



**DENİZLİ YÖRESİNDE D1S80 (MCT118), D17S5 (YNZ22), IgJH
POLİMORFİZMLERİ**

Emine DİNÇ

**Eylül 2007
DENİZLİ**

**DENİZLİ YÖRESİNDE D1S80 (MCT118), D17S5 (YNZ22), IgJH
POLİMORFİZMLERİ**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Biyofizik Anabilim Dalı**

Emine DİNÇ

Danışman: Yard. Doç. Dr. Ayfer ATALAY

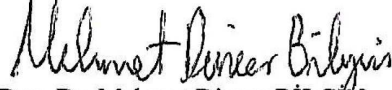
**Eylül 2007
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Emine DİNÇ tarafından, Yrd. Doç. Dr. Ayfer ATALAY yönetiminde hazırlanan 'Denizli Yöresinde D1S80 (MCT118), D17S5 (YNZ22), IgJH Polimorfizmleri" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Ayfer ATALAY
Jüri Üyesi (Danışman)

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 18./09/2020 tarih ve 07.110.16 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Doç. Dr. A. Çevik TUFAN
Müdür

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmam boyunca bana teorik ve pratik bilgilerini sabırla aktaran, yardımlarını eksik etmeyen tez danıŐmanım Yrd. Doç. Dr. Ayfer ATALAY' a ve anabilim dalı baŐkanımız Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY' a sonsuz teŐekkürlerimi sunarım. YaŐamım boyunca her türlü desteği veren, en değerli varlığım olan sevgili aileme ve çalışma süresince bana yardım eden tüm çalışma arkadaşlarıma teŐekkürü borç bilirim.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :
Öğrenci Adı Soyadı : Emine DİNÇ

ÖZET**DENİZLİ YÖRESİNDE D1S80 (MCT118), D17S5 (YNZ22), IgJH
POLİMORFİZMLERİ**

Dinç, Emine
Yüksek Lisans Tezi, Biyofizik ABD
Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Ayfer ATALAY

Eylül 2007, 40 Sayfa

İnsan çekirdek genomu ileri derecede polimorfik yapı gösteren değişken sayıda ve ardışık biçimde tekrarlanan (VNTR) DNA dizilerini içermektedir. Polimorfik özellik taşıyan VNTR dizileri değişken sayıda allel ve yüksek heterozigotluk derecelerine sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı VNTR dizileri; farklı toplumlardaki genetik çeşitlilik araştırmalarının yanı sıra adli tıp, ana-babalık testi ve doğum öncesi tanıda maternal kontaminasyonun kontrol edilmesi gibi uygulama alanlarında yer bulmaktadır.

Bu tez çalışmasında, Denizli yöresinde D1S80 (MCT118), D17S5 (YNZ22), IgJH VNTR bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve agaroz jel elektroforezi tabanlı yöntemler kullanılarak sağlıklı toplumdaki dağılımlarının araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda D1S80 odağının tanımlanmasında agaroz jel yönteminin yeterli olmadığı, D17S5 ve IgJH bölgelerinin tanımlanmasında ise bu yaklaşımın uygulanabilir bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan elde edilen verilere göre, Denizli yöresindeki D17S5 odağında 168- 938 baz çifti uzunluğu arasında 12 farklı allel, 33 genotip ve heterozigotluk derecesi 0.72 değerinde; IgJH odağında ise 470-1020 baz çifti uzunluğu arasında 10 farklı allel, 23 genotip ve heterozigotluk derecesi 0.62 değerinde olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: VNTR, Polimorfizm, D1S80, D17S5, IgJH

ABSTRACT**D1S80 (MCT118), D17S5 (YNZ22), IgJH POLYMORPHISMS IN
DENIZLI PROVINCE**

Dinç, Emine
M. Sc.Thesis in Biophysics
Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ayfer ATALAY

September 2007, 40 Pages

Human nuclear genome contains highly polymorphic variable number of tandem repeat (VNTR) sequences. These polymorphic VNTRs has variable number of alleles and high heterozygosities. For these purpose, VNTRs widely used to investigate the extent of genetic diversity among different populations, paternity determinations, forensic medicine and prenatal diagnosis.

The aim of this thesis is to analyse the diversity of D1S80 (MCT118), D17S5 (YNZ22), IgJH VNTR regions in healthy population in Denizli province by using polymerase chain reaction and agarose gel electrophoretic techniques. According to our results; agarose gel electrophoresis is not appropriate for determination of the D1S80 locus but it is useful to characterize for D17S5 and IgJH locus. On the other hand; 12 different alleles between 168-938 base pairs, 33 genotypes and heterozygosity of 0.72 for D17S5 locus and 10 different alleles between 470-1020 base pairs, 23 genotypes and heterozygosity of 0.62 for IgJH locus were observed.

Keywords: VNTR, Polymorphism, D1S80, D17S5, IgJH

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
Teşekkür	i
Bilimsel Etik Sayfası	ii
Özet	iii
Abstract	iv
İçindekiler	v
Şekiller Dizini	vi
Tablolar Dizini	vii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	viii
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	2
2.1 İnsan Genomunun Genel Yapısı	2
2.2 İnsan Genomunda Yer Alan Polimorfizmler	3
2.3 İnsan Genomunda Yer Alan DNA Dizi Tekrarları	4
2.4 Değişken Sayıda Tekrarlanan DNA Dizileri	6
2.5 D1S80 (MCT118) VNTR Bölgesi	8
2.6 D17S5 (YNZ22) VNTR Bölgesi	10
2.7 IgJH VNTR Bölgesi	10
2.8 İstatistiksel Değerlendirme	11
3 GEREÇLER VE YÖNTEMLER	13
3.1 Genomik DNA İzolasyonu	13
3.2 D1S80, D17S5, IgJH VNTR Bölgelerinin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması	14
3.3 Alel Polimorfizimlerinin Belirlenmesi	16
4. BULGULAR	19
4.1 Örnekler	19
4.2 D1S80 (MCT118) VNTR Bölgesi Polimorfizmi	19
4.3 D17S5 (YNZ22) VNTR Bölgesi Polimorfizmi	22
4.4 IgJH VNTR Bölgesi Polimorfizmi	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
6. KAYNAKLAR	36
7. ÖZGEÇMİŞ	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

	SAYFA
Şekil 2.1 İnsan Genomunun Genel Organizasyonu	3
Şekil 4.1 D1S80 VNTR bölgesinin PCR Ürünleri	20
Şekil 4.2 D1S80 VNTR bölgesinin PCR Ürünleri	20
Şekil 4.3 D17S5(YNZ22) bölgesinin PCR Ürünleri	22
Şekil 4.4 D17S5 (YNZ22) VNTR bölgesi için tespit edilen alellerin % sıklıkları	24
Şekil 4.5 D17S5 (YNZ22) bölgesi için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları	27
Şekil 4.6 IgJH VNTR bölgesinin PCR Ürünleri	28
Şekil 4.7 IgJH VNTR bölgesi için tespit edilen alellerin % sıklıkları	30
Şekil 4.8 IgJH bölgesi için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları	32

TABLO DİZİNİ

	SAYFA
Tablo 2.1 D1S80 (MCT118) VNTR Bölgesi Nükleotid Dizisi	9
Tablo 2.2 D17S5 (YNZ22) VNTR Bölgesi Nükleotid Dizisi	10
Tablo 2.3 IgH VNTR Bölgesi Nükleotid Dizisi	10
Tablo 3.1 Hazırlanan PCR karışımı	15
Tablo 3.2 PCR çoğaltımında kullanılan primer çiftlerinin özellikleri	15
Tablo 3.3 D1S80 VNTR bölgesi için çoğaltım koşulları	15
Tablo 3.4 D17S5 VNTR bölgesi için çoğaltım koşulları	16
Tablo 3.5 IgH VNTR bölgesi için çoğaltım koşulları	16
Tablo 3.6 D1S80 VNTR bölgesinin genel sınıflandırılması	17
Tablo 3.7 D17S5 VNTR bölgesinin genel sınıflandırılması	18
Tablo 3.8 IgJH VNTR bölgesinin genel sınıflandırılması	18
Tablo 4.1 D1S80 (MCT118) bölgesi için çalışılan 50 örnekten elde edilen sonuçlar	21
Tablo 4.2 D17S5 (YNZ22) bölgesi için çalışılan 50 örnekten elde edilen sonuçlar	23
Tablo 4.3 D17S5 (YNZ22) VNTR bölgesi için tespit edilen alellerin % sıklıkları	24
Tablo 4.4 D17S5 (YNZ22) VNTR bölgesi için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları	25
Tablo 4.5 IgJH VNTR bölgesi için çalışılan 50 örnekten elde edilen sonuçlar.....	29
Tablo 4.6 IgJH VNTR bölgesi için tespit edilen alellerin % sıklıkları	30
Tablo 4.7 IgJH VNTR bölgesi için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları	31

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

VNTR	Değişken sayıda ardışık tekrar dizileri
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
STE	Tuz tris EDTA
LINEs	Uzun dağınık tekrar elementleri
SINEs	Kısa dağınık tekrar elementleri
LTR	Uzun terminal tekrarlar

1. GİRİŞ

İnsan mitokondriyal ve çekirdek DNA içeriğinde saptanan polimorfizmler bireyler ve toplumlar arasındaki gensel farklılıkları saptamak ve karşılaştırmak için kullanılan sistemlerdir. Bu sistemler içinde yer alan değişken sayıda ardışık tekrar (VNTR), bölgeleri insan gensel farklılıklarının araştırılmasında kullanılan DNA dizileridir.

İnsan VNTR bölgelerinin polimorfizmi toplumlar arasındaki gen havuzu değişim araştırmalarının yanı sıra adli tıp, ana-babalık testleri ile hastalıklardaki etkilerini araştırmaya yönelik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

İnsan genomunda tanımlanan VNTR bölgelerinden olan D1S80 (MCT118) bölgesinin 16 baz çifti tekrarından oluşan birimleri kromozom 1 p35-p36, D17S5 (YNZ22) bölgesinin 70 baz çifti tekrarından oluşan birimleri kromozom 17 p 13.3, IgJH bölgesinin 50 baz çifti tekrarından oluşan birimleri ise kromozom 14 q 32.33 bölgesine yerleşmişlerdir. Bu bölgeler polimorfizmleri nedeniyle gen havuzu araştırmalarında ve adli tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmamızda, polimorfik yapı gösteren D1S80, D17S5 ve IgJH VNTR bölgelerinin Denizli yöresinde yaşayan bireylerdeki dağılımının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

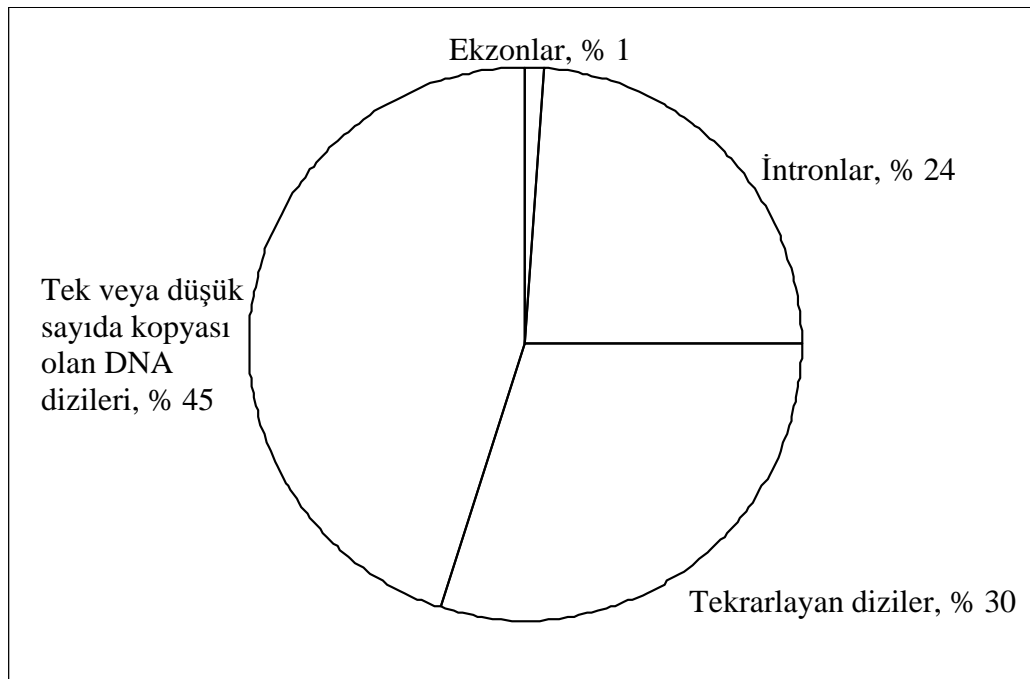
2.1. İnsan Genomunun Genel Yapısı

İnsan genomundaki DNA baz dizilerinin belirlenmesi amacı ile 1980' li yıllarda başlatılan insan genom projesi kapsamında, insan dışında diğer bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda genom bilgileri araştırılmıştır. Bu proje kapsamında insan DNA baz dizilerinin yanı sıra insanlarda hastalığa sebep olan gen/genlerin kimliklendirilmesi; kistik fibrozis, talasemi, orak hücre anemisi gibi genetik hastalıkların erken tanısı; kanser, kalp hastalıkları, şeker hastalıkları gibi hastalıkların oluşturulmasında genetik etkenlerin araştırılması ve elde edilecek bilgiler kullanılarak yeni uygulamaların planlanması amaçlanmıştır. Bu proje, yeni nesil DNA dizi analizi teknolojilerinin, yeni klonlama vektörlerinin ve büyük gen parçalarını klonlama yöntemlerinin geliştirilmesinin yanı sıra elde edilen gen bilgilerinin analizi için yeni nesil bilgisayar teknolojilerinin gelişimine de neden olmuştur. Sonuç olarak uluslararası işbirliği ile *Homo sapiens* genomunun 23 çift kromozomunu oluşturan yaklaşık $3,2 \times 10^9$ baz çiftinin dizi taslağı 2000 yılında tamamlanmıştır (Venter 2001, Baltimore 2001).

İnsan genom projesinden elde edilen bilgilere göre bir insan hücresindeki genomun % 99,9995' i hücre çekirdeğinde, % 0,0005' i mitokondride yer almaktadır. İnsan mitokondri genomunda 37 farklı proteini kodlayan gen olduğu kabul edilmesine karşın hücre çekirdeğindeki proteine kodlanan gen sayısı günümüzde de tartışmalıdır. Gilbert'in insan genomunda yaklaşık 100 bin adet proteine kodlanan gen olduğu varsayımına karşın, günümüzde bu sayının 30.000-40.000 civarında olduğu öngörülmektedir (Strachan 1999, International Human Genome Sequencing Consortium 2001).

Çekirdek genomunun yaklaşık olarak % 25' lik bölümü genler ve genlerle ilişkili DNA dizileri içerirken % 75' lik bölümü gen dışı DNA dizileri içermektedir. İnsan genomunun genlerle ilişkili bölümünde sadece % 1' lik kısım ekzonlarla kaplı iken, geri kalan bölümde intronlar ve ilişkili DNA dizileri yer alır. Gen dışı (intergenic) DNA bölgelerinin yaklaşık olarak % 45' lik bölümü tek veya düşük sayıda kopyası olan DNA dizilerini içerirken, % 30' luk bölümü tekrarlayan DNA dizilerini içerir (Şekil1). İnsan genom projesinin sonuçlarına göre; insan yaşamı için gerekli olan gen sayısının

çekirdek genomunda kapsadığı bölümün beklenenden çok daha düşük oranda bulunması, tekrar dizilerinin oranının ve tek nükleotid polimorfizmi oranının beklenenden çok fazla oranda olması araştırmacıların dikkatinin bu konularda toplanmasına neden olmuştur (Strachan 1999, Makalowski 2001, Venter 2001).



Şekil 2.1: İnsan Genomunun Genel Organizasyonu (Makalowski 2001)

2.2. İnsan Genomunda Yer Alan Polimorfizmler

İnsan genomundaki çeşitliliği gösteren ilk çalışma 1900 yılında Landsteiner ABO kan gruplarını keşfetmesidir. Daha sonra, eritrosit enzimleri ile serum proteinlerinin elektroforetik farklılıkları, insan lökosit antijenleri (Human Leukocyte Antigen, HLA) gibi proteinlerde polimorfizimler saptanmıştır. 1978’ de Kan ve Dozy beta globini kodlayan gen bölgesinin yakınlarındaki DNA dizi polimorfizmleri rapor etmişlerdir. 1980’ de Botstein sınırlı parça uzunlukları polimorfizmleri (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) ile 1985’ te Jeffreys ve arkadaşları DNA parmak izi adını verdikleri yöntemlerle DNA düzeyinde uzunluk polimorfizmleri olduğunu göstermişlerdir. Gelişen DNA teknolojileri ile birlikte 1990 yılından sonra insan genomunda yer alan tek baz polimorfizmlerinin (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) saptanması ile bireylerdeki gen polimorfizmlerinin tek baz değişikliklerinden

DNA parça uzunluk değişikliklerine uzanan boyutları olabileceği açığa çıkarılmıştır (Kidd 2004, Stoneking 2001, Chakravarti 2001).

Belirlenen polimorfizmlerin bir kısmı kan grupları gibi fenotipe yansırken bazı polimorfizmler de gen ürünlerinde ifade edilip yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olmakta, diğer bir kısım polimorfizmler ise herhangi bir fenotopik etkiye sahip olmayıp sessiz kalarak gen düzeyinde çeşitliliklere neden olmaktadır. İnsan genom projesinin sonuçlarına göre, iki insan DNA dizisi karşılaştırıldığında her 1000-2000 nükleotitte bir nükleotidin değiştiği saptanmış olup, bir genomda yer alan yaklaşık 3,2 milyar nükleotidin 1,6-3,2 milyonda tek nükleotid polimorfizmi olabileceği hesaplanmaktadır (Motulsky 1996, Stoneking 2001, Chakravarti 2001, The International SNP Map Working Group 2001).

2.3. İnsan Genomunda Yer Alan DNA Dizi Tekrarları

İnsan genomunda yer alan gen dışında yerleşen ve proteine kodlanmayan DNA dizi tekrarlarının oranı yaklaşık % 30 olarak verilmekle birlikte, genlerle ilişkili bölgelerde de tekrarlanan DNA dizilerinin bulunması göz önüne alındığında, genomdaki tekrar dizilerinin yaklaşık olarak % 50 oranında olduğu işaret edilmektedir. Apolipoprotein, plazminojen, kollajen, serum albümini kodlayan genler DNA tekrar dizileri içeren genlere örnek olarak verilmektedir (Strachan 1999, International Human Genome Sequencing Consortium 2001).

İşlevsel genlerin dışında yer alan DNA tekrar dizileri, genel anlamda kromozom yapısı ve dinamikleri, molekülse gen tanısı ve populasyon araştırmaları için aydınlatıcı araçlar olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak, bu diziler beş sınıfta incelenmektedir;

1. Transposonlardan türeyen DNA tekrar dizileri (Transposon-derived Repeats);

Sıklıkla dağınık tekrarlar adı da verilmektedir. Bu DNA tekrar aileleri etkin biçimde, genomun herhangi bir yerinden başka bölgelere yerleşerek (Transposable Elements) kopya sayılarını arttıran DNA elementleri içerir. Uzun dağınık tekrar elementleri (Long Interspersed Repeat Elements, LINES), kısa dağınık tekrar elementleri (Short Interspersed Repeat Elements, SINES), uzun terminal tekrarlar (Long Terminal Repeat,

LTR) ve DNA transpozonları bu grupta yer alır (International Human Genome Sequencing Consortium 2001, Li 2001).

2. Yalancı genler (*Pseudogenes*); İnsan genomunda RNA gen aileleri veya polipeptit kodlayan genlerin bozuk kopyaları bulunur. Yalancı gen dizileri genin tamamını veya polipeptite kopyalanan diziyi veya genin bir kısmını içerebilir. Alfa globin gen ailesinin bir üyesi, beta globin gen ailesinin üç üyesi yalancı gen olarak tanımlanmaktadır (Strachan 1999, International Human Genome Sequencing Consortium 2001).

3. Parça dublikasyonları (*Segmental Duplication*); Genomun bir bölgesinden diğer bölgesine kopyalanabilen ve yaklaşık olarak 10-300 kb'lık DNA dizilerini içeren elementlerdir. Genomda parça dublikasyonları iki grupta incelenmektedir; birincisi, homolog olmayan kromozomlar arasındaki parça dublikasyonları (interchromosomal duplications) ve ikincisi, aynı kromozom üzerindeki parça dublikasyonları (intrachromosomal duplications). İnsan 22. kromozomun 45-230 pozisyonundaki dizilerin 21. kromozomun q kolu 646-751 pozisyonunda da bulunması, kromozomlar arasında parça dublikasyonlarının oluşumuna, insan 21. kromozomunun q kolunun 188-377 pozisyonundaki dizilerin 14795-15002 pozisyonunda da bulunması ise, aynı kromozom üzerindeki parça dublikasyonlarının oluşumuna örnek olarak verilmektedir (Makalowski 2001). İnsan kromozomlarının perisentromerik ve subtelomerik bölgeleri genomun herhangi bir yerindeki DNA dizilerinin büyük parça dublikasyonlarıyla doludur (International Human Genome Sequencing Consortium 2001).

4. Ardışık olarak tekrarlanan DNA blokları; Sentromer, telomer, akrosentrik kromozomların kısa kollarında ve ribozomal gen ailelerinde gözlenen DNA tekrar dizileridir (International Human Genome Sequencing Consortium 2001).

5. Basit dizi tekrarları (*Simple Sequence Repeats*); Değişik sayıdaki baz dizilerinin ardışık tekrarlarını içeren gruptur ve tekrar dizilerin baz uzunluklarına göre sınıflara ayrılır; her bir tekrar ünitesi 1-9 baz çiftinden oluşan kısa ardışık tekrar DNA dizilerine mikrosatellitler, 9-100 baz çifti gibi daha uzun tekrar birimleri içerenlere minisatellitler, birkaç yüz baz çiftlik uzunlukta tekrar birimleri içeren tekrar dizilerine megasatellit adı verilmektedir (Naslund 2005, Debrauwere 1997, Strachan 1999).

İnsan genomundaki DNA dizi tekrarlarının kromozom yapısını ve dinamiklerini aydınlatmak ve genle ilgili çalışmalarda birçok gereksinime yanıt verebileceği düşünülmektedir (International Human Genome Sequencing Consortium 2001, Makalowski 2001).

2.4. Değişken Sayıda Ardışık Tekrarlanan DNA Dizileri

İnsan genomunda belirli sayıda baz çiftini kapsayan ünitelerin ardışık tekrarlarıyla oluşan DNA dizilerine basit dizi tekrarları adı verilmektedir. Bu tekrar dizilerindeki diğer bir özellik ardışık tekrarlanan ünitelerin tekrar sayılarındaki değişkenliğin genomdaki polimorfizmlere neden olmasıdır. Bu sınıf insan genomunun yaklaşık % 3' ünü kapsar, dolayısıyla yaklaşık olarak genomda her 2 kilobaza bir basit dizi tekrarı karşılık gelir. Basit dizi tekrarları farklı toplumlarda olağanüstü uzunluk polimorfizmi gösterdiklerinden dolayı insan genetik araştırmalar için çok önemlidir (International Human Genome Sequencing Consortium 2001, Makalowski 2001, Tamaki 2005). Basit dizi tekrarlarının sınıflandırmaları farklı araştırmacılar tarafından farklı sayıda DNA bazları ile verilmektedir (Naslund 2005, Debrauwere 1997, Strachan 1999).

İnsan genomundaki basit dizi tekrarları içinde yer alan minisatellit adı verilen 9-100 baz çifti uzunluğunda ardışık tekrarlanan DNA dizilerinin uzunluk polimorfizmleri ile ilgili ilk çalışma Jeffreys ve arkadaşlarının DNA parmakizi adı verdikleri yöntemdir (Motulsky 1996, Kidd 2004). Minisatellit bölgeleri bir toplumun tüm bireylerinde çekirdek DNA dizisi aynı sayıda tekrar ediyorsa monomorfik, tekrar sayısı kişiden kişiye farklı ise polimorfik minisatellitler olarak tanımlanırlar. Polimorfik minisatellitler VNTR dizileri olarak bilinmektedir (Naslund 2005, Kidd 2004). DNA tekrar dizileri, genom içinde ardışık veya dağılmış olarak buldukları gibi farklı uzunluklarda da olabildikleri ve genellikle aynı tekrar birimlerinden oluşmalarına rağmen farklı kompozisyondaki nükleotid dizilerinden de oluştukları bilinmektedir (Brown 2002, Arakura 1998).

Minisatellitlerin insan genomunda dağınık halde bulunmakla birlikte telomerlere yakın bölgelerde ve sentromerik bölgelerde daha fazla yer aldıkları tespit edilmiştir. (Debrauwere 1997, Strachan 1999, International Human Genome Sequencing Consortium 2001). Yapılan çalışmalarda, VNTR dizilerindeki değişkenlik hızının

yüksek olduğu bazı VNTR dizilerindeki değişkenliğin % 15' e kadar ulaşabildiği de gösterilmektedir. VNTR dizilerindeki değişkenlik hızının yüksek olması, tekrar sayısının yani allel büyüklüğünün kişiler arasında farklılık göstereceği ve bu nedenle tek bir toplumda dahi çok sayıda allelin bulunacağı anlamına gelmektedir. Sonuç olarak VNTR dizileri, yüksek mutasyon hızına sahip olmaları nedeniyle yüksek derecede polimorfik yapı ve Mendel kalıtımı göstermeleri ile önemli moleküler işaretleyicileri oluşturmaktadırlar (Jeffrey 1999).

Aşırı değişken VNTR dizileri bazı istisnai örnekleri dışında transkribe edilmezler. Örneğin insanda kromozom 1q' da yer alan MUC1 odağı ifade bulan bir minisatellit bölgesidir. Bu odak, vücut sıvılarında ve bir çok epitelyal dokuda bulunan bir glikoprotein kodlamaktadır ve oldukça polimorfiktir (Strachan 1999).

Yüksek derecede polimorfik VNTR dizilerinde tekrar birimleri homojen ve tek bir tekrar birimi ile sınırlı değildir. Birbirleriyle sıkıca ilişkili tekrar motifleri tek bir allelde varolabilir ve genellikle birçok komşu olmayan tekrar dizisi ile difüze olma eğilimindedir. VNTR bölgelerinin oluşumunda, bu bölgelerde geniş dublikasyon ve delesyon noktalarının tespit edilmesi, allelik polimorfizmde öncelikli işlemlerin replikasyon kayması, kromozomlar arası eşit olmayan parça değişimi (krossing over) ve gen dönüşümü olduğunu işaret etmektedir (Debrauwere 1997, Jeffrey 1999, Richard 2000).

VNTR bölgeleri; allel sayısının fazlalığı, heterozigotluk dereceleri, yüksek derecede polimorfik olmaları, genom içindeki sıklıkları nedeni ile oldukça bilgilendirici karakteristik özelliklere sahiptir (Attila 2004). Son yıllarda yapılan çalışmalarda VNTR dizilerinin önemli işlevsel rolleri bulunmuştur. VNTR dizileri içeren bazı genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde, mRNA stabilizasyonu ve translasyonun da etkili olduğu rapor edilmiştir. Örneğin, monoamin oksidaz A (MAOA) aktivitesindeki farklılıklar MAOA geninin üstünde yer alan bir VNTR dizisinde tekrarlayan ünitelerin sayısına bağlıdır. Ayrıca bazı araştırmacılar insülin bağımlı diabetes mellitus, rahim ve göğüs kanseri gibi bazı hastalıkların VNTR bölgeleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Iwashita 2001, Naslund 2005). Göğüs kanseri olan hastaların tümör hücrelerinde kromozomal değişiklikleri görmek için D6S261, D6S300, D8S272, D11S907, D11S925, D11S927 gibi altı farklı mikrosatellit bölgesi kullanılarak karşılaştırılmalı

analizler yapılmıştır (Buerger 2001). Ayrıca Huntington hastalığının D4S95 bölgesi, koroner arter hastalığının ise ApoB bölgesi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Skraastad 1992, Yalın 2006).

İnsan genomunda VNTR bölgelerinin olağanüstü polimorfik olmalarının yanı sıra çok düşük miktarlardaki DNA örnekleri kullanılarak PCR tabanlı yöntemlerle kolay analiz edilebilmesi ve hızlı olarak kimliklendirilebilmesi, toplumsal gen araştırmaları, ana- babalık testi ve adli tıp gibi araştırma ve uygulamalı alanlarda yaygın olarak kullanılan bir sistemdir (Wan 2004, Das 2003). Kistik fibrosis, orak hücre anemisi, β talasemi gibi hastalıkların doğum öncesi tanısında maternal kontaminasyonun kontrolünde D1S80, Apo B, THO1, D17S5, IgJH, D4S95 gibi VNTR bölgeleri kullanılarak yapılan çalışmaların yeterli bilgileri sağladığı rapor edilmiştir (Antoniadi 2002, Attila 2004).

Bu tez çalışmasında Denizli Bölgesi' nde D1S80 (MCT-118), D17S5 (YNZ22), IgJH adı verilen VNTR bölgelerinin genotip dağılımı araştırılmıştır.

2.5 D1S80 (MCT118) VNTR Bölgesi

D1S80, Nakamura ve arkadaşları tarafından ilk saptanan VNTR bölgelerinden biridir ve ilk olarak pMCT118 probuyla saptandığı için MCT118 adı verilmiştir (Gen bank sequence accession # D28507). 1. kromozomun p 35.36 bölgesinde bulunan D1S80 bölgesi 16 baz çiftinden oluşan ünitelerin değişik sayıda tekrarlarını içermesinden dolayı allel isimlendirilmesi, çoğaltılan parçalardaki tekrar sayısı temel alınarak yapılmaktadır (Arakura 1998, Das 2004).

D1S80 bölgesinin DNA dizi analizlerinde 18 farklı tekrar ünitesi olduğu açığa çıkarılmıştır (Duncan 1997). Aynı allel içerisinde farklı tekrar ünitelerinin olmasının yanı sıra nükleotid değişiklikleri ile insersiyon ve delesyonların olduğu saptanmıştır. D1S80 bölgesinin bu polimorfik özellikleri, allelerin farklı elektroforetik hareketi ile Hinf I, Tsp5091 veya EcoRII enzim kesim bölgelerindeki polimorfizmlerden dolayı olduğu açıklanmıştır (Arakura 1998, Duncan 1997). D1S80 VNTR bölgesinin ileri derecede polimorfik oluşuyla birlikte yüksek derecede ayırt edebilme özelliklerinden

dolayı adli tıpta ve pretanal tanıda maternal kontaminasyonun kontrol edilmesinde kullanımı yaygındır (Arakura 1998, Antoniadi 2002).

Gen bankası sonuçlarına göre ise bu VNTR bölgesi için, 354-850 baz çifti arasında 32 farklı allel saptanmış olup (www.ncbi.nlm.nih.gov) tüm toplumlarda en sık gözlenen allel 24 olarak tespit edilmiştir (Watanabe 2002, Das 2003). Bugüne kadar birçok farklı toplumlarda polimorfizmi çalışılan bu VNTR bölgesinin heterozigotluk derecesi 0.75-0.81 arasında olduğu rapor edilmiştir (Antoniadi 2002).

Tablo 2.1 D1S80 (MCT118) VNTR Bölgesi Nükleotid Dizisi (www.ncbi.nlm.nih.gov)

```

5'accggccccg cacggtgcca aggaacacgc ccacatga ggcgctgaga gaaactggcc tccaacact
gcccggcgc cacggccggc cggctctgcg tgcaatgac tcaggagcgt attccccacg cgccagcact gcattcagat
aagcgtggc tcagt
gtcagcccaa ggaaga
cagaccacag gcaagg
aggaccaccg gaaagg
aagaccaccg gaaagg
aacaccaccg gaaagg
aagaccacag gcaagg
aggaccaccg gaaagg
aagaccaccg gcaagg
aggaccaccg gcaagg
aggaccacca ggaagg
aggaccacca gcaagg
aggaccacca gcaagg
aggaccacca ggaagg
aggaccacca ggaagg
aggaccaccg gcaagg
aggaccacca ggaag
aggaccacca ggaagg
aggaccacca gcaagg
aggaccacca ggaagg
agaaccacca ggaagg
aggaccacca ggaagg
aggaccacca ggaagg
aggaccactg gcaagg
aagaccaccg gcaagc
ctgcaagggg cacgtgcatc tccaacaaga caaaataaac aagccagag gggcttgtga ccagtgtggc attgtcac 3'

```

2.6 D17S5 (YNZ22) VNTR Bölgesi

İlk kez pYNZ22 probuyla saptanan D17S5 VNTR bölgesi kromozom 17 p 13.3 bölgesinde yer almaktadır (Gen bank sequence accession # M21143) (Horn 1989, Luhm 2000). Bu bölgenin tekrar birimleri 70 baz çiftinden meydana gelmiş olup ileri derecede polimorfik olduğu saptanmıştır (Pelotti 2003, Das 2003, Sachdeva 2004). Bu bölgenin Miller-Dieke sendromu ile ilişkili olduğu, göğüs kanserlerinin % 60' ında bu bölgede delesyon bulunduğu rapor edilmiştir (Horn 1989). Farklı toplumlarda yapılan çalışmalarda D17S5 bölgesi; 0.8625 heterozigotluk derecesi ile heterozigositesi en yüksek VNTR bölgesidir (<http://www.gdb.org>).

Tablo 2.2 D17S5 (YNZ22) VNTR Bölgesi Nükleotid Dizisi (www.ncbi.nlm.nih.gov)

```
5' gtcggaagag cggggcaggg agagaaaggt cgaagagtga agtgcacagg agggcaaggcggcctcaccct
gcctgggctg gggcagggct gtgagaccct cccttacaga agcaatgagg gcttgaggag ggggttaggg
gcctgggctg gggcagggct gtgagaccct cccttacaga agcaatgagg gcttgagggg ggggttaggg
gcctgggctg gggcagggct gtgagaccct cccttacaga agcaatgagg gcttgagggg ggggttaggg
gcctgggctg gggcagggct gtgagaccct cccttacaga agcaatgagg gcttgagggg ggggttaggg
gcagtaagtt aactggggag gcggatgtgg gggaacgctg aagaataaag actgtgggca cagcagac 3'
```

2.7 Ig JH VNTR Bölgesi

İnsan immunglobulin ağır zincirinin birleşme (joining, J_H) bölgesini kodlayan gen ailesinin 5' bölgesinde bulunan ve IgJH bölgesi olarak tanımlanan bölgede 50 baz çiftinden oluşan tekrar üniteleri bulunur (Gen bank sequence accession # Y00130). Kromozom 14 q 32.33 bölgesinde yerleşen IgJH' in 11 farklı alleli saptanmıştır (Bin'ko 2002).

Tablo 2.3 IgJH VNTR Bölgesi Nükleotid Dizisi (www.ncbi.nlm.nih.gov)

```
5' gggccctgtc tcaagtgggg agctgctcct gctcaaggac tgtcttccgc gggatcg
aaaggccgcg tcctgaacaa tgcgtgggcc acgtgagcgg agcaggctct
aaaggccgcg tcctaacag tgcgtgggcc acgtgagcgg agcaggctct
aaaggccgcg tcctaacag tgcgtgggcc acgtgagcgg agcaggctct
aaaggccgcg tcctaacag tgcgtgggcc acgtgagcgg agcaggctct
aaaggccacg tcctaacag tgcgtgggcc acgtgagcgg agcaggctct
aaaggccgcg tcctaacag tgtgtgggcc acgtgagcgc cctctccact
gcctcgggg ccgcagctcc cagctcagct cccagcctg etcagggcag ccaggcca 3'
```

2.8 İstatistiksel Değerlendirme

Allel Sıklıkları ve Hardy-Weinberg Dengesi

Allel sıklığı; herhangi bir allelin bir toplum içindeki göreceli sıklığı olarak tanımlanmaktadır. Bir toplumdaki allellerin sıklıklarındaki değişiklikler genellikle o toplumda meydana gelen gensel değişikliklerin bir ölçüsü olarak alınabilir. Bu nedenle allel sıklıklarının tespitini yapmak önem kazanmaktadır. İki allelli bir sistemde allel sıklığı şu şekilde hesaplanır:

$$\frac{\text{Allel sıklığı} \times (2 \times \text{Homozigot bireylerin sayısı}) + (\text{Heterozigot bireylerin sayısı})}{2 \times \text{Toplam birey sayısı}} =$$

VNTR' lar ikiden fazla allele sahiptirler fakat genotip sıklıkları iki allelli bir bölgede olduğu gibidir. D17S5 (YNZ22), IgJH için tespit edilen allellerin sıklıkları aşağıda verilen eşitlik temel alarak hesaplanmıştır.

$$X_i = \frac{2 n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n}$$

X_i = i allelinin sıklığı

n_{ii} = A_iA_i genotipine sahip homozigot bireylerin sayısı

n_{ij} = A_iA_j genotipine sahip heterozigot bireylerin sayısı

n = toplam birey sayısı

Heterozigotluk

Heterozigotluk terimi herhangi bir toplumdaki gensel çeşitliliğin ölçüsü olarak kullanılır ve bir toplumda mevcut heterozigotların toplam sıklıklarının ifadesidir. Heterozigotluk, bir odakla ilgili çok sayıda ve birbirlerine eşit sıklıkta alleller bulunduğu durumlarda en büyük değerini almaktadır (Hartl 1997).

Bir toplumda gözlenen ve beklenen heterozigotluk aşağıdaki eşitlikle hesaplanır;

$$\text{Gözlenen Heterozigotluk (Ho)} = \frac{\text{Heterozigot bireylerin sayısı}}{\text{Toplam birey sayısı}}$$

$$\text{Beklenen heterozigotluk (h)} = \frac{2n(1 - \sum Xi^2)}{2n-1}$$

Xi = i allelinin sıklığı

n = toplam birey sayısı

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Bu tez çalışmasında, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı DNA Bankasından alınan, daha önce β globin geninde herhangi bir mutasyon saptanmayan 50 örnek kullanılmıştır. Örnekleme sürecinde, bireylerden Bilgilendirilmiş Onay Formu alınarak elde edilen DNA'lar anonim biçimde DNA Bankasına konulmuştur.

3.1. Genomik DNA İzolasyonu

1. Potasyum EDTA'lı tüplere beş ml kan alındı.
2. Bir ml kan örneği üzerine beş ml 1x retikülosit tuz çözeltisi eklendi, hafif biçimde karıştırıldı, 600 g' de 15 dakika santrifüj yapıldı ve üst sıvı atıldı.
3. Santrifüj sonrası elde edilen çökelti, en az üç kez 1x retikülosit tuz çözeltisi ile yıkandı. Her seferinde 600 g' de 15 dakika santrifüj yapıldı.
4. Yıkama işleminden sonra çökelti üzerine üç ml soğuk lizat çözeltisi eklenerek çözelti berraklaşmaya kadar buz içerisinde bekletildi. Çözelti berraklaştıktan sonra 1900 g' de 15 dakika santrifüjlendi ve üst sıvı atıldı.
6. Çökelti üzerine, bir ml 1xSTE çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve 1900 g' de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlandı.
7. Nükleer pellet üzerine, 0.45 ml 1xSTE çözeltisi eklenerek, vortekslendi ve steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 100 μ g/ml derişimde olacak şekilde Proteinaz-K ve % 1 olacak şekilde SDS (sodyum dodesil sülfat) eklendi.
8. Tüp 37 ⁰C' ta gece boyu bekletildi.
9. Gece boyu bekletmeden sonra, tüp üzerine eşit miktarda doymuş fenol eklenerek karıştırıldı. Karışım, 11.000 g' de 15 dakika santrifüjlendi ve üst faz, temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
10. Üst faz üzerine eşit miktarda, kloroform / izoamilalkol (24:1) eklendi ve karıştırıldı. Karışım 11.000 g' de 15 dakika santrifüjlendi ve üst sıvı faz temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
11. Üst fazı üzerine, 1/10 oranında 3M sodyum asetat (pH: 5) eklendi ve saf etanol ile 20 kat hacime kadar çoğaltıldı. DNA tüp içinde ipliksi görünüm aldıktan sonra steril mikrosantrifüj tüpüne alındı.

12. Mikrosantrifüj tüpü içerisinde bulunan DNA üzerine, 500 µl %70' lik etanol eklenerek karıştırıldı ve 11.000 g' de iki dakika santrifüjlenerek etanol atıldı.
13. DNA steril saf suda çözüldü.
14. Elde edilen DNA' nın derişimi ve optik yoğunluk (OD₂₆₀) değeri "Eppendorf DNA Fotometre" ile ölçüldü.
15. Elde edilen DNA elektroforezle kontrol edildi.

Kullanılan Çözeltiler

5X Retikülosit Tuz (Salin) Çözeltisi

Sodyum Klorür	686 mM
Potasyum Klorür	25 mM
Magnezyum Klorür	35 mM

Lizat Hazırlama Çözeltisi

Amonyum Klorür	155 mM
Potasyum Bikarbonat	10 mM
Disodyum EDTA	0.1 mM

STE (Salin-Tris-EDTA) Çözeltisi

Sodyum Klorür	100 mM
Tris HCl	10 mM (pH: 8.0)
EDTA (Disodyum Tuzu)	1 mM

Proteinaz K (Amresco 20 mg/ml)

% 10 SDS: 10 gr SDS 100 ml distile suda çözülür.

3.2 D1S80, D17S5, IgJH VNTR Bölgelerinin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

50 DNA örneğinde D1S80, D17S5, IgJH VNTR bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Tablo 3.1' de verilen bileşenlerle 50 µl' lik PCR karışımı hazırlandı. Bu VNTR bölgeleri için farklı tüplerde hazırlanan PCR karışımında bulunan primerlerin özellikleri Tablo 3.2' de verilmiştir.

Tablo 3.1 Hazırlanan PCR Karışımı

PCR Bileşenleri	Miktar	Derişim
dH ₂ O (Steril)	27 µl	-
Tampon (Buffer BIORON, 10X)	5 µl	1X
dNTPmix (0.5 mM)	5 µl	0.1 mM
Mg ⁺² (BIORON, 16 mM)	5 µl	1.6 mM
Primer 1 (10 pmol/ µl)	1 µl	10 pmol
Primer 2 (10 pmol/ µl)	1 µl	10 pmol
Taq DNA <i>Polymerase</i> (BIORON) (5 U/µl)	1.5 µl	1.5 U / µl
DNA (0.1-0.2 M)	1 µl	1 µg / 50 µl
Toplam Hacim	50 µl	50 µl

Tablo 3.2 PCR çoğaltımında kullanılan primer çiftlerinin özellikleri

Primer Adı	Primer Dizisi	Büyüküğü
PAM 502 (IgJH)	5' GGG CCC TGT CTC AGC TGG GGA 3'	21 mer
PAM 503 (IgJH)	5' TGG CCT GGC TGC CCT GAG CAG 3'	21 mer
PAM 504 (D1S80)	5' GAA ACT GGC CTC CAA ACA CTG CCC GCC G 3'	28 mer
PAM 505 (D1S80)	5' GTC TTG TTG GAG ATG CAC GTG CCC CTT GC 3'	29 mer
PAM 506 (D17S5)	5' CGA AGA GTG AAG TGC ACA GG 3'	20 mer
PAM 507 (D17S5)	5' CAC AGT CTT TAT TCT TCA GCG 3'	21 mer

PCR karışımları, ısısal döngü cihazında (*Technogene Thermo cycler*), her bir VNTR bölgesi için ayrı uygulanacak olan çoğaltım koşullarında hazırlanan programa konuldu. Tablo 3.3' de D1S80, Tablo 3.4' de D17S5 ve Tablo 3.5' de IgJH VNTR bölgelerinin çoğaltımı için kullanılan ısısal döngü cihazındaki program koşulları verilmiştir.

VNTR bölgelerinin çoğaltım reaksiyonları % 1' lik agaroz jelde elektroforez yapılarak PCR ürünlerinin varlığı görüntüleme cihazında (UVItec) görüntülendi.

Tablo 3.3 D1S80 VNTR bölgesi için çoğaltım koşulları

Olay	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	94 °C	1 dk	30
Primer Bağlanması ve Uzaması	65 °C	1 dk	
Son Uzama	70 °C	5 dk	1

Tablo 3.4 D17S5 VNTR bölgesi için çoğaltım koşulları

Olay	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	94 °C	30 s	30
Primer Bağlanması	55 °C	15 s	
Uzama	72 °C	1 dk	
Son Uzama	72 °C	5 dk	1

Tablo 3.5 IgJH VNTR bölgesi için çoğaltım koşulları

Olay	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	94 °C	1 dk	30
Primer Bağlanması ve Uzaması	68 °C	3 dk	
Son Uzama	68 °C	3 dk	1

3.3 Allel Polimorfizmlerinin Belirlenmesi

VNTR bölgelerinin PCR ürünleri alkolle çöktürülerek 20 µl distile suda çözüldü. Yoğunlaştırılan PCR ürünleri % 2' lik SERVA agarozunda molekül ağırlık kontrol örneğiyle (Ambresco DNA step ladder, 100 bç) birlikte elektroforez yapıldı. Elektroforez sonrasında görüntüleme cihazı (UVitec) ile görüntülenerek VNTR bölgelerine ait ürünlerin molekül ağırlıkları hesaplandı.

Tablo 3.6' da D1S80, Tablo 3.7'de D17S5 ve Tablo 3.8' de IgJH VNTR bölgelerine ait allel isimleri ve baz çiftlerine ait genel sınıflandırma verilmiştir.

Tablo 3.6 D1S80 VNTR bölgesinin genel sınıflandırması

No	Allel İsmi	Uzunluk (bp)
1	13	354
2	14	370
3	15	386
4	16	402
5	17	418
6	18	434
7	19	450
8	20	466
9	21	482
10	22	498
11	23	514
12	24	530
13	25	546
14	26	562
15	27	578
16	28	594
17	29	610
18	30	626
19	31	642
20	32	658
21	33	674
22	34	690
23	35	706
24	36	722
25	37	738
26	38	754
27	39	770
28	40	786
29	41	802
30	42	818
31	43	834
32	44	850

Tablo 3.7 D17S5 VNTR bölgesinin genel sınıflandırması

No	Allel İsmi	Uzunluk (bp)
1	1	168
2	2	238
3	3	308
4	4	378
5	5	448
6	6	518
7	7	588
8	8	658
9	9	728
10	10	798
11	11	868
12	12	938

Tablo 3.8 IgJH VNTR bölgesinin genel sınıflandırması

No	Allel İsmi	Uzunluk (bp)
1	6	420
2	7	470
3	8	520
4	9	570
5	10	620
6	11	670
7	12	720
8	13	770
9	14	820
10	15	870
11	16	920
12	17	970
13	18	1020

4. BULGULAR

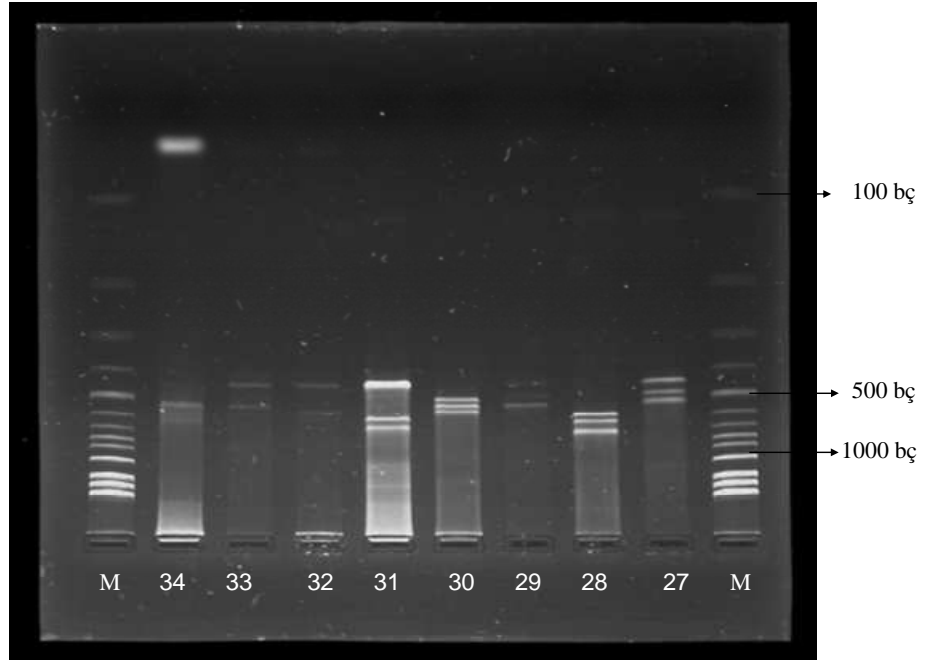
4.1 Örnekler

Bu tez çalışmasında, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı DNA Bankasından alınan ve β globin gen açısından herhangi bir özelliği olmayan 50 normal örnek üzerinde çalışıldı.

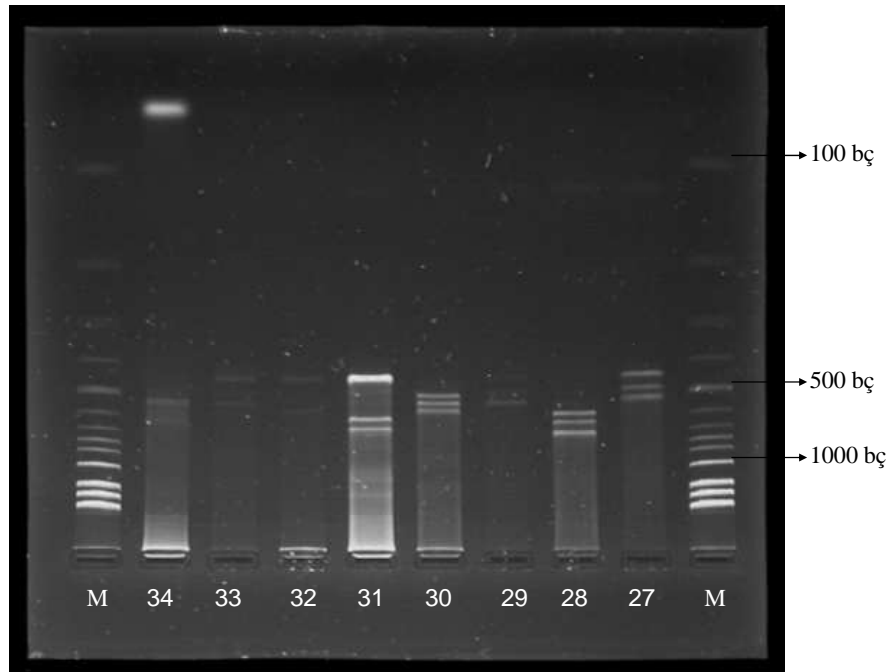
4.2 D1S80 (MCT-118) VNTR Bölgesi Polimorfizmi

D1S80 VNTR bölgesinde tekrar ünitelerinin 16 baz çiftinden oluşması, agaroz jel elektroforezinde, çalışılan örneklerin allel kimliklendirilmesinde sorunlara neden olmuştur. Bu nedenle aynı jel örneklerinde D1S80 bölgesi için farklı elektroforez sürelerinde molekül ağırlık hesaplamaları yapılmıştır. Serva agaroz jelde (% 2) ilk 18 örnek 25 dakika, 30 dakika ve 40 dakika; 19-42 numaralı örnekler birinci gruba göre 10 dakika daha fazla; 43-50 numaralı örnekler ikinci gruba göre 10 dakika daha fazla elektroforezleri yapılarak baz çifti uzunlukları görüntüleme cihazında hesaplanmıştır (Şekil 4.1 ve 4.2). Bu analiz sonuçlarının verildiği Tablo 4.1' de görüldüğü gibi örneklerdeki D1S80 bölgesinin allel tanımlaması tekrar ünitelerinde 16 baz çiftinden oluşması ve elektroforezde 100 baz çifti uzunluklarıyla karşılaştırma yapılması etkenlerinden dolayı tespit edilememiştir.

Çalışılan 50 örnekte bu bölge için 34 tane heterozigotluk ve 16 tane homozigotluk saptanmış olup heterozigotluk derecesi 0,68 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.1 D1S80 VNTR bölgesinin PCR ürünleri (M: Marker, 27-34 arası DNA örnekleri, 40. dakika jel görüntüsü)



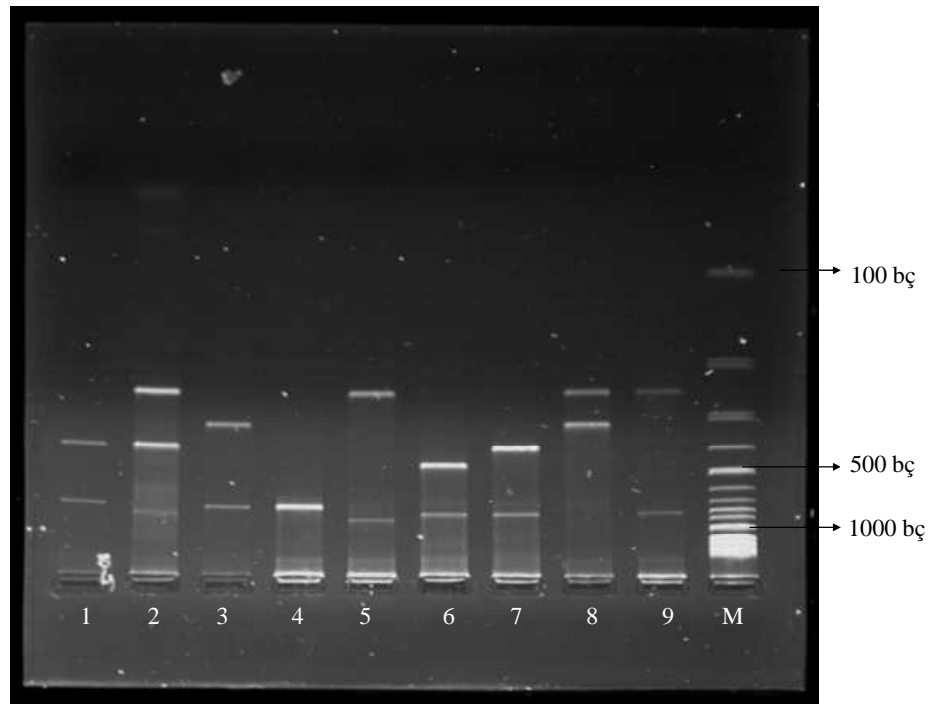
Şekil 4.2 D1S80 VNTR bölgesinin PCR ürünleri (M: Marker, 27-34 arası DNA örnekleri, 50. dakika jel görüntüsü)

Tablo 4.1 D1S80 (MCT-118) bölgesi için çalışılan 50 örnekten elde edilen sonuçlar

DNA	Baz çifti (25.dk)	Baz çifti (30.dk)	Baz çifti (40.dk)	Baz çifti (50.dk)	Baz çifti (60. dk)
1	479/438	561/527	549/516		
2	370	468	458		
3	500	577	560		
4	479	566	554		
5	500/385	577/473	554/463		
6	665/574	735/647	713/616		
7	536/385	600/468	583/454		
8	600/378	665/463	625/445		
9	458	549/531	537/518		
10	558/415	551/408	552/404		
11	670/579	649/579	649/579		
12	468/437	467/438	466/436		
13	468	462	466		
14	670/558	691/572	691/572		
15	519/468	531/472	525/472		
16	579/500	600/518	600/519		
17	437	452	451		
18	509	538	538		
19	615/462	581/468	576/445	576/445	
20	574/523	571/516	576/514	583/512	
21	481	516/481	529/473	525/477	
22	632/574	581/552	584/544	583/552	
23	481	487	486	483	
24	700/481	715/487	677/486	689/488	
25	600/548	623/571	600/580	618/559	
26	648	661	642	700/648	
27	535/500/457	537/500/450	534/494/445	535/495/445	
28	758/685/642	770/677/632	761/679/629	766/681/626	
29	578/474	571/522/467	565/513	562/523	
30	587/448	571/537	609/574/534	608/569/529	
31	738/671/483	741/665/467	736/659/460	732/662/459	
32	642/491	632/480	629/471	600/464	
33	614/491/457	581/487/438	557/465	569/464	
34	600	677/571	669/557	555/523	
35	440	444	445	446	
36	466	461	456	451	
37	656/466	665/467	628/461	634/465	
38	577	590	567	569	
39	588	590	575	562	
40	577	600	567	562	
41	554	581	559	562	
42	738/656	785/677	749/628	732/626	
43	544/443	545/454	577/549/450	587/545/447	589/544/451
44	572	583	611/570	614/563	627/558
45	623/459	658/447	644/469	637/467	688/640/464
46	581	618	608	607	611/589
47	526	552	530	527	521
48	475	512	484	481	481
49	564	600	577	607	617/589
50	544	600	570	569	563

4.3 D17S5 (YNZ22) VNTR Bölgesi Polimorfizmi

D17S5 (YNZ22) VNTR bölgesi için yapılan çoğaltım örnekleri Şekil 4.3' de ve 50 örneğin analiz sonuçları Tablo 4.2' de verilmiştir. Çalışılan örneklerde uzunlukları 168-938 baz çifti arasında değişen 12 farklı allel saptanmış olup bu allellerin gözlenen sıklıkları Tablo 4.3' de ve Şekil 4.4' de özetlenmiştir.



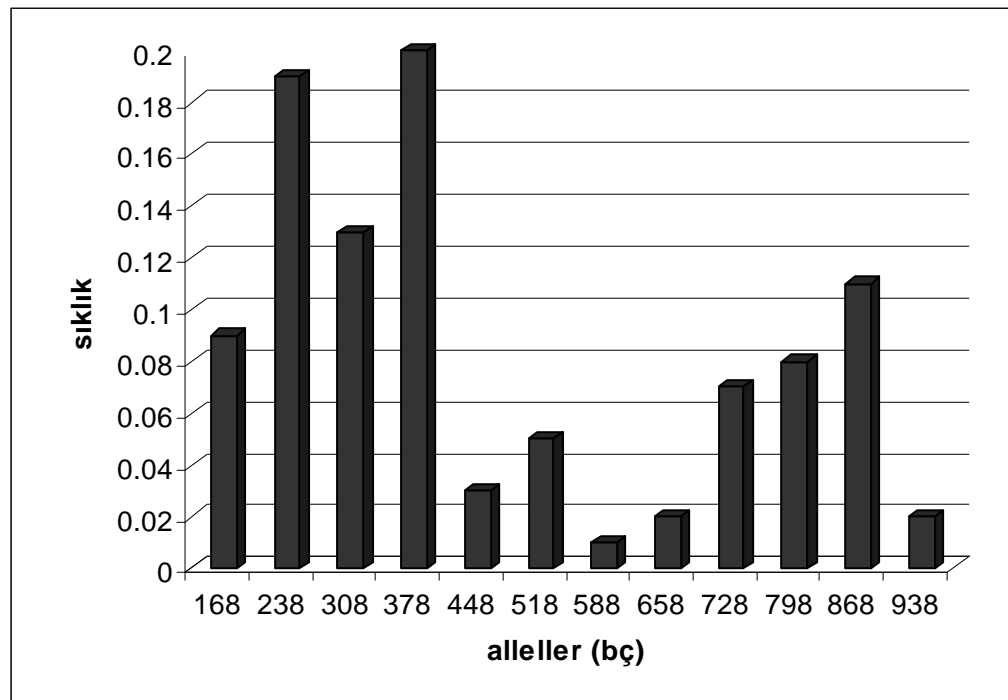
Şekil 4.3 D17S5 (YNZ22) VNTR bölgesinin PCR ürünleri (M: Marker, 1: 378/798, 2: 238/378, 3: 308/798, 4: 798/798, 5: 238/938, 6: 448/868, 7: 378/868, 8: 238/308, 9: 238/868).

Tablo 4.2 D17S5 (YNZ22) bölgesi için çalışılan 50 örnekten elde edilen sonuçlar

Örnek No	Uzunluk (bç)	Tekrar sayısı
1	238/378	2/4
2	308/658	3/8
3	308/378	3/4
4	238/868	2/11
5	378/868	4/11
6	518/518	6/6
7	238/378	2/4
8	868/938	11/12
9	378/518	4/6
10	238/868	2/11
11	238/308	2/3
12	378/868	4/11
13	448/868	5/11
14	238/938	2/12
15	798/798	10/10
16	308/798	3/10
17	238/378	2/4
18	378/798	4/10
19	728/728	9/9
20	238/238	2/2
21	378/378	4/4
22	308/728	3/9
23	798/798	10/10
24	238/308	2/3
25	168/378	1/4
26	308/798	3/10
27	378/728	4/9
28	238/728	2/9
29	168/378	1/4
30	238/238	2/2
31	798/868	10/11
32	168/378	1/4
33	378/658	4/8
34	448/448	5/5
35	238/238	2/2
36	238/238	2/2
37	238/728	2/9
38	308/378	3/4
39	168/308	1/3
40	518/868	6/11
41	308/868	3/11
42	308/518	3/6
43	168/168	1/1
44	378/868	4/11
45	378/378	4/4
46	168/238	1/2
47	728/868	9/11
48	308/308	3/3
49	378/588	4/7
50	168/168	1/1

Tablo 4.3 D17S5 (YNZ22) VNTR bölgesi için tespit edilen allellerin % sıklıkları

Alel no	Uzunluk(bç)	Tekrar sayısı	Gözlenen sayı	Sıklık
1	168	1	9	0.09
2	238	2	19	0.19
3	308	3	13	0.13
4	378	4	20	0.20
5	448	5	3	0.03
6	518	6	5	0.05
7	588	7	1	0.01
8	658	8	2	0.02
9	728	9	7	0.07
10	798	10	8	0.08
11	868	11	11	0.11
12	938	12	2	0.02
Toplam			100	1

**Şekil 4.4** D17S5 (YNZ22) VNTR bölgesi için tespit edilen allellerin % sıklıkları

D17S5 VNTR bölgesi için 33 farklı genotip tespit edilmiş olup gözlenen genotipler yüksek oranda çeşitlilik göstermiştir. Tespit edilen genotiplerin gözlenen sayısı ve sıklıkları Tablo 4.4' de gösterilmektedir.

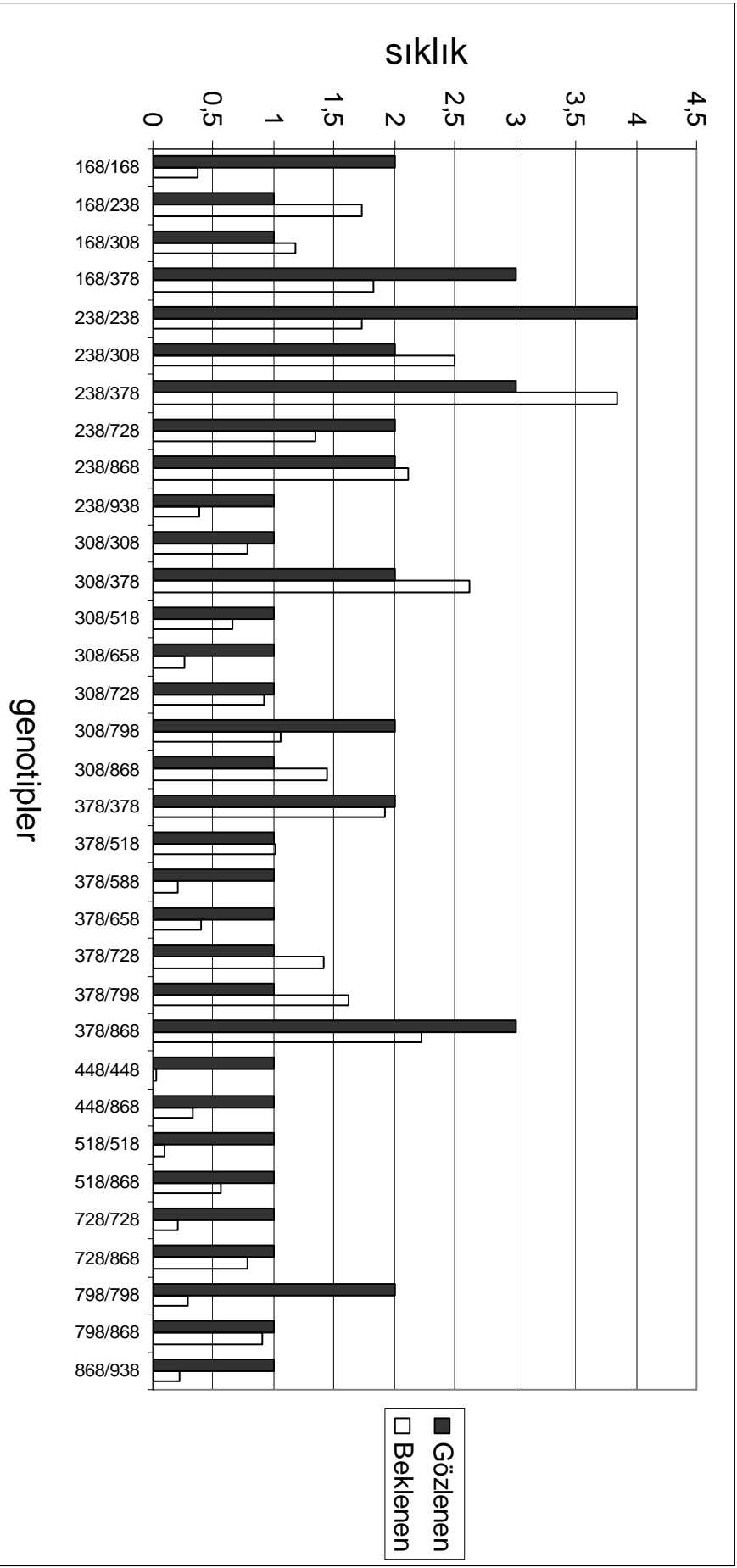
Tablo 4.4 D17S5 (YNZ22) bölgesi için tespit edilen genotiplerin gözlenen sayıları ve sıklıkları

Genotip	Gözlenen sayı	Sıklık
168/168	2	0.04
168/238	1	0.02
168/308	1	0.02
168/378	3	0.06
238/238	4	0.08
238/308	2	0.04
238/378	3	0.06
238/728	2	0.04
238/868	2	0.04
238/938	1	0.02
308/308	1	0.02
308/378	2	0.04
308/518	1	0.02
308/658	1	0.02
308/728	1	0.02
308/798	2	0.04
308/868	1	0.02
378/378	2	0.04
378/518	1	0.02
378/588	1	0.02
378/658	1	0.02
378/728	1	0.02
378/798	1	0.02
378/868	3	0.06
448/448	1	0.02
448/868	1	0.02
518/518	1	0.02
518/868	1	0.02
728/728	1	0.02
728/868	1	0.02
798/798	2	0.04
798/868	1	0.02
868/938	1	0.02
Toplam	50	1

Çalışılan örneklerin D17S5 (YNZ22) VNTR bölgesi saptanan allel sıklıkları ile GENEPOP programında saptanan beklenen sıklıkları ki-kare (chi-square, X^2) testi ile

(*serbestlik derecesi, df, degrees of freedom: 32 X^2 : 78,22*) değerlendirilmiştir. Tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları arasında fark olmadığı ($p>0,05$), diğer bir deyişle çalışma grubunun bu bölge için Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

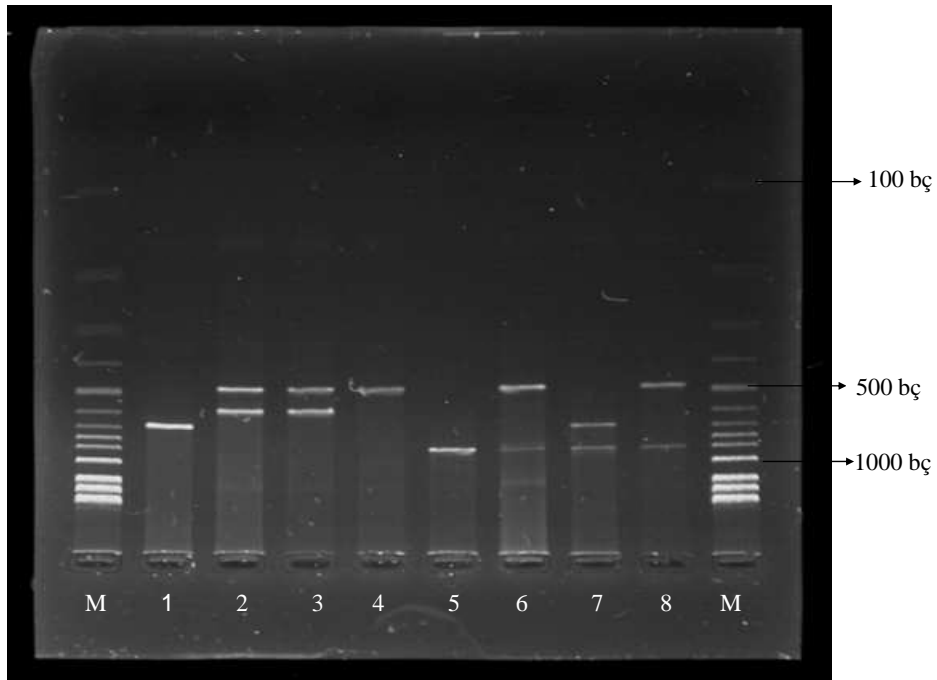
Çalışılan örneklerden elde edilen sonuçlara göre D17S5 VNTR bölgesi için gözlenen heterozigotluk derecesi 0.72 ve beklenen heterozigotluk derecesi 0.88 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.5 D17S5 (YNZ22) bölgesi için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları

4.4 IgJH VNTR Bölgesi Polimorfizmi

Bu çalışmada IgJH VNTR bölgesi için değerlendirilen çoğaltım örnekleri Şekil 4.6' da ve 50 örneğin analiz sonuçları Tablo 4.5' de verilmektedir. Örneklerde uzunlukları 470-1020 baz çifti arasında değişen 10 farklı allel saptanmış olup bu allellerin gözlenen sıklıkları Tablo 4.6' da ve Şekil 4.7' de özetlenmiştir.



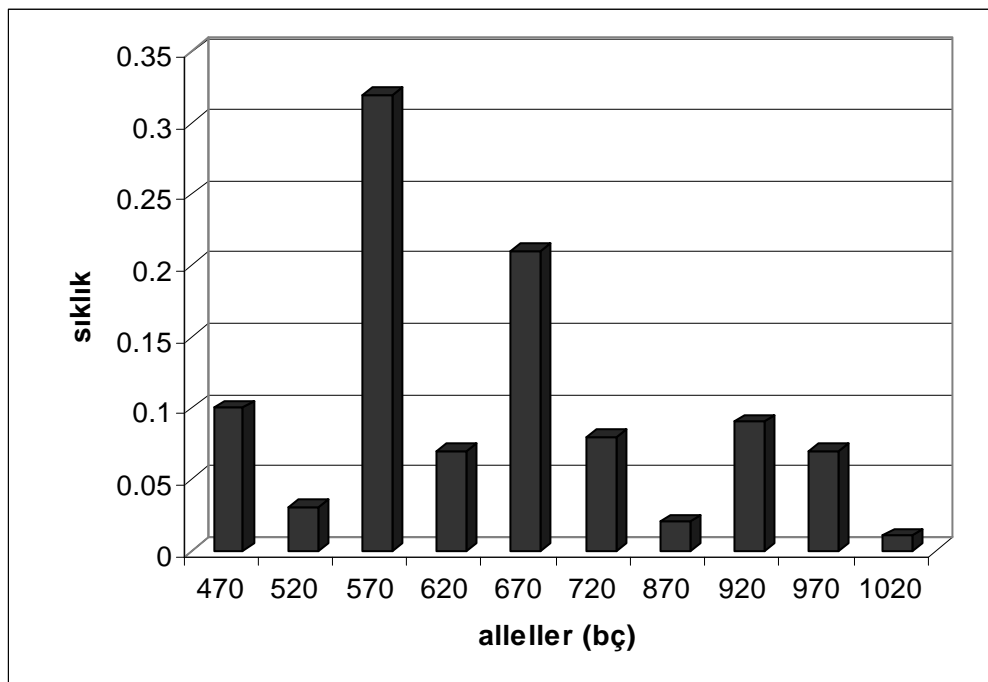
Şekil 4.6 IgJH VNTR bölgesinin PCR ürünleri (M: Marker, 1: 670/670, 2: 570/470, 3: 570/470, 4: 470/470, 5: 920/920, 6: 920/470, 7: 920/670, 8: 920/470).

Tablo 4.5 IgJH VNTR bölgesi için çalışılan 50 örnekten elde edilen sonuçlar

Örnek No	Uzunluk (bç)	Tekrar sayısı
1	720/720	12/12
2	520/720	8/12
3	620/970	10/17
4	620/720	10/12
5	620/970	10/17
6	620/620	10/10
7	970/970	17/17
8	620/720	10/12
9	620/720	10/12
10	570/570	9/9
11	570/570	9/9
12	470/570	7/9
13	470/570	7/9
14	720/970	12/17
15	570/970	9/17
16	570/1020	9/18
17	570/970	9/17
18	570/720	9/12
19	470/570	7/9
20	670/670	11/11
21	570/920	9/16
22	570/570	9/9
23	920/920	16/16
24	470/570	7/9
25	670/670	11/11
26	570/670	9/11
27	470/920	7/16
28	670/920	11/16
29	470/920	7/16
30	920/920	16/16
31	470/470	7/7
32	470/570	7/9
33	470/570	7/9
34	670/670	11/11
35	670/670	11/11
36	670/920	11/16
37	570/670	9/11
38	570/570	9/9
39	670/670	11/11
40	570/570	9/9
41	670/670	11/11
42	570/670	9/11
43	570/570	9/9
44	570/670	9/11
45	520/570	8/9
46	570/670	9/11
47	520/670	8/11
48	570/570	9/9
49	570/870	9/15
50	670/870	11/15

Tablo 4.6 IgJH VNTR bölgesi için tespit edilen allellerin % sıklıkları

Allel no	Uzunluk (bç)	Tekrar sayısı	Gözlenen sayı	Sıklık
1	470	7	10	0.10
2	520	8	3	0.03
3	570	9	32	0.32
4	620	10	7	0.07
5	670	11	21	0.21
6	720	12	8	0.08
7	870	15	2	0.02
8	920	16	9	0.09
9	970	17	7	0.07
10	1020	18	1	0.01
Toplam			100	1

**Şekil 4.7** IgJH VNTR bölgesi için tespit edilen allellerin % sıklıkları

IgJH VNTR bölgesi için 23 farklı genotip tespit edilmiştir. Tespit edilen genotiplerin gözlenen sayıları ve sıklıkları Tablo 4.7' de gösterilmektedir.

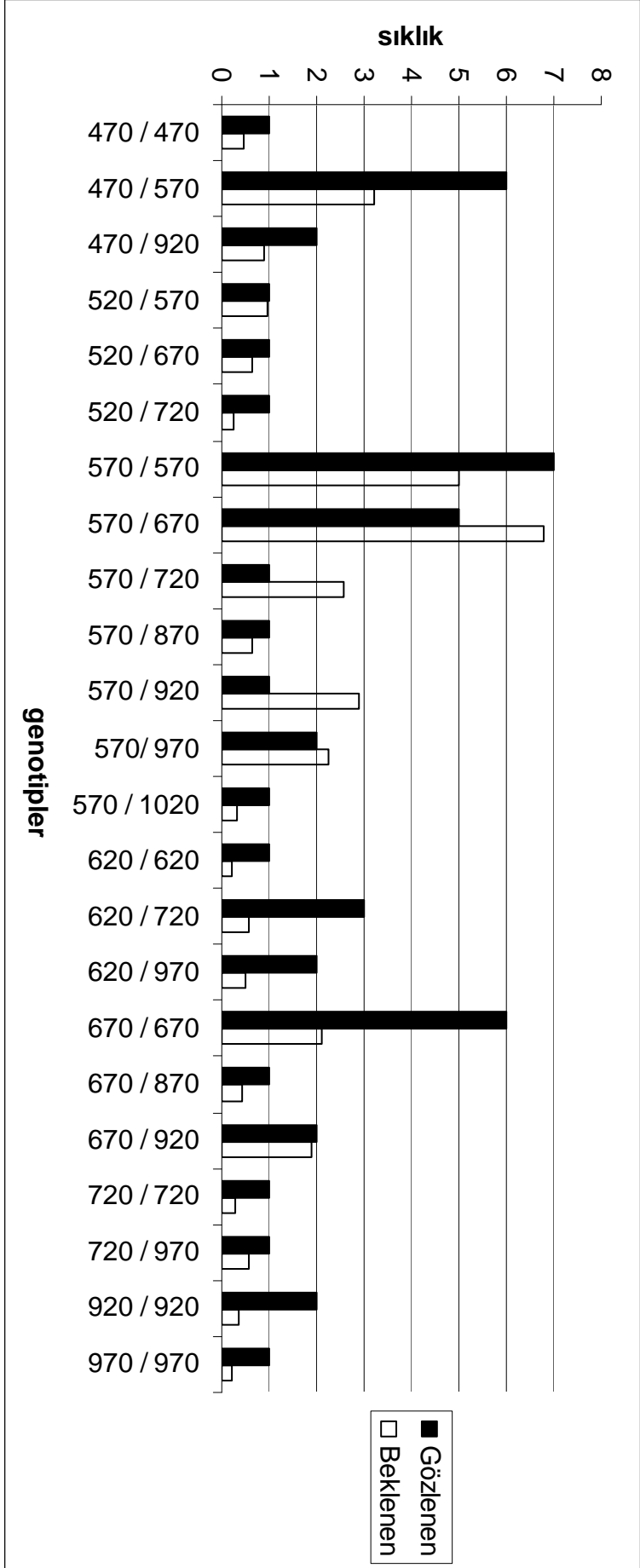
Tablo 4.7 IgJH VNTR bölgesi için tespit edilen genotiplerin gözlenen sayıları ve sıklıkları

Genotip	Gözlenen sayı	Sıklık
470/470	1	0.02
470/570	6	0.12
470/920	2	0.04
520/570	1	0.02
520/670	1	0.02
520/720	1	0.02
570/570	7	0.14
570/670	5	0.10
570/720	1	0.02
570/870	1	0.02
570/920	1	0.02
570/970	2	0.04
570/1020	1	0.02
620/620	1	0.02
620/720	3	0.06
620/970	2	0.04
670/670	6	0.12
670/870	1	0.02
670/920	2	0.04
720/720	1	0.02
720/970	1	0.02
920/920	2	0.04
970/970	1	0.02
Toplam	50	1

Çalışılan örneklerin IgJH bölgesine ait saptanan allel sıklıkları ile GENEPOP programında saptanan beklenen sıklıkları ki-kare (chi-square, X^2) testi ile (*serbestlik derecesi, df, degrees of freedom:22 $X^2 : 9.33$*) değerlendirilmiştir. Tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış ($p>0,05$) olup bu lokusun Hardy-Weinberg dengesinden saptığı tespit edilmiştir.

Çalışılan örneklerden elde edilen sonuçlara göre IgJH VNTR bölgesi için gözlenen heterozigotluk derecesi 0.62 ve beklenen heterozigotluk derecesi 0.82 olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.8 IgJH bölgesi için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları



6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çekirdek ve mitokondriyal DNA polimorfizmleri toplumlar arası gensel farklılıkları karşılaştırmak için önem verilen sistemlerdir. İleri derecede polimorfik olan VNTR bölgeleri, hızlı genotip saptama yöntemleri ve allel çeşitlilikleri nedeniyle toplumsal gen araştırmalarında en yaygın kullanılan çalışma bölgeleridir. İnsan genomundaki VNTR bölgeleri toplumsal gen araştırmalarının yanı sıra adli tıp, ana-babalık testi ve doğum öncesi tanı gibi uygulama alanlarında da kullanılmaktadır (Sachdeva 2004, Yalın 2006). Özellikle, talasemiler, kistik fibrozis, orak hücre anemisi gibi gensel hastalıkların doğum öncesi tanısı sırasında alınan örneklerdeki (koryonik villus, amniyotik sıvı gibi) maternal kontaminasyonun belirlenmesinde VNTR bölgelerinin karşılaştırmalı kullanımı önem taşımaktadır (Antoniadi 2002).

Denizli yöresinde β -talasemi ve anormal hemoglobinler en sık rastlanan kalıtsal hastalıklardandır (Yıldız 2004, Atalay 2005). Biyofizik Anabilim Dalı' nda β -talasemi ve anormal hemoglobinler için doğum öncesi tanı programında, mutasyon analizlerinin yanı sıra maternal kontaminasyonun tesbitinde D1S80 (MCT118), D17S5 (YNZ22), IgJH, Apo B ve D4S95 VNTR bölgelerinin tanımlaması yapılmaktadır. Yöremizdeki hemoglobinopatilerin prenatal tanı uygulamalarında maternal kontaminasyonun belirlenmesinde kullanılan VNTR dizilerinden hangisinin öncelikli yere sahip olduğuna ilişkin bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışmasının planlanmasındaki temel amaç, yöremize ilişkin bilgilerin elde edilmesine yöneliktir. Bu hedef doğrultusunda elde edilecek verilerin yöremizdeki prenatal tanı çalışmalarına katkı oluşturacağı öngörülmüştür.

Prenatal tanıdaki maternal kontaminasyonun tesbitinde kullandığımız beş odaktan üç tanesi olan D1S80 (MCT118), D17S5 (YNZ22), IgJH VNTR odakları tez çalışması kapsamında incelenmiştir.

D1S80 (MCT118) VNTR bölgesinin yüksek derecede polimorfizm gösterdiği bilinmektedir. Bu özelliği nedeni ile D1S80 odağı bu alanda çalışan araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bütün toplumlarda en sık gözlenen D1S80 VNTR allelinin, 530 baz çifti uzunluğundaki 24 tekrarlı DNA dizisi olduğu gösterilmiştir (Das 2004). Bugüne kadar D1S80 VNTR odağının farklı toplumlardaki polimorfizmi ile ilgili elde edilen

veriler, bu bölgenin D17S5 VNTR bölgesinden sonra 0.8080 ile en yüksek heterozigotluk derecesine sahip olduğunu göstermektedir (<http://www.gdb.org>). Ayrıca bu odakta allel 13 ve allel 44 arasında uzunluk polimorfizmlerinin yanı sıra baz değişiklikleri bulunan 32 tane farklı allel tespit edilmiş olup nükleotid dizi bankası verilerinde dizileri verilmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Türkiye’ de yapılan bir çalışmada, 17 farklı allel, 30 farklı genotip gösterilmiş olup 24 tekrar DNA dizisinin en sık gözlenen allel olduğu bildirilmiştir (Çakır 2001). Diğer taraftan İstanbul bölgesine yönelik bir çalışmada da, 24 tekrarlık dizinin sıklıkla gözlemlendiği gösterilmiştir (Akgüneş 2002).

Bu tez çalışmasında D1S80 VNTR bölgesi % 2’ lik Serva agarozda 100 baz çifti merdiven DNA dizileriyle (marker) birlikte elektroforez yapılarak baz çifti uzunluğu saptanmıştır. Ancak elektroforezde kullanılan agarozun ayırt edici özelliği nedeni ile 16 baz çifti uzunluğunda tekrar birimleri içeren D1S80 odağının kantitatif tanımlanmasında yeterli olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışmada anlamlı veri olarak 50 örneğin 34 tanesi heterozigot, 16 tanesi homozigot olarak tespit edilmiş olup gözlenen heterozigotluk derecesi 0.68 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda bu VNTR odağına özgü allel tespiti ve genotip dağılımı yapılamamış olup istatistiksel anlamı olan verilere ulaşılamamıştır. Bu odakta sayısal biçimde allel tespitinin yapılabilmesinde, PAGE (Poliakrilamid Jel Elektroforezi), kapiller jel elektroforezi (BeckmanCoulter CEQ 8000 Genetic Analysis System) gibi tekniklerin kullanılmasının daha doğru bir yaklaşım olacağı sonucuna varılmaktadır (Duncan 1997, Arakura 1998, Sachdeva 2004, Cakir 2001, Akgunes 2002).

D17S5 (YNZ22) VNTR bölgesi 70 baz çifti DNA dizi tekrarları içerir ve bugüne kadar farklı toplumlarda en yüksek heterozigotluk derecesi (0.8625) saptanan VNTR odağıdır (<http://www.gdb.org>). Hindistan’ da bu odak için 2 (238) ve 4 (378) numaralı allellerin, Avrupa, Afrika ve Çin toplumlarında ise 4 (378) numaralı allelin baskın olduğu bildirilmiştir (Das 2003, Sachdeva 2004, Ruangjirachuporn 2006). Bununla birlikte, farklı allel sayısı konusunda D1S80 bölgesinde olduğu gibi herhangi ayrıntılı bir nükleotid dizi çalışmasına rastlanmamıştır.

D17S5 VNTR bölgesi için Türkiye’ de yapılan çalışmada 168-728 baz çifti uzunluğu arasında yer alan 8 farklı allel ve 17 farklı genotip bildirilmiştir. Bu çalışmada en sık gözlenen allelin 378 baz çifti uzunluğundaki VNTR dizisi olduğu gösterilmiştir (Gümüş 2004).

Bu tez çalışmasında Denizli yöresinde D17S5 (YNZ22) odağında 168- 938 baz çifti uzunluğu arasında 12 farklı allel gözlenmiş olup 33 farklı genotip tespit edilmiştir. Ayrıca en sık gözlenen allelin 378 (Allel 4) baz çifti uzunluğunda (0.20) olduğu saptanmıştır. Çalışmamızdaki örneklerin az sayıda olmasına karşın göreceli olarak çok sayıda farklı allel ve genotip gözlenmesi, heterozigotluk derecesinin 0.72 değerine sahip olması dikkat çekicidir. Ayrıca D17S5 (YNZ22) bölgesi için GENEPOP programında hesaplanan gözlenen ve beklenen genotip sıklıkları arasında fark olmadığı ($p>0,05$), diğer bir deyişle çalışma grubunun bu odak için elde edilen verilerin Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

IgJH VNTR bölgesi için çeşitli toplumlara yönelik olarak yapılan çalışmalarda bu bölgeye ait allel sıklıkları konusunda farklı sonuçlar bulunmaktadır. Ural, Sibiry ve Kuzey Kazakistan toplumlarında 420–920 baz çifti uzunlukları arasında 11 farklı allel ve 27 farklı genotip gösterilmiştir. Bu toplumlarda en sık rastlanan allel 570 baz çifti uzunluğunda olup heterozigotluk derecesi 0.71 olarak verilmektedir (Bin’ko 2001). Diğer taraftan Tayland toplumunda ise 520-920 baz çifti uzunlukları arasında 10 farklı allel gözlenmiştir. Bu çalışmada en sık rastlanan allel 520 baz çifti uzunluğunda olup heterozigotluk derecesi 0.28 olarak verilmektedir (Ruangjirachuporn 2006). Bu çalışmalardan elde edilen verilere göre IgJH VNTR bölgesinin coğrafi bölgelere göre farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız örneklerde IgJH bölgesi için toplam uzunlukları 470-1020 baz çifti arasında değişen 10 farklı allel ve 23 farklı genotip tespit edilmiştir. Çalışmamızda en sık gözlenen allelin 570 baz çifti uzunluğunda (0.32) olduğu bulunmuştur. Örneklerimizden elde ettiğimiz bulgulara göre IgJH odağı için heterozigotluk derecesi 0.62 olarak tespit edilmiş olup gözlenen ve beklenen genotiplerin sıklıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p>0,05$) saptanmıştır. Diğer bir deyişle bu VNTR odağının Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olmadığı

tespit edilmiştir. Bulgularımızdaki bu uyumsuzluğun örnek sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, D1S80 VNTR bölgesinin allel tanımlanmasında agaroz jel elektroforez yönteminin yeterli olmadığı, buna karşın yöremizdeki allel çeşitliliği nedeniyle doğum öncesi tanıda kullanılabileceği düşünülmektedir.

D17S5 VNTR bölgesi ile ilgili olarak bu çalışmamız, Türkiye’ de Gümüş ve arkadaşlarının çalışmasından sonra ikinci bir çalışma olma özelliği taşımakta ve sonuçlarımız bu çalışma ile uyum göstermektedir. Ayrıca yöremizde bu odakta saptanan allel çeşitliliği doğum öncesi tanıda maternal kontaminasyon kontrolünde kullanılabilir öncelikli VNTR bölgesi olduğunu işaret etmektedir.

Türkiye’ de ilk kez çalışılan IgJH VNTR odağı ile ilgili bulgularımız Hardy-Weinberg dengesi ile uyumlu olmamasına karşın bundan sonraki çalışmaları yönlendirmede katkı oluşturmaktadır. Çalışmamızdaki verilere göre en sık gözlenen allel 570 baz çifti uzunluğunda olup Ural, Sibirya ve Kuzey Kazakistan toplumlarında yapılan çalışma ile uyum göstermektedir. Diğer tarafta, bu odaktaki çeşitliliğin yöremizdeki prenatal tanı çalışmalarında öncelikli yer tuttuğu kanısındayız.

Sonuç olarak Denizli yöresinde D1S80 (MCT118), D17S5 (YNZ22), IgJH VNTR bölgelerinin yöresel karakterizasyonu, D17S5 (YNZ22), IgJH bölgelerinin allel sıklıklarının değerlendirilmesi, genotip dağılımının belirlenmesi ve heterozigotluk derecelerinin saptanması yapılmış olup daha sonraki çalışmalara katkısı olacağı düşünülmektedir. Bu katkının özellikle yöremizde yapılmakta ve yapılacak olan prenatal tanı uygulamalarında daha da önem kazanabileceği kanısı taşınmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Akgüneş E., Filoğlu G., Yükseloğlu H., Abacı-Kalfaoğlu E., Atasoy S. (2002). D1S80 polymorphism in İstanbul(Turkey). *J. Forensic Sci.*, Jul 46(4): 906.
- Antoniadi T., Yapijakis C., Kaminopetros P., Makatsoris C., Velissariou V., Vassilopoulos D., Peterson M.B. (2002). A simple and effective approach for detecting maternal cell contamination in molecular prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, 22. 425-429.
- Atalay E.Ö., Koyuncu H., Turgut B., Atalay A., Yıldız S., Bahadır A., Köseleler A. (2005). High incidence of Hb-D –Los Angeles [β 121(GH4)Glu \rightarrow Gln] in Denizli Province, Aegean region of Turkey. *Hemoglobin*, 29 (4) : 307-310.
- Attila G., Yalın S., Tuli A., Yalın E., Aksoy K. (2004). Prenatal diagnosis of sickle cell anemia in twin pregnancies and identification by VNTRs. *Clinica Chimica Acta*, 350. 137-142.
- Arakura A., Liu C., Ota M., Fukushima H. (1998). Subtyping and characterization of D1S80 alleles in a Japanese population using PCR-RFLP. *Int J Med*, 111:183-187.
- Baltimore D. (2001). Our genome unveiled. *Nature*, vol 409. 814-816.
- Brown T.A. (2002). Genomes. Second Edition London: *Taylor and Francis*.
- Bin'ko IA., Sharokhova DA., Shvarts IuB., Demakov SA., Novoselov VP. (2002). Allele distribution at the HVR-IgH hypervariable locus in unrelated individuals living in Ural, Siberia, and northern Kazakhstan. *Genetika*, Apr;38(4):529-33. Russian
- Buerger H., Schmidt H., Beckmann A., Zanker KS., Boecker W., Brandt B. (2001). Genetic characterisation of invasive breast cancer: A comparison of CGH and PCR based multiplex microsatellite analysis. *J Clin Pathol.*, 54: 836-840.
- Chakravarti A. (2001). ...to a future of genetic medicine. *Nature*, vol 409. 822-823.
- Çakır AH., Açık C., Kesici T. (2001). Distribution of amplified fragment length polymorphism D1S80 alleles in Turkish population. *J. Forensic Sci.*, Jul 46(4):1002.
- Das K., Mastana S.S. (2003). Genetic variation at three VNTR loci in three tribal populations of Orissa, India. *Annals of Human Biology*, 30.3. 237-249.
- Das B., Seshadri M. (2004). Genetic variability at the D1S80 minisatellite: predominance of allele 18 among some Indian populations. *Annals of Human Biology*, Vol.31, No.5, 541-553
- Debrauwere H., Gendrel CG., Lechat S., Dutreix M.(1997). Differences and similarities between various tandem repeat sequences : minisatellites and microsatellites. *Biochimie*, 79: 577-586
- Duncan G.T., Balamurugan K., Budowle B., Smerick J., Tracey M.L. (1997). Microvariation at the human D1S80 locus. *Int J Med*, 110:150-154.
- Gümüş G., Rustamov A., Kadıkıran A., Sunguroğlu A. (2004). D17S30 and TP53 polymorphisms in a Turkish population. *Hum Biol.*, Oct;76(5):785-8.
- Hartl Daniel and Clark Andrew.(1997). *Principles of Population Genetics*, Third Edition
- Horn GT., Richards B., Klinger KW. (1989). Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by polymerase chain reaction *Nucleic Acids Research*, Volume 15. Number 5. -2140.
- International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, vol 409. 860-921.

- Iwashita S., Koyama K., Nakamura Y. (2001). VNTR sequence on human chromosome 11p15 that affects transcriptional activity. *J Human Genet*, 46: 717-721
- Jeffreys A.J., Barber R., Bois P., Buard J., Dubrava Y.E., Grant G., Hollies C.R.A., May C.A., Neumann R., Panayi M., Ritchie A.E., Shone A.C., Singer E., Stead, J.D.H., Tamaki K.(1999). Human minisatellites, repeat DNA instability and meiotic recombination. *Electrophoresis*, 20: 1665-1675.
- Kidd KK., Pakstis AJ., Speed WC., Kidd JR. (2004). Understanding human DNA sequence variation. *Journal of Heredity*, 95(5):406-420.
- Li W. (2001). Evolutionary Analyses of the Human Genome. *Nature*, vol 409. 847-849.
- Luhm RA., Bellissimo DB., Uzgiris AJ., Drobyski WJ., Hessner MJ. (2000). Quantitative Evaluation of Post-Bone Marrow Transplant Engraftment Status Using Florescent-labeled Variable Number of Tandem Repeats. *Molecular Diagnosis*, Vol.5. No.2. 129-138.
- Makalowski W. (2001). The Human Genome Structure and Organization. *Acta Biochimica Polonica*, Vol. 48 No. 3. 587-598.
- Motulsky A.G., Vogel F. (1996) *Human Genetics Problems and Approaches*, Third Edition, 495-502.
- Naslund K., Saetre P., Salome J., Bergstrom T., Jareborg N., Jazin E. (2005). Genome-wide prediction of human VNTRs. *Genomics*, 85:24-35.
- Pelotti S., Ferri G., Colalongo C., Abbondanze A., Falconi M., Pappalardo G. (2003). A method to help the detection of false homozygous samples at the D17S5 locus. *International Congress Series*, 1239, 677-679.
- Richard G., Paques F. (2000). Mini and microsatellite expansion : The recombination connection . *EMBO reports*, 1(22): 122-126.
- Ruangjirachuporn W., Japa O., Tanratanavijit M., Nanakorn S. (2006). Population genetic data on D1S80, D17S5, ApoB, COL2A1 and Ig-JH in Northeastern Thais. *Leg Med.*, (Tokyo). Oct; 8(5): 308-9.
- Sachdeva MP., Mastana SS., Saraswathy KN., Elizabeth AM., Chaudhary R., Kalla AK. (2004). Genetic variation at three VNTR loci (D1S80, APOB, D17S5) in two tribal populations of Andhra Pradesh, India. *Annals of Human Biology*, Vol. 31. No. 1. 95- 102.
- Strachan, Tom and Read , Andrew P. (1999) Human Molecular Genetics. Second edition. London : *Taylor & Francis*, Chapter 7
- Stoneking M. (2001). From the evolutionary past... *Nature*, vol 409. 821-822.
- Skraastad MI., Van de Vosse E., Belfroid R., Höld K., Vegter van der Vilis M., Sandkuijl LA., Bakker E., B van Ommen GJ.(1992). Significant Linkage Disequilibrium between the Huntington Disease Gene and the Loci D4S10 and D4S95 in the Dutch Population. *Am. J. Hum. Genet.*, 51:730-735.
- Tamaki K., Jeffreys A. (2005). Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Legal Medicine*, 7. 244-250.
- The International SNP Map Working Group. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, vol 409. 928-933.
- Venter J.C, Adams M.D., Myers E.W... (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science*, vol 291, 1304-1351.
- Watanabe G., Shimizu K. (2002). DNA sequence analysis of long PCR amplified products at the D1S80 locus. *Legal Medicine*, 4, 37-39.
- Wan Q., Wu H., Fujihara T., Fang S. (2004). Which genetic marker for which conservation genetics issue?. *Electrophoresis*, 25, 2165-2176.
- Web I. (2006). <http://www.gdb.org>

Web II. (2006). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Yalın E., Attila G., Yalın S., Aksoy K.(2006). Allele frequency distributions of Apo B VNTR locus in Cukurova, Turkey. *Cell Biochem Funct.*, Sep 18 (in press).

Yıldız S., Atalay A., Bağcı H., Atalay E.Ö. (2004). Beta thalassemia mutations in Denizli province of Turkey. *Turk J Haematol*, 22 (1) : 19-23.

8. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İzmir' de doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi İzmir' de tamamladım. Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü lisans programından 2004 yılında mezun oldum. Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı' nda Yüksek Lisans programına 2004 yılında başladım. 2006 Ekim ayında bir seneliğine, Macaristan' da (Szeged) Biological Research Center' ın düzenlediği International Training Course programına katıldım. Szeged Üniversitesi Fen Fakültesi doktora programına 2007 yılının Eylül ayından itibaren başlamak üzere kabul edildim.