



T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ADLİ TIP ANABİLİM DALI

12 X-STR LOKUSUNUN ADLİ ETKİNLİK DEĞERLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Esen KALAOĞLU

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Behnan ALPER

ADANA-2019



T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ADLİ TIP ANABİLİM DALI

12 X-STR LOKUSUNUN ADLİ ETKİNLİK DEĞERLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Esen KALAOĞLU

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Behnan ALPER**

Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TTU-2019-11537 No'lu proje ile desteklenmiştir.

ADANA-2019

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmalarımında danışman öğretim üyesi olarak değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her zaman yanımda olduğumu hissettiğim hocam Prof. Dr. Behnan Alper'e,

Asistanlığım süresince eğitimime sundukları katkılarından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mete Korkut Gülmen'e, bilgi ve deneyimlerini her daim bizlerle paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Necmi Çekin ve Prof. Dr. Ahmet Hilal'e,

Tez çalışmamın hem laboratuvar hem de yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ayşe Serin'e,

Laboratuvar aşamasında bana eşlik eden Dr. Hüsniye Canan ve hiçbir desteğini ve zamanını esirgemeyen, sonsuz sabır ve anlayış gösteren Adli Bilimler Doktora öğrencisi çok değerli arkadaşlarım Ayça Ulubay ile Mustafa Ürün Ay'a,

Dört yıllık asistanlık sürecinde birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve Adli Tıp Anabilim Dalı çalışanlarına,

TTU-2019-11537 No'lu proje olarak bu çalışmanın düzenlenmesine katkı sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Bugünlere gelmemi sağlayan, beni her zaman cesaretlendiren, başarabileceğime inanan, her anımda yanımda olduğumu hissettiren, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen, değerli annem ve babama, varlıkları ile hayatımı güzelleştiren kardeşlerim, yeğenlerim ve tüm aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
EKLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. DNA'nın Genel Özellikleri ve Yapısı.....	4
2.3. Genom ve İnsan Genomunun Yapısı	5
2.4. Adli Analizlerde Kullanılan Polimorfizmler	5
2.4.1. Dizi (Sekans) polimorfizmi.....	5
2.4.2. Uzunluk polimorfizmi.....	5
2.5. STR.....	6
2.5.1.STR'lerin Adlandırılması.....	6
2.5.2.STR Lokuslarının Seçim Kriterleri	7
2.5.3.STR'lerde Mutasyon	7
2.5.4. STR'lerin Adli Amaçlı Kullanım Alanları	8
2.5.5. Gonozomal STR Polimorfizmi	8
2.5.6. X-STR Polimorfizminin Adli Amaçlı Kullanımı	9
2.6. Çalışmada Kullanılan X STR Lokusları	10
2.7. X-STR Lokuslarının Analizinde Kullanılan Yöntemler	13
2.7.1. DNA İzolasyonu	13
2.7.2. DNA Kantitasyonu.....	13

2.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	14
2.7.4. Elektroforez.....	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Gereçler.....	18
3.1.1. Deneyleerde Kullanılan Örnekler	18
3.1.2. Deneyleerde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	18
3.1.3. Deneyleerde Kullanılan Plastik ve Diğer Malzemeler	19
3.1.4. Deneyleerde Kullanılan Cihaz veya Gereçler.....	19
3.2. Yöntem.....	19
3.2.1. Instagene Matriks ile DNA İzolasyonu.....	19
3.2.2. DNA miktar tayini	20
3.2.3. PCR.....	20
3.2.4. Kapiller Elektroforez	21
3.2.5. İstatistiksel analiz.....	21
4. BULGULAR.....	22
5. TARTIŞMA.....	29
6. SONUÇ	34
KAYNAKLAR.....	36
ÖZGEÇMİŞ	43
EKLER	44
EK-1: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Onayı	44

TABLolar LİSTESİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 1. Çalışmada kullanılan X-STR lokusları ⁶⁸	11
Tablo 2. Çalışılan lokusların X kromozomundaki yeri ⁶⁹	12
Tablo 3. Bağlantı Grupları ⁶⁹	22
Tablo 4. Çukurova popülasyonunda 84 kadın ve 53 erkeğe ait ayrı ve birlikte hesaplanan DXS8378, DXS10135 ve DXS10148 lokuslarına ait alel frekansları.....	23
Tablo 5. Çukurova popülasyonunda 84 kadın ve 53 erkeğe ait ayrı ve birlikte hesaplanan DXS7132, DXS10074 ve DXS10079 lokuslarına ait alel frekansları.....	24
Tablo 6. Çukurova popülasyonunda 84 kadın ve 53 erkeğe ait ayrı ve birlikte hesaplanan HPRTB, DXS10101 ve DXS10103 lokuslarına ait alel frekansları.....	25
Tablo 7. Çukurova popülasyonunda 84 kadın ve 53 erkeğe ait ayrı ve birlikte hesaplanan DXS7423, DXS10134, DXS10146 lokuslarına ait alel frekansları.....	26
Tablo 8. -X-STR Lokusunun Adli Etkinlik Değerleri (n=137).....	27
Tablo 9. Çukurova popülasyonunda 53 erkeğe ait örnekte haplotip sıklığı.....	28

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. Thermal Cycler.....	15
Şekil 2. Kapiller Elektroforez Cihazı.....	17
Şekil 3. Bir erkeğe ait 12 X STR lokusu allellerinin elektroforez görüntüsü	31
Şekil 4. Bir kadına ait 12 X STR lokusu allellerinin elektroforez görüntüsü	31



EKLER

Ekler No:

Sayfa No:

EK-1: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Onayı.....44



SİMGELER VE KISALTMALAR

AMP-FLP	: Amplification Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Dinükleotid trifosfat
HET	: Heterozygosity (Heterozigot oranı)
HLA	: Human Leukocyte Antigens (İnsan Lökosit Antijeni)
HOM	: Homozygosity (Homozigot oranı)
ISFH	: International Society of Forensic Hemogenetics (Uluslararası Adli Hemogenetik Derneği)
LD	: Linkage Disequilibrium (Bağlantı Dengesizliği)
LTR	: Long Tandem Repeats (Uzun Ardışık Tekrarlar)
Mg⁺²	: Magnezyum iyonu
MEC	: Mean Exclusion Change (Ortalama Dışlama Şansı)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Çoklu Zincir Reaksiyonu)
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojen gücü)
PD	: Power of Discrimination (Ayrım Gücü)
PE	: Power Exclusion (Dışlama Gücü)
PI	: Power of Identity (Kimliklendirme Gücü)
PIC	: Polymorphic Information Content (Polimorfik Bilgi İçeriği)
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism (Sınırlanmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
STR	: Short Tandem Repeats (Kısa Ardışık Tekrarlar)
VNTR	: Variable Number of Tandem Repeats (Değişken Sayıda Ardışık Tekrarlar)
°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre

ÖZET

12 X-STR Lokusunun Adli Etkinlik Değerlerinin Araştırılması

Amaç: X kromozomu üzerindeki kısa ardışık tekrarlar (Short Tandem Repeats-STRs) otozomal kromozomlardaki STR'lere destekleyici olarak adli kimliklendirmede ve soy bağı araştırmalarında kullanılabilir. X STR lokusu allellerinin allel frekansları popülasyonlar arasında farklılıklar gösterdiğinden adli amaçlı kimliklendirme ve soy bağı analizleri için yapılacak istatistiksel analizlerde her popülasyona özgü veri tabanı oluşturulmalıdır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma 12 X-STR lokusunun (DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10079, DXS10101, DXS10103, DXS10134, DXS10135, DXS10146, DXS10148 ve HPRTB) alel/haplotip frekans dağılımının saptanması ve adli etkinlik değerlerinin belirlenebilmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalına DNA analizi için başvuran olgulardan rastgele seçilen 137 kişiden (84 kadın, 53 erkek) gönüllülük esasına dayalı olarak alınan biyolojik örnekler kullanılmıştır. Alınan örneklerde instagene matriks ile DNA izolasyonunu takiben 12 X-STR lokusunun mültipleks amplifikasyonu yapılmış ve PCR ürünleri kapiler elektroforezde yürütüldükten sonra genotiplendirilmiştir.

Bulgular: Çalışılan 12 X-STR lokusunda toplam 126 alel tanımlanmıştır. En fazla alele sahip lokusun 31 alelli DXS10148 ve en az alele sahip lokusun 5 alelli DXS8378 olduğu gözlenmiştir. 84 diploid örnekle yapılan analizde, Bonferroni düzeltme testinden sonra, Hardy Weinberg Dengesinde sapma tanımlanmamıştır ($p=0.05/12$). Çalışılan lokuslar içinde en yüksek ayırım gücü kapasitesine sahip lokusun DXS10135 (PDKadın = 0.995396, PDERkek = 0.951127) ve en düşük ayırım gücüne sahip lokusun DXS8378 (PDKadın= 0.826910; PDERkek= 0.669670) olduğu gözlenmiştir. 53 haploid örnekte bağlantılı grupların oluşturduğu haplotipler incelendiğinde bağlantı grubu 1 (Linkage Group 1-LG1), LG2, LG3 ve LG4'te sırasıyla 50, 46, 39 ve 46 farklı haplotip tanımlanmış olup, her bir bağlantılı grubu için en düşük ayırım gücü (Power of Discrimination-PD) değeri 0.94 olarak hesaplanmıştır. 4 LG grubunun kümülatif PD değeri ise 0.999999'un üzerindedir.

Sonuç: Bu çalışma sonucunda elde edilen istatistiksel veriler 12 X-STR lokusu için geliştirilen Argus X-12 STR panelinin Türk popülasyonunda oldukça polimorfik ve bilgilendirici olduğunu; özellikle babanın analizinin yapılamadığı babalık davalarında ve kompleks akrabalık ilişkilerinin ortaya koyulmasında güçlü bir tamamlayıcı araç olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: X-STR, X kromozomu, Adli Kimliklendirme, Soy Bağı, Adli Etkinlik

ABSTRACT

Investigation of Forensic Activity Values of 12 X-STR Locus

Aim: Short Tandem Repeats (STRs) on the X chromosome can be used as supportive for STRs in autosomal chromosomes, forensic identification and lineage research. Since allele frequencies of X STR loci vary among populations, for statistical analysis for forensic identification and pedigree analysis, population-specific database should be established.

Material and Method: This study was carried out to determine the allele / haplotype frequency distribution and forensic efficiency values of the 12 X-STR loci (DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10134, DXS10105, DXS10103, DXS10134, DXS10135, DXS10146, DXS10148 and HPRTB). In this study, biological samples were used taken from 137 subjects (84 females, 53 males) who were randomly selected from the patients who applied for DNA analysis in Çukurova University Faculty of Medicine Department of Forensic Medicine. In the samples, 12 X-STR loci were amplified after DNA isolation with instagene matrix and PCR products were genotyped after capillary electrophoresis.

Results: A total of 126 alleles were identified in the 12 X-STR loci studied. It was observed that the locus with the most alleles was DXS10148 with 31 alleles and with the least alleles was DXS8378 with 5 alleles. In the analysis performed with 84 diploid samples, there was no deviation in Hardy Weinberg Balance after Bonferroni correction test ($p = 0.05 / 12$). It was observed that the locus which had the highest discriminating capacity within the studied loci was DXS10135 (PDFemale = 0.995396, PDMale = 0.951127) and the locus with the lowest discriminating power was DXS8378 (PDFemale = 0.826910; PDMale = 0.669670). For 53 haploid samples, when haplotypes of the linked groups were examined, in the linking group 1 (Linkage Group 1-LG1), LG2, LG3 and LG4, 50, 46, 39 and 46 different haplotypes were identified, respectively, and for each linked group, the least Power of Discrimination-PD value was calculated as 0.94. Cumulative PD value of 4 LG groups was found over 0.999999.

Conclusion: The statistical data obtained from this study revealed that the Argus X-12 STR panel developed for the 12 X-STR locus was highly polymorphic and informative in the Turkish population; especially in paternity cases where the father's analysis cannot be done, and a strong complementary tool in revealing complex kinship relations.

Key words: X-STR, X chromosome, Identification, Kinship, Forensic Efficacy

1. GİRİŞ

Yaşayan veya ölü bir kişinin tanımlanmasına ve diğer kişilerden ayırt edilebilmesine yarayan özelliklerin tespiti için yapılan işlemlerin tümü kimliklendirme olarak adlandırılır. Adli bilimlerin temel uygulama alanlarından biri olan kimliklendirme, şüpheli ölüm, kitlesel felaket, kayıp kişi tespiti, soy bağı tayini, suçlu/suçsuz araştırması gibi çalışmalarda kullanılmaktadır.^{1,2}

Kan, semen ve diğer biyolojik vücut sıvıları ile bunlara ait lekelerden adli amaçlı kimlik tespiti çok uzun bir süredir yapılabilmektedir. Ana kan grubu ve alt grupları, insan lökosit antijenleri, polimorfik proteinler ve enzimlerin immünolojik ve elektroforetik yöntemlerle analizi önceki yıllarda bu amaçla kullanılmıştır.^{3,4}

DNA'nın tanımlanması sonrasında konvansiyonel yöntemlerin yerini daha hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle DNA tekniklerinin aldığı görülmektedir. DNA profillemesi veya tiplendirmesinin 1985'te Alec Jeffreys ve arkadaşları tarafından ilk kez tanımlanmasının ardından, adli genetik alanında, insan orjinli biyolojik materyallerin kimliklendirmesinde oldukça etkili olduğu kanıtlanan, bilgilendirici ve güçlü DNA tiplendirme sistemleri geliştirilmiştir.^{1,5}

DNA analizi, doku tipi ayırımı yapmadan, herhangi bir dokudan (örneğin kan, kemik, saç, tükürük, semen, deri) yapılabilmektedir. Ayrıca, diğer belirteçlere (antijenler, polimorfik proteinler ve enzimler) göre degradasyona daha dirençli olmasının yanında, çok az miktardaki örneklerde analizinin yapılabilmesi ve kimliklendirme potansiyelinin çok yüksek olması sebepleri ile oldukça avantajlı olduğu bilinmektedir. Günümüzde DNA analizi, kriminal çalışmalar ile kimliklendirmede adli genetik laboratuvarları tarafından kullanılan standart bir yöntem haline gelmiş olup, geleneksel inceleme ve araştırma yöntemlerinin geri planda kalmasına neden olduğu görülmektedir.³

Otozomal kısa tandem tekrarları (STR), insan tanımlama, ebeveyn testi, kardeş analizi ve adli olgularda uzun yıllardan beri yaygın olarak kullanılmaktadır.^{6,7} Son zamanlarda, X-STR'ler, bazı karmaşık akrabalık analizleri ile analiz için anneye ulaşılamayan ve sadece baba-kız çocuğunun analizinin mümkün olduğu vakalarda yararlılıkları nedeniyle, adli araştırmalarda otozomal STR'lerin tamamlayıcı araçları olarak kullanılmaya başlanmıştır.^{8,9} X-STR'ler, özellikle tartışmalı çocuğun cinsiyetinin

kız çocuğu olduğu durumlarda, anne-oğul ilişkisi, baba-kız ilişkisi, iki kız kardeşin aynı babadan olup olmadıklarının sorulduğu durumlarda ve babaanne-torun gibi akrabalık ilişkilerinin çözümlenmesinde yararlı olduğu ve ek katkı sağladığı görölmektedir.¹⁰ X-STR'ler ayrıca, cinsel suçlar gibi kadın-erkek biyolojik örneklerin karışık olduğu durumlarda erkek DNA profilinin ayırımına yardımcı olabilmektedir.

X-STR lokuslarının kimliklendirme ve akrabalık ilişkileri tayininde kullanılabilmesi için öncelikle popölyasyon çalışması yapılarak, ilgili popölyasyonda allel frekans dağılım oranlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, 12 X-STR lokusunun Çukurova yöresinde yaşayan insanlardan alınan biyolojik materyallerde allel frekans dağılım oranlarının saptanması ve adli etkinlik değerlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Belirlenen allel frekans dağılım oranları adli örneklerin analizi sonrası yapılacak istatistiksel analizlerde veri tabanı olarak kullanılacaktır. Adli etkinlik değerlerinin belirlenmesi her bir lokus ve 12 lokusun birlikte çalışılması durumunda ne kadar anlamlı sonuçlar alınabileceğini gösterecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Karl Landsteiner 1930 yılında Tıp ve Fizyoloji alanında Nobel Ödülü kazandıran çalışması olan ABO kan grubu sistemini 1900 yılında tanımlamış ve insanların kan gruplarına göre sınıflandırılacağını ortaya koymuştur.¹¹ Leone Lattes tanımlanan ABO kan grubu sistemi ile 1915'te bir babalık vakasını çözerek, genetik farklılıklar sonucu antijenlerin oluşturduğu ayırım gücünü hukukun kullanımına sunmuş ve böylece adli genetiğin temelleri atılmıştır. Daha sonra, çok sayıda kan grubu sistemi ile polimorfik serum proteini ve enzimleri, lökosit antijenleri (Human Leukocyte Antigens- HLA) tanımlanmıştır. Bunlar birlikte analiz edildiğinde yüksek ayırım gücü elde edilmiştir. Bu serolojik belirteçler hep birlikte kullanıldığında güçlü bir tanımlayıcı araç olmakla birlikte, çoğu adli olguda tüm belirteçlerin analizi için yeteri kadar biyolojik örnek bulunmadığından, biyolojik örneklerin olay yerinde yapıları bozulduğundan, proteinlerin ve enzimlerin yapılarının bozulmaya eğilimli olmasından dolayı etkinlikleri sınırlı kalmıştır.^{1,11}

20. yüzyılın başından itibaren DNA polimorfizminin tanımlandığı ve kullanımının hızlı bir şekilde geliştiği ve adli bilimler alanında kabul gördüğü bilinmektedir. DNA adli amaçlı kimliklendirmede kişiler arasındaki farkların temel verilerini oluşturduğundan 1978 yılında DNA polimorfizminin tanımlanmasıyla, genetik materyalin bizzat kullanılması ve DNA'ya dayalı kimliklendirme yaklaşımlarının da başlangıcını oluşturmuştur.¹¹ DNA polimorfizmi Southern tarafından tasarlanan Southern Blotlama tekniği ile tespit edilmiş ve 1980 yılında ilk yüksek polimorfizme sahip lokus saptanmıştır. 1984 yılında Alec Jeffreys tarafından restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA parçalarının spesifik DNA problemleri ile hibridizasyonu sonucu birey spesifik bant paternlerinin oluştuğu ortaya konmuştur. Oluşan birey spesifik bant paterni DNA parmak izi olarak adlandırılmıştır.^{1,11-14}

1987 yılında Nakamura ve arkadaşları tarafından belirli bir lokusta bulunan ve ardışık tekrar eden DNA dizileri saptanmıştır.¹⁵ Ardışık tekrar eden bu dizilerin sayıları bireyler arasında değişiklik gösterdiğinden Değişen Sayıda Ardışık Tekrarlar (VNTRs-Variable Number of Tandem Repeats) olarak adlandırılmaktadır.¹⁶ İlerleyen yıllarda bu

lokuslar ile yapılan çalışmaların sonucunda biyolojik sıvılar (kan, semen, tükürük gibi) ve bunlara ait lekeler ile dokuların kimliklendirmesinde kullanılabileceği görülmüştür.¹⁷

Karry Mullis'e 1993 yılında Nobel Kimya ödülünü kazandıran Adli DNA analizlerinde dönüm noktası olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR)'nin moleküler biyolojinin uygulama alanlarında derin etki yaratan bir teknik olduğu bilinmektedir.^{18,19} PCR teknolojisi sayesinde, PCR ile çoğaltılabilen VNTR lokusları tanımlanmış ve bu lokuslar PCR ile çoğaltılabilmeleri nedeni ile AMP-FLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) olarak adlandırılmıştır.¹ 1990'lı yılların başında, Edwards ve arkadaşları tarafından, STR olarak isimlendirilen AMP-FLP'lerden daha kısa parça uzunluk polimorfizmi oluşturan lokuslar tanımlanmıştır.²⁰ VNTR'nin yüksek ayırım gücü olmasına rağmen analiz için yüksek miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulması ve bozulmuş örneklerde işe yaramaması biyolojik örneklerin kimliklendirilmesinde STR lokuslarının tercih edilmesine neden olmuştur.^{21,22} STR lokuslarının degrade örnekte PCR ile analizinin mümkün olması, az miktarda örnekte analiz edilebilmesi ve yorumlama kolaylığı gibi üstünlükleri nedeniyle yaygın olarak adli hemogenetik laboratuvarlarında standart olarak uygulanmaya başlandığı, ticari kit haline gelmesinin kullanımını daha da popüler hale getirdiği gözlenmiştir.²³⁻²⁵

2.2. DNA'nın Genel Özellikleri ve Yapısı

DNA'nın, insanlarda ve hemen hemen diğer tüm organizmalarda bulunan kalıtım materyali olduğu, insan vücudundaki tüm hücrelerin aynı DNA'ya sahip olduğu bilinmektedir.

İnsan DNA'sının 3 milyar bazdan oluştuğu ve bu bazların % 99'undan fazlasının bütün insanlarda aynı olduğu anlaşılmıştır. Bazların dizisi, organizmanın oluşturulması ve korunması için uygun bilgiyi kodlamaktadır. Bu bazların dizilerinin sırası genetiğin ve kalıtımın prensibini oluşturmaktadır. DNA eritrositler haricinde tüm hücrelerin nükleusunda, 23 çift kromozom içinde paketlenmiş halde bulunmaktadır.¹

DNA kendi kendini kopyalayabilme yeteneğine sahiptir. İkili sarmal halinde bulunur ve her bir iplik, baz dizilerinin kopyalanması için model görevi görür. DNA, her bir iplik boyunca bulunan nükleotitlerin sırası veya dizisi boyunca bilgiyi kodlar. Canlılar farklı nükleotid dizilerine sahip DNA molekülleri taşımaları sebebi ile birbirlerinden ayrılırlar.^{2,3}

2.3. Genom ve İnsan Genomunun Yapısı

Canlıların DNA'sındaki bilginin tamamı genom olarak adlandırılmaktadır. Genomlardaki bazların sıralaması sentezlenecek olan proteinlerin bilgisini taşır. DNA'nın % 25'i genlerle ilgili bölge, % 75'i ise genlerle ilgili olmayan bölge şeklinde sınıflandırılmaktadır. Genlerle ilgili olan % 25'lik kısmın % 1,5'i ekzon (kodlayan bölge) ve % 23,5'i intron (kodlamayan bölge) olarak ayrılmaktadır. Ekzonda insersiyon, delesyon ve eşit olmayan crossing over gibi çeşitli nedenlerle fenotipe de yansiyabilen bireysel farklılıklar oluşurken, intronda da aynı nedenlerle polimorfizmler oluşabilmektedir.²⁶

2.4. Adli Analizlerde Kullanılan Polimorfizmler

Adli analizlerde DNA polimorfizmi sekans ve uzunluk polimorfizmi olmak üzere iki ana başlık altında sınıflandırılmaktadır.

2.4.1. Dizi (Sekans) polimorfizmi

DNA'nın polimorfik özelliklerinden ilk saptananı dizi (sekans) polimorfizmidir. DNA molekülünü oluşturan baz dizisindeki insersiyon, delesyon veya yer değişikliği (substisyon) sonucu meydana gelmektedir. Sekans polimorfizmi gösteren HLA geninin aşırı değişken bölgeleri ve mitokondrial DNA'nın D-loop bölgesi adli amaçlı kimliklendirmede sıklıkla kullanılan bölgelerdir.^{27,28} İnsan genom projesinin tamamlanması sonrası insan genomu boyunca dağılmış olan ve adli amaçlı kimliklendirme, yakın soy tahmini, atasoy tahmini ve fenotip tahmini yapılabilmesine olanak tanıyan çeşitli tek nükleotid polimorfizmler (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs) de bildirilmiştir.²⁹

2.4.2. Uzunluk polimorfizmi

İnsan genomunda belirli baz dizilerinden oluşan çekirdek ünitenin birbiri ardı sıra değişik sayıda tekrarından oluşan DNA fragmanları bulunmaktadır. Ardışık olarak tekrar eden bu dizilerin tekrar sayıları toplumdaki bireylerde farklılıklar gösterdiği için bu polimorfizmlerden adli amaçlı kimliklendirmede yararlanılmaktadır. İnsanlar arasındaki tekrar sayısı değişikliği bu spesifik DNA fragmanının uzunluğunun farklı olmasına neden olmaktadır. Bu DNA bölgeleri uzunluk farklarından dolayı VNTR'ler

(Variable Number of Tandem Repeats) olarak adlandırılmaktadır. VNTR'ler nükleotid veya nükleotidlerin delesyon, insersiyon ve/veya eşit olmayan krosing-over'ı sonucu oluşabilmektedir. Mendel yasalarına göre kalıtılan VNTR'ler yüksek ayırt etme gücüne sahiptirler. VNTR'ler tekrar dizilerinin içerdikleri baz sayısına göre sınıflandırılmıştır. Buna göre tekrar dizisi 6 baz çiftinden fazla ise Uzun Ardışık Tekrarlar (Long Tandem Repeats; LTRs) ya da minisatellit, 2 ile 6 baz çifti arasında ise Kısa Ardışık Tekrarlar (Short Tandem Repeat-STRs) ya da mikrosatellit olarak adlandırılmaktadır.^{18,30}

2.5.STR

STR lokusları 2-6 bç (baz çifti) uzunluktaki çekirdek ünitenin ardışık tekrarından oluşan ve sıklıkla 100-400 baz çifti uzunluğundaki DNA tekrar üniteleridir. STR lokuslarına genom boyunca ortalama her 6-10 kb (kilobaz) da bir rastlandığı ve yaklaşık 500.000 STR lokusunun olduğu tahmin edilmektedir.³¹⁻³³ STR lokusları tekrar eden ünitenin yapısına göre basit, bileşik ve karmaşık olarak üçe ayrılmaktadır. Basit tekrarlar aynı sayıda diziler içerirken, bileşik tekrarlar iki veya daha çok sayıda bitişik basit tekrarları içermektedir. Karmaşık tekrarlar ise çeşitli sayıda farklı uzunluklarda araya karışan tekrar ünitelerini içermektedir.³⁴⁻³⁷

2.5.1.STR'lerin Adlandırılması

Tüm Dünyada suç oranı artmış ve bundan dolayı ülkeler arasında veri alışverişi zorunlu hale gelmiştir. Bunun için STR lokuslarının ve lokus alellerinin adlandırılmasında standardizasyona gidilmesi gerekmiştir. Bu nedenle ISFH (International Society of Forensic Hemogenetics, Uluslararası Adli Hemogenetik Derneği) 1992 yılında lokus ve alellerin adlandırılmasıyla ilgili kurallar belirlemiştir. Bu kurallara göre STR lokuslarının adlandırılması dört aşamada yapılmakta olup; ilk harf olan D; DNA'yı sembolize etmektedir. İkinci sıradaki rakam; lokusun hangi kromozomda yerleştiğini göstermektedir. Üçüncü harf olan S (Single); bu lokusun DNA dizisinde tek olduğunu belirtmekte, en sonda yer alan sayı ise; lokusu o kromozomda yer alan diğer STR lokuslarından ayıran rakamdır. Örneğin D12S391 bu kurallara göre isimlendirilmiştir. Allelik adlandırma ise her allelin içerdiği tekrar sayısına göre yapılmakta olup, tekrar dizilerinin bir kısmı sadece aynı basit tekrarlardan oluşurken bir kısmı ise iki ya da daha fazla, farklı, basit tekrar dizilerinden oluşmaktadır. Kompleks

tekrar dizilerinden oluşan bir diğer grupta ise dizi boyunca değişik sayı, uzunluk ve baz tekrarı içeriği olan tekrar dizileri bulunmaktadır. Bu tanımlamaya göre her allele tekrar sayısını gösteren bir rakam verilir. Örneğin yaygın kullanılan THO1 lokusunun en küçük alleli 5'tir ve beş adet "AATG" tekrarı içerir. En büyük allel olan "10" ise adından da anlaşıldığı gibi on adet tetranükleotid tekrarı göstermektedir.³⁸⁻⁴⁰

2.5.2.STR Lokuslarının Seçim Kriterleri

Genom üzerinde çok sayıda STR lokusunun olduğu bilinmektedir. Bu STR lokuslarının hepsi adli amaçlı kimliklendirme ve soy bağıni tespit çalışmalarında kullanılmamaktadırlar. Bunun için bazı özelliklere sahip olmaları gerekmektedir. Bu özellikler;

- STR lokusunda gözlenen heterozigotluğun % 70'in üzerinde olması,
- Ayrım gücünün % 90'ın üzerinde olması,
- Alellerin tahmin edilen uzunluklarının 90-400 baz çifti arasında olması,
- Tanımlanma hassasiyeti yüksek lokuslar olması,
- Multipleks amplifikasyona olanak tanınması,
- Mutasyon oranının düşük olması,
- Uygun olmayan biyolojik örneklerde sağlıklı sonuçlar alınabilmesidir.^{18,41,42}

2.5.3.STR'lerde Mutasyon

STR lokusları düşük, orta ve yüksek düzeyde olmak üzere çeşitli oranda mutasyona uğrayabilmektedir. STR lokusunun adli tıpta kullanılabilir olması için mutasyon oranının düşük olması gerekmektedir. STR'ler sıklıkla tekrar artışı ya da azalması şeklinde ve insersiyon ve delesyonlar şeklinde görülen nokta mutasyonları gibi mutasyonlar gösterebilirler.

Mikrosatellitlerde lokuslar arasındaki kısmi farklılıkların yanı sıra mutasyon oranının her jenerasyonda 10^{-3} ile 10^{-4} arasında değişmekte olduğu bildirilmektedir.^{43,44} Şimdiye kadar bildirilen en yüksek mutasyon oranının ACTBP2 (SE33) lokusunda olduğu görülmüştür.⁴⁵

Mikrosatellitlerde mutasyon oluşumu replikasyon sırasında tekrar dizisini içeren bölgenin ayrıldıktan sonra shift (kayma) sonucu hatalı birleşmesi ile meydana

gelmektedir. Bu hatalı birleşme bir tekrar artışına ya da bir tekrar azalmasına yol açan delesyon veya insersiyona sebep olmaktadır.⁴⁶ Araştırmacılar mutasyon oranının lokusun tekrar sayısını arttırdığı, dolayısı ile tekrar sayısının artması sonucunda uzunluğun da arttığı görüşü kabul edilmektedir.⁴⁷ Bu durum replikasyon sırasındaki kaymanın, tekrar sayısı fazla olan uzun lokuslarda meydana gelme olasılığının artması ile açıklanmaktadır.⁴⁸ Mutasyon oranının, türler arasında farklılık gösterdiği gibi aynı tür içinde lokuslar arasında da farklılık gösterdiği bilinmektedir.^{49,50} Mutasyon sıklığının erkeklerde kadınlara göre daha fazla olduğu görülmektedir.^{51,52}

2.5.4. STR'lerin Adli Amaçlı Kullanım Alanları

Adli olaylarda failin tespiti, babalık tayini ve her türlü karmaşık akrabalık ilişkisinin ortaya çıkarılması, göçmen alımları, kitlesel felaketlerde ölenlerin kimliklendirilmesi amacı ile kullanılmaktadır.⁵³⁻⁵⁵

STR'ler insanlardaki bu kullanımının yanında veterinerlik alanında da kullanılmaktadır. Özellikle saf kan atların ya da küçük ve büyük baş hayvanların nesep tayini amacı ile STR'lerden faydalanılmaktadır. Hayvan DNA'sından STR analizi yabancı ülkelerde ise daha fazla kedi, köpek gibi evcil hayvanların biyolojik örneklerinin bu hayvanların ev, iş yeri gibi ortamlarda beslenmesi nedeni ile bir çok kriminal olayda fail ile olayın ilişkilendirilmesinde delil değeri taşıyabilmesinden dolayı kullanılmaktadır. Bu amaçla cinayet, tecavüz gibi olayların olduğu olay yerinde ve/veya failin giysi veya üzerinde saptanan mağdur/e'ye ait evcil hayvanların kılı bir çok olayın çözümünde yardımcı olmaktadır.^{56,57}

2.5.5. Gonozomal STR Polimorfizmi

Cinsiyet kromozomlarında bulunan polimorfik bölgelerin adli genetik incelemelerde son derece yararlı olabilecekleri gösterilmiştir. Bu konuda son yıllarda bir çok çalışma yapılmıştır. Öncelikle Y kromozom üzerindeki polimorfik bölgelerin adli amaçlı kullanımına yönelik olgu bildirimleri, istatistik değerlendirme yapılabilmesi için frekans hesaplamaları ve ticari kullanıma sunum öncesinde multipl Y-STR kitlerinin validasyon çalışmaları yapılmıştır. Y-STR çalışmalarından elde edilen başarılı sonuçlar bu kez çalışmaların X-STR analizleri üzerine yoğunlaşmasına sebep olmuştur.

Y kromozomu sadece erkek ebeveyn tarafından kalıtıldığından aynı soydan gelen tüm erkeklerde yeni bir mutasyon olmadıkça bir çok jenerasyon boyunca aynı haplotip görülecektir.^{58,59} Bu nedenle Y-STR'nin paternite olgularında kullanımı yaygınlaşmıştır. Özellikle baba adayının bulunamadığı ya da baba adayının biyolojik materyalinden DNA elde edilemediği durumlarda çocuk erkek ise baba adayının soy ağacında yer alan dede, amca, kuzen vs. gibi herhangi bir erkeğin Y-STR sonuçları olayın aydınlatılmasında yardımcı olmaktadır.⁵⁹⁻⁶³

2.5.6. X-STR Polimorfizminin Adli Amaçlı Kullanımı

Otozomal STR'lere ek olarak, sadece anneliğin sorulduğu durumlarda, baba adayının ölmesi, bulunamaması gibi nedenlerle otozomal DNA profilinin çalışılmadığı durumlarda baba adayının yakınlarının çalışılması ile babalık tayini yapılabilmektedir. Bu durumun çocuğun cinsiyetinin kız olması halinde geçerli olduğu, çocuğun iki X alelinden birisini annesinden, diğerini de babasından aldığı, böylece çocuğun biyolojik annesinde bulunmayan allellerin babadan geçmiş olduğu kabul edilmektedir. Baba adayının taşıyacağı X alellerinin kaynağı annesi olduğundan, anne veya babaanne tarafından aktarılan X analizi için her iki cinsten kardeşler kullanılabilir. X STR analizi babaanne kız torun arasındaki ilişkiyi ortaya koymak konusunda yararlı olmaktadır. Kız torunların taşıdığı baba kaynaklı X kromozomun mutlaka babaannenin iki X kromozomundan birisi olması gerektiği bilinmektedir.

Biyolojik babaları aynı olan iki kız kardeşin aynı paternal X kromozomuna sahip olmaları gerekmektedir. Dolayısı ile iki kız kardeşin aynı babadan olup olmadıklarının sorulduğu durumlarda, X kromozomal STR'lerin çalışılması faydalı sonuçlar vermektedir.

Yakın akraba iki erkeğin baba adaylığı olduğu durumlarda, çocuğun kız olması koşulu ile X-STR analizi otozomal STR'lere göre daha yararlı olabilmektedir. Özellikle bu iki baba adaylığı erkeğin, baba ve oğul olmaları halinde X-STR'ler son derece bilgi verici olmaktadır. Çünkü bu durumda her iki baba adayının taşıdığı X kromozomunun farklı biyolojik kaynaktan geldiği bilinmektedir. Aynı durumun kuzenler için de geçerli olduğu kabul edilmektedir.

X-STR'lerin babalık davalarında otozomal STR'lere üstünlüğü baba adayının daha kolaylıkla dışlanabilmesinden kaynaklanmaktadır. Çünkü X-STR'lerin dışlama

olasılığının, benzer Polimorfik Bilgi İçeriği (Polymorphic Information Content-PIC) değerine sahip otozomal STR'lere göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Bunun nedeni olarak da baba adayının X STR açısından hemizigot olması bildirilmektedir.⁶⁴

Abortus materyalinden babalık tayini gerektiğinde eğer fetus dişi ise X-STR analizi büyük kolaylık sağlamaktadır. Çünkü kürtaj materyalinden fetal dokunun gözle ayırt edilmesi gebeliğin yaşı ile ters orantılı olarak hemen hemen imkansızdır. Bu nedenle rastgele yapılan örnekleme sonucunda DNA analizi sıklıkla sadece anneye ait alelleri içerirken, şanslı olunan bazı vakalarda anne ile fetusun alellerinin miks olarak yer aldığı durumla karşılaşmaktadır. Böyle bir miks örneğin otozomal STR çalışılmış olması halinde değerlendirme gücü güçlüdür. Oysa dişi bir fetusun X-STR analiz sonucunda her lokustaki annede bulunmayan allelin babadan kalıtıldığı bilinmektedir.^{10,65}

DNA'nın fethi kabir materyalinden veya eski kemiklerden elde edildiği vakalarda, sıklıkla sadece kısa DNA fragmanına sahip STR'ler başarı ile amplifiye edilebilmektedir. Bu durumda yeterli istatistiksel değer elde edilebilmesi güçtür. Erkekler X-kromozom açısından hemizigot olduğundan Ortalama dışlama şansı (Mean Exclusion Chance-MEC) değerleri otozomal STR'lerden daha yüksek olmaya eğilimlidir. Bu nedenle X-STR'ler kullanılarak istenilen istatistiksel değerleri elde etmek mümkün olmaktadır.^{64,66,67}

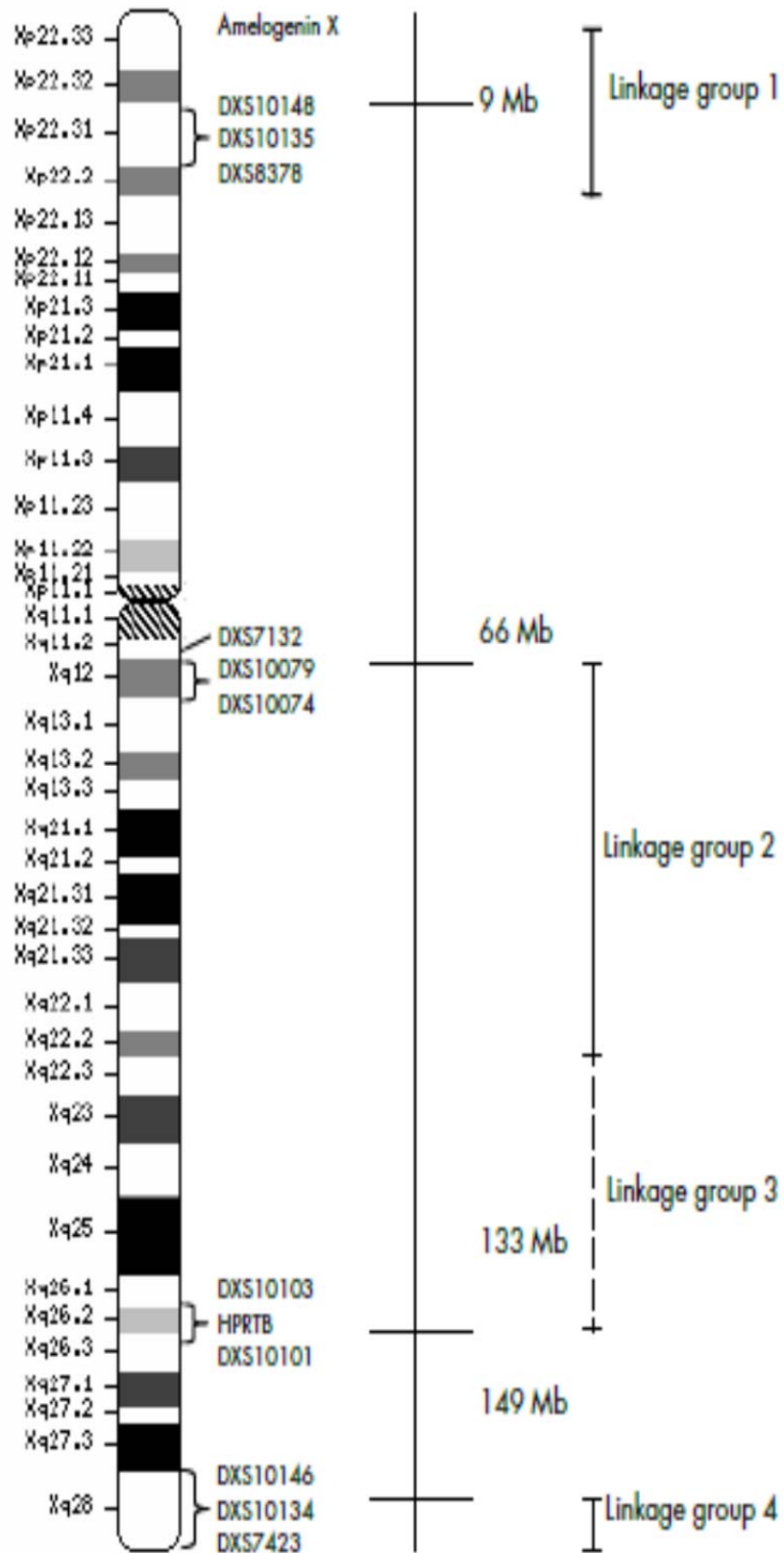
2.6. Çalışmada Kullanılan X STR Lokusları

Investigator Argus X-12 QS Kiti, cinsiyet tayini için Amelogenin (AM) primerleri yanında, DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10079, DXS10101, DXS10103, DXS10134, DXS10135, DXS10146, DXS10148, HPRTB markırları içermektedir. Her grupta 3 markırın olduğu 4 bağlantı grubuna ayrılmıştır ve her 3 markır bir haplotip olarak ele alınmaktadır. Kit içinde ayrıca örnekler arası kontaminasyon kontrolü ve diğer kitlerle tutarlılığın kontrolü için otozomal STR lokusu D21S11 lokusuna ait primerleri de bulunmaktadır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan X-STR lokusları⁶⁸

Locus	GenBank® Accession number	Repeat motif of the reference allele	Chromosomal mapping
Amelogenin X	M55418	-	Xp22.1-22.3
Amelogenin Y	M55419	-	Yp11.2
DXS7132	G08111	[TCTA] ₁₂	Xq11.2
DXS7423	AC109994	[TCCA] ₂ TCTGCTCT [TCCA] ₁₂	Xq28
DXS8378	G08098	[CTAT] ₁₂	Xp22.31
DXS10074	AL356358	[AAGA] ₁₄	Xq12
DXS10079	AL049564	[AGAG] ₂ TGAAAGAG [AGAA] ₁₇ AGAG [AGAA] ₂	Xq12
DXS10101	AC004383	[AAAG] ₂ GAAAGAAG [GAAA] ₂ A [GAAA] ₄ AAGA [AAAG] ₂ AAAAAGAA [AAAG] ₁₂ AA	Xq26.2
DXS10103	BV680555	[TAGA] ₂ CTGA [CAGA][TAGA] ₁₁ [CAGA] ₄ [TAGA]	Xq26.2
DXS10134	AL034384	[GAAA] ₂ GAGA [GAAA] ₄ AA [GAAA] GAGA [GAAA] ₄ GAGA [GACAGA] ₂ [GAAA] GTAA [GAAA] ₂ AAA [GAAA] ₄ AAA [GAAA] ₁₅	Xq28
DXS10135	AC003684	[AAGA] ₂ GAAAG [GAAA] ₂₀	Xp22.31
DXS10146	AL034384	[TTCC] ₂ T [TTCC] ₂ TTC CTCCCTCC [TTCC] [TTCC] TTCTTTTC [TTCC] ₂ TTCTT [CTTT] ₂ CTTC [CTTT] ₁₀ T [CTTT] ₂	Xq28
DXS10148	AC003684	[GGAA] ₄ [AAGA] ₁₂ [AAAG] ₄ N ₆ [AAGG] ₂	Xp22.31
HPRTB	M26434	[AGAT] ₁₂ *	Xq26.2
D21S11	AP000433	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₂ TA [TCTA] ₂ TCA [TCTA] ₂ TCCATA [TCTA] ₁₁	21q21.1

Tablo 2. Çalışılan lokusların X kromozomundaki yeri⁶⁹



2.7. X-STR Lokuslarının Analizinde Kullanılan Yöntemler

STR lokusu analiz yöntemleri 4 aşamada gerçekleştirilmektedir.

2.7.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda amaç DNA profilini ortaya koyabilmek için en yüksek verimlilikte yeteri kadar saflaştırılmasını sağlamaktır. Bunun için yapılması gereken hücre zarlarını parçalayıp proteinleri denatüre etmek ve denatüre proteinlerle diğer hücre içeriklerinin ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Böylelikle DNA'nın açığa çıkarıldığı bilinmektedir. İzolasyon için çeşitli yöntemler bulunmakta olup en çok bilinenleri; Fenol-kloroform izolasyonu, Silika bazlı izolasyon, Chelex izolasyonu ve FTA izolasyonudur.^{70,71}

Çalışmamızda, Chelex izolasyonu yöntemi ile izole edilen DNA'lar kullanılmıştır. Bu yöntemde Chelex reçinesi, DNazların koaktivatörü olan Mg^{+2} gibi metal iyonlarına çok yüksek oranda afinite duyduğundan dolayı bunlara bağlanarak, DNA'nın parçalanmasına engel olmaktadır. İki aşamada gerçekleşen bu işlemin ilk aşamasında; protein partiküllerinin reçineye bağlanması için, Chelex eklenen örnek karışımı, 56°C'de 20 dakika inkübe edilmekte, ikinci aşamada ise, protein denatürasyonunun ve reçine ile daha sıkı bağlanarak çökmenin sağlanması için 99°C'de 8 dakika inkübasyonu yapılmakta ve PCR amplifikasyonu aşamasına kadar +4°C'de saklanmaktadır.

2.7.2. DNA Kantitasyonu

DNA izolasyonundan sonra DNA'nın miktar ve kalitesinin saptanması için yapılan işlemdir. DNA'nın PCR aşamasının gerçekleştirilmesi, DNA'nın miktarına göre hiç DNA profili elde edilmemesine veya yorum yapılamayacak kadar bozuk bir DNA profili elde edilmesine yol açabilmektedir. Özellikle olay yeri incelemesinden sonra elde edilen örnekler çevresel koşullara bağlı olarak degrade olabileceğinden, bu örneklerde kantitasyon büyük önem taşımaktadır. Bunun için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunların bazıları; ultraviyole spektroskopi, floresan spektroskopi, jel bazlı analiz, slot blot analizi, real-time PCR'dir.⁷² Adli örneklerin miktar tayininde hassas kantitasyon yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, floresan spektroskopi ve jel bazlı analizin kullanımı sınırlıdır. Adli örneklerin miktar tayini için

geçmişte slot blot analizi yaygın olarak kullanılsa da, günümüzde qubit fluorometre ile floresan bazlı florometrik ölçüm ve/veya real-time PCR'a dayalı miktar tayini sıklıkla yapılmaktadır.

2.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, 1983 yılında Karry Mullis tarafından geliştirilmiş olup, DNA içerisinde yer alan ve dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir.^{3,18,73}

PCR için; kalıp DNA, çoğaltılacak bölgenin 5' veya 3' ucuna komplementer iki adet primer, dinükleotid trifosfatlar (dNTPs), DNA polimerazın optimum aktivite ve stabilitesi için uygun pH ve iyon (Mg^{+2}) konsantrasyonunu sağlayan tampon çözelti ile yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi gereklidir.

PCR üç aşamada gerçekleşmektedir.

Denatürasyon: Çoğaltılacak olan DNA'nın, yüksek sıcaklıkta ikili zincirinin bozularak tek zincir haline getirilme aşamasıdır. İkili zincirin çözülüp tek zincir haline gelmesi 94-98°C'de yaklaşık olarak 5 dakikada gerçekleşir. Ayrılma sonrası tek zincir halindeki DNA, kalıp olarak kullanılır.

Bağlanma (Annealing): Tepkime sıcaklığı 50-65°C'ye düşürülerek tek zincirli kalıp DNA'ya primerlerin bağlanması gerçekleşir. Primerin bağlanma sıcaklığı; baz dizisine, primer konsantrasyonuna ve iyonik tepkime ortamına bağlıdır.

Uzama (Extension/Elongation): 68-72°C'de gerçekleşen bu aşamada, DNA polimeraz enzimi tarafından, kalıp DNA zincirinin 5' ucundan 3' ucuna doğru dNTP'lerin eklenmesi ile yeni DNA ipliği meydana gelir. Bu üç aşama bir döngü olarak kabul edilir ve döngü sayısı 20-35 defa tekrarlanabilmektedir.¹¹

Döngü tamamlandıktan sonra uygulanan son uzama aşaması, zaman zaman uygulanan bir aşamadır. Kalan tek iplikli DNA var ise, onların uzaması için ürünler 70-74°C arasında bir süre bekletilir.

PCR teknolojisi, genetik hastalıkların tanısı, doku tiplendirme, bulaşıcı hastalıkların tanısı, kimliklendirme ve soy bağı tespiti gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 1. Thermal Cycler

2.7.4. Elektroforez

DNA parçalarının PCR ile çoğaltılmasından sonraki aşama uzunluklarına göre ayırımının yapıldığı elektroforez yöntemidir. Elektroforezde kullanılan yöntemlerden bazıları; agaroz jel elektroforezi, poliakrilamid jel elektroforezi ve kapiller jel elektroforezidir. Çalışmamızda, kapiller jel elektroforezinden yararlanılmıştır.

Adli DNA laboratuvarlarında kapiller jel elektroforezi STR alellerinin ayırımı ve tespiti için kullanılan başlıca yöntemdir. 1995 yılından sonra, adli DNA laboratuvarlarında STR tiplendirme amacıyla kullanılan popüler bir yöntem olmuştur.^{72,74} Kapiller elektroforezde; dar bir cam kapiller, iki küçük tampon şişesi ve yüksek voltajda güç sağlayıcıya bağlı iki elektrot bulunmaktadır. Ayrıca, lazer ışık kaynağı, floresan detektörü, örnek tüpleri veya tablasını tutan bir otomatik numune alma cihazı ile örnek enjeksiyonu ve tespitini kontrol eden bir bilgisayar da bulunmaktadır.

Her bir örnek enjekte edilmeden önce, kapiller polimer solüsyonu ile doldurulur. Çoğu kapiller elektroforez sistemi, yüklenmiş moleküllerin örnekten kapillere hareketini sağlamak üzere yüksek voltajın uygulandığı elektrokinetik enjeksiyondan faydalanmaktadır. DNA negatif yüklü olduğu için pozitif voltaj DNA moleküllerini kapillere çekmektedir.

Örneğin tespiti, kapillerin sonuna yakın yerleştirilen lazer ile örnek enjeksiyonundan örnek tespitine olan süreç ölçülerek otomatik olarak gerçekleştirilmektedir. Lazer ışığı, kapillerdeki pencerenin içinde sabitlenmiş bir pozisyonda kapillerin üzerine gelmektedir. DNA parçaları, bu pencereden geçtikçe ışıklandırılmaktadır. Tespit noktasında daha küçük DNA parçaları ilk önce tespit edilmektedir. Onları uzunluk ve baz çifti sayısı ile ilişkili olarak daha büyük olan DNA parçaları takip etmektedir. DNA'nın çoğaltılmış hedef bölgeleriyle birleştirilmiş olan PCR primerleri floresan boyaya bağlanmıştır. Çoğaltılan alleller, işaretlenmiş DNA molekülleri detektörü geçtikçe elektroferogram üzerinde pikler halinde ekranda görüntülenir. Görüntülenen bu pikler, daha önce cihaza kaydedilen standartlarla karşılaştırılır.¹¹

Kapiller elektroforez, çok az miktarda örnek gerektiren, güvenilir veri sağlayan, küçük inorganik iyonlardan DNA makromoleküllerine kadar, analizi yapılacak olan maddeler için etkili bir ayırma tekniğidir. Yüksek etkinlik, kısa analiz süresi, çok yönlü çalışma gibi özelliklerinin yanı sıra, manuel veya yarı manuel tekniklerin otomasyonunu çalıştırma, değerli örnekleri saklama ile tehlikeli organik kimyasalların kullanımını en aza indirme ve klinik laboratuvarlar için güçlü bir yeni metodoloji oluşturma avantajlarını barındırmaktadır.⁷²

Klinik amaçlar için de kullanılmakta olan kapiller elektroforezden, metabolik hastalıkların saptanmasında ve vücut sıvılarında ilaçların görüntülenmesinde de yararlanılmaktadır. Gelişen teknolojiyle birlikte, geleneksel jel elektroforezi yöntemiyle analiz edilemeyen düşük moleküler ağırlıktaki maddelerin saptanmasında uygun olduğu görülmektedir.



Şekil 2. Kapiller Elektroforez Cihazı

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Biyolojik materyal olarak Doğu Akdeniz - Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yaşayan ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalına DNA analizi için başvuran olgulardan rastgele seçilen ve aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 137 kişiye ait örneklerin kullanıldığı çalışmanın projesi için, Çukurova Üniversitesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Etik Kurul No: 83/ Karar No:3). İzole DNA'larda, DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10079, DXS10101, DXS10103, DXS10134, DXS10135, DXS10146, DXS10148, HPRTB ile internal kontrol D21S11 STR lokuslarının Applied Biosystems GeneAmp PCR Systems 9700 PCR cihazı ile amplifikasyonu ve sonrasında 3130 Genetic Analyzer otomatik kapiller elektroforez cihazı ile elektroforezi yapılarak, işlem sonrası oluşan pikler değerlendirilmiştir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonundan TTU-2019-11537 nolu proje ile parasal destek alınmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Örnekler

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalına DNA analizi için başvuran olgulardan rastgele seçilen ve aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 137 kişiye (84 kadın, 53 erkek) ait örnekler kullanılmıştır. Bu çalışma kişilerin parmaklarından alınan 3µl tam kan örnekleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Instagene matrix (Bio Rad)
- Quant-it ssDNA kiti
- Investigator Argus X-12 QS Kit (Qiagen)
- Formamid: Applied Biosystems 25 ml (Applied Biosystems)
- POP 7 (Applied Biosystems)
- 10xEDTA tamponu (Applied Biosystems)
- Su: Deiyonize, DNAaz, RNAaz free
- DNA Size Standard 550 (BTO)

3.1.3. Deneylerde Kullanılan Plastik ve Diğer Malzemeler

- Tüpler: 0,2 ml, 0,5 ml ve 1,5 ml'lik steril ependorf tüpler
- Pipet uçları: 2.5, 10, 100 ve 1000 µl'lik steril, otomatik pipet uçları
- Rack
- Buz kalıbı
- Filtre kağıdı: Whatman

3.1.4. Deneylerde Kullanılan Cihaz veya Gereçler

- Mikropipet: 2,5 µl, 10 µl, 100 µl ve 1000 µl hacminde mikropipetler
- Mikro Santrifüj: Hettich Universal 12F santrifüj
- Vorteks: Elektro-Mag M16
- Qubit Fluoremetre: Invitrogen
- Thermal Cycler cihazı: Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700
- Kapiller Elektroforez cihazı: Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer
- Buzdolabı: Philco
- Derin dondurucu: Bosch

3.2. Yöntem

3.2.1. Instagene Matriks ile DNA İzolasyonu

Çalışmada 3 µl tam kandan izole edilen genomik DNA'lar kullanılmıştır. İzolasyon aşamaları aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. 1,5 ml'lik eppendorf tüp içine alınan 3 µl kan örneğinin üzerine 1 ml saf su ilave edilerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyonu takiben tüpler 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası altta 20-30 µl kalacak şekilde üst faz pipetle uzaklaştırıldı.
4. Alt faz üzerine 200 µl Instagene matrix (BioRad) eklendi ve 56°C'de 20 dakika inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası tüpler yüksek hızda vorteks ile karıştırıldı.
6. Ardından 99°C'lik ısı bloğu üzerinde 8 dakika bekletildi.

7. İnkübasyon sonrası tüpler yüksek hızda vorteks ile karıştırıldı ve 13000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Çalışmada üst fazdan alınan 0,5-1 ng DNA örnekleri kullanıldı.

3.2.2. DNA miktar tayini

Instagene matriks ile izole edilen tek zincirli DNA’ların miktarları Quant-it ssDNA kit protokolü izlenerek Qubit 2.0 fluorometre ile ölçüldü.

3.2.3. PCR

İzole DNA örneklerine Investigator Argus X-12 QS Kit protokolü uygulandı⁷⁵. PCR reaksiyonunda her bir örnek için;

<u>Kullanılan malzemeler</u>	<u>Miktar</u>
Fast Reaction Mix 2.0	7,5 µl
Primer Mix	2,5 µl
Distile su	değişken µl
DNA	değişken (0,5-1 ng olacak şekilde)
Toplam volüm	25 µl

0,2 ml’lik ependorflara hazırlandı ve tüpler Thermal Cycler cihazına yerleştirildi

Amplifikasyonda kullanılan PCR parametreleri:

	Sıcaklık Değeri	Bekleme Süresi	Döngü Sayısı
Denatürasyon	98°C’de	60 saniye	3 döngü
Yapışma	61°C’de	100 saniye	
Uzama	72°C’de	5 saniye	
Denatürasyon	96°C’de	10 saniye	27 döngü
Yapışma	61°C’de	100 saniye	
Uzama	68°C’de	2 dakika	
Son uzama	72°C’de	5 saniye	
Bekletme	10° C	∞	

3.2.4. Kapiller Elektroferez

Thermal Cycler cihazında amplifiye edilen örnekler otomatik kapiller elektroferez cihazında yürütüldü. Cihazda yürütülen her bir örnek için alttaki tabloda verilen miktarlarda malzeme kullanıldı.

<u>Kullanılan malzeme</u>	<u>Miktar</u>
Hi-Di™ Formamide	6 µl
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,25 µl
DNA	0,5 µl
Toplam	6,75 µl

Hazırlanan bu karışımlar plate'in uygun kuyucuklarına yerleştirildi. Ayrıca, analiz edilen örnekleri genotiplendirmek üzere 6 µl formamide ve 0,25 µl DNA Size Standard 550 (BTO) ile 0.5 µl Allelik Ladder içeren bir başka karışım plate'in uygun kuyucuğuna koyuldu. Tüm örnekler kuyucuklara yerleştirildikten sonra, kuyucuklarda hava kabarcığı olup olmadığına bakıldı. Eğer kabarcık varsa, kısa bir santrifüj yapılarak kabarcıklar giderildi. Plate elektroferez cihazına yerleştirildikten sonra polimer seviyesi, tamponların ve suyun seviyesi, hava kabarcığı olup olmadığı kontrol edildi. Elektroferez sonrası sonuçlar GeneMapper ID v3.2 programı ile değerlendirildi.

3.2.5. İstatistiksel analiz

Lokusların kadın/erkek/total alel frekansları ve erkeklere ait veriler ile oluşturulan haplotip frekansları StatsX (Statistics for X-STR) v2.0 yazılım programı ile hesaplandı.⁷⁶

Lokusların Hardy Weinberg Dengesi (HWE) nde olup olmadığını test için Gouy ve Zieger'in geliştirdiği çevirim içi istatistik programı kullanıldı.⁷⁶

Lokusların polimorfik bilgi içeriği (PIC), erkekler ve kadınlar için ayırım gücü (PD), ortalama dışlama şansı (MEC), heterozigot oranı (HET) gibi adli etkinlik değerleri lokusların alel frekansları kullanılarak www.chrx-str.org web sitesinde bulunan çevrimiçi istatistik programı ile hesaplandı.⁷⁷

4. BULGULAR

Çukurova popülasyonunda çalışılan 84 kadın ve 53 erkeğe ait örnekte 12 X-STR lokusuna ait bağlantı grupları Tablo 3'te; alel frekans dağılım oranları Tablo 4, 5, 6 ve 7'de; adli etkinlik değerleri Tablo 8'de ve 4 LG grubunun 53 erkeğe ait haplotip frekans dağılım oranları Tablo 9'da aktarılmıştır.

Tablo 3. Bağlantı Grupları⁶⁹

Linkage group	
1 (Xp22)	DXS8378 - DXS10135 - DXS10148
2 (Xp11)	DXS7132 - DXS10074 - DXS10079
3 (Xp26)	HPRTB - DXS10101 - DXS10103
4 (Xp28)	DXS7423 - DXS10134 - DXS10146

Tablo 4. Çukurova popülasyonunda 84 kadın ve 53 erkeğe ait ayrı ve birlikte hesaplanan DXS8378, DXS10135 ve DXS10148 lokuslarına ait alel frekansları.

Alel no	DXS8378			DXS10135			DXS10148		
	Kadın	Erkek	Total	Kadın	Erkek	Total	Kadın	Erkek	Total
9	0,018		0,014						
10	0,321	0,358	0,330						
11	0,411	0,453	0,421						
12	0,214	0,189	0,208						
13	0,036		0,027						
13,3							0,006		0,005
15								0,019	0,005
16				0,006		0,005			
17				0,036	0,038	0,036	0,006		0,005
18				0,042	0,113	0,059	0,101	0,038	0,086
19				0,054		0,041	0,012	0,075	0,027
19,1				0,012		0,009			
20				0,036		0,027		0,094	0,023
20,1				0,018		0,014			
21				0,065		0,050	0,006	0,075	0,023
21,1				0,024		0,018			
21,2								0,038	0,009
22				0,095		0,072		0,113	0,027
22,1					0,113	0,027	0,012		0,009
23				0,089		0,068	0,018	0,038	0,023
23,1				0,006	0,019	0,009	0,054		0,041
24				0,060		0,045	0,018	0,113	0,041
24,1					0,170	0,041	0,131		0,100
25				0,077		0,059	0,006	0,113	0,032
25,1					0,189	0,045	0,208		0,158
26				0,060		0,045		0,038	0,009
26,1					0,132	0,032	0,167		0,127
27				0,113		0,086		0,057	0,014
27,1					0,151	0,036	0,125		0,095
28				0,071		0,054		0,038	0,009
28,1					0,057	0,014	0,054		0,041
28,2							0,006		0,005
29				0,060		0,045		0,057	0,014
29,1					0,019	0,005	0,054		0,041
30				0,054		0,041		0,019	0,005
30,1							0,012		0,009
31				0,006		0,005		0,038	0,009
31,1							0,006		0,005
32				0,012		0,009		0,019	0,005
33								0,019	0,005
34				0,006		0,005			

Tablo 5. Çukurova popülasyonunda 84 kadın ve 53 erkeğe ait ayrı ve birlikte hesaplanan DXS7132, DXS10074 ve DXS10079 lokuslarına ait alel frekansları.

Alel no	DXS7132			DXS10074			DXS10079		
	Kadın	Erkek	Total	Kadın	Erkek	Total	Kadın	Erkek	Total
7				0,054	0,019	0,045			
8				0,137	0,170	0,145			
9					0,019	0,005			
11	0,024	0,057	0,032						
12	0,125	0,151	0,131						
13	0,268	0,132	0,235		0,038	0,009			
14	0,399	0,415	0,403	0,006		0,005	0,018	0,019	0,018
15	0,125	0,189	0,140	0,060	0,075	0,063	0,006	0,038	0,014
16	0,048	0,057	0,050	0,179	0,151	0,172	0,036	0,058	0,041
17	0,012		0,009	0,226	0,226	0,226	0,089	0,115	0,095
18				0,256	0,170	0,235	0,143	0,173	0,150
19				0,071	0,113	0,081	0,286	0,135	0,250
20				0,012	0,019	0,014	0,232	0,288	0,245
21							0,137	0,096	0,127
21,3							0,006		0,005
22							0,048	0,038	0,045
23								0,019	0,005
29								0,019	0,005

Tablo 6. Çukurova popülasyonunda 84 kadın ve 53 erkeğe ait ayrı ve birlikte hesaplanan HPRTB, DXS10101 ve DXS10103 lokuslarına ait alel frekansları.

Alel no	HPRTB			DXS10101			DXS10103		
	Kadın	Erkek	Total	Kadın	Erkek	Total	Kadın	Erkek	Total
11	0,113	0,151	0,122						
12	0,310	0,377	0,326						
13	0,333	0,302	0,326						
14	0,173	0,132	0,163						
15	0,054	0,038	0,050				0,030		0,023
16	0,018		0,014				0,095	0,118	0,100
17							0,131	0,059	0,114
18							0,190	0,255	0,205
19							0,423	0,373	0,411
20							0,119	0,196	0,137
21							0,006		0,005
21,2							0,006		0,005
24,2				0,006		0,005			
25,2				0,006	0,019	0,009			
26,1				0,006	0,019	0,009			
26,3					0,019	0,005			
27,2				0,036		0,027			
28				0,024	0,038	0,027			
28,2				0,083	0,132	0,095			
29				0,048		0,036			
29,2				0,161	0,151	0,158			
30				0,060	0,075	0,063			
30,2				0,125	0,208	0,145			
31				0,083	0,075	0,081			
31,2				0,083	0,132	0,095			
32				0,083	0,019	0,068			
32,2				0,048	0,057	0,050			
33				0,113	0,057	0,100			
34				0,036		0,027			

Tablo 7. Çukurova popülasyonunda 84 kadın ve 53 erkeğe ait ayrı ve birlikte hesaplanan DXS7423, DXS10134, DXS10146 lokuslarına ait alel frekansları.

Alel no	DXS7423			DXS10134			DXS10146		
	Kadın	Erkek	Total	Kadın	Erkek	Total	Kadın	Erkek	Total
11	0,006		0,005						
12	0,006		0,005						
13	0,065	0,019	0,054						
14	0,345	0,509	0,385						
15	0,357	0,340	0,353						
16	0,179	0,132	0,167						
17	0,042		0,032		0,019	0,005			
24							0,006		0,005
25							0,060	0,019	0,050
26							0,060	0,075	0,063
27							0,167	0,075	0,145
28							0,173	0,170	0,172
29							0,173	0,170	0,172
30							0,119	0,113	0,118
31				0,006		0,005	0,012		0,009
32				0,024	0,019	0,023	0,006		0,005
33				0,101	0,057	0,090	0,006	0,038	0,014
34				0,149	0,113	0,140			
35				0,190	0,189	0,190			
36				0,185	0,189	0,186			
36,2					0,019	0,005			
37				0,167	0,189	0,172			
37,2					0,019	0,005	0,006		0,005
38				0,054	0,094	0,063			
38,2							0,006		0,005
38,3				0,036	0,038	0,036			
39				0,018	0,019	0,018			
39,2							0,030	0,038	0,032
39,3				0,030	0,038	0,032			
40,2							0,012	0,075	0,027
40,3				0,018		0,014			
41,2							0,018	0,019	0,018
41,3				0,006		0,005			
42,2							0,012	0,057	0,023
42,3				0,012		0,009			
43,2							0,042	0,094	0,054
44,2							0,054	0,038	0,050
44,3				0,006		0,005			
45,2							0,024	0,019	0,023
47							0,018		0,014

Tablo 8.-X-STR Lokusunun Adli Etkinlik Değerleri (n=137).

Lokus	PIC	HOM	HET	PE	PD _F	PD _M	MEC Krüger	MEC Kishida	MEC _D esmerais	MEC _D esmerais Duo
DXS8 378	0.60 5698	0.33 0330	0.66 9670	0.38 2918	0.82 6910	0.66 9670	0.396 887	0.605 698	0.6056 98	0.4589 17
DXS1 0135	0.94 8911	0.04 8873	0.95 1127	0.90 0532	0.99 5396	0.95 1127	0.900 966	0.948 911	0.9489 11	0.9050 26
DXS1 0148	0.91 5762	0.07 9115	0.92 0885	0.83 8254	0.98 8617	0.92 0885	0.841 293	0.915 013	0.9157 62	0.8506 44
DXS7 132	0.70 5548	0.25 8000	0.74 2000	0.49 6179	0.89 6984	0.74 2000	0.525 049	0.705 548	0.7055 48	0.5675 79
DXS1 0074	0.80 8417	0.16 9792	0.83 0208	0.65 6252	0.94 9380	0.83 0208	0.662 874	0.808 417	0.8084 17	0.6939 50
DXS1 0079	0.80 3475	0.17 4455	0.82 5545	0.64 7278	0.94 7495	0.82 5545	0.651 505	0.797 786	0.8034 75	0.6878 71
DXS1 0101	0.89 6863	0.09 5447	0.90 4553	0.80 4730	0.98 3200	0.90 4553	0.806 924	0.896 430	0.8968 63	0.8201 54
DXS1 0103	0.71 3476	0.25 3290	0.74 6710	0.50 4154	0.90 2610	0.74 6710	0.536 708	0.713 476	0.7134 76	0.5765 27
HPRT B	0.70 1318	0.25 6403	0.74 3597	0.49 8874	0.89 1979	0.74 3597	0.513 642	0.701 318	0.7013 18	0.5626 24
DXS7 423	0.64 1009	0.30 4472	0.69 5528	0.42 1376	0.85 2778	0.69 5528	0.442 133	0.640 889	0.6410 09	0.4967 77
DXS1 0134	0.84 9949	0.13 5521	0.86 4479	0.72 3593	0.96 7105	0.86 4479	0.729 070	0.849 949	0.8499 49	0.7511 46
DXS1 0146	0.88 0956	0.10 9478	0.89 0522	0.77 6102	0.97 8448	0.89 0522	0.781 440	0.880 956	0.8809 56	0.7966 24

PIC :Polymorphic Information Content (Polimorfik Bilgi İçeriği)

HOM: Homozygosity (Homozigot oranı)

HET: Heterozygosity (Heterozigot oranı)

PE:Power Exclusion (Dışlama Gücü)

PD_F: Power of Discrimination Female (Kadınlar İçin Ayrım Gücü)

PD_M: Power of Discrimination Male (Erkekler İçin Ayrım Gücü)

MEC_{Krüger}: Krüger'in formülü ile Anne-Baba-Çocuk durumunda Ortalama Dışlama Şansı

MEC_{Kishida}: Kishida'nın formülü ile Anne-Baba-Çocuk durumunda Ortalama Dışlama Şansı

MEC_{Desmerais Duo}: Baba-Kız veya Anne-Kız durumunda Ortalama Dışlama Şansı

Tablo 9. Çukurova popülasyonunda 53 erkeğe ait örnekte haplotip sıklığı

Haplotype frequency (N=			53)								
LG1 Haplotype	Count	Frequency	LG2 Haplotype	Count	Frequency	LG3 Haplotype	Count	Frequency	LG4 Haplotype	Count	Frequency
10 22.1 15	1	0,018867925	11 17 20	1	0,01886792	11 29.2 19	1	0,018867925	13 36 29	1	0,018867925
10 22.1 28	1	0,018867925	11 18 18	1	0,01886792	11 30.2 16	2	0,037735849	14 17 40.2	1	0,018867925
10 24.1 21	1	0,018867925	11 18 19	1	0,01886792	11 30.2 16,18	1	0,018867925	14 32 25	1	0,018867925
10 24.1 25	1	0,018867925	12 15 20	1	0,01886792	11 30.2 18	1	0,018867925	14 33 28	1	0,018867925
10 24.1 26	1	0,018867925	12 16 18	1	0,01886792	11 30.2 19	1	0,018867925	14 33 29	1	0,018867925
10 24.1 33	1	0,018867925	12 16 19	1	0,01886792	11 31.2 18	1	0,018867925	14 34 29	1	0,018867925
10 25.1 18	1	0,018867925	12 16 22	1	0,01886792	11 31.2 20	1	0,018867925	14 34 30	1	0,018867925
10 25.1 19	1	0,018867925	12 17 15	1	0,01886792	12 25.2 18	1	0,018867925	14 35 26	1	0,018867925
10 25.1 20	1	0,018867925	12 17 21	1	0,01886792	12 26.3 20	1	0,018867925	14 35 27	1	0,018867925
10 25.1 25	1	0,018867925	12 19 20	1	0,01886792	12 28 19	2	0,037735849	14 35 28	2	0,037735849
10 25.1 31	1	0,018867925	12 8 18	1	0,01886792	12 28.2 19	3	0,056603774	14 35 42.2	1	0,018867925
10 26.1 19	1	0,018867925	13 17 20	1	0,01886792	12 28.2 20	4	0,075471698	14 35 43.2	1	0,018867925
10 26.1 20	1	0,018867925	13 18 15	1	0,01886792	12 29.2 19	2	0,037735849	14 36 27	1	0,018867925
10 26.1 22	1	0,018867925	13 18 19	1	0,01886792	12 29.2 20	1	0,018867925	14 36 28	1	0,018867925
10 27.1 27	1	0,018867925	13 18 29	1	0,01886792	12 30 16	1	0,018867925	14 36 30	2	0,037735849
10 27.1 30	1	0,018867925	13 19 20	1	0,01886792	12 30.2 19	2	0,037735849	14 36.2 33	1	0,018867925
10 27.1 32	1	0,018867925	13 20 20	1	0,01886792	12 31.2 19	1	0,018867925	14 37 26	2	0,037735849
10 28.1 21	1	0,018867925	13 8 17	1	0,01886792	12 32.2 19	2	0,037735849	14 37 40.2	2	0,037735849
10 28.1 28	1	0,018867925	14 13 20	2	0,03773585	13 26.1 20	1	0,018867925	14 37 44.2	1	0,018867925
11 17 20	1	0,018867925	14 15 18	1	0,01886792	13 29.2 18	1	0,018867925	14 37.2 30	1	0,018867925
11 17 29	1	0,018867925	14 15 20	2	0,03773585	13 29.2 20	2	0,037735849	14 38.3 28	1	0,018867925
11 18 20	1	0,018867925	14 16 19	1	0,01886792	13 30 17,19	1	0,018867925	14 38.3 43.2	1	0,018867925
11 18 25	1	0,018867925	14 17 17	2	0,03773585	13 30 18	2	0,037735849	14 39 39.2	1	0,018867925
11 22.1 19	1	0,018867925	14 17 19	1	0,01886792	13 30.2 19	1	0,018867925	14 39.3 45.2	1	0,018867925
11 22.1 24	1	0,018867925	14 17 20	2	0,03773585	13 31 16	2	0,037735849	15 33 41.2	1	0,018867925
11 24.1 19	1	0,018867925	14 17 21	2	0,03773585	13 31 18	1	0,018867925	15 34 27	1	0,018867925
11 24.1 21.2	1	0,018867925	14 18 16	1	0,01886792	13 31.2 18	2	0,037735849	15 34 28	1	0,018867925
11 24.1 24	2	0,037735849	14 18 22	1	0,01886792	13 32 17	1	0,018867925	15 34 29	1	0,018867925
11 24.1 27	1	0,018867925	14 18 23	1	0,01886792	13 33 16	1	0,018867925	15 34 33	1	0,018867925
11 25.1 22	2	0,037735849	14 19 21	1	0,01886792	13 33 19	1	0,018867925	15 35 29	1	0,018867925
11 25.1 23	1	0,018867925	14 7 20	1	0,01886792	14 29.2 17	1	0,018867925	15 35 30	2	0,037735849
11 25.1 31	1	0,018867925	14 8 16	1	0,01886792	14 30.2 18	1	0,018867925	15 36 28	1	0,018867925
11 26.1 22	1	0,018867925	14 8 18	2	0,03773585	14 30.2 19	1	0,018867925	15 36 29	1	0,018867925
11 26.1 27	1	0,018867925	14 8 20	1	0,01886792	14 31 18	1	0,018867925	15 36 43.2	1	0,018867925
11 26.1 29	1	0,018867925	15 16 14	1	0,01886792	14 31.2 18	1	0,018867925	15 37 29	2	0,037735849
11 27.1 21	1	0,018867925	15 16 17	1	0,01886792	14 31.2 19	1	0,018867925	15 37 42.2	1	0,018867925
11 27.1 21.2	1	0,018867925	15 17 19	1	0,01886792	14 33 17	1	0,018867925	15 37 43.2	2	0,037735849
11 27.1 23	1	0,018867925	15 18 20	1	0,01886792	15 30.2 18	1	0,018867925	15 38 42.2	1	0,018867925
11 27.1 26	1	0,018867925	15 19 16	1	0,01886792	15 32.2 19	1	0,018867925	15 39.3 40.2	1	0,018867925
11 28.1 24	1	0,018867925	15 19 17	1	0,01886792				16 35 26	1	0,018867925
11 29.1 22	1	0,018867925	15 8 17	1	0,01886792				16 36 28	1	0,018867925
12 18 18	1	0,018867925	15 8 18	2	0,03773585				16 36 39.2	1	0,018867925
12 18 22	1	0,018867925	15 9 18	1	0,01886792				16 38 27	1	0,018867925
12 18 25	2	0,037735849	16 16 15,19	1	0,01886792				16 38 28	1	0,018867925
12 22.1 25	1	0,018867925	16 16 19	1	0,01886792				16 38 29	1	0,018867925
12 22.1 29	1	0,018867925	16 19 21	1	0,01886792				16 38 44.2	1	0,018867925
12 23.1 24	1	0,018867925									
12 25.1 24	1	0,018867925									
12 26.1 20	1	0,018867925									
12 27.1 21	1	0,018867925									

5. TARTIŞMA

Moleküler biyoloji; DNA teknolojisinin ilerlemesiyle büyük ölçüde gelişme göstermiştir. DNA incelemeleri hızlı ve güvenilir bir biçimde az miktarda biyolojik materyallerle sonuç verebilmektedir. Adli amaçlı olarak saç/kıllar, kan, idrar, semen ve diğer biyolojik sıvılar ile bunlara ait lekeler DNA analizi için kullanılmaktadır. Homolog kromozomlar üzerinde yer alan alellerin oluşturduğu genotip tablosu bir kişinin DNA profilini oluşturmaktadır. DNA profillemesi; soy bağı tespitinde, şüpheli ve mağdurların tanımlanmasında ve cinsiyet belirlenmesi gibi durumlarda kullanılmaktadır.

Adli DNA analizi, İngiltere’de 1983 ve 1986 yıllarında işlenen bir tecavüz ve cinayet davasının çözümünde ilk olarak uygulanmıştır. Her iki olayda, Alec Jeffreys DNA parmak izi yöntemini kullanarak DNA profilini şüpheli ve olay yeri örneklerinde göstermiş, DNA profilinin birebir eşleşmesi ile şüphelinin her iki olayın da suçlusu olduğu bulunmuştur.^{78,79} DNA teknolojisinin gelişmesi ve yapılan çalışmalar, RFLP tekniği ile VNTR lokuslarının ve PCR tekniği ile de STR lokuslarının kimliklendirme ve soy bağı tespit amaçlı daha etkin olarak kullanılacak belirteçler olabileceği gösterilmiştir.^{80,81} Böylece, gelişmiş ülkeler başta olmak üzere tüm dünyada daha objektif ve güvenilir sonuçlar elde edebilmenin yolu olan DNA’ya dayalı kimliklendirme ve soy bağı tespit çalışmalarına geçiş süreci başlamıştır.

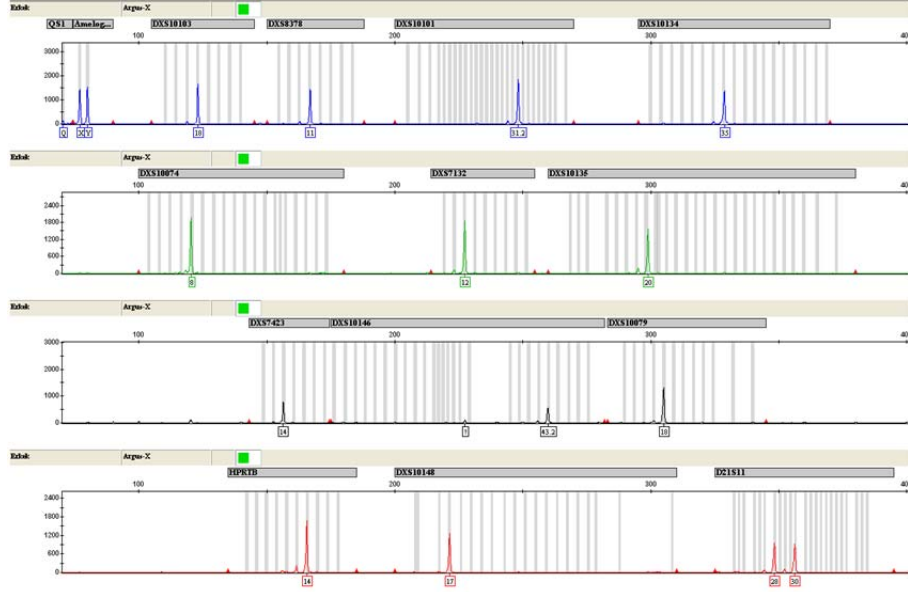
Ülkemizde, Yargıtay 2. Hukuk Dairesinin 27.05.1993 tarih ve 8685 esas, 9405 sayılı kararında, “paternite araştırmalarında eritrosit antijenleri, polimorfik eritrosit enzimleri ve serum proteinlerinin çalışılması gerektiği; babalığın/anneliğin reddedilemediği durumlarda ve bu testlerle baba/anne olabirliğinin %99.73 oranına ulaşmadığı durumlarda, DNA analizleri dahil tüm çalışmaların yapılması gerektiği” belirtilmiştir.

Türkiye’de ilk olarak adli DNA analizi 1993 yılında, İstanbul Üniversitesi’ne bağlı Deneysel Tıp Araştırma Merkezinde yapılmıştır. Burada, HLA DQ alfa, LDLR, GC, GYPA, HBGG ve D7S8 lokuslarının birlikte analizine izin veren ticari bir kit ile DNA analizi çalışmalarına başlanmıştır.⁸² STR lokuslarının keşfedilmesinden sonra ise, yapılan deneysel çalışmalar sonrası ticari olarak geliştirilen multipleks kitlerin kullanımı ile kimliklendirme ve soy bağı analizlerinde, geçmişte kullanılan tüm serolojik

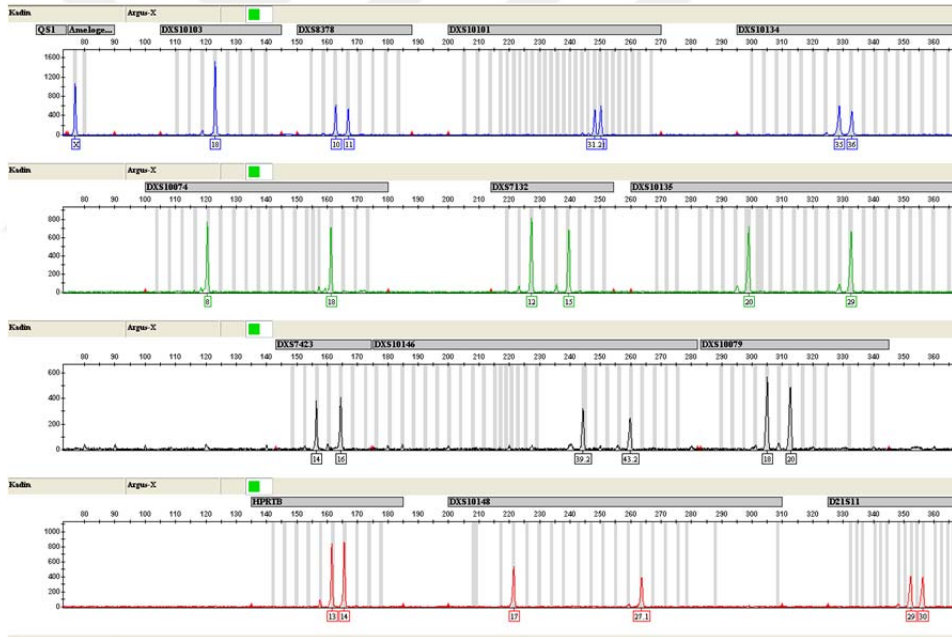
tanımlama metodolojilerinin yerini STR lokuslarının kullanıldığı DNA analizleri almıştır.^{83,84}

Kimliklendirme ve soy bağının belirlenmesinde kullanılacak ilave STR lokuslarını belirlemek için popülasyon çalışması yapılması ve lokusların ilgili popülasyondaki allel frekans dağılım oranlarının hesaplanması gerekmektedir. Olay yeri örneği ile şüpheli örneğin DNA profilleri eşleştğinde olay yeri örneğinin ne kadar olasılıkla şüpheliye ait olabileceğini veya şüpheli baba/anne ile çocuğun DNA profilleri eşleştğinde şüpheli baba veya annenin, baba/anne olma olasılığının toplumda bulunan herhangi bir erkek ya da kadından kaç kat daha olası olduğunu hesaplayabilmek için analizde kullanılan lokusların allel frekanslarının bilinmesi gerekmektedir. Daha az lokusla daha yüksek ayırım gücüne ulaşılabilmesi için seçilen lokusların ayırım gücünün % 90'ın üzerinde olması istenmektedir .

X-STR'lerin X kromozomunun özel kalıtımı sonucu, karmaşık akrabalık vakalarında rutin adli uygulamalar için değerli bir araç olabileceği belirlenmiştir. Kadınlar iki X kromozomundan birini annelerinden, diğeri babalarından alırken, erkekler ise X kromozomunu yalnızca annelerinden alır. Bu yüzden, X-STR'ler baba-kız ilişkilerinde markır aktarımı bozulmadığı sürece, uzun soyağacı izleri konusunda fikir verebilir. Aynı şekilde, yüksek MEC değeri nedeniyle baba-kız, büyükanne-torun veya iki kız kardeşin babalığının reddedilmesi gibi durumlarda anlamlı veriler sunabilir. Bunun da ötesinde kompleks akrabalık ilişkilerinde bu markırların kullanılabilmesi nedeniyle özellikle kitlesel felaketlerde anlamlı olabileceği bildirilmiştir. Şekil 3 ve 4'te çalışılan 12 X-STR lokusun bir kadına ve bir erkeğe ait elektroforez görüntüleri izlenmektedir.



Şekil 3. Bir erkeğe ait 12 X STR lokusu allellerinin elektroforez görüntüsü



Şekil 4. Bir kadına ait 12 X STR lokusu allellerinin elektroforez görüntüsü

X-STR'lerin adli amaçlı kullanılmasında, her popülasyonun alel frekans veri tabanlarının oluşturulması gerekmektedir. Dünya'da çok sayıda popülasyon için ticari olarak elde edilebilen Investigator™ Argus X-12 Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) paneli veya GHEP-ISFG tarafından geliştirilen decaplex paneli kullanarak kendi veri tabanları oluşturulmuştur.

84 kadın ve 53 erkekten oluşan toplam 137 örnekle yapılan bu çalışmada 12-XSTR lokusunun Doğu Akdeniz-Güneydoğu Anadolu Bölgesi popülasyonu için alel ve haplotip frekans dağılımları araştırılmıştır. Yapılan çalışmada bu popülasyon için en düşük alel sayısına sahip lokusun 5 alelli DXS8378, en yüksek alel sayısına sahip lokusun 31 alelli DXS10148 olduğu görülmüş olup diğer popülasyon sonuçlarına bakıldığında da benzer sonuçlar bildirilmiştir.

53 erkek örnekle yapılan çalışmada iki kişide DXS10079 lokusunda iki alelli patern, bir kişide DXS10103 lokusunda iki alelli patern gözlenmiştir. Daha önce otozomal kromozomlar ile Y kromozomlarında gösterilen duplikasyon X-kromozomu üzerinde de olabilmektedir.^{63,85} Bu nadir paternler, çalışılan örneklerde ilgili lokusun duplike olabileceğini veya kişilerin ekstra bir X-kromozoma sahip olabileceğini gösterir. Aynı numunelerde başka hiçbir lokus bu alışılmadık kalıpları göstermediğinden, bu çalışmada elde edilen duplikasyon bulguları için birinci açıklama daha mantıklıdır. İlave elektroforez pikleri üretimine neden olan bu durum (erkeklerde biallelik, kadınlarda triallelik) adli yorumlamayı karmaşık hale getireceğinden, X-STR veri tabanları oluştururken karşılaşılan bu gibi durumların raporlanmasının önemli olacağı vurgulanmaktadır. Bu tür verilerin sadece adli olgularda değil, genetik antropoloji ve moleküler tıpta da yararlı olabileceği düşünülmektedir.⁸⁶ Adli amaçlı analizlerde polimorfik lokusların istatistiksel analizlerde güvenle kullanılabilmesi için lokusların alel frekans dağılımlarının HWE'den sapma göstermemesi beklenir. Bu amaçla 84 diploid örneğin Arlequin 3.5 istatistik analiz programında HWE testi yapılmıştır. Analiz sonuçlarında; 0.05 güven aralığına göre HPRTB ve D1S10135 lokusları HWE'den sapma göstermiştir. Bununla birlikte, multiallelik lokuslar için uygulanması önerilen Bonferroni düzeltmesinden sonra, test edilen 12 X-STR lokusun hiçbirinde HWE den sapma olmadığı, gözlenen ve beklenen verilerin dengede olduğu saptanmıştır.

Lokusların adli etkinlik değerleri incelendiğinde PIC değeri en yüksek lokusun DXS10135, en düşük lokusun DXS8378 olduğu saptanmıştır. Lokusların MEC değerleri analiz edilen olgu gruplarına göre değişiklik göstermektedir. Anne-baba-çocuk üçlüsü analiz edildiğinde; baba-kız veya anne-kız analizinde; babaanne-torun veya iki kız kardeş analiz edildiğinde MEC değerleri değişmektedir. Her bir farklı durum için geliştirilmiş istatistik hesaplamalarına göre de MEC değeri en yüksek lokus

DXS10135'tir. Benzer şekilde en yüksek PD değerine sahip lokus DXS10135, en düşük PD değerine sahip lokus DXS8378'dir.

Adli genetikte analiz edilen tüm lokusların kombine ayırım gücü hesaplanırken, bağımsız lokuslar arasında çarpım kuralı uygulanmaktadır. Tüm X-STR'ler aynı kromozom üzerinde olduğundan, iki veya daha fazla markırın birbiri ile ilişkili olması muhtemeldir ve bağlantılı bölgeler ayrılmadan birlikte aktarılırlar. X-STR'lerin adli amaçlı kullanılabilmesi için X kromozom markırları arasında genetik bağlantı olup olmadığı konusunda tam bilgi sahibi olmak gerekir. Bağlantılı lokusların çarpıma dahil edilmesi, yanlış istatistik hesaplamalara neden olabilecektir. Genel olarak, X kromozomu Xp22.2, Xq12, Xq26 ve Xq28 'te bulunan 4 bağlantı grubuna ayrılmıştır. Bununla birlikte, lokuslar arasındaki fiziksel mesafe çok küçükse, bu gruplar arasında da rekombinasyon ve geçişin meydana gelebileceği bildirilmiştir. Adli amaçlı analizlerde lokuslar arasında çarpım kuralını uygulayabilmek için lokuslar arasında bağlantı olmaması gerektiğinden, çalışılan 12 X-STR lokusu için Arlequin 3.5.1 programı ile diploid (kadın) ve haploid (erkek) örneklerde ayrı olmak üzere lokuslar arası bağlantı dengesizliği (Linkage Disequilibrium-LD) testi gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz sonuçlarına 0.05 güven aralığında bazı lokuslarda anlamlı ilişki saptanmıştır. Bu nedenle literatürde önerilen multialelli lokuslar arasında bağlantı hesaplamada düzeltme faktörü olarak kullanılan Bonferroni testi uygulanmıştır ($p=0.05/66$). Bu düzeltme testi sonrası diploid ve haploid örneklerle yapılan hesaplamalarda lokuslar arasında anlamlı bağlantı tespit edilmemiştir. Test sonuçlarına göre lokuslar arasında anlamlı bir ilişki tanımlanmamasına rağmen, 4 LG grubunun (LG1, LG2, LG3 ve LG4) PD değeri hesaplanmıştır. Her bir LG grubu için en düşük PD değeri 0.94 hesaplanmıştır. Test edilen bütün parametreler ve özellikle yüksek kümülatif PD değeri (0.999999999), 12-XSTR lokusunun mütipleks analizinin adli amaçlı kimliklendirme ve akrabalık analizlerinde kullanımının uygun olacağını göstermiştir.

6. SONUÇ

1. Çukurova popülasyonunda 137 (84 kadın ve 53 erkek) örnekle yapılan çalışmada 12 X-STR lokusunda toplam 126 alel tanımlanmıştır. En fazla alele sahip lokusun 31 alelli DXS10148 ve en az alele sahip lokusun 5 alelli DXS8378 olduğu gözlemlendi.
2. Diploid örneklerle yapılan HWE testlerinde; Bonferroni düzeltme testi sonrası gözlenen ve beklenen genotip dağılımları arasında sapma olmamıştır ($p > 0.05/12$).
3. Lokusların PD değerleri incelendiğinde çalışılan lokuslar içinde en yüksek ayırım gücü kapasitesine sahip lokusun DXS10135 (PD Kadın = 0.995396, PD Erkek = 0.951127) ve en düşük ayırım gücü kapasitesi sahip lokusun DXS8378 (PD Kadın = 0.826910, PD Erkek = 0.669670) olduğu saptanmıştır.
4. 84 kadın ve 53 erkek örnekle yapılan LD testinde; Bonferroni düzeltme faktörü sonrası 12-XSTR lokusu arasında bağlantı saptanmamıştır.
5. 53 haploid örnekte bağlantılı grupların oluşturduğu haplotipler incelendiğinde;
 - a) Bağlantı grubu 1 (DXS8378, DXS10135 ve DXS10148)'de 50 farklı haplotip,
 - b) Bağlantı grubu 2(DXS7132, DXS10074 ve DXS10079)'de 46 farklı haplotip,
 - c) Bağlantı grubu 3 (HPRTB, DXS10101 ve DXS10103)'te 39 farklı haplotip ve
 - d) Bağlantı grubu 4 (DXS7423, DXS10134 ve DXS10146)'te 46 farklı haplotip tanımlanmış olup, bağlantılı gruplar için en düşük PD değeri 0.94'ün üzerindedir.
6. Çalışılan 12 –XTR lokusunun adli analizler için etkinliği test edildiğinde yüksek PIC, PD, MEC değerleri ile dört bağlantı grubunun yüksek kümülatif PD değeri (0.999999) nedeniyle, bu markırların adli amaçlı kimliklendirme ve akrabalık ilişkilerinin analizinde ve özellikle bazı kompleks akrabalık ilişkilerinde yüksek etkinliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur.
7. Bu çalışma ile oluşturulan veriler Anabilim Dalımız Adli Genetik Laboratuvarı ve diğer Adli Genetik Laboratuvarlarında yapılacak istatistiksel hesaplamalarda

kullanılabilir; özellikle otozomal STR lokusları ile yeterli ayırım gücüne ulaşamayan ve/veya babanın yokluğunda babaanne-kız torun ve hala-kız yeğen ilişkisinin ortaya koyulması ile baba olabilirliğin kuvvetlendirilmesi veya dışlanmasında anlamlı olacaktır.



KAYNAKLAR

1. **Butler JM.** Fundamentals of Forensic DNA Typing. *Fundam. Forensic DNA Typing* **2010**; doi:10.1016/C2009-0-01945-X.
2. **Jiang X, Guo F, Jia F, Jin P & Sun Z.** Development of a 20-locus fluorescent multiplex system as a valuable tool for national DNA database. *Forensic Sci. Int. Genet.* **2013**; 7: 279–289.
3. **Carracedo A & Sánchez-Diz P.** Forensic DNA-typing technologies: a review. *Methods Mol. Biol.* **2005**; 297: 1–12.
4. Hukuku, I.I.I. S. Iii. sağlık hukuku kurultayı 7-8. **2010**.
5. **Jeffreys AJ, Wilson V & Thein SL.** Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. *Nature* **1985**; 314:67–73.
6. **Dumache R, Ciocan V, Muresan C & Enache A.** Molecular DNA Analysis in Forensic Identification. *Clin. Lab.* 62, **2016**.
7. **Hossain T et al.** Population genetic data on 15 autosomal STR loci in Bangladeshi population. *Forensic Sci. Int. Genet.* **2014**; 13:e4–e5.
8. **Liu QL et al.** Development and population study of the 12 X-STR loci multiplexes PCR systems. *Int. J. Legal Med.* **2012**; 126: 665–670.
9. **Trindade-Filho A, Ferreira S & Oliveira SF.** Impact of a chromosome X STR Decaplex in deficiency paternity cases. *Genet. Mol. Biol.* **2013**; 36:507–510.
10. **Szibor R et al.** Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int. J. Legal Med.* **2003**; 117: 67–74.
11. **Williams LN.** *An introduction to forensic genetics. General Dentistry* 61, **2013**.
12. **Tamaki K & Jeffreys AJ.** Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Leg. Med.* **2005**; 7:244–250.
13. **Jeffreys AJ, Wilson V & Thein SL.** Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. *Nature* **1985**; 316:76–79.
14. **Litt M & Luty JA.** A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* **1989**; 44: 397–401.

15. **Nakamura Y *et al.*** Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* **1987**; 235: 16–22.
16. **Kashyap VK, Sitalaximi T, Chattopadhyay P & Trivedi R.** DNA Profiling Technologies in Forensic Analysis. *Int. J. Hum. Genet.* **2004**; 4:11–30.
17. **Kloosterman AD, Budowle B & Daselaar P.** PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis. *Int. J. Legal Med.* **1993**; 105:257–64.
18. **Butler J.** *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology.* (Elsevier). **2012**
doi:10.1016/C2011-0-04189-3
19. **Saiki R *et al.*** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (80-).* **1985**; 230: 1350–1354.
20. **Edwards A, Civitello A, Hammond HA & Caskey CT.** DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* **1991**; 49: 746–56.
21. **Kimpton CP *et al.*** Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl.* **1993**; 3: 13–22.
22. **Kimpton C *et al.*** Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *Int. J. Legal Med.* **1994**; 106: 302–311.
23. **Clayton TM, Whitaker JP & Maguire CN.** Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Sci. Int.* **1995**; 76: 7–15.
24. **Hagelberg E, Gray IC & Jeffreys AJ.** Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* **1991**; 352: 427–429.
25. **Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E & Sonnberg A.** Identification of the skeletal remains of josef mengele by DNA analysis. *Forensic Sci. Int.* **1992**; 56: 65–76.
26. **Melez İE.** *Kan Lekesi Üzerinden Adli Genetiğe Giriş Olay Yerinden Laboratuvara.* (Nobel Tıp Kitabevleri) **2013**.
27. **Lee HC, Ladd C, Bourke MT, Pagliaro E & Tirnady F.** DNA typing in forensic science. I. Theory and background. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* **1994**; 15: 269–82.

28. **Balazs I.** Properties of hypervariable single locus polymorphisms and their application to identity testing. in *DNA In Forensic Science Theory, Techniques And Applications* (ed. James R. Robertson, A. M. Ross, L. B.) **1990**; 112–124 (Ellis Horwood Limited).
29. **Glover KA et al.** A comparison of SNP and STR loci for delineating population structure and performing individual genetic assignment. *BMC Genet.* 11, 2, **2010**.
30. **Serin A, Alper B ve Dag H.** No Title. *Adli Tip Derg.* **2002**; 16:72–81.
31. **Ruitberg CM.** STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Res.* **2001**; 29: 320–322.
32. **Lygo JE et al.** The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *Int. J. Legal Med.* **1994**; 107: 77–89.
33. **Semizoğlu İ.** *Adli DNA Analizleri.* (Adalet Yayınevi) **2013**.
34. **Gettings KB, Aponte RA, Vallone PM & Butler JM.** STR allele sequence variation: Current knowledge and future issues. *Forensic Sci. Int. Genet.* **2015**; 18: 118–130.
35. **Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ & Gill P.** Variation in Short Tandem Repeat sequences ?a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int. J. Legal Med.* **1994**; 107: 13–20.
36. **Butler JM & Hill CR.** Biology and Genetics of New Autosomal STR Loci Useful for Forensic DNA Analysis. *Forensic Sci. Rev.* **2012**; 24: 15–26.
37. **Altun A.** Çukurova Yöresinde HUMVWA Lokusu Allel Frekans Dağılımı. (Çukurova Üniversitesi) **1999**.
38. **Aşçioğlu F.** X-Kromozomal STR Polimorfizmi (DXS8377, DXS101, DXS6789, STRX-1, HUMHPRTB) ve Türk Toplumundaki Alel Frekansları. (İstanbul Üniversitesi) **2006**.
39. **Edelmann J, Deichsel D, Hering S, Plate I & Szibor R.** Sequence variation and allele nomenclature for the X-linked STRs DXS9895, DXS8378, DXS7132, DXS6800, DXS7133, GATA172D05, DXS7423 and DXS8377. *Forensic Sci. Int.* **2002**; 129: 99–103.
40. **Urquhart A, Oldroyd NJ, Kimpton CP & Gill P.** Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification. *Biotechniques* **1995**; 18: 116–8, 120–1.
41. **Sparkes R et al.** The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (I). Mixtures, ageing, degradation and species studies. *Int. J. Legal Med.* **1996**; 109: 186–94.

42. **Sparkes R et al.** The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (II), Artefacts, casework studies and success rates. *Int. J. Legal Med.* **1996**; 109: 195–204.
43. **Jin L, Macaubas C, Hallmayer J, Kimura A & Mignot E.** Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: Phylogenetic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**; 93: 15285–15288.
44. **Brinkmann B, Klitschar M, Neuhuber F, Hühne J & Rolf B.** Mutation Rate in Human Microsatellites: Influence of the Structure and Length of the Tandem Repeat. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**; 62: 1408–1415.
45. **Möller A et al.** Population data and forensic efficiency values for the STR systems HumVWA, HumMBP and HumFABP. *Int. J. Legal Med.* **1994**; 106: 183–9.
46. **Di Rienzo A et al.** Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**; 91: 3166–3170.
47. **Farrall M & Weeks DE.** Mutational Mechanisms for Generating Microsatellite Allele-Frequency Distributions: An Analysis of 4,558 Markers. *Am. J. Hum. Genet.* **1998**; 62: 1260–1262.
48. **Aşıcıoğlu F, Oguz-Savran F & Ozbek U.** Mutation rate at commonly used forensic STR loci: paternity testing experience. *Dis. Markers* **2004**; 20: 313–5.
49. **Rubinsztein DC et al.** Microsatellite evolution — evidence for directionality and variation in rate between species. *Nat. Genet.* **1995**; 10: 337–343.
50. **Henke J & Henke L.** Mutation Rate in Human Microsatellites. *Am. J. Hum. Genet.* **1999**; 64: 1473.
51. **Rolf B, Wiegand P & Brinkmann B.** Somatic mutations at STR loci—a reason for three-allele pattern and mosaicism. *Forensic Sci. Int.* **2002**; 126: 200–2.
52. **Chakraborty R, Stivers DN & Zhong Y.** Estimation of mutation rates from parentage exclusion data: applications to STR and VNTR loci. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **1996**; 354: 41–48.
53. **Ross AM ve Harding HWJ.** DNA typing and forensic Science. *Forensic Sci. Int.* **1989**; 41: 197–203.
54. **Hallenberg C & Morling N.** A report of the 1997, 1998 and 1999 Paternity Testing Workshops of the English Speaking Working Group of the International Society for Forensic Genetics. *Forensic Sci. Int.* **2001**; 116: 23–33.
55. **Holland MM, Cave CA, Holland CA & Bille TW.** Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks. *Croat. Med. J.* **2003**; 44: 264–72.

56. **Menotti-Raymond MA, David VA, Wachter LL, Butler JM & O'Brien SJ.** An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples. *J. Forensic Sci.* **2005**; 50: 1061–70.
57. **Pádár Z et al.** Canine STR analyses in forensic practice. Observation of a possible mutation in a dog hair. *Int J Leg. Med* **2002**; 116: 286–288.
58. **Schneider PM et al.** Results of collaborative study regarding the standardization of the Y-linked STR system DYS385 by the European DNA Profiling (EDNAP) group. *Forensic Sci. Int.* **1999**; 102: 159–65.
59. **Prinz M & Sansone M.** Y chromosome-specific short tandem repeats in forensic casework. *Croat. Med. J.* **2001**; 42: 288–91.
60. **Gehrig C, Hochmeister B & Budowle B.** Swiss Allele Frequencies and Haplotypes of 7 Y-Specific STRs. *J. Forensic Sci.* **2000**; 45: 14701J.
61. **Jobling MA, Pandya A & Tyler-Smith C.** The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int. J. Legal Med.* **1997**; 110: 118–24.
62. **Kayser M et al.** Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int. J. Legal Med.* **1997**; 110: 125–33, 141–9.
63. **Kayser M et al.** Characteristics and Frequency of Germline Mutations at Microsatellite Loci from the Human Y Chromosome, as Revealed by Direct Observation in Father/Son Pairs. *Am. J. Hum. Genet.* **2000**; 66: 1580–1588.
64. **Edelmann J, Hering S, Kuhlisch E & Szibor R.** Validation of the STR DXS7424 and the linkage situation on the X-chromosome. *Forensic Sci. Int.* **2002**; 125: 217–22.
65. **Szibor R, Hering S & Edelmann J.** A new Web site compiling forensic chromosome X research is now online. *Int. J. Legal Med.* **2006**; 120: 252–254.
66. **Turrina S ve De Leo D.** Population genetic comparisons of three X-chromosomal STRs (DXS7172, DXS7173, GATA 172D05) in North and South Italy. in *International Congress Series* **2004**.
67. **Lv M et al.** Allele Frequency Distribution of Two X-Chromosomal STR Loci in Han Population in China. *J. Forensic Sci.* **2004**; 49: 1–2.
68. **Bär W et al.** DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. International Society for Forensic Haemogenetics. *Int. J. Legal Med.* **1997**; 110: 175–6.

69. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/human/>. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/human/>. (Accessed: 30th May 2019)
70. **Mi Y & Vanderpuye O.** Comparison of Different DNA Extraction Methods for Forensic Samples. *J. Nat. Sci. Res.* **2013**; 3: 32–39.
71. **Sweet D, Lorente M, Valenzuela A, Lorente JA & Alvarez JC.** Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. *Forensic Sci. Int.* **1996**; 83: 167–77.
72. **Thormann W, Molteni S, Caslavská J & Schmutz A.** Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **1994**; 15: 3–12.
73. **Boehnke M, Arnheim N, Li H & Collins FS.** Fine-structure genetic mapping of human chromosomes using the polymerase chain reaction on single sperm: experimental design considerations. *Am. J. Hum. Genet.* **1989**; 45: 21–32.
74. **El-Alfy SH & Abd El-Hafez AF.** Paternity testing and forensic DNA typing by multiplex STR analysis using ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2012**; 10: 101–112.
75. Qiagen N.V. Investigator® Argus X-12 Handbook. 1–84, **2013**.
76. **Lang Y, Guo F & Niu Q.** StatsX v2.0: the interactive graphical software for population statistics on X-STR. *Int. J. Legal Med.* **2019**; 133: 39–44.
77. chrx-str. Available at: chrx-str.org. (Accessed: 11th May 2019)
78. **Aronson JD.** DNA fingerprinting on trial: the dramatic early history of a new forensic technique. *Endeavour* **2005**; 29: 126–131.
79. **Jobling MA.** Curiosity in the genes: the DNA fingerprinting story. *Investig. Genet.* 4, 20 **2013**.
80. **Budowle B, Baechtel FS, Giusti AM & Monson KL.** Applying highly polymorphic variable number of tandem repeats loci genetic markers to identity testing. *Clin. Biochem.* **1990**; 23: 287–293.
81. **Lareu V et al.** Normal and anomalous electrophoretic behavior of polymerase chain reaction-based DNA polymorphisms in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **1998**; 19: 1566–1572.
82. **Vural B, Atlioglu E, Kulusayin O, Togan I, Buyukdevrim SOT.** Turkish population data on the HLA-DO alpha, LDLR, GYPA, HBGG, D7s8, and GC loci. *Int. J. Legal Med.* **1998**; 111: 43–45 .

83. **Budowle B, Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA & Keys KM.** Population Data on the Thirteen CODIS Core Short Tandem Repeat Loci in African Americans, U.S. Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians. *J. Forensic Sci.* **1999**; 44: 14601J.
84. **Birus I, Marcikić M, Lauc D, Dzijan S & Lauc G.** How high should paternity index be for reliable identification of war victims by DNA typing? *Croat. Med. J.* **2003**; 44: 322–6 .
85. **Prontera P, Ottaviani V, Isidori I, Stangoni G & Donti E.** Xq12-q13.3 duplication: Evidence of a recurrent syndrome. *Ann. Neurol.* **2012**; 72: 821–822.
86. **Mršić G et al.** Expanded Croatian 12 X-STR loci database with an overview of anomalous profiles. *Forensic Sci. Int. Genet.* **2018**; 34: 249–256.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esen KALAOĞLU
Doğum Tarihi ve Yeri : 21.02.1984, Adana
Medeni Durumu : Bekar
Adres : Huzurevleri Mah. 77051 Sk. Dış Kapı No:12 Erciyes
Suit Apt. Kat:4, Daire:13 Çukurova/Adana
Telefon : 0 507 787 80 60
E posta: kalaoglu_esen@hotmail.com

Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi

Görev Yerleri: Midyat 1 Nolu Sağlık Ocağı, Midyat/Mardin
Midyat 9 Nolu Kayalıpınar ASM, Midyat/Mardin
Midyat 8 Nolu Çavuşlu ASM, Midyat/Mardin

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı, Adana

Dernek Üyelikleri: Adana Tabip Odası

Adli Tıp Uzmanlar Derneği

Avrasya Adli Bilimler Derneği

Yabancı Dil: İngilizce





EKLER

EK-1: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Onayı

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Sayısı	Tarih
83	7 Aralık 2018

KARAR NO 3- Adli Tıp Anabilim Dalı'nda, Prof. Dr. Behnan Alper yönetiminde, Doç. Dr. Ayşe Serin'in katkılarıyla, Araş. Gör. Dr. Esen Kalaoğlu tarafından yürütülmesi öngörülen, "12 X- STR Lokusunun Adli Etkinlik Değerlerinin Araştırılması" başlıklı tıpta uzmanlık tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN	Prof Dr Selim Kadioğlu Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
ÜYELER	Prof Dr Davut Alptekin Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Dinçer Yıldızdaş Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gülşah Seydaoğlu Biyostatistik Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Gürhan Sakman Genel Cerrahi Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Murat Gündüz Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı	
	Doç Dr Ezgi Özyılmaz Saraç Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Av. Zehra Bulut Hukukçu Üye	
	Dr Neşe Kayrın Kurum Dışı Üye	

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Balcalı 01330 Adana
Telefon: 0322 338 60 60 dahili 3465, Faks: 0322 338 67 22