



T.C.

ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ

BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

ADLİ GENETİK BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEN RENGİ TAYİNİNDE ASIP GEN POLİMORFİZMİ

Biyolog Hamide Sümeyye BOZKURT

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Kaan YILANCIOĞLU

İSTANBUL – 2018

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
ADLİ GENETİK BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEN RENGİ TAYİNİNDE ASIP GEN POLİMORFİZMİ

Biyolog Hamide Sümeyye BOZKURT

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Kaan YILANCIOĞLU

İSTANBUL – 2018

EK 1. TEZ ONAY SAYFASI



T.C.
ÜSKÜDAR
ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI

Bağcılık ve Adalet Bilimleri ENSTİTÜSÜ

GENEL BİLGİLER

Öğrenci No	: 164501016
Öğrenci Adı Soyadı	: Hanide Şeyyic Bozoktur
Anabilim Dalı	: Adalet Bilimleri
Tez Danışmanı	: Dr. Öğr. Üyesi Kaan Yılancıoğlu
Tezin Başlığı	: Ten Zengî Teğminden ASIP Gen Polimerfitmi

Toplantı Tarihi	: 24.10.2018	Saati	: 11:00
-----------------	--------------	-------	---------

Öğrenci Savunmaya : Geldi

Üniversitemiz Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca tez bilimsel olarak incelenmiş, adayın tez çalışmasını sunmasının ardından, adaya tez çalışması ile ilgili sorular yöneltilmiştir.

- Yapılan savunma sınavında adayın tez çalışması başarılı bulunarak **KABUL** edilmesine,
 Yapılan savunma sınavı sonunda tez çalışmasının **DÜZELTİLMESİNE**, düzeltme için adaya .. ay **EK SÜRE** verilmesine (en fazla 3 ay)
 Yapılan savunma sınavının sonunda tezin **REDDEDİLMESİNE**

OY BİRLİĞİ **OY ÇOKLUĞU**

İle karar verilmiştir.

Savunmada Tezin Başlığı : Değişmedi Değişti

Tezin Yeni Başlığı : Değişmedi

Öğrenci Savunmaya : Gelmedi

Üniversitemiz Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca yukarıda belirtilen tarih ve saatte Tez Savunma Jürisi toplanmış ancak ilgili öğrenci savunma sınavına gelmemiştir. Adayın tez çalışmasını Jüri önünde sunmadığı için yapılan değerlendirmeler sonunda adayın tez çalışmasıyla ilgili aşağıdaki kararı,

OY BİRLİĞİ İLE REDDEDİLMİŞTİR.

Tez Sınavı Jürisi	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	Prof.Dr. Sevil ATASOY	
Danışman Üye	Dr. Öğr. Üy. Kaan YILANCIÖĞLU	
Üye	Doç. Dr. Emel TIMUĞİN	
Üye	Dr. Öğr. Üy. Tuğba İNSAL	
Üye	Dr. Öğr. Üy. Pınar ÖZ	

(Tüm durumlarda jüri üyelerinin tez değerlendirme raporları gerekir.)

Sayı No :

Dr. Öğr. Üy. Ahmet Can TIMUĞİN

Tarih : 24. / 10. / 2018

Yukarıda kimlik bilgileri belirtilen ve Anabilim Dalımız Yüksek Lisans Programı öğrencisinin Tez Savunma Sınav Tutanağı ve eklerinin Enstitü Yönetim Kurulunda görüşülmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Not: Bu forma orijinal raporlar (bir nüsha) eklenecektir.

Prof. Dr. Sevil Atasoy
Anabilim Dalı Başkanı
(Unvanı, Adı Soyadı, İmza)

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
ŞEKİLLER	v
TABLolar	vi
TEŞEKKÜR	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Cilt Rengi	3
2.2. Cilt Rengine Etki Eden Faktörler	4
2.3. Fitzpatrick Skalası	8
2.4.Genetik Polimorfizm	9
2.5. Tek Nükleotit Polimorfizmi (SNP) ve Adli bilimlerde SNP'lerin Kullanılması	10
2.6. Adli Bilimlerde Genetik Gelişmeler	11
2.7.Agouti Geni (ASIP) ve Adli Bilimlerde Kullanımı	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	14
3.1. Örneklem Grubunun Seçilmesi ve Biyolojik Örneklerin Toplanması	14
3.1.1. Etik Koşullar	14
3.1.2. Laboratuvar	14
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	15
3.2. DNA İzolasyon Protokolü	15
3.2.1. DNA'nın Miktar Tayini ve Görüntülenmesi	16
3.3. Polimeraz Zincir Reasyonu (PZR)	16
3.3.1. PZR Primer Listesi	17

3.4. PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi ve Jelin Hazırlanması	18
3.4.1. Jel Yükleme	19
3.5. Sanger DNA Dizileme Yöntemi	20
4.BULGULAR	21
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇ	30
7. KAYNAKLAR	31
EK 2. BEYAN FORMU	36
EK 3. ETİK KURUL KARARI	37
EK 4. ÖZGEÇMİŞ	38

KISALTMALAR

A	Adenin
bp	Baz çifti
C	Sitozin
CNV	Kopya sayısı varyantları
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitozin trifosfat
ddNTP	Dideoksiribonükleotid trifosfat
dGTP	Deoksiguanin trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
dTTP	Deoksitimin trifosfat
g	Gram
G	Guanin
GWAS	Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Reaction)
R primer	Reverse primer
RNA	Ribonükleik asit
SNP polymorphism)	Tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide
T	Timin
TBE	Tris - Borik asit - EDTA
U	Urasil
UTR	Tercüme edilmemiş bölge
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil 1: İnsan derisi renk dağılımı (Van Luschan, 1940)

Şekil 2: Deride melanosit hücresi ve melanin pigmenti

Şekil 3: Melanin türleri (Ömelanin ve Feomelanin)

Şekil 4: Vitiligo birey

Şekil 5: Albino birey

Şekil 6: Fitzpatrick skalası

Şekil 7: Adli bilimlerde gelişmeler

Şekil 8: İnsan ASIP geni kromozom üzerinde yeri

Şekil 9: Pamuklu çubuk (bukkal swap) ile ağız içi örnek toplama

Şekil 10: UV ışığında ASIP (rs6119471) PZR Jel Görüntüsü

Şekil 11: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 1

Şekil 12: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 2

Şekil 13: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 3

Şekil 14: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 4

Şekil 15: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 5

Şekil 16: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 6

Şekil 17: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 7

Şekil 18: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 8

Şekil 19: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 9

Şekil 20: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 10

Şekil 21: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 11

Şekil 22: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 12

TABLÖLAR

Tablo 1: ASIP geni genotip bilgileri

Tablo 2: PZR primerleri ve özellikleri

Tablo 3: PZR için kullanılan bileşenler ve miktarları

Tablo 4: PZR Döngüsü

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sırasında, ilgisi ve önerileri ile yol gösterici olan Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Sevil Atasoy'a,

Birikim ve tecrübeleri ile bana destek olan değerli danışman hocan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kaan Yıllancıoğlu'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını hiç esirgemeyen değerli arkadaşlarım Biyomühendis Hüma Erkoç ve Biyolog Mert Sönmez'e;

Sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım...

Özet

İnsan ten rengi, gen polimorfizimlerinden etkilenir. Dolayısıyla bireyler ve topluluklar arasında farklılık gösterir. Bu çalışmada ten rengi oluşumuna, özellikle koyu ten rengi oluşumuna etki eden ASIP (agouti) geninin rs6119471 SNP bölgesinin etkilerini araştırdık. Örneklem grubumuz Türkiye’de cilt rengiyle ilgili bir hastalık geçirmemiş (vitiligo gibi), albino olmayan, çilleri bulunmayan, cilt renginin açılması ve koyulaştırılmasıyla ilgili cerrahi operasyon geçirmemiş ve güneş yanığı bulunmayan 18 yaş ve üstü 12 gönüllü bireylerden oluşmaktadır. Çalışmaya gönüllü 12 kişinin biyolojik materyal olarak ağız içisürüntü örneklerinden elde edilen DNA’ları kullanılmıştır.

Örneklem grubundaki bireylerin sol bilek içi görüntüleri 20 cm’den aynı pozisyonda ve aynı fotoğraf makinesiyle görüntülendi. Literatürde koyu ten rengi ile ilişkisi olduğu bilinen rs6119471 SNP genotiplendirildi ve değerlendirmeler toplamda 12 örnek üzerinden gerçekleştirildi. Araştırma sonucunda örneklem grubundaki açık ten renkli bireyler ile koyu ten renkli bireyler arasında rs6119471 SNP’sinde polimorfik bir farklılık beklenmesine rağmen tüm gönüllülerin C genotipinde olduğu tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Adli genetik, Melanin, Gen polimorfizmi, SNP, ASIP.

ASIP GENE POLYMORPHISM IN SKIN COLOR DETERMINATION

Abstract

Human skin color is affected by gene polymorphisms. Therefore, it differs between individuals and communities. In this study, we investigated the effects of rs6119471 SNP loci of ASIP (agouti) gene which is mainly effected on dark skin color formation. Sample Our group carrying a disease related to skin color in Turkey (vitiligo), non-albinos, freckles absent, lighten skin color and had not undergone surgery associated with thickened and sunburn are not 18 years of age and older consists of 12 volunteers. The DNA of 12 volunteers was used as a biological material.

Left wrist images of the valunteers were visualized with a same camera at a distance of 20 cm. In the literature, rs6119471 SNP known to be associated with dark skin, was genotyped. Analyzes were performed on 12 volunteers. The results of the study, all volunteers were in C genotype therefore no polymorphic differences between light skinned volunteers and dark skinned volunteers in rs6119471 SNP polymorphism.

Key words: Forensic genetics, Melanin, Gene polymorphism, SNP, ASIP.

1. GİRİŞ

Cilt rengi insanlarda siyahtan beyaz renge kadar bireyler ve topluluklar arasında farklılık gösterir. Bunun nedeni ise cilt rengine kalıtsal faktörlerin etki etmesidir. Yani cilt rengi kalıtsaldır. Kalıtsal özelliklerin yanı sıra cilt rengi çevresel faktörlerden de etkilenir. Özellikle güneşin yaymış olduğu ultraviyole (UV) ışınları cilt rengini etkilemektedir. Güneşlenme süresinin uzun olduğu Afrika da daha fazla güneşe maruziyetten melanin sentezinde artış gözlenir. Bu sebeple sıcak bölgelerde cilt rengi daha koyudur (Kirchweger, 2001).

İnsan cildinin en üst tabakası renksizdir. Cilt rengini veren melanin pigmenti alt tabakalarda sentezlenir. Deride bulunan melanin pigmentinin türü ve miktarı insan cilt rengini belirler. Melanin türü ve miktarı ise genler tarafından belirlenir. Bu genlerden bazıları; SLC24A5, MC1R, OLA2, SLC45A2, TYR, IRF4, ASIP ve DEF8'dir (Maronas ve ark., 2014).

Literatürde cilt rengiyle ilgili yapılan genetik çalışmalar tek nükleotit polimorfizimlerinin (SNP) fenotipe etkisi üzerine olan çalışmalardır. İnsanların genotipleri kullanılarak fenotipleri hakkında bilgi sahibi olmakadli genetiğin çalışma alanlarındanıdır. Bu ise bireylerin bıraktıkları biyolojik materyaller kullanılarak yapılmaktadır (Maronas ve ark., 2014).

Adli antropologlar insan iskelet kalıntılarında etnik köken, cinsiyet, boy gibi fiziksel karakterleri belirleyebilirler. Fakat pigment görünüşü ile ilgili özellikleri belirleyemezler. Pigment görünüşü ile ilgili özellikler büyük ölçüde genetik olarak belirlenir (Bronicki ve ark., 2009). Bunun için melanozomun iç yüzeyindeki tirozinaz enzim kompleksinin oluşumunu, hormonal ve çevresel düzenlemeyi, melanoblast göçü ve farklılaşmasını, melanozom içindeki yeni proteinlerin hücre içi yönlendirilmesini ve melanozomların dendrik kollarıyla keratinositlere doğru yer değiştirmesini içeren birçok biyokimyasal yolda yer alan insan pigmentasyon genlerinden faydalanılır (Eiberg ve ark., 1996). Bu açıdan göz, saç ve cilt rengi ya da boy gibi fiziksel karakterlerle ilişkili SNP genotipleme, adli genetik alanında kişisel kimliklendirme için yararlı bir araçtır (Eiberg ve ark., 1996).

Fenotipik bir özellik olan cilt renginin oluşmasında, genotipik olarak ön plana çıkan genlerden biri de ASIP'tir. ASIP geninin koyu saç ve göz rengi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Bonilla ve ark., 2004). Bu çalışmada amacımız, cilt rengi oluşumunda koyu ten rengi ile ilişkili tek nükleotit polimorfizmini (SNP) taramak, cilt renginde renk ölçümü yaparak tek nükleotit değişimini ve bu değişimin oluşturduğu morfolojik farklılıkları belirleyerek genotip ve fenotip etkileşimini ilişkilendirmektir. Elde ettiğimiz veriler sayesinde adli genetikte DNA'dan cilt renginin belirlenebilmesi için yapılacak çalışmalara güçlü bir kaynak sağlanmış olacaktır.

ASIP geninin adli genetikte kullanım amacı ise bilinmeyen bir bireyin DNA'sı kullanılarak ten rengi açısından fiziksel görünüşü hakkında bilgi sahibi olabilmektir. Adli genetik araştırmalar, göz, saç ve cilt renginin gözlemlenebilir fiziksel özelliklerini tahmin etmek için DNA bazlı araçların geliştirilmesi amacıyla insan pigmentasyon varyasyonuna odaklanmayı arttırmıştır (Maronas ve ark., 2014).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Cilt Rengi

İnsanlar siyahtan beyaz renge kadar farklı ten renklerine sahip olabilirler. Cilt rengi, kalıtsal bir özelliktir. Bilindiği üzere, deri rengi güneşe maruz kalma süresine göre değişmekte ve koyulaşmaktadır yani bronzlaşmaktadır. Bu değişimin nedeni, güneş ışınlarının artmasının vücudumuza vereceği zararlara ve mor-ötesi ışınların vücudumuzdaki folik asit (folat) dengesine vereceği zararlara karşı derimizin uyum sağlamasıdır (Kirchweger, 2001).

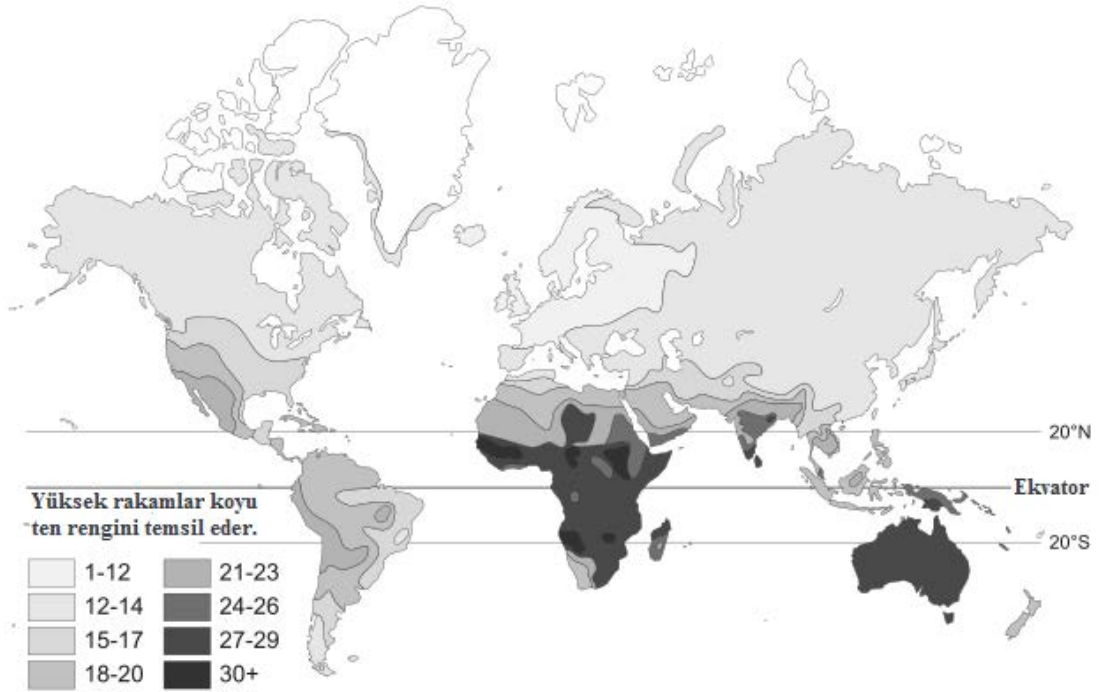
İnsanlarda deri pigmentasyonunun evrimsel tarihini anlamak için çeşitli hipotezler üretilmiştir. İnsanların Afrika'dan dışarıya güneş ışığına daha az maruz kalmasıyla göç ettikleri, pigmentasyon genlerindeki fonksiyonel kısıtlamaların gevşemesinin veya daha hafif cilt pigmentasyonuna neden olan fonksiyonel olarak ilgili varyantların seçiminin gerçekleştiği öne sürülmüştür (Jablonski ve Chaplin, 2000). Bu, sınırlı güneş ışığı maruziyetinin varlığında D vitamini sentezleme yeteneğinin artmasına neden olmaktadır (Harding ve ark., 2000; Rees, 2003; Rana ve ark., 1999). Ayrıca, ultraviyole radyasyona karşı korunmak için ekvatora daha yakın bölgelerde koyu cildin meydana geldiği bilinmektedir (Jablonski ve Chaplin, 2000). Cilt pigmentasyonundaki farklılıklar patojenlere ve cinsel seçiminde (eş seçimi) de önemli olabilmektedir (Aoki, 2002).

Deride bulunan melanin pigmentinin türü ve miktarı insan cilt rengini belirler. Melanin deriye, göze ve saça renk veren pigmenttir (Sturm ve Larsson, 2009).

Ekvator'dan (folik asitin UV fotolizi olduğu düşünülen kısıtlama) uzaklaşıldıkça koyu pigmentasyon da azalmalar meydana gelmektedir. Özellikle Avrupalılar ve Doğu Asyalılar'da ciltte, farklı pigmentasyonların oluşmasının nedenin bu olduğu düşünülmektedir (Norton ve ark., 2007).

Cilt tonunda gözle görülür değişiklikler yerel ve mevsimsel koşullara yanıt olarak ortaya çıkar ve fakültatif pigmentasyon olarak adlandırılır. Yani Afrikalılar daha az UV'ye maruz kaldığında daha açık pigmentasyona sahip olabilirler ve Avrupalılar daha güçlü UV'ye maruz kaldıklarında daha koyu pigmentasyona sahip olabilirler. Cilt

tonunda kısa süreli adaptif değişiklikler, genetik olarak belirlenmiş melanojenik aktivite (melanozom tipi ve dağılımı) ile kontrol edilen cilt rengi fenotipinin sadece bir kısmını temsil eder (Sturm, 1998a, 2009b; Rees, 2004; Bouakaze ve ark., 2009).



Şekil 1: İnsan derisi renk dağılımı (Van Luschan, 1940)(Barsh, 2003)

2.2. Cilt Rengine Etki Eden Genetik Faktörler

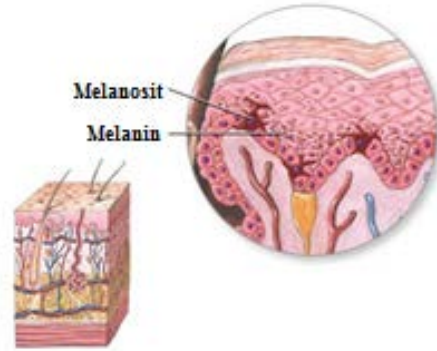
Cilt rengi insanlarda farklılıklar gösterir. Bu farklılığın nedeni ise cilt rengine kalıtsal faktörlerin etki etmesidir (Kirchweger, 2001). Deride bulunan melanin pigmentinin türü ve miktarı insan cilt rengini belirler. Melanin türü ve miktarı ise genler tarafından belirlenir. Bu genlerden bazıları; SLC24A5, MC1R, OLA2, SLC45A2, TYR, IRF4, ASIP ve DEF8'dir (Maronas ve ark., 2014).

Melanin, deride ve kıl foliküllerinde bulunan melanosit hücreleri tarafından üretilen inert bir biyopolimerdir. Epidermisin etrafındaki keratinositlere veya büyüyen kök kılıfın kortikal bölgesine ince hücresel çıkıntılar boyunca melanozom partikülleri içinde bulunur, ancak göz de iridial melanositlerinde bulunmaktadır (Sturm ve Larsson, 2009).

Bu genlerdeki varyasyonlar, pleiotropik bir konumda, deri, saç ve göz rengini belirler. Örneğin, Kuzey Avrupa popülasyonları açık ten ve mavi gözlü insanlar olarak ilişkilendirilir. Ekvatora daha yakın popülasyonlarda ise koyu tenli, koyu renkli ve kahverengi gözlü insanlar bulunur. Bununla birlikte, melanositler bağımsız hücresel popülasyonları temsil ettiğinden alternatif düzenleyici veya sinyal yollarıyla, Avrupalılarda görülen koyu renkli saçlar, açık tenli ve mavi gözler veya Solomon Adasında görülen koyu renkli saç, koyu renkli ten ve kahverengi gözler gibi çeşitli fenotipik kombinasyonlar üreten özel özellikli varyantlar da ortaya çıkar (Tobin, 2011; Van Raamsdonk, 2009).

Bunun bir başka örneği de foliküler melanositlerin yaşlanmaya duyarlılığı olup, gümüşgri ile beyaz saç renginin kademeli olarak üretilmesidir. Bu durum yıllar içinde ampul bölgesinden hücrelerin kaybına işaret etmektedir. Bu tüm insanlarda olur, ancak başlangıç yaşı etnik gruplar arasında değişiklik gösterebilir (Commo ve ark., 2004; Rogers ve ark., 2004).

Melanin;derinin epidermis tabakasında bulunan melanosit hücreleri tarafından üretilen pigmenttir(Sturm ve Larsson, 2009).

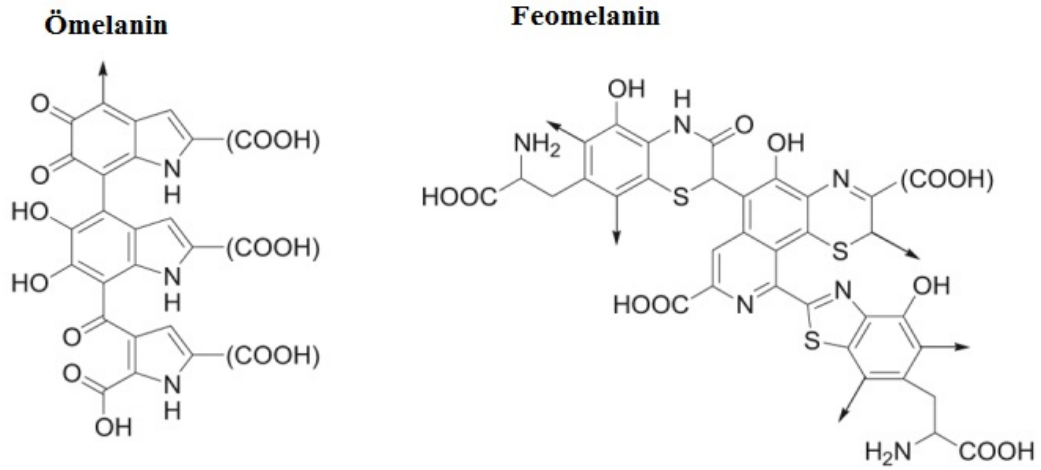


Şekil 2: *Deride melanosit hücresi ve melanin pigmenti (DermaVIDUALS, 2015)*

Melanin pigmentinin insan derisinde iki türü bulunur. Bunlardan ömelanin kahverengi-siyah yani koyu ten renklerini verir, feomelanin sarı-kırmızı yani açık ten renklerini verir. Tenleri açık renk olan insanların cildinde feomelanin üretimi daha fazlayken, tenleri koyu olan insanların ömelanin üretimi daha fazladır. Ömelanin ve feomelanin, tirozinaz katalizörlü tirozin oksidasyonu ile üretilir. Genel olarak, ömelanin

UV-koruma fonksiyonunu gerçekleştirdiği bilinmektedir. Dolayısıyla kahverengi-siyah renk verir (Miyamura, 2007).

Feomelanin ise kızıl saçlı, açık tenli olan kişiler de görülmektedir. Bu pigment, UV-görünür ışık ışınlamasına yanıt olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) yoğun üretimine neden olduğundan güçlü bir foto-hassaslaştırıcıdır. Hayvan modelleriyle yapılan son çalışmalar, feomelanin pigment yolağının, oksidatif hasar mekanizmaları ile melanomogeneze karşı UV radyasyonuna bağımsız karsinojenik katkıları olduğunu göstermiştir (Sarna ve ark. 1985; Morgan ve ark., 2013; Mitra, 2012; Fukunaga ve ark., 2012).



Şekil 3: Melanin türleri (Ömelanin ve Feomelanin)

Pigment miktarı da pigmentin türü gibi cilt rengini belirleyen faktörlerdendir. Pigment miktarının ya da melanositlerin az olması ten renginin açık renkte olmasına neden olur (Sturm ve Larsson, 2009).

Ciltteki pigmentasyon anormalliği ile ilgili hastalıklardan bazıları vitiligo ve ablinizimdir.

Vitiligo, epidermiste pigment üreten hücreler olan melanositler üzerindeki sitotoksik T hücresi aracılı saldırıdan kaynaklanan cildin az tanınan, organa özgü bir otoimmün hastalığıdır. Sonuç ciltte beyaz lekeler olarak görülen pigment kaybıdır (Van den Boorn ve ark., 2009; Taieb ve ark., 2009).



Şekil 4: Vitiligo birey (Harris, 2016)

Ciltte vitiligo oluşumu, in vitro ve in vivo olarak insan denekleri ve dokuları kullanılarak, yıllardır yapılan translyonel araştırmalarla devam etmektedir (Dell'anna ve ark., 2012).

Melanositlerin yüksek stres düzeylerinden etkilendiğini tespit etmek, bu otoimmün hastalıkta stres yollarının araştırılmasına yol açarak, vitiligenin öncelikle dejeneratif veya otoimmün bir hastalık olup olmadığına dair devam eden bir tartışmayı başlatmaktadır. (Schallreuter, 2008).

Bununla birlikte, bir kimyasal varyant olan kimyasal kaynaklı vitiligo ile ilgili yeni translyon çalışmaları, şimdi iki teoriyi uzlaştırmaktadır ve hücre dokuları ile bağışıklık tepkilerini birbirine bağlayan ve insan dokuları kullanılarak keşfedilen önemli

mekanizmaları açığa çıkarmaktadır. Bu nedenle vitiligo, hücre stresinin ve bağışıklık yanıtlarının patogenezi ile ilgili için işbirliği yaptığı ve bu nedenle yukarıda sunulan sorulara önemli cevaplar verdiği bir otoimmün hastalıktır (Harris JE., 2018).

Albinizm, melanin pigmenti üretimindeki bir açığın neden olduğu genetik bir durumdur. Albinizm frekansları değişse de, cinsiyet veya etnik kökene bakmaksızın tüm dünyadaki popülasyonları etkiler. Yani albinizm doğuştan melanin pigmentinin olmaması durumudur ve genler tarafından kontrol edilmektedir (Franklin ve ark., 2018).



Şekil 5: Albino birey (Ameliyat, 2018)

Albinizm, istemsiz nistagmus, fotofobi, zayıf derinlik algısı, şaşılık, zayıf görme keskinliği ve refraktif kusur ile zayıf görme ile sonuçlanır (Yahalom ve ark., 2012).

2.3. Fitzpatrick Skalası

Fitzpatrick ölçeği, bireyleri görsel olarak algılanan ten rengine ve bronzlaşma kabiliyeti de dahil olmak üzere güneşe karşı cildin hassasiyetine dayalı olarak gruplandırır (Walsh ve ark., 2017).

Fitzpatrick skalası



Şekil 6: Fitzpatrick skalası (Dr. Nebil Yesiloglu, 2017)

2.4. Genetik Polimorfizm

Bir popülasyonda % 1 veya daha yüksek sıklıkta görülen genetik farklılıklara yani DNA dizi farklılıklarına genetik polimorfizm denilmektedir. Gen polimorfizmleri genomun herhangi bir bölgesinde ortaya çıkabilir. Polimorfizmlerin çoğu sessizdir, yani bir genin işlevini veya ifadesini değiştirmez. Ancak bazen bir genin bir polimorfik varyantı, anormal ekspresyona veya proteinin anormal bir formunun üretilmesine yol açabilir; bu anormallik hastalığa neden olabilir veya hastalık ile ilişkili olabilir (Ford, 1940).

Mutasyonlar kendileri tarafından polimorfizm olarak sınıflandırılmaz. Bir polimorfizm, popülasyonda yaygın olan bir DNA dizisi varyasyondur. Diğer taraftan, bir mutasyon, normalden uzak bir DNA sekansındaki herhangi bir değişikliktir (normal bir alel popülasyonun içinden geçtiğini ve mutasyonun bu normal alleli nadir ve anormal bir varyantla değiştirdiğini ima eder) (Sheppard, 1975).

Polimorfizmlerde, iki veya daha fazla eşit olarak kabul edilebilir alternatif vardır ve bir polimorfizm olarak sınıflandırılır, en az yaygın alel popülasyonda yüzde 1 veya daha

fazla bir sıklığa sahip olmalıdır. Frekans bundan daha düşük ise, alel bir mutasyon olarak kabul edilir (Ford, 1940a, 1975b; Sheppard, 1975).

2.5. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) ve Adli Bilimlerde SNP'lerin Kullanılması

Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) iki birey arasında belirli bir DNA parçasındaki tek baz farklılıklarıdır (Wang ve ark., 1998). Brookes tarafından yapılan tanımlamaya göre SNP, (allel sıklığı en az % 1 veya daha fazla olan) bazı popülasyonlardaki normal bireylerde bulunan farklı sekans alternatifli (alelli) genomik DNA'lardaki tek baz değişimidir (Brooks, 1999).

Genetik tiplendirme, adli vakalarda biyolojik kanıtların bulunduğu olay yerinde, doğal afetlerde mağdurların tespiti ve tanınması imkansız cesetlerin kimlik tespiti, doku parçalarından kimliklendirme gibi durumlarda yani profillemeye güçlü bir araçtır. Biyolojik kanıtlar kan, sperm, kemik, saç, dişler, kas dokusu ve tükürük gibi materyallerden elde edilir. Biyolojik materyallerin karakterizasyonu için kullanılan genetik teknolojik olanaklar günümüzde geliştirilerek kullanılmaktadır. SNP'ler, adli genetik alanında, kanıtsal bir örneği genetik olarak tanımlamak veya bilinmeyen bir kişiyi tanımlamak için daha fazla fırsat sunmaktadır (Børsting ve ark., 2007).

Adli vakalarda bulunan biyolojik kanıtların bozulmuş olma ve kontamine olmuş olma olasılığı yüksektir. Dolayısıyla elde edilen DNA miktarı 150 bç'den düşük olabilir. SNP'ler ise 60-80 bç gibi düşük miktarlarda bile DNA analizlerinde kullanılabilir. Bu sebeple SNP'lerin adli bilimlerde kullanılması avantajlıdır (Cho ve ark., 1999). Ayrıca SNP'ler düşük mutasyon oranlarına sahiptirler. Bu yüzden nesep tayinlerinde daha güvenli kullanılabilir (Børsting ve ark., 2007).

Çok sayıda SNP lokusunun sadece bir analizle belirlenmesini sağlayan teknolojiler SNP'lerin uygulanmasını kolaylaştırmaktadırlar. SNP analizleri özellikle otomatize sistemlerde kullanılabilir. Bu da zaman ve maliyet açısından kazanç sağlamaktadır (Griffin ve Smith, 2000).

2.6. Adli Bilimlerde Genetik Gelişmeler

Yıl	Adli Bilimlerdeki Gelişmeler
1900	ABO Kan Grupları
1953	DNA Molekülünün Adli Bilimlerde Kullanımı
1953	Kırmızı Hücre Enzimleri Serum Proteinleri
1958	HLA (İnsan Lökosit Antijeni)
1970	Tip II Restriksiyon Enzimleri
1975	Southern Blotting
1980	VNTR (Değişken sayıda ardışık tekrarlar)
1983	PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
1985	Alec Jeffreys, ilk kez DNA profilini RFLP tekniği kullanarak VNTR'ları tanımladı.
1985	İngiltere'de bir cinayet olayı ilk kez DNA kullanılarak çözüldü.
1986	İlk PCR Vakası
1986	Edward Blake, PCR temelli DNA testini (HLA DQa) aynı şahsa ait farklı otopsi örneklerinde uyguladı.
1987	Kary Mullis, PCR tekniği geliştirdi.
1987	Otomatik Sekanslama
1988	FBI tarafından VNTR'lar rutinde kullanıldı.
1990	K. Kasai ve arkadaşları ilk STR'ı (D1S80) geliştirdiler.
1992	Kapiller Elektroforez'de ilk STR'lar tanımlandı.
1994	FSS (Forensic Science Service-İngiltere)'de Quadruplex denendi.
1995	İngiltere Ulusal DNA veri bankası oluşturuldu.
1996	İlk ticari STR kitleri yapıldı.
1998	Amerika Birleşik Devletleri'nde CODİS lokusları tanımlandı.
2000	STR analizleri rutin uygulamaya girdi.
2001	On altı lokusu içeren ticari PowerPlex 16 kiti satışa sunuldu
2002	Applied Biosystem, beş boyalı Identifiler kitini ve çok kapillerli AB3100 genetik analizörünü tanıttı.
2004	Real Time PCR DNA miktarı
2004	Y kromozomuna özgü STR kitleri kullanılmaya başlandı.
2007	Olay yeri biyolojik lekelerden şüphelinin göz rengi, saç rengi ve tipi, yaşı, boyu gibi fiziksel özelliklerinin tespiti için SNP (Single Nucleotide Polymorphism) çalışmaları hız kazandı.
2010	Yeni Avrupa Standardı STR lokusları oluşturuldu.

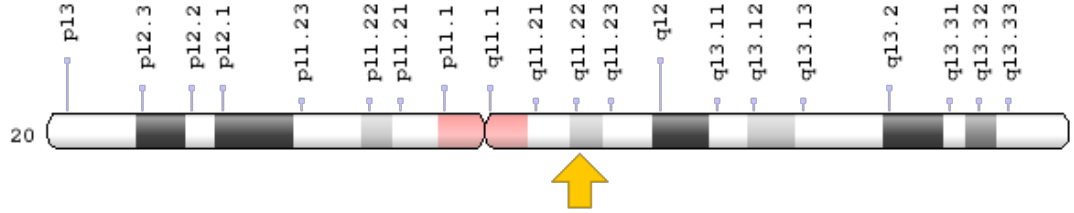
Şekil 7: Adli bilimlerde gelişmeler (Arzu Dövençi, 2015)

2.7. Agouti Geni(ASIP) ve Adli Bilimlerde Kullanımı

Farelerde Agouti geni, saç folikülü melanositlerinin ömelanin yerine feomelanin sentezlemesine neden olan parakrin sinyalleme molekülünü kodlar.

Bunun yanında;

- 1) Saç pigmentasyonunun kalitesini etkileyebilen bir proteini kodlar.
- 2) Alfa-melanosit uyarıcı hormonun farmakolojik antagonisti olarak hareket eder.
- 3) Nöroendokrinde rol oynar.
- 4) Melanokortin etkisinin yönleri ve adipositlerdeki lipid metabolizmasını düzenlemede fonksiyonel bir rolü vardır.



Şekil 8: İnsan ASIP geni kromozom üzerinde yeri (National Library of Medicine, 2018)

(Sitogenetik lokasyon: 20q11.22, 20. Kromozom 11.22 pozisyonu,

Moleküler lokasyonu: 34,186,493 ile 34,269,344 baz çiftleri (bç))

Melanogenezdeki rolünün yanında, agouti sinyalleme proteini (ASIP) obezite ile ilişkilidir (Liu ve ark., 2012). İnsanlarda ASIP esas olarak adipoz dokuda eksprese edildiği için, bu proteinin obezite ve insülin direnci gibi metabolik bozuklukların gelişimindeki rolü tespit edilmiştir (Kwon ve ark., 1994; Xue ve ark., 1998). ASIP lokusu tarafından kodlanan agouti proteininin adipoz dokudaki güçlü ekspresyonu nedeniyle insanda lipid metabolizmasında rol oynadığı anlaşılmıştır (Kwon ve ark., 1994; Xue ve ark., 1998; Klebig ve ark., 1995).

ASIP'in bir diğer rolü davranış genetiği ile ilgili olmuştur. At üzerinde kürk rengini belirleyen 2 gen vardır. Bunlar davranışları etkileyecek şekilde bildirilmiştir: MC1R ve ASIP. Davranış araştırması yapılarak insanların atlarla olan etkileşiminde ASIP genotipi ve mizaç arasında bir ilişki bulmuştur (Keeler ve ark., 1968).

ASIP geninin adli genetikte kullanım amacı ise bilinmeyen bir bireyin DNA'sı kullanılarak ten rengi açısından fiziksel görünüşü hakkında bilgi sahibi olabilmektir. Adli genetik araştırmalar, göz, saç ve cilt renginin gözlemlenebilir fiziksel özelliklerini tahmin etmek için DNA bazlı araçların geliştirilmesi amacıyla insan pigmentasyon varyasyonuna odaklanmayı arttırmıştır (Maronas ve ark., 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklem Grubunun Seçilmesi ve Biyolojik Örneklerin Toplanması

Örneklem gurubu oluşturulurken gönüllüler çalışma hakkında bilgilendirilerek onayları alındı. Sağlıklı ve aralarında akrabalık bulunmayan 12 kişiden ağız içi sürüntü ile DNA örnekleri True Line steril swab tüpe ile toplandı.

Örnek toplama işlemi tamamlandıktan sonra steril swablar kontaminasyonu engellemek amacıyla ayrı ayrı paketlenildi. Paketlerin üzerine gönüllülerin isimleri ve tarih not alındı.



Şekil 9: Pamuklu çubuk (bukkal swab) ile ağız içi örnek toplama

3.1.1. Etik Koşullar

Bu çalışma Üsküdar Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik kurulunun B.8.6.YÖK.2.ÜS.0.05.0.06/2018/716 sayılı 25/06/2017 tarihli onayını almıştır.

3.1.2. Laboratuvar

Üsküdar Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarında ve Ankara'da bulunan BM Laboratuvar Sistemleri laboratuvarında çalışmalar tamalanmıştır.

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

- TBE (Tris-borate-EDTA) (Thermo-Fisher Scientific, USA) buffer distile su ile çözümlenerek kullanılmıştır.
- DNA izolasyon Kiti (RTA Kandan Genomik DNA Kiti)
- Primerler (Forward-Reverse) (Macrogen)
- BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Exo-Sap, Sephadex
- EtBr (Etidyum Bromür) (Invitrogen, USA)
- Agarose (Thermo-Fisher Scientific, USA) sitile su ile çözümlenerek kullanılmıştır.
- DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo-Fisher Scientific, USA)
- 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA)
- 10 x PBS (Phosphate-Bufferedsaline) (Thermo-Fisher Scientific, USA)
- Etanol : %70 Etanol çözeltisi kullanılmıştır.

3.2. DNA İzolasyonu Protokolü

Steril swablar ile alınan DNA'nın açığa çıkarılabilmesi için RTA[®] Kandan Genomik DNA İzolasyon kiti modifiye edilerek kullanıldı.

- 1) 1.5 ml'lik ependorf tüpüne 200 µl PBS ekledi.
- 2) Swabtaki örnekler PBS'li tüplerin içerisine alındı.
- 3) Tüpler 5 saniye vortekslendi.
- 4) Örneklerin üzerine 20 µl proteinaz K eklendi.
- 5) 200 µl sölüsyon B eklendi ve 20 saniye vorteks ile karıştırıldı.
- 6) Kısa santrifüjden sonra her 3 dakikada bir karıştırılarak 65°C'de 15 dakika inkübe edildi.
- 7) 260 µl etanol (%96-100) eklendi ve vorteks ile karıştırıldı.
- 8) Kısa santrifüjden sonra karışım, toplama tüpünün içine yerleştirilmiş spin kolona aktarıldı.
- 9) 5000 x g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Sıvı içeren alttaki tüp atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.

- 10) 700 µl Solüsyon W1 eklendi. 5000 x g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 11) 700 µl Solüsyon W2 eklendi. 16.000 x g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 12) 16000 x g'de 3 dakika santrifüj yapıldı.
- 13) Spin kolon, steril 1.5 ml'lik bir ependorfa transfer edildi.
- 14) 200 µl 70°C'ye ısıtılmış Solüsyon e eklendi ve kolonun kapağı kapatıldı. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi.
- 15) 5000 x g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- 16) 16000 x g'de 30 saniye daha santrifüj yapıldı.
- 17) Spin kolon atıldı ve ependorfta bulunan DNA örnekleri diğer analizler yapılabileceği kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.1. DNA'nın Miktar Tayini ve Görüntülenmesi

İzole edilen DNA'ların miktar ölçümleri Thermo Multiskan Go spektrofotometresinde yapıldı.

1. İzole DNA'lar 1:100 oranında ultra saf su ile seyreltildi.
2. Spektrofotometrenin doğruluğunu kontrol etmek için su referans örneği olarak kullanıldı ve spektrofotometrenin ölçeği sıfırlandı.
3. Spektrofotometrenin kuvetine seyreltilmiş DNA solüsyonu konuldu ve 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçüm yapıldı.
4. DNA miktarının tayini için; $DNA(\mu l/ml) = Absorbans\ Değeri \times Sulandırma\ Oranı \times 50$ formülü kullanıldı.
5. DNA' da saflık kontrolü için A260/A280 oranı hesaplandı.

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

ASIP geninin ten rengi üzerine etkisini anlamak için DNA örneklerinde SNP'nin olduğu kısmı da içeren bölge Forward ve Reverse primer çiftleri kullanılarak PZR yöntemi ile amplifiye edildi.

Bu çalışmada ASIP gen bölgesi rs 6119471 SNP lokusunun genotip tayini yapılmıştır. Daha önceden tasarlanmış olan Forward ve Reverse primer çifti PZR yöntemi ile amplifiye edilmeden önce optimizasyon denemeleri SNP bölgelerinin en yüksek ve en düşük Tm sıcaklıkları baz alınarak yapılmıştır. Bu denemeler sunucunda en iyi protokol tespit edilmiştir. PZR reaksiyonu için Forward ve Reverse primerlerin en iyi bağlanma sıcaklıkları belirlenmiş ve primerler ile PZR reaksiyonu gerçekleştirilirken ilgili bağlanma sıcaklıkları uygulanmıştır. PZR işlemi T100 Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hedeflenen DNA bölgesi için 39 döngü yapıldı.

3.3.1. PZR Primer Listesi

Hedeflenen gen bölgesinin çoğaltılması için Forward (F: Direkt) ve Reverse (R: karşıt) primerleri kullanıldı. Amplifikasyon işlemi Forward primerinin DNA'nın bir ipliğine Reverse primerinin ise diğer ipliğine bağlanmasıyla başlar. Primerlerin dizaynı Primer3Plus programı ile yapıldı. Macrogen firması primerleri sentezledi. ASIP genine ait primer listesi Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1: ASIP geni genotip bilgileri

SNP	Gen	Allel	Pozisyon
rs6119471	ASIP	C/G	3278212

Tablo 2: PCR primerleri ve özellikleri

Gen Adı	rs Kodu	Primer Dizisi	Tm (°C)	Uzunluk (bp)
ASIP	rs 6119471	F: 5' - CTA GCC TGG GCA GCA GAG - 3'	60.7	18
		R: 5' - CTG CGT ACA CTT CCC TGG AT - 3'	60.5	20

PZR protokolü iki basamakta gerçekleştirilmiştir:

1. PZR bileşenlerinin hazırlanması:

Tablo3'deki gibi 12 örnek için PZR karışımı hazırlandı ve Thermal Cyclers'a örnekler yerleştirildi.

Tablo 3: PZR için kullanılan bileşenler ve miktarları

PZR Bileşenleri	1 x Hacim / Reaksiyon µl
Taq DNA Polymerase PZRBuffer	5 µl
F Primer	1 µl
R Primer	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,5 µl
Distile su	15,5 µl
DNA	2 µl
Toplam Hacim 25 µl	

2. Thermal cyclers döngüsü:

Tablo 4: PZR Döngüsü

Basamaklar	Sıcaklık	Zaman
Başlangıç Denatürasyon	95°C	5 dakika
Denatürasyon	95°C	1 dakika
Bağlanma	56°C	45 saniye
Uzama	72°C	1 dakika
Son Uzama	72°C	4 dakika
Döngü Sayısı 39		

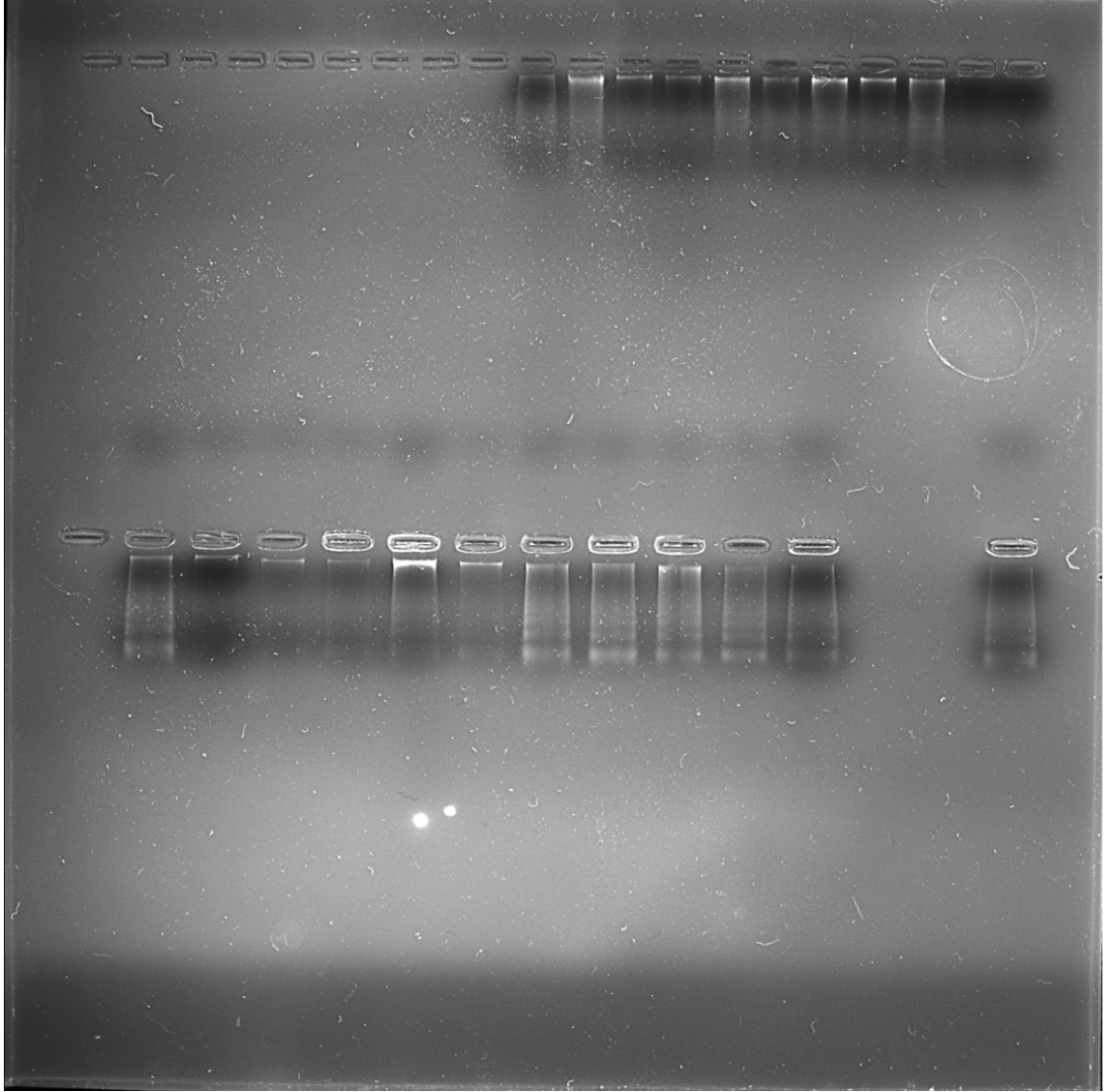
3.4. PZR Ürünlerinin Jel Elektrofrezisi ile Belirlenmesi ve Jelin Hazırlanması

- 1) 1,5 gram agaroz tartıldı ve erlene konuldu.
- 2) 150 ml 0,5 x TBE çözeltisi erlene konuldu ve hafifçe çalkalayarak karıştırıldı.

- 3) Mikrodalga fırın yüksek sıcaklıkta erlendeki örnek kaynayana kadar çalıştırıldı.
- 4) Aralıklarla erlen mikrodalga fırından çıkarılarak karıştırıldı.
- 5) Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında 50-60°C'ye düşünceye kadar bekletildi.
- 6) 2 µl EtBr eklendi ve homojen hale gelinceye kadar hafifçe çalkalanarak karıştırıldı.
- 7) Hazırlanan çözelti jel tarakları yerleştirilmiş jel kabına hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde döküldü.
- 8) Jel katılaşıncaya kadar oda sıcaklığında bekletildi.
- 9) Taraklar jele zarar vermeyecek şekilde çıkarıldı ve jel elektroforez tankına alındı.
NOT: Jel kuyucukları, yürütme tankının katot elektrot tarafına yerleştirilmelidir.
- 10) Jelin üzeri kaplanacak şekilde TBE ile doldurulur.

3.4.1. Jel Yükleme

- 1) 20 cm parafilm kesildi ve buz üzerine konuldu.
- 2) 1 µl Jel Loading Buffer ve 5 µl DNA örneği parafilm üzerine konuldu ve mikropipet ile karışım homojen hale getirildi.
- 3) 6 µl'lik karışım mikropipet yardımıyla jeli delmeden kuyucuklara yerleştirildi.
- 4) Tankın kapağı kapatıldı ve anot ve katot uçlarının bağlantıları takıldı.
- 5) 100 V'de 70 mA'da 40 dakika örnekler yürütüldü.
- 6) Jel görüntüleme cihazında UV ışığıyla sonuçlar değerlendirildi.



Şekil 10: UV ışığında ASIP (rs6119471) PZJ Jel Görüntüsü

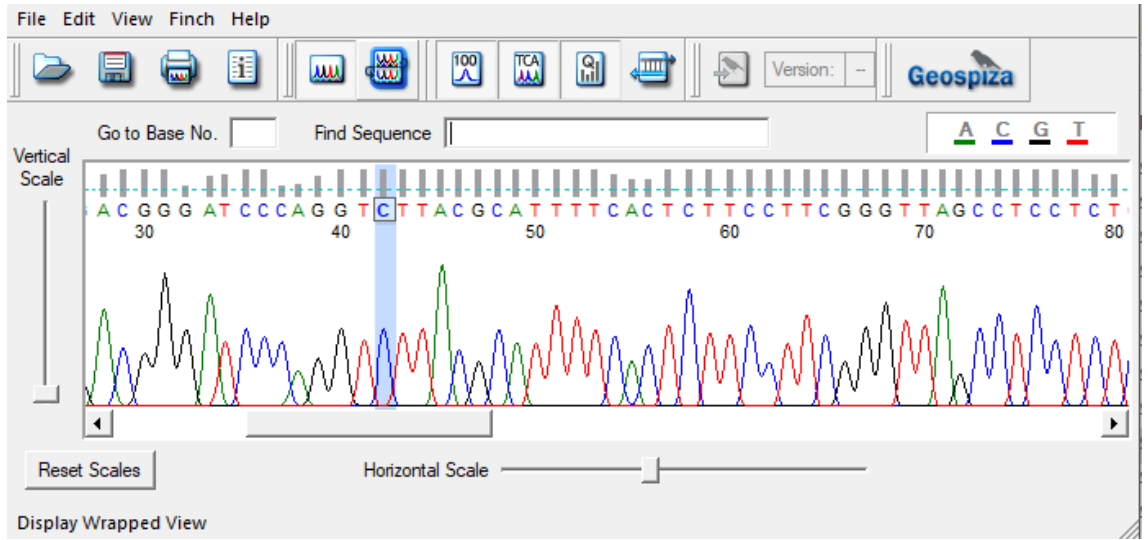
3.5. Sanger DNA Dizileme Yöntemi

Bu çalışmada sekanslama aşaması hizmet alımı kapsamında 16 kapilerli, kapiler uzunluğu 36 cm olan ABI Prism 3130 XL Genetik Analizör cihazında (Applied Biosystems) POP7 polimeri kullanılarak ‘‘BMLabosis’’ firmasının hizmet alımı laboratuvarında gerçekleştirildi.

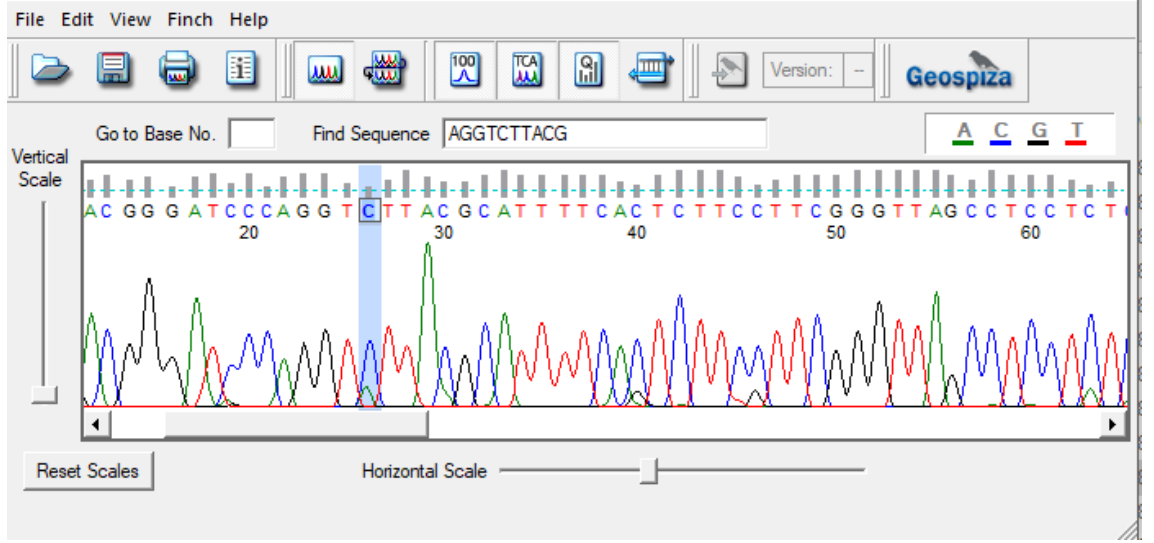
4. BULGULAR

Her bir birey için alınan dizi (Forward) Finch TV Chromatogram Viewer (Digital World Biology, USA) (<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>) programı ile açılmış ve The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) web sitesindeki Pairwise Sequence Alignment (Çift yönlü sekans hizalama) (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/) programı ile güvenilirliği en yüksek olan diziler karar verilmiştir.

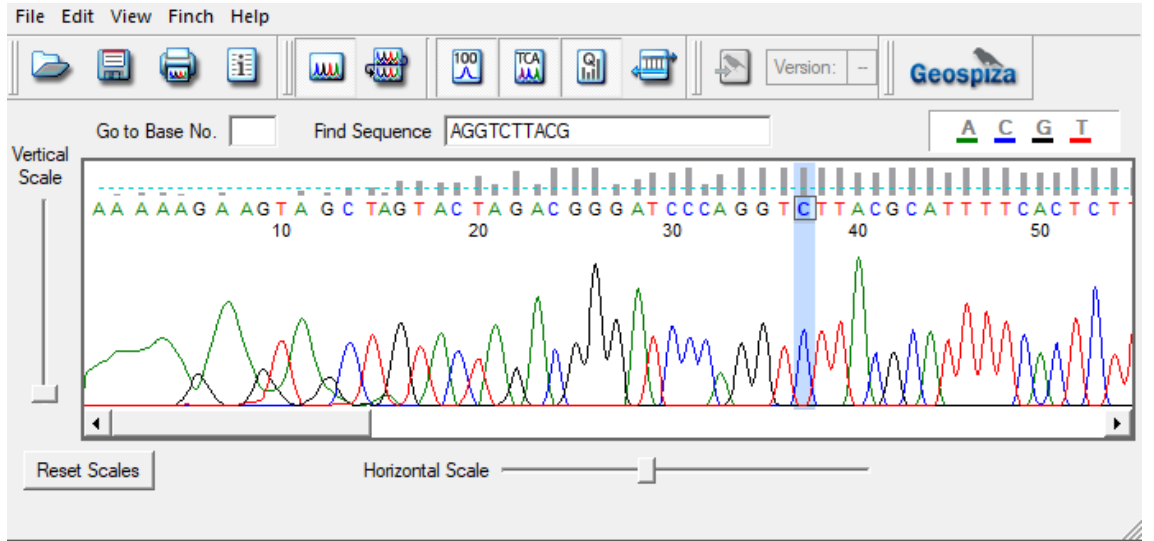
12 örnek için dizilerin okunmasını sağlayan dört farklı renkte piklerin oluşturduğu görüntüler aşağıda gösterilmiştir.



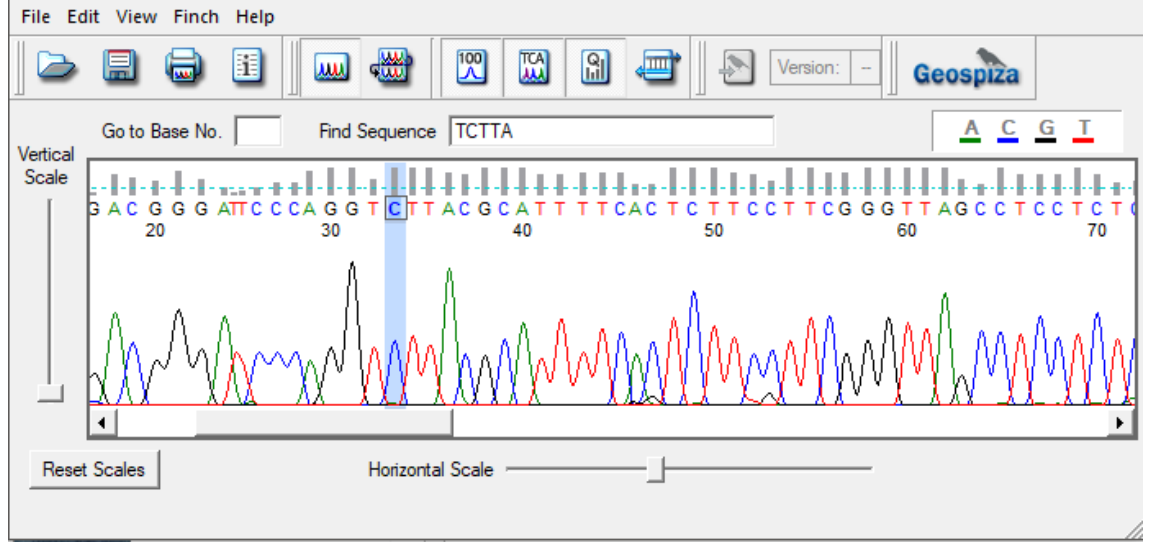
Şekil 11: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 1



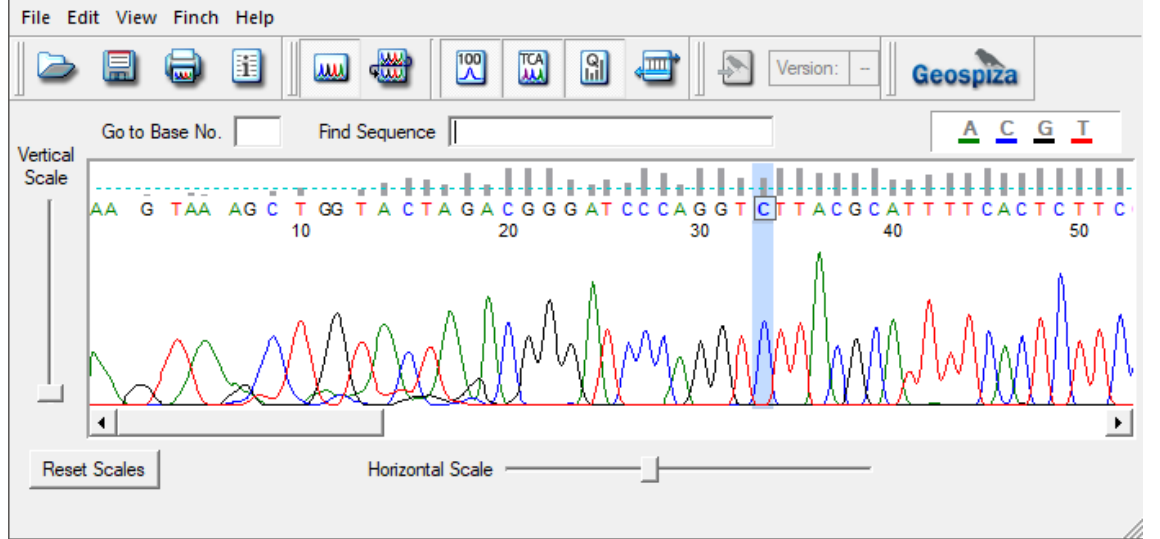
Şekil 12: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 2



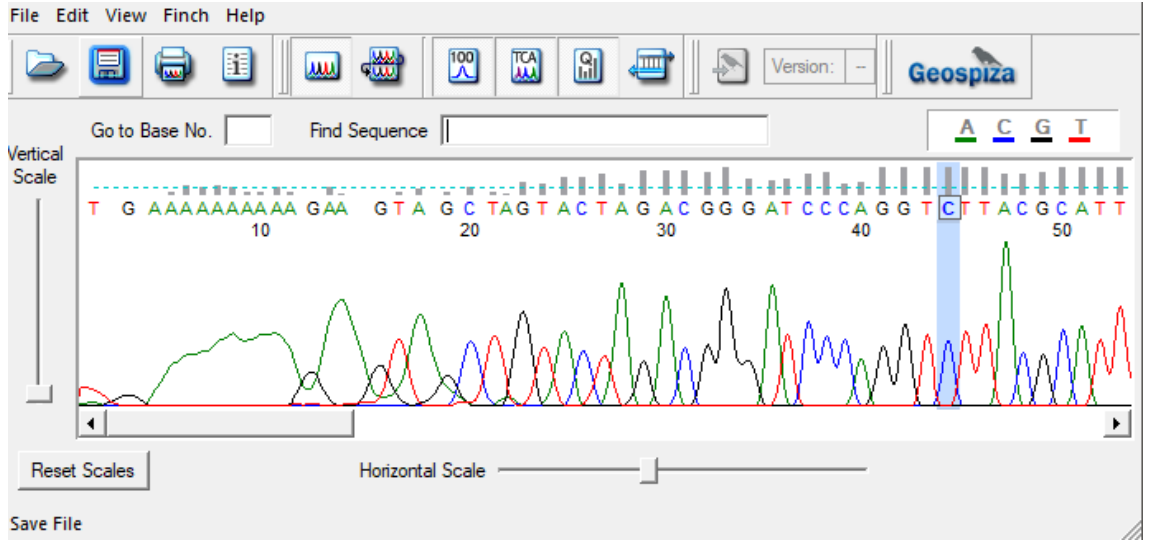
Şekil 13: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 3



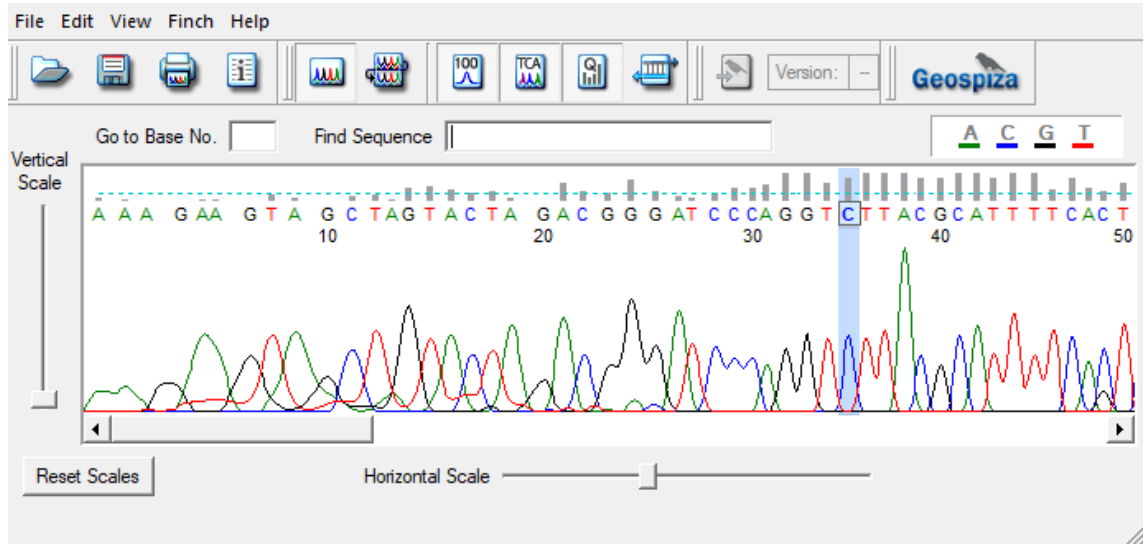
Şekil 14: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 4



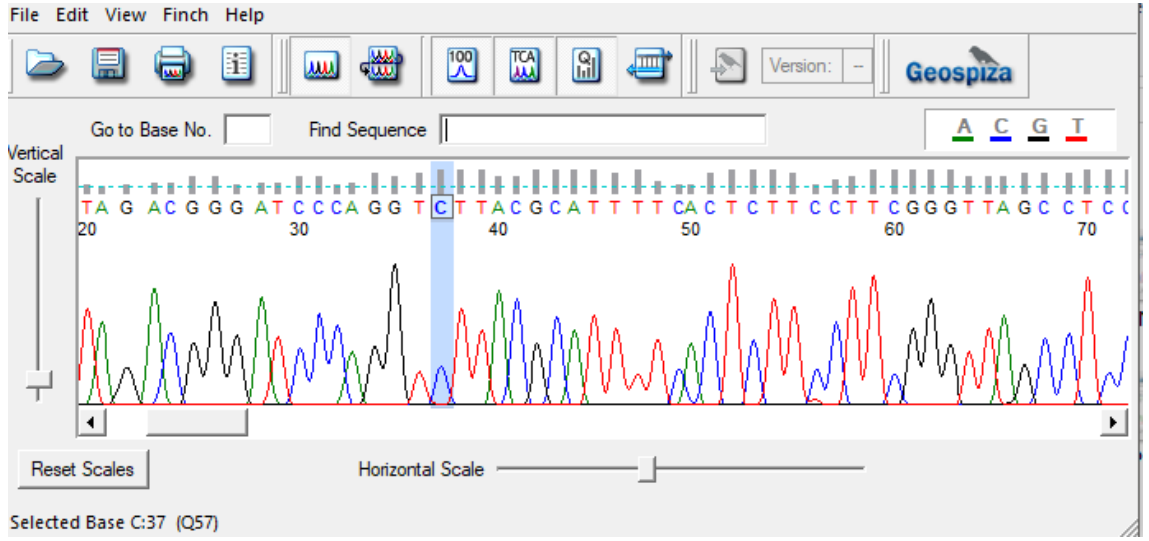
Şekil 15: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 5



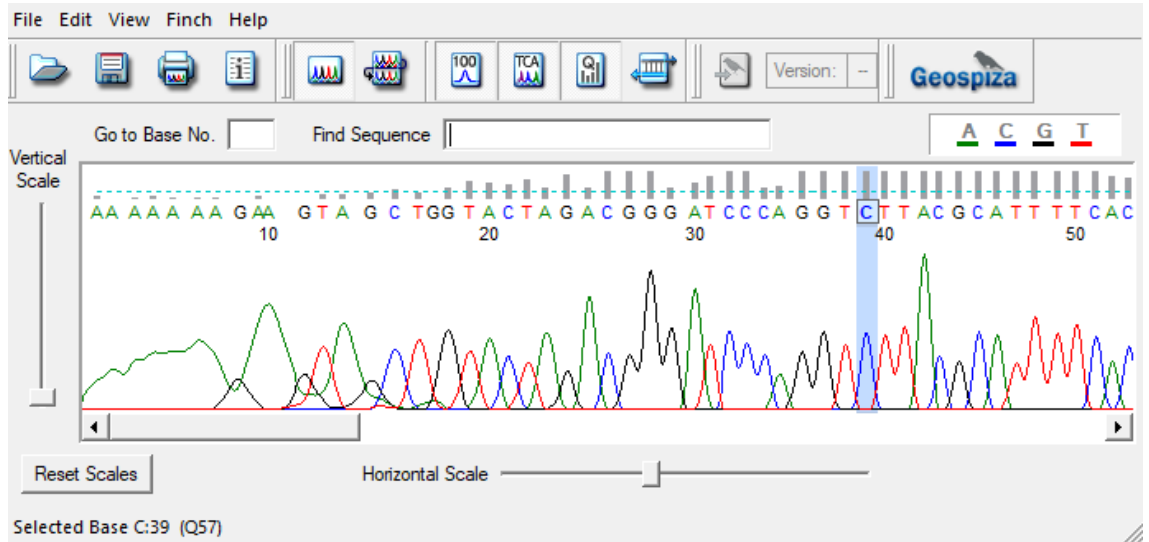
Şekil 16: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 6



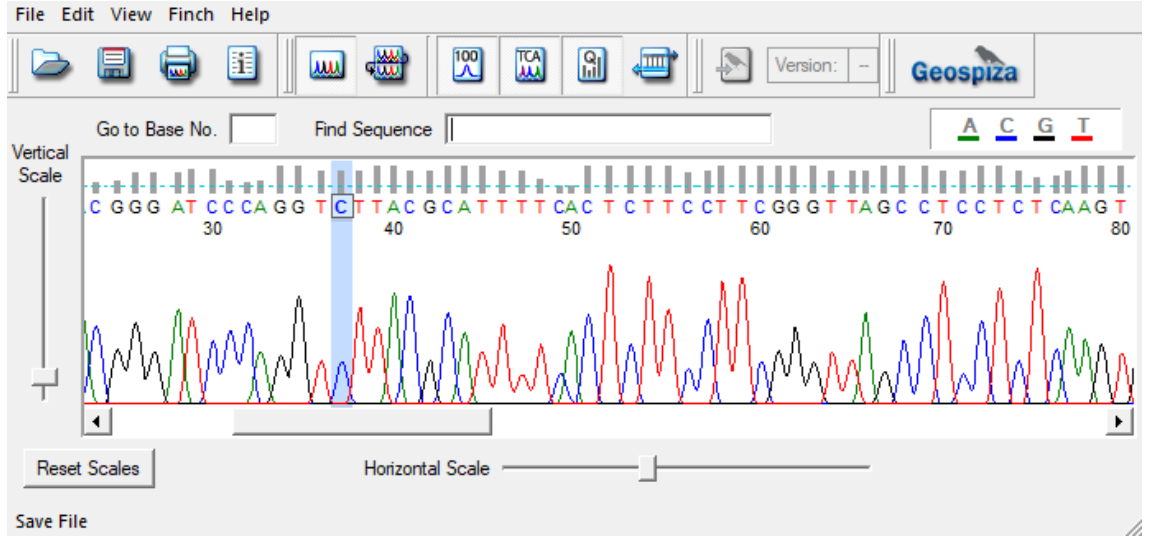
Şekil 17: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 7



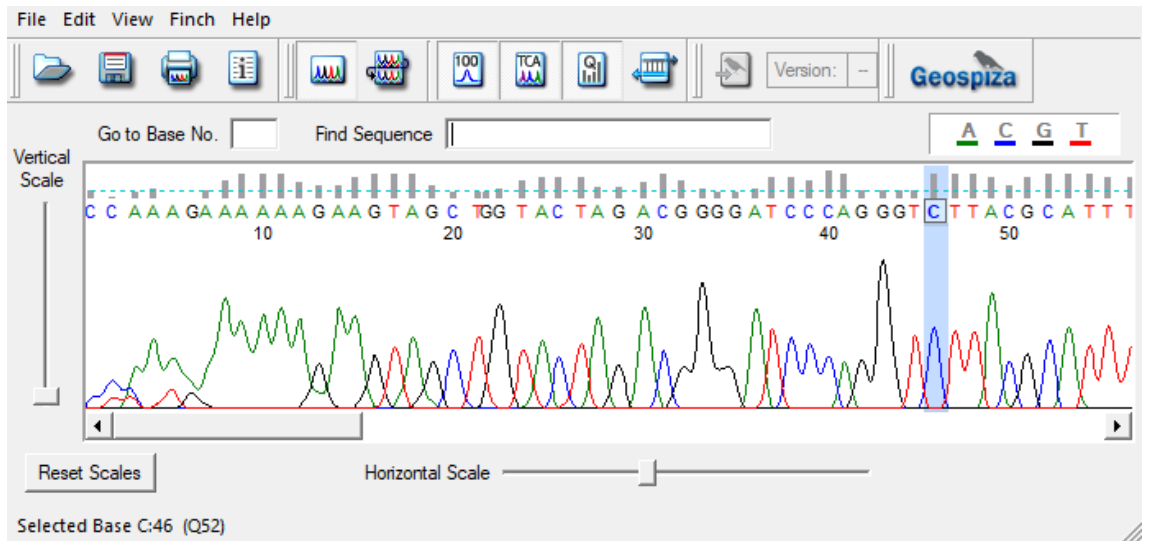
Şekil 18: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 8



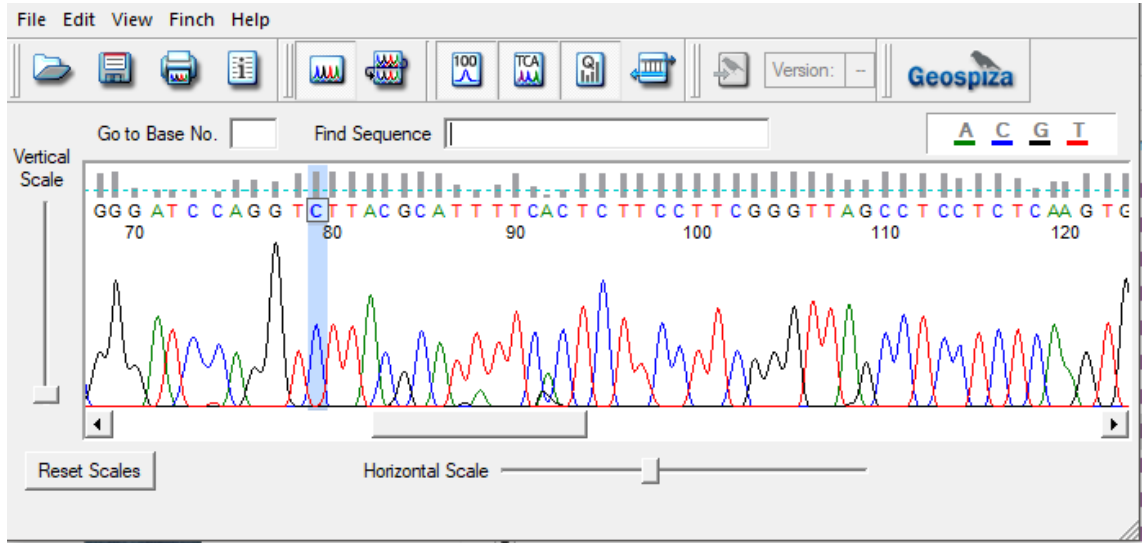
Şekil 19: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 9



Şekil 20: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 10



Şekil 21: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 11



Şekil 22: ASIP (rs6119471) için C genotipli birey 12

ASIP rs6119471 polimorfizminde alınan 12 örnekte C genotipi bulunmuştur. Örneklem grubunda Fitzpatrick ölçeğine göre tip 1, tip 2, tip 3 ve tip 4 olan bireyler bulunmaktadır bunun amacı karşılaştırma yapabilmektir. Ancak Fitzpatrick ölçeğine göre tip 4 olan bireyler dahil tüm bireylerin C genotipli olduğu bulunmuştur. Tip 1 ve tip 2 olan bireylerde farklılık bulunmamıştır. Yani örneklem grubunda G genotipine sahip birey bulunamamıştır.

5. TARTIŞMA

Deri renginin oluşumu melanin pigmenti tarafından gerçekleştirilmektedir. Melanin pigmenti; vücudu ultraviyole (UV) radyasyonundan korunmasında önemli bir rol oynamaktadır.

Farelerde agouti sinyal protein geni (ASIP) pigmentasyonu düzenleyen ana genlerden biridir (Suzuki ve ark., 1997). Fare ASIP'inde fonksiyon mutasyon kaybı ömelanin üretirken, fonksiyon mutasyonlarının kazanımı feomelanin üretimine yol açar. Farelerde çeşitli kürk renkleri, bu değişikliğin sonucunda ortaya çıkar (Voisey ve Van Daal, 2002). ASIP'in türler arasında korunmuş olduğu göz önüne alındığında (Voisey ve Van Daal, 2002), insan pigmentasyonundaki varyasyona katkıda bulunduğu da bilinmektedir (Bonilla ve ark, 2004). Bununla birlikte yapılan çalışmalarla ASIP'in insan pigmentasyonunda kesin rolü tanımlanmaya devam etmektedir (Bonilla ve ark, 2004).

ASIP'in 3'-UTR bölgesinde bir tek nükleotit polimorfizminin (SNP), Avrupalı ve Amerikalılarda koyu saç ve kahverengi gözlerle ilişkili olduğu bilinmektedir (Kanetsky ve ark., 2002). ASIP SNP için önerilen etki mekanizması G aleli mevcut olduğunda transkriptin azaltılmış mRNA stabilitesini ve erken bozulmasını içerir. Sonuç olarak, MCR'ye bağlanma, α -MSH'a doğru eğilimlidir. Bu da ömelanogeneze ve daha sonra koyu pigmentasyona yol açar (Kanetsky ve ark., 2002; Zeigler-Johnson ve ark.,2004).

ASIP'in ömelaninden feomelanin üretimine geçişte oynadığı rol düşünüldüğünde, insan pigmentasyonundaki bireyler arası varyasyonu açıklayan birçok güçlü gen adayından biridir (Kanetsky ve ark., 2002).

Bu çalışmamızda koyu ten renkli bireylerin, açık ten renkli bireylere göre polimorfik farklılık beklenmiş ancak örneklem grubundaki 12 kişide bu SNP için farklılık olmaksızın C genotipi bulunmuştur. Daha detaylı veriler elde etmek için ve adli genetik uygulama alanlarında bu bilgi ve metodolojiyi kullanabilmek için örneklem grubunun genişletilmesi gerekmektedir.

2. bireyin sekans analizinde C genotipinin yanı sıra A genotipine de görüldü. Bunun kontaminasyon mu yoksa mutasyon mu olduğu bilinmemektedir. Sekans tekrar edilerek

mutasyon olup olmadığı belirlenmelidir. Türkiye'ye özgü bir polimorfizm ya da bireye ait bir mutasyon olup olmadığı örneklem grubu genişletilerek belirlenmelidir. Bir sonraki çalışma da buna da yer verilmesi planlanmaktadır.

G alelleri, Batı Afrikalılar gibi koyu tenli popülasyonlarda ve Afrikalı Amerikalılar gibi soyu tükenen popülasyonlarda sık görülür (Zeigler-Johnson ve ark.,2004). Literatürde yapılan çalışmalar sonucunda koyu tenin toplam melanin içeriği ve derideki ömelanın ve feomelanin oranı gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla farklı popülasyonlarda deri pigmentasyonunda farklı gen kümelerinin bulunması muhtemeldir. Hintlilerle yapılan çalışmada ise ömelaninde önemli seviyelere sahipken, Afrikalılara nispeten yüksek feomelanin konsantrasyonu görülmüştür (Bonilla ve ark., 2004).

Bu çalışmamızda cinsiyete bağlı olarak pigmentasyonda farklılık tespit edilememiştir. Örneklem grubunda az bireyin bulunması istatistiksel güçte bir azalmaya neden olmuştur. ASIP geni popülasyonlarda farklı seviyelerde olmasına rağmen pigmentasyonu etkilediği açıktır (Bonilla ve ark., 2004; Voisey ve ark., 2002). Adipoz dokudaki ASIP gen ekspresyonunu erkeklerde ve kadınlarda vücut kitle indeksi (VKİ) ile zıt olarak ilişkili olduğunu bildirmiş ve bu farklılığın cinsiyet hormonları ile ilişkili olabileceğini öne sürülmüştür. Bu bulguları açıklığa kavuşturmak için daha ileri çalışmalar gereklidir. Deri pigmentasyonu ile ilgili genler farklı popülasyonlar üzerinde fenotipte farklı miktarlarda, farklı şekillerde işlev görür (Bonilla ve ark., 2004).

ASIP'in insan melanom hücrelerinde, farelerde melanojenik yolun bir bileşeni olan trozinaz ile ilişkili protein 1 (TYRP1) (MIM 115501) ve 5 yeni aday genin ekspresyonunu aşağı doğru regüle ettiği bulunmuştur (Voisey ve ark., 2003).

Bu gözlemler, hangi genetik etkileşimlerin insan pigmentasyonunda rol oynadığını belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ

Yapmış olduğumuz bu çalışma Türkiye’de ASIP gen polimorfizminin çalışılmasını sağlayan ilk çalışma olması açısından önemlidir. ASIP geninin insan ten rengini belirleyen genlerden biri olduğu literatürde yapılan diğer çalışmalarla belirlenmiştir.

Bu çalışmamızda esmer-koyu ten rengine sahip bireylerin yani Fitzpatrick ölçeğine göre tip 3 ve tip 4 olan bireylerin açık ten renkli bireylere yani Fitzpatrick ölçeğine göre tip 1 ve tip 2 olan bireylere göre polimorfik farklılık beklenmiştir ancak örneklem grubundaki tüm bireylerde farklılık olmaksızın C genotipi olduğu görülmüştür. Örneklem grubumuzda spesifik olarak ayırım göstermediği için adli genetikte kullanımı uygun bulunmamıştır.

Ancak yapmış olduğumuz çalışmanın imkanları kısıtlı olduğundan örneklem grubu verileri 12 kişi ile sınırlı kalmıştır. Daha detaylı veriler oluşturmak için ve Türkiye’de adli genetik laboratuvarlarında kullanabilmek için Türkiye popülasyonunu temsil edecek şekilde daha fazla sayıda örnek ile çalışılarak Türkiyedeki alel frekanslarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla yüksek örneklem sayısı ile benzer metodoloji kullanılarak bir sonraki çalışma planlanacaktır.

Bu çalışma daha kapsamlı bir çalışma yapılması adına bir metod çalışması olarak değer kazanacaktır. Benzer metodoloji kullanılarak yapılan kapsamlı çalışma adli genetikte ten rengi belirlenmesi açısından önemli olacaktır.

7. KAYNAKLAR

Aoki K. Sexual selection as a cause of human skin colour variation: Darwin's hypothesis revisited. *Ann Hum Biol.* 2002;29:589–608. doi: 10.1080/0301446021000019144.

Barsh G. What Controls Variation in Human Skin Color?. *PLoS Biology.* 2003; 1(1), p.e27.doi:10.1371/journal.pbio.0000027.

Bonilla C, Shriver M, Parra E, Jones A, Fernandez J. Ancestral proportions and their association with skin pigmentation and bone mineral density in Puerto Rican women from New York city. *Hum Genet.*2004; 115:57–68, doi: 10.1007/s00439-004-1125-7
Børsting C, Sanchez JJ. and Morling N. Application of SNPs in forensic casework. *Molecular Forensics:* 2007; 91.

Bouakaze C, Keyser C, Crubézy E, Montagnon D. and Ludes B. Pigment phenotype and biogeographical ancestry from ancient skeletal remains: inferences from multiplexed autosomal SNP analysis. *International Journal of Legal Medicine.* 2009; 123(4), pp.315-325.doi: 10.1007/s00414-009-0348-5.

Branicki W, Liu F, Duijn K, Draus-Barini J, Pośpiech E, Walsh S, Kupiec T, Wojas-Pelc A, Kayser M. Model-based prediction of human hair color using DNA variants. *Hum Genet.* 2011 Apr; 129(4): 443–454., doi: 10.1007/s00439-010-0939-8.

Brookes A. The Essence of SNPs. *Gene.*1999; 234: 77-186, PMID: 10395891.

Cho RJ, Mindrinos M, Richards DR. Genome-Wide Mapping with Biallelic Markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 1999; 23: 203-207, doi: 10.1038/13833.

Commo S, Gaillard O, Bernard BA. Human hair greying is linked to a specific depletion of hair follicle melanocytes affecting both the bulb and the outer root sheath. *Br J Dermatol.* 2004;150:435–443. doi: 10.1046/j.1365-2133.2004.05787.x.

Dell'anna ML, Cario-Andre M, Bellei B, Taieb A, Picardo M. In vitro research on vitiligo: strategies, principles, methodological options and common pitfalls. *Exp Dermatol.* 2012;21:490–496, doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01506.x.

Düvenci A. 30 İnsersiyon/Delesyon (indel) Lokusunun Türkiye'deki Polimorfizmi [Yüksek Lisans Tezi] İstanbul: İstanbul Üniversitesi,2015.

Eiberg H, Mohr J. Assignment of genes coding for Brown eye colour (BEY2) and Brown hair colour (HCL3) on chromosome 15q. *Eur J Hum Gen.* 1996;4(4):237-41. PMID:8875191.

Ford EB. Polymorphism and Taxonomy. In Julian Huxley (ed.). *The New Systematics.* Oxford: Clarendon Pr. 1940;pp. 493–513. ISBN 1-930723-72-5.

Ford EB. *Ecological Genetics* (4th ed.). London: Chapman & Hall. 1975. ISBN 978-94-009-5825-8.

Franklin A, Lund P, Bradbury-Jones C, Taylor J. Children with albinism in African regions: their rights to 'being' and 'doing'. 2018 Jan 12;18(1):2. doi: 10.1186/s12914-018-0144-8.

Fukunaga-Kalabis M. and Herlyn M. Cancer. Complexion matters. *Nature*. 2012;491, 342–343.

Girardot M, Martin J, Guibert S, Leveziel H, Julien R., et al. Widespread expression of the bovine Agouti gene results from at least three alternative promoters. *Pigment Cell Res*. 2005;18:34–41, doi: 10.1111/j.1600-0749.2004.00195.x.

Griffin TJ. and Smith LM. Genetic identification by mass spectrometric analysis of single-nucleotide polymorphisms: ternary encoding of genotypes. *Analytical chemistry*. 2000;72(14): 3298-3302.

Harding RM, Healy E, Ray AJ, Ellis NS, Flanagan N, Todd C, Dixon C, Sajantila A, Jackson IJ, Birch-Machin MA, Rees JL. Evidence for variable selective pressures at MC1R. *Am J Hum Genet*. 2000;66:1351–1361. doi: 10.1086/302863.

Haris JE. Cellular stress and innate inflammation in organ-specific autoimmunity: lessons learned from vitiligo. *Immunol Rev*. 2016 Jan; 269(1): 11–25. doi: [10.1111/imr.12369].

Harris JE, Riding RL, Richmond JM. Mouse Model for Human Vitiligo., *Curr Protoc Immunol*. 2018 Sep 25;e63. doi: 10.1002/cpim.63.

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ASIP#location> (26.09.2018)

<https://www.ameliyat.com/albino-hastaligi-albinizm-d59/> (09.10.2018)

https://www.dermaviduals.com.au/news/hello-im-epidermis/melanocytes-in-the-epidermis_2/ (09.10.2018)

<https://www.drnebilyesiloglu.com/yuz-estetigi> (26.09.2018)

Kanetsky P, Swoyer J, Panossian S, Holmes R, Guerry D, Rebbeck T. A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation. *Am J Hum Genet*. 2002; 70:770–775, doi: 10.1086/339076.

Keeler C, Ridgway S, Lipscomb L, Fromm E. The genetics of adrenal size and tameness in colorphase foxes. *J Hered*. 1968;591:82–84, PMID: 5656925.

Kirchweger G. The evolution of race was as simple as the politics race is complex, *Discover*, 2001; 22, 2.

Klebig ML, Wilkinson JE, Geisler JG, Woychik RP. Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice causes obesity, features of type II diabetes, and yellow fur. *Proc Natl Acad Sci ; USA*. 1995;92:4728–4732, PMID: 7761391.

Kwon HY, Bultman SJ, Loffler C, Chen WJ, Furdon PJ, et al. Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the agouti gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:9760–9764, PMID: 7937887.

Liu Y, Albrecht E, Schering L, Kuehn C, Yang R, Zhao Z, Maak S. Agouti Signaling Protein and Its Receptors as Potential Molecular Markers for Intramuscular and Body Fat Deposition in Cattle., 2018 Mar 6;9:172. doi: 10.3389/fphys.2018.00172.

Mitra D. et al. . An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature* 491. 2012;449–453. doi: 10.1038/nature11624.

Miyamura Y. et al. Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res*. 2007;20, 2–13 doi: 10.1111 / j.1600-0749.2006.00358.x.

Morgan AM, Lo J. and Fisher DE. How does pheomelanin synthesis contribute to melanomagenesis? Two distinct mechanisms could explain the carcinogenicity of pheomelanin synthesis. *Bioessays*2013;35, 672–676.

Norton HL, Kittles RA, Parra E, McKeigue P, Mao X, Cheng K, Canfield VA, Bradley DG, McEvoy B, Shriver MD. Genetic evidence for the convergent evolution of light skin in Europeans and East Asians, *Mol. Biol. Evol.* 24. 2007;710–722. doi: 10.1093/molbev/msl203.

Rana BK, Hewett-Emmett D, Jin L, Chang BH, Sambughin N, Lin M, Watkins S, Bamshad M, Jorde LB, Ramsay M, Jenkins T, Li WH. High polymorphism at the human melanocortin 1 receptor locus. *Genetics*. 1999;151:1547–1557. PMID: 10101176.

Rees JL. The genetics of sun sensitivity in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 75. 2004;739–751. doi: 10.1086/425285.

Rees JL. Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet.* 2003;37:67–90. doi: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143233.

Rogers AR, Iltis D, Wooding S. Genetic variation at the MC1R locus and the time since loss of human body hair. *Curr Anthropol.* 2004;45:105–108. doi: 10.1086/381006.

Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H. and Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230(4732), pp.1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980.

Sarna T, Menon IA. and Sealy RC. Photosensitization of melanins: a comparative study. *Photochem. Photobiol.*1985;42, 529–532.

Schallreuter KU, et al. Vitiligo pathogenesis: autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else? *Exp Dermatol.* 2008;17:139–140. Discussion 141-160. doi: 10.1111/j.1600-0625.2007.00666_1.x.

Sheppard PM. *Natural Selection and Heredity* (4th ed.) London: Hutchinson. 1975.

Sturm RA, Larsson M. Genetics of human iris colour and patterns. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22:544–562. doi: 10.1111/j.1755-148X.2009.00606.x.

Sturm RA. Human pigmentation genes and their response to solar UV radiation, *Mutat. Res.* 422 1998;69–76. PMID: 9920429.

Sturm RA, Duffy DL, Zhao ZZ, Leite FP, Stark MS, Hayward NK, Martin NG, Montgomery GW. A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the *HERC2* gene determines human blue-brown eye color. *Am J Hum Genet.* 2008 Feb;82(2):424-31. doi: 10.1016/j.ajhg.2007.11.005.

Sturm RA. Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum. Mol. Genet.* 18 2009;R9–R17., doi: 10.1093/hmg/ddp003.

Suzuki I, Tada A, Ollmann M, Barsh G, Im S, Lamoreux M, Hearing V, Nordlund J, Abdel-Malek Z. Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. *J Invest Dermatol.* 1997;108:838–842. PMID: 9182807.

Taieb A, Picardo M. Clinical practice. Vitiligo. *N Engl J Med.* 2009;360:160–169., doi: 10.1056/NEJMcp0804388.

Tobin DJ. The cell biology of human hair follicle pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24:75–88. doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00803.x.

Van den Boorn JG, et al. Autoimmune destruction of skin melanocytes by perilesional T cells from vitiligo patients. *J Invest Dermatol.* 2009;129:2220–2232. doi: 10.1038/jid.2009.32.

Van Raamsdonk CD, Barsh GS, Wakamatsu K, Ito S. Independent regulation of hair and skin color by two G protein-coupled pathways. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22:819–826. doi: 10.1111/j.1755-148X.2009.00609.x.

Voisey J, Imbeault P, Hutley L, Prins J, Van Daal A. Body mass index-related human adipocyte agouti expression is sexspecific but not depot-specific. *Obes Res* 2002; 10:447–452, doi: 10.1038/oby.2002.62.

Voisey J, Kelly G, Van Daal A. Agouti signal protein regulation in human melanoma cells. *Pigment Cell Res.*2003;6:65–71., PMID: 12519127.

Voisey J, Van Daal A. Agouti: from mouse to man, from skin to fat. *Pigment Cell Res* 2002;15:10–18., PMID: 11837451.

Walsh S, Chaitanya L, Breslin K, Muralidharan C, Bronikowska A, Pospiech E, Koller J, Kovatsi L, Wollstein A, Branicki W, Liu F, Kayser M. Global skin colour prediction from DNA, *Hum Genet* 2017;136:847–863, doi 10.1007/s00439-017-1808-5.

Wang DG, Fan JB, Siao CJ. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome *Science*.1998;280: 1077-1082., PMID: 9582121.

Xue B, Moustaid N, Wilkison WO, Zemel MB. The agouti gene product inhibits lipolysis in human adipocytes via a Ca²⁺-dependent mechanism. *FASEB J*. 1998;12:1391–1396., PMID: 9761782.

Yahalom C, Tzur V, Blumenfeld A, Greifner G, Eli D, Rosenmann A, Glanzer S, Anteby I. Refractive profile in oculocutaneous albinism and its correlation with final visual outcome. *Br J Ophthalmol*. 2012;96:537–539. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-300072.

Zeigler-Johnson C, Panossian S, Gueye S, Jalloh M, Ofori-Adjei D, Kanetsky P. Population differences in the frequency of the agouti signaling protein g.8188A>G polymorphism. *Pigment Cell Res*.2004;17:185–187, doi: 10.1111/j.1600-0749.2004.00134.x.

EK 2. BEYAN FORMU

Bu çalışmanın kendi tez çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Tarih

Adı Soyadı

İmza

EK 3. ETİK KURUL KARARI



info@uskudar.edu.tr

Altunizade Mah. Haluk Türksoy Sk. No:14, 34662 Üsküdar / İstanbul / Türkiye
Tel: +90 216 400 22 22 Faks: +90 216 474 12 56

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

SAYI: B.08.6.YÖK.2.ÜS.0.05.0.06 /2018/835

25/09/2018

Dr.Öğr.Üyesi Kaan YILANCIOĞLU
(Hamide Sümeğe BOZKURT)

Üsküdar Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulunun 23/06/2018 tarihinde yapılan 07 No.lu toplantısında uygun görülen “Türkiye Populasyonunda DNA’dan Koyu Ten Rengi Tayini” adlı araştırma projenizin adının 25/09/2018 tarihli 10 no lu Girişimsel Olmayan Etik Kurul toplantısında “Ten Rengi Tayininde ASIP Gen Polimorfizmi” olarak değiştirilmesinin etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç.Dr.Cumhur TAŞ
Girişimsel Olmayan Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

EK 4. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad-Soyad: Hamide Sümeyye Bozkurt

e-mail: hsumeyyebozkurt@gmail.com

Eğitim Bilgileri

2012-2015 Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi Laboratuvar ve Veteriner
Teknikerliği

2010 - 2015 İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

2016 – 2018 Üsküdar Üniversitesi, Bağımlılık ve Adli Bilimleri Enstitüsü Adli Genetik
Bilim Dalı

Yabancı Dil

İngilizce

Sertifika

ISO 17025: 2005 Laboratuvar Akreditasyonu

ISO 15189 Tıbbi Laboratuvar Akreditasyonu

ISO 13485 Tıbbi Cihaz Üretimi Kalite Yönetim Sistemi

ISO 9001 Kalite Yönetim Sistemi

Uluslararası Bilimsel Toplantılara (kongre, sempozyum, v.b) Katılım