

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

ÇUKUROVA BÖLGESİNDE HLADQA1 VE POLYMARKER
(LDLR, GYPA, HBG, D7S8,GC) LOKUSLARININ
ALLEL FREKANS DAĞILIMLARI

132598

Bil. Uzm. HÜSNİYE DAĞ CANAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Behnan ALPER

132598

ADANA- 2003

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

**ÇUKUROVA BÖLGESİNDE HLA-DQA1 VE POLYMORFİZM
(DQA1, DQA2, DQA3, DQA4) LOKUSLARININ
ALLEL FREKANS DAĞILIMLARI**

Bil. Uzm. HÜSNİYE DAĞ CANAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Behnan ALPER

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

Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Bütçesinden
SBE 2002-D24 nolu proje olarak desteklenmiştir.

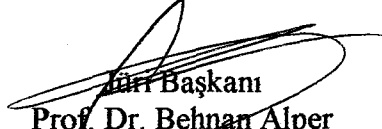
Tez No:

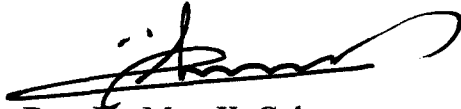
ADANA- 2003


Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü


Adli Tıp Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan Çukurova Bölgesinde **HLADQA1 ve Polymarker (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8,GC) lokuslarının allel frekans dağılımları** adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

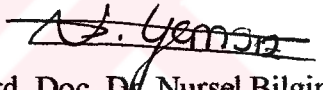
Tez Savunma Tarihi: 26.12.2003


Jüri Başkanı
Prof. Dr. Behnan Alper
Ç. Ü. Tıp Fak. Adli Tıp ABD

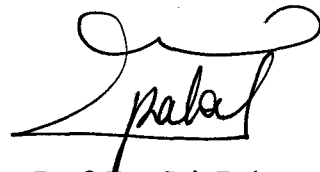

Doç. Dr. Mete K. Gülmen
Ç. Ü. Tıp Fak. Adli Tıp ABD


Doç. Dr. Abdullah Tuli
Ç. Ü. Tıp Fak. Biyokimya ABD


Doç. Dr. Necmi Çekin
Ç. Ü. Tıp Fak. Adli Tıp ABD


Yrd. Doç. Dr. Nursel Bilgin
Mersin Ü. Tıp Fak. Adli Tıp ABD

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun 07.01.2004. tarih ve 1./8-3.....sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Sait Polat
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tezimin oluşum ve çalışma aşamasında bilgi ve deneyimleri ile desteklerini esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Behnan Alper'e,

Eğitim ve tez dönemi içerisinde gösterdikleri ilgi ve destekleri için Anabilim Dalı ğretim yeleri Doç. Dr. Mete K. Gülmen, Doç. Dr. Necmi ekin ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet Hilal'e,

Çalışmalarım sırasında gereksinim duyduğum desteği sağlayan Dr. Biyolog Ayşe Serin ile çalışma arkadaşlarıma,

SBE 2002-D24 nolu proje olarak bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde maddi katkı sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Uz. Bio. Hüsniye Dağ Canan

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. DNA'nın Yapısı	3
2.2. Genetik Polimorfizm ve Adli Amaçlı DNA Tiplendirmesi	5
2.3. HLA Kompleksi	7
2.3.1. HLA Kompleksinin Genetik Organizasyonu	8
2.3.2. İsimlendirme	10
2.4. Polymarker Sistemi (LDLR, GYPA, HBG, D7S8, GC)	11
2.4.1. LDLR	11
2.4.2. GYPA	13
2.4.3. HBG	14
2.4.4. D7S8	15
2.4.5. GC	15
2.5. Tiplendirmede Kullanılan Yöntemler	16
2.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	16
2.5.2. Allele Özgü Oligonükleotid Hibridizasyonu (ASO)	17
2.6. Striplerdeki Sonuçların Yorumlanması	18
2.7. AmpliType PM+HLADQA1 Sistemlerinin Adli Amaçlı Kullanımı	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Deneylerde Kullanılan Malzemeler	25
3.1.1. Deneylerde Kullanılan Araç ve Gereçler	25
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	25

3.1.3. AmpliType PM+DQA1 PCR	
Amplifikasyon ve Tiplendirme Kitinin İçindekiler	26
3.1.4. High Pure PCR Template Preparation Kitinin İçindekiler	26
3.2. Deneylede Kullanılacak Solüsyonların Hazırlanması	27
3.2.1. Kitte Bulunanların Hazırlanması	27
3.2.2. Kitte Bulunmayanların Hazırlanması	27
3.3. Deneylede	29
3.3.1. High Pure PCR Template Preparation Kit ile DNA Ekstraksiyonu	29
3.3.2. Amplifikasyon	30
3.3.3. Agaroz Jelinin Hazırlanması	31
3.3.4. Elektroforez ile Amplifikasyon Kontrolü	31
3.3.5. DNA Hibridizasyonu	32
3.3.6. Renklendirme	33
3.4. İstatistiksel Hesaplamalar	36
4. BULGULAR	37
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇLAR	50
7. KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. DNA'yı oluşturan nükleotid yapısına bir örnek.	3
Şekil 2.2. DNA çift sarmalının yapısı.	4
Şekil 2.3. DNA üzerinde exon ve intron görünümü.	5
Şekil 2.4. HLA antijen sistemi (MHC gen bölgesi).	8
Şekil 2.5. HLA Sınıf 2 antijeninin yapısı.	9
Şekil 2.6. LDLR'nin yapısı.	12
Şekil 2.7. GYPA'nın yapısı.	14
Şekil 2.8. Kromozom 11 üzerindeki beta globin geni	15
Şekil 2.9. PCR'ın şematik sunumu.	17
Şekil 2.10. ASO ile hibridizasyonun şematize edilmesi.	18
Şekil 2.11.a. HLADQA1 1.1, 4.1	19
Şekil 2.11.b. LDLR BB, GYPA AB, HBGG AC, D7S8 AB, GC BB	20
Şekil 3.1. Termal Cyclers cihazı	31
Şekil 3.2. Agaroz jelde bantların görünümü.	32
Şekil 3.3. Hibridizasyon sonrasında striplerin görünümü.	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Nükleotidlerin listesi	3
Çizelge 2.2. Adli seroloji ve Hemogenetikte kullanılan markerlara örnekler.	7
Çizelge 2.3. WHO isimlendirmesi	11
Çizelge 2.4. HLADQA1 ve PM lokuslarının kromozomal lokasyonu	16
Çizelge 4.1. HLADQA1 ve PM lokuslarında gözlenen gen sayıları ve yüzdeleri	38
Çizelge 4.2. HLADQA1 lokusuna ait gözlenen ve beklenen değerler	39
Çizelge 4.3. PM sistemine ait gözlenen ve beklenen değerler	40
Çizelge 4.4. HLADQA1 ve PM sistemlerinin gen frekansları	41
Çizelge 4.5. HLADQA1 ve PM sistemlerinin adli etkinlik değerleri	42
Çizelge 5.1. Türkiye'nin çeşitli bölgelerine ait HLADQA1+PM allel frekans dağılımları	47
Çizelge 5.2. Çeşitli popülasyonlarda gözlenen HLADQA1 ve PM lokuslarına ait frekans dağılımları	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aa: Aminoasit

α : Alfa

AmpFLP: Amplified fragment length polymorphism

ASO : Allele specific oligonucleotide (Allele özgü oligonükleotidler)

β : Beta

bp: base pair

df: Degrees of freedom (serbestlik derecesi)

GC: Group specific component

GYPA: Glycophorin A

DNA: Deoxyribonucleic acid (Deoksiribonükleik asit)

EDTA: Etilendiamintetraacetic acid

Exp- H: Expected heterozigosity (Beklenen heterozigotluk)

FH: Familial hypercholesterolemia (ailesel hiperkolesterolemi)

Hb: Hemoglobin

HBGG: Hemoglobin G gammaglobin

HLA: Human leucocyte antigen (insan lökosit antijenleri)

HWE: Hardy –Weinberg dengesi

KDa: Kilo dalton

LDLR: Low density lipo-protein receptor

mt DNA: Mitokondrial DNA

Obs-H: Observed heterozigosity (Gözlenen heterozigotluk)

PCR: Polymerase chain reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)

PD: Power of discrimination (ayırt etme gücü)

PE: Power of exclusion (reddetme gücü)

PM: Polymarker

RFLP: Restriction fragment length polymorphism.

STR: Short tandem repeat.

TMB:Tetrametilbenzidin

VNTR: Variable number of tandem repeats.

ÖZET

Çukurova Bölgesinde HLADQA1 ve Polymarker (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8,GC) lokuslarının allel frekans dağılımları

PCR'a dayalı tiplendirme yapılan HLADQA1 lokusu ve PM (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 ve GC) lokusları adli amaçlı paternite ve kimliklendirme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. PCR'a dayalı bir tiplendirme olan bu yöntem ASO problemleriyle reverse dot blot formatını içermektedir.

Bu çalışmada Çukurova Bölgesinde yaşayan 100 kişilik bir popülasyonda HLADQA1 ve Polymarker (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 ve GC) lokuslarının allel frekansları saptanmıştır. Bu 6 lokusun istatistiksel değerlendirilmesi yapılarak sonuçlar diğer ülke popülasyonlarında yapılan çalışma sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Akrabalık ilişkisi bulunmayan 100 gönüllü vericiden intravenöz kan örnekleri alındıktan sonra High Pure PCR Template Preparation kit ile DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyondan sonra amplifiye edilen ürünlerde HLADQA1 ve PM lokusları ASO problemleri ile reverse dot blot formatında AmpliType PM+HLADQA1 kiti ile saptanmıştır.

Çalışma sonucunda 100 kişide HLADQA1 allellerinin 21, LDLR'nin 3, GYPA'nın 3, HBGG'nin 5, D7S8'nin 3, GC'nin ise 6 genotipi gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Hardy-Weinberg Dengesi ile uyumlu bulunmuştur. Çalışma sonuçlarına göre Çukurova Bölgesine ait ayırım gücü; HLADQA1 %94.6, LDLR %85.8, GYPA %85.6, HBGG % 88.3, D7S8 %83.8, GC 94.5, bu 6 sistemin toplam ayırım gücü %99.975, PE değeri ise HLADQA1 0.5023, LDLR 0.185, GYPA 0.184, HBGG 0.216, D7S8 0.174, GC 0.314 olarak hesaplanmıştır.

Elde ettiğimiz sonuçların Çukurova Bölgesinde adli amaçlı çalışmalarda veri tabanı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Adli Bilimler, HLADQA1 lokusu, PM lokusları, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Reverse dot-blot.

ABSTRACT

Allele frequency distribution of HLADQA1 and polymarker (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC) loci in Çukurova Region.

PCR- based typing of the HLADQA1 locus as well as that of several other polymorphic loci including the Low Density Lipo-protein Receptor (LDLR), Glycophorin A (GYPA), Hemoglobin G gammaglobin (HBGG), D7S8 and Group Specific Component (Gc) is very useful for forensic as well as paternity identification. This PCR-based typing involves reverse dot blot methodology with allele specific oligonucleotide (ASO) probes.

We have analysed the allele and genotype frequencies of six PCR-based genetic marker (HLA-DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC) in 100 unrelated person living in Çukurova Region. Allele frequency distribution of HLADQA1 and polymarker loci were statistically the other countries data were compared.

Blood samples taken from healthy and unrelated 100 volunteer individual and DNA were extracted from these samples with High Pure PCR Template preparation Kits.

Allele and genotype frequencies at the HLADQA1 and PM locus have been determined by the use of polymerase chain reaction amplification and allele specific oligonucleotide probes. The probes define six alleles and 21 genotypes in a dot-blot format..

In this population sample 21 genotypes of HLADQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 were observed. The results were in good agreement with the Hardy Weinberg Equilibrium. In Çukurova Region the PD rate HLADQA1 %94.6, LDLR %85.8, GYPA %85.6, HBGG % 88.3, D7S8 % 83.8, GC %94.5 were calculated.

It's determined results of PM+HLADQA1 loci from Çukurova Region database can be used in forensic aim tests.

Key words: Forensic Sciences, HLADQA1 locus, PM loci, Polymerase chain reaction, Reverse dot-blot.

1.GİRİŞ

Adli bilimler kapsamında birçok bilim dalı vardır. Bu dallardan biri de biyolojik sıvı ve dokular ile bunlara ait lekelerin kimliklendirilmesinde uygulama alanı bulan Adli seroloji ve hemogenetiktir.

Biyolojik sıvılar ile dokuların identifikasyonu adli bilimler literatüründe 1904'den beri kullanılmaktadır. 20.yy başlarında Landsteiner'in ABO kan gruplarını tanımlamasından sonraki yıllarda, çok sayıda polimorfik özellik belirlenmiştir. Eritrosit antijen sistemleri, izoenzim markerlar, eritrosit protein varyantları, serum protein markerları ve insan lökosit antijenleri (HLA) bireysel ayırım amacıyla adli bilimlerde kullanılmaya başlanmıştır¹. Geleneksel adli seroloji analizlerinde, protein seviyesinde genetik polimorfizm değerlendirilirken, Deoksiribonükleic acid (DNA) tiplendirmesi ile nükleotid seviyesinde çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. 1984'de Alec Jeffreys tarafından minisatellit DNA'ların saptanmasıyla, DNA düzeyindeki analizler kriminal incelemelerde önemli bir yer almıştır^{1,2,3}.

Popülasyon çalışmaları ve genetik markerların haritalama çalışmalarının yapılması için spesifik DNA polimorfizmlerinin identifikasyonunun yapılması gerekmektedir. PCR'ın geliştirilmesi ile spesifik DNA sekanslarının in vitro amplifikasyonu sağlanabilmiştir. Böylece DNA polimorfizmlerinin identifikasyonları yapılmaya başlanmıştır⁴. Günümüzde Adli Bilimlerde annelik/babalık araştırılması ve kimliklendirme amaçlı çalışmalarda, DNA varyasyonları şeklinde görülen genetik polimorfizm oldukça sık kullanılmaktadır⁵. Bu polimorfik markerlardan HLADQA1 ile Polymarkerlar (PM); düşük dansiteli lipoprotein reseptörü (LDLR), Glycophorin A (GYPA), Hemoglobin G-Gamma Globin (HBGG), D7S8 ve Grup spesifik komponentleri (Gc) adli bilimlerde oldukça sık kullanılan sistemlerdir. Bu 6 sistemin DNA düzeyinde tiplendirilmeleri için bir çok tekniğin standardize edilmesine gereksinim duyulmuş, bu amaçla araştırmalar yapılmıştır. Bunlardan biri de PCR ile amplifiye edilen DNA'ların non-radyoaktif işaretli oligonükleotid problarla dot-blot formatında tiplendirilmesidir. Bu tiplendirme için, Roche tarafından AmpliType PM+DQA1 kiti geliştirilmiştir. Böylece HLA-DQA1 ve PM lokuslarından oluşan 6 farklı lokusun amplifikasyonu aynı PCR reaksiyon karışımı içinde yapılabilmektedir⁶.

Adli Bilimlerde kullanılacak olan tekniklerde örnek miktarı, zaman, maliyet, görüntüleme kolaylığı gibi özellikler aranmaktadır. Ayrıca adli amaçlı paternite ve kimliklendirme olgularında çalışılan lokusların o popülasyondaki allel frekanslarının bilinmesi gerekmektedir. Böylece olgularda çalışılan lokusların reddetme gücünü hesaplama olanağı olmaktadır.

Bu çalışmada Çukurova Bölgesinde yaşayan 100 kişilik bir popülasyonda HLADQA1 ve Polymarker (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 ve Gc) lokuslarının AmpliType PM+ HLADQA1 kiti ile saptanması, eldeki verilere göre HLADQA1 ve PM lokuslarının allel frekanslarının hesaplanarak elde edilen sonuçların diğer çalışma sonuçları ile karşılaştırılması ve bölgemize ait veri tabanının oluşturulması amaçlanmıştır.

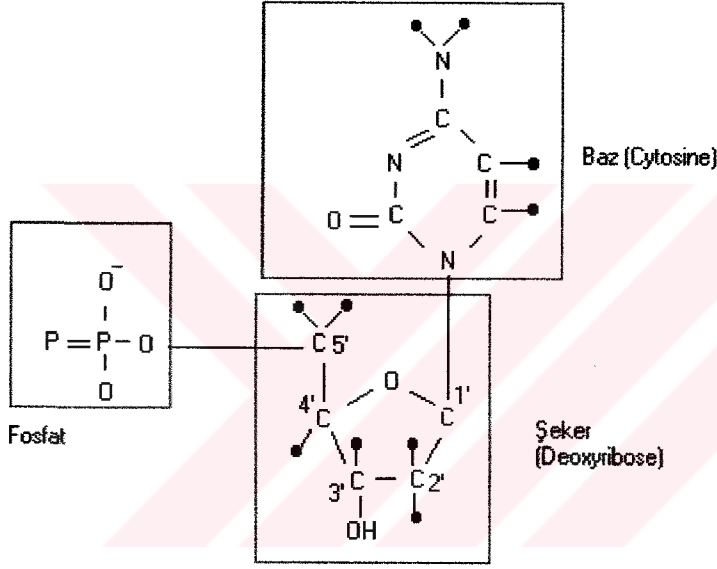


2. GENEL BİLGİ

2.1. DNA'nın Yapısı

DNA canlı organizmalarda kalıtım materyalidir. DNA polimer yapıdadır ve yapısal üniti nükleotid olarak adlandırılan deoksiribonükleotidlerdir. Herbir nükleotid üç komponentten oluşmuştur (Şekil 2.1):

- bir beş karbonlu şeker (deoksiriboz)
- bir nitrojen baz
- bir veya daha fazla fosfat grubu



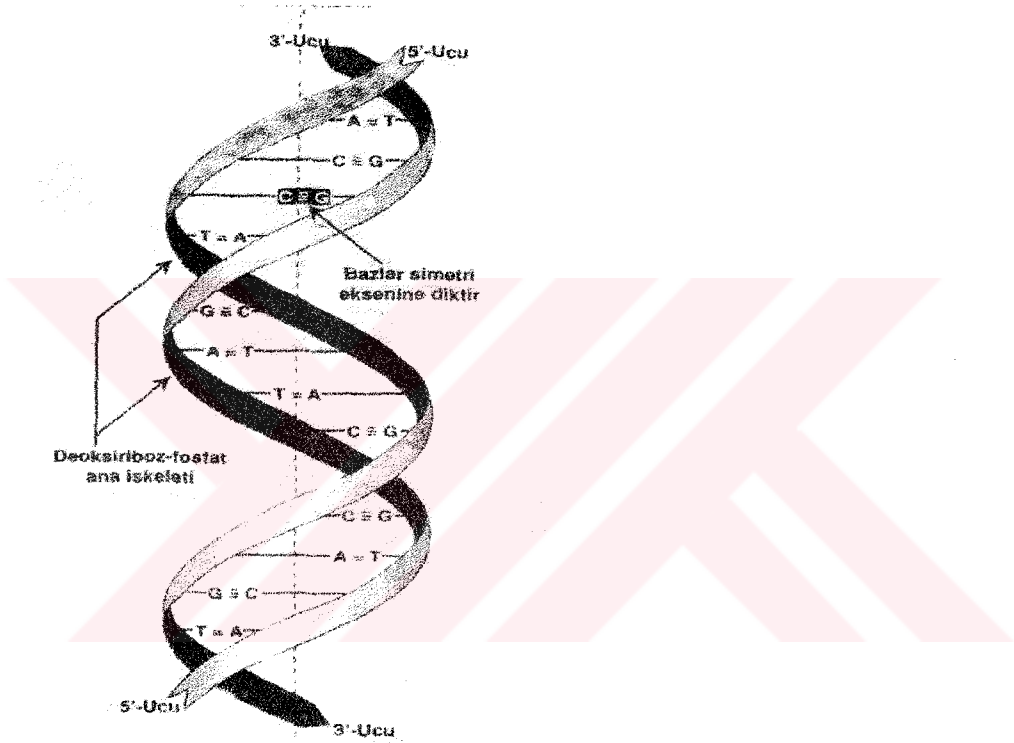
Şekil 2.1. DNA'yı oluşturan nükleotid yapısına bir örnek¹⁵.

DNA'da 4 tip nükleotid bulunmaktadır: Adenin (A), guanin (G), sitozin (C), timin (T).

Çizelge 2.1. Nükleotidlerin listesi ¹⁵.

Nükleotid	Baz
Deoksiadenozinmonofosfat (dAMP)	Adenin
Deoksiguanozinmonofosfat (dGMP)	Guanin
Deoksisitidinmonofosfat (dCMP)	Sitozin
Deoksitimidinmonofosfat (dTMP)	Timin

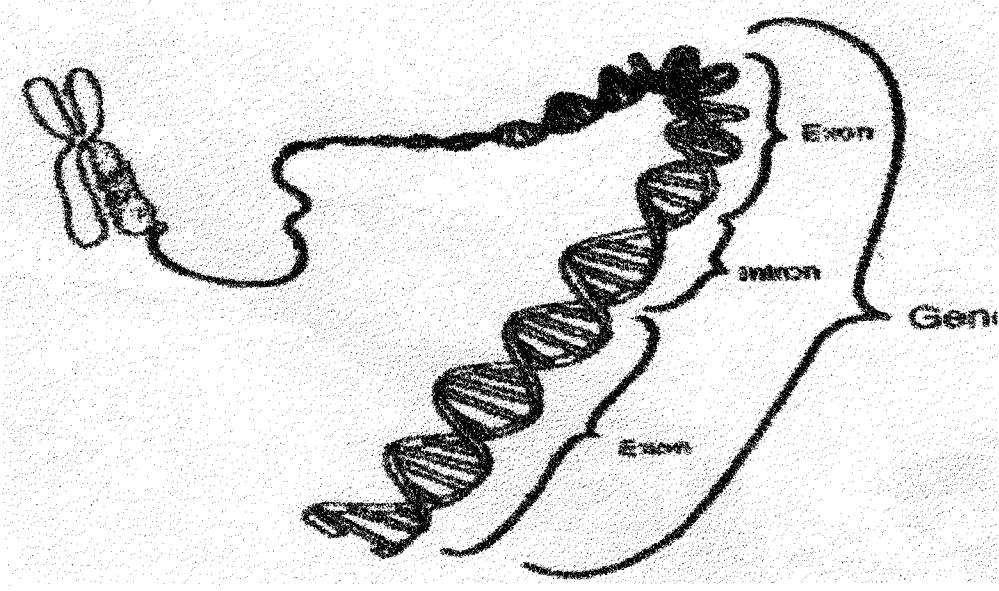
DNA molekülü çift sarmal yapıdadır. Bu yapı 1953'de Watson ve Crick tarafından keşfedilmiştir. 2 DNA iplikçığı birbirine purin ve pirimidinlerle hidrojen bağı ile bağlıdır. Nükleotidler birbirine fosfodiester bağı ile kovalent olarak bağlanırlar. A ve T birbirine 2 hidrojen bağı ile C ve G ise 3 hidrojen bağı ile bağlanmıştır. Zincirler birbiriyle antiparalel olarak eşleşirler; iplikciklerin birisi 5' fosfattan 3' hidroksile diğeri de 3' 5' yönünde uzanmaktadır¹ (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. DNA çift sarmalının yapısı.

Kromozomlar hücre çekirdeklerinde bulunurlar ve her bir nükleus kodlu bilgileri DNA formunda içerirler. İnsanlarda biri anneden biri babadan gelen 23 çift kromozom vardır¹⁶.

Genlerin üzerinde çok sayıda kodlanan ve kodlanmayan bölgeler vardır. Protein kodlamada görev alan bölgeler exon, protein kodlamada fonksiyonu olmayan bölgeler intron olarak adlandırılırlar¹ (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. DNA üzerinde exon ve intron görünümü¹⁷.

İnsan genomu 3 milyar bp (baz çifti) DNA içermektedir. Bunun içinden yaklaşık olarak 50000 genin kodlandığı tahmin edilmektedir. Her bir birey, bir tek gen için 2 farklı allelden daha fazlasına sahip olamaz. Genlerin multipl formları allel olarak adlandırılan birkaç farklı formda olmaktadır. Bu varyasyon genetik polimorfizm olarak adlandırılmaktadır¹.

2.2. Genetik Polimorfizm ve Adli Amaçlı DNA Tiplendirmesi

Adli Bilimlerde genetik polimorfizmin kullanımı yeni değildir. Geleneksel yöntemler kullanılarak antijen-antikor reaksiyonları (ABO ve Rh kan grubu sistemi gibi), HLA histokompatibilite antijenleri veya izoenzim ve proteinlerin elektroforetik ayrımı gibi analizler yapılmaktadır.

Son yıllardaki moleküler biyolojideki ilerlemeler, adli bilimlerde, DNA analizi uygulamalarının kullanılmasını sağlamıştır. Adli bilimlerde DNA analizlerinin kullanımı 1980'lerde Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ile spesifik problemlerin tayiniyle başlamıştır¹⁸. Southern transfer metodu 1985'de RFLP analizine adapte edilmiştir. Alec Jeffreys tarafından minisatellit lokus problemleri izole edilmiş, böylece bir multipl band DNA profili elde edilmiştir. Bu minisatellit bölgelerin, kişileri birbirinden ayırt etmede kullanılabileceği ve adli bilimlerde kimliklendirme ile paternite

olaylarında kullanılabileceği düşünölmüştür. Jeffreys'in multilokus sistemi, DNA parmakizi olarak adlandırılmaktadır¹⁹. 1986'da single lokus prob yöntemi geliştirilmiştir²⁰. Higuchi et all 1988'de yaptıkları bir çalışma ile tek bir kıldan polymerase chain reaction (PCR) ile polimorfik DNA sekansı tayinini yapmışlardır²¹. Fakat multi lokus sisteminde eski ve az miktarlardaki örneklerde sonuç alınamaması dezavantaj olarak görölmektedir. 1990'ların başında insan genomunda yüksek polimorfizm gösteren PCR ile çalışılabilen genetik markerlar saptanmıştır. PCR tekniğinin adli bilimlere adaptasyonu ile minimal miktarlardaki materyalden DNA amplifikasyonu yapılabilmektedir. PCR ile tesbit edilebilen genetik markerlar mikrosatellit veya short tandem repeat (STR) olarak bilinen DNA sekanslarıdır. STR'lar 3-5 bp uzunluğunda tekrar sekanslarıdır ve küçük bp uzunluklarından dolayı eski ve degrade örneklerde sonuç alınabilmektedir^{18,22}.

Araştırmacılar, insan genomunda 2500'den fazla polimorfik lokus identifiye etmişlerdir. DNA polimorfizmleri 2 ana grupta toplanmaktadır^{1,23,24}.

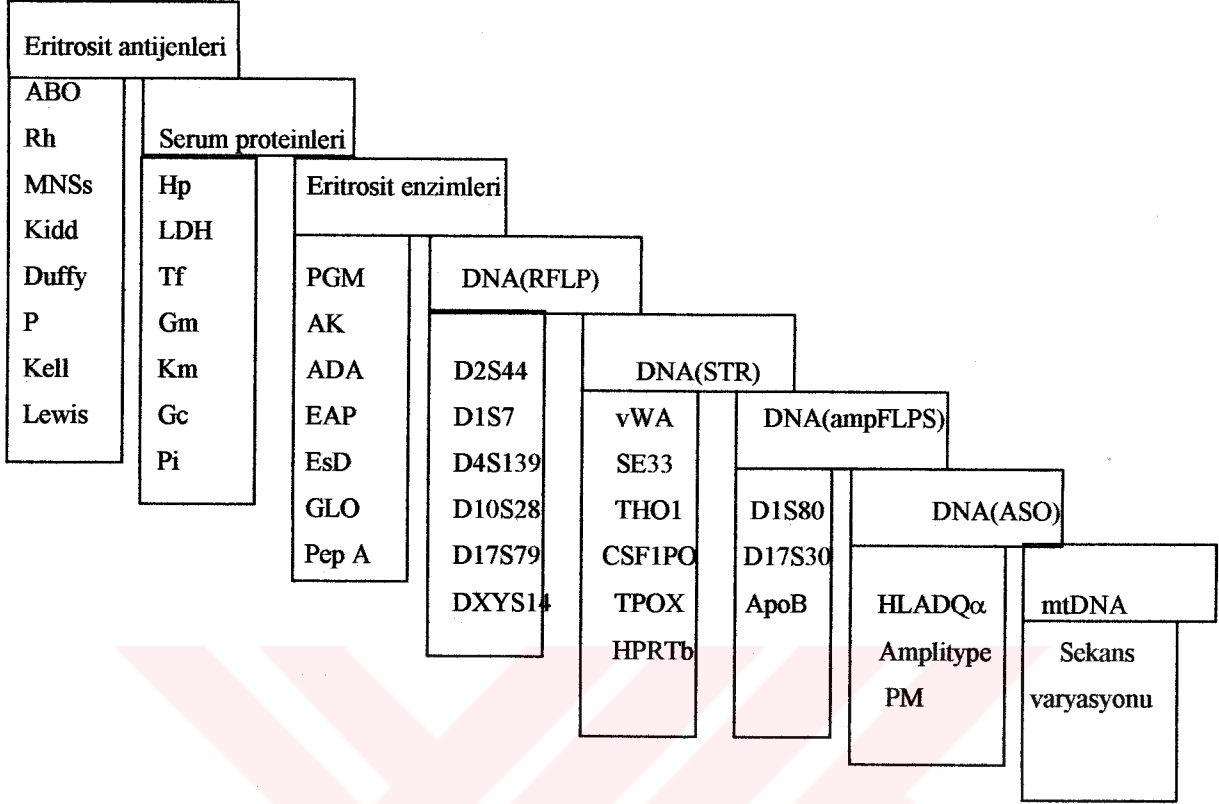
- Tek baz değışiklikleri,
- Mini satellit sekansı (değışen sayıda ardarda tekrarlayan dizilimler- variable number of tandem repeats (VNTR)-),

Tek baz değışikliklerine bağı polimorfizmler; delesyon, insersiyon veya nokta mutasyonlarıyla bir nükleotidin yer değıştirmesi ile olmaktadır.

Adli seroloji ve Hemogenetikte, rutin uygulamalarda kullanılan genetik markerlar²⁵:

- a- Konvansiyonel markerlar: Selöler antijenler, serum proteinleri, eritrosit enzimleri.
- b- DNA markerları: RFLP, STR, AmpFLP, allel spesifik oligonökleotidler (ASO), mitokondrial DNA (mtDNA).

Çizelge 2.2. Adli seroloji ve Hemogenetikte kullanılan markerlara örnekler ²⁵.



2.3. HLA Kompleksi

Doku uygunluk antijenleri, doku veya organ transplantasyonlarında doku atılım reaksiyonlarına ve immün sistemde hücreler arası tanıma olaylarında rol oynarlar. Doku uygunluk antijenleri, genomun belirli bir bölgesindeki genler tarafından yönetilir. Bu gen bölgesine, büyük doku uygunluk kompleksi (MHC) gen bölgesi adı verilir. 6. kromozomda lokalize olan bu genlere HLA adı verilmektedir ²⁶⁻²⁸. Doku uygunluk antijenleri Mendel kurallarına göre geçmektedir. Anneden ve babadan gelen haplotipler, kromozomda allel genleri oluşturmaktadırlar. Bu allel genler ko-dominant olup her ikisi de fenotipte görünürler. MHC antijenlerindeki farklılık allel genlerin farklılığından oluşmaktadır. HLA fetüste, 6. haftadan itibaren oluşmaktadır ²⁹.

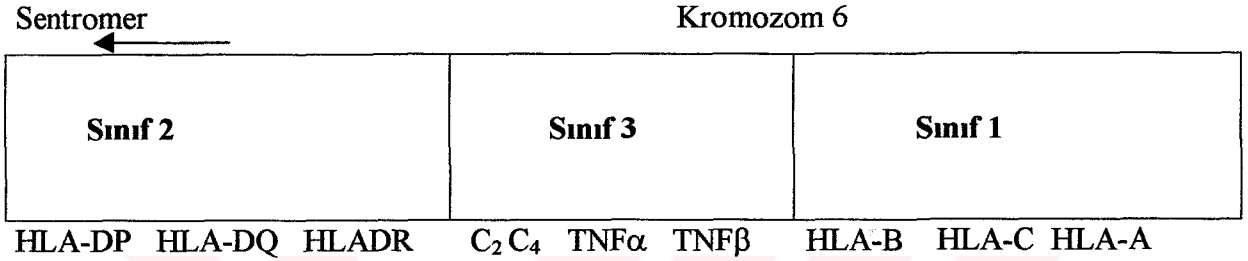
HLA klinik uygulamalarda oldukça önemlidir. Özellikle;

- Kemik iliği ve organ transplantasyonlarında donör-alıcı uygunluğunu araştırmada,
- Trombositopenik hastalarda donör uygunluğunu araştırmada,
- HLA ilişkili hastalıkların genetik analizinde,
- Antropolojik araştırmalarda toplumların kökleri ve göçleri ile ilgili çalışmalarda,

- Adli incelemelerde, özellikle paternite araştırmalarında HLA ile ilgili testler sıklıkla yapılmaktadır^{29,30}.

2.3.1. HLA Kompleksinin Genetik Organizasyonu

HLA genetik kompleksi, 6. kromozomun kısa kolunda (6p21.3) lokalize olmuştur. 100'den fazla gen içermektedir. Kompleks 4 majör genden oluşmaktadır; HLA A, HLA B, HLA C ve HLA D^{27,28}. Şekil 2.4'de HLA antijen sistemi görülmekte.

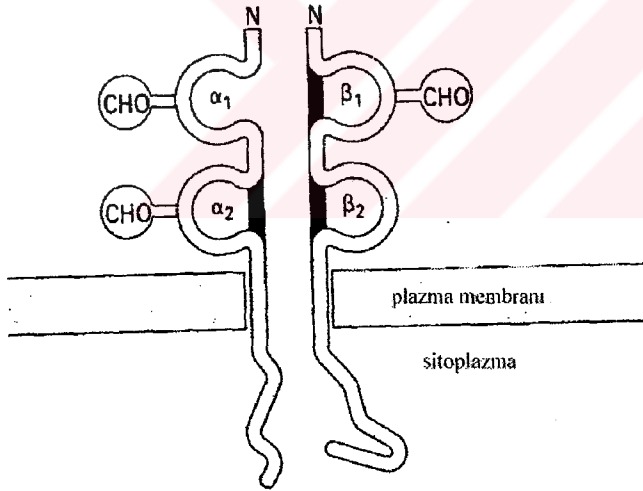


Şekil 2.4. HLA antijen sistemi (MHC gen bölgesi).

HLA genleri 3 grupta toplanmaktadır;

- 1- Sınıf I antijenleri: Klasik doku uygunluk kompleksini oluşturan bu genler; HLA-A,B,C lokusları ile nonklasik sınıf I genleri olan HLA -E, -F, -G, birkaç psödogen ve diğer fonksiyonu tanımlanmamış genleri içerir. Bu grup antijenler bir ağır α zinciri ve bir hafif β zincirinin nonkovalant bağlanmasıyla oluşan heterodimerlerdir. α zinciri HLA genlerinde polimorfik glikoproteinleri kodlamaktadır. Bir NH₂-terminal ekstra seller hidrofilik bölge, bir hidrofobik transmembran bölge ve bir hidrofilik intraselüler bölge, COOH- ucundan oluşur. α zinciri birbirlerine disülfid bağıyla bağlı α_1 , α_2 , α_3 zincirlerinden oluşmaktadır. β zinciri β_2 mikroglobuline homologdur^{29,31}. Molekln N ucunda α_1 ve α_2 birimlerindeki aminoasit (aa) sıralanmalarındaki farklılıklar genetik çeşitliliği yani polimorfizmi oluşturur. Hücrelerdeki makrofajlar ve T lenfositlerin immünolojik fonksiyonlarından dolayı Sınıf I molekülleri serolojik olarak tesbit edilebilmektedirler^{29,31}.
- 2- Sınıf II antijenleri: Bu grup HLA DR, DQ ve DP lokuslarını içermektedir. Bu antijenler ilk tanımlandıklarında HLA-D olarak adlandırılmışlar, daha sonra farklı antijenler bulununca D ile ilgili anlamında HLA-DR (D related) olarak, alfabetik uyum açısından da bu bölgedeki diğer farklı antijenlerde HLADQ ve HLADP olarak

adlandırılmışlardır. Sınıf II molekülü hücre membranı boyunca uzanan 2 polipeptid zincir (α ve β) içermektedir. Bu grup antijenler, Sınıf I'den farklı olarak ekstraselüler bölgesinde α zinciri sadece 2 bölüm (α_1 , α_2) içermektedir (Şekil 2.4). Peptid haritalama çalışmaları Sınıf II molekülündeki β hafif zincirinin α ağır zincirinden daha polimorfik olduğunu göstermiştir^{29,31}. Sınıf II antijenleri mixed lenfosit reaksiyonu (MLR), primed lenfosit test (PLT) ve serolojik tekniklerle tanımlanabilmektedirler. Sınıf I ve Sınıf II moleküllerinin fonksiyonu T hücrelerinde bulunan ve protein antijenlerinin intraselüler degradasyonu ile açığa çıkan peptid fragmentlerini bağlamaktır. Sınıf I ve Sınıf II protein molekülleri birbirleriyle ortak paylaştıkları aminoasit sekanslarıyla benzerlik göstermektedirler. Bununla birlikte molekülün küçük segmentlerindeki aminoasit rezidülerinde farklılıklar vardır. Bu bölgeler HLA moleküllerinde ve antijen özelliklerinde kişisel çeşitliliği (polimorfizm) oluşturmaktadır³² (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. HLA Sınıf 2 antijeninin yapısı³².

3- Sınıf III antijenleri: Bir dizi suda çözümlü protein kodlayan genler dizisinden oluşan gruptur. C2, C4, 21-OH, faktör B, tümör nekrozis faktör (TNF), heat shock protein (Hsp 70) genlerini içermektedir^{15,30,31,33}.

Sınıf II gen grubu içinde olan DQ antijeninin alfa alt ünitesini kodlayan gen (HLADQA1) çok yüksek polimorfizm göstermektedir. DNA düzeyinde DQ alt bölgesi

2 çift A ve B geni içerir. DQA2 ve DQB2 olarak bildirilen çift psödogen olup ürün kodlamaz. Diğer çift DQA1 ve DQB1'dir ve DQ $\alpha\beta$ molekülünün sentezini sağlar.

HLADQA1 lokusunda yaygın olarak gözlenen 4 majör allel (1, 2, 3, 4) ile 1 ve 4 allellerinin subtipleri (1.1, 1.2, 1.3, 4.1, 4.2, 4.3) olmak üzere toplam 8 allel tanımlanmıştır. Bu alleller 242 bp'lik bölgede (2 ve 4 allelleri 239 bp'de) lokalize olmuştur. Popülasyon çalışmalarında 21 farklı genotip tespit edilmiştir³⁴⁻³⁶.

HLA genleri bir set sıkıca bağlı kodominant (her haplotipin tümüyle ifade olması) olarak kalıtılan bir grup içermektedir. Buradaki sıkı bağlantılı deyimini, bu bölgede çok seyrek rekombinasyon olur anlamındadır. Bu grup genler, haplotipler olarak adlandırılmaktadırlar. Her bir birey bir maternal bir paternal HLA haplotipi içermektedir. İki kardeşin aynı haplotipe sahip olma şansı %25'tir²⁶.

HLADQ lokusunun ikinci exonunda lokalize olan allelik çeşitlilik ile oluşan genetik polimorfizm, PCR amplifikasyonu ve allel spesifik oligonükleotid (ASO) problemlerinin hibridizasyonu ile analiz edilebilmektedir³⁷.

2.3.2. İsimlendirme

MHC'deki antijen, gen, lokus ve allellerin terminolojisi Dünya Sağlık Örgütü (WHO) HLA isimlendirme komitesi tarafından standardize edilmektedir. Tanımlanan yeni genler, alleller ve serolojik özellikleri bu komite tarafından rapor edilmektedir. Sınıf I ve Sınıf II genlerinin en son rapor edilen allel sayısı 900'dür³⁸.

İsimlendirmede A ve B harfleri α ve β zincirlerini ifade etmektedir. A ve B'yi takip eden sayı, lokustaki α veya β zincirlerinin sayısını göstermektedir. Örneğin DQA1, DQB1, DQA2, DQB2.

WHO HLA isimlendirme komitesi 1990 yılında HLA isimlendirmesini değiştirmiştir. DQ α lokusu DQA1 olarak bilinmektedir. D α olarak bilinen homolog lokus DQA2 olarak isimlendirilmiştir. Eski lokus düzeni (DQA1) ise değiştirilmemiştir³⁸. WHO tarafından düzenlenen isimlendirme çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. WHO isimlendirmesi ³⁹.

Allel	WHO isimlendirmesi
1.1	0101
1.2	0102
1.3	0103
2	0201
3	0301
4.1	0501
4.2	0401
4.3	0601

2. 4. PolyMarker Sistemi (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC)

2. 4. 1. **LDLR:** Düşük dansiteli lipoprotein reseptörü olarak bilinen gen 19. Kromozomun kısa kolunda (19p13.1-13.3) lokalize olmuştur. LDLR, 839 aa'den oluşan bir transmembran glikoproteinidir ve LDL (low density lipoprotein) taşınmasında görev alır. LDLR kolesterol homeostazisinde önemli bir rol oynamaktadır⁴⁰. 45 kb uzunluğundadır ve 6 fonksiyonel proteini kodlayan 18 exon içerir (Şekil 2.6)⁴¹⁻⁴⁴. Bunlar:

- Exon 1: İşaret (signal) sekansı,
- Exon 2-6: Bağlayıcı bağlar (ligand binding domain) sekansı,
- Exon 7-14: Epidermal growth factor (EGF) precursor homolog sekansı ,
- Exon 15: O-bağlı şeker sekansı,
- Exon16+ exon 17'nin 5' ucu: Transmembran sekansı,
- Exon 17'nin 3' ucu + Exon 18: Sitoplazmik sekans.

LDLR genindeki bir mutasyon ailesel hiperkolesterolemi (Familial hypercholesterolemia (FH)) hastalığına neden olmaktadır. Bu mutasyon ilk defa 1973'de tanımlanmıştır. FH klinik olarak plazma LDL-kolesterol konsantrasyonunun yükselmesi, ksantoma, arkus kornea ve erken koroner kalp hastalığı ile karakterize otozomal dominant kalıtsal hastalıklardan bir tanesidir⁴⁵⁻⁵⁰.

Günümüze kadar LDLR geninde 920 mutasyon tesbit edilmiştir. cDNA seviyesinde mutasyonların 840 tanesi nokta mutasyonudur ve dağılımı şu şekildedir; 610 yer

değiştirme, 121 küçük delesyonlar, 53 küçük insersiyonlar veya duplikasyonlar. Protein düzeyindeki mutasyonların dağılımı ise şu şekildedir; 507 missense mutasyon, 103 nonsense mutasyon, 139 premature stop kodons, 35 sınırlı aa delesyon veya insersiyonu. Promoterde sadece 7 mutasyon (%1) bulunmuştur⁵¹. LDLR genindeki mutasyonlar 5 sınıfa ayrılmıştır. Bunlar:

Sınıf 1: Mutasyonlar endoplazmik retikulumda reseptör sentezini bozmaktadır.

Sınıf 2: Mutasyonlar golgi kompleksinde transportu engellerler.

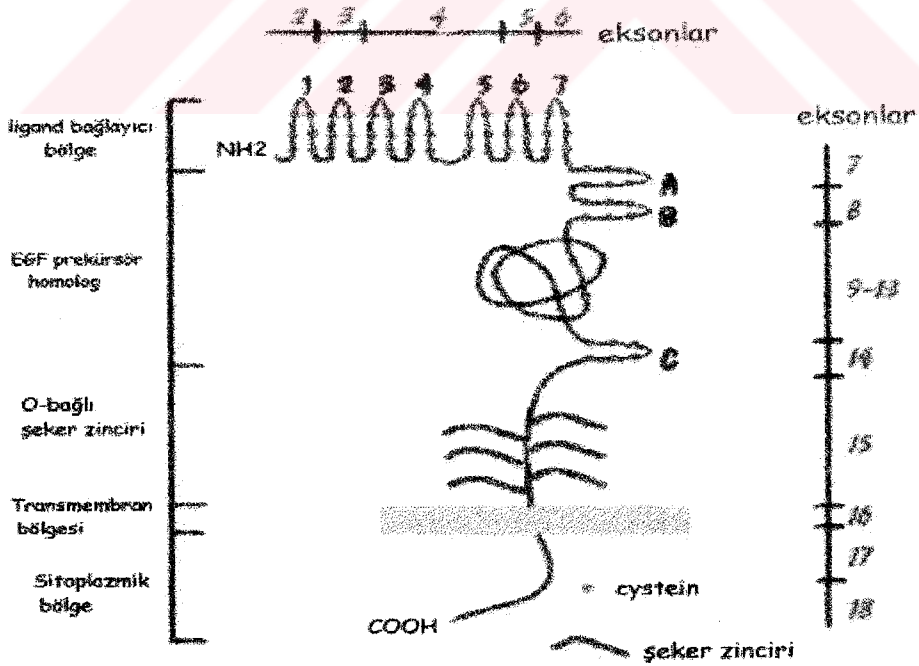
Sınıf 3: Mutasyonlar hücre yüzeyine taşınan protein üretilmesini engellemezler, fakat LDL'ye bağlanmayı engellerler.

Sınıf 4: Mutasyon sonucu meydana gelen proteinler hücrelerdeki LDL'ye bağlanmazlar.

Sınıf 5: Mutasyonlar endozomdaki bağlar ve reseptör ilişkili asite bağlı ilişkiyi engellerler.

LDLR'nin polimorfik özellik gösteren 2 alleli tanımlanmıştır; allel -A ve allel -B

41

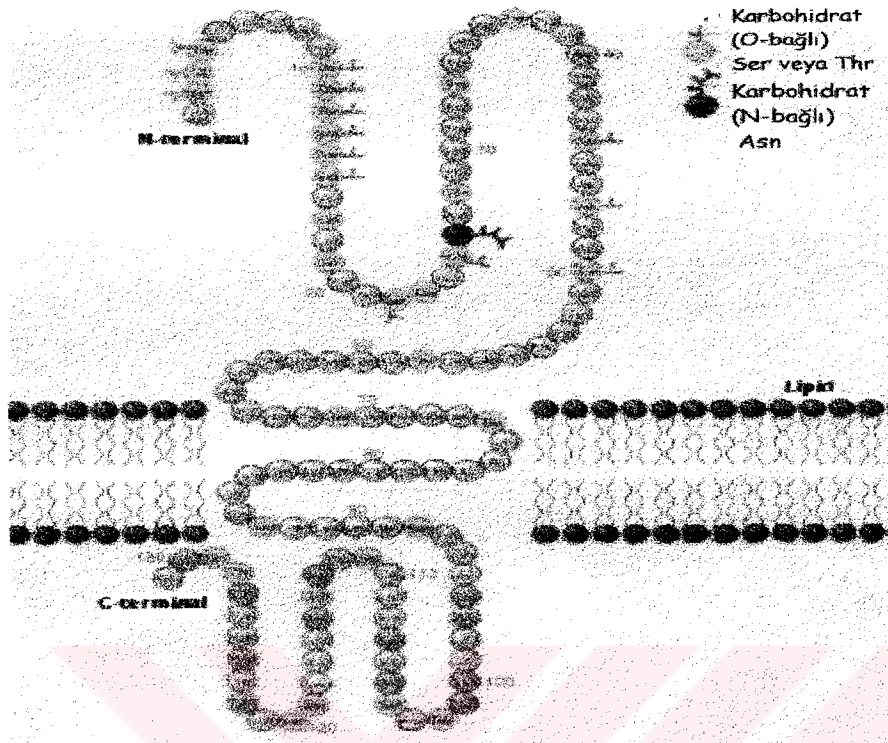


Şekil 2.6. LDLR'nin yapısı⁴².

2. 4. 2. GYPA: Glikoproteinler olarak adlandırılan ve glikoproteinden zengin 4 sialik asitten (Glikoprotein A, B, C ve D) oluşan proteinler grubu total eritrosit membran proteinlerinin yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. Yapısındaki yüksek derecede glikozilasyondan dolayı GYPA eritrositlerdeki sialik asitin yaklaşık %70'ini taşımaktadır. Glikoprotein B ve C 72 ve 128 rezidüden oluşan farklı polipeptidler içermektedirler. 4. kromozomda q28-31 bandında lokalize olan GYPA 131 aa rezidüsünden oluşmaktadır ve MN kan grup antijenleri, peptid antijenleri ve karbohidrat antijenlerini taşımaktadır. Polimorfik farklılık birinci ve beşinci aminoasitlerdeki değişiklikten (M, Ser¹ Gly⁵; N, Leu¹ Glu⁵) dolayı oluşmaktadır (Şekil 2.7)⁵²⁻⁵⁴.

GYPA lokusunun analizi sadece adli amaçlı çalışmalar ve antropolojik araştırmalarda değil, klinik tanı ve özellikle moleküler gelişim genetiğinde de önemlidir. Yapılan araştırmalarda ataksi telenjektazi, paroksimal nokturnal hemoglobinüri, hematolojik proliferatif hastalık, aplastik anemi hastalarında ve kanser kemoterapisi ve radyoterapisi alan hastalarda GYPA lokusunda somatik mutasyonlar tesbit edilmiştir⁵³.

GYPA lokusunda Afrika kökenli Amerikalı popülasyonunda görülen A' alleli ile birlikte toplam 3 alleli vardır. Fakat, striplerde ayırımı yapılamadığından 2 allel tanımlanmıştır; -A ve -B^{30,55-58}.



Şekil 2.7. GYPA'nın yapısı⁵⁹.

2. 4. 3. HBGG: Hemoglobin (hb), eritrositlerde bulunan ve demir içeren bir proteindir. Görevi akciğer ve diğer organlar arasında oksijen taşımaktır. Hemoglobin molekülü, hem grubu taşıyan birbirlerine nonkovalent 2 polipeptid zincir içerir; α zinciri ve non α zincir (β , γ , δ)^{60,61}.

a- α zinciri: α zincir oluşumu embriyogenezin erken döneminde tamamlanmaktadır. α zincir 141 aa rezidüsü içermektedir.

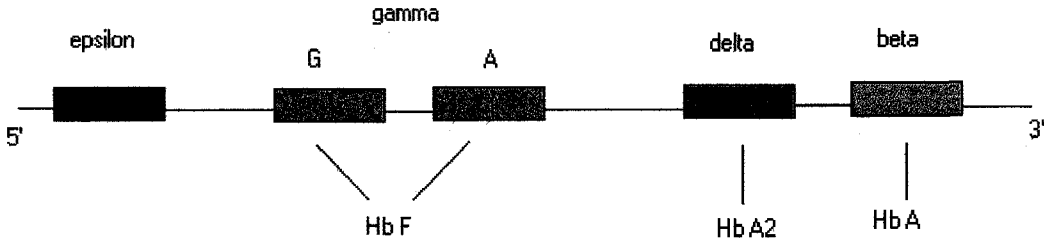
b- Non α zinciri (β , γ , δ): Non α zincirlerinin herbiri 146 aa rezidüsü içermektedir.

- β zinciri normal erişkin hb'de (HbA ($\alpha_2\beta_2$)) bulunmaktadır.
- γ zinciri fetal hb'i (HbF ($\alpha_2\gamma_2$)) oluşturur. HbF'nin γ zinciri β zincirinden 39 aa rezidüsü ile farklıdır.
- δ zinciri HbA₂ (HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$)) oluşturur.

HBGG 11. Kromozom üzerinde lokalize olmuştur. 5 tane beta like globin gen kodlayan bölge içerir:

5'-epsilon-G-gamma-A-gamma-delta-beta-3'. Şekil 2.8'de beta globin geni gösterilmektedir⁶².

HBGG lokusunun 3 alleli tanımlanmıştır, allel -A, allel -B, allel -C.



Şekil 2.8. Kromozom 11 üzerindeki beta globin geni⁶².

2. 4. 4. D7S8: D7S8 lokusu 7. kromozom üzerinde (7q22-q31.1) lokalize olmuştur. 7. kromozomun yaklaşık 3000-3500 gen içerdiği ve 25'den fazla hastalık geninin lokalize olduğu belirtilmektedir. D7S8 bölgesi özellikle prenatal tanıda sıklıkla tercih edilen bir markerdir. Bu kromozom üzerindeki bir mutasyon, kistik fibrozis denilen otozomal resesif bir hastalığa neden olmaktadır. Bu hastalıkta klor iyonlarının transportundaki defekt ile özellikle akciğer ve pankreas sekresyonları koyulaşır⁶³.

D7S8'in allel -A ve allel -B olarak bilinen 2 alleli tanımlanmıştır.

2. 4. 5. GC: Serum alfa-2-globulin olarak adlandırılan GC'nin polimorfik özelliği ilk defa 1959'da Hirschfeld tarafından tanımlanmıştır. Aynı yıl, plazma proteinlerinden vitamin D bağlayan alfa- globulinin de tanımlanmasıyla, bu 2 proteinin aynı olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle grup spesifik komponentleri vitamin D bağlayan protein olarak da bilinmektedir. Grup spesifik komponentleri, 4. Kromozom üzerinde (4q11-q13) albumin ve alfa-fetoprotein genleri ile birlikte lokalize olmuştur. GC geni 13 ekson içermektedir. GC'nin 3 alleli tanımlanmıştır; -A, -B, -C⁶⁴⁻⁶⁸.

Çizelge 2.4'de HLADQA1 ve PM lokuslarının kromozomal lokalizasyonu, PCR ürününün büyüklüğü ve 6 lokusun her birinin allel sayısı gösterilmektedir³⁹.

Çizelge 2.4. HLADQA1 ve PM lokuslarının kromozomal lokasyonu⁵⁸.

	Kromozomal Yerleşim	PCR ürünü (bp)	Alleller
HLADQA1	6p21.3	239-242	7
LDLR	19p13.3	214	2
GYPA	4q28- q31	190	2
HBGG	11p15.5	172	3
D7S8	7q22-q31.1	151	2
GC	4q11-q13	138	3

2. 5. Tiplendirmede Kullanılan Yöntemler

2. 5. 1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

Polimeraz zincir reaksiyonu, kısa bir tanımla hedef gen dizisinin çoğaltılmasıdır.

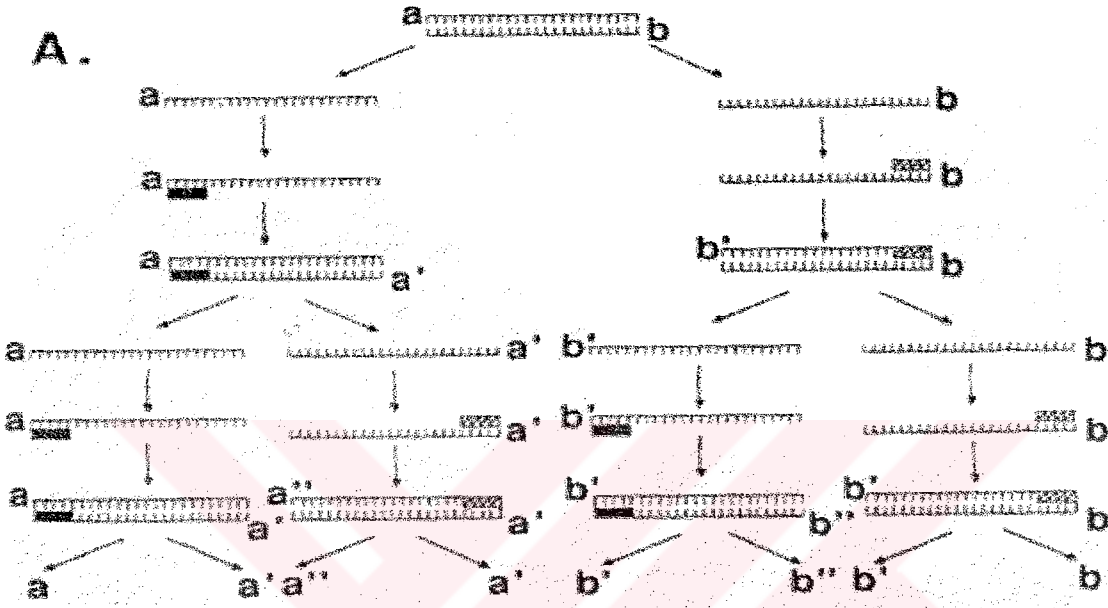
1985’de Saiki et all tarafından bulunmasından itibaren Adli Bilimlerde oldukça sık kullanılan bir yöntem olmuştur. 3 basamaktan oluşmaktadır:

- Denatürasyon; DNA çift iplikliğinin 90-95°C’de ısı ile denatüre olarak birbirinden ayrılması,
- Primer annealing; Primerlerin 54-55°C’de templat DNA’ya yapışması,
- Uzama; DNA polimeraz enzim yardımıyla templat DNA’ya komplementer olarak uzaması (72-75°C’de)^{1,25,69,70}.

Bu işlem 20-30 kez tekrar eder. Tüm döngülerin tamamlanmasından sonra milyonlarca kopya oluşur (Şekil.2.9)³⁸.

PCR’in etkisi Taq polimeraz ile kuvvetlendirilmektedir. Taq polimeraz *Thermus aquaticus*’tan elde edilmektedir. Düşük hata oranı elde etmek için 10.000 nükleotid de bir konudur. PCR için 25 ng insan DNA’sı yeterlidir.

PCR ile çok az miktarlarda veya degrade olmuş, fiziksel ve çevresel etmenlere maruz kalmış, eski örneklerde de sonuç alınabilmektedir. Ayrıca PCR, hedef dizinin istenilen miktarlarda çoğaltılabilmesi nedeniyle adli bilimlerde tercih nedeni olmaktadır^{1,71-73}.



Şekil 2.9. PCR'in şematik sunumu⁷⁴.

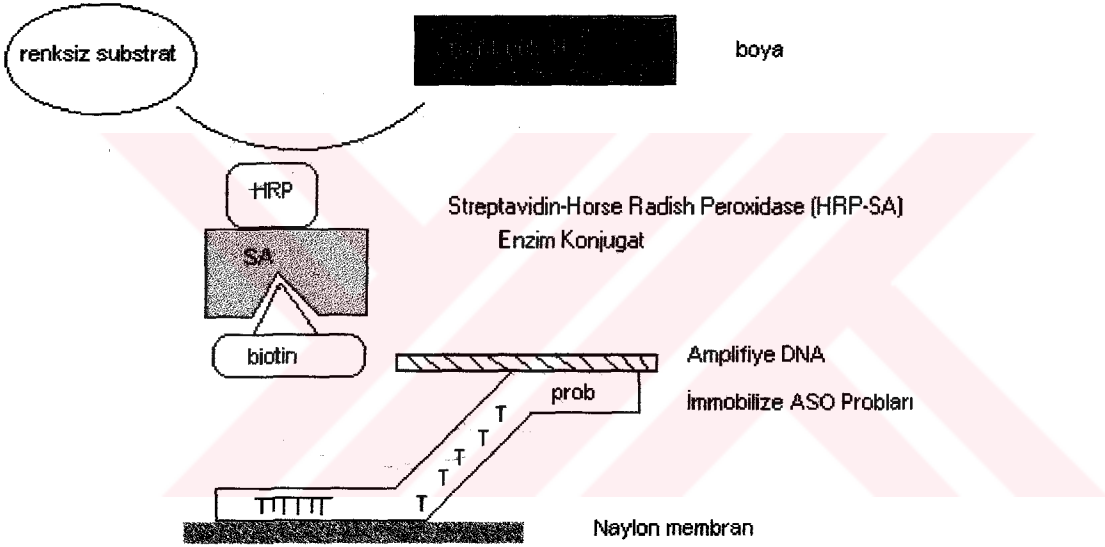
2. 5. 2. Allele Özgü Oligonükleotid Hibridizasyonu (ASO):

Allele özgü oligonükleotid problemlerle hibridizasyon single baz mutasyonlarıyla oluşan sickle cell anemi, α -1 antitripsin noksanlığı ve β talasemi gibi genetik hastalıkların analizinde ve polimorfizmlerin tayininde oldukça sık kullanılmaktadır^{37,64}. Bu yöntemle, HLA-DQA1 ve PM sistemleri tanımlanabilmektedir. ASO sadece eşleşmesi gereken dizine yapışmaktadır. Yöntemin duyarlılığını, özgünlüğünü ve basitliğini arttırmak için hibridizasyondan önce çalışılan lokusların özgün bölgesini enzim kullanarak çoğaltabilmek amacıyla PCR kullanılmaktadır.

PCR'a dayalı olarak yapılan ASO hibridizasyonunda örnekteki hedef dizin çoğaltılarak test edilmektedir. Allele özgü oligonükleotidler naylon membran üzerine immobilize edilmektedir. Membran üzerine sabitleştirilmiş ASO problemleri ile çoğaltılan PCR ürünleri hibridize edildikten sonra streptavidin horseradish peroksidaz konjuge

biotin ile işaretli PCR ürünlerine bağlanır. Oluşan renksiz kompleksin kromojen solüsyonu muamelesi ile ilgili alleler mavi renge dönüşmektedir (Şekil 2.10)^{1,69,70}.

Dotlarda görülen renk değişikliği lokusların allel sayısını göstermektedir. HLADQA1’de 1 dotunda renk değişikliği varsa 1 alelli, 2 dotunda varsa 2 alelli olduğunu göstermektedir. 1.1, 1.2, 1.3 subtipleri de 1 allelinin içindeki varyasyonları göstermektedir. Amplifiye DNA striplerdeki blotlara bağlanır. Her bir prob blot strip üzerinde spesifik bir dot da bulunur. Bu nedenle, bu yönteme dot-blot yöntemi denilmektedir.



Şekil 2.10. ASO ile hibridizasyonun şematize edilmesi²⁵.

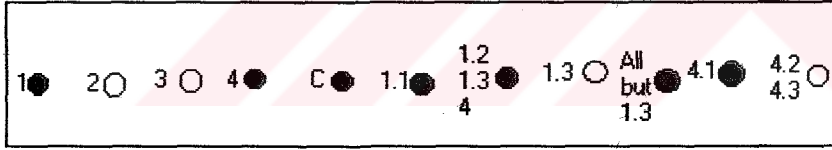
2. 6. Striplerdeki Sonuçların yorumlanması:

AmpliType PM+DQA1 stripleri üzerindeki noktaların mavi renk olması örneklerin içindeki PM ve DQA1 allellerini göstermektedir. Prob striplerin üzerindeki S ve C noktaları kontrol noktalarıdır. Hibridizasyonun sonunda S ve C noktalarının mavi renk olması gerekmektedir. Eğer S ve C noktaları mavi renge dönüşmemişlerse deneyin tekrarlanması gerekmektedir. Strip üzerindeki diğer noktaların da S ve C noktalarından daha koyu mavi renkte olmaları gerekmektedir. S ve C noktalarından daha açık renkte mavi renk oluşumu ise DNA kontaminasyonunu veya fazla miktardaki

DNA nedeniyle cross hibridizasyon meydana geldiğini göstermektedir. Eğer S ve C noktalarında mavi renk oluşmamışsa diğer lokusların tiplendirilmesi yapılamaz.

AmpliType HLADQA1 DNA prob striplerindeki noktalar ve gösterdikleri alleler:

- 1 noktasındaki pozitiflik HLADQA1 1.1, 1.2 ve 1.3 allelerinin varlığını gösterir
- 2 noktasındaki pozitiflik sadece HLADQA1 2 allelinin varlığını gösterir,
- 3 noktasındaki pozitiflik sadece HLADQA1 3 allelinin varlığını gösterir,
- 4 noktasındaki pozitiflik HLADQA1 4.1, 4.2 ve 4.3 allelerinin varlığını gösterir,
- 1.1 noktasındaki pozitiflik sadece HLADQA1 1.1 allelinin varlığını gösterir,
- 1.2, 1.3, 4 noktasındaki pozitiflik HLADQA1 1.2, 1.3, 4.1, 4.2 ve 4.3 allellerinin varlığını gösterir,
- 1.3 noktasındaki pozitiflik sadece HLADQA1 1.3 allelinin varlığını gösterir,
- All but 1.3 noktasındaki pozitiflik HLADQA1 1.3 allelinin haricindeki allellerin varlığını gösterir. Bu prob 1.2, 1.3 genotipini 1.3, 1.3 genotipinden ayırmaya yaramaktadır.
- 4.1 noktasındaki pozitiflik sadece HLADQA1 4.1 allelinin varlığını gösterir,
- 4.2, 4.3 noktasındaki pozitiflik HLADQA1 4.2 ve 4.3 allellerinin varlığını gösterir³⁹.



HLADQA1 1.1, 4.1

Şekil 2.11.a. HLADQA1 1.1, 4.1.

AmpliType PM DNA prob stiplerinin üzerindeki noktalar ve gösterdikleri alleler:

- A noktasındaki pozitiflik her bir lokustaki A allelinin varlığını gösterir,
- B noktasındaki pozitiflik her bir lokustaki B allelinin varlığını gösterir,
- C noktasındaki pozitiflik HBGG ve GC lokuslarındaki C allelinin varlığını gösterir.

LDLR, GYPA ve D7S8 için 3 genotip olasıdır; AA, BB ve AB.

HBGG ve GC için ise 6 genotip olasıdır; AA, BB, CC, AB, AC ve BC³⁹.

S ●	LDLR A ○ B ●	GYP A A ● B ●	HBGG A ● B ○ C ●	D7S8 A ● B ●	GC A ○ B ● C ○
-----	-----------------	------------------	---------------------	-----------------	-------------------

LDLR BB, GYP A AB, HBGG AC, D7S8 AB, GC BB

Şekil 2.11.b. LDLR BB, GYP A AB, HBGG AC, D7S8 AB, GC BB.

2. 7. AmpliType PM+HLADQA1 Sistemlerinin Adli Amaçlı Kullanımı

HLADQA1 ve polymarkerlar çeşitli vücut doku ve sıvılarında (kan, kan lekesi, tükürük, semen, vaginal sekresyon, kemik, kıl, vb) gösterilebilmektedir⁷⁶.

- Olumsuz çevre şartlarına, uzun süreli güneş ışığı, mikroorganizmalar, evdeki kimyasallar, vb maruz bırakılmış kan lekelerinden AmpliType sistemleri ile sonuç alınabilmektedir⁷⁷. Mizuno et all tarafından yapılan bir çalışmada, 22 yıl oda ısısında saklanan kan lekelerinden tiplendirme yapılabildiği rapor edilmiştir⁷⁸.

- Semen ve vaginal sürüntü örnekleri: Roy ve Reynolds tarafından yapılan bir çalışmada 17 aylık semen smear, pap smear ve postkoital örneklerden HLADQA1 ve PM tiplendirmesi yapılabildiği rapor edilmiştir. Semen-vaginal sekresyon, semen-tükürük, semen - kan, semen - idrar, semen – kan - vaginal sekresyon gibi karışmış örneklerde de reverse-dot blot ile tiplendirme yapılabilmektedir^{76,79}.

- İdrarda yapılan çalışmalar: İdrar adli amaçlı incelemelerde önemli olan eritrosit, lökosit, epitelyal hücreler gibi komponentleri içermektedir. Erkek idrarlarında bazen spermatozoaya da rastlanmaktadır. HLADQA1 ve PM tiplendirmelerinde daha önceki çalışmalarda yaklaşık 30mL idrar ile sonuç alınabilmekte iken, yeni geliştirilen yöntemlerle 1 mL idrar örneğinden tiplendirme yapılabildiği belirtilmektedir. Sodyum azid (%0.25), sodyum florid (%1'lik) gibi koruyucular eklenmiş idrar örnekleri +4°C ile -20°C'de 30 gün saklanabilmektedir. -80°C'de saklanan 6 aylık idrar örneklerinde tiplendirme yapılabildiği belirtilmektedir. Amplifiye örnekler tiplendirme yapılana kadar -70°C'de saklanması gerekmektedir. İdrardan izole edilen DNA örnekleri -20°C'de bir yıl saklanabilmektedir^{12,80,81}.

- Dişler ve iskelet kalıntıları: Uçak kazaları gibi toplu ölümlerde dişler, kemikler ve doku parçaları gibi insan kalıntılarında tiplendirme yapılabilmektedir. Postmortem dayanıklılığı nedeniyle de dişler ve kemikler adli amaçlı analizler için tercih edilen materyallerdendir. Tahir et all'un yaptıkları bir çalışmada, 27 yıl önce gömülen bir

kişinin cesedinden alınan kemik, diş ve tırnaktan DNA ekstrakte edilerek HLADQA1 ve PM tiplendirme yapılabildiği belirtilmektedir⁸²⁻⁸⁸.

- Kıl: Kıllar olay yerinde sıklıkla bulunan biyolojik materyallerdendir. Saklanması ve korunması diğer biyolojik örnekler göre daha sorunsuz olduğu için özellikle adli antropologlar tarafından da tercih edilmektedir. Tek bir kıl parçasından dahi HLADQA1 ve PM tiplendirmesi yapılabilmektedir^{21,89}.

- Fetal materyal: Prenatal tanı amaçlı çalışmalarda amniyosentez ve koryonik villus örnekleri kullanılmaktadır. Adli Bilimlerde de bu materyallerden kimliklendirme ve paternite amaçlı olarak yararlanılmaktadır. Ancak amniyosentez ve koryonik villus biyopsisi anne ve fetus için riskli olduğu için günümüzde non-invaziv tekniklerin arayışına gidilmiştir. Annenin periferik kanında rastlanan trofoblastlar, çekirdekli eritrositler, lenfositler ve granülositler gibi fetal hücreler bu amaçla araştırılmıştır. Çekirdekli eritrositler en çok tercih edilen fetal hücrelerdendir. Adli amaçlı çalışmalarda gestasyonun 13-36. hafta arası olan gebelerden alınan periferik kandan izole edilen çekirdekli eritrositlerden bebeğe ait HLADQA1 ve polymarker lokuslarının tiplendirilebileceği belirtilmektedir⁹⁰.

- Dokular: Formalin en sık kullanılan fiksatiflerdendir. Yapılan çalışmalarla formalinli ortamda amino grubuyla purin ve pirimidin bazları arasındaki metil köprülerinin etkilendiği bu nedenle çift iplikçikli DNA inhibe olacağı için DNA analizi yapılacak dokuların formalinli ortama konulmaması gerektiği, en uygun fiksatifin %95'lik etanol olduğu belirtilmektedir. DNA çalışmalarında fiksasyonun süresi çalışmaları etkilemektedir. Yapılacak DNA çalışmalarında formalinle fiksasyonun süresinin 3 günden az olması önerilmektedir. HLADQ α ve PM ile ilgili yapılan çalışmalarda formalinle fixe edilmiş dokular ve formalinle fikse edilip parafine gömülen dokularda tiplendirme yapılabildiği belirtilmektedir^{38,91-93}.

1900'lü yıllarda kan gruplaması ile başlayan çalışmalara polimorfik eritrosit enzimleri ve serum proteinleri eklenmiş, daha sonra da DNA çalışmalarına başlanmıştır. Yapılan çalışmalarla 2500'den fazla polimorfik lokus tesbit edilmiştir.

Lokusların adli etkinlik değerleri incelendiğinde HLADQA1 lokusu için ayırım gücü %92 olarak belirtilmektedir. Bu sonuçlar paternite ve kimliklendirme için bildirilen %90'ın üzerindeki ayırım gücüne ulaşıldığını göstermektedir. HLADQA1 ve

PM lokuslarının ayırım gücü kişilerin etnik kökenlerine göre %99.93-%99.98 olarak belirtilmektedir⁷².

AmpliType PM+HLADQ1 sistemlerinin deneysel ve adli olgu analizlerinde geçerliğini araştırmak amacıyla çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sonuçlar hızlı, kolay, güvenilir profillendirme yapılabildiğini ve bu altı sistemin kombinasyonu ile oluşturulan ayırım gücünün yüksek olduğunu göstermektedir. Ancak ayırım gücü, belirtilen lokusların ilgili popülasyonda yapılacak olan allel frekans dağılımlarının araştırılması sonucu hesaplanabilmektedir⁹⁴.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada; Çukurova Bölgesinde yaşayan, rastgele seçilen ve aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 100 sağlıklı gönüllü vericiden yazılı izin alınarak, HLADQA1 ve polymarker (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC) lokuslarının tiplendirilmeleri yapıldı.

Alınan venöz kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınarak saklandı. DNA ekstraksiyonunda ticari olarak elde edilen High Pure DNA Purification Kit (Roche) kullanıldı. %4'lük agaroz jelde kontrol edilen amplifikasyon ürünlerinin kit protokolüne uygun şekilde hibridizasyonu ve renklendirmesi gerçekleştirildi. Tiplendirme sonucunda da istatistiki hesaplamalar yapıldı. Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için SBE 2002- D24 no'lu proje ile Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nden parasal destek alındı.

Form 3.1'de Rıza ve Bilgilendirme Formu görülmektedir.

Form 3.1. Vericileri bilgilendirme ve rıza formu.

BİLGİLENDİRME FORMU

Bu çalışmanın amacı Çukurova Bölgesinde HLADQA1 ve polymarker (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC) lokuslarının allel frekans dağılımlarını ortaya koymaktır.

Gönüllü olarak katılacak kişilerden 2 cc venöz kan alınarak bu polimorfik sistemlerin allel fenotipleri belirlenecektir. Bu çalışmada elde edilecek bilgiler ile Çukurova Bölgesinde bu sistemlerin allel frekans dağılımları saptanabilecektir. Elde edilen sonuçlar Adli Tıp Anabilim Dalı'na yapılacak çalışmalarda kişilerin ad, soyad veya onları tanıtıcı herhangi bir işaret belirtilmeden veri olarak kullanılabilir. Sonuçlar çalışmaya katılan kişilere istedikleri takdirde yazılı olarak bildirilecektir.

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

RIZA FORMU

Aşağıda imzası bulunan ben Çukurova Bölgesinde HLADQA1 ve polymarker (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC) lokuslarının allel frekans dağılımları çalışması hakkında tam olarak bilgi aldım.

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

Gönüllünün Adı ve Soyadı:
Yaşı:

Tarih
İmza:

Bilgi için:
Ç.Ü. Tıp Fak. Adli Tıp ABD
Tif: 3386060/ 3429

3. 1. DeneYlerde Kullanılan Malzemeler:

3. 1. 1. DeneYlerde Kullanılan Araç ve Gereçler:

- Termocycler Cihazı: GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems,
- Santrifüj Cihazı: Dakikada maksimum 5500 devir hızına ulaşan, 12 tüpe uygun başlıklı, zaman ve hız ayar göstergeli santrifüj cihazı. Hettich Universal 30 F
- Mikrosantrifüj Cihazı: Eppendorf tüplerin santrifügasyonuna uygun rotor başlığı bulunan ve 15000 devir/dakika hıza ulaşabilen mikrosantrifüj cihazı. Hettich EBA12,
- Su Banyosu (Elektro mag KB6),
- Elektroforez Tankı (Maxicell EC360M),
- Güç Kaynağı (Bio-Rad, Power PAC 3000),
- UV Transilluminatör (Vilber Lourmat),
- Vortex (Elektro-mag M16),
- Çalkalayıcı (KS125 basic, IKA labortechnik),
- Analitik Terazi (Ohaus TP200S),
- Buzdolabı (AEG),
- Derin Dondurucu (Bosch GSD2616ID),
- PH Metre (Hanna HI9321),
- Etüv (Memmert),
- Eppendorf tüpleri: Isıya dayanıklı malzemedden yapılmış,0.5 mL, 1 mL ve 1.5 mL hacim kapasiteli,
- Pipet ucu: 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl'lik DNAs, RNAs free, steril filtreli pipet uçları,
- Mikropipet: Costar, pipetman,
- Tray

3. 1. 2. DeneYlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler:

- Proteinaz K (Boehringer 745723),
- Tris Baz [Tris(hydroxymethyl)aminomethane] (Sigma T-1503),
- Etilendiamintetraasetik asit dihidrat tuzu ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) (Sigma E-5134),
- Sodyum Klorür (NaCl) (Merck),

- Etidyum bromid (Merck 111608),
- Sodyum fosfat monobasic monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Merck 106345),
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck 822050),
- Borik Asit (Sigma B-0252),
- Bromfenol mavisi (3',3'',5',5''- tetrabromophenolsulfonephtalein) (Sigma B-8026),
- Sitrik asit monohidrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Sigma C 4540),
- Sodyum Hidroksit (NaOH) (Merck 6462),
- Agaroz (Merck 101236),
- Trisodyum sitrat, dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck 106432),
- Gliserol (%87'lik) (Merck 104091),
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck 8280),
- %35'lik Hidrojen peroksit (H_2O_2) (Merck 860010),
- İsopropanol (2-propanol) (Riedel-deHaën 24137),
- Etanol (%99.8'lik) (Riedel-deHaën 32221),
- AmpliType PM+HLADQA1 PCR Amplifikasyon ve Tiplendirme Kiti (Applied Biosystem, Roche),
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).

3. 1. 3. AmpliType PM+DQA1 PCR Amplifikasyon ve Tiplendirme Kitinin İçindekiler

- AmpliType PM PCR reaksiyon karışımı,
- AmpliType PM Primer Set,
- Kontrol DNA 1,
- AmpliType PM DNA Prob Stripleri,
- AmpliType HLADQA1 DNA Prob Stripleri,
- Enzim Konjugat: HRP-SA,
- Kromojen: TMB.

3. 1. 4. High Pure PCR Template Preparation Kitinin İçindekiler

- Proteinaz K,
- Binding tampon,

- Doku lize tamponu,
- İnhibitör removal tampon,
- Yıkama tamponu,
- Elüsyon tamponu,
- High Pure filtrelili tüpler,
- Deney tüpleri.

3. 2. Deneylerde Kullanılacak Solüsyonların Hazırlanması

3. 2. 1. Kıtte Bulunanların Hazırlanması:

- Kromojen: TMB (tetrametilbenzidin) solüsyonu: Buzdolabından çıkarılan kromojen oda ısısına getirildi. Üzerine saf etil alkolden 30 mL eklenerek iyice karıştırıldı. Hazırlanan solüsyon buzdolabında saklandı. (Saklama süresi:6 ay)
- AmpliType PM reaksiyon karışımı: Buzdolabında saklandı.

3. 2. 2. Kıtte Bulunmayanların Hazırlanması

3. 2. 2. 1. Sitrat Tamponu (0,1 M Sodyum Sitrat, pH 5.0 1 L):

18.4 gr Trisodyum sitrat dihydrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) üzerine 800 mL distile su eklenip karıştırıldı.

Yaklaşık 6 gr sitrik asit monohidrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ile pH 5'e ayarlanarak final hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. Solüsyon hazırlandıktan sonra otoklavlandı.

3. 2. 2. 2. 20xSSPE tamponu (3.6 M NaCl, 200 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 20 mM EDTA, pH:7.4, 1 L)

7.4 gr disodyum etilendiamintetraasetik asit dihidrat ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 800 mL distile suda çözüldü.

10 N sodyum hidroksit (NaOH) ile pH 6'ya ayarlandı.

210 gr NaCl ile 27.6 gr sodyum fosfat monobasic monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) eklendi.

10 N NaOH ile pH 7.4'e ayarlanarak final hacim 1 litreye tamamlandı.

3. 2. 2. 3. %20'lik Sodyum dodesil sülfat (SDS, 1 L) :

200 gr Ultrapure SDS ile

800 mL distile su karıştırılıp, 37°C'de su banyosunda eritilerek 1 litreye tamamlandı.

3. 2. 2. 4. Hibridizasyon solüsyonu (5xSSPE, %0.5 SDS 1 L):

250 mL 20xSSPE (bölüm 3. 2. 2. 2'de hazırlanan),
25 mL %20 SDS (bölüm 3. 2. 2. 3'de hazırlanan) ve
725 mL distile su karıştırıldı. 37°C'de etüvde saklandı.

3. 2. 2. 5. Yıkama solüsyonu (2.5xSSPE, %0.1 SDS, 2 L):

250 mL 20xSSPE (bölüm 3. 2. 2. 2'de hazırlanan) ile
10 mL %20 SDS (bölüm 3. 2. 2. 3'de hazırlanan),
1740 mL distile su eklenerek karıştırıldı. 37°C'de etüvde saklandı.

3. 2. 2. 6. %3'lük Hidrojen Peroksit (H₂O₂)(1 mL):

100 µL %30'luk H₂O₂ üzerine
900 µL distile su eklendi. Bu solüsyon ışıktan korunarak buzdolabında saklandı.

3. 2. 2. 7. 1 M Tris HCl (pH:8.0, 1 L)

121.1 gr Tris Baz,
800 mL distile su ile karıştırıldı.
Konsantre HCl ile pH 8'e ayarlanarak final hacim 1 L'ye tamamlandı.
Daha sonra solüsyon otoklavlanarak oda ısısında saklandı.

3. 2. 2. 8. 0.5 M EDTA (1L):

186.1 gr Na₂EDTA.2H₂O ,
800 mL distile su ile manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.
Yaklaşık 20 gr NaOH pelleti ile pH 8'e ayarlanarak final hacim 1 L'ye tamamlandı.
Solüsyon otoklavlanarak oda ısısında saklandı.

3. 2. 2. 9. 200 mM EDTA (10 mL):

4 mL 0.5 M disodyum EDTA (bölüm 3. 2. 2. 8'de hazırlanan),
6 mL distile su eklenerek karıştırıldı.
Solüsyon otoklavlanarak buzdolabında saklandı

3. 2. 2. 10. 10xTBE (890 mM Tris, 890 mM Borik Asit, 20 mM EDTA, 1 L):

40 mL 0.5 M disodyum EDTA (bölüm 3. 2. 2. 8'de hazırlanan),

900 mL distile su ile karıştırıldı.

Bu solüsyona 108 gr tris baz ve 55 gr borik asit eklenerek magnetik karıştırıcıda karıştırıldı. Hacim 1 L'ye tamamlandı.

3. 2. 2. 11. Elektroforez yürütme tamponu, 0.5 xTBE (44.5 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, 1 L):

50 mL 10xTBE (bölüm 3. 2. 2. 10'da hazırlanan),

950 mL distile su eklenerek karıştırıldı.

3. 2. 2. 12. Gel loading buffer (%0.2 bromfenol mavisi, %50 gliserol, 20 mM tris (pH 8), 2.5 mM EDTA):

0.1 gr bromfenol mavisi,

23.75 mL distile su içinde çözdürülerek iki saat kadar karıştırıcının üzerinde bekletildi.

Üzerine;

1 mL 1 M tris-HCl (pH 8) (bölüm 3. 2. 2. 7'de hazırlanan),

0.25 mL 0.5 M disodyum EDTA (bölüm 3. 2. 2. 8'de hazırlanan) ve

25 mL gliserol karıştırıldı. Solüsyon buzdolabında saklandı.

3. 3. DeneYler

Çalışmamızda gönüllü vericilerden alınan 100 kan örneği çalışıldı. 2 cc venöz kan alınarak steril EDTA'lı cam tüplerin içine aktarılıp, her örneğe bir protokol numarası verildi. Hemen çalışılmayacak örnekler buzdolabına kaldırıldı.

3. 3. 1. High Pure PCR Template Preparation Kit ile DNA Ekstraksiyonu

- Ependorf tüplerin içine 200 µL kan, 200 µL binding tampon ve 40 µL proteinase K karıştırılarak 10 dakika 72°C'de inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra bu karışıma 100 µL isopropanol eklenerek iyice karıştırıldı.
- Daha sonra tüp içindikiler High Pure filtreli tüplere aktarılarak 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası alt tüpler değiştirilerek 500 µL inhibitör removal tampon solüsyonu eklendi ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi.

- Alt tüpler değiştirilerek 500 µL yıkama tamponu eklendi ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi.
- Tekrar alt tüpler değiştirilerek yine 500 µL yıkama tamponu eklenip 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi.
- Kirli kalan örnekler için yıkama tamponu ile ekstra bir yıkama daha yapıldı.
- Alt tüpler değiştirilerek 70°C'ye ısıtılan elüsyon tamponundan 200 µL eklenip 800 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra üst tüpler atılarak alt tüplerin içindekiler kapaklı eppendorf tüplere aktarılarak amplifiye edilinceye kadar buzdolabında saklandı.

3. 3. 2. Amplifikasyon

0.2 mL'lik eppendorf tüpleri örnek tüpü, negatif (-) kontrol tüpü, pozitif (+) kontrol tüpü olarak işaretlendi. Tüplerin içlerine;

	örnek tüpü	(-) kontrol tüpü	(+) kontrol tüpü
PCR mix	40 µL	40 µL	40 µL
Primer	40 µL	40 µL	40 µL
Distile su	-	20 µL	-
Kontrol DNA	-	-	20 µL
örnek DNA	20 µL	-	-

konularak elde edilen karışım vortexlendi. Daha sonra eppendorf tüpleri thermal cycler cihazının içine yerleştirildi. Thermal Cycler cihazı aşağıdaki parametrelere göre ayarlandı.

95°C'de 5 dak
 95°C'de 30 sn
 63°C'de 30 sn
 72°C'de 30 sn
 72°C'de 10 dak

} 32 döngü

Amplifikasyondan hemen sonra örneklerin üzerine 200mM EDTA solüsyonundan 5 µL eklenerek buzdolabına kaldırıldı. (Şekil 3.1 Thermal Cycler cihazı)



Şekil 3.1. Thermal Cycler cihazı.

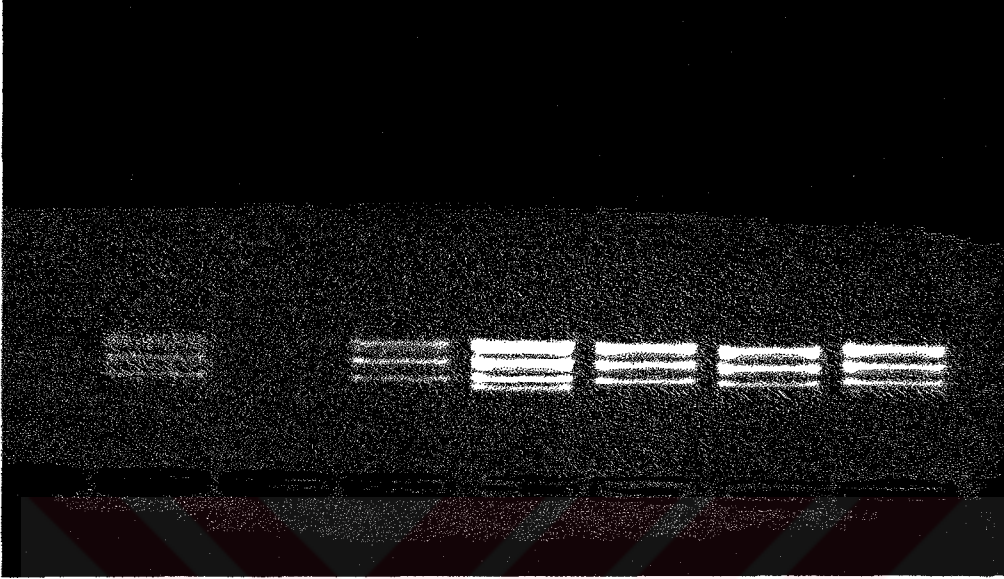
3. 3. 3. Agaroz Jelinin Hazırlanması

4 gr agaroz, 100 mL 0.5xTBE tamponu ile karıştırılarak su banyosunda 100°C'ye ısıtılarak eritildi. Daha sonra karışım oda ısısında yaklaşık olarak 55°C'ye geldikten sonra üzerine 10 mg/mL etidyum bromid stok solüsyonundan 5 µL eklendi ve üzerine kuyucukları açmak için tarak yerleştirilen plağa döküldü. Oda ısısında 20 dakika kadar bekletildikten sonra tarak jelden çıkarıldı.

3. 3. 4. Elektroforez ile Amplifikasyon Kontrolü

Elektroforez tankının içine 0.5xTBE elektroforez yürütme solüsyonu konuldu. Agaroz jel tankın içine yerleştirildi. Tampon solüsyonu jelin üzerini yaklaşık olarak 2 mm kaplayacak şekilde ayarlandı. EDTA eklenmemiş amplifiye örneklerden 10 µL PCR ürünü + 2 µL loading buffer alınarak agaroz jelinin içindeki kuyucukların içine mikropipet ile pipetlendi. Örnekler jele aplikte edildikten sonra tankın kapağı kapatılarak elektrotlar güç kaynağına bağlandı. 120V 80 mA'de örnekler pozitif elektroda doğru yürüyene kadar yaklaşık 1 saat çalıştırıldı. Elektroforez sonrası jel UV transilluminatörde incelenerek bantlar gözlemlendi (Şekil 3.2). Bant gözlenen örnekler

hibridizasyon için çalışıldı. Bant gözlenmeyen örneklerin ekstraksiyon ve amplifikasyonları tekrarlandı.



Şekil 3.2. Agaroz jelde bantların görünümü. Soldan sağa; pozitif kontrol, negatif kontrol, örnek 1, 2, 3, 4, 5.

3. 3. 5. DNA Hibridizasyonu

AmpliType DNA hibridizasyonu 3 adımlı bir prosedürden oluşmaktadır;

- DNA prob striplerine amplifiye DNA'ların hibridizasyonu,
- Hibridize PCR ürünlerine HRP-SA enzim konjugatın bağlanması,
- PCR ürünlerine bağlı olan non-spesifik ürünlerin yıkanarak uzaklaştırılması.

Renklendirme yıkama adımından sonra gerçekleştirilmektedir³⁹.

Gerekli ekipman ve ayraçlar: HRP-SA enzim konjugat, kromojen (TMB solüsyonu), hibridizasyon solüsyonu, yıkama solüsyonu, sitrat tamponu, %3'lük H₂O₂, AmpliType DNA tiplendirme plağı, AmpliType PM DNA prob stripleri, AmpliType HLADQA1 DNA prob stripleri, su banyosu.

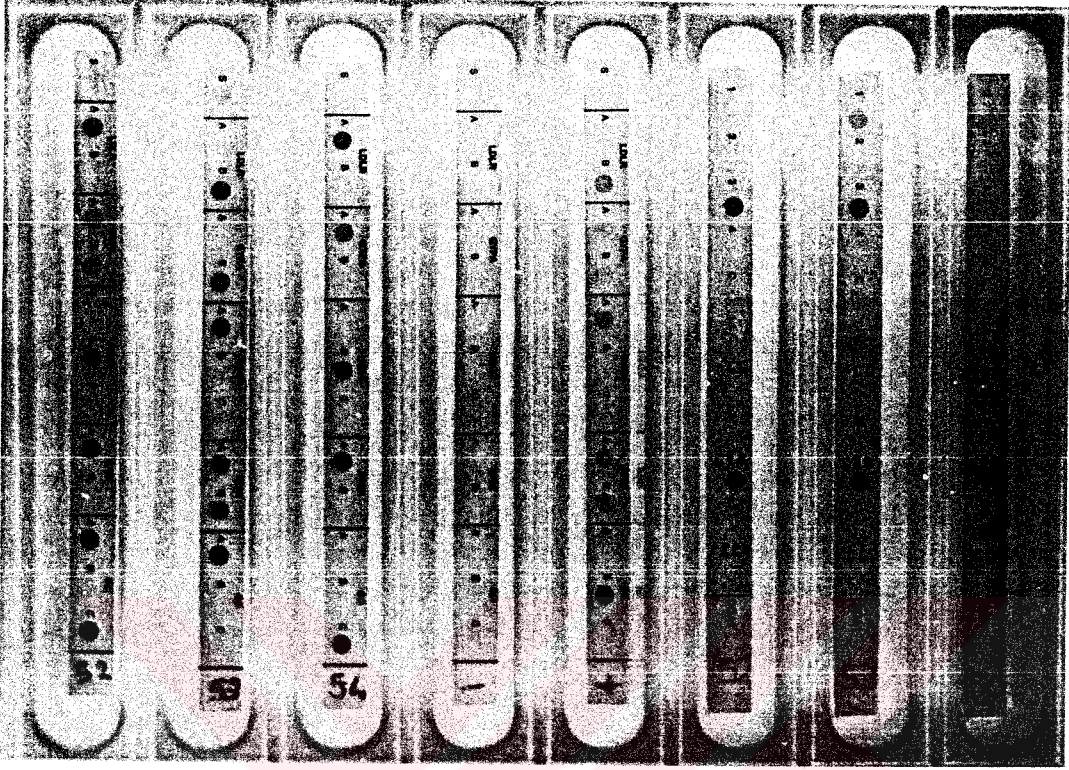
- Su banyosu 55°C'ye ayarlandı.
- Hibridizasyon ve yıkama solüsyonu etüvde ısıtıldı.
- AmpliType stripleri buzdolabından çıkarıldıktan sonra oda ısısında bir süre bekletildi.

- Stripler DNA tiplendirme plağına yerleştirildi.
 - Thermal Cycler 95°C'ye ayarlandı. Isınan cihaza amplifiye DNA'lar yerleştirildi.
 - Örnek kullanılabildi kadar bu sıcaklıkta bırakıldı (3-5 dak).
 - Stripler DNA tiplendirme plağının içine yerleştirilerek üzerleri işaretlendi.
 - DNA tiplendirme plağı üzerindeki strip bulunan kuyucuklara 3 mL ısıtılmış hibridizasyon solüsyonu konuldu.
 - Her bir örnek için işaretili kuyucuklardaki striplere her stripin tamamen ıslanmış olmasına dikkat ederek 20'şer mL amplifiye DNA örneği eklendi.
 - Kalan amplifiye örnekler buzdolabında saklandı.
 - Hibridizasyon için su banyosunda 55°C'de 15 dakika (± 2) bekletildi.
 - Hibridizasyon sonlanmadan 5 dakika önce enzim-konjugat solüsyonu hazırlandı.
- Kullanılacak solüsyon miktarı:
- Strip sayısı x 3.3 mL hibridizasyon solüsyonu,
 Strip sayısı x 27 μ L enzim konjugat: HRP-SA olarak hesaplandı.
- Hibridizasyon tamamlandıktan sonra plak kaldırıldı ve sıvı boşaltıldı.
 - Her kuyuya etüvde ısıtılan 5 mL yıkama solüsyonu eklenerek hafifçe çalkalayıp pastör pipeti ile solüsyon geri çekilerek döküldü.
 - Her kuyucuğa 3 mL enzim-konjugat solüsyonu eklenerek su banyosunda 55°C'de 5 dakika tutuldu.
 - Sürenin sonunda plak kaldırıldı ve kuyucuklardaki sıvı çekildi. Daha sonra 5 mL yıkama solüsyonu eklenerek 55°C'de 12 dakika tutuldu.
 - Süre sonunda kuyucuklardaki sıvı çekilerek tekrar yıkama solüsyonu eklendi ve sıvı boşaltıldı.

3. 3. 6. Renklendirme

- Her kuyuya 5 mL sitrat tamponu konuldu. Shaker üzerinde 5 dakika tutuldu. Bu süre içinde renklendirme solüsyonu hazırlandı:
- Strip sayısı x 5 μ L %3'lük H₂O₂,
 Strip sayısı x 5 mL sitrat tamponu,
 Strip sayısı x 0.25 mL Kromojen: TMB solüsyonu.

- Karışım hazırlandıktan sonra ışıktan etkilenmemesi için tüpün etrafı alüminyum folyo ile kapatıldı.
- Shaker üzerindeki plak alınarak içindeki sitrat tamponu boşaltıldı.
- Striplerin üzerine 5 mL enzim konjugat solüsyonu (hazırlanan renklendirme solüsyonu) eklenerek ışıktan etkilenmemesi için üzeri alüminyum folyo ile kapatılıp shaker üzerine konuldu (15-30°C, 50 rpm).
- Ortalama 20-30 dakika içinde S ve C noktalarının mavi renge dönüştüğü gözlemlendi.
- Bazı striplerde 20 dakikanın altında da renklenme görüldü. Bu durumda renklenme izlenen stripler hemen plaktan çıkarılarak diğer basamaklar uygulandı.
- Tüm striplerdeki renklenme tamamlandıktan sonra kuyucuklardaki sıvı boşaltılıp üzerlerine 5 mL distile su eklendi. Bu işlem daha sonra oluşabilecek renklenmeyi önlemektedir.
- Plak tekrar çalkalayıcının üzerine alınarak 5-10 dakika bekletildi.
- Plak üzerindeki striplerden sonuçlar kaydedilerek fotoğraflandı. Şekil 3.3'de örnek bir sonuç görülmekte.



Şekil 3.3. Hibridizasyon sonrasında striplerin görünümü: 52; LDLR AA, GYPA AB, HBGG BB, D7S8 AA, GC AC, 53; LDLR BB, GYPA BB, HBGG AA, D7S8 AB, GC AA, 54; LDLR AA, GYPA AA, HBGG BB, D7S8 AA, GC CC, negatif kontrol, pozitif kontrol; LDLR BB, GYPA AB, HBGG AA, D7S8 AB, GC BB, 52; DQA1 3, 3, 53; DQA1 1.1, 3, 54; DQA1 1.1,4.1.

3. 4. İstatistiksel Hesaplamalar

Çalışılan lokusun adli amaçlı kimliklendirme ve babalık tayininde kullanılabilmesi için gözlenen ve beklenen frekansların Hardy-Weinberg dengesine (HWD) uyumu, χ^2 testi ile kontrol edildi³. Adli etkinlik değerlerini ölçmek için allelik diversity, ayırtetme gücü ve reddetme gücü değerleri hesaplandı^{33,95,96}.

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

G: Gözlenen genotip sayısı.

B: Beklenen genotip sayısı.

Beklenen genotip frekansı: Homozigot genotipler için $\longrightarrow p^2$

Heterozigot genotipler için $\longrightarrow 2pq$

(p,q: j lokusundaki p ve q allellerinin frekansları)

Beklenen genotip sayısı: Homozigot genotipler için $\longrightarrow p^2 \times n$

Heterozigot genotipler için $\longrightarrow 2pq \times n$

Allel frekansı:

$$x_{ij} = \frac{2x_i + y_i}{2n}$$

x_i : i allelinin bulunduğu homozigot genotip sayısı.

y_i : i allelinin bulunduğu heterozigot genotip sayısı.

n: Toplam kişi sayısı.

Serbestlik derecesi (df):

$$df = \frac{\text{allel sayısı} \times (\text{allel sayısı} - 1)}{2}$$

Beklenen heterozigotluk oranı (fi)

$$f_i = (1 - \sum x_{ij}^2) \cdot 2n / (2n - 1)$$

formülü ile hesaplandı.

Adli etkinlik değerlerini ölçmek için allelik diversity, ayırdetme gücü ve reddetme gücü değerleri hesaplandı.

Allelik diversity (h):

$$h = [1 - \sum x_i^2] [n / n - 1]$$

x_i : Allel frekansı.

n: Toplam kişi sayısı.

Ayırt etme gücü (PD): Fisher formülü ile hesaplandı.

$$PD = 1 - \sum y_{kj}^2$$

(y_{kj} : j lokusundaki k genotipinin frekansı)

Reddetme gücü (PE);

$$PE = \sum_i p_i (1 - p_i)^2 - \frac{1}{2} \sum_i \sum_{j \neq i} p_i^2 p_j^2 (4 - 3p_i - 3p_j)$$

formülleri kullanılarak hesaplandı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Çukurova bölgesinde yaşayan ve birbiri ile akrabalık ilişkisi bulunmayan 100 tane gönüllü vericiden alınan kan örneklerinde HLADQA1 ve PM (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 ve Gc) lokusları AmpliType PM+HLADQA1 kiti ile saptandı.

Çizelge 4.1. HLADQA1 ve PM lokuslarında gözlenen gen sayıları ve yüzdeleri.

	Gözlenen sayı	%
HLADQA1 1.1	28	14
1.2	42	21
1.3	22	11
2	12	6
3	35	17.5
4.1	60	30
4.2/4.3	1	0.05
LDLR – A	67	8.93
– B	80	10.67
GYPA – A	81	10.8
– B	64	8.53
HBGG – A	65	8.67
– B	77	10.27
– C	5	0.67
D7S8 – A	90	12
– B	58	7.73
GC – A	42	5.6
– B	37	4.93
– C	84	11.2

Çalışma sonuçlarının HWD'ne uyumu χ^2 ile test edildi. Elde ettiğimiz değerler HWD ile uyumlu bulundu. HLADQA1 ve PM sistemlerine ait gözlenen ve beklenen değerler çizelge 4.2 ve 4.3'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. HLA-DQA1 lokusuna ait gözlenen ve beklenen değerler (n=100).

Fenotipler	Gözlenen Değer	Beklenen Değer
1.1, 1.1	3	1.960
1.1, 1.2	5	5.880
1.1, 1.3	1	3.080
1.1, 2	2	1.680
1.1, 3	4	4.900
1.1, 4.1	10	8.400
1.1, 4.2/4.3	-	0.140
1.2, 1.2	4	4.410
1.2, 1.3	4	4.620
1.2, 2	1	2.520
1.2, 3	10	7.350
1.2, 4.1	13	12.60
1.2, 4.2/4.3	1	0.210
1.3, 1.3	2	1.210
1.3, 2	2	1.320
1.3, 3	6	3.850
1.3, 4.1	5	6.600
1.3, 4.2/4.3	-	0.110
2, 2	-	0.360
2, 3	4	2.100
2, 4.1	3	3.600
2, 4.2/4.3	-	0.060
3, 3	3	3.0625
3, 4.1	5	10.500
3, 4.2/4.3	-	0.175
4.1, 4.1	12	9
4.1, 4.2/4.3	-	0.300
4.2/4.3, 4.2/4.3	-	0.0025

Çizelge 4.3. PM sistemine ait gözlenen ve beklenen değerler (n=100).

Lokus	Genotip	Gözlenen değer	Beklenen değer
LDLR	AA	20	18.90
	AB	47	49.15
	BB	33	31.90
GYPA	AA	36	34.22
	AB	45	48.55
	BB	19	17.22
HBGG	AA	21	18.49
	AB	42	46.87
	AC	2	2.15
	BB	32	29.70
	B C	3	2.725
	CC	-	0.062
D7S8	AA	42	43.56
	AB	48	44.88
	BB	10	11.56
GC	AA	4	5.29
	AB	9	9.20
	AC	29	26.22
	BB	3	4
	BC	25	22.80
	CC	30	32.49

Çizelge 4.4. HLADQA1 ve PM sistemlerinin gen frekansları.

Lokus	Allel	Frekans
HLADQA1	1.1	0.140
	1.2	0.210
	1.3	0.110
	2	0.060
	3	0.175
	4.1	0.300
	4.2/4.3	0.005
LDLR	A	0.435
	B	0.565
GYPA	A	0.585
	B	0.415
HBBG	A	0.430
	B	0.545
	C	0.025
D7S8	A	0.660
	B	0.340
GC	A	0.230
	B	0.200
	C	0.570

Çukurova Bölgesinde 100 kişilik popülasyon örneğinde HLADQA1 ve PM sistemleri için saptanan adli etkinlik değerleri Çizelge 4.5’de görülmektedir.

Çizelge 4.5. HLADQA1 ve PM sistemlerinin adli etkinlik değerleri.

Lokus	χ^2	Df	Obs H	Exp H	h	PD	PE
HLADQA1 p> 0.05	16.8735	15	0.76	0.800	0.80	0.946	0.5023
LDLR p>0.05	0.195	1	0.47	0.492	0.49	0.858	0.185
GYP A p>0.05	0.525	1	0.45	0.486	0.49	0.856	0.184
HBGG p>0.05	1.123	3	0.47	0.518	0.52	0.883	0.216
D7S8 p>0.05	0.481	1	0.48	0.449	0.45	0.838	0.174
GC p>0.05	1.264	3	0.63	0.583	0.58	0.945	0.314

df: Serbestlik derecesi **Obs. H:** Gözlenen heterozigotluk, **Exp. H:** Beklenen heterozigotluk, **h:** allelik diversity, **PD:** Ayırt etme gücü, **PE:** Reddetme gücü.

5. TARTIŞMA

Günümüzdeki teknolojik gelişmelere paralel olarak Adli Bilimlerde kullanılan yöntemler de sürekli olarak bir değişim içindedir. Akrabalık ilişkilerinin araştırılması ve kimliklendirme çalışmaları, ilk olarak kişilerin birbiri ile olan fiziksel benzerliklerinin karşılaştırılması ile başlamış, kan grup antijenlerinin saptanması ile de deneysel ve daha objektif kriterler kullanılmıştır. Daha sonra, eritrositlerin ve serumun genetik kontrollü polimorfik enzim ve proteinleri ile lökosit antijenleri rutin çalışmalar arasına girmiştir. Ancak bu konvansiyonel yöntemlerin ekonomik olmaları ve pek fazla laboratuvar bilgi ve deneyimine ihtiyaç duyulmaması gibi avantajlarının yanında; hassaslık oranının düşük olması, çok fazla miktarda örneğe ihtiyaç duyulması, ısı, güneş ışığı gibi çevresel ve fiziksel faktörlere maruz kalmış örneklerden sağlıklı sonuçlar alınamaması ve taze örnek gerektirmesi, karışmış örneklerden sonuç alınamaması gibi dezavantajları görülmüştür. DNA analizlerinin Adli Bilimler alanında kullanılmaya başlaması ile beklenmiş, fiziksel etkilere maruz kalmış, karışmış ve çok az miktardaki örneklerden bile hızlı, hassas ve güvenilir sonuçlar alınmıştır. Ayrıca ayırdetme gücünün yüksek olması da bu çalışmalarda DNA analizlerinin tercih edilmesine neden olmaktadır⁹⁷.

Adli amaçlı kimliklendirme ve paternite tayininde kullanılan analizler, genetik alanındaki ilerlemelere göre şöyle sıralanabilir²⁰:

- 1- Hypervariable proplar: minisatellit sekansların keşfi ile multiple lokusların tayini.
- 2- Oldukça fazla polimorfik özellik gösteren sekanslar. Popülasyonda her bir lokustaki allellerin frekansları hesaplanabilmiştir .
- 3- PCR ile enzimatik amplifikasyonla bilinen polimorfik bölgenin direk sekanslanması veya ASO/SSO ile hibridizasyonu.
- 4- MtDNA'nın amplifikasyonu ve sekanslanması.
- 5- SNP'lerin (Single nucleotid polymorphism) tayini.

Genetik testlerle kimliklendirme ve akrabalık ilişkileri tayininde istatistiksel analizler yardımcı olmaktadır. Kimliklendirmede bir veya daha fazla markerda farklılık var ise reddetme olanağı ortaya çıkmaktadır.

HLADQA1 lokusu adli amaçlı testlerde PCR tekniğine dayalı olarak geliştirilen ilk DNA lokusudur. Bu lokusa daha sonra PM lokuslarının eklenmesiyle AmpliType PM+HLADQA1 kitinde bu 6 sistem tek bir çalışma ile tiplendirilebilmektedir^{7,37,75,97,98}.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların HWD'ne uyumlu olduğu saptanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, HLADQA1 lokusunda 21, LDLR lokusunda 3, GYPA lokusunda 3, HBGG lokusunda 5, D7S8 lokusunda 3, GC lokusunda ise 6 genotip gözlenmiştir. HLADQA1 lokusunda en yüksek sıklıkta görülen allel 4.1, en düşük sıklıkta görülen allel ise 4.2/4.3 alleli olarak saptanmıştır. PM sistemlerinden HBGG lokusunda CC genotipi gözlenmemiştir.

HLADQA1 ve PM lokuslarının adli etkinlik değerleri incelendiğinde; HLADQA1 lokusu için gözlenen heterozigotluk %76, ayırım gücü %94.6, PM lokusları için ise gözlenen heterozigotluk %45-%63 arasında, ayırım gücünün ise %83 ile %94.5 arasında olduğu belirlenmiştir. 6 lokusun toplam ayırım gücü ise %99.975'e ulaşmaktadır. HLADQA1 lokusu için reddetme gücü 0.5023, PM lokusları için ise sırasıyla 0.185, 0.184, 0.216, 0.174, 0.314 olarak saptanmıştır.

DNA analizleri yapılan laboratuvarlarda en sık karşılaşılan sorunlardan biri kontaminasyon riskidir. Laboratuvarlarda örnekler arası kontaminasyonu engellemek için ekstraksiyon ve amplifikasyon aşamalarının farklı bölgelerde yapılması, pipetleme sırasında dikkat edilmesi, örneklerle temas eden eldivenlerin değiştirilmesi gibi bazı kurallara dikkat edilmesi gerektiği önerilmektedir³⁶.

AmpliType PM+HLADQA1 kiti ile yapılan çalışmalarda tiplendirme sonuçlarını değerlendirirken dikkat edilmesi gereken noktalar vardır: Stripleri değerlendirirken öncelikle HLADQA1 stripinde C, PM striplerinde S kontrol noktalarına bakılır. Eğer S ve C noktalarında renk değişikliği yoksa değerlendirilme yapılmaz ve çalışma tekrar edilir. S ve C noktalarında renk değişikliği varsa, bu noktaların diğer noktalar ile aynı veya daha az yoğunlukta boyanmış olması gerekmektedir. S ve C noktalarından daha az yoğunlukta renklenme görülen noktalar kontaminasyon olduğunu göstermektedir³⁹. Bizim deneylerimizde de striplerin kontrol noktalarında renklenme görülmeyen örneklerde çalışmalar tekrarlandı.

Yorumlama sırasında karşılaşılan sorunlardan biri de HLADQA1 stripinde örnek 1.1 allelini içermediği halde 1.1 dotunda zayıf bir renklenme görülmesidir. Bunun nedeni HLA DX α gen sekansının non-spesifik amplifikasyonudur. Sonuçları yorumlarken bu renklenmenin gözönüne alınmaması gerektiği önerilmektedir⁹⁹.

Çalışmalarımızda DNA ekstraksiyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit kullanıldı. Ekstraksiyon esnasında her tampon solüsyonun ardından santrifüj sonrası

filtreli tüplerin altına konulan tüplerin değiştirilmesi kontaminasyonu önlemesi, filtreli tüplerin de DNA kaybını engellemesi nedeniyle bu kit tercih edilmiştir. Ancak ekstraksiyon esnasında isopropanolün eklenmesi ile birlikte tüp içindeki karışımın koyulaşarak tüpün çeperlerini tıkaması nedeniyle alt tüpe akımın engellenmesi problemi yaşadık. Bu tür kirli kalan örneklerde yıkama tamponu ile ekstra yıkama yapıldı.

Amplifikasyon esnasında kullanılan primerlere bağlı olarak PCR döngü parametrelerinde değişiklikler olabilmektedir. Çalışmamızda PCR cihazına kit kullanım kitapçığında önerilen parametreler girilerek toplam 32 döngü yaptırıldı. Başarılı bir amplifikasyonun denatürasyon ve annealing ısısına bağlı olduğu belirtilmektedir. Bu ısılar DNA örneğinin tamamen denatüre olması ve primerlerin tek iplikçiğe bağlanmaları için gerekli olan ısılardır. Amplifikasyon esnasında örneklerin 3 dakikadan az 10 dakikadan fazla denatüre edilmemesi gerektiği önerilmektedir³⁶.

Çalışmamızda amplifikasyon kontrolü için PCR ürünlerini agaroz jelde yürütürken bantların görünürleştirilmesi için etidyum bromid kullandık. Etidyum bromid mutajen bir madde olduğu için jele ekleme esnasında eldivenin yanısıra koruyucu olarak maske kullandık.

Hibridizasyon sırasında denatüre örnekler bloktan 30-90 saniye arası bir sürede ayırmalıdır. Hibridizasyon ve yıkama sırasında sıcaklığa dikkat etmek gerekmektedir ($55 \pm 1^\circ\text{C}$). Isının yüksekliği ve düşüklüğü dotların hassaslığını azaltmaktadır³⁶. Hibridizasyon sırasında DNA tiplendirme plağının içindeki striplere amplifiye DNA örneklerini eklerken her stripin tamamen ıslanmış olmasına dikkat edilmelidir. Çünkü hibridizasyon başladığı andan itibaren striplerin sürekli ıslak olması gerekmektedir. Karşılaşılan sorunlardan biri de sıcaklık süreleriyle ilgilidir. Bu sürelere ek olarak ± 1 dakika limitini aşmamak gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda süre uzadıkça dotlardaki hassaslığın azalabileceği, DQA1'de 4.1 ve GC'de ise B noktalarında sıcaklık zamanı ile bağlantılı olarak renklenme kaybı görülebildiği belirtilmektedir¹⁰⁰. Bizim çalışmamız esnasında da optimum sıcaklığın ve sürenin sağlanamadığı deneylerde striplerde renklenme zayıflığı ve eksikliği saptandı. Bu nedenle hibridizasyon aşamalarında termometre ile suyun sıcaklığı sürekli olarak kontrol edilerek optimum sıcaklık sağlandı.

HLADQA1 ve PM lokuslarının kimliklendirme ve paternite testleri gibi adli amaçlı uygulamalarda kullanılmaya başlanması ile birçok popülasyonda bu sistemlere

ait frekans dağılımları hesaplanmıştır. Ülkemizde de birçok bölgede bu sistemlere ait istatistiksel çalışmalar yapılmıştır. Çizelge 5.1’de Türkiye’nin çeşitli bölgelerine ait HLADQA1+PM allel frekans dağılımları görülmektedir. Yaptığımız çalışma sonuçları ile karşılaştırdığımızda sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu görüldü. Sonuçlar arasındaki küçük farklılıkların bölgeler arası ve kişi sayılarındaki farklılıklardan dolayı olabileceği düşünülmektedir. Bölgeler arasında karşılaştırma yaptığımızda Elazığ popülasyonunda HLADQA1 oranının çok düşük olduğu, bizim yaptığımız çalışmada ise HLADQA1 2 oranının diğer bölgelere göre daha düşük olduğu gözlemlendi. PM lokuslarında ise, LDLR B oranının diğer bölgelere göre daha düşük olduğu görüldü. HBGG C alleli ise bütün bölgelerde düşük oranda izlenmektedir¹⁰¹⁻¹⁰⁵.



Çizelge 5.1. Türkiye'nin çeşitli bölgelerine ait HLADQA1+PM allel frekans dağılımları ¹⁰¹⁻¹⁰⁵

Allel	Çukurova*	Ege	Orta Anadolu	İstanbul	Elazığ	Türkiye
HLADQA1 1.1	0.140	0.085	0.106	0.143	0.178	0.149
1.2	0.210	0.119	0.125	0.151	0.122	0.168
1.3	0.110	0.102	0.135	0.089	0.033	0.097
2	0.060	0.095	0.192	0.107	0.122	0.103
3	0.175	0.228	0.178	0.107	0.178	0.129
4.1	0.300	0.371	0.264	0.366	0.367	0.356
4.2/4.3	0.005			0.018		
LDLR A	0.435	0.401	0.295	0.391		0.438
B	0.565	0.599	0.705	0.609		0.562
GYP A	0.585	0.603	0.682	0.602		0.618
B	0.415	0.397	0.318	0.397		0.382
HBBG A	0.430	0.469	0.488	0.453		0.435
B	0.545	0.519	0.508	0.523		0.551
C	0.025	0.012	0.004	0.024		0.014
D7S8 A	0.660	0.615	0.601	0.590		0.617
B	0.340	0.385	0.399	0.410		0.383
GC A	0.230	0.267	0.333	0.343		0.270
B	0.200	0.195	0.143	0.187		0.190
C	0.570	0.538	0.523	0.470		0.540

* Yaptığımız çalışma

Çizelge 5.2'de çeşitli popülasyonlara ait allel frekansları görülmektedir. Bu çizelge incelendiğinde HLADQA1 için en sık rastlanan allel 4.1, en düşük frekansa sahip allel ise 4.2/4.3 olarak izlenmektedir. Peru ve Alaska'da HLADQA1 1.1 oranının çok düşük, 3 allelinin ise Peru'da çok yüksek oranda olduğu görülmekte, Alaska yerlilerinde 1.3 ve 2 allellerinin frekansı 0 olarak izlenmekte, 4.2/4.3 allelinin Peru ve Zimbabwe popülasyonlarında oldukça yüksek olduğu izlenmektedir. PM sistemlerini karşılaştırdığımızda ise Japon popülasyonunda LDLR A oranının çok düşük olduğu görülmektedir. LDLR B alleli bütün popülasyonlarda 0.384-0.565 arası bir değerde iken, Zimbabwe'de bu oranın çok düşük (0.08), Japonya'da ise çok yüksek (0.838)

olduğu gözlenmektedir. Bütün popülasyonlarda HBG C alleli nadir görülürken, Zimbabwe popülasyonunda 0.358 gibi çok yüksek bir değere ulaştığı gözlenmektedir. Zimbabwe popülasyonunda GC B alleli frekansı diğer popülasyonlara göre oldukça yüksek bir değerde (0.858), GC C alleli ise diğer popülasyonlara göre çok düşük bir değerde (0.042) izlenmektedir^{9,100,106-114}.

Yaptığımız çalışma sonuçlarını diğer popülasyonlarla karşılaştırdığımızda Avrupa ülkeleri ve Amerikan Caucasian popülasyonlarındaki sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Çukurova Bölgesi sonuçları Güney Amerika ülkeleri, Alaska, Zimbabwe ve Japon popülasyonları ile karşılaştırıldığında ise anlamlı farklılıklar gözlenmektedir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz adli etkinlik değerlerinin yüksekliği bu sonuçların Çukurova Bölgesine ait adli olgu analizlerinde kullanılabileceğini göstermektedir.



Allel	Japonya	İspanya	Almanya	Peru	Kolombiya	İtalya	U.S. Caucasian	Zimbabwe	Hindistan	Dubai	Alaska
HLADQA1	0.127	0.113	0.12	0.0450	0.135	0.175	0.153	0.132	0.127	0.090	0.030
1.1											
1.2	0.164	0.221	0.19	0.0550	0.117	0.190	0.191	0.344	0.118	0.306	0.009
1.3	0.227	0.098	0.08	0.0300	0.063	0.0425	0.060	0.123	0.180	0.055	0.000
2	0.005	0.186	0.16	0.0500	0.101	0.130	0.151	0.057	0.149	0.113	0.000
3	0.354	0.176	0.15	0.4250	0.255	0.0525	0.196	0.047	0.075	0.116	0.383
4.1	0.123	0.186	0.29	0.2350	0.328	0.410	0.224	0.189	0.325	0.321	0.578
4.2/4.3		0.020		0.1600			0.025	0.108	0.026		
LDLR A	0.162	0.422	0.40	0.5850	0.527	0.47	0.435	0.198	0.443	0.442	0.616
LDLR B	0.838	0.578	0.60	0.4150	0.473	0.53	0.565	0.080	0.557	0.558	0.384
GYPA A	0.595	0.574	0.56	0.6900	0.636	0.55	0.533	0.486	0.610	0.678	0.629
GYPA B	0.405	0.426	0.44	0.3100	0.361	0.45	0.467	0.514	0.390	0.322	0.371
HBGG A	0.311	0.505	0.54	0.2700	0.416	0.44	0.485	0.368	0.500	0.456	0.156
HBGG B	0.689	0.495	0.455	0.7150	0.562	0.55	0.515	0.271	0.500	0.464	0.844
HBGG C	0.000	0	0.005	0.0150	0.022	0.01	0.000	0.358	0	0.081	0.000
D7S8 A	0.608	0.412	0.67	0.6050	0.616	0.54	0.570	0.712	0.781	0.639	0.558
D7S8 B	0.392	0.588	0.33	0.3950	0.384	0.46	0.430	0.288	0.219	0.361	0.442
GCA	0.284	0.304	0.26	0.1800	0.215	0.30	0.307	0.099	0.289	0.194	0.299
GCB	0.473	0.098	0.15	0.2500	0.252	0.16	0.153	0.858	0.149	0.289	0.326
GCC	0.243	0.598	0.59	0.5700	0.532	0.54	0.540	0.042	0.561	0.517	0.375

Çizelge 5.2. Çeşitli popülasyonlarda gözlenen HLADQA1 ve PM lokuslarına ait frekans dağılımı ^{9/100,106-114}.

6. SONUÇLAR

- 1- Bu çalışmada Çukurova bölgesinde HLADQA1 ve PM lokuslarının allel frekanslarını saptamak amacıyla AmpliTypePM+HLADQA1 kiti kullanılmıştır.
- 2- Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde HLADQA1 lokusunda 21, LDLR lokusunda 3, GYPA lokusunda 3, HBGG lokusunda 5, D7S8 lokusunda 3, GC lokusunda ise 6 genotip gözlenmiştir.
- 3- Çalışmada elde edilen sonuçların HWD uyumu χ^2 ile test edildi. Çalışma sonuçlarının HWD ile uyumlu olduğu saptandı .
- 4- HLADQA1 lokusunda 21, LDLR lokusunda 3, GYPA lokusunda 3, HBGG lokusunda 5, D7S8 lokusunda 3, GC lokusunda ise 6 genotip gözlenmiştir.
- 5- HLADQA1 ve PM lokuslarının adli etkinlik değerleri ise; HLADQA1 lokusu için gözlenen heterozigotluk %76, ayırım gücü %94.6, PM lokusları için ise gözlenen heterozigotluk %45- %63 arasında, ayırım gücü ise LDLR %85.8, GYPA %85.6, HBGG %88.3, D7S8 %83.8, GC %94.5 olarak hesaplanmıştır. 6 lokusun toplam ayırım gücü ise %99.975'e ulaşmaktadır. HLADQA1 lokusu için reddetme gücü 0.5023, LDLR 0.185, GYPA 0.184, HBGG 0.216, D7S8 0.174, GC 0.314 olarak saptanmıştır.
- 6- HLADQA1 ve PM lokuslarının saptanmasında kullanılan AmpliTypePM+HLADQA1 kiti ile reverse dot blot hibridizasyon yönteminin hassas, güvenilir, fotoğraflanabilme ve kısa bir sürede sonuç alınabilmesi gibi avantajları olduğu görüldü.
- 7- İstatistiksel olarak anlamlı bulunan çalışma sonuçları Ç.Ü.Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Adli Hemogenetik laboratuvarında kimliklendirme ve akrabalık ilişkilerini belirleme testlerinde kullanılmak üzere veri tabanı oluşturacaktır.

7. KAYNAKLAR

- 1- **Lee HC, Ladd C, Bourke MT, Pagliaro E, Tirnady F.** DNA typing in forensic science. I. Theory and background. *Am J Forensic Med and Pathol*, 1994; 15(4): 269-282.
- 2- **Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL.** Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 1985; 314: 76-79.
- 3- **Sensabaugh GF.** Biochemical markers of individualisation. In: Saferstein R. Eds. *Forensic Science Handbook*. New Jersey: A Simon and Schuster Company, 1982: 338-403.
- 4- **Helmuth R, Fildes N, Blake E, Luce MC, Chimera J, Madej R, Gorodezky C, Stoneking M, Schmill N, Klitz W.** HLADQ α allele and genotype frequencies in various human populations determined by using enzymatic amplification and oligonucleotide probes. *Am J Hum Genet*, 1990; 47: 515-523.
- 5- **Mangin PD, Ludes BP.** A forensic application of DNA typing: Paternity determination in a putrefied fetus. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 1991; 12(2): 161-163.
- 6- **Presley LA, Baumstark AL, Dixon A.** The effects of specific latent fingerprint and questioned document examination on the amplification and typing of the HLA DQ alpha gene region in forensic casework. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1993, 38(5), 1028-1036.
- 7- **Budowle B, Lindsey JA, DeCou JA, Koons BW, Giusti AM, Comey CT.** Validation and population studies of the loci LDLR, GYPA, HBG, D7S8 and Gc (PM loci), and HLADQ alpha using a multiplex amplification and typing procedure. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1995; 40: 45-50.
- 8- **Yasin S, Hamad M, El Karmi A.** Jordanian population data on the PCR-based loci: LDRL, GYPA, HBG, D7S8 and GC. *Forensic Sci Int*, 1999; 104:17-21.
- 9- **Brown RJ, Rowold D, Tahir M, Barna C, Duncan G, Herrera RJ.** Distribution of the HLA-DQA1 and polymarker alleles in the Basque population of Spain. *Forensic Sci Int*, 2000; 108:145-151.
- 10- **Tahir MA, Balamurugan K, Tahir UA, Amjad M, Awin MB, Chaudhary OR, Hamby JE, Budowle B, Herrera RJ.** Allelic distribution of nine short tandem repeat (STR), HLA-DQA1 and polymarker loci in an Omani sample population. *Forensic Sci Int*, 2000; 109: 81-85.
- 11- **Turowska B, Sanak M.** Data on the loci LDLR, GYPA, HBG, D7S8 and GC in a South Polish population. *Int J Legal Med*, 1998; 111: 101-102.
- 12- **Vu NT, Chaturvedi AK, Canfield DV.** Genotyping for DQA1 and PM loci in urine using PCR-based amplification: Effects of sample volume, storage temperature, preservatives and aging on DNA extraction and typing. *Forensic Sci Int*, 1999; 102: 23-34.
- 13- **Comey CT, Koons BW, Presley KW, Smerick JB, Sobieralski CA, Stanley DM, Baechtel FS.** DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1994; 39(5): 1254-1269.
- 14- **Mulhare P, McQuillen E, Collins C, Heintz N, Howard P.** An unusual case using DNA polymorphisms to determine parentage of human remains. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 1991; 12(2): 157-160.

- 15- **Balazs I.** Properties of hypervariable single locus polymorphisms and their application to identity testing in DNA in Forensic Science, Robertson J, Ross AM, Burgoyne LA. Ed. England, Ellis Horwood Limited, 1990: 112-124.
- 16- **Brian Lane.** *The Encyclopedia of Forensic Science.* Headline, 1992, London, 220-225.
- 17- <http://www.accessexcellence.org/AB/GG/intron.html>. Erişim tarihi: 9.08.2003
- 18- **Martin PD, Schmitter H, Schneider PM.** A brief history of the formation of DNA databases in forensic science within Europe. *Forensic Sci Int*, 2001; 119: 225-231.
- 19- **Jeffreys AC, Wilson V, Thein SL.** Individual specific "fingerprints" of human DNA. *Nature*, 1985; 316: 76-79.
- 20- **King MC.** Invited editorial: Genetic testing of identity and relationship. *Am J Hum Genet*, 1989; 44: 179-181.
- 21- **Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA.** DNA typing from single hairs. *Nature*, 1988; 332: 543-546.
- 22- **Crouse CA.** Implementation of forensic DNA analysis on casework evidence at the Palm Beach County Sheriff's Office Crime Laboratory: Historical perspective. *Croatian Medical Journal*, 2001; 42(3): 247-251.
- 23- **Lygo JE, Johnson PE, Holdaway DJ, Woodroffe S, Whitaker JP, Clayton TM, Kimpton CP, Gill P.** The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *Int J Legal Med*, 1994; 107: 77-89.
- 24- **Balazs I, Baird M, Clyne M, Meade E.** Human population genetic studies of five hypervariable DNA loci. *Am J Hum Genet*, 1989; 44: 182-190.
- 25- **Duncan GT, Tracey ML.** Serology and DNA typing. In: Eckert WG. Eds. Introduction to Forensic Sciences. 2 th Ed. USA: CRS press, 1997: 233-293.
- 26- **Bozcuk AN.** *Genetik*, Palme yayıncılık, Ankara, 2000, 78-80.
- 27- **Kereszturya L, Rajczya K, Laszikk A, Gyodia E, Penzes M, Falus A, Petranyia GG.** Combination of DNA-based and conventional methods to detect human leucocyte antigen polymorphism and it's use for paternity testing. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 2002; 23(1): 57-62.
- 28- **Keresztury L, Rajczy K, Tauszik T, Gyodia E, Petranyi GG, Falus A.** DNA typing revealing high HLA-Cw polymorphism completes availability of major histocompatibility complex loci in forensic medicine. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 2003; 24(1): 70-75.
- 29- **Gülmezoğlu E, Ergüven S.** *İmmünoloji*, Hacettepe Taş, Ankara, 1994, 29-40
- 30- **Rodey GE, Lalezari P.** HLA and neutrophil antigen and antibody systems in Hematology basic principles and practice. 3 rd Edition, Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlove P. Ed. Newyork, Churchill Livingstone, 2000: 2220-2233.
- 31- **van Rood JJ, Jongh B, Claas FHJ, Goulmy E, Gratama JW, Giphart MJ.** New facts on HLA genetics: Are they relevant in bone marrow transplantation. *Seminars in Hematology*, 1984; 21(2): 65-80.
- 32- **Sullivan KA, Kipps TJ.** Human leukocyte and platelet antigens. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, Selighson V Eds. William's Hematology. 6th ed, USA: McGraw Hill, 2001: 1859-1870.

- 33- **Selvin Steve.** Statistical analysis of blood genetic evidence. In: Grunbaum BW. *Handbook for forensic individualization of human blood and bloodstains*, 1st ed, California: Sartorius GmbH, 1981: 177-211.
- 34- **Allen M, Saldeen T, Pettersson U, Gyllensten U.** Genetic typing of HLA class II genes in Swedish populations: Application to Forensic Analysis. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1993; 38(3): 554-570.
- 35- **Salazar M, Williamson J, Bing DH.** Genetic typing of the DQA1 *4 alleles by restriction enzyme digestion of the PCR product obtained with the DQ alpha AmpliType Kit. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1994; 39(2): 518-525.
- 36- **Wilson RB, Ferrara JL, Baum HJ, Shaler RC.** Guidelines for internal validation of the HLADQ α DNA typing system. *Forensic Sci Int*, 1994; 66: 9-22.
- 37- **Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.** Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLADQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 1986; 324: 163-166.
- 38- **Blake E, Mihalovich J, Higuchi R, Walsh PS, Erlich H.** Polymerase chain reaction (PCR) amplification and human leukocyte antigen (HLA)DQ α oligonucleotide typing on biological evidence samples- casework experience. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1992; 37(3): 700-726.
- 39- AmpliType PM+DQA1 PCR Amplification and Typing Kit Package Insert, Applied Biosystems, Roche, 2000.
- 40- **Leitersdorf E, Chakravarti A, Hobbs HH.** Polymorphic DNA Haplotypes at the LDL receptor locus. *Am J Hum Genet*, 1989; 44: 409-421.
- 41- **Hara M, Takada A, Ro A, Saito K, Kido A.** Association between LDLR polymorphism and diseases in the Japanese population: Ageing and distribution of the polymorphism. *Forensic Sci Int*, 2000; 113: 133-137.
- 42- <http://www.umd.necker.fr/LDLR/gene.html>. Erişim tarihi: 20.06.2003
- 43- **Varret M, Rabes JP, Thiart R, Kotze MJ, Baron H, Cenarro A, Descamps O, Ehardt M, Hondelijn JC, Kostner GM, Miyake Y, Pocovi M, Schmidt H, Schmidt H, Schuster H, Stuhmann M, Yammura T, Junien C, Beroud C, Boileau c.** LDLR Database (second edition): new additions to the database and the software and results of the first molecular analysis. *Nucleic Acids Research*, 1998; 26: 248-252.
- 44- **Südhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russel DW.** The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science*, 1985; 228: 815-822.
- 45- **Varret M, Rabes JP, Beroud GC, Junien C, Boileau C, Beroud C.** Software and database for the analysis of mutations in the human LDL receptor gene. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(1): 172-181.
- 46- **Couture P, Morissette J, Gaudet D, Vohl MC, Gagne C, Bergeron J, Despres JP, Simard J.** Fine mapping of low-density lipoprotein receptor gene by genetic linkage on chromosome 19p13.1-p13.3 and study of the founder effect of four French Canadian low-density lipoprotein receptor gene mutations. *Atherosclerosis*, 1999; 143: 145-151.
- 47- **Villegier L, Abifadel M, Allard D, Rabes JP, Thiart R, Kotze MJ, Beroud C, Junien C, Boileau C, Varret M.** The UMD-LDLR database: Additions to the software and 490 new entries to the database. *Human Mutation*, 2002; 20: 81-87.

- 48- **Daniel DLG, Bates PW, Tebon A, Attie AD.** Endoplasmic reticulum localization of the low density lipoprotein receptor mediates presecretory degradation of apolipoprotein B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99(7): 4337-4342.
- 49- **Hobbs HH, Brown MS, Russel DW, Davignon J, Goldstein JL.** Deletion in the gene for the low-density- lipoprotein receptor in a majority of French Canadians with familial hypercholesterolemia. *The New England Journal of Medicine*, 1987; 317(12): 734-737.
- 50- **Scholtz CL, Peeters AV, Hoogendijk CF, Thiart R, Villiers JNP, Hillermann R, Liu J, Marais AD, Kotze MJ.** Mutation -59 →t in repeat 2 of the LDL receptor promoter: reduction in transcriptional activity and possible allelic interaction in a south African family with familial hypercholesterolaemia. *Human Molecular Genetics*, 1999; 8(11): 2025-2030.
- 51- **Villegier L, Abifadel M, Allard D, Rabes JP, Thiart R, Kotze MJ, Beroud C, Junien C, Boileau C, Varret M.** The UMD-LDLR database: Additions to the software and 490 new entries to the database. *Human Mutation*, 2002; 20: 81-87.
- 52- **Hempel K, Deubel W, Lorenz R, Reiners C.** High gradient magnetic cell sorting and internal standardisation substantially improve the assay for somatic mutations at the glycoporphin A (GPA) locus. *Mutation Research*, 2003; 525: 29-42.
- 53- **Mizukami H, Akane A, Shiono H, Ogawa K.** Molecular evolution of alleles of the glycoporphin A gene. *Legal Medicine*, 2002; 4: 13-20.
- 54- **Ha M, Yoo KY, Cho SH.** Glycoporphin A mutant frequency in radiation workers at the nuclear power plants and a hospital. *Mutation research*, 2002; 501: 45-56.
- 55- **Remaley AT, Ugorski M, Wu N, Litzky L, Burger SR, Moore JS, Fukuda M, Spitalnik SL.** Expression of human glycoporphin A in wild type and glycosylation deficient chinese hamster ovary cells. *The journal of biological chemistry*, 1991; 266(35): 24176-24183.
- 56- **Liu Q, Tanimoto K, Bungert J, Engel JD.** The A γ - globin 3' element provides no unique function(s) for human β globin locus gene regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95(17): 9944-9949.
- 57- **Ougari KE, Teissie J, Benoist H.** Glycoporphin A protects K562 cells from natural killer cell attack role of oligosaccharides. *The Journal of biological chemistry*, 1995; 270(45): 26970-26975.
- 58- **Herrin G, Fildes N, Reynolds R.** Evaluation of the AmpliType PM DNA test system on forensic case samples. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1994; 39(5): 1247-1253.
- 59- <http://users.ren.com/jkimball.ma.ultranet/biologypages/G/glycoproteins>. Erişim tarihi 20.6.2003.
- 60- **Sadıq MFG.** Studies on fetal hemoglobin and gamma globin gene triplication in newborns in Jordan. *Proceedings of the National Science Council, ROC, Part B- Life Sciences*. 1998; 22(3): 108-113.
- 61- **Onat T, Emerk K.** *Temel Biyokimya*, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 1997: 241-250.
- 62- <http://sickle.bwh.harvard.edu/hbsynthesis.html>. Erişim tarihi 20.6.2003.
- 63- **Iannuzzi MC, Dean M, Drumm ML, Hidaka N, Cole JL, Perry A, Stewart C, Gerrard B, Collins FS.** Isolation of additional polymorphic clones from the cystic fibrosis region, using chromosome jumping from D7S8. *Am J Hum Genet*, 1989; 44(5): 695-703.

- 64- **Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA.** Genetic analysis of amplified DNA with immobilised sequence –specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 6230-6234.
- 65- **Yang F, Brune JL, Naylor SL, Cupples RL, Naberhaus KH, Browman BH.** Human group-specific component (Gc) is a member of the albumin family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82(23): 7994-7998.
- 66- **Song YH, Naumova AK, Liebhaber SA, Cooke NE.** Physical and meiotic mapping of the region of human chromosome 4q11-q13 encompassing the vitamin D binding protein DBP/ Gc-Globulin and albumin multigene cluster. *Genome research*, 1999; 9(6): 581-587.
- 67- **Yang F, Bergeron JM, Linehan LA, Lalley PA, Sakaguchi AY, Bowman BH.** Mapping and conservation of the group specific component gene in mouse. *Genomics*, 1990; 7(4): 509-516.
- 68- **Daiger, S. P.; Schanfield, M. S.; Cavalli-Sforza, L. L. :** Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D. *Proc Nat Acad Sci*, 1975; 72: 2076-2080.
- 69- **Jeffreys AJ, Rovie NJ, Patel I, Armour JAL, McLeod A, Collick IC, Gray IC, NeumannR, Gibs M, Crusier M, Hill M, Signer E, Monekton D.** Principles and recent advances in DNA fingerprinting in DNA- Technology and It's forensic application. Berghaus G, Brinkmann B, Rittner C, Staak M. Ed. Berlin: SpringerVerlag, 1990: 3-19.
- 70- **Westwood S, Werret DJ.** An evolution of the polymerase chain reaction method for forensic applications. *Forensic Sci Int*, 1990; 45: 201-215.
- 71- **Isacson J, Cao H, Ohlsson L, Nordgren S, Svanvik N, Westman G, Kubista M, Sjöback R, Sehlstedt V.** Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes. *Molecular and Cellular Probes*, 2000; 14: 321-328.
- 72- **Chaturvedi AK, Vu NT, Ritter RM, Confield DV.** DNA typing as a strategy for resolving issues relevant to forensic toxicology. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1999; 44(1): 189-192.
- 73- **Lee HC, Pagliaro EM, Berka KM, Folk NL, Anderson DT, Ruano G, Keith TP, Phipps P, Herrin GL, Garner DD, Gaensslen RE.** Genetic markers in human bone: I. deoksyribonucleic acid (DNA) analysis. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1991; 36(2): 320-330.
- 74- **Remick DG, Kunkel SL, Holbrook EA, Hanson CA.** Theory and applications of the polymerase chain reaction. *AJCP*, 1990, 93(4): 49-54.
- 75- **Walsh PS, Fildes N, Loue AS, Higuchi R.** Report of the blind trial of the cetus AmpliType HLADQ α forensic DNA amplification and typing kit. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1991; 36(5): 1551-1556
- 76- **Schneider PM, Rittner C.** Experience with the PCR-based HLADQ alpha DNA typing system in routine forensic casework. *Int J Legal Med*, 1993; 105(5): 295-299.
- 77- **Hochmeister MN, Budowle B, Jung L, Borer UV, Comey CT, Dirnhofner R.** PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts. *Int J Legal Med*, 1991; 104: 229-233.
- 78- **Mizuno N, Senju H, Sekiguchi K, Yoshida K, Kasai K, Sato H.** A Standard of AmpliType PM Typing from aged evidentiary samples. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 2001; 46(3): 677-680.
- 79- **Roy R, Reynolds R.** AmpliType PM and HLADQ alpha typing from pap smear, semen smear and postcoital slides. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1995; 40(2): 266-269.
- 80- **Tsongalis GJ, Anamani DE, Wu AHB.** Identification of urine specimen donors by the PM+HLADQA1 amplification and typing kit. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1996; 41(6): 1031-1034.

- 81- **Medintz I, Chiriboga L, McCurdy L, Kobilinsky L.** Restriction fragment length polymorphism and polymerase chain reaction-HLADQ α analysis of casework urine specimens. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1994; 39(6): 1372-1380.
- 82- **Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann D, Comey CT, Dirnhofer R.** Typing of DNA extracted from compact bone from human remains. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1991; 36(6): 1649-1661.
- 83- **Hsu CM, Huang NE, Tsai LC, Kao LG, Chao CH, Linacre A, Lee JCI.** Identification of victims of the 1998 Taoyuan Airbus crash accident using DNA analysis. *Int J Legal Med*, 1999; 113: 43-46.
- 84- **Tahir MA, Balraj E, Luke L, Gilbert Hamby JE, Amjad M.** DNA typing of samples for polymarker, DQA1 and nine STR loci from a human body exhumed after 27 years. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 2000; 45(4): 902-907.
- 85- **Trivedi R, Chattopadhyay P, Kashyap VK.** A new improved method for extraction of DNA from teeth for the analysis of hypervariable loci. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 2002; 23(2): 191-196.
- 86- **Yamamoto T, Uchihi R, Kajima T, Nozawa H, Huang X-L, Tamaki K, Katsumata Y.** Maternal identification from skeletal remains of an infant kept by the alleged mother for 16 years with DNA typing. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1998; 43(3): 701-705.
- 87- **Potsch L, Meyer V, Rothschild S, Schneider PM, Rittner C.** Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. *Int J Legal Med*, 1992; 105(3): 139-143.
- 88- **Hsu CM, Huang NE, Tsai LC, Kao LG, Chao CH, Linacre A, Lee JCI.** Identification of victims of the 1998 Taoyuan airbus crash accident using DNA analysis. *Int J Legal Med*, 1999; 113: 43-46.
- 89- **Uchihi R, Tamaki K, Kojima T, Yamamoto T, Katsumata Y.** Deoxyribonucleic acid (DNA) typing of human leukocyte antigen (HLA)-DQA1 from single hairs in Japanese. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1992; 37(3):853-859.
- 90- **Hromadnikova I, Bendukidze N, Mrstinova M, Ivaskova E.** Analysis of paternal alleles in nucleated red blood cells enriched from maternal blood. *Folia Biologica (Praha)*, 2001; 47: 36-39.
- 91- **Romero RL, Juston AC, Ballantyne J, Henry BE.** The applicability of formalin-fixed and formalin fixed paraffin embedded tissues in forensic DNA analysis. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1997; 42(4): 708-714.
- 92- **Sajantila A, Ström M, Budowle B, Karhunen PJ, Peltonen L.** The polymerase chain reaction and post-mortem forensic identity testing: application of amplified D1S80 and HLADQ α loci to the identification of fire victims. *Forensic Sci Int*, 1991; 51: 23-34.
- 93- **Medintz I, Chiriboga L, McCurdy L, Kobilinsky L.** Restriction fragment length polymorphism and polymerase chain reaction-HLADQ α analysis of casework urine specimens. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1994; 39(6): 1372-1380.
- 94- **Fildes N, Reynold R.** Consistency and reproducibility of AmpliType PM results between seven laboratories: field trial results. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1995; 40:279-286.

- 95- **Crouse CA, Feuer WJ, Nippes DC, Hutto SC, Barnes KS, Coffman D, Livingston SH, Ginsberg L, Glidewell DE.** Analysis of HLADQ α allele and genotype frequencies in populations from Florida. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1994; 39(3): 731-742.
- 96- **Evett IW, Weir BS.** Interpreting DNA Evidence. Statistical Genetics for Forensic Scientists. 1st ed, Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc, 1998.
- 97- **Gross MA, Guerrieri RA.** HLADQA1 and polymarker validations for forensic casework: Standard specimens, reproducibility and mixed specimens. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1996; 41(6): 1022-1026.
- 98- **Comey CT, Budowle B, Adams DE, Baumstark AL, Lindsey JA, Presley LA.** PCR amplification and typing of the HLADQ α gene in forensic samples. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1993; 38(2): 239-249.
- 99- **Crouse CA, Vincek V, Caraballo BK.** Analysis and interpretation of the HLA DQ α "1.1 Weak-signal" observed during the PCR-based typing method. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1994; 39(1): 41-51.
- 100- **Grow M, Phillips V, Reynolds R.** Post amplification primer extension of heat- denatured AmpliType PCR products: Effects on typing results. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1996; 41(3): 497-502.
- 101- **Çakır AH, Açık L, Taşdelen B.** Distribution of HLADQA1 and AmpliType PM locus alleles in a Turkish population sample. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 2001; 46(5): 1256.
- 102- **Vural B, Atlıoğlu E, Kulusayın Ö, Togan İ, Büyükdevrim S, Özçelik T.** Turkish population data on the HLADQ α , LDLR, GYPA, HBG, D7S8 and GC loci. *Int J Legal Med*, 1998; 111: 43-45.
- 103- **Yükseloğlu H, Altunçel DH, Filoğlu G, Abacı-Kalfoğlu E, Atasoy S.** Allele frequencies of HLADQA1 and PM in Istanbul (Turkey) population. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 2002; 47(4): 907.
- 104- **Tokdemir M, Dülger HE, Akin H, Doymaz MZ.** A study on polymerase chain reaction-based HLADQ α locus in Elazığ, Turkey. *Am J Forensic Med and Pathol*, 2000; 21 (2): 184-188.
- 105- **Çakır AH, Şimşek F, Altunbaş S.** Distribution of HLADQA1 and AmpliType PM locus alleles in Aegean Region of Turkey. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 2002, 47(3): 671-672.
- 106- **Budowle B, Koons BW, Moretti TR.** Subtyping of the HLADQA1 locus and independence testing with PM and STR/VNTR loci. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1998; 43(3): 657-660.
- 107- **Alkhatat A, Alshamali F, Budowle B.** Population data on the PCR-based loci LDLR, GYPA, HBG, D7S8, Gc, HLADQA1 and D1S80 from Arabs from Dubai. *Forensic Sci Int*, 1996; 81: 29-34.
- 108- **Perez L, Hau J, Garcia O.** HLADQA1 and polymarker allele frequencies in Peru. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 2003; 48(2): 438-439.
- 109- **Vargas CI, Castillo A, Lemus M, Gil AM, Pico AL, Garcia O.** HLADQA1 and polymarker locus allele frequencies in the Northeast region of Colombia (Departments of Santander, Nore de Santander, Boyaca and Casanare). *J Forensic Sci (JFSCA)*, 2003; 48(2): 440-441.
- 110- **Wolfarth R, Nhari LT, Budowle B, Kanoyangwa SB, Masuka E.** Polymarker HLADQA1 and D1S80 allele data in a Zimbabwean black sample population. *Int J Legal Med*, 2000; 113: 300-301.

- 111- **Zehner R, Mebs D, Bratzke H.** Population genetic study of the simultaneously amplified loci HLADQA1, LDLR, GYPA, HBG, D7S8 and GC in a German population sample. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1998; 43(4): 913-914.
- 112- **Tahir MA, Herrera R, Khan AA, Kashyap VK, Duncan G, Barna C, Budowle B, Rowold DJ, Amjad M, Sinha S.** Distribution of HLA-DQA1, Polymarker, CSF1PO, vWA, THO1, TPOX, D16S539, D7S820, D13S317 and D5S818 alleles in East Bengali and West Punjabi populations from Indo-Pak subcontinent. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 2000; 45(6): 1320-1323.
- 113- **Walkinshaw M, Strickland L, Hamilton H, Denning K, Gayley T.** DNA profiling in two Alaskan native populations using HLADQA1, PM and D1S80 loci. *J Forensic Sci (JFSCA)*, 1996, 41(3): 478-484.
- 114- **Nakajima T, Matsuki T, Ohkawara H, Nara M, Furukawa K, Kishi K.** Evaluation of 7 DNA (D1S80, HLADQ α , LDLR, GYPA, HBG, D7S8 and GC) in a Japanese population. *Int J Legal Med*, 1996; 109(1): 47-48.



ÖZGEÇMİŞ

Hüsniye Dağ Canan 1970 yılında Mersin’de doğdu. İlköğrenimini 1976-1981’de Mersin İleri İlkokulu, orta ve lise öğrenimini ise 1981-1984’de Mersin Orta Okulu ile 1984-1988’de Ç.Ü. Sağlık Koleji’nde tamamladı.

Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne 1990 yılında girerek 1994 yılında biyolog olarak mezun oldu.

1994-1995 eğitim yılında Ç. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Adli Tıp Anabilim Dalı’nın açmış olduğu Adli Seroloji Yüksek Lisans programına başladı. 1997-1999’da “Çukurova Yöresinde Haptogloblin Gen Frekanslarının Saptanması” başlıklı teziyle Yüksek Lisans eğitimini tamamladı.

Şubat 1999’da ise yine aynı bölümde Adli Tıp Doktora sınavına girerek Adli Tıp doktora eğitimine başladı. 2001-2003 tarihleri arasında “Çukurova Bölgesinde HLADQA1 ve Polymarker (LDLR, GYPA, HBG, D7S8, GC) lokuslarının allel frekans dağılımları” başlıklı doktora tezini hazırladı.

Halen Ç.Ü.Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı’nda görev yapmaktadır.

Evli ve bir çocuk annesidir.