1. Melanin Pigmenti	3
1.3. İris Fenotipi ve Pigment Dağılımı	6
1.4. Genotip Fenotip İlişkisi ve İnsan Göz Rengi	8
1.5. OCA2 (Oculocutaneus Albinism II)	11
1.6. HERC2 (Hect domain and RCC1-like domain-containing protein 2)	12
1.7. DNA (Deoksiribonükleik asit)	15
1.7.1. Genetik Polimorfizm	15
1.7.1.1. Polimorfizm Çeşitleri	16
1.7.1.1.1. Tek Nükleotid Değişimi (Single Nucleotide Polymorphism:SNP)	16
1.8. DNA İzolasyonu	19
1.8.1. Fenol Kloroform İzolasyonu	19
1.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction:PCR)	21
1.9.1. PCR'ın Aşamaları	22
1.9.2. Standart PCR Bileşenleri	24
1.9.3. Primerlerin Seçimi	25
1.10. Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)	26
1.10.1. Restriksiyon Endonükleaz (RE) Sınıflandırılması	28

1.11.Gen Eksprsyonu	29
2. GEREÇ VE YÖNTEM	32
2.1. Gereçler	32
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	33
2.1.3. Deney Protokolü	34
2.1.3.1. Çalışma Grubunun Seçilmesi	34
2.1.3.2. Çalışma ve Kontrol Grubundan Biyolojik Materyalin Toplanması	34
2.1.4. Yöntem	34
2.1.4.1. Göz Renginin Oluşmasında Etkili Olan HERC2 Genindeki A→G Polimorfizminin Belirlenmesi	35
2.1.4.1.1. Yöntemde Kullanılan Çözeltiler	35
2.1.4.2. HERC2 Gen Polimorfizminin Genotipinin Belirlenmesi	36
2.1.4.2.1. Svab Örneklerinden DNA İzolasyonu	36
2.1.4.2.2. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi ve %0.5'lik Agaroz Jel Hazırlanması	38
2.1.4.2.2.1. Agaroz Jel'e Yükleme İçin Örnek Hazırlanması ve Yürütme Koşulları	39
2.1.4.2.3. PCR	40
2.1.4.2.3.1. Primer Listesi	40
2.1.4.2.3.2. PCR Bileşenleri ve PCR Programı	41
2.1.4.2.3.3. PCR Ürünlerinin Jele Uygulanması ve Elektroforez	43
2.1.4.2.4. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi (RFLP)	43
2.1.4.2.4.1. Kullanılan Kesim Koşulları	43
2.1.4.2.4.2. Kesim Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezine Uygulanması ve Genotip Tayini	44
2.1.5. İstatistiksel Analiz Yöntemi	44

3.BULGULAR	45
3.1. HERC2 Genindeki A→G Polimorfizmini Belirlemek Amacıyla Yapılan Analiz Sonuçları	45
3.1.1. Genomik DNA'nın Agaroza Jel Elektroforezi ile Belirlenmesinin Sonuçları	46
3.1.2. PCR Reaksiyonu ile HERC2 Geninin Amplifikasyon Sonuçları	46
3.1.3. DraI Restriksiyon Enzimi ile Amplifiye Edilen Bölgenin Kesim Sonuçları	48
3.1.3.1. DNA Örneklerinin Genotiplendirilmesi	49
3.1.3.2. "A/A" Genotipli Homozigot Tipik Bireyler	50
3.1.3.3. "G/G" Genotipli Homozigot Atipik Bireyler	51
3.1.3.4. "A/G" Genotipli Heterozigot Bireyler	52
3.2. HERC2 Gen Polimorfizminin Araştırıldığı Açık Göz Rengine Sahip Çocuklar ile Bu Çocukların Anne ve Babalarından Oluşan Bireylerin Fenotipik ve Genotipik Açısından Değerlendirilmesi	54
3.2.1. Açık Göz Renginin Kalıtımında, Anne ve Babanın Fenotipik Etkisinin, Çocuklardaki Fenotipik Özellik Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	54
3.2.2. Açık Göz Rengine Sahip Çocuklar ile Anne ve Babalarının Genotip Frekanslarının Dağılımı	55
3.2.3. Tüm Populasyondaki Fenotip-Genotip İlişkisi	56
3.2.4. Anne, Baba ve Çocuklardaki Genotip-Fenotip İlişkisi	58
3.2.5. Çocuk Fenotipi ile Anne ve Baba Fenotipi Arasındaki İlişki	61
3.2.6. Çocuk Genotipi ile Anne ve Baba Fenotipi Arasındaki İlişki	63
3.2.7. Çalıştığımız Populasyonun Hardy-Weinberg Dengesinin Tespiti	65
4. TARTIŞMA	66
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
ÖZET	73
SUMMARY	74
KAYNAKLAR	75
EKLER	91
Ek-1	91
ÖZGEÇMİŞ	93

ÖNSÖZ

Adli yönden, olay yerinde bulunan biyolojik örneklerin analizi ile suçluya ulaşılması son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Göz rengi bireylerin belirgin fiziksel özelliklerinden birisi olduğundan, toplumumuzda göz rengini belirleyen genlerdeki polimorfizmlerle ilgili veri tabanı oluşturulması önemlidir. Bu çalışmada; toplumumuzda göz rengini belirleyen kalıtsal özelliklerin dağılımının belirlenmesi amacıyla gözleri açık renkli olan bireyler ile anne ve babalarının HERC2 genotiplerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Tez konusu seçiminde, tezimin hazırlanmasında yol gösteren, karşılaşılan sorunların çözümünde bilimsel ve sosyal desteğini her zaman yanımda hissettiğim hocam Sayın Prof. Dr. Tülin SÖYLEMEZOĞLU'na,

Çalışmalarıma yön veren, her türlü sorunda desteğini ve yardımını her zaman hissettiğim, araştırmaların ve deneylerin yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen, yetişmemi sağlayan danışmanım, sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Zeliha KAYAALTI'na,

Gerek lisans gerekse lisans sonrası eğitimimde desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Zeki AYTAÇ'a,

Üstün başarılı genç bilim insanlarını destekleyen ve teşvik eden, toplumda bilim ve teknoloji kültürünün oluşmasına yardımcı olan TÜBİTAK kurumuna, yüksek lisans programım boyunca verdiği maddi desteklerden dolayı,

Örneklerin analizleri için hazırlanmasında emeği geçen, dostluğu ve yardımıyla her zaman yanımda olduğunu hissettiğim Yrd. Doç. Dr. Ayşegül BACAKSIZ ve Dr. Bio. Dilek KAYA'ya,

Tezim için gerekli olan biyolojik materyallerin toplanması aşamasındaki yardımlarından dolayı Seher Asena GÜLPINAR, Onur DİNEK ve diğer tüm arkadaşlarıma,

Anlayış ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım yeğenim Sevilay Dilara ÖZBEK'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
bp	Baz çifti (Base pair)
C	Sitozin
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleozidtrifosfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
F primer	Forward Primer
g	Gram
G	Guanin
M	Molarite
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyumklorür
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
R primer	Reverse Primer
RE	Restriksiyon Endonükleaz
RFLP	Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizm (Single Nucleotid Polymorphism)
T	Timin
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
U	Urasil
µg/ml	Mikrogram/mililitre
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil.1.1.	Gözün anatomisi	1
Şekil.1.2.	Ömelaninin yapısal formülü	4
Şekil.1.3.	Feomelaninin yapısal formülü	4
Şekil.1.4.	Gözün uveal sisteminin bir parçası olan iris	7
Şekil.1.5.	Genotip ve fenotip	9
Şekil.1.6.	Göz rengi skalası	10
Şekil.1.7.	OCA2 geni	11
Şekil.1.8.	HERC2 geni	12
Şekil.1.9.	Tek Nükleotid Değişimi (Single Nucleotide Polymorphism: SNP)	16
Şekil.1.10.	Transisyon	17
Şekil.1.11.	Transversiyon	17
Şekil.1.12.	İnsersiyon	18
Şekil.1.13.	Delesyon	18
Şekil.1.14.	DNA izolasyonu	20
Şekil.1.15.	PCR basamakları	23
Şekil.1.16.	Taq DNA Polimeraz enzimi	24
Şekil.1.17.	RFLP tekniği ile canlılar arasındaki genetik farklılığın tespiti	27
Şekil.1.18.	Gen ekspresyonu	29
Şekil.1.19.	Gen sentezi başlama aşamasının şematik gösterimi	31
Şekil.2.1.	Agaroz jel kuyucuklarına örneklerin yüklenmesi	39
Şekil.2.2.	PCR ile çoğaltılan 226bp'lik baz dizilimi, HERC2-F ve HERC2-R primerleri	42
Şekil.3.1.	Çalışmadaki bireylerin dağılımı	45
Şekil.3.2.	Amplifikasyonunun jel görüntüsü	48
Şekil.3.3.	DraI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi ve kesim ürünlerinin şematik gösterimi	49
Şekil.3.4.	226 bp'lik amplifikasyon ürününün homozigot tipik bireylerde, DraI enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları	50
Şekil.3.5.	226 bp'lik amplifikasyon ürününün homozigot atipik bireylerde oluşan oligonükleotid uzunlukları	51

Şekil.3.6. 226 bp'lik amplifikasyon ürününün heterozigot bireylerde oluşan oligonükleotid uzunlukları	52
Şekil.3.7. Tüm populasyondaki fenotip-genotip ilişkisi	58
Şekil.3.8. Populasyonda yer alan annelerin genotip-fenotip ilişkisi	60
Şekil.3.9. Populasyonda yer alan babaların genotip-fenotip ilişkisi	60
Şekil.3.10. Populasyonda yer alan çocukların genotip-fenotip ilişkisi	61
Şekil.3.11. Çocuk fenotipi ile anne ve baba fenotipi arasındaki ilişki	63
Şekil.3.12. Çocuk genotipi ile anne ve baba fenotipi arasındaki ilişki	65
Şekil.4.1. OCA2 gen ekspresyonu	68

ÇİZELGELER

Çizelge.2.1.	Amplifikasyonda kullanılan primerler ve özellikleri	40
Çizelge.2.2.	PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları	41
Çizelge.2.3.	HERC2 gen polimorfizmi için PCR şartları	42
Çizelge.3.1.	Bireylerin fenotip frekansları	46
Çizelge.3.2.	PCR’da kullanılan primerler, kromozom üzerindeki lokalizasyonları ve amplifiye edilen bölgenin nükleotid dizilimi	47
Çizelge.3.3.	DraI enzimi ile kesilen baz çiftlerinin bant uzunlukları	53
Çizelge.3.4.	HERC2 gen polimorfizmi ile oluşan genotip ve alel frekansları	54
Çizelge.3.5.	Bireylerin fenotipik açıdan değerlendirilmesi	55
Çizelge.3.6.	Çocuklar ile anne ve babalarına ait genotip frekanslarının dağılımı	56
Çizelge.3.7.	Tüm populasyonun fenotip-genotip ilişkisi	57
Çizelge.3.8.	Anne, baba ve çocuklardaki genotip-fenotip ilişkisi	59
Çizelge.3.9.	Çocuk fenotipi ile anne ve baba fenotipi arasındaki ilişki	62
Çizelge.3.10.	Çocuk genotipi ile anne ve baba fenotipi arasındaki ilişki	64
Çizelge.3.11.	Çalışma grubumuzun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti	65

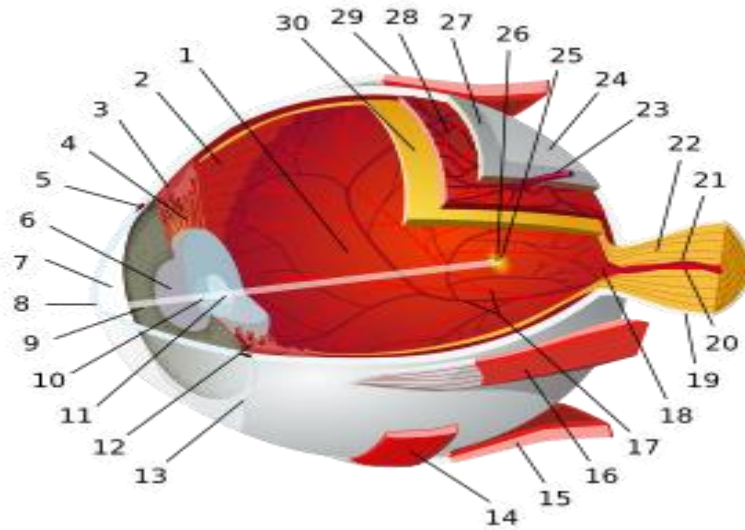
1. GİRİŞ

1.1. Göz (ORGANUM VISUALE)

Göz çukurunda yer alan, görmeyi sağlayan, küremsi bir organ olan göz; yüzey ektodermi ve bundan türeyen nöral tomurcuk ile nöral ektoderm ve mezodermden meydana gelmiştir.

1.1.1. Gözün Anatomisi

Göz birbirinden farklı iki ayrı sistemden oluşmaktadır. Bunlardan birincisi yüzey ektodermi ile nöral tomurcuktan köken alan ve görüntüyü retina üzerine düşüren "optik sistem" diğeri ise nöral ektodermden köken alan ve görüntüyü görme merkezine ileten "sinirsel sistem"dır (Güllülü ve Kıvanç, 2010) (Şekil.1.1).



Şekil.1.1. Gözün anatomisi (<http://www.science.howstuffworks.com>).

1-arka oda, 2-ora serrata, 3-silier kası, 4-kirpiksi bölge, 5-Schlemm kanalı, 6-göz bebeği, 7-ön oda , 8-kornea, 9-iris, 10-lens korteksi, 11-lens çekirdeği, 12-silier cisim (kirpiksi cisim) , 13-konjunktiva, 14-alt oblik kası, 15-alt rektus kası, 16-medial rektus kası, 17-retinal arter ve venler, 18- optik disk, 19-dura mater, 20-santral retinal arter, 21-santral retinal ven, 22-optik sinir, 23-vortikoz veni (göz koroid veni) , 24- Tenon kapsülü, 25-makula, 26-fovea, 27-sklera, 28-koroid (damar tabakası) , 29-süperior rektus kası, 30-retina.

Göz küresi dıştan içe doğru destekleyici (fibröz), vasküler ve retinal olmak üzere üç tabakadan meydana gelmiştir.

Destekleyici (Fibröz) tabaka: Fibröz bağ dokudan meydana gelmiş, kalın ve dayanıklı bir tabakadır. Bu tabakanın 5/6'sı gibi önemli bir kısmı beyaz ve opak olan sklera (sclera), 1/6'sı ise saydam korneadan (cornea) meydana gelmiştir. Sklera gözün beyaz kısmını oluşturur ve daha iç tabakaları korur. Kornea ise ışığın göze girdiği yerdir. Kornea sinir yönünden zengin olmasına rağmen kan ve lenf damarları ihtiva etmez. Doku reddinde rol oynayan lenfositler bulunmadığı için kornea transplantasyonları yaklaşık %95 oranında başarı ile sonuçlanır.

Vasküler tabaka: Kan damarları yönünden zengin olduğu için bu adı almıştır. Bu tabaka sklera ile retina arasında bulunur ve kan damarlarınca zengindir. Vasküler tabakanın anteriorunda kalın corpus ciliare (silyer kısım) bulunur. Burada düz kaslar mevcuttur. Bu kaslara lens (mercek) de tutunur. Gözün renkli kısmı olan iris arkasında yer alan, yaklaşık bir cm çapında olan lens kan damarı ihtiva etmeyen epitel hücrelerden meydana gelmiştir. Koroid tabakasının önünde ince bir kas tabakası bulunur. Gözün rengini belirleyen bu renkli kas tabakası iris olarak adlandırılır. İris göze giren ışığın miktarını ayarlayan bir diyafram gibi iş görür.

Retinal tabaka: En içteki ışığa duyarlı, özelleşmiş sinir hücreleri açısından meydana gelmiş tabakadır. Retina tabakası beyne, bir milyondan fazla sinir ile bağlantısı olan optik sinirle bağlanır. Retina sinir dokudan oluşmuş kalın bir nöroretina tabakasına sahiptir. Nöroretina, ışık dalgalarının alınması, sinir impulsları halinde beyne iletilmesi ve görme duyusuna çevrilmesi görevini yapar. Optik sinirin göz yuvarlağından çıktığı yani reseptörlerin bulunduğu retinayı deldiği bölgede, reseptörler olmadığı ve görüntü meydana gelmediği için buraya "kör nokta" denir. Göz merceğinin asal ekseninin retina ile kesiştiği bölgede görme reseptörleri yoğunlaşmıştır. Ölüm gerçekleştiğinde burası sarı bir noktaya dönüştüğü için buraya "sarı benek" adı verilir. Sarı beneğin yani görmenin yoğun olarak gerçekleştiği bölgenin orta kısmında koni reseptörleri çevresinde ise çomak reseptörleri yerleşmiştir. Çomak reseptörleri cismin şeklini algılar ve alacakaranlıkta görmeyi

sağlarken koni reseptörleri renge karşı duyarlıdır. Ayrıca koni reseptörleri ayrıntılı görmeyi de sağlamaktadır (Güllülü ve Kıvanç, 2010).

1.2. İnsan Pigmentasyonu ve Genetik Temeli

Bireylerin görünüşlerinin en bariz tanımlayıcıları rengi, boyu ve yüz özellikleridir. Pigmentasyon gibi insan fenotipik özellikleri genomda ya da sadece bir gende meydana gelen tek bir varyasyona bağlı değildir. Kompleks özelliklerin bu poligenik doğası genlerin çeşitliliğinde etkili olan tek nükleotid polimorfizmlerin (Single Nucleotid Polymorphism: SNP) sayısından etkilenmektedir. Ayrıca DNA metilasyonu ve kopya varyantlar gibi ek genetik varyasyonlar da bu fenotiplerin çeşitliliğine katkıda bulunabilir (Daal, 2008).

Fiziksel bir özellik olan insan göz rengi birden çok genin etkilediği polimorfik bir fenotiptir (Sturm ve Frudakis, 2004). Genellikle Mendel kalıtımının dominant ya da resesif kurallarına uygun olarak kalıtıldığı düşünülen göz rengi, kolayca gözlemlenebilen bir karakter olduğu için insan genetiğine dair yapılan kantitatif çalışmalara en başından beri örnek teşkil etmiştir. 19. yüzyılın sonlarında İngiltere'deki Galton ve Avrupa'daki Candolle, ailelerdeki göz rengi aktarımının alternatif fenotipik doğasını, nesiller arasındaki frekans sürekliliğini ve irisin koyu ile açık formlara ayrılmasının önemini anlatmıştır (Galton, 1886).

1.2.1. Melanin

İnsan pigmentasyonu, fonksiyonları içinde fotokoruma da olan melanin pigmentinin miktarı ve tipi ile belirlenir (Daal, 2008). Dolayısıyla bireyler arasındaki göz rengi çeşitliliği melanin pigmentinin miktarına, türüne, melanozom sayısına ve bu melanozomların dağılımındaki farklılıklara bağlıdır (Imesch ve ark., 1996; Wielgus ve Sarna, 2005).

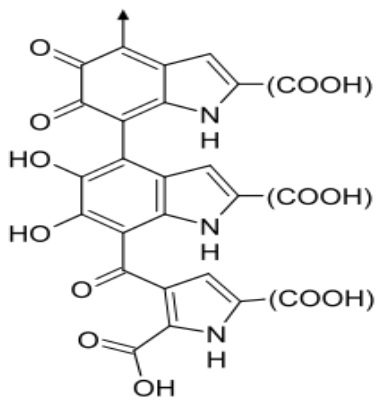
Melanin biyosentezi, özel post-golgi lizozomal organeli içinde bulunan ve melanositin endoplazmik retikulumundan orijin alan melanozomlarda gerçekleşmektedir (Meyskens ve ark., 2001; Nappi ve Vass, 1996; Daal, 2008).

Yüksek farklılaşma özelliğine sahip, dendritik hücreler olan melanositler ışık mikroskobu altında saydam hücreler olarak görülürler (Carranza ve Newmann, 1996; Hakinen ve Larjava, 2000; Sulaimon ve Kitchell, 2003).

Melanositler; deride epidermisin bazal tabakasında, gözde retinal pigment epiteli ve gözbebeğinin renkli iç zarında, saç matriksinde ise damarsal alan ile mukoza membranında bulunurlar (Jimbow ve ark., 1995).

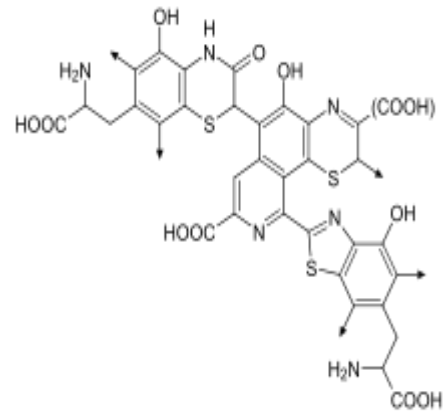
Melanositlerin orijinine dair geçmişte birçok görüş ileri sürülmüşse de bu gün, Rawles tarafından 1953 yılında ortaya atılan ve bu hücrelerin neural crest'den orijin aldığı yönünde olan görüş kabul görmektedir (Barrett ve Scully, 1994; Mayer, 1973; Robins, 1991).

Melanin üretimindeki biyolojik süreç olan melanogenezis ise çok sayıdaki proteinlerin etkileşimini içermektedir ve iki yolakla gerçekleştirilmektedir. Birinci yolağın sonunda koyu bir pigment (kahverengi-siyah) olan ömelanin (Şekil.1.2) diğer yolağın sonunda ise açık renk bir pigment (kırmızı-sarı) olan feomelanin (Şekil.1.3) oluşur (Sturm ve Frudakis, 2004).



Şekil.1.2. Ömelaninin yapısal formülü.

(<http://www.en.wikipedia.org/wiki/Melanin>)



Şekil.1.3. Feomelaninin yapısal formülü.

(<http://www.en.wikipedia.org/wiki/Melanin>)

Vücutta pigment oluşumundan sorumlu enzim Tirozinaz (TYR)dır. Dolayısıyla melanogenezisi başlatan ve kromozomda 11q14-q21 noktalarında bulunan tirozinaz (Sturm ve ark., 2001) fonksiyon gösteremediği zaman pigment üretimi olmaz (Kayser ve ark., 2008).

Melaninin oluşumundaki temel enzim olan TYR tirosini dihidroksifenilalanine (DOPA) ve onuda dopakinona dönüştürmekle görevlidir. Dopakinon ise ömelanini ya da feomelanini oluşturur. Sistein varlığında reaksiyon sonucunda feomelanin oluşur. Dolayısıyla esansiyel bir aminoasit olmamasına rağmen ve eksikliği nadiren görülen sisteinin yoksunluğunda feomelanin üretimi durur. Dopakrom tautomeraz, TYR ve TYR bağlı protein 1 varlığında ise kimyasal yol sonucunda ömelanin oluşmaktadır. Dolayısıyla bu proteinler eğer doğru kodlanmazsa ömelanin üretimi engellenebilir. Böylece açık göz rengi oluşumu gözlenebilir (Sturm ve Frudakis, 2004; Galton, 1886; Imesch ve ark., 1996; Wielgus ve Sarna, 2005; Sturm ve ark., 2001; Kayser ve ark., 2008; Frudakis ve ark., 2003).

Melanin üretiminin bütünüyle durması durumunda, bütün vücutta albinizm görülür. TYR renk için kodlama yapmasa bile fonksiyon dışı bu TYR pigmentasyondan sorumlu diğer genleri maskeler. Bebeklerde pigment dağılımı sırasında sistein veya metiyonin açısından fakir besin alınımı söz konusu olduğunda bu aminoasit eksikliği giderilinceye kadar çocukların göz rengi bu durumdan etkilenir. Bu durumda, pleiotropik etkiler göz rengini değiştirir (Frudakis ve ark., 2003).

Bir melanozom transmembran G protein çifti reseptörü olan insan melanokortin-1 reseptörü (MC1R) ömelaninden feomelanine sentez geçişini kontrol eden mekanizmada düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Ayrıca MCR1 normal pigment çeşitliliği ile ilişkili ilk insan geni olarak tespit edilmiştir (Daal, 2008).

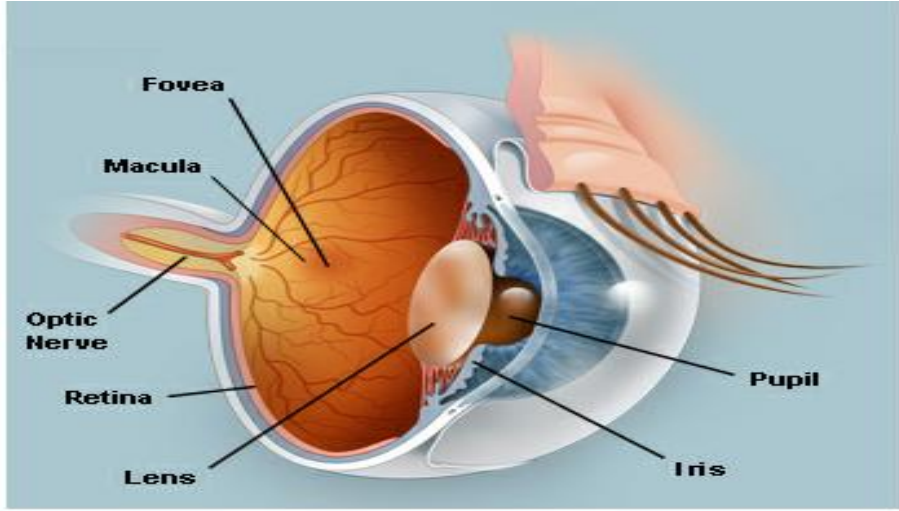
Adli antropologlar insan iskelet kalıntılarından etnik köken, cinsiyet ve boy gibi fiziksel karakterleri belirleyebilirler. Fakat pigment görünüşü ile ilgili özellikleri belirleyemezler. Bu karakterler büyük ölçüde genetik olarak belirlenir (Branicki ve

ark., 2009; Anno ve ark., 2008; Eiberg ve ark., 2008; Eriksson ve ark., 2010; - Liu ve ark., 2010; Sturm ve ark.,2008; Valenzuela ve ark., 2010; Yang ve ark., 2010). Bunun için melanozomun iç yüzeyindeki tirozinaz enzim kompleksinin oluşumunu, hormonal ve çevresel düzenlemeyi, melanoblast göçü ve farklılaşmasını, melanozom içindeki yeni proteinlerin hücre içi yönlendirilmesini ve melanozomların dendritik kollarıyla keratinositlere doğru yer değiştirmesini içeren birçok biyokimyasal yolakda yer alan insan pigmentasyon genlerinden faydalanılır (Eiberg ve ark., 1996). Bu açıdan göz, saç ve deri rengi ya da boy gibi fiziksel karakterlerle ilişkili SNP genotiplemesinin Adli bilimler alanında yakın gelecekte kişisel kimliklendirme için yararlı bir araç olması beklenmektedir (Iida ve ark., 2009).

1.3. İris Fenotipi ve Pigment Dağılımı

İnsan göz rengi hakkında yapılan çalışmaların temelinde gelişim biyolojisi, morfoloji, kimya ve yapının genetik belirleyicisi olarak bilinen ve gözün uveal sisteminin bir parçası olan iris yer almaktadır (Forrester ve ark., 2008) (Şekil.1.4).

Gevşek bir bağ dokusu olan iris; stroma fibroblastları, melanositler, kollagen fibril proteinleri (tipI,III;VI ve XVIII), glikozaminoglikanlar ile makrofaj ve mast hücreleri gibi immunolojik hücrelerden oluşmaktadır (Maatta ve ark., 2007; May, 1999; Mcmenamin, 1997; Rittig ve ark., 1990).



Şekil.1.4. Gözün uveal sisteminin bir parçası olan iris (<http://www.webmd.com/eye-health/picture-of-the-eyes>).

İris;

- ✓ Anterior sınır tabakası (anterior katmanı),
- ✓ Stroma,
- ✓ Sfinkter ve dilatör kas fibrilleri,
- ✓ Posterior pigment epitali olmak üzere beş hücre tabakasından oluşur.

Göz renginin görünümündeki en önemli yapılar anterior tabakası ve altındaki stromada yer alır (Imesch ve ark., 1996; Eagle, 1988; Wilkerson ve ark., 1996).

Pek çok farklı özellik içeren iris dokusu kompleks bir desenlenme formuna sahiptir. Bu desenlenme otomatik kişisel tanımlamada kullanılabilir. Tanımlamada pin kodu yerine irisi kullanan bankaların sayısı giderek artmaktadır. İngiltere'ye seyahat eden en az 1 milyondan fazla kişinin iris desenlemesi video kamera yardımıyla kayıt edilecek ve bu kayıt yetkili bir kişi tarafından veri tabanı ile karşılaştırılacaktır. Böylece ülkeye pasaport ya da kimlik göstermeden giriş mümkün olabilecektir (Daugman, 2006). Ayrıca iriste yer alan doku markerlarının oküler melanoma, glokom (Chang ve ark., 1999), pigment dağılımı ve Psödoeksfolyasyon sendromu (Asano ve ark., 1995) gibi göz hastalıklarının yanı sıra beyin iris gelişimiyle bağlantısı olduğu iddia edilen Down sendromu (Donaldson, 1961), Nörofibromatozis tip 1 (Lee ve Stephenson, 2007), Gillespie sendromu (Marien ve ark., 2008; Ticho ve

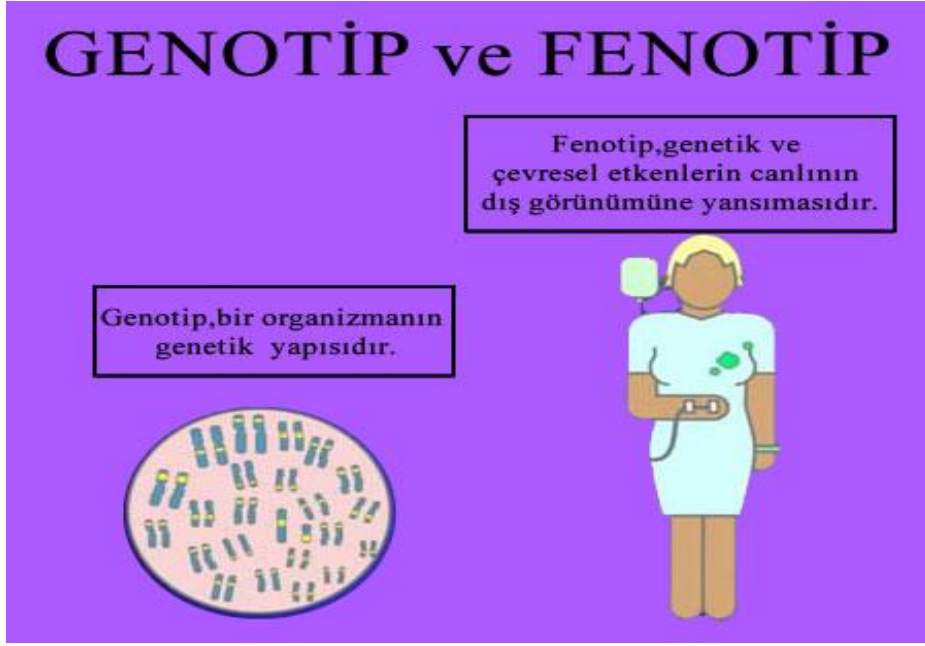
ark., 2006) gibi nörolojik hastalıklarla da bağlantısı vardır. Bununla birlikte iriste yer alan genlerin ifadesi farklı iris desenlemesine katkıda bulunan genlerin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Daugman, 2006; Chang ve ark., 1999; Asano ve ark., 1995; Donaldson, 1961; Lee ve Stephenson, 2007; Marien ve ark., 2008; Ticho ve ark., 2006).

Göz renklerinin çeşitliliği iriste yer alan melanin pigmentinin dağılımı ve sayısındaki çeşitlilik sonucunda oluşmaktadır. İnsanlardaki en dikkat çekici göz rengi çeşitliliği beyaz ırktakiler arasında bulunmuştur. Mavi/kahverengi göz rengi genetiğinin genel olarak monogenik kalıtım gösterdiği düşünülmektedir. Ancak göz rengi genetiğinin daha kompleks bir genetiğe sahip olması iriste yer alan pigmentlerin dağılımı ve kontrastındaki çeşitlilikten kaynaklanmaktadır (Sturm ve ark., 2001; Eiberg ve Mohr, 1996; Duffy ve ark., 2007; Zhu ve ark., 2004; Posthuma ve ark., 2006).

İris rengindeki değişkenlik ömelanin ve feomelaninin oranlarındaki değişkenlikle bağlantı gösterir (Frudakis ve ark., 2007). Çünkü iris doğrudan ya da dolaylı olarak ömelaninin tirozinden biyosentezini içermektedir (Sturm ve ark., 2001; Gardner ve ark., 1992; Durham-Pierre ve ark., 1994; Durham-Pierre ve ark., 1996; Hamabe ve ark., 1991; Chintamaneni ve ark., 1991; Abbott ve ark., 1991; Boissy ve ark., 1996; Robbins ve ark., 1993; Smith ve ark., 1998; Flanagan ve ark., 2000). Yeşil iris feomelanin ile, kahverengi iris ömelanin ile, karışık göz rengi ise bu ikisinin karışımı ile ilişki gösterirken, mavi iris bunların daha az miktarda bulunması halinde gözlenebilmektedir (Frudakis ve ark., 2007).

1.4. Genotip Fenotip İlişkisi ve İnsan Göz Rengi

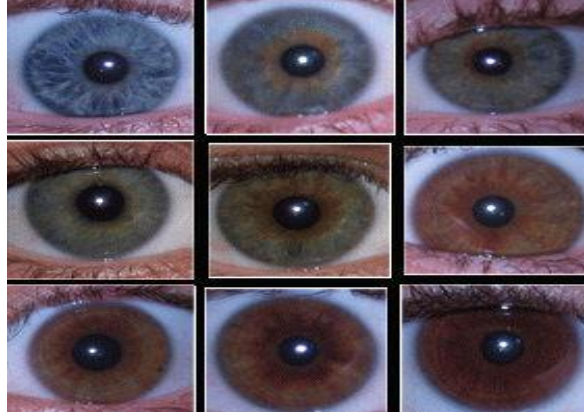
Bir bireyin görünüşünü hem kalıtımı hem de çevresel faktörler etkiler. Bu iki durum gelişmenin her basamağında canlı üzerinde etkisini gösterir. Farklı ortam koşulları bir canlının fenotipini değiştirebilir. Fakat bu değişiklik kalıtsal değildir. Çünkü bu sırada genler değişmez, sadece genlerin işleyişi değişir (Şekil.1.5).



Şekil.1.5.Genotip ve fenotip.

Göz rengi genellikle Mendel kalıtımına göre modellendirilir (Hurst, 1908). Fakat yapılan birçok araştırma ve gözlem bunun böyle klasik bir yol izlemediğini göstermiştir. Çünkü göz rengi fenotipi epistaz ve eksik dominantlık göstermektedir (White ve Smith, 2010).

Göz rengi çeşitliliği içinde kahverenginin çeşitli tonları, ela, yeşil, mavi, gri ve bazı nadir durumlarda mor ve kırmızı bulunmaktadır (Şekil.1.6). Geleneksel görüşe göre kahverengi göz rengini kodlayan alel yeşil ya da mavi göz rengini kodlayan alele, yeşil göz rengini kodlayan alel ise mavi göz rengini kodlayan alele baskındır (Redei, 2008).

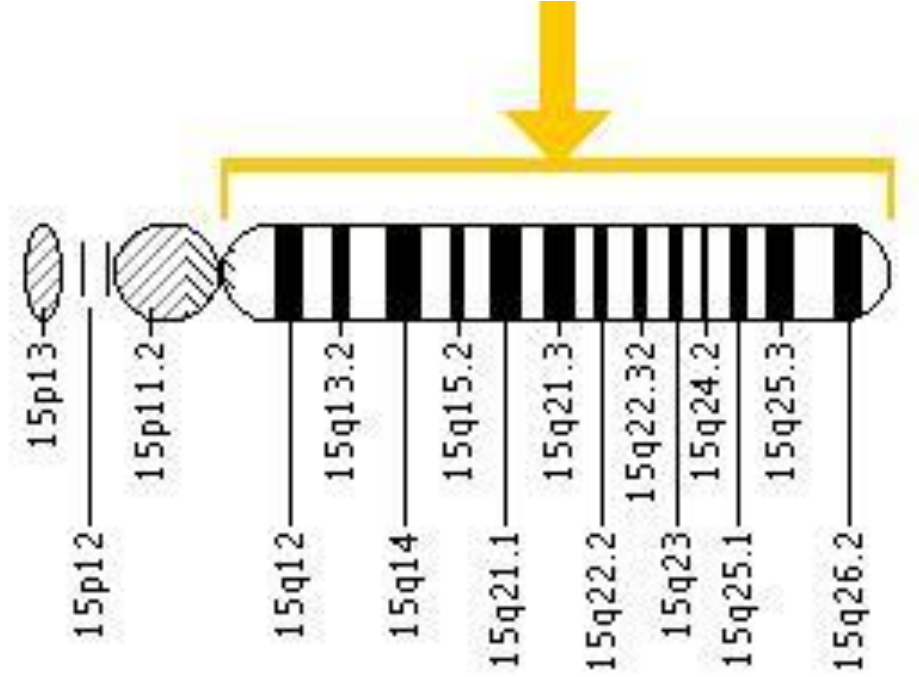


Şekil.1.6.Göz rengi skalası (Sturm ve Frudakis, 2004).

Gözün anterior tabakasında ve stromasında yer alan melanositler sitoplazmalarında melanin bulundurmaktadır. Melanin vücudun geri kalan kısmında ise hücrelerden salgılanır. Göz rengi farklı olan bireylerde melanosit sayısı farklı değildir. Çünkü göz rengini sitoplazmadaki melanin miktarı ve bu melaninin özelliği belirlemektedir. Işık melaninden geçerken görünür ışığın büyük bir kısmı retina tarafından emilmektedir. Daha az melanin içeren hücrelerde görünür ışık daha fazla yansıtılır. Kırmızı ve menekşe göz rengi pigmentasyon olmadığı takdirde gerçekleşmektedir. Kırmızı görünüm gözün kan damarlarındaki ışık yansımından ötürü oluşmaktadır. Menekşe rengi ise güçlü bir mavi rengi oluşturmak için çok az bir pigment varsa bu kırmızı yansıma ile az olan mavi etkileşime girdiğinde oluşmaktadır (Sturm ve Frudakis, 2004).

Göz rengi oluşumundan 16 farklı gen sorumludur. Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalara göre göz renginin oluşumundan 2 önemli gen sorumludur: Hect domain and RCC1-like domain-containing protein 2 (HERC2) ve oculocutaneous albinism (OCA2) (Sturm ve Frudakis, 2004; White ve Smith, 2010; Duffy ve ark., 2007; Sulem ve ark., 2007).

1.5. OCA2 (Oculocutaneous Albinism II) :



Şekil.1.7. OCA2 geni (<http://www.ghr.nlm.nih.gov/gene/OCA2>).

15. Kromozomun 15q21.3 bölgesinde lokalize olan ve 345 kilobazın üzerinde olan insan OCA2 geni, 24 ekzondan oluşmuştur (Şekil.1.7).

OCA2 geni 838 amino asitten oluşan ve bir integral melanozomal membran proteinini olan P proteinini kodlamaktadır (Lee ve ark., 1995). P proteinini ise melanozomların olgunlaşmasında yer alan en önemli taşıyıcı proteindir. Dolayısıyla, melanositlerde yer alan melaninin miktarını ve kalitesini etkiler. P proteinini melanozomları taşıdığı için membran ilişkili taşıyıcı proteinlere benzerlik göstermektedir. Fakat bu proteinler aynı zamanda pH'ı da kontrol etmektedir. Ayrıca farelerde ve insanlarda pigmentasyonda önemli rol oynayan P proteinini fonksiyonel olmadığı durumlarda albinizm ortaya çıkmaktadır (Sturm ve Frudakis, 2004; Brilliant, 2001; Rinchik ve ark., 1993).

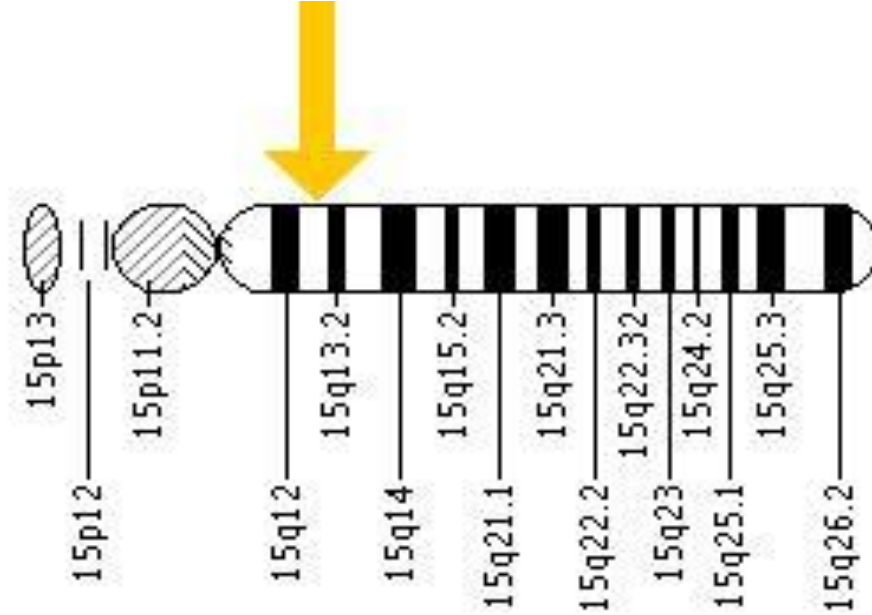
OCA2 geni göz rengi ifadesi için çok sayıda bölge içermektedir. Bu gen üzerinde göz rengi açısından 300'den fazla tek nükleotid polimorfizmi bulunmuştur fakat bunların sonuçlarının sınıflandırılması çok zor olmuştur. Bu gen, kahverengi göz

rengi ve ela göz rengi için temel kodlama bölgesi içerir (Sturm ve Frudakis, 2004; Frudakis ve ark., 2003).

OCA2'nin ekspresyonundaki azalma melanozomların olgunlaşmasını etkilemektedir. Melanin paketleme ve taşıma işlemi esnasında çok miktarda P proteini mevcut değilse koyu renkli pigment olan melaninin kalitesinde azalma gözlenmektedir (Rinchik ve ark., 1993).

OCA2 proteinin fonksiyonunun ne olduğu tam olarak bilinmemektedir fakat Na^+/H^+ antiporterları (Ancans ve ark., 2001) ya da glutamat taşıyıcısı (Lamoreux ve ark., 1995) olduğu öne sürülmüştür. Fonksiyonların her ikisinde OCA2'nin melanin biyosentezinde tirozinaza substrat tedarik ettiğini gösterir (Ancans ve ark., 2001).

1.6. HERC2 (Hect domain and RCC1-like domain-containing protein 2):



Şekil.1.8. HERC2 geni (<http://www.ghr.nlm.nih.gov/gene/HERC2>).

15. Kromozomun 15q13.2 bölgesinde lokalize olan insan HERC2 geni, 93 ekzonu kapsayan 250 kilobazdan oluşmuştur (Şekil.1.8).

HERC2 geni, 4834 amino asitten oluşan bir polipeptidi kodlamaktadır (Eiberg ve ark., 2008; Sturm ve ark., 2008). HERC2 geninin fonksiyonu tam anlamıyla bilinmemektedir fakat bu gen spermatogenez, ubiquitin aracılı proteoliz ve hücre içi taşımacılığında yer alan iyi korunmuş fonksiyonel proteinleri de kodlamaktadır (Yonggang ve ark., 2000).

HERC2 geninin intron 86 noktasında mavi-kahverengi göz rengi ile çok ilişkili bir SNP (rs12913832 A/G) bulunmuştur (Eiberg ve ark., 2008; Sturm ve ark., 2008).

HERC2 geninin intron 86 noktası OCA2 geninin iyi korunmuş kuvvetlendirici bölgelerini içerir. rs12913832 adlı tek nükleotid polimorfizmi ön görülen transkripsiyon faktörü bağlayıcı bölgede yer alır. Bu yüzden G aleli bakımından homozigot olan bireylerde OCA2 geninin ifadesi yapılamaz. Bu nedenle melanin seviyesinde azalma olur. Böylece açık göz rengi oluşumu gözlenmektedir (Sturm ve ark., 2008).

İntronlar (kodlama yapmayan nükleotid dizileri) genellikle DNA açısından işlevsiz gibi görülüyor olmasına rağmen HERC2 geninde yer alan intron 86, OCA2 geninin gen ifadesini düzenlemektedir (Kayser ve ark., 2008 Eiberg ve ark., 2008; Sturm ve ark., 2008). Çünkü HERC geninde yer alan bir intron, OCA2 geni için promotor bölge içerdiğinden onun ekspresyonunu yani gen ifadesini etkilemektedir. Bu yüzden, bu iki genin her birinde gerçekleşen tek nükleotid polimorfizmi bireyin göz renginin oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca genetik ekspresyon sırasında bazı anormallikler de meydana gelebilir. Bazı bireylerin her bir gözünde ayrı 2 fenotipik ifade görülmesine ya da pigmentasyonun tamamlanmamasına neden olabilir (oküler albinizm). Ayrıca farklı gen ifadelerin ortaya çıkmasında evrim ve populasyon da önemli rol oynamaktadır (White ve Smith, 2010).

Göz rengi fenotipinin epistaz ve eksik dominantlık gösterdiğine değinmiştik. Bu epistaz HERC2 geninin OCA2 geni tarafından üretilen ürünleri etkilemesini sağlamaktadır. OCA2 geni kahverengi göz rengi için gerekli aleli içerse bile HERC2 geninin intron 86 noktasında görülen bir SNP, OCA2 geninin gen ifadesini engeller. Ekspresyonun azalması eksik dominantlığa neden olabilir. Tam bir dominantlık görülmediğinde gri, mavi ve kahverenginin açık tonları ya da bu fenotiplerden ikisinin bir karışımı görülür (Sturm ve ark., 2001).

HERC2 geninde meydana gelen bir mutasyon, OCA2 geni tarafından kodlanan P proteinin ifadesini azaltmaktadır. Bu durum P proteini ile etkileşim olmadan bile HERC2 geninde meydana gelen delesyonların, melanin miktarında azalmaya neden yol açtığını açıklamaktadır (White ve Smith, 2010).

İnsanlarda OCA2-HERC2 lokusundaki kısmi delesyonlar sonucunda Prader-Willi ve Angelman sendromu oluşmaktadır. Çeşitli durumlarda her iki sendrom oculocutaneous albinism ya da pigment azlığıyla ilişkilidir (Spritz ve ark., 1997). Prader-Willi sendromu baba tarafından kalıtımı sağlanırken, Angelman sendromu ise anne tarafından kalıtım gösterir (Cassidy ve Driscoll, 2009; Gardner ve ark., 1992; Knoll ve ark., 1990; Oetting ve King, 1999). Bu sendromlar sonucunda hipopigmentasyon görülmektedir. Bununla beraber gelişimde gecikme, nöbetler ve çocuksu davranışlar da oluşmaktadır (Kayser ve ark., 2008; Garcia ve Rosa, 2005).

Son dönemlerde bireylerin göz renginin tespitinde 2 adli test sistemi kullanılmaktadır. Bu işlemde rs12913832 adlı SNP'den geliştirilen önemli bir göz rengi markeri (belirteci) kullanılmaktadır. Her iki sistem sadece Avrupa popülasyonundan elde edilen veriler üzerine kurulmuştur. Burada farklı popülasyonlardan alınan 554 örnek üzerinde rs12913832 adlı SNP'yi de içeren 7 SNP valide edilmiştir. Validasyonu yapılan bu SNP'ler göz ve deri renginin tanımlanmasında kullanılmıştır. Ayrıca bu işlem popülasyondaki bu bağlantıdan bağımsız tüm bireylerde kullanılmıştır ve tanımlamadaki hata verme oranı oldukça düşüktür. Bunun sonucunda bu 7 SNP, insan kalıntılarının tanımlanmasında kolaylık sağladığı için adli testlerde kullanılmak için iyi birer adaydır (Mengel ve ark., 2010; Walsh ve ark., 2010).

Yapılan son alışmalar OCA2 geninin st kısmında yer alan HERC2 geninin iris renginin belirlenmesinde baskın rol oynadığını göstermiştir. Dolayısıyla HERC2 geninin göz renginde daha güçlü bir bağlantıya sahip olduğu tespit edilmiştir (Kayser ve ark., 2008; Sturm ve ark., 2008; Eiberg ve ark., 2008).

1.7. DNA

1.7.1. Genetik Polimorfizm

DNA (Deoksiribonükleik asit) molekülü üzerinde yer alan ve herhangi bir ürünün sentezi için gerekli bilgiyi içeren spesifik nükleotid bölgesine gen adı verilir. Bir genin belli bir lokusta yer alan alternatif kopyalarından her birine ise alel adı verilmektedir. Ayrıca belirli bir lokustaki gen çiftini oluşturan aleller birbirinin aynısı ise bunlara homozigot, farklı ise heterozigot denir.

Normal bir popülasyonda bir karakter için iki veya daha fazla fenotip bulunuyorsa ve fenotiplerden her biri popülasyonda %1'den daha büyük sıklıkla görülüyorsa bu duruma “genetik polimorfizm”, bulunma sıklığı %1'den daha az olursa “genetik mutasyon” adı verilir.

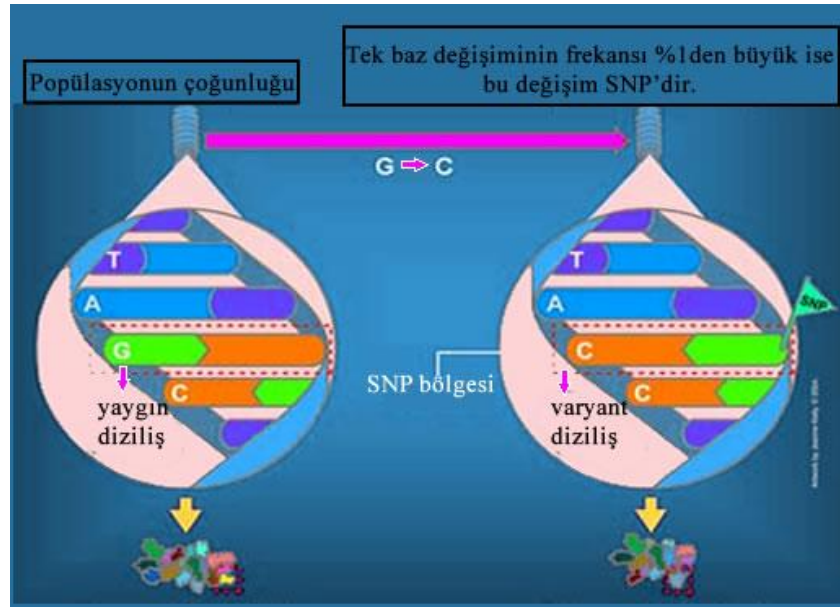
Organizmanın fenotipinde gözlenen değişimler genetik çeşitlilikle sağlanmaktadır. Fenotip bir genotipin morfolojik, klinik, biyokimyasal veya moleküler özellik olarak gözlenebilen ekspresyonudur. İnsanlar arasındaki fenotipik farklılıkların nedeni, DNA'da kodlanan genetik değişiklikler veya genetik olmayan çevresel farklılıklardır. Herhangi iki insanın DNA dizisi yaklaşık % 99.9 özdeştir. Geriye kalan küçük bir kısım ise farklıdır ve insanlar arasında genetik olarak belirlenen çeşitlilikten sorumludur (Gonzalez,1999; Nelson ve ark., 1996).

1.7.1.1. Polimorfizm Çeşitleri

Toplumun en az % 1'inde görülen ve genetik yapıda değişimlere neden olan polimorfizmler oluş nedenlerine göre;

- ⊗ Tek nükleotid değişimi (Single Nucleotide Polymorphism-SNP),
- ⊗ İnsersiyon,
- ⊗ Delesyon olmak üzere üç grupta incelenirler.

1.7.1.1.1. Tek Nükleotid Değişimi (Single Nucleotide Polymorphism: SNP):

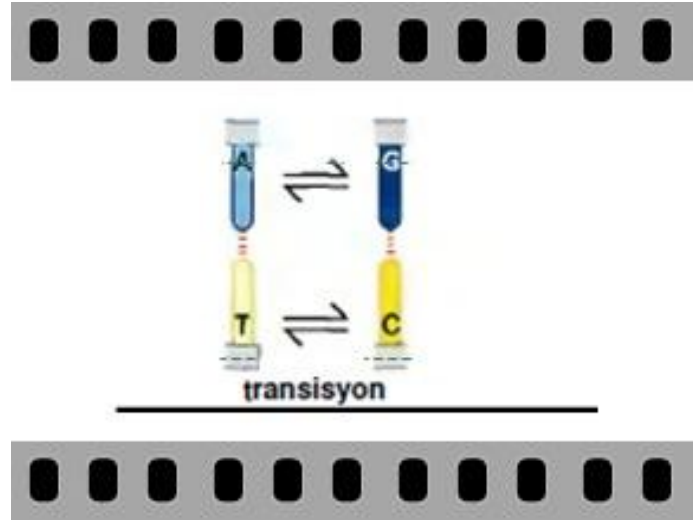


Şekil.1.9. Tek Nükleotid Değişim (Single Nucleotide Polymorphism: SNP)

(<http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer>)

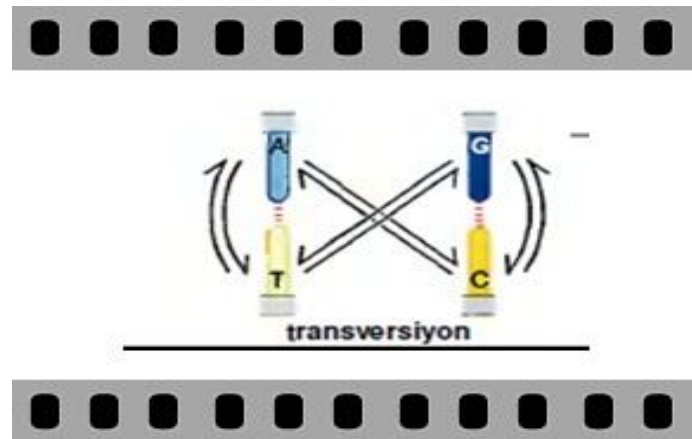
SNP'ler genetik bir lokusta farklı aleller oluşturacak biçimde spesifik bir bölgedeki bir baz veya bazlarda meydana gelen nokta mutasyonlarının neden olduğu polimorfizmlerdir (Şekil.1.9). İnsan genomundaki en basit ve en yaygın genetik polimorfizm çeşidi olan SNP'ler bazı alt gruplara ayrılırlar:

Transisyon: Dizi içindeki bir pürin bazının (A, G) diğer bir pürin bazına veya bir pirimidin bazının (T, C) diğer bir pirimidin bazına dönüşmesine transisyon denir (Şekil.1.10).



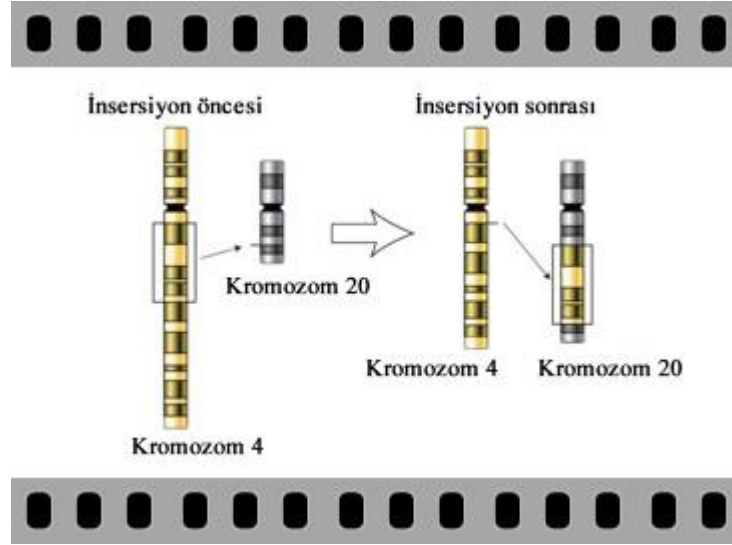
Şekil.1.10. Transisyon

Transversiyon: Dizi içindeki bir pürin bazının (A,G) bir pirimidin bazına (T,C) veya bir pirimidin bazının bir pürin bazına dönüşmesine transversiyon denir (Şekil.1.11).



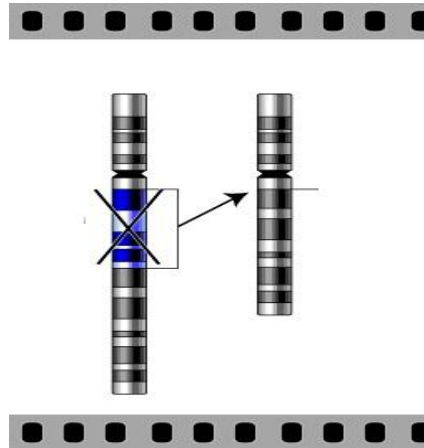
Şekil.1.11. Transversiyon

İnsersiyon: DNA içerisinde tek bir nükleotid ya da nükleotidlerin eklenmesine insersiyon denilmektedir (Şekil.1.12).



Şekil.1.12. İnsersiyon (<http://www.tr.wikipedia.org/wiki/insersiyon>).

Delesyonlar: DNA dizisi içerisinde tek bir nükleotidin ya da nükleotidlerin kırılıp ayrılması delesyon olarak adlandırılmaktadır (Emir ve Özden, 2006) (Şekil.1.13).



Şekil.1.13. Delesyon (<http://www.tr.wikipedia.org/wiki/delesyon>).

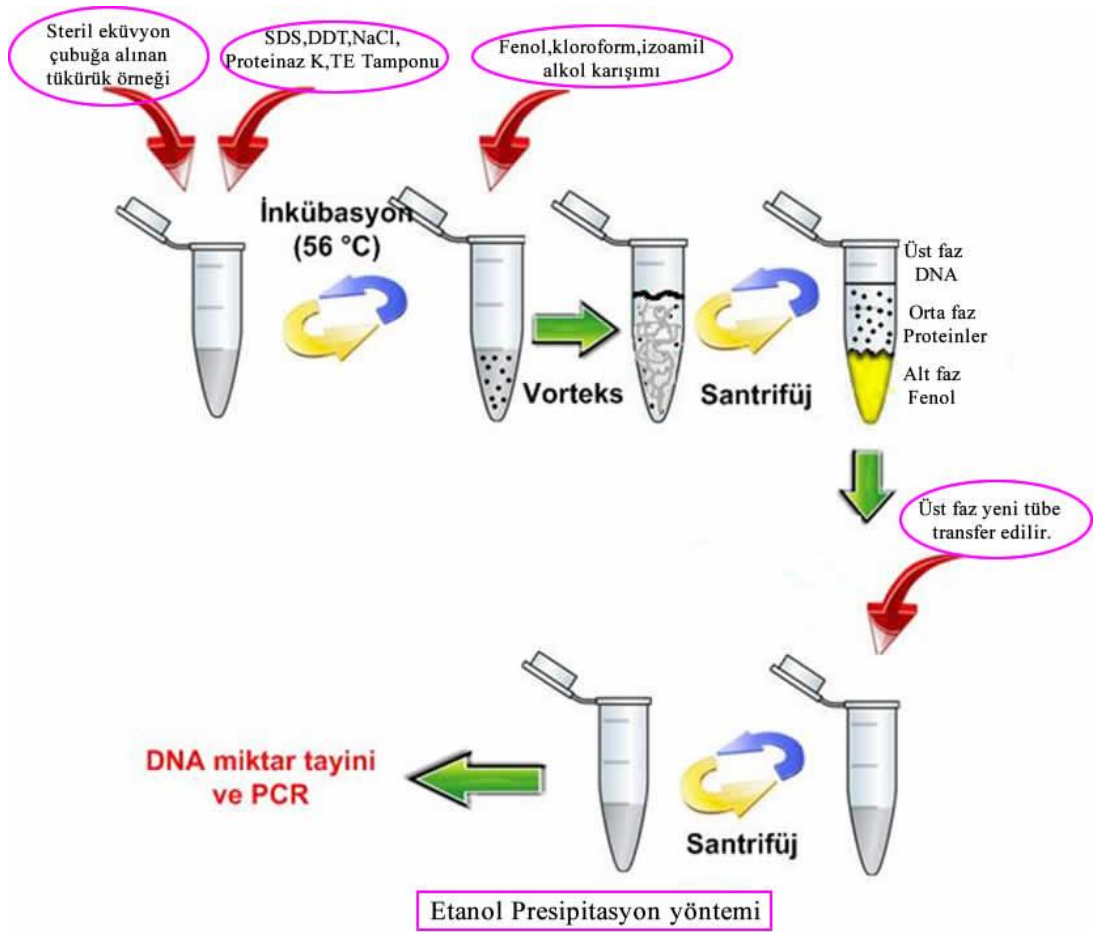
Ayrıca SNP, bir genin sentezi ile ilgili düzenlemeleri içeren promotor bölgede meydana geliyor ise; transkripsiyonla oluşan mRNA düzeyi ve stabilitesi, dolayısı ile gen ekspresyon düzeyi değişecektir (Williams ve Hayward, 2001).

1.8. DNA İzolasyonu

Büyük bir kısmı hücresel materyallerde yer alan DNA hücre içerisinde serbest halde bulunmaz. Bu nedenle DNA molekülleri inceleme aşamasına alınmadan önce hücresel materyalden ayrılmalıdır. Bazı kimyasal maddeler ve enzimler ile canlı hücrelere ait hücre zarı veya canlı hücre duvarının yıkılıp DNA'nın ortaya çıkarılmasına DNA izolasyonu denir. DNA hücre ortamından korunmak amacıyla hücresel proteinler tarafından koruma altına alınmıştır. Bu koruma kalkanı DNA analizlerini etkiler. Bu sebeple, DNA molekülünden diğer proteinleri ve hücresel materyalleri ayırmak amacıyla farklı DNA izolasyon yöntemleri kullanılır. Çünkü DNA izolasyonunda kullanılacak izolasyon yöntemi biyolojik materyalin özelliğine bağlıdır (Butler, 2005).

1.8.1.Fenol Kloroform İzolasyonu

Fenol kloroform izolasyonu en çok tercih edilen yöntemlerin başında gelir. Fenol proteinlerin sekonder yapısını parçalayan denatüre edici bir ajandır. Fenol ile proteinler ve DNA parçaları birbirinden ayrılır ve uzaklaşmaları sağlanır. Fenol kloroform yöntemi ile izolasyonda birbirini takip eden aşamalar bulunmaktadır. (Şekil.1.14).



Şekil.1.14. DNA izolasyonu.

1) Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve proteinaz K: Hücre duvarlarını yıkar. Kromozomlar içinde bulunan DNA'yı koruyan proteinleri parçalar.

2) Fenol-kloroform-izoamil alkol karışımı: DNA'yı proteinlerden ayırmak için kullanılır.

- ❖ Fenol proteini bağlar.
- ❖ Kloroform fenolü bağlar.
- ❖ İzoamil alkol fenol fazı ile sulu fazın daha net bir biçimde ayrılmasını sağlar.

DNA negatif yüklü suda çözünebilen ama alkolde çözünemeyen bir moleküldür. Santrifüj edildiğinde, istenmeyen proteinler ve hücresel atıklar sulu fazdan ayrılır ve çift sarmal DNA molekülleri bu sayede analiz için ayrıştırılır.

Fenol kloroform izolasyonu, yüksek moleküler ağırlıklı DNA'nın izolasyonu için uygun ve ucuz bir yöntemdir. Bu nedenle her DNA laboratuvarında dikkatlice uygulandığında yüksek verimlilikle kullanılabilir (Butler, 2005).

1.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR)

Hedef DNA dizilerinin enzimatik olarak çoğaltılması şeklinde tanımlanan ve in vitro bir yöntem olan PCR (Polymerase Chain Reaction) yöntemi ilk defa Cetus firması araştırmacısı Kary Mullis tarafından bulunmuş ve 1993 yılında kimya dalında nobel ödülünü getirmiştir. Ayrıca bu yöntemle, bir organizmanın DNA'sında bilinen herhangi bir bölgenin çok hızlı ve başarılı bir şekilde klonlanması sağlanır (Goodwin ve ark., 2007; Kubista ve ark., 2006).

PCR analizi; moleküler biyoloji, insan genetiği, evrim, farmakoloji, toksikoloji, paleontoloji ve kriminoloji gibi çok geniş disiplinlerde;

- Adli Tıp'ta,
- Doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde,
- Farmakogenetik ve toksikogenetik çalışmalarda,
- Genetik bozuklukların teşhisinde,
- Mutasyon ve polimorfizm çalışmalarında,
- Sekanslama amacıyla DNA hazırlanmasında,
- Enfekte hastalıklarda virüs ve bakterilerin teşhisinde,
- Onkogenlerin belirlenmesinde,

- Doğum öncesi genetik tanı konulması gibi çalışmalarda yaygınlıkla kullanılmaktadır (Butler, 2005; Wright ve Wynford-Thomas, 1990).

1.9.1. PCR'ın Aşamaları

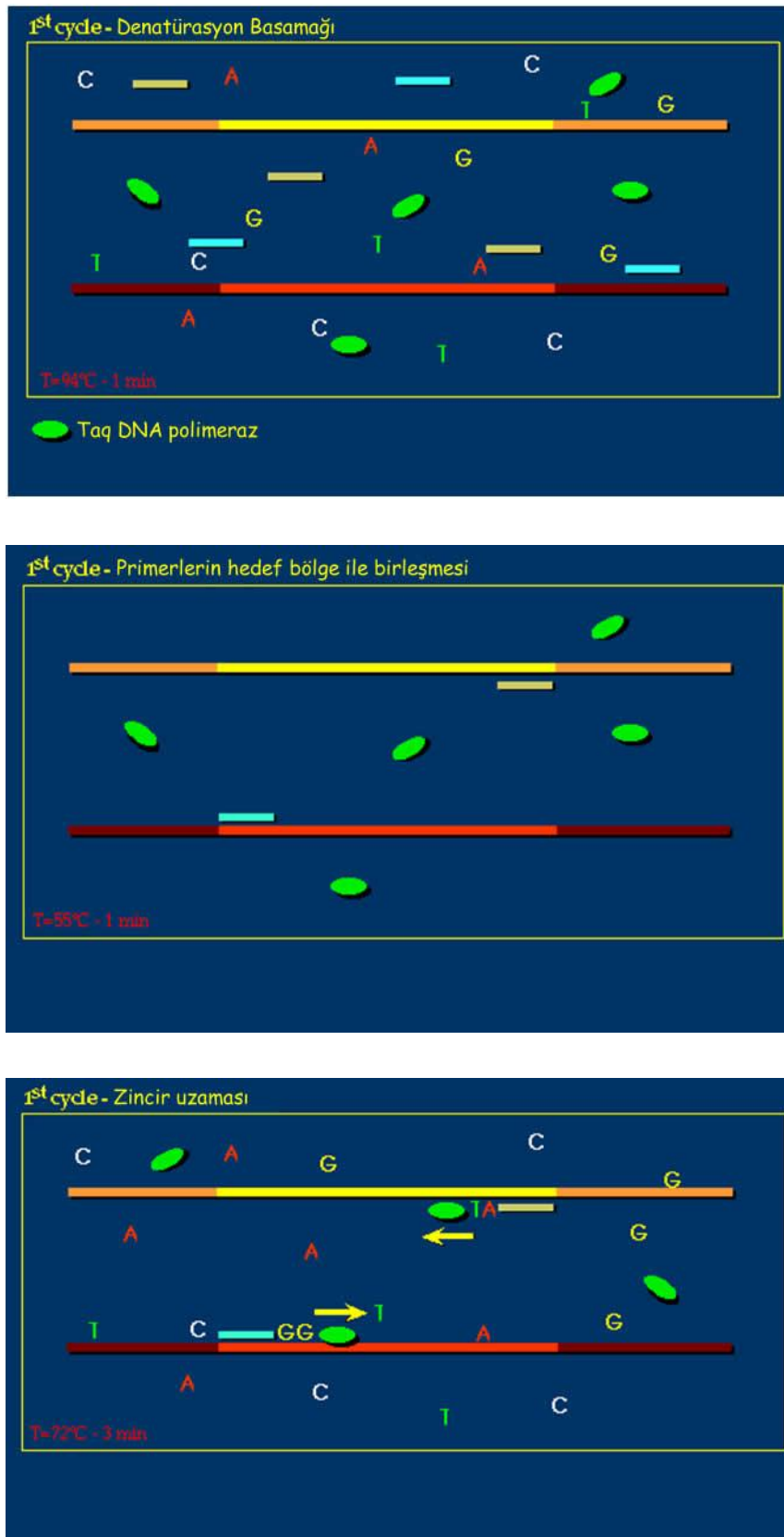
Bir PCR döngüsü;

- Denatürasyon,
- Primerlerin bağlanması (annealing),
- Uzama (extension) olarak adlandırılan üç basamaktan oluşur (Şekil.1.15).

1. Denatürasyon: Amplifiye edilecek DNA molekülündeki hidrojen bağlarının yüksek sıcaklıkta (90-95 °C) birbirinden ayrılması ve tek sarmal haline getirilmesidir.

2. Primerlerin Hedef Bölgelerle Birleşmesi (Annealing): Primerler, amplifiye edilen segmentin yanındaki dizilere spesifik olarak bağlanan 17-30 nükleotid uzunluğundaki sentetik oligonükleotitlerdir. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklıklarda (55-70 °C) gerçekleşir.

3. Zincir Uzaması (Elongation): DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozit trifosfat (dNTP) varlığında primerlerin 3' hidroksil uçlarına dNTP'leri ekleyerek polimerizasyonu (70-75 °C) gerçekleştirir. DNA her zaman 5' ucundan 3' ucuna doğru uzar. Böylece hedef DNA'nın birçok komplementer kopyaları elde edilir. Bu üç basamağın defalarca tekrarlanması sonrasında her bir döngü sonunda kalıp DNA iki katına çıkar. Böylece hedeflenen bölgenin milyarlarca kez çoğaltılmasıyla PCR ürününün kolay analiz edilmesi sağlanır (Walker ve Rapley, 2000).

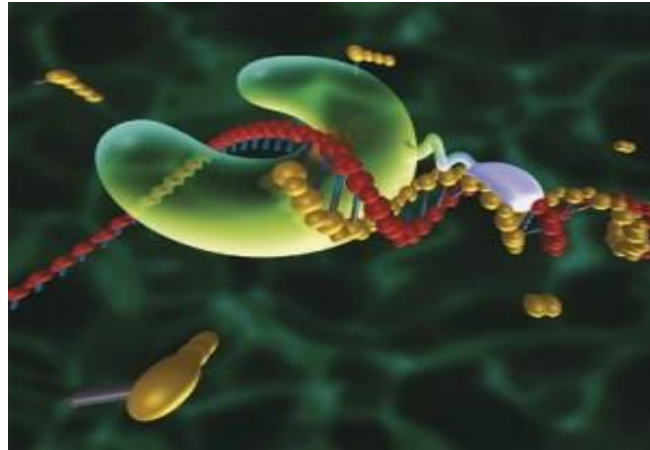


Şekil.1.15. PCR basamakları (<http://www.cls.umc.edu/COURSES/CLS405/Pcr.ppt>).

1.9.2. Standart PCR Bileşenleri

Standart bir PCR’da bulunması gereken bileşenler; kalıp DNA örneği, sentetik oligonükleotid primerler, dNTP’ler (A,T,C,G), Taq DNA Polimeraz enzimi ve tampon çözeltilerdir.

- ❖ **Kalıp DNA örneği** → Nükleer, mitokondriyal, bakteriyal ve plazmid DNA olabilir. DNA herhangi bir biyolojik materyalden (kan, kıl, tükürük, vücut sıvısı, ter, tırnak, doku vd.) elde edilebilir.
- ❖ **Sentetik oligonükleotid primerler** → DNA üzerindeki çoğaltılacak her bir bölge için bir çift (Forward: F ve Reverse: R) primer kullanılmalıdır.
- ❖ **Tampon karışımı** → Tampon içerisinde Tris, magnezyum (Mg), KCl, çeşitli deterjanlar ve tuzlar bulunur. Reaksiyon tamponunda kullanılan $MgCl_2$ nonspesifik amplifikasyonu nötralize ederken, KCl, Taq polimeraz’ın sentez hızını artırmaktadır.
- ❖ **Taq DNA Polimeraz enzimi** → *Thermus Aquaticus* adlı bakteriden elde edilen ısıya dayanıklı bir enzimdir.



Şekil.1.16. Taq DNA Polimeraz enzimi.

(<http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/gene/taq.polymerase.jpg>)

Tag DNA polimeraz, maksimum aktivite gösterdiği 72 °C’de dNTP’leri tanıyarak ayırabilme ve saniyede yaklaşık 100 dNTP’yi diziye katabilme yeteneğindedir. Denatürasyon aşaması uzun olan PCR’larda Hot Star Taq DNA Polimeraz enzimleri tercih edilmelidir (Wilson, 1997).

1.9.3. Primerlerin Seçimi

Çoğaltılacak olan hedef DNA bölgesi belirlendikten sonra, bu bölgeye uygun olan primerlerin seçilmesi gerekir. PCR’da kullanılacak primerler, genom üzerinde sadece tek bir bölgeyi komplementer olarak tanımalıdır. Aksi halde, istenilen bölgenin dışında bir başka bölge de kolaylıkla çoğalabilir. DNA’nın özgül olarak çoğaltılabilmesi için primer seçiminde bazı kurallara uyulması gerekir.

- ✓ Primer dizileri, çoğaltılacak DNA içinde sadece bir kez bulunmalıdır. Primerlerin 3’ ucuna DNA polimerazın bağlanması sentezin başlamasında en önemli aşama olup 3’ ucunda 6-7 nükleotidlik bir uygunluk, kalıp DNA’ya bağlanma ve polimerizasyonun başlatılması için yeterli olabilir.
- ✓ Primerin 3’ ucunun guanin (G) ve sitozin (C)’den zengin olması DNA’ya daha sıkı bağlanmayı sağlayarak polimerizasyonun daha başarılı olmasını sağlar. Çünkü adenin (A) ve timin (T) bazları DNA zincirini iki hidrojen bağı ile tutarlarken G ve C bazları üç hidrojen bağı ile tutarlar.
- ✓ Primerlerin kendi üzerlerine ve birbirleri üzerine bağlanabilir olmamaları gerekir. Bunu sağlamak için kendi içlerinde ve birbirleri üzerinde uygunluk gösteren diziler içermemelidirler. Primerlerin kendi içlerinde uygunluk göstermesi, bir ucun kıvrılarak kendi üzerine bağlanmasına, birbirleri üzerinde uygunluk göstermesi ise polimerazın bu uçlara bağlanarak primer dimer denilen ürünleri meydana getirmesine neden olur.

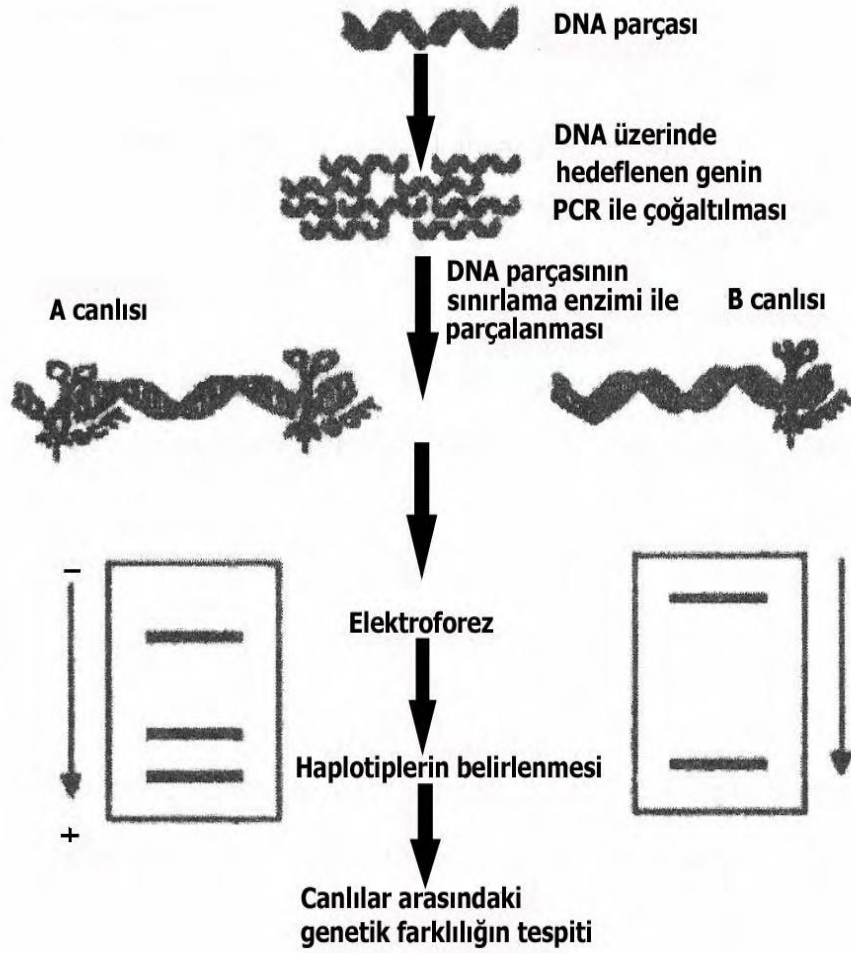
- ✓ Primer dizileri rastgele seçilmelidir. GC/AT oranlarının kalıp DNA'ya yakın olması çoğalma etkinliğini artırır.
- ✓ İki primerin ayrılma ve bağlanma sıcaklıkları birbirine yakın olmalıdır.
- ✓ Genel olarak 20-30 nükleotid uzunluğundaki primerler, kullanılan kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlayabilirler.
- ✓ Primerlerin birbirlerine olan uzaklıkları 100-1000 nükleotid arasında olmalıdır. DNA polimerazlar, polimerizasyon yaptıktan bir süre sonra DNA üzerinden düşerler. Bu yüzden çoğaltılacak parçanın boyu ne kadar uzun olursa çoğaltma oranı da o kadar az olacaktır (Stubbins ve ark., 1996).

1.10. Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

4-6 baz uzunluğundaki DNA fragmanlarını tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içerisindeki spesifik yerlerden DNA'yı kesen enzimlere Restriksiyon Endonükleaz (RE) enzimleri denir (Murray,2000; Pearson,1985). Kesim genellikle simetriktrir. Yani bir zincirdeki bir yöndeki serilerin baz dizilimi diğer zincirdeki baz dizilimi ile ters yönde simetri özelliği gösterir. RE enzimlerinin tanıdığı bu dizilerin karakteristiği *palindrom* olarak adlandırılır (Walker ve Rapley,2000). DNA'nın bu enzimlerle kesilmesinden sonra agaroz jel elektroforezine tabi tutulmasıyla oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) adı verilir (Botstein ve ark., 1980) (Şekil 1.17).

Restriksiyon enzimi ilk defa 1970 yılında Hamilton Smith ve Kent Wilcox tarafından izole edilmiş (Roberts, 2005) ve genetik analiz için ilk kez 1974 yılında RFLP metodu uygulanmıştır (Botstein ve ark., 1980). Bu yıldan sonra hızla rekombinant

DNA teknolojisinde, protein üretilmesinde, gen dizilimlerinin belirlenmesinde ve polimorfizm çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Aggarwal, 1995).



Şekil 1.17. RFLP tekniği ile canlılar arasındaki genetik farklılığın tespiti (Turan,2002).

1.10.1. Restriksiyon Endonükleaz (RE) Enzimlerinin Sınıflandırılması

Restriksiyon enzimleri birbirinden çok az farklılık gösteren üç farklı sınıfta tanımlanmıştır Her tip ayrı ayrı hem kısıtlama hem de modifikasyon (metilasyon) aktivitesini beraberinde göstermektedir ve çift zincirli DNA'yı kırmaktadır. Bunlar TipI, TipII ve TipIII'tür. TipII restriksiyon endonükleaz, kesme işleminde en sık kullanılan ve en önemli olanıdır (Green, 1998).

Tip I: Hem metilasyon hem de modifikasyon yapabilen iki fonksiyonlu enzimlerdir. Referans baz dizisini, 1000 baz çifti uzağından keser. TipI tarafından tanınan nükleotitler asimetriktir. Bu enzimler hedef dizilimlere bağlanmalarına rağmen kesimleri dizilim dışında tesadüfi olarak gerçekleşmektedir. Kesim olayında belirleyici faktör enzimin metilasyon aktivitesidir.

Tip II: Moleküler biyoloji alanında restriksiyon enzimlerinden bahsedildiğinde Tip II enzimleri kastedilmektedir. Tip II restriksiyon enzimleri dizilimdeki bir bölgeyi tanıyarak tam hedef nükleotidden kesim yapabilen enzimlerdir (Pingoud ve Jeltsch, 1997). Bu özelliklerinden dolayı klonlama ve moleküler biyoloji araştırmaları için oldukça idealdirler.

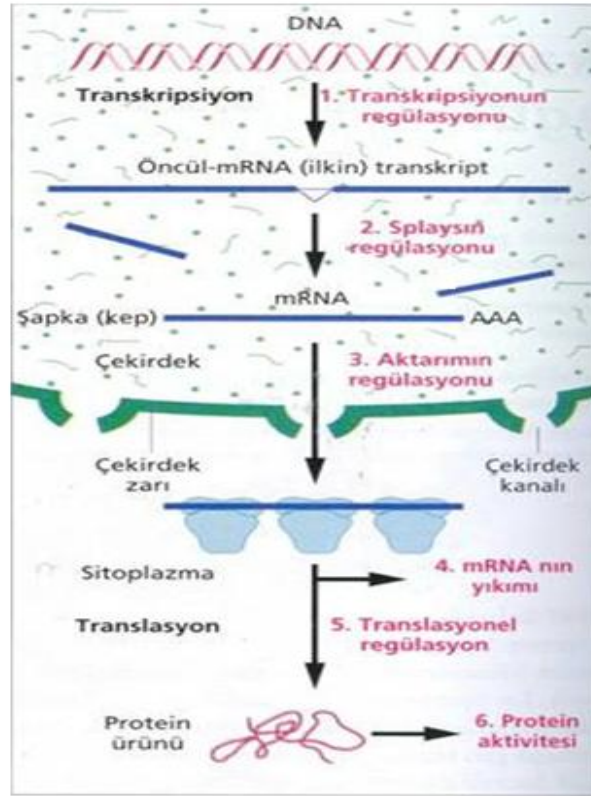
Tip III: Tip I'ler gibi metilasyon ve modifikasyon yapabilen restriksiyon enzimleridir. Dizilimi tanırlar fakat rastgele ve yakın yerden kesim işlemini gerçekleştirirler. Bu nedenle tip III enzimleri klonlamada ve moleküler genetik çalışmalarında kullanılmamaktadır (Meisel ve ark., 1995).

1.11. Gen Ekspresyonu

DNA'daki kalıtsal bilginin, özgün yapı ve fonksiyonları olan proteinlere dönüştürülmesi işlemi olan gen ekspresyonu;

- ★ Replikasyon,
- ★ Transkripsiyon ve
- ★ Translasyon olmak üzere 3 aşamadan oluşmaktadır.

Replikasyon ve transkripsiyon çekirdekte, translasyon işlemi ise sitoplazmada gerçekleşmektedir (Şekil.18).



Şekil.1.18. Gen ekspresyonu.

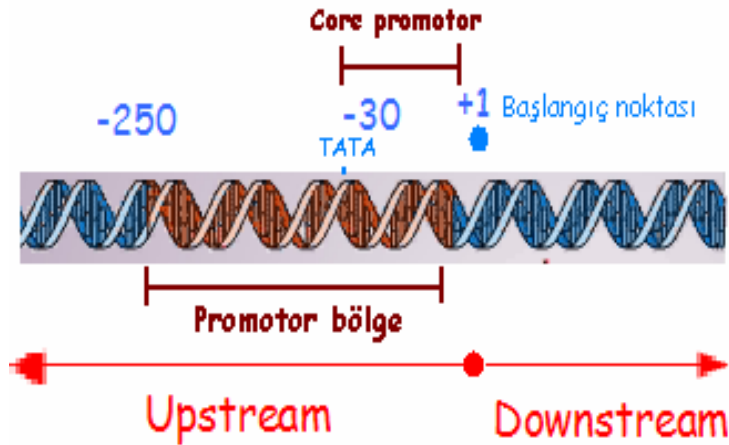
(<http://www.news-medical.net-Mechanism>)

- **Replikasyon:** DNA'nın replikasyonu, DNA molekülünün, sakladığı genetik bilgilerin sonraki nesillere aktarılması için kendi kopyasını oluşturmastır. Bu

aşamada DNA polimeraz, DNA ligaz, topoizomeraz gibi enzimler görev almaktadırlar.

- **Transkripsiyon:** Transkripsiyon, DNA’da saklanan genetik bilgilerin bir RNA molekülü (mRNA, tRNA, rRNA) şeklinde kopyalanması veya yazılması olayıdır. Bu aşamada önce DNA öncül mRNA’ya dönüşür. Sonra “splicing: uç uca birleştirme” işlemi ile intronlar çıkarılır ve ekzonlar (kesintilere uğramış bir genin olgun mRNA da yer alan DNA dizileri) olgun mRNA oluşumuna katılırlar. Bu işlem sırasında RNA polimeraz II enzimi görev almaktadır.

Transkripsiyonda; DNA üzerinde bulunan, başlama noktasından gen bölgesinin sentezlendiği kısma doğru olan bölge “downstream”(+1...); başlama noktası öncesinde bulunan ve kor promotor, promotor bölge ve TATA kutusu gibi gen sentezinin başlatıcılarını içeren bölge ise “upstream(...-1)” olarak tanımlanır. Transkripsiyonu yapılacak genin önünde bulunan, yaklaşık 250 nükleotid uzunluğundaki (-1 ile -250) transkripsiyonun başladığı bölgeye “promotor bölge” denilir. Bu bölgenin içinde bulunan ve TATA bölgesini de içeren yaklaşık 30 nükleotid uzunluğundaki (-1 ile -30) bölge ise “kor promotor” olarak isimlendirilir. Transkripsiyonu gerçekleştiren RNA Polimeraz II enziminin aktivitesini yapabilmesi için promotor bölgeye bağlanması gerekmektedir (Şekil.19).



Şekil.1.19. Gen sentezi başlama aşamasının şematik gösterimi.

- **Translasyon:** Transkripsiyonla RNA'ya kopyalanan genetik bilginin bir protein veya polipeptit zinciri haline dönüştürülmesidir (Conaway ve Conaway, 1993; Butler ve Kadonaga, 2002).

Dış görünüşle ilgili karakterlerin DNA analizleri ile belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar günümüzde adli bilimlerin önemli ilgi alanlarından birisi durumuna gelmiştir. Göz rengi bireylerin belirgin fiziksel özelliklerinden birisi olduğundan, toplumumuzda göz rengini belirleyen genlerdeki polimorfizmler ve bu polimorfizmlerin bireylerin göz rengi fenotipini nasıl etkilediği önemli bir araştırma konusudur. Bu çalışmada; toplumumuzda göz rengini belirleyen kalıtsal özelliklerin dağılımının belirlenmesi amacıyla gözleri açık renkli olan bireyler ile anne ve babalarının HERC2 genotiplerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Restriksiyon enzimi (DraI)	Neb (New England Biolab)
Primerler	Alpha DNA, Montreal
NEBuffer 4	New England Biolab
PCR Buffer, 10X	Qiagen
Deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP Mix)	Fermentas
Agaroz	Prona
Etidyum bromür	Applichem
6X loading çözeltisi	Fermentas
Saf etanol	Sigma-Aldrich
DNA's RNA's free water	Bome
Hot Star Taq DNA polimeraz	Qiagen
Fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1)	Applichem
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Applichem
Proteinaz K	Fermentas
100 bp ladder	Fermentas
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol(DTT)	Sigma
Tris	Merck
EDTA	Sigma

2.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Steril eküvyon çubuk	Whatman
Jel görüntüleme cihazı	Syngene
Laminar flow kabin	Esco
Thermal Cycle PCR cihazı	Techne Tc 512
Soğutmalı santrifüj	Hettich
Mikro santrifüj	Hettich
Otoklav	Nüve
Su banyosu	Nüve
Etüv	Nüve
Su pürifikasyon sistemi	Human UP 900 Scholar-UV
Vorteks karıştırıcı	Biosan
Dijital hassas terazi	Mettler Toledo
pH metre	Mettler Toledo
Yatay elektroforez cihazı	Scie-Plas
Güç kaynağı	Bio-Rad
Mikrodalga fırın	Arçelik
Eppendorf tüpler (1.5 ml. ve 0.2 ml'lik)	Axygen Genuine
Otomatik mikro pipetler	Eppendorf, Rainen
Pipet uçları (100 µl, 1000 µl, 5 ml, 10 ml)	Finntip
Manyetik Karıştırıcı	Mirak
Steril eldiven	TopGloves
Derin dondurucu	Regal
Cam malzemeler	
Parafilm	

2.1.3. Deney Protokolü

2.1.3.1. Çalışma Grubunun Seçilmesi

Araştırmaya açık göz rengine sahip bireyler ile bu bireylerin anne ve babaları alınmıştır. 303 kişiden oluşan çalışma grubumuzu 18-82 yaş arası bireyler oluşturmaktadır. Gönüllülerle yapılan ön görüşmeden sonra bireyler çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve steril eküvyon çubuğa yanak içi epitel hücreleri svab şeklinde alınmıştır.

Bu çalışma; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulunun 12 Aralık 2011 tarih, 41-868 sayılı kararı ile onaylanmıştır. Çalışmamız, Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

2.1.3.2. Çalışma Grubundan Biyolojik Materyalin Toplanması

Çalışmamızda biyolojik materyal olarak, açık göz rengine sahip bireyler ile bu bireylerin anne ve babalarından oluşan gönüllü ailelerden steril eküvyon çubuğa alınan yanak içi epitel hücreleri kullanılmıştır ve bu svablardan DNA izolasyonu yapılmıştır. Tüm DNA örnekleri analizlere alınıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

2.1.4. Yöntem

Çalışmamızda toplumumuzdaki açık göz rengine sahip bireyler ile bu bireylerin anne ve babalarının HERC2 genlerindeki A→G polimorfizmi PCR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi) tekniği ile belirlenmiştir.

2.1.4.1. Göz Renginin Oluşmasında Etkili Olan HERC2 Genindeki A→G Polimorfizminin Belirlenmesi

2.1.4.1.1. Yöntemde Kullanılan Çözeltiler

- **%20'lik Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) çözeltisi (500 ml)**
100 gram Sodyum dodesil sülfat (SDS) tartılır. 300 ml distile su içerisinde çözülerek 500 ml'ye tamamlanır.
NOT: Çözelti oda sıcaklığında saklanmalıdır.
- **TE çözeltisi (100 ml)**
0.121 gram tris tartılır ve 80 ml distile su içersinde çözülür. 0.037 gram EDTA ilave edilir. pH 7.5'a ayarlanır. Distile su ile son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
NOT: → Çözelti +4 °C'de muhafaza edilmelidir.
→ EDTA sıvı konulacak ise 0.5 M EDTA'dan 200 µl konulmalıdır.
- **0.39 M Dithiothreitol (DTT) (5 ml)**
0.3 gram Dithiothreitol (DTT) tartılarak 5 ml distile su içerisinde çözülür.
NOT: Çözelti -20 °C'de muhafaza edilmelidir.
- **1 M Sodyum Klorür (NaCl) (1000 ml)**
58.44 gram sodyum klorür 1000 ml distile su içerisinde çözülür.
NOT: Çözelti +4 °C'de muhafaza edilmelidir.
- **Proteinaz K hazırlanması (1250 µl)**
25 mg Proteinaz K, 1250 µl distile su içersinde çözülür. 20 µl – 10 µl ve 5 µl'lik hacimlerde epondorf tüplere konur.
NOT: Çözelti -20 °C'de muhafaza edilmelidir.

2.1.4.2. HERC2 Gen Polimorfizminin Genotipinin Belirlenmesi

2.1.4.2.1. Svab Örneklerinden DNA İzolasyonu

Eküvyon çubuğa alınan tükürük örneklerindeki nDNA'yı açığa çıkarabilmek için fenolkloroform- izoamil-alkol ekstraksiyon yöntemi kullanıldı.

1. Ependorf tüplerinin içine konulan svab örneklerinin üzerine;

- ✓ 45 µl NaCl (1 M),
- ✓ 40 µl SDS (%10'luk),
- ✓ 410 µl TE
- ✓ 7 µl DTT ve
- ✓ 5 µl Proteinaz K eklenerek kısaca vortekslendi.

2. 56 °C'lik su banyosunda 1.5-2 saat inkübe edildi.

3. İnkübasyondan sonra Fenol-kloroform-izoamil alkol karışımından 500 µl ilave edildi.

4. Ependorf tüpleri 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

5. Alt faz hareket ettirilmeden süpernatant kısmı yeni bir ependorf tüpe alındı ve alt faz atıldı.

6. 1000 µl soğuk saf etil alkol ilave edildi.

7. 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

8. Alkol oluşan pelete zarar vermeden dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.

9. 500 µl %70'lik oda sıcaklığında etil alkol ilave edildi.

10. 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

11. Ependorf tüpün içerisinde bulunan tüm alkol dikkatlice uzaklaştırıldı.

12. Tüpün dibinde kalan alkol de tamamen uçurulduktan sonra 60 µl DNase-RNase free su ilave edildi. Tüm DNA örnekleri diğer analizlere alınıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

Dikkat edilecek hususlar:

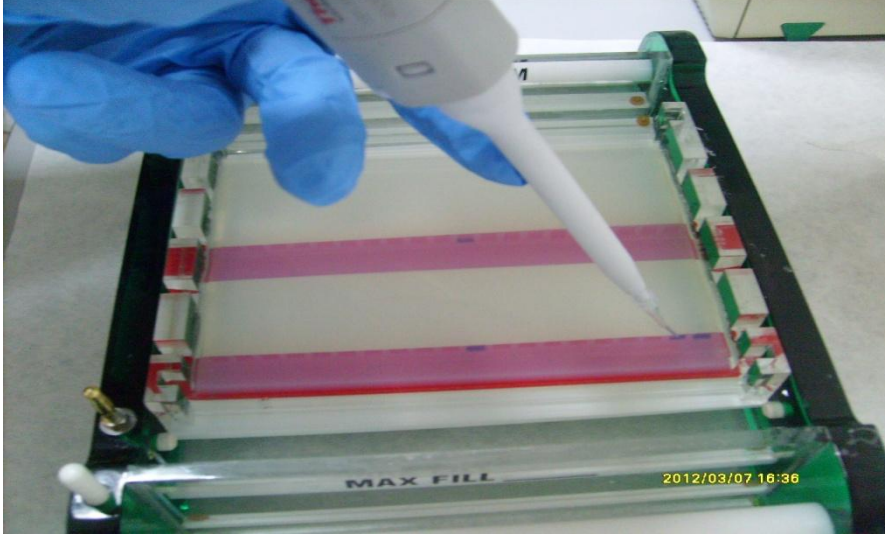
- Proteinaz K -20 °C’de muhafaza edilmelidir.
- %10’luk SDS oda koşullarında muhafaza edilmelidir.
- NaCl, TE ve Fenol-kloroform +4 °C’de muhafaza edilmelidir.
- Tüm solüsyonlar gerektiği şekilde sterilize edilmelidir.
- Ependorf tüpleri santrifüj edilirken oryantasyonları belirlenerek yerleştirilmelidir.
[Pelet her zaman görünmeyebilir fakat bu sayede yeri tahmin edilir.]
- Ayrıca DNA çalışmaları için ayrı bir oda oluşturulmalıdır.
- Her izolasyon öncesi ve sonrasında kullanılacak çalışma ortamı ve otomatik pipetler alkol ile temizlenmelidir.
- Pipet setleri ve otomatik mikro pipetler ayrılmalıdır.

2.1.4.2.2. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi ve %0.5'lik Agaroz Jel Hazırlanması

Steril eküvyon çubuğa alınan tükürük örneğinden genomik DNA'nın izole edilip edilmediğinin analizi %0.5'lik agaroz jel elektroforezi ile belirlendi.

1. 0.6 g agaroz tartıldı ve 120 ml 1X TBE çözeltisi bir erlen içinde karıştırıldı.
2. Ağız alüminyum folyo ile kapatıldı ve üzerinde birkaç delik açılarak mikrodalga fırında kaynatıldı.
3. Çözelti oda sıcaklığında 50–60 °C'ye düşünceye kadar bekletildi.
4. Üzerine 8 µl EtBr (10 mg/ml) ilave edildi ve çözelti homojen bir yapı kazanana kadar erlen çalkalandı.
5. Bu karışım jel tarakları yerleştirilmiş jel kalıplarına hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Ayrıca jel üzerinde hava kabarcıkları oluşmuş ise, jel katılaşmaya başlamadan pipet ucu yardımı ile patlatıldı.
6. Jelin katılaşması için bir süre oda sıcaklığında bekletildi.
7. Taraklar ve bariyerler dikkatlice çıkarılarak kalıp elektroforez tankına yerleştirildi. Bu esnada jel kuyucuklarının, yürütme tankının katot elektrot tarafına yerleştirilmesine dikkat edildi.
8. Jelin üzerini kaplayacak miktarda tank içerisine 1X TBE çözeltisi konuldu.

2.1.4.2.2.1. Agaroze Jele Yükleme İçin Örnek Hazırlanması ve Yürütme Koşulları



Şekil.2.1. Agaroze jel kuyucuklarına örneklerin yüklenmesi.

1. 15 cm uzunluğunda parafilm kesilerek buz kalıbı üzerine yerleştirildi.
2. 1 μ l 6X Jel Loading Buffer ve 5 μ l DNA örneği parafilm üzerine konuldu ve homojenizasyon için mikropipet yardımı ile yavaşça karıştırıldı.
3. Toplam 6 μ l karışım jeli delmeden dikkatli bir şekilde jel kuyucuklarına yerleştirildi.
4. Tank kapağı kapatıldı ve anot ile katot uçlarının bağlantıları takıldı.
5. Güç kaynağı 100 V ve 70 mA'e ayarlanarak, numuneler 45 dakika jel üzerinde yürütüldü.
6. UV ışığında, jel görüntüleme cihazında sonuçlar değerlendirildi.

2.1.4.2.3. PCR

HERC2 gen polimorfizminin göz rengi üzerine etkisini anlamak için DNA örneklerinde SNP' nin olduğu kısmı da içeren bölge Forwad ve Reverse primer çiftleri kullanılarak PCR yöntemi ile amplifiye edildi. Bu işlem TECHNE TC 512 Thermal Cycle cihazı ile gerçekleştirildi ve hedeflenen DNA bölgesinin her biri 2^{35} defa çoğaltıldı. Her PCR analizinde kontrol amacıyla, pozitif ve negatif örnekler de kullanıldı.

2.1.4.2.3.1. Primer Listesi

Amplifikasyon için Forward (F: direkt) ve Reverse (R: karşıt) primerleri kullanıldı. Hedeflenen bölgenin çoğaltılma işlemi Forwad primerinin DNA'nın bir ipliğine Reverse primerinin ise diğer ipliğine bağlanmasıyla başlar. Primerler HPSF (High Performance Salt Free) yöntemi ile Montreal'deki Alpha DNA firmasına sentezletirildi. Kullanılan primerler ve özellikleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge.2.1. Amplifikasyonda kullanılan primerler ve özellikleri.

	F PRİMER	R PRİMER
	5'-GAGGCCAGTTTCATTTGAGCTTTA-3'	5'-CACCACTGGTAGTTTTCTTTGCC-3'
Uzunluk	24baz	23baz
GC içeriği	%41.67	%47.83
Erime Sıcaklığı (T _m)	63.6°C	62.1°C
T _m farkı	1.5°C	

2.1.4.2.3.2. PCR Bileşenleri ve PCR Programı

Standart bir PCR reaksiyonunda PCR Buffer, Hot Star Taq DNA Polimeraz, dNTP karışımı, F Primer, R Primer ve DNA bileşenleri bulunmaktadır.

Çalışmada kullanılan PCR reaksiyonunun bileşenleri, bileşenlerin stok konsantrasyonları, reaksiyondaki miktarları ile reaksiyon karışımındaki final konsantrasyonlarına ait bilgiler Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge.2.2. PCR bileşenleri ile stoktaki ve reaksiyondaki konsantrasyonları.

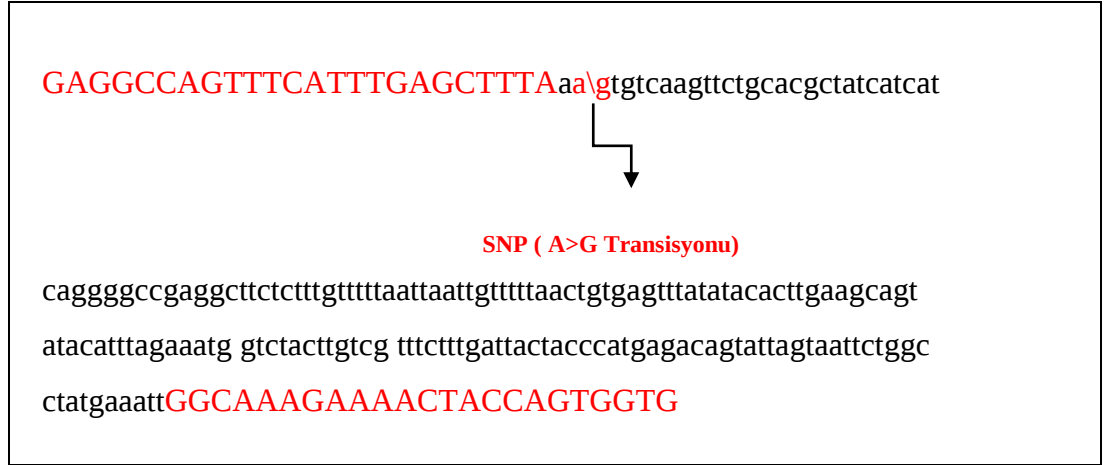
Bileşen	Stok Konsantrasyon	Reaksiyona konulan miktar	25 µl’lik reaksiyon karışımındaki final konsantrasyon
10 X PCR Buffer	10X	2.5 µl	1X
dNTP karışımı	2mM	2 µl	200 µM
F Primer	10 pmol/ µl	0.5 µl	10 pmol/ µl
R Primer	10 pmol/ µl	0.5 µl	10 pmol/ µl
Hot Star Taq DNA Polimeraz	5 U/ µl	0.125 µl	1.25 U
DNA		5 µl	~200 ng
Steril H₂O		17 µl	

HERC2 gen polimorfizmi için Çizelge 2.3'te belirtilen koşullar doğrultusunda PCR gerçekleştirildi.

Çizelge.2.3. HERC2 gen polimorfizmi için PCR şartları.

Şartlar	°C	Süre (dakika)
Başlangıç denatürasyonu	94 °C	10
Denatürasyon	94 °C	1
Bağlanma	60 °C	1
Uzama	72 °C	1
Son uzama	72 °C	5
	4 °C	∞dakika
Siklus sayısı	35 döngü	

PCR sonucunda HERC2 geni için 226bp'lik PCR ürünleri elde edildi. Bu ürünün baz dizilimi ve primer dizilimleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil.2.2).



Şekil.2.2. PCR ile çoğaltılan 226bp'lik baz dizilimi, HERC2-F ve HERC2-R primerleri.

PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülünceye kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

2.1.4.2.3.3. PCR Ürünlerinin Jele Uygulanması ve Elektroforez

PCR işleminin ardından istenilen dizinin amplifikasyonunun doğru olarak gerçekleştiğini kontrol etmek amacıyla 8 µl PCR ürünü ile 1 µl 6X Jel Loading Buffer ile karıştırılarak %1'lik normal agaroz jele yüklendi. Bu jelin hazırlanması için 1.2 gr agaroz tartılarak 120 ml 1XTBE içerisinde çözüldü ve bölüm 2.1.4.2.2' de yapıldığı gibi işleme devam edildi. Ayrıca 100 bp DNA ladder'dan 1 µl, 6X Jel Loading Buffer'dan 1 µ ve distile sudan 6 µl karıştırılarak yükleme yapıldı. Jel 100 Volt ve 70 Amperde 45 dakika elektroforeze tabi tutuldu ve PCR ürünleri UV ışığında, jel görüntüleme sistemi ile değerlendirildi.

2.1.4.2.4. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi (RFLP)

DNA sarmalı özgül restriksiyon enzimleri ile kesildiği zaman farklı uzunluklarda fragmentler oluşur ve bu fragmentler agaroz jel elektroforezinde yürütüldüğünde farklı seviyelerde bantlar oluşturur.

Çalışmamızda HERC2 genindeki A→G polimorfizmini belirlemek için, amplifikasyon sonucunda oluşan PCR ürünü, *DraI* Restriksiyon enzimi ile kesildi. PCR ürününün RFLP yöntemi ile kesim işleminde negatif ve pozitif örnekler de kontrol amacıyla analizlere alındı.

2.1.4.2.4.1. Kullanılan Kesim Koşulları

- HERC2 gen bölgesi için kesim koşulları:

8 µl Nükleaz Free H₂O

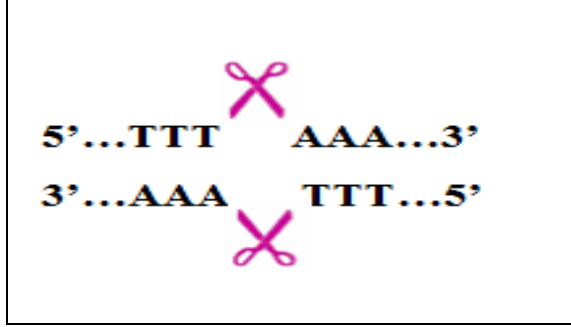
2 µl NEB4

15 µl PCR ürünü

0.25 µl *DraI*

olmak üzere her bir örnek için toplam hacim 25.25 µl'dir. Enzim kesimi için 37°C'de bir gece inkübe edildi.

DraI enziminin tanıma bölgesi:



2.1.4.2.4.2. Kesim Ürünlerinin Agaroza Jel Elektrofrezine Uygulanması ve Genotip Tayini

HERC2 genotiplemesi için çoğaltılan PCR ürünlerinin restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda elde edilen ürünler 6X yükleme boyası ile (8 µl kesim ürünü 1 µl boya ile karıştırıldı) bölüm 2.1.4.2.3.3'te anlatıldığı şekilde % 2.5'lik jele yüklendi ve elektroforeze tabi tutuldu. Sonuçlar UV ışığında, jel görüntüleme sistemi ile değerlendirildi.

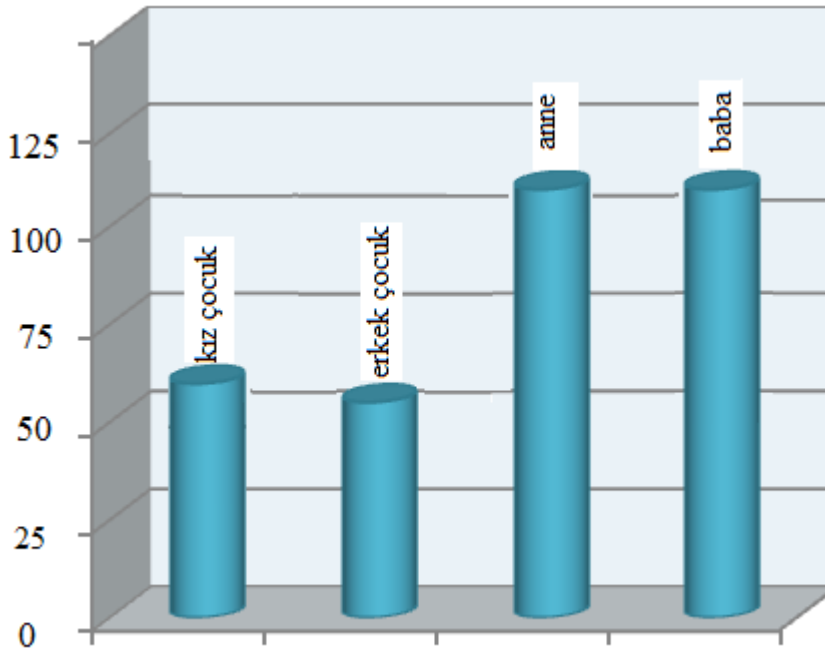
2.1.5. İstatistiksel Analiz Yöntemi

Tüm istatistiksel analizlerde SPSS V16 kullanılmıştır. HERC2 geninde yer alan A→G tek nükleotid polimorfizminin frekansları direkt olarak hesaplanmış ve Hardy-Weinberg eşitliğinde "Haldane exact" testi ile yapılmıştır. Katagorik veriler için χ^2 testi, grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Datalar ortalama±S.S ve median, minimum, maksimum değerleri kullanılarak verilmiştir. $P<0,05$ ve $p<0,01$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. HERC2 Genindeki A→G Polimorfizmini Belirlemek Amacıyla Yapılan Analiz Sonuçları

Çalışmamıza, Kasım 2011-Haziran 2012 tarihleri arasında, Türkiye'nin farklı bölgelerinde yaşayan açık göz rengine sahip bireyler ile bu bireylerin anne ve babaları olmak üzere toplam 303 gönüllü katılmıştır. Genetik analizler için bireylere ait ağız içi svap örnekleri kullanılmıştır. Çalışmada 51 kız çocuk, 50 erkek çocuk, 101 anne ve 101 baba bulunmaktadır. Bu bireylerin yaş ortalaması $41,72 \pm 14,06$ 'dır (18-82 yaş) (Şekil.3.1).



Şekil.3.1. Çalışmadaki bireylerin dağılımı.

Çalışmamızda göz rengi 4 kategoride incelenmiştir. Bu göz renklerine sahip bireylerin fenotip frekansı Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Bireylerin fenotip frekansları.

Göz Rengi	Fenotip Frekansı (n:303)	
	n	%
Mavi	116	38,3
Yeşil	67	22,1
Ela	62	20,5
Kahverengi	58	19,1
Toplam	303	100

3.1.1. Genomik DNA'nın Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesinin Sonuçları

Çalışmada kullanılan 303 örneğin tamamı, izolasyon işleminden sonra agaroz jel elektroforezinde tayin edildi. Her bir örneğin DNA'larının izole edildiği görüldü.

3.1.2. PCR Reaksiyonu ile HERC2 Geninin Amplifikasyon Sonuçları

İnsan HERC2 geni 93 ekzonu kapsayan 250 kilobazdan oluşmakta ve 4834 amino asitlik bir polipeptidi kodlamaktadır. HERC2 geninin intron 86 noktasında göz rengini fenotipik olarak etkileyen tek nükleotid polimorfizmi bulunmuştur.

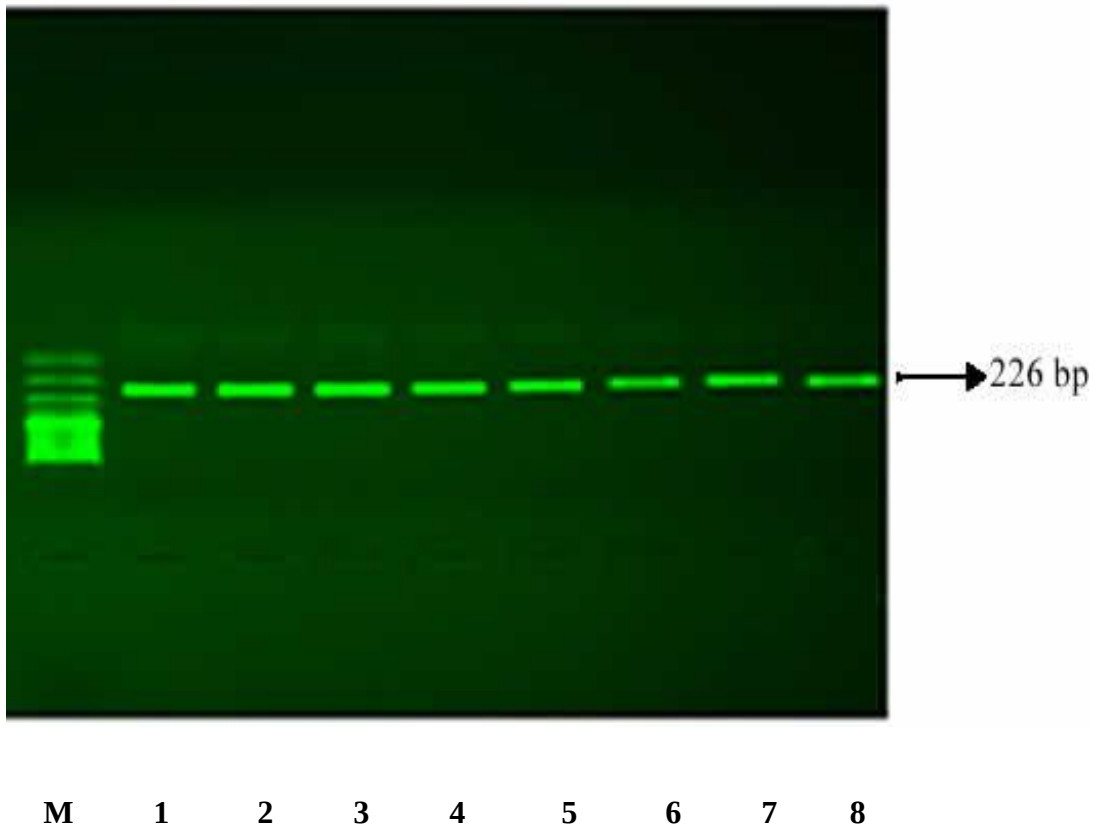
HERC2, 15. Kromozomun 15q13.2 bölgesinde lokalize olan bir genidir. Bu gendeki polimorfizmlerden birisi de rs12913832 numaralı SNP'dir. Bu SNP 15. kromozom üzerindeki 28365618. noktaya denk gelen nükleotiddir. Bu noktadaki, HERC2 A→G Tek Nükleotid Polimorfizmi tipik bireylerde nükleotid A iken, atipik bireyler de G'ye değişim göstermektedir.

Kullanılan primerler ile amplifiye edilen bölgenin baz dizilimi aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Çizelge.3.2).

Çizelge 3.2. PCR'da kullanılan primerler, kromozom üzerindeki lokalizasyonları ve amplifiye edilen bölgenin nükleotid dizilimleri. Kırmızı ve altı çizik olan "a" bazı 28365618. noktada bulunan ve A→G değişimini gösteren polimorfik nükleotiddir.

Primerler	15. Kromozomda Primerlerin Bağlandığı Nokta	Amplifiye Edilen Bölge
F PRİMER	5'-GAGGCCAGTTTCATTTGAGCTTTA-3'	<u>GAGGCCAGTTTCATTTGAGCTTTA</u> a _{at} gtcaagttctgcacgctatcatcacaggggcccagg cttctctttgttttaattaattgttttaactgtgagttatataca cttgaagcagtatacattagaatgggtctacttgcgttcttg attactacccatgagacagtattagtaattctggcctatgaaatt
R PRİMER	5'-CACCACTGGTAGTTTCTTTGCC-3'	<u>GGCAAAGAAAACCTACCAGTGGTG</u>

HERC2 genindeki A→G polimorfizmini göstermek amacıyla, bu noktayı da içeren 226 bp'lik bölge amplifiye edildi ve sonuçlar jel görüntüleme sisteminde, UV ışık altında değerlendirilerek fotoğraflandı (Şekil.3.2).

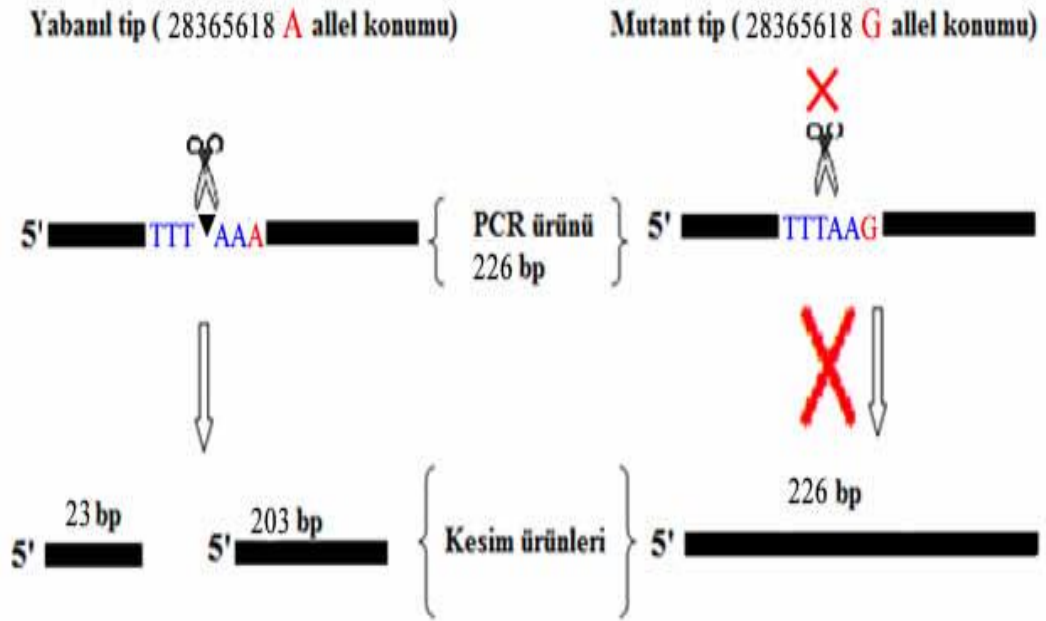


Şekil.3.2. Amplifikasyonunun jel görüntüsü (M=100 bp Ladder; 1- 8= 226 bp PCR ürünü).

3.1.3. *DraI* Restriksiyon Enzimi ile Amplifiye Edilen Bölgenin Kesim Sonuçları

HERC2 A→G genindeki tek nükleotid polimorfizm bölgesini de kapsayacak şekilde çoğaltılan 226 bp'lik PCR ürünü, A→G polimorfizmini belirlemek amacıyla; *DraI* enzimi ile 37 °C'de geceboyu inkübe edildi.

DraI enzimi 226 bp'lik PCR ürününü aşağıdaki şekilde gösterildiği noktadan keser (Şekil.3.3).



Şekil.3.3. *DraI* restriksiyon enziminin tanıma bölgesi ve kesim ürünlerinin şematik gösterimi.

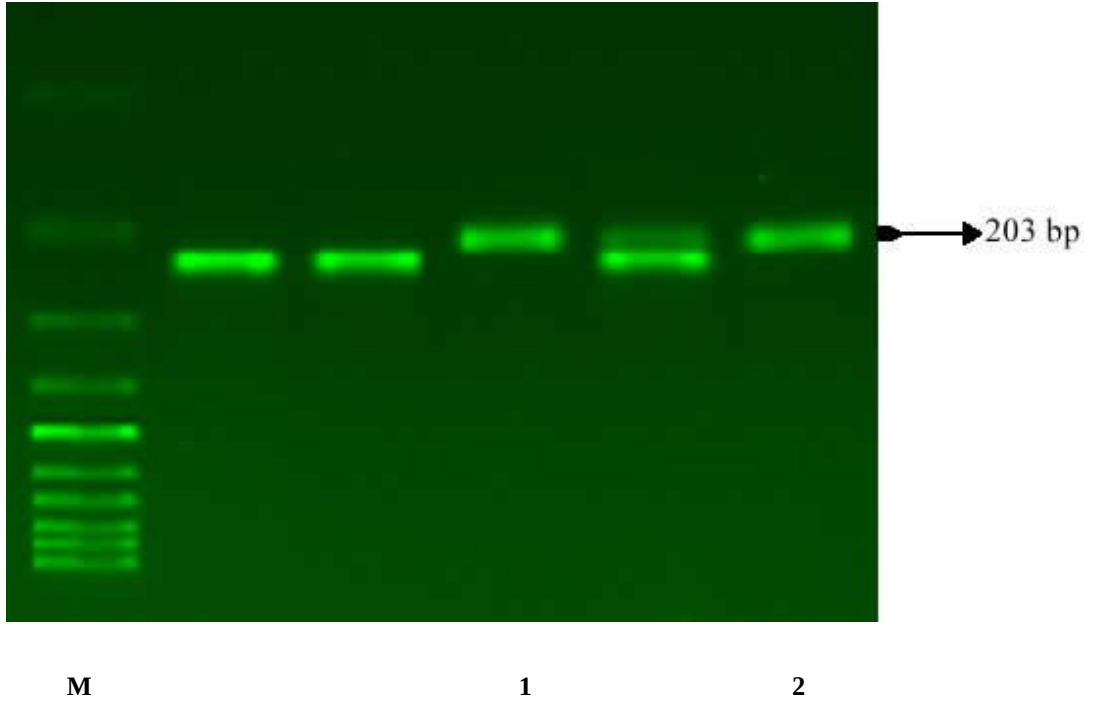
3.1.3.1. DNA Örneklerinin Genotiplendirilmesi

DNA örneklerinin genotiplendirilmesi, restriksiyon enzimi ile kesim sonrası jel analizi sonuçları değerlendirilerek yapılmıştır. Çalışmamızdaki agaroz jel analizlerinin değerlendirilmesi sonucunda üç farklı varyasyon elde edilmiştir:

- ⇔ "AA" homozigot tipik,
- ⇔ "GG" homozigot atipik,
- ⇔ "AG" heterozigot genotip varyantları belirlenmiştir.

3.1.3.2. "A/A" Genotipli Homozigot Tipik Bireyler

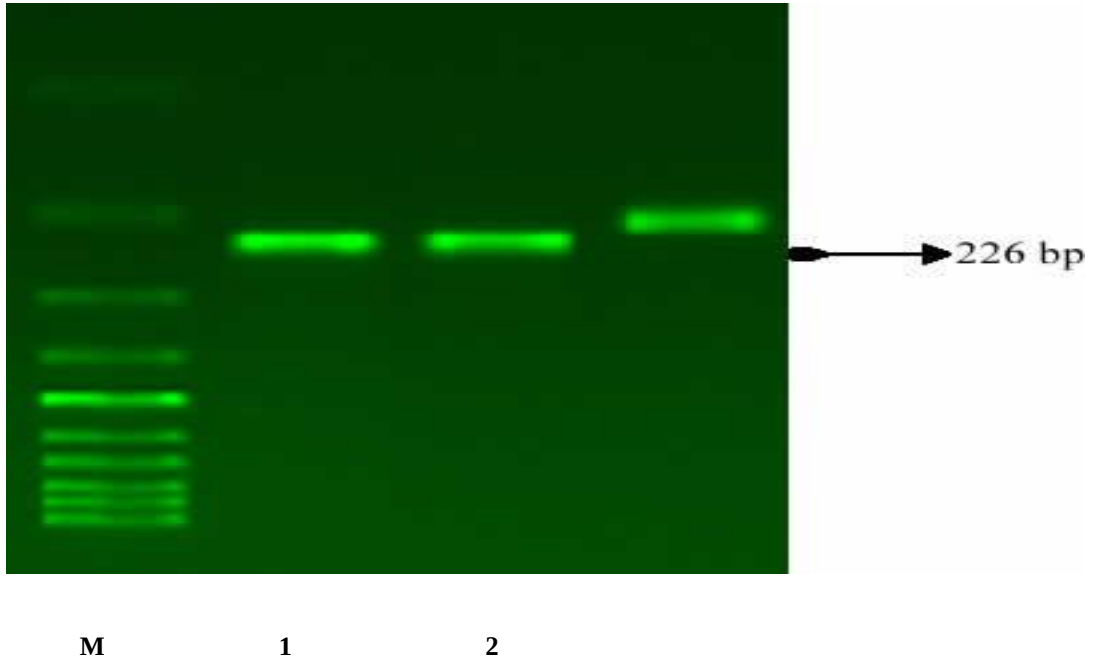
Bireyler homozigot tipik genotipli (AA) ise; *DraI* enzimi 226 bp'lık bölgeyi 5' ucundan TTTAAA dizisini tanıyarak TTT/AAA noktasından keser. Bunun sonucu olarak da 226 bp'lık amplifikasyon ürünü; 203 bp ve 23 bp'lık iki oligonükleotid parçasına ayrılmış olur ve iki bant gözlenir (Şekil.3.4).



Şekil.3.4. 226 bp'lık amplifikasyon ürününün homozigot tipik bireylerde, *Dra I* enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları (M=100 bp Ladder; 1 ve 2 homozigot tipik genotipli bireyler= 203 bp ve 23 bp uzunluğundaki oligonükleotidler).

3.1.3.3. "G/G" Genotipli Homozigot Atipik Bireyler

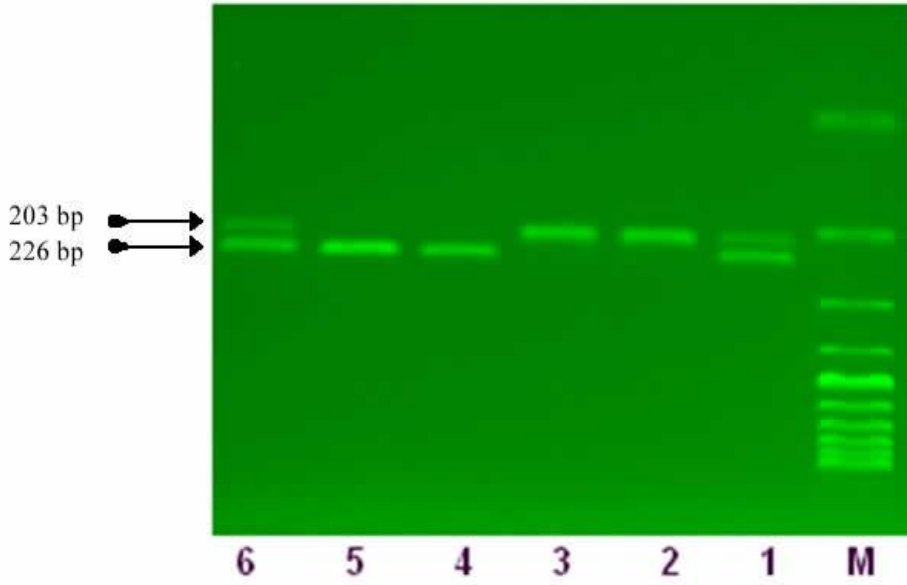
Bireyler homozigot atipik genotipli (GG) ise; TTTAAG dizisine bağlanamaz ve bu bölgedeki kesim işlemini gerçekleştiremez ve 226 bp'lık oligonükleotid parçası gözlenir (Şekil.3.5).



Şekil.3.5. 226 bp'lık amplifikasyon ürününün homozigot atipik bireylerde oluşan oligonükleotid uzunlukları (M=100 bp Ladder; 1 ve 2 homozigot atipik genotipli bireyler= 226 bp uzunluğundaki oligonükleotidler).

3.1.3.4. "A/G" Genotipli Heterozigot Bireyler

Bireyler heterozigot genotipli (AG) ise; bireylerin tek DNA ipliğinde "G", diğer DNA ipliğinde "A" olduğundan; *DraI* enzimi ile kesim sonucunda; bir DNA ipliği, "AA" genotipli bireylerde olduğu gibi, 203 bp ve 23 bp olarak iki oligonükleotide ayrılır. Diğer DNA ipliğinde ise "GG" genotipli bireylerde olduğu gibi, kesim işlemi gerçekleştirilemez ve heterozigot genotiplilerin oligonükleotid bantları 226 bp, 203 bp ve 23 bp olarak üç bant şeklinde gözlenir (Şekil.3.6).



Şekil.3.6. 226 bp'lık amplifikasyon ürününün heterozigot bireylerde oluşan oligonükleotid uzunlukları (M=100 bp Ladder; 1 ve 6 heterozigot genotipli bireyler= 226 bp, 203 bp ve 23 bp uzunluğundaki oligonükleotidler).

A→G Tek Nükleotid Polimorfizm bölgesini de kapsayacak şekilde çoğaltılan 226 bp'lık PCR ürününün *DraI* enzimi ile kesim sonucunda oluşan baz çifti uzunlukları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Çizelge.3.3).

Çizelge.3.3. *DraI* enzimi ile kesilen baz çiftlerinin bant uzunlukları.

GENOTİP	<i>DraI</i> enzimi ile kesim sonucunda oluşan oligonükleotid uzunlukları
Homozigot tipik (A/A)	203 bp, 23 bp
Homozigot atipik (G/G)	226bp
Heterozigot (A/G)	226 bp, 203 bp ve 23 bp

Çalışmamız sonucunda; açık göz rengine sahip bireyler ile bu bireylerin anne ve babalarından oluşan gönüllü bireylerde (n:303) *HERC2* gen polimorfizminin; % 4,6'sı homozigot tipik (A/A), % 45,6'i heterozigot (A/G) ve % 49,8'i homozigot atipik (G/G) genotip olarak belirlenmiştir. *HERC2* gen polimorfizmi ile oluşan alel frekansları ise (n:606); A alel frekansı; % 27,4 (n:166), G alel frekansı ise % 72,6 (n:440) olarak belirlenmiştir (Çizelge.3.4).

Çizelge.3.4. HERC2 gen polimorfizmi ile oluşan genotip ve alel frekansları.

Polimorfizm	Genotip Frekansı (n:303)	
	n	%
AA (Homozigot tipik)	14	4,6
AG (Heterozigot)	138	45,6
GG (Homozigot atipik)	151	49,8
Alel (A\G)	Alel Frekansı (n:606)	
	n	%
A	166	27,4
G	440	72,6

3.2. HERC2 Gen Polimorfizminin Araştırıldığı Açık Göz Rengine Sahip Çocuklar ile Bu Çocukların Anne ve Babalarından Oluşan Bireylerin Fenotipik ve Genotipik Açidan Değerlendirilmesi

3.2.1. Açık Göz Renginin Kalıtımında, Anne ve Babanın Fenotipik Etkisinin, Çocuklardaki Fenotipik Özellik Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda yer alan açık göz rengine sahip çocukların % 49,5'i (n:50) mavi; % 34,7'si (n:35) yeşil; % 15,8'i (n:16) ela göz rengine sahiptir. Bu bireylerin babalarının % 30,7'si (n:31) mavi, % 15,8'i (n:16) yeşil; % 25,7'si (n:26) ela; % 27,7'si (n:28) kahverengi göz rengine, annelerinin ise % 34,7'si (n:35) mavi; % 15,8'i (n:16) yeşil; % 19,8'i (n:20) ela; % 29,7'si (n:30) kahverengi göz rengine sahiptir (Çizelge.3.5).

Çizelge.3.5. Bireylerin fenotipik açıdan değerlendirilmesi.

Bireyler	Göz Rengi	Fenotip Frekansı (n:303)	
		n	%
Çocuk	Mavi	50	49,5
	Yeşil	35	34,7
	Ela	16	15,8
Baba	Mavi	31	30,7
	Yeşil	16	15,8
	Ela	26	25,7
	Kahverengi	28	27,7
Anne	Mavi	35	34,7
	Yeşil	16	15,8
	Ela	20	19,8
	Kahverengi	30	29,7

3.2.2. Açık Göz Rengine Sahip Çocuklar ile Anne ve Babalarının Genotip Frekanslarının Dağılımı

Çalışmamızda yer alan açık göz rengine sahip çocukların % 72,3'ü (n:73) homozigot atipik, % 27,7'si (n:28) heterozigot; bu çocukların babalarının % 34,7'si (n:35) homozigot atipik, % 57,4'ü (n:58) heterozigot, % 7,9'u (n:8) homozigot tipik; annelerinin % 42,6'sı (n:43) homozigot atipik, % 51,5'i (n:52) heterozigot, % 5,9'u (n:6) homozigot tipik genotipe sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge.3.6).

Çizelge.3.6. Çocuklar ile anne ve babalarına ait genotip frekanslarının dağılımı

Bireyler	Genotip	Genotip Frekansı (n:606)	
		n	%
Çocuk	GG	73	72,3
	AG	28	27,7
Baba	GG	35	34,7
	AG	58	57,4
	AA	8	7,9
Anne	GG	43	42,6
	AG	52	51,5
	AA	6	5,9

3.2.3. Tüm Populasyondaki Fenotip-Genotip İlişkisi

Çalışma grubumuzda;

"GG" genotipine sahip bireylerin;

% 76,8'i (n:116) mavi göz rengine,

% 15,9'u (n:24) yeşil göz rengine,

% 7,3'ü (n:11) ela göz rengine sahiptir.

"GG" genotipine sahip hiçbir birey kahverengi göz rengine sahip değildir.

"AG" genotipine sahip bireylerin;

% 31,2'si (n:43) yeşil göz rengine,

% 37,0'si (n:51) ela göz rengine,

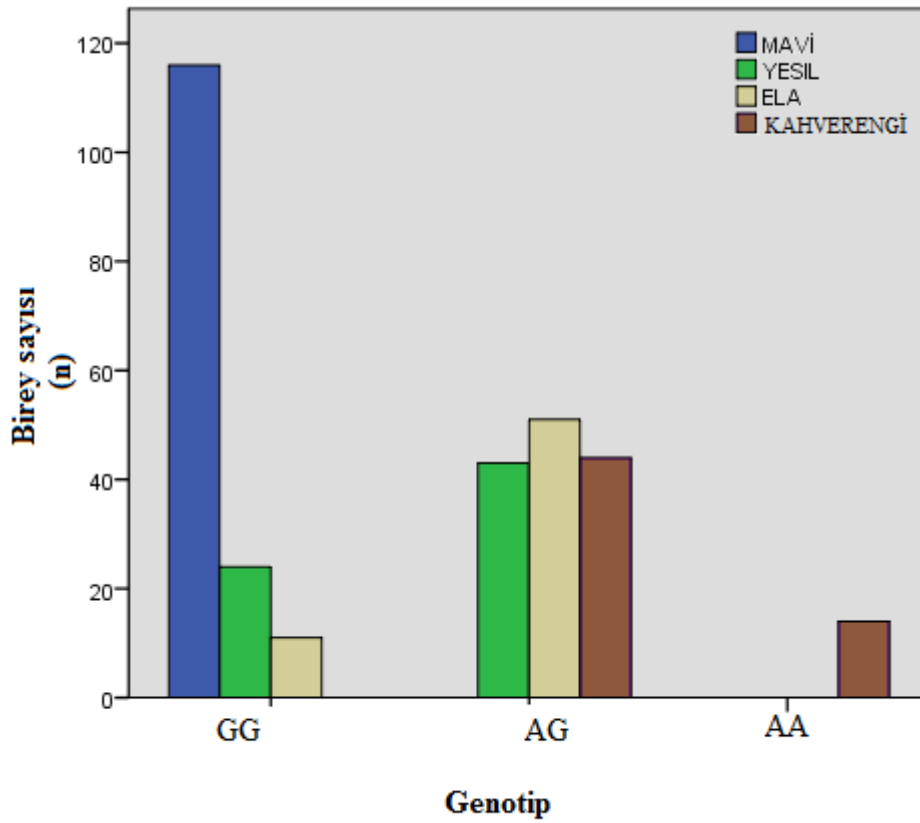
% 31,9'u (n:44) kahverengi göz rengine sahiptir.

"AA" genotipine sahip bireylerin;

% 100' ü (n:14) kahverengi göz rengine sahiptir (Çizelge.3.7; Şekil.3.7).

Çizelge.3.7. Tüm populasyonun fenotip-genotip ilişkisi.

Genoti P		FENOTİP				
		MAVİ	YEŞİL	ELA	KAHVERENG İ	P
GG	n	116	24	11	0	<0.001
	%	76,8	15,9	7,3	0	
AG	n	0	43	51	44	<0.001
	%	0	31,2	37,0	31,9	
AA	n	0	0	0	14	<0.001
	%	0	0	0	100,0	
Toplam	n	116	67	67	58	<0.001
	%	38,3	22,1	22,1	19,1	



Şekil.3.7. Tüm populasyondaki fenotip-genotip ilişkisi.

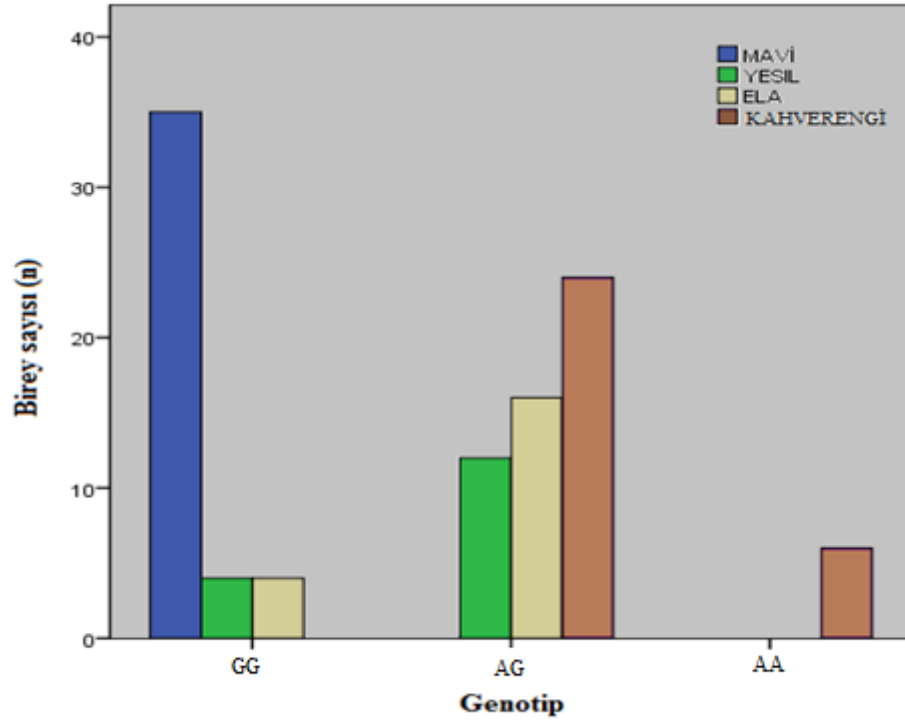
Tüm populasyondaki genotip ve fenotip ilişkisi değerlendirildiğinde, bireylerin genotipik özellikleri ve bu özelliğin fenotip üzerine etkisi arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p < 0.001$).

3.2.4. Anne, Baba ve Çocuklardaki Genotip-Fenotip İlişkisi

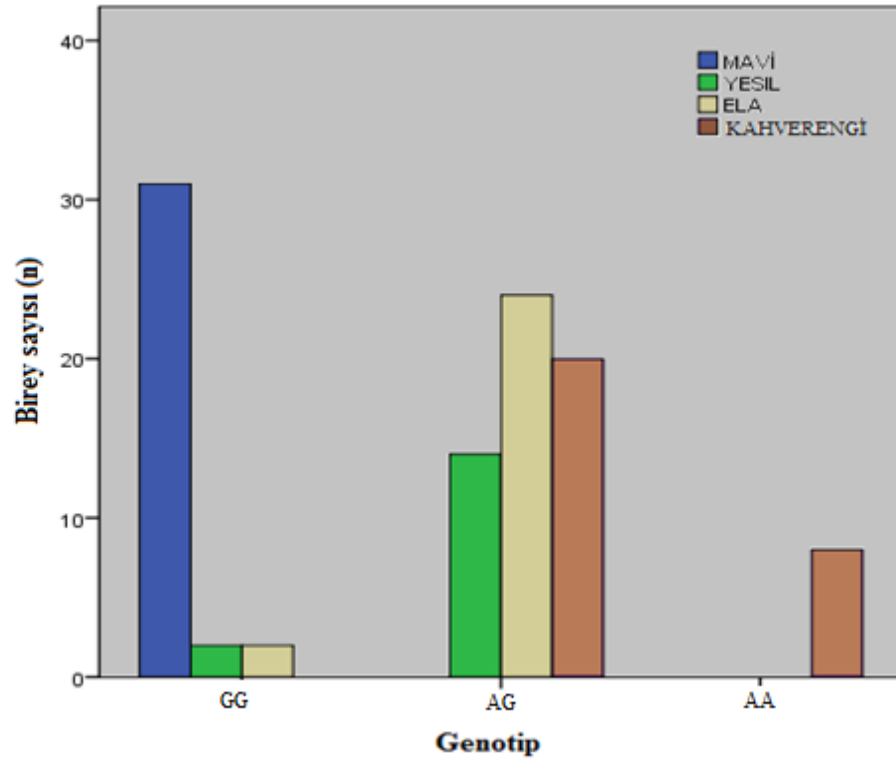
Anne, baba ve çocuklardaki genotip ile fenotip arasındaki ilişki χ^2 testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Çizelge.3.8; Şekil.3.8. Şekil.3.9. Şekil.3.10).

Çizelge.3.8. Anne, baba ve çocuklardaki genotip-fenotip ilişkisi.

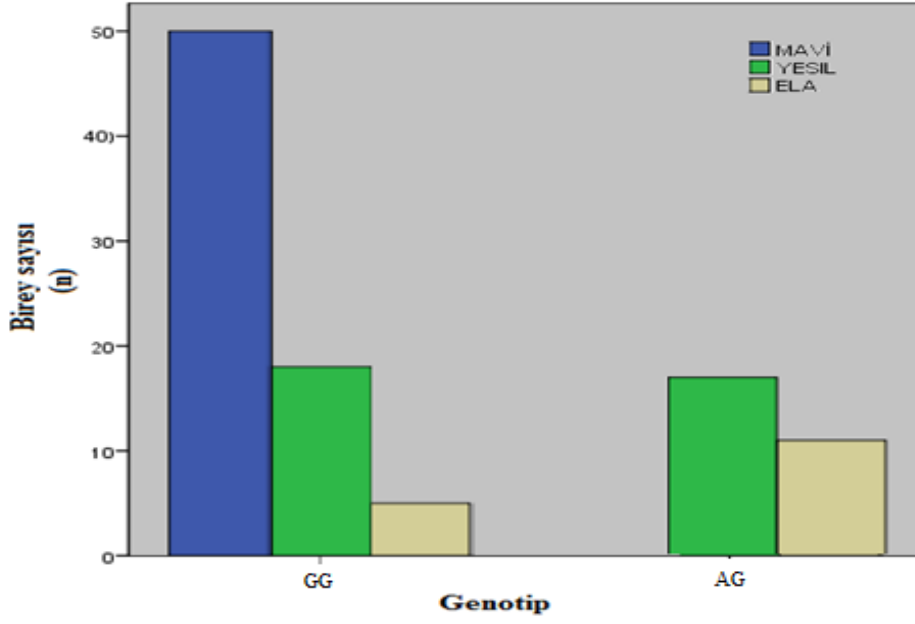
Bireyler	Genotip		FENOTİP				
			MAVİ	YEŞİL	ELA	KAHVERENGİ	p
ANNE	GG	n	35	4	4	0	<0.001
		%	81,4	9,3	9,3	0	
	AG	n	0	12	16	24	<0.001
		%	0	23,1	30,8	46,2	
	AA	n	0	0	0	6	<0.001
		%	0	0	0	100,0	
TOPLAM		n	35	16	20	30	<0.001
		%	34,7	15,8	19,8	29,7	
BABA	GG	n	31	2	2	0	<0.001
		%	88,6	5,7	5,7	0	
	AG	n	0	14	24	20	<0.001
		%	0	24,1	41,4	34,5	
	AA	n	0	0	0	8	<0.001
		%	0	0	0	100	
TOPLAM		n	31	16	26	28	<0.001
		%	30,7	15,8	25,7	27,7	
ÇOCUK	GG	n	50	18	5	0	<0.001
		%	68,5	24,7	6,8	0	
	AG	n	0	17	11	0	<0.001
		%	0	60,7	39,3	0	
TOPLAM		n	50	35	16	0	<0.001
		%	49,5	34,7	15,8	0	



Şekil.3.8. Populasyonda yer alan annelerin genotip-fenotip ilişkisi.



Şekil.3.9. Populasyonda yer alan babaların genotip-fenotip ilişkisi.



Şekil.3.10. Populasyonda yer alan çocukların genotip-fenotip ilişkisi.

Yukarıdaki çizelge ve grafiklerde görüldüğü gibi, çalışma grubumuz, anneler, babalar ve çocuklar olarak ayrıldığında, anne, baba ve çocukların sahip oldukları genotipik ve fenotipik özellikleri arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p < 0.001$).

3.2.5. Çocuk Fenotipi ile Anne ve Baba Fenotipi Arasındaki İlişki

Çalışmamızdaki çocukların sahip oldukları fenotipik özellikleri ile anne babalarının sahip oldukları fenotipik özelliklere ait sonuçlar aşağıda başlıklar halinde özetlenmiştir. Anne ve babalar; her ikisinin de gözü açık renkli, sadece birisinin gözü açık renkli ve her ikisinin de gözü kahverengi olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır.

Mavi göz rengine sahip çocukların;

- % 64'ünün hem annesi hem de babası açık göz rengine,
- % 30'unun anne ya da babalarından herhangi biri açık göz rengine,
- % 6'sının ise anne ve babalarının her ikisi de kahverengi göz rengine sahiptir.

Yeşil göz rengine sahip çocukların;

- % 37,1'inin hem annesi hem de babası açık göz rengine,
- % 57,1'inin anne ya da babalarından herhangi biri açık göz rengine,
- % 5,7'si ise anne ve babalarının her ikisi de kahverengi göz rengine sahiptir.

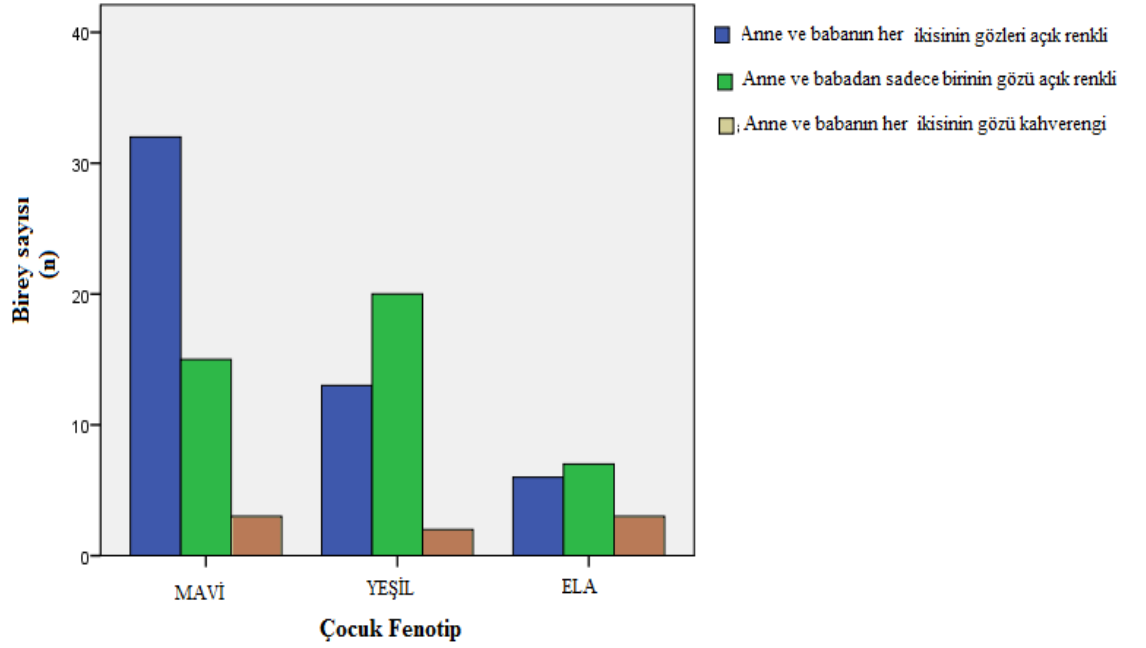
Ela göz rengine sahip çocukların;

- % 37,5'inin hem annesi hem de babası açık göz rengine,
- % 43,8'inin anne ya da babalarından herhangi biri açık göz rengine,
- % 18,8'inin ise anne ve babalarının her ikisi de kahverengi göz rengine sahiptir (Çizelge.3.9; Şekil.3.11).

Çizelge.3.9. Çocuk fenotipi ile anne ve baba fenotipi arasındaki ilişki.

	Fenotip		ANNE VE BABA FENOTİPİ				p
			Anne ve Babanın her ikisinin gözleri açık renkli	Anne ve Babadan sadece birinin gözü açık renkli	Anne ve Babanın her ikisinin gözü kahverengi	Toplam	
ÇOCUK FENOTİP	Mavi	n	32	15	3	50	p<0.01
		%	64,0	30,0	6,0	100	p<0.01
	Yeşil	n	13	20	2	35	p<0.01
		%	37,1	57,1	5,7	100	p<0.01
	Ela	n	6	7	3	16	p<0.01
		%	37,5	43,8	18,8	100	p<0.01
	Toplam	n	51	42	8	101	p<0.01
		%	50,5	41,6	7,9	100	p<0.01

Çocuk fenotipi ile anne ve baba fenotipi arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0.01$).



Şekil.3.11. Çocuk fenotipi ile anne ve baba fenotipi arasındaki ilişki.

3.2.6. Çocuk Genotipi ile Anne ve Baba Fenotipi Arasındaki İlişki

Çalışmamızdaki çocukların sahip oldukları genotipik özellikleri ile anne babalarının sahip oldukları fenotipik özelliklere ait sonuçlar aşağıda başlıklar halinde özetlenmiştir.

"GG" genotipine sahip çocukların;

- %58,9'unun hem annesi hem babası açık göz rengine,
- %31,5'inin anne ya da babalarından herhangi biri açık göz rengine,
- %9,6'sının ise anne ve babalarının her ikisi kahverengi göz rengine sahiptir.

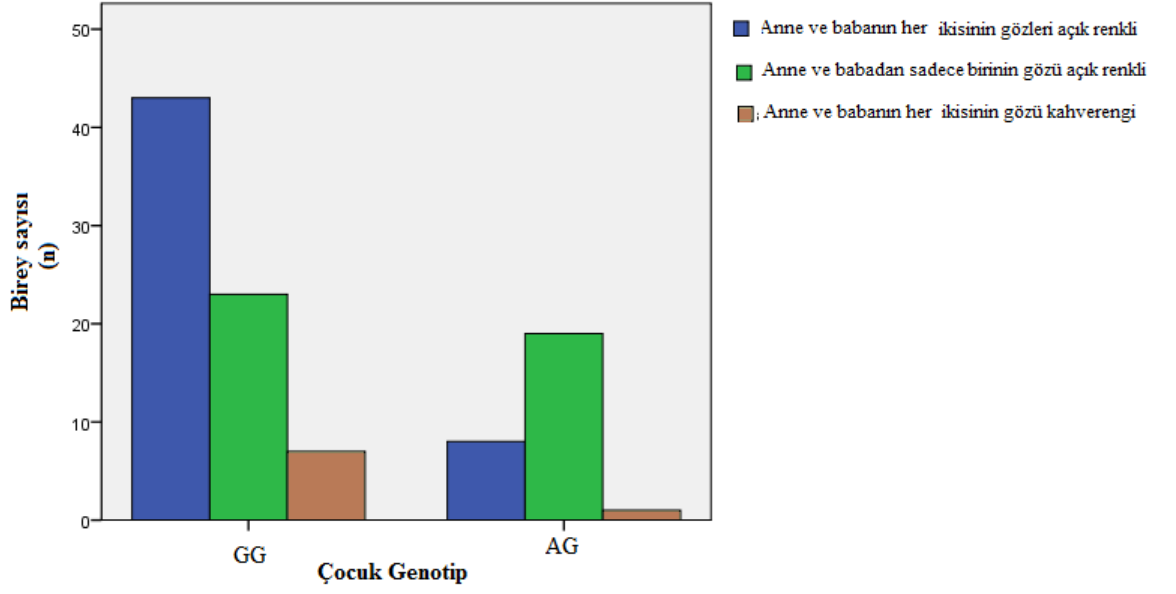
"AG" genotipine sahip çocukları;

- %50,5'inin hem annesi hem babası açık göz rengine,
 - %41,6'sının anne ya da babalarından herhangi biri açık göz rengine,
 - %7,9'unun ise anne ve babalarının her ikisi kahverengi göz rengine sahiptir
- (Çizelge.3.10; Şekil.3.12).

Çizelge.3.10. Çocuk genotipi ile anne ve baba fenotipi arasındaki ilişki.

ÇOCUK GENOTİPİ			ANNE VE BABA FENOTİPİ				p
			Anne ve Babanın her ikisinin gözleri açık renkli	Anne ve Babadan sadece birinin gözü açık renkli	Anne ve Babanın her ikisinin gözü kahverengi	Toplam	
	GG	n	43	23	7	73	p<0.01
		%	58,9	31,5	9,6	100	p<0.01
	AG	n	51	42	8	101	p<0.01
		%	50,5	41,6	7,9	100	p<0.01
	Toplam	n	8	19	1	28	p<0.01
		%	28,6	67,9	3,6	100	p<0.01

Çocuk genotipi ile anne ve baba fenotipi arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0.01$).



Şekil.3.12. Çocuk genotipi ile anne ve baba fenotipi arasındaki ilişki.

3.2.7.Çalıştığımız Populasyonun Hardy-Weinberg Dengesinin Tespiti

Çalışmamızda yapılan istatistiksel analizlere göre, HERC2 gen polimorfizmindeki, genotip ve alel frekans dağılımının Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olmadığı hesaplanmıştır ($p > 0.05$).

Çizelge.3.11. Çalıştığımız grubumuzun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığının tespiti.

	AA (Homozigot tipik) (n)	AG (Heterozigot) (n)	GG (Homozigot atipik) (n)
Gözlenen	14	138	151
Beklenen	22,74	120,53	159,74
P<0.05			

Çalışmamızda ayrıca, HERC2 gen polimorfizmi ile yaş ve cinsiyet arasındaki ilişki de hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.

4. TARTIŞMA

Göz, saç ve deri rengi gibi dış görünüşle ilgili karakterlerin DNA analizleri ile belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmalar adli bilimlerin ilgi odağı haline gelmiştir. Çünkü bu çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin kimliklendirmede ya da eleme kriteri olarak kullanımında çok fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Fenotipik özellikleri etkileyen gen polimorfizm çalışmalarının içinde en dikkat çekicilerinden birisi pigmentasyonla ilgili olanlarıdır. Göz rengi ise bu çalışmalarda sıklıkla karşımıza çıkan fiziki bir özelliktir (Duffy ve ark., 2004; Duffy ve ark., 2007; Jannot ve ark., 2005; Graf ve ark., 2005; Rees 2003; Tully 2007; Stokowski ve ark., 2007; Sulem ve ark., 2007; Norton ve ark., 2007; Branicki ve ark., 2007; Branicki ve ark., 2008; Branicki ve ark., 2009; Han ve ark., 2008; Sturm ve ark., 2009; Mengel-From ve ark., 2009; Valenzuela ve ark., 2010).

Göz rengi ile ilgili genlerin polimorfizmleri, toplumlar arasında çalışılarak toplumların karakteristik özellikleri ve birbirlerine olan genetik yakınlıkları belirlenebilmektedir (Sulem ve ark.,2007). Kayser ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada, Hollanda’da bulunan iki ayrı bölgedeki kişilerle Avrupalı, Asyalı (Japon ve Çin) ve Afrikalı kişiler arasında göz rengi ile ilgili genlerde farklı SNP’leri araştırmışlar ve SNP frekansları açısından, Avrupalı’ların Asya ve Afrikalılar’dan oldukça farklı olduğunu tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise melanosit hücrelerinin sayısı Asyalılarda, Afrika kökenli Amerikalılarda ve beyaz ırklarda karşılaştırılmış ve Asyalılarda toplam melanosit sayısının diğerlerine göre düşük olduğu belirlenmiştir (Albert ve ark., 2003).

Bireyler arasındaki göz rengi çeşitliliği melanin pigmentinin miktarına, türüne, melanozom sayısına ve bu melanozomların dağılımındaki farklılıklara bağlıdır (Imesch ve ark., 1996; Wielgus ve Sarna, 2005). Dolayısıyla göz rengi farklı olan bireylerde melanosit sayısı farklı değildir. Çünkü göz rengini sitoplazmadaki melanin miktarı ve özelliği belirlemektedir. Melanin biyosentezi melanozomlarda gerçekleşmektedir. Melanin üretimindeki biyolojik süreç olan melanogenezis

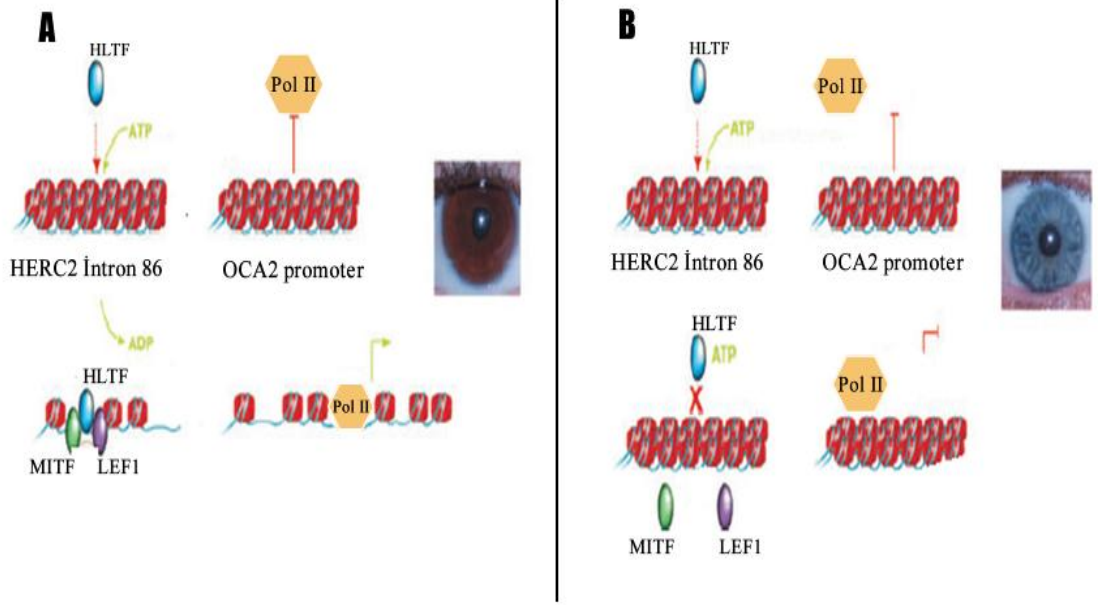
sonucunda koyu bir pigment (kahverengi-siyah) olan ömelanin ya da açık renk bir pigment (kırmızı- sarı) olan feomelanin elde edilmektedir (Sturm ve Frudakis, 2004).

Yeşil göz rengi oluşumu ihtimalini artıracak bölgeler içeren, bir melanozom transmembran G protein çifti reseptörü olan insan melanokortin-1 reseptörü (MC1R) (Rees, 2004; Rouzaud ve ark., 2005; Sturm, 2002) ömelaninden feomelanine sentez geçişini kontrol eden mekanizmada düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Bu gen çoğunlukla "kırmızı başlıklı gen" olarak adlandırılır. Çünkü bu genin ifadesi kırmızı saçlı ve yeşil gözlü insanlarda yaygındır (Branicki ve ark., 2009).

Göz renginin oluşmasında 16 farklı gen sorumludur. HERC2 ve OCA2 göz renginden sorumlu en önemli genler olarak gösterilmektedir. Her iki gen de 15. kromozomda bulunmaktadır. OCA2 geni 15q11.2-12, HERC2 geni ise 15q13 yer almaktadır (Eiberg ve ark., 2008; Kayser ve ark., 2008; Sturm ve ark., 2008). OCA2 geninin göz renginde major değişikliğe neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. (Eiberg ve Mohr 1996; Rebbeck ve ark., 2002; Zhu ve ark., 2004; Duffy ve ark., 2007). Ancak yapılan son çalışmalarda HERC2 geninin göz rengi ile daha güçlü bir bağlantıya sahip olduğu tespit edilmiştir (Kayser ve ark., 2008; Sturm ve ark., 2008; Eiberg ve ark., 2008). Çünkü White ve Smith'in 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada gösterdiği gibi HERC2 geninde yer alan bir intron, OCA2 geninin promotor bölgesini içermektedir (White ve Smith, 2010). Dolayısıyla HERC2 geni OCA2 geninin ekspresyonunu yani gen ifadesini etkilemektedir. Bu etkileşim gerek HERC2 gerekse OCA2 geninin her birinde gerçekleşen tek nükleotid polimorfizminin bireyin göz renginin oluşmasında önemli rol oynamasını sağlamaktadır (White ve Smith, 2010).

Sturm ve arkadaşları, 2008'de yaptıkları çalışmada göz renginin oluşumunu 92 SNP'nin etkileyebileceğini belirtmişlerdir (Sturm ve ark., 2008). Bu çalışmadan bir yıl sonra Branicki ve arkadaşları, bu SNP'lerden göz rengi üzerine en büyük etkiye sahip olan SNP'nin, HERC2 geninin 28365618. noktasındaki A→G tek nükleotid polimorfizmi olan rs12913832 adlı SNP olduğunu belirtmişlerdir (Branicki ve ark., 2009).

HERC2 geninin 5' terminalinde bulunan rs12913832 ile mavi/kahverengi göz rengi arasında oldukça kuvvetli bir ilişki tespit edilmiştir (Sturm ve ark., 2008; Eiberg ve ark., 2008; Sturm ve Larson, 2009)(Şekil.4.1).



Şekil.4.1. OCA2 gen ekspresyonu (Sturm ve Larson, 2009).

HERC2 geninin intron 86'sı OCA2 geninin iyi korunmuş bölgelerini içerir. rs12913832 SNP'si ise ön görülen transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı bölgede yer almaktadır. Bu bölgede Adenin (A) nükleotidi bulunuyorsa, LEF1, HLTF ve MITF transkripsiyon faktörleri bağlanır ve gen ifadesi gerçekleşir. Sonuçta kahverengi göz rengi oluşur (Şekil.4.1.A). Eğer bu bölgede Guanin (G) nükleotidi varsa transkripsiyon faktörleri bağlanamaz dolayısıyla genin ekspresyonu yapılamaz. Sonuçta mavi göz rengi oluşur (Şekil.4.1.B) (Sturm ve Larson, 2009). Bu yüzden G alleli bakımından homozigot olan bireylerde OCA2 geninin ifadesi yapılamaz. Bu nedenle melanin seviyesinde azalma olur. Böylece açık göz rengi oluşumu gözlenir (Sturm, 2008). Ayrıca gen düzenlenmesinde önemli rol oynayan LEF1 ve MITF transkripsiyon faktörleri aynı zamanda melanosit hücrelerinin gelişiminde ve farklılaşmasında da etkilidir (Levy ve ark., 2006; Larue ve Delmas,2006).

HERC2 genindeki A→G tek nükleotid polimorfizmini belirlemek amacı ile yaptığımız çalışma sonucunda genotip frekansları; %4,6 homozigot tipik (AA), %45,6 heterozigot (AG) ve %49,8 homozigot atipik (GG) genotip olarak belirlenmiştir. Alel frekansı "A" aleline sahip bireylerde %27,4, "G" aleline sahip bireylerde ise %72,6 olarak hesaplanmıştır.

Branicki ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, "A" alelinin insan fenotipinde koyu pigmentasyona neden olduğunu vurgulamıştır (Branicki ve ark., 2009). Biz de Branicki ile uyumlu olarak yaptığımız çalışmada "AA" genotipine sahip bireylerin sadece kahverengi göz rengine sahip olduğunu tespit ettik. Ayrıca yeşil, ela veya kahverengi göz rengine sahip bireylerin "AG" genotipine; yeşil, ela ya da mavi göz rengine sahip bireylerin "GG" genotipine sahip olduğunu belirledik. Sonuç olarak, yaptığımız tez çalışmasında, "AA" genotipine sahip tüm bireylerin kahverengi gözlü olduğunu, mavi gözlü tüm bireylerin de "GG" genotipine sahip olduklarını belirledik.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda çalıştığımız popülasyonun tümü genotip ve fenotip ilişkisi açısından değerlendirildiğinde, bireylerin genotipik özellikleri ve bu özelliğin fenotip üzerine etkisi arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p<0.001$). Aile bireyleri içinde yaptığımız istatistiksel analizler sonucunda ise anneler, babalar ve çocukların sahip oldukları genotipik ve fenotipik özellikleri ($p<0.001$); çocuk fenotipi ile anne ve baba fenotipi ($p<0.01$); çocuk genotipi ile anne ve baba fenotipi arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı ilişki tespit edilmiştir ($p<0.01$).

Çalışma grubumuzdaki bireylerde HERC2 gen polimorfizminin genotip ve alel frekans dağılımı Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olmamıştır. Hardy-Weinberg dengesi, belirli sabit şartlar altında her iki alelin frekansının ve genotipik oranının sabit kalması ve popülasyondaki bireylerin rastgele seçilme durumunda geçerlidir. Bizim çalışmamızda ise, toplumumuzdaki açık göz rengine sahip çocuklar ve onların anne-babaları çalışma grubumuzu oluşturmuştur. Dolayısı ile açık göz rengine sahip çocuklar hedeflenmiş ve bunların anne babaları çalışmaya dahil edilerek rastgele

seçim yapılmadığından, genotip ve alel frekanslarımız Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu çıkmamıştır ($p<0.05$).

Literatür taramamız sonucunda, toplumumuzda göz rengini etkileyen gen polimorfizmleriyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca diğerk ülkelerde ailelerin birkaç kuşaağını kapsayan çalışmalar olmakla birlikte (Eiberg ve ark., 2008, Sturm ve ark., 2008) aile içinde göz rengi seçilerek yapılmış genetik polimorfizm çalışması bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu çalışmanın, toplumumuzda göz rengine etkileyen genlerdeki polimorfizmlerin frekanslarının çıkarılması ve göz rengine göre bu polimorfizmlerin belirlenmesinin adli olayların aydınlatılmasına yardımcı olması yönünden önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemiz bireylerinde göz rengi ile ilişkili herhangi bir genetik polimorfizm çalışması yapılmamıştır. Diğer ülkelerde ailelerin birkaç kuşağını kapsayan çalışmalar olmakla birlikte aile içinde göz rengi seçilerek yapılmış genetik polimorfizm çalışması bulunmamaktadır. Bu nedenle yapmış olduğumuz çalışma bu ilişkiyi inceleyen ilk bilimsel çalışma olmasından dolayı önemli olabileceği düşünülmektedir.

Göz rengi oluşumundan 16 farklı gen sorumlu olmasına rağmen "Hect domain and RCC1-like domain-containing protein 2 (HERC2)" geni göz renginin oluşumundan sorumlu en önemli gendir. Yapmış olduğumuz analizlerin (PCR-RFLP) değerlendirilmesi sonucunda bu genin; homozigot tipik (AA), homozigot atipik (GG), heterozigot (AG) olmak üzere üç farklı varyasyonu belirlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda göz rengi mavi, yeşil, ela ve kahverengi olmak üzere dört kategoride incelenmiştir.

HERC2 geninde yer alan A→G tek nükleotid polimorfizmi ile;

- * "GG" genotipine sahip bireylerin yeşil, ela ya da mavi göz rengine,
- * "AG" genotipine sahip bireylerin yeşil, ela veya kahverengi göz rengine,
- * "AA" genotipine sahip bireylerin ise sadece kahverengi göz rengine sahip olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, olay yerinden alınan biyolojik materyalde yapılan analizler sonucunda, şüpheli şahıs "AA" genotipine sahip ise kesinlikle kahverengi göz rengine (ela, yeşil ve mavi göz rengine sahip olamayacağı), eğer kişi mavi göz rengine sahip ise kesinlikle "GG" genotipine sahip olacağı sonucuna varılmıştır.

Açık göz rengine sahip çocuklar ile bu çocukların anne ve babalarından oluşan çalışma grubumuzda yapılan analizler sonucunda;

- ✓ Populasyonun tümü genotip ve fenotip ilişkisi açısından değerlendirildiğinde, bireylerin genotipik özellikleri ve bu özelliğin fenotip üzerine etkisi arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p < 0.001$).

- ✓ Anneler, babalar ve çocukların sahip oldukları genotipik ve fenotipik özellikler arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0.001$).
- ✓ Çocuk fenotipi ile anne ve baba fenotipi arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0.01$).
- ✓ Çocuk genotipi ile anne ve baba fenotipi arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($p<0.01$).

Genetik çalışmalar maliyeti fazla olan analizlerdir. Dolayısıyla adli vakalarda kimlik tespiti sırasında genotipik özelliklerin belirlenmesi fenotipik özellikler hakkında çıkarımda bulunmamızı sağlayacaktır. Bu durum da adli biyolojide zaman, maliyet ve iş gücü açısından oldukça fazla avantaj sağlayacaktır.

Göz rengini belirleyen genlerdeki polimorfizmlerle ilgili veri tabanı oluşturulduğu takdirde, şüpheli sayısının çok fazla olduğu durumlarda, göz rengi polimorfizmi çalışılarak şüphelinin göz rengi tahmin edilebilir ve göz rengi tespiti, kimliklendirmede fiziksel bir eleme kriteri olarak kullanılabilir ya da toplu ölümlerin olduğu kazalarda kimlik bilgilerine ulaşmak açısından fayda sağlayabilir. Ayrıca, göz rengi fenotipini, istatistiksel olarak oldukça anlamlı etkilediğini bulduğumuz HERC2 genindeki rs12913832 A→G tek nükleotid polimorfizminin, diğer toplumlarda da çalışılması, bu sonuçlarla uluslararası bir veri tabanı oluşturulması ve uluslararası suçların aydınlatılması da önerilmektedir.

ÖZET

HERC2 Gen Polimorfizminin Göz Rengi ile İlişkisi

Olay yerinde bulunan örneğin kaynağının fiziksel özelliklerinin belirlenmesi delil niteliğinde bilgi sağlamaktadır. Bireylerin görünüşlerinin en bariz tanımlayıcıları yüz özellikleri, boyu ve ten rengidir. Ayrıca göz, saç ya da deri rengi gibi fiziksel karakterlerle ilişkili SNP genotiplemesinin Adli bilimler alanında yakın gelecekte kişisel kimliklendirme için yararlı bir araç olması beklenmektedir.

Fiziksel bir özellik olan insan göz rengi ve bu konu hakkında yapılan çalışmaların temelinde iris yer almaktadır. Çünkü iriste yer alan melanositlerde üretilen melanin pigmenti miktarına bağlı olarak göz rengi oluşmaktadır.

Göz renginin oluşmasından 16 farklı gen sorumlu olmasına rağmen daha çok 15. kromozomdaki iki komşu gen olan hect domain and RCC1-like domain-containing protein 2 (HERC2) ve oculocutaneous albinism II (OCA2), göz renginin oluşumuna daha çok etki etmektedir. Ayrıca, son birkaç yıl içinde HERC2'nin göz rengi ile daha güçlü bir bağlantısının olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, toplumumuzdaki açık göz rengine sahip bireyler ile anne ve babalarının HERC2 genotiplerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla, 303 bireyde HERC2 genindeki A→G tek nükleotid polimorfizmi araştırıldı. İzole edilen DNA'lar PCR tekniği ile çoğaltılarak, 246 bp uzunluğundaki oligonükleotid amplifiye edildi. PCR ürünü DraI restriksiyon enzimi ile kesildi. HERC2 genindeki A→G tek nükleotid polimorfizminin (rs12913832) genotip frekansları; %4,6 homozigot tipik, %45,6 heterozigot ve %49,8 homozigot atipik genotip olarak belirlendi. Alel frekansı A aleline sahip bireylerde %27,4, G aleline sahip bireylerde ise %72,6 olarak tespit edildi.

Çalışmamızda HERC2 geninde yer alan rs12913832 adlı tek nükleotid polimorfizmi ile "GG" genotipli bireylerin kahverengi göz rengine sahip olamayacağı (göz rengi yeşil, ela ya da mavi olabilir) ve "AG" ile "AA" genotiplerine sahip bireylerin ise mavi göz rengine sahip olamayacağı (göz rengi yeşil, ela veya kahverengi olabilir) sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Göz rengi, Gen polimorfizmi, HERC2, Genotip, Fenotip.

SUMMARY

Effect of HERC2 Gene Polymorphism on Eye Color

To determine the physical characteristics of the source of a crime scene sample would provide important probative information. Facial features, height and skin colouring are the major physical descriptors of a person. In addition, in the field of forensic science, genotyping of SNPs associated with physical traits such as eye, hair or skin colors is expected to be a useful tool for personal identification in the near future.

Human eye colour as a physical trait and studies on this topic are based on iris. Because eye color results from varying degrees of melanin produced in the melanocytes of the iris.

Although there are about 16 different genes responsible for eye color, it is mostly attributed to two adjacent genes on chromosome 15, hect domain and RCC1-like domain-containing protein 2 (HERC2) and ocular albinism (oculocutaneous albinism II (OCA2)). In addition, within the last couple of years, HERC2 has been linked more strongly to eye color.

The aim of this study is to determine HERC2 genotypes of individuals with light colored eyes and their parents. For this purpose, A→G single nucleotide polymorphism (SNP) (rs12913832) of HERC2 gene was analyzed in 303 individuals. The isolated DNAs were amplified with the PCR technique and 246 bp oligonucleotide was produced. The amplified oligonucleotides were cut with *Dra*I restriction enzyme. The genotype frequencies of the SNP in the HERC2 gene were determined as follows; 4.6% homozygote typical (AA), 45.6% heterozygote (AG) and 49.8% homozygote atypical (GG) genotype. Additionally the frequency of A allele was found as 27.4% and of G allele as 72.6%.

In this study, it is suggested that the prediction relies mainly on rs12913832 in HERC2 gene, in an exclusive approach: G/G-homozygotes are deduced not to have brown eyes (the eye color could be green or blue). A/G-heterozygotes and A/A-homozygotes are deduced not to have blue eyes (the eye color could be green or brown).

Key words: Eye Color, Gene polymorphism, HERC2, Genotype, Phenotype.

KAYNAKLAR

ABBOTT, C., JACKSON, I., CARRITT, B., POVEY, S. (1991). The human homolog of the mouse brown gene maps to the short arm of chromosome 9 and extends the known region of homology with mouse chromosome 4. *Genomics*. **11**: 471–473.

AGGARWAL, A.K. (1995). Structure and function of restriction endonucleases. *Curr Opin Struct Biol*. **5**(1): 11-9.

ALBERT, D.M., GREEN, W.R., ZIMBRIC, M.L., LO, C., GANGNON, RE., HOPE, KL., GLEISER, J. (2003). Iris melanocyte numbers in Asian, African American, and Caucasian irides. *Trans Am Ophthalmol Soc*. **101**: 217-21

ANCANS, J., TOBIN, D.J., HOOGDUIJN, M.J., SMIT, N.P., WAKAMATSU, K., THODY, A.J. (2001). Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Exp Cell Res*. **268**: 26–35.

ANNO, S., ABE, T., YAMAMOTO, T. (2008). Interactions between SNP alleles at multiple loci contribute to skin color differences between caucasoid and mongoloid subjects. *Int. J. Biol. Sci*. **4**: 81–86.

ASANO, N., SCHLOTZER-SCHREHARDT, U., AND NAUMANN, G.O. (1995). A histopathologic study of iris changes in pseudoexfoliation syndrome. *Ophthalmology*. **102**: 1279–1290.

BARRETT, A.W., SCULLY, C. (1994). Human oral mucosal melanocytes: a review. *J Oral Pathol Med*. **23**: 97-103.

BOISSY, R., ZHAO, H., OG, W., AUSTIN, L., WILDENBERG, S., BOISSY, Y., ZHAO, Y., STURM, R., HEARING, V., KING, R., NORDLUND, J. (1996).

Mutation in and lack of expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) in melanocytes from an individual with brown oculocutaneous albinism: a new subtype of albinism classified as 'OCA3.' *Am J Hum Genet.* **58**: 1145–1156.

BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* **32**(3): 314-331.

BRANICKI, W., BRUDNIK, U., DRAUS-BARINI, J., KUPIEC, T., WOJAS-PELC, A. (2008). Association of the SLC45A2 gene with physiological human hair colour variation. *J Hum Genet.* **53**(11-12): 966-71.

BRANICKI, W., BRUDNIK, W.U., & WOJASPELC, A. (2009). Interactions between HERC2, OCA2, and MC1R may influence human pigmentation phenotype. *Annals of Hum Genet.* **73**: 160–170.

BRANICKI, W., BRUDNIK, U., KUPIEC, T., WOLAŃSKA-NOWAK, P., WOJAS-PELC, A. (2007). Determination of phenotype associated SNPs in the MC1R gene. *J Forensic Sci.* **52**(2): 349-54.

BRILLIANT, M. (2001). The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, ocular albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. *Pigment Cell Res.* **14**: 86–93.

BUTLER, J.M. (2005). Forensic DNA typing. Biology Technology and Genetics of STR Markers. USA: Elsevier Press. p.:33-84.

CARRANZA, F.A., NEWMANN, M.G. (1996). Clinical Periodontology 8th ed: The normal periodontium. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders Co, London, Montreal, Tokyo; Section 1.

CASSIDY, S.B., & DRISCOLL, D.J. (2009). Prader-Willi syndrome. *European J Genet.* **17**: 3–17.

CHANG, B., SMITH, R.S., HAWES, N.L., ANDERSON, M.G., SAVINOVA, O., RODERICK, T.H., HECKENLIVELY, J.R., DAVISSON, T., AND JOHN, S.W. (1999). Interacting loci cause severe iris atrophy and glaucoma in DBA / 2J mice. *Nat. Genet.* **21**: 405–409.

CHINTAMANENI, C., RAMSAY, M., COLMAN, M., FOX, M., PICKARD, R., KWON, B. (1991). Mapping the human CAS2 gene, the homologue of the mouse brown (b) locus, to human chromosome 9p22-pter. *Biochem Biophys Res Commun.* **178**: 227–235.

CONAWAY, R.C., CONAWAY, J.W. (1993). General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 161-190.

DAAL, A. (2008). The genetic basis of human pigmentation. *Genetics Supplement Series Forensic Science International.* **1**: 541–543.

DAUGMAN, J. (2006). Probing the uniqueness and randomness of Iris Codes: results from 200 billion iris pari comparisons. *Proc. IEEE.* **94**: 1927–1935.

DONALDSON, D.D. (1961). The significance of the iris in mongolids: Brushfield spots. *Arch. Ophthalmol.* **65**: 26–31.

DUFFY, D.L., MONTGOMERY, G.W., CHEN, W., ZHAO, Z., LE, L., JAMES, M.R., HAYWARD, N.K., MARTIN, N.G., STURM, R.A. (2007). A three single-nucleotide polymorphism haplotype in intron 1 of OCA2 explains most human eye-color variation. *Am J Hum Genet.* **80**: 241–252.

DUFFY, D.L., BOX, N.F., CHEN, W., PALMER, J.S., MONTGOMERY, G.W., JAMES, M.R., HAYWARD, N.K., MARTIN, N.G., STURM, R.A. (2004). Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes. *Hum Mol Genet.* **13**(4): 447-61.

DURHAM-PIERRE, D., GARDNER, J., NAKATSU, Y., KING, R., FRANCKE, U., CHING, A., AQUARON, R., DEL MARMOL, V., BRILLIANT, M. (1994). African origin of an intragenic deletion of the human P gene in tyrosinase positive oculocutaneous albinism. *Nat Genet.* **7**: 176–179.

DURHAM-PIERRE, D., KING, R., NABER, J., LAKEN, S., BRILLIANT, M. (1996). Estimation of carrier frequency of a 2.7 kb deletion allele of the P gene associated with OCA2 in African Americans. *Hum Mutat.* **7**: 370–373.

EAGLE, R.C. (1988). Iris pigmentation and pigmented lesions: an ultrastructural study. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **86**: 581–687.

EIBERG, H., AND J. MOHR. (1996). Assignment of genes coding for brown iris colour (BEY2) and brown hair colour (HCL3) on chromosome 15q. *Eur. J. Hum. Genet.* **4**: 237–241.

EIBERG, H., TROELSEN, J., NIELSEN, M., MIKKELSEN, A., MENGEL-FROM, J., KJAER, K.W., HANSEN, L. (2008). Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the HERC2 gene inhibiting OCA2 expression. *Hum. Genet.* **123**:177–187.

EMIR, F., ve ÖZDEN, A. (2006). Genetik polimorfizm ve polimorfizm çalışmaları. *Güncel Gastroenteroloji.* **10** (1): 24-28.

ERIKSSON, N., MACPHERSON, J.M., TUNG, J.Y., HON, L.S., NAUGHTON, B., SAXONOV, S., AVEY, L., WOJCICKI, A., PE'ER, I., MOUNTAIN, J. (2010). Web-based, participant-driven studies yield novel genetic associations for common traits. *Plos Genet.* **6** (6): 1-20 (e1000993).

FLANAGAN, N., HEALY, E., RAY, A., PHILIPS, S., TODD, C., JACKSON, I., BIRCH-MACHIN, M., REES, J. (2000). Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation. *Hum Molec Genet.* **9**: 2531–2537.

FORRESTER, J.V., DICK, A.D., MCMENAMIN, P.G., AND ROBERTS, F. (2008). *The Eye: Basic Sciences In Practice* (Edinburgh, New York: *Saunders Ltd*).

FRUDAKIS, T., TERRAVAINEN, T., THOMAS, M. (2007). Multilocus OCA2 genotypes specify human iris colors. *Hum Genet.* **122**: 311–326.

FRUDAKIS, T., THOMAS, M., GASKIN, Z., VENKATESWARLU, K., CHANDRA, K.S., GINJUPALLI, S., GUNTURI, S., NATRAJAN, S., PONNUSWAMY, V.K., PONNUSWAMY, K.N. (2003). Sequences associated with human iris pigmentation. *Genetics.* **165**:2071–2083.

GALTON, F. (1886). Family likeness in eye-colour. *Proc. R. Soc. Med. Lond.* **40**: 402–416.

GARCIA-GONZALO, F.R., & ROSA, J.L. (2005). The HERC proteins: functional and evolutionary insights. *Cell Mol Life Sci.* **62**: 1826–1838.

GARDNER, J., NAKATSU, Y., GONDO, Y., LEE, S., LYON, M., KING, R.A., BRILLIANT, M.H. (1992). The Mouse pinkeyed dilution gene: association with human Prader-Willi and Angelman Syndromes. *Science.* **257**: 1121.

GONZALEZ, F.J. (1999). Polymorphisms in xenobiotic metabolism. In *Molecular and Applied Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes. Life Sciences Pharmacogenetics.* **303**: 91-110.

GOODWIN, W., LINACR, E.A., HALL, S. (2007). *DNA structure and the genome. An Introduction to Forensic Genetics.* John Wiley & Sons, Ltd. England. p.:7-15.

GRAF, J., HODGSON, R., VAN DAAL, A. (2005). Single nucleotide polymorphisms in the MATP gene are associated with normal human pigmentation variation. *Hum Mutat.* **25**(3): 278-84.

GREEN, E.K. (1998). Restriction Fragment- Length Polymorphism. Eds; Rapley R, Walker J. In. Molecular Biomethods Handbook. New Jersey: Humana Press, **8**: 271-279.

GÜLLÜLÜ, G., KIVANÇ, S. (2010). Göz ve eklemlerinin embriyolojisi. *Temel Göz Hastalıkları*. Ed.: P. A. O'dwyer, Y. A. Akova. Güneş Tıp Kitabevleri. s.:3-117.

HAKINKEN, L., UITTO, V., LARJAVA, H. (2000). Cell Biology of gingival wound healing. *Periodontology 2000*. **24**: 127-152.

HAMABE, J., FUKUSHIMA, Y., HARADA, N., ABE, K., MATSUO, N., NAGAI, T., YOSHIOKA, A., TONOKI, H., TSUKINO, R., NIIKAWA, N. (1991). Molecular study of the Prader-Willi syndrome: deletion, RFLP, and phenotype analyses of 50 patients. *Am J Med Genet*. **41**: 54-63.

HAN, J., KRAFT, P., NAN, H., GUO, Q., CHEN, C., QURESHI, A., HANKINSON, S.E., HU, F.B., DUFFY, D.L., ZHAO, Z.Z., MARTIN, N.G., MONTGOMERY, G.W., HAYWARD, N.K., THOMAS, G., HOOVER, R.N., CHANOCK, S., HUNTER, D.J. (2008). A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation. *PLoS Genet*. **4**(5):e1000074.

(<http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/gene/taq.polymerase.jpg>). Erişim Tarihi:15.07.2012.

(<http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer>). Erişim Tarihi:10.07.2012.

(<http://www.en.wikipedia.org/wiki/Melanin>). Erişim Tarihi: 02.07.2012.

(<http://www.ghr.nlm.nih.gov/gene/HERC2>). Erişim Tarihi:05.07.2012.

(<http://www.ghr.nlm.nih.gov/gene/OCA2>). Erişim Tarihi:05.07.2012.

(<http://www.news-medical.net-Mechanism>). Erişim Tarihi:24.06.2012.

(<http://www.science.howstuffworks.com>). Erişim Tarihi: 03.07.2012.

(<http://www.tr.wikipedia.org/wiki/delesyon>). Erişim Tarihi:01.07.2012.

(<http://www.tr.wikipedia.org/wiki/insersiyon>). Erişim Tarihi:01.07.2012.

(<http://www.webmd.com/eye-health/picture-of-the-eyes>). Erişim Tarihi:08.07.2012.

HURST, C.C. (1908). On the inheritance of eye colour in man. *Molecular and General Genet.* MGG **1**: 393–394.

IMESCH, P.D., BINDLEY, C.D., KHADEMIAN, Z., LADD, B., GANGNON, R., ALBERT, D.M., WALLOW, I.H. (1996). Melanocytes and iris color electron microscopic findings. *Arch Ophthalmol.* **114**: 443–447.

JANNOT, A.S., MEZIANI, R., BERTRAND, G., GÉRARD, B., DESCAMPS, V., ARCHIMBAUD, A., PICARD, C., OLLIVAUD, L., BASSET-SEGUIN, N., KEROB, D., LANTERNIER, G., LEBBE, C., SAIAG, P., CRICKX, B., CLERGET-DARPOUX, F., GRANDCHAMP, B., SOUFIR, N., MELAN-COHORT. (2005). Allele variations in the OCA2 gene (pink-eyed-dilution locus) are associated with genetic susceptibility to melanoma. *Eur J Hum Genet.* **13**(8): 913-20.

JIMBOW, K., QUEVEDO, W.C., PROTA G. et al. (1999). Biology of melanocytes. In: Freedberg, I.M., Eisen, A.Z., Wolff, K. et al. eds. *Dermatology in General Medicine*, 5th edn, Vol. 1. New York: McGraw-Hill: 192-220.

KAYSER, M., LIU, F., JANSSENS, A.C., RIVADENEIRA, F., LAO, O., VAN DUIJN, K., VERMEULEN, M., ARP, P., JHAMAI, M.M., VAN IJCKEN, W.F., DEN DUNNEN, J.T., HEATH, S., ZELENKA, D., DESPRIET, D.D., KLAVER, C.C., VINGERLING, J.R., DE JONG, P.T., HOFMAN, A., AULCHENKO, Y.S., UITTERLINDEN, A.G., OOSTRA, B.A., VAN DUIJN, C.M. (2008). Three

genome-wide association studies and a linkage analysis identify HERC2 as a human iris color gene. *Am J Hum Genet.* **82**: 411–42.

KNOLL, J.H.M., NICHOLLS, R.D., MAGENIS, R.E., GLATT, K., GRAHAM JR, J.M., KAPLAN, L., LALANDE, M. (1990). Angelman syndrome: three molecular classes identified with chromosome 15q11q13-specific DNA markers. *Am J Hum Genet.* **47**: 149–155.

KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJOBACK, R., SJOGREEN, B., STROMBOM, L., STÅHLBERG, A., ZORIC, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* **27**(2-3): 95-125.

LAMOREUX, M.L., ZHOU, B.K., ROSEMBLAT, S., ORLOW, S.J. (1995). The pinkeyed- dilution protein and the eumelanin/pheomelanin switch: in support of a unifying hypothesis. *Pigment Cell Res.* **8**: 263–270.

LARUE, L., AND DELMAS, V. (2006). The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma. *Front. Biosci.* **11**: 733–74.

LEE, M.J., AND STEPHENSON, D.A. (2007). Recent developments in neurofibromatosis type 1. *Curr. Opin. Neurol.* **20**: 135–341.

LEE, S.T., NICHOLLS, R.D., JONG, M.T., FUKAI, K., SPRITZ, R.A., (1995). Organization and sequence of the human P gene and identification of a new family of transport proteins. *Genomics.* **26**: 354–363.

LEVY, C., KHALED, M., AND FISHER, D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol. Med.* **12**: 406–414.

LIDA, R., UEKI, M., TAKESHITA, H., FUJIHARA, J., NAKAJIMA, T., KOMINATO, Y., NAGAO, M., AND YASUDA, T. (2009). Genotyping of five

single nucleotide polymorphisms in the OCA2 and HERC2 genes associated with blue-brown eye color in the Japanese population. *Eur J Hum Genet.* **27**(5): 323-7.

LIU, F., VAN DUIJN, K., VINGERLING, J.R., HOFMAN, A., UITTERLINDEN, A.G., JANSSENS, A.C., KAYSER, M. (2009). Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Current Biology.* **19**(5): R192-193.

LIU, F., WOLLSTEIN, A., HYSI, P.G., ANKRA-BADU, G.A., SPECTOR, T.D., PARK, D., ZHU, G., LARSSON, M., DUFFY, D.L., MONTGOMERY, G.W., MACKEY, D.A., WALSH, S., LAO, O., HOFMAN, A., RIVADENEIRA, F., VINGIERLING, J.R., UITTERLINDEN, A.G., MARTIN, N.G., HAMMOND, C.J., KAYSER, M. (2010). Digital quantification of human eye color highlights genetic association of three new loci. *Plos Genet.* **6**(5): e1000934.

MAATTA, M., HELJASVAARA, R., PIHLAJANIEMI, T., AND UUSITALO, M. (2007). Collagen XVIII/endostatin shows a ubiquitous distribution in human ocular tissues and endostatin-containing fragments accumulate in ocular fluid samples. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **245**: 74–81.

MARIEN, P., BROUNS, R., ENGELBORGHES, S., WACKENIER, P., VERHOEVEN, J., CEULEMANS, B., AND DE DEYN, P.P. (2008). Cerebellar cognitive affective syndrome without global mental retardation in two relatives with Gillespie syndrome. *Cortex.* **44**: 54–67.

MAY, C.A. (1999). Mast cell heterogeneity in the human uvea. *Histochem. Cell Biol.* **112**: 381–386.

MAYER, T.C. (1973). The migration pathway of neural crest cells into the skin of mouse embryos. *Dev Biol.* **34**: 39.

MCMENAMIN, P.G. (1997). The distribution of immune cells in the uveal tract of the normal eye. *Eye.* **11**: 183–193.

MEISEL, A., MACKELDANZ, P., BICKLE, T.A., KRUGER, D.H., SCHROEDER, C. (1995). Type III restriction endonucleases translocate DNA in a reaction driven by recognition site-specific ATP hydrolysis. *Embo J.* **14**(12): 2958-66.

MENGEL-FROM, J., WONG, T.H., MORLING, N., REES, J.L., JACKSON, I.J. (2009). Genetic determinants of hair and eye colours in the Scottish and Danish populations. *BMC Genet.* **30**: 10-88.

MENGEL-FROM, J., BØRSTING, C., SANCHEZ, J.J., EIBERG, H., MORLING, N. (2010). Human eye colour and HERC2, OCA2 and MATP, *Forensic Sci. Int. Genet.* **4**(5): 323-8.

MEYSKENS, FL Jr., McNULTY, S.E., BUCKMEIER, J.A., TOHIDIAN, N.B., SPILLANE, T.J., KAHN, R.S., GONZALEZ, R.I. (2001). Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes. *Free Radical Biology and Medicine.* **31**: 799-808.

MURRAY, N.E. (2000). Type I Restriction Systems: Sophisticated Molecular Machines (a Legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 412-434.

NAPPI, A.J., VASS, E. (1996). Hydrogen peroxide generation associated with the oxidations of eumelanogenic precursors 5,6- dihydroxyindole and dihydroxyindole-2 carboxylic acid. *Melanoma Research.* **6**: 341-9.

NELSON D.R., KOYMANS L., KAMATAKI T., STEGEMAN J.J., FEYEREISEN R., WAXMAN D.J., WATERMAN M.R., GOTOH O., COON M.J., ESTABROOK R.W., GUNSALUS I.C., NEBERT D.W. (1996). P 450 superfamily: update on new Sequence, genemapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogen.* **6**: 1-42.

NORTON, H.L., KITTLES, R.A., PARRA, E., MCKEIGUE, P., MAO, X., CHENG, K., CANFIELD, V.A., BRADLEY, D.G., MCEVOY, B., SHRIVER, M.D. (2007). Genetic evidence for the convergent evolution of light skin in Europeans and East Asians. *Mol Biol Evol.* **24**(3): 710-22.

OETTING, W.S., & KING, R.A. (1999). Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Hum Mutat.* **13**: 99–115.

PEARSON, P.L. (1985). Restriction fragment length polymorphisms (RFLP's) and their use in mapping the human genome. *Prog. Clin. Biol. Res.* **177**: 23-36.

PINGOUD, A., JELTSCH, A. (1997). Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases. *Eur J Biochem.* **246**(1): 1-22.

POSTHUMA, D., VISSCHER, P.M., WILLEMSSEN, G., ZHU, G., MARTIN, N.G., SLAGBOOM, P.E., DE GEUS, E.J., BOOMSMA, D.I. (2006). Replicated linkage for eye color on 15q using comparative ratings of sibling pairs. *Behav Genet.* **36**: 12–17.

REBBECK, T.R., KANETSKY, P.A., WALKER, A.H., HOLMES, R., HALPERN, A.C., SCHUCHTER, L.M., ELDER, D.E., GUERRY, D. (2002). P gene as an inherited biomarker of human eye color. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **11**(8): 782-4.

REDEI, G. (2008). Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics, 3rd edn. Springer, New York City, NY.

REES, J.L. (2003). Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet.* **37**: 67-90.

REES, J.L. (2004). The genetics of sun sensitivity in humans. *Am J Hum Genet* **75**: 739–751.

RINCHIK, E.M., BULTMAN, S.J., HORSTHEMKE, B., LEE, S., STRUNK, K.M., SPRITZ, R.A., AVIDANO, K.M., JONG, M.T., NICHOLLS, R.D. (1993). A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature*. **361**: 72–76.

RITTIG, M., LUTJEN-DRECOLL, E., RAUTERBERG, J., JANDER, R., AND MOLLENHAUER, J. (1990). Type-VI collagen in the human iris and ciliary body. *Cell Tissue Res*. **259**: 305–312.

ROBBINS, L., NADEAU, J., JOHNSON, K., KELLY, M., ROSELLI-REHFUSS, L., BAACK, E., MOUNTJOY, K., CONE, R. (1993). Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*. **72**: 827–834.

ROBERTS, R.J. (2005). How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**(17): 5905-5908.

ROBINS, A.H. (1991). Biological Perspectives on Human Pigmentation. Cambridge University Press.

ROUZAUD, F., KADEKARO, A.L., ABDEL-MALEK, Z.A., HEARING, V.J. (2005). MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. *Mutat Res*. **571**:133–152.

SMITH, R., HEALY, E., SIDDIQUI, S., FLANAGAN, N., STEIJLEN, P., ROSDAHL, I., JACQUES, J., ROGERS, S., TURNER, R., JACKSON, I., BIRCHMACHIN, M., REES, J. (1998). Melanocortin 1 receptor variants in an Irish population. *J Invest Derm*. **111**:119–122.

SPICHENOKA, O., BUDIMLIJA, Z.M., MITCHELL, A.A., JENNY, A., KOVACEVIC, L., MARJANOVIC, D., CARAGINE, T., PRINZ, M., WURMBACH, E. (2010). Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Sci Int Genet*. **5**(5): 472-8.

SPRITZ, R.A., BAILIN, T., NICHOLLS, R.D., LEE, S.T., PARK, S.K., MASCARI, M.J., BUTLER, M.G. (1997). Hypopigmentation in the Prader-Willi syndrome correlates with P gene deletion but not with haplotype of the hemizygous P allele. *Am J Med Genet.* **71**: 57–62.

STOKOWSKI, R.P., PANT, P.V., DADD, T., FEREDAY, A., HINDS, D.A., JARMAN, C., FILSELL, W., GINGER, R.S., GREEN, M.R., VAN DER OUDERAA, F.J., COX, D.R. (2007). A genomewide association study of skin pigmentation in a South Asian population. *Am J Hum Genet.* **81**(6): 1119-32.

STUBBINS M.J., HARRIES L.W., SMITH G., TARBIT M.H., WOLF C.R. (1996). Genetic analysis of the human cytochrome P450 2C9 locu. *Pharmacogenetics.***6**: 429-439.

STURM, R.A., AND LARSSON, M. (2009). Genetics of human iris colour and patterns. *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**: 544–562.

STURM, R.A., DUFFY, D.L., ZHAO, Z.Z., LEITE, F.P., STARK, M.S., HAYWARD, N.K., MARTIN, N.G., MONTGOMERY, G.W. (2008). A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the HERC2 gene determines human blue-brown eye color. *Am. J. Hum. Genet.* **82**(2): 424-31.

STURM, R.A., FRUDAKIS, T.N. (2004). Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. *Trends Genet.* **20**: 327–332.

STURM, R.A., TEASDALE, R.D. & BOX, N.F. (2001). Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Genet.* **277**: 49–62

STURM, R.A. (2002). Skin colour and skin cancer—MC1R, the genetic link. *Melanoma Res.* **12**: 405–416.

SULAIMON, S.S., KITCHELL, B.E. (2003). Review article The biology of melanocytes. *Veterinary Dermatology*. **14**: 57-65.

SULEM, P., GUDBJARTSSON, D., STACEY, S., HELGASON, A., RAFNAR, T., MAGNUSSON, K.P., MANOLESCU, A., KARASON, A., PALSSON, A., THORLEIFSSON, G., JAKOBSDOTTIR, M., STEINBERG, S., PÁLSSON, S., JONASSON, F., SIGURGEIRSSON, B., THORISDOTTIR, K., RAGNARSSON, R., BENEDIKTSDOTTIR, K.R., ABEN, K.K., KIEMENEY, L.A., OLAFSSON, J.H., GULCHER, J., KONG, A., THORSTEINSDOTTIR, U., STEFANSSON, K. (2007). Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat Genet*. **39**: 1443–1452.

TICHO, B.H., HILCHIE-SCHMIDT, C., EGEL, R.T., TRABOULSI, E.I., HOWARTH, R.J., AND ROBINSON, D. (2006). Ocular findings in Gillespie-like syndrome: association with a new PAX6 mutation. *Ophthalmic Genet*. **27**: 145–149.

TULLY, G. (2007). Genotype versus phenotype: human pigmentation. *Forensic Sci. Int. Genet*. **1**(2): 105-10.

TURAN, C. (2002). Genetik. Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Ders Kitabı, Yayın No: 2, Hatay, s.169.

VALENZUELA, R.K., HENDERSON, M.S., WALSH, M.H., GARRISON, N.A., KELCH, J.T., COHEN-BARAK, O., ERICKSON, D.T., JOHN MEANEY, F., BRUCE WALSH, J., CHENG, K.C., ITO, S., WAKAMATSU, K., FRUDAKIS, T., THOMAS, M., BRILLIANT, M.H. (2010). Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. *J. Forensic Sci*. **55**: 315–322.

WALKER, J.M., RAPLEY, R. (2000). Molecular analysis and amplification techniques. In: *Molecular Biology and Biotechnology*. The Royal Society of Chemistry. p.:25-64.

WALSH, S., LIU, F., BALLANTYNE, K.N., VAN OVEN, M., LAO, O., KAYSER, M. (2010). IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information, *Forensic Sci. Int. Genet.* **5**(3): 170-80.

WHITE, D., AND SMITH, M. (2010). Genotype–phenotype associations and human eye color, 126. *J Hum Genet.* **56**(1): 5-7.

WIELGUS, AR., SARNA, T. (2005). Melanin in human irides of different color and age of donors. *Pigment Cell Res.* **18**: 454–464.

WILKERSON, C.L., SYED, N.A., FISHER, M.R., ROBINSON, N.L., WALLOW, I.H., AND ALBERT, D.M. (1996). Melanocytes and iris color. Light microscopic findings. *Arch. Ophthalmol.* **114**: 437–442.

WILLIAMS S.J., AND HAYWARD N.K. (2001). The impact of the human genome project on medical genetics. *Trends in Molecular Medicine.* **7**: 187-231.

WILSON, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3741-3751.

WRIGHT, P.A., WYNFORD-THOMAS, D. (1990). The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J Pathol.* **162**(2): 99-117.

YANG, J., BENYAMIN, B., MCEVOY, B.P., GORDON, S., HENDERS, A.K., NYHOLT, D.R., MADDEN, P.A., HEATH, A.C., MARTIN, N.G., MONTGOMERY, G.W., GODDARD, M.E., VISSCHER, P.M. (2010). Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nat. Genet.* **42**: 565–569.

YONGGANG, J., REBERT, NA., JOSLIN, J.M., HIGGINS, J., SCHULTZ, R.A., NICHOLLS, R.D. (2000). Structure of the highly conserved HERC2 gene and of multiple partially duplicated paralogs in Human. *Genome Res.* **10**: 319–329.

ZHU, G., EVANS, D., DUFFY, D., MONTGOMERY, G., MEDLAND, S., GILLESPIE, N.A., EWEN, K.R., JEWELL, M., LIEW, Y.W., HAYWARD, N.K., STURM, R.A., TRENT, J.M., MARTIN, N.G. (2004). A genome scan for eye color in 502 twin families: most variation is due to a QTL on chromosome 15q. *Twin Res.* **7**: 197–210.

EKLER

Ek-1

KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KURULU DEĞERLENDİRME FORMU			
DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu		
AÇIK ADRES	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/Ankara		
TELEFON	0312 310 30 10/227		
FAKS	0312 310 63 70		
E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Toplumumuzda göz rengini belirleyen genlerdeki polimorfizmler ve göz rengine göre bu polimorfizmlerin araştırılması	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU		
	EUDRACT NUMARASI		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOY ADI	Prof.Dr.Tulin SÖYLEMEZOĞLU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Adli Toksikoloji	
	KOORDİNATORUN UNVANI/ADI/SOY ADI		
	KOORDİNATORUN UZMANLIK ALANI		
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü	
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu	
	BAŞVURULAN DEĞERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI		
DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ			
UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	YÜKSEK LİSANS TEZİ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐		
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐	Diğer ise belirtiniz
	FAZ 2	☐	
ARAŞTIRMA MERKEZİ	FAZ 3	☐	Belirtiniz
	FAZ 4	☐	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	BE-BY	☐	ULUSAL ☐ ULUSLARARASI ☐
	DİĞER	☐	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU		
	OLGU RAPOR FORMU		
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	SIGORTA	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	ILAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GUVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
DİĞER	☐		

Hastane Tıp Fakültesi
İdari Personel Birimi
Bürosu Şefi

23 Nisan 2009

ASLI ÇİFTLİ

Etik Kurul Değerlendirme Formu
28 Nisan 2009 Versiyon No:1

1

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:41-868	Tarih: 12 Aralık 2011
	Prof.Dr.Tülin SÖYLEMEZOĞLU'nun sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler; araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile bilgilendirilmiş gönüllü olur formu dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	

DEĞERLENDİRME KURULU BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
DEĞERLENDİRME KURULU BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Mehmet MELLİ	
DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Mehmet Melli	Tıbbi Farmakoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M. Melli
Prof.Dr.Çihan Yurdaydın	Gastroenteroloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Çihan Yurdaydın
Prof.Dr.Ahmet Demirkazık	Tıbbi Onkoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	YURTDIŞINDA
Prof.Dr.Tanju Özçelikay	Eczacı-Farmakolog	Ankara Üniv. Ecz. Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Tanju Özçelikay
Prof.Dr.Cem Atbaşoğlu	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİNLI
Prof.Dr.Hakan Uncu	Genel Cerrahi	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Hakan Uncu
Prof.Dr.Nuhan Puralı	Biyofizik	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Nuhan Puralı
Prof.Dr.H.Serdar Öztürk	Tıbbi Biyokimya	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	H.Serdar Öztürk
Prof.Dr.H.Serap Sivri	Çocuk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	H.Serap Sivri
Prof.Dr.Muharrem Özen	Avukat-Öğr. Üyesi	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	TOPLANTIDA
Prof.Dr.Banu Çakır	Halk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Banu Çakır
Yrd.Doç.Dr.Nüket Yürür Kutlay	Tıbbi Genetik	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Nüket Yürür Kutlay
Yrd.Doç.Dr.Derya Öztuna	Biyostatistik	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Derya Öztuna
Öğr.Gör.Dr.Volkan Kavas	Deontoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Volkan Kavas
Gülsum Aslan	Sağlık Mes. Dışı- Emekli	-----	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Gülsum Aslan

* :Araştırma ile ilişki
 ** :Toplantıda Bulunma

Hasan Dönmez
 A. T. Tıp Fakültesi
 İdari Personel Bürosu Şefi

23 Aralık 2011

ASLI GIBİDİR

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Yasemin

Soyadı: KARTAL

Doğum Tarihi ve Yeri: 1987, ANKARA

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi ve Telefonu: A.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü Tıp Fakültesi
Cebeci Kampüsü Dikimevi/ANKARA Tel:0(312) 319 27 34

II- Eğitimi

2006-2010 Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

2000-2004 Mustafa Kemal Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi

Yabancı Dili: İngilizce ve Almanca

III- Bilimsel İlgi Alanları

- Disiplinlerarası Adli Tıp,
- Moleküler Biyoloji,
- Biyoteknoloji,
- Genetik,
- Genetik Toksikoloji,
- Adli Kimya ve Toksikoloji.

IV-Yapılan Çalışmalar:

→ “Using the Correct Comet Assay Parameters of DNA Damages in Cell Studies” isimli poster sunumu (9th International Comet Assay Workshop).

→ “Alzheimer”

Araştırma Proje Yürütücüsü: Yrd. Doç. Dr. LEVENT BİNGÖL

→ “Biyofilm”

Araştırma Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. NESLİHAN GÜNDOĞAN

V- Stajlar:

✓ Ankara Adli Tıp Kurumu

Staj yapılan birim: Biyoloji İhtisas Dairesi

Staj süresi: 60 gün

✓ Türk Standartları Enstitüsü

Staj yapılan birim: Personel Sistem Belgelendirme

Staj süresi: 30 gün

IV- Katıldığı Eğitim Kursları

- ❖ Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Avrupa Birliği Ofisi ve **Alman Akademik Değişim Programı (DAAD)** İşbirliği ile Almanca Dil Kursu Katılım Belgesi, Güz 2011- Bahar 2012, Ankara.
- ❖ **‘Strategic Action Plan for Improving Access to Opioid Medication’** Conference, 2 May 2012, Ankara (certificate of attendance).
- ❖ **‘iThenticate (Professional Plagiarism Prevention)’** Ulusal Akademik Ağ ve Bilgi Merkezi 22 Mart 2012, Ankara.
- ❖ **‘EndNote Eğitim Semineri’** Ankara Üniversitesi, 17 Şubat 2012, Ankara.
- ❖ **“Yeni Radyoterapi Tekniklerinin Kansere Tedavisine Katkısı”** Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim dalı Prof. Dr. Enis ÖZYAR, 25 Aralık 2012.
- ❖ **“9th International Comet Assay Workshop (ICAW)”** Kusadası, Turkey from 13 to 16 September 2011.
- ❖ **“IV. International Congress of MOLEKULER MEDICINE from Cell to Bedside”** Yeditepe University 27–30 June 2011, İstanbul (certificate of attendance).
- ❖ HETEK (Hacettepe Eczacılık Teknolojisi) Derneği Semineri **“Immune Regulation in Allergic Disease-Application of Carbohydrate Based Adjuvants in Allergen Specific Immunotherapy”** Assoc. Prof. Guro GAFVELIN Karolinska Institute Department of Medicine, 16 Haziran 2011, Ankara.
- ❖ **“Mutasyon ve Kansere”** Ankara Üniversitesi Patoloji Anabilim dalı Doç. Dr. Berna SAVAŞ, 25 Mayıs 2011, Ankara.
- ❖ **“Optimization Techniques for Western Blot, Immunoprecipitation, and Immunohistochemistry”** Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Dr. Guillaume BOUCHER, Abcam Bilimsel Destek Danışmanı, 12 Nisan 2011, Ankara.

- ❖ Türk Farmakoloji Derneği- **“Klinik Toksikoloji Kursu”** kurs sertifikası, 22–24 Aralık 2010, İstanbul.
- ❖ **“Türkiye’de Adli Toksikoloji’nin Bugünü ve Geleceği”** Hacettepe Üniversitesi Adli Tıp Anabilim Dalı, 20 Aralık 2010, Ankara.
- ❖ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi- **“I. NANOTIP SEMPOZYUMU NANOMED”** katılım sertifikası 11 Eylül 2008, Ankara.
- ❖ 07/2009–08/2009: Türk Standartları Enstitüsü
 - * TS-EN-ISO 9000 **Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitim:** Müşteri şartlarını karşılamak amacı ile müşteri tatminini arttırmak için kalite yönetim sisteminin geliştirilmesi, uygulanması ve etkinliğinin iyileştirilmesi.
 - * TS-EN –ISO 9000 **Kalite Yönetim Sistemi İç Tetkik Eğitimi:** ISO 9001:2008 Standart’ının etkili olarak uygulanması ve tetkiki için ihtiyaç duyulan becerilerin belirlenmesi ve kazandırılması.
 - * TS-EN -ISO 9001 **Kalite Yönetim Sistemi Dokümantasyon Eğitimi:** ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi dokümanlarının tanımlanması ve hazırlanmasına yönelik becerilerin kazandırılması.