

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ  
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI  
1. Danışman: Prof. Dr. Melek Öztürk  
2. Danışman: Doç. Dr. Zuhâl Eroğlu**

**X KROMOZOMUNDA YER ALAN 5 FARKLI LOKUSTAKİ  
TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİNİN  
MİNİSEKANSLAMA YÖNTEMİ  
İLE ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Selin Yeşil  
Biyolog**

**İstanbul – 2013**

İstanbul, 21 Ağustos 2013

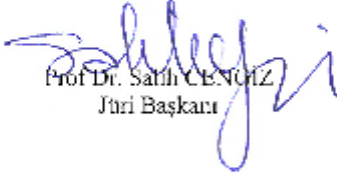
**İ.Ü. ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ**  
**FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA**


Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 36. Maddesi uyarınca Enstitümüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nın yüksek lisans öğrencisi Selin YRŞİL'in

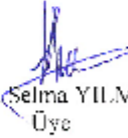
"X Kromozomunda Yer Alan 5 Farklı Lokustaki Tek Nükleotid Polimerizasyonlarının  
Minisekanslama Yöntemi İle Araştırılması "

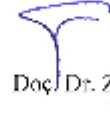
Adlı tezi jürimizce tetkik edilmiş ve kendisine tez savunması yaptırılmıştır.

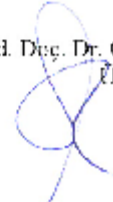
Yukarıda adı geçen tezin ve tez savunmasının kabul edilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

  
Prof. Dr. Salih CENOLIZ  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK  
Danışmanı

  
Prof. Dr. Selma YILMAZER  
Üye

  
Doç. Dr. Zuhâl EROĞLU  
Üye

  
Yrd. Doç. Dr. Gönül FULUOĞLU  
Üye

Bu tez projesi İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: **21064**

## TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması süresince katkı ve yardımlarını esirgemeyen, pozitif bakış açısıyla sorunları çözmemde bana destek olan danışman hocam sayın **Prof. Dr. Melek ÖZTÜRK**'e tez çalışmamda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım 2. danışman hocam sayın **Doç. Dr. Zuhale EROĞLU**'na çok teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nde yüksek lisans eğitimim boyunca gösterdiği desteklerden dolayı Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Salih CENGİZ**'e çok teşekkür ederim. Tez çalışmamda karşılaştığım sorunlarda bana destek vererek yol gösteren **Yard. Doç. Dr. Havva ALTUNÇUL**'a çok teşekkür ederim.

Tezimde benden yardımlarını esirgemeyen, laboratuvarında yaşadığım her sorunun çözümünde bana sabırla katlanan, laboratuvar çalışmamda beni yönlendiren değerli hocam **Araş. Gör. Özlem BÜLBÜL**'e çok teşekkür ederim.

Hiçbir zaman yardımını esirgemeyen ve tez çalışmamdaki istatistiksel hesaplamalarda yardımcı olan Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam **Prof. Dr. Cumhuriyet GÜNDÜZ**'e tezime olan katkılarından ve bana laboratuvarları kullanma izni verdiği için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca Tıbbi Genetik Anabilim dalında genetik laboratuvarını kullanmama izin veren **Doç. Dr. Hüseyin ONAY**'a anlayışından dolayı çok teşekkür ederim.

Her zaman manevi desteklerini hissettiğim değerli hocalarım **Yard. Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI**'ya ve **Yard. Doç. Dr. Nur SELVİ**'ye teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar bilgisini ve yardımını esirgemeyen **Araş. Gör. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ**'a, **Araş. Gör. Aslı TETİK VARDARLI** ve **Araş. Gör. Duygu AYGÜNEŞ** çok teşekkür ederim.

Tezimi hazırlama aşamasında her zaman yanımda olan, en umutsuzluğa düştüğüm anda beni motive eden değerli dostlarım; **Dok. Öğr. Çağla KAYABAŞI'na, Dok. Öğr. Zeynep MUTLU'ya, Yük. Lis. Öğr. Cansu ÇALIŞKAN'a, Yük. Lis. Öğr. Sezgi KIPÇAK'a, Dok. Öğr. Tuğçe BALCI'ya, Yük. Lis. Öğr. Merkkaya ARAS'a, Dok. Öğr. Ali Şahin KÜÇÜKASLAN, Araş. Gör. Bakiye GÖKER'e** çok teşekkür ederim. Tez yazımında verdiği destekten dolayı **Yük. Lis. Öğr. Tuğba SOHTORİK ÖZTÜRK'e** çok teşekkür ederim.

Kendimi bir parçası hissettiğim tüm Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Ege Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve bana İstanbul'da evinin kapılarını açan **ÇEVİK** ailesine sonsuz teşekkürler.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, eğitim hayatım boyunca gösterdikleri fedakarlıkların yanı sıra seçimlerime saygı duyup her zaman arkamda olduklarını bana hissettiren canım annem ve babama teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>KISALTMALAR.....</b>	<b>iv</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ.....</b>	<b>vi</b>
<b>TABLO LİSTESİ.....</b>	<b>viii</b>
<b>1.GİRİŞ ve AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1 X Kromozomunun Özellikleri.....	3
2.1.1.X kromozomu Üzerinde Bulunan Genetik Belirteçlerin.....	8
Adli Bilimlerdeki Önemi	
2.2 Adli Bilimlerde Kimliklendirmede Kullanılan Sistemlerin.....	9
Tarihsel Gelişimi	
2.3 Polimorfizm.....	13
2.4 Tek Nükleotid Polimorfizmleri.....	15
2.5 SNP' lerin Adli Bilimlerde Kullanımı.....	16
2.6 Tek Nükleotid Polimorfizmlerini Tiplendirme.....	18
Teknikleri	
A. Alele özgü hibridizasyon.....	19
A.1 Fret kullanarak homojen hibridizasyon.....	20
A.2 Array (Dizi) hibridizasyonu ve floresan saptama.....	25
B.Primer uzama.....	25
B.1 Minisekanslama.....	26
B.2 Pirosekanslama.....	30
B.3 Alele-özü uzama.....	31
C.Alele özgü oligonükleotid ligasyonu.....	32
D. Invazif kesilme.....	33
2.7 PCR Yöntemi ile DNA'nın Çoğaltılması.....	35
2.7.1 Multipleks PCR.....	37
2.8 Elektroforez.....	38

2.8.1 Agaroz Jel Elektroforezi.....	39
2.8.2 Poliakrilamit Jel Elektroforezi.....	40
2.8.3 Kapiler Elektroforez .....	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	43
3.1 GEREÇ.....	43
3.1.1 Kimyasal Malzemeler .....	43
3.1.2 Kullanılan Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanışı .....	44
3.1.3 Kullanılan Cihazlar .....	46
3.2 YÖNTEM.....	47
3.2.1 DNA İzolasyonu.....	48
3.2.2 I.PCR .....	48
3.2.3 I. PCR ürünlerinin saflaştırılması.....	52
3.2.4 II. PCR.....	52
3.2.5 II. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	55
3.2.6 SNaPshot Ürünlerinin ABI 3100 Analizör Cihazı .....	55
ile Elektroforezi	
3.2.7 Verilerin Analizi.....	57
3.2.8 İstatistiksel Analiz .....	57
4.BULGULAR .....	58
4.1 Optimizasyon Çalışmaları .....	58
4.2 Validasyon çalışmaları .....	64
4.2.1. Analiz Eşiğinin Belirlenmesi .....	65
4.2.2. Duyarlılık çalışması.....	65
4.2.3 Tekrarlanabilirlik çalışması.....	67
4.2.4. Karışım örnek çalışması .....	68

4.3 Analizi yapılan örneklerin değerlendirilmesi .....	71
4.4 İstatistiksel Bulgular .....	77
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	81
6. ÖZET .....	91
7.SUMMARY .....	92
8.KAYNAKLAR.....	93



**KISALTMALAR**

A = Adenin

APEX = Array Primer Uzama

APS = Amonyum Persülfat

ASO = Allel Spesifik Oligonükleotid

ATP = Adenozintrifosfat

Bis = N,N'-metilen-bis-akrilamit

BSA = Bovine serum albumin

C = Sitozin

CCD (charge coupled device)

DNA = Deoksiribonükleik Asit

ddNTP = Dideoksiribonükleosit Trifosfat

ddATP = Dideoksi Adenozin Trifosfat

ddCTP = Dideoksi Sitozin Trifosfat

ddGTP = Dideoksi Guanozin Trifosfat

ddTTP = Dideoksi Timidin Trifosfat

dATP = Deoksi Adenin Trifosfat

dGTP = Deoksi Guanin Trifosfat

dTTP = Deoksi Timin Trifosfat

dCTP = Deoksi Sitozin Trifosfat

EXO I = E.Coli Exonuclease 1

FBI = Federal Bureau of Investigation

FP = Floresans Polarizasyon

FRET = Floresans Rezonans Enerji Transferi

G = Guanin

HLA = İnsan Lökosit antijeni

HPLC = High Performance Liquid Chromotography

LC = LightCycler

MALDI-TOF = Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight

MEC = Mean Exclusion chance

MgCl<sub>2</sub> = Magnezyum klorür

mtDNA = Mitokondrial DNA

OLA = Oligonükleotid Ligasyon Analiz

PCR = Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

P<sub>D</sub> = power of discrimination (ayırt etme gücü)

P<sub>I</sub> = power of identity (kimliklendirme gücü)

PIC = Polymorphism information contents

RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphisms

SAP = Shrimp Alkaline Phosphatase (Karides Alkalın Fosfataz)

SBE = Single Base Extension (Tek Baz Uzama)

SNP = Single Nükleotid Polimorfizim (Tek Nokta Polimorfizmi)

STR = Short Tandem Repeat (Kısa Tekrar Dizinleri)

T = Timin

Taq = Thermus Aquaticus

TAE = Tris-acetate-EDTA

TBE = Tris-borat-EDTA

TEMED = N,N,N,N-Tetrametil etilendiamin

UV = Ultraviyole

VEGA = Vertebrate Genome Annotation

VNTR = Variable Numbers of Tandem Repeats (Değişik Ardsık Tekrar Dizinleri)

Y-SNP = Y kromozomal Single Nükleotid Polimorfizim

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 X kromozomuyla ilgili genel bilgi içeren şematik görünüm .....	4
Şekil 2.2 X kromozomu üzerindeki bazı tek nükleotid polimorfizmlerinin.....	
Yerleşimi .....	7
Şekil 2.3 Adli genetik analizlerini etkileyen önemli gelişmelerin zaman çizelgesi .....	12
Şekil 2.4 SNP analizinde kullanılan tiplendirme teknikleri .....	19
Şekil 2.5 Alel spesifik hibridizasyon yönteminin genel şematik görünümü .....	20
Şekil 2.6 Lightcycler yönteminin genel şematik görünümü.....	22
Şekil 2.7 Taqman yönteminin genel şematik görünümü .....	23
Şekil 2.8 Moleküler işaretçi yönteminin genel şematik gösterimi .....	24
Şekil 2.9. Primer uzama yönteminin genel şematik görünümü .....	26
Şekil 2.10 Farklı floresan işaretli ddNTP' lerin analizi .....	27
Şekil 2.11 SNaPshot yöntemi.....	28
Şekil 2.12. Allel Spesifik Uzama yönteminin genel şematik görünümü.....	32
Şekil 2.13. Allele özgü oligonükleotid bağlanma yönteminin genel şematik görünümü.....	33
Şekil 2.14. İnvazif Klevaj ( kesilme ) yönteminin genel şematik görünümü .....	35
Şekil 4.1 SNaPshot kit pozitif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü .....	58
Şekil 4.2 GeneScan-120 Liz internal size standart uzunlukları.....	59
Şekil 4.3 SNaPshot kit Negatif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü.....	59
Şekil 4.4 Singlepleks PCR sonrası ürünlerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	60
Şekil 4.5 Sırasıyla X018-X036-X047-X131-X142 SNP noktalarının .....	
elektroforegram görüntüsü .....	61
Şekil 4.6 Multipleks PCR sonrası ürünlerin poliakrilamid jel .....	
elektroforezi görüntüsü .....	62
Şekil 4.7 K562 kontrol örneğinin duyarlılık çalışması .....	
sonucunda elde edilen görüntüler .....	66

<b>Şekil 4.8</b> Analizi yapılan bir örneğin farklı zamanlarda 6 kere yürütülmesi.....	
sonucu görüntülerin karşılaştırılması ile elde edilen elektroforegram görüntüsü .....	67
<b>Şekil 4.9</b> İki erkeğe ait DNA örneklerinin 1/1 oranında karıştırılmasıyla .....	
elde edilen elektroforegram görüntüsü.....	69
<b>Şekil 4.10</b> İki kadına ait DNA örneklerinin 1/1 oranında karıştırılmasıyla .....	
elde edilen elektroforegram görüntüsü.....	70
<b>Şekil 4.11</b> Bir erkek ve bir kadına ait DNA örneklerinin 1/1 oranında.....	
karıştırılmasıyla elde edilen elektroforegram görüntüsü .....	71
<b>Şekil 4.12</b> Bir kadına ait elektroforegram görüntüsü .....	72
<b>Şekil 4.13</b> Bir erkeğe ait elektroforegram görüntüsü .....	72
<b>Şekil 4.14</b> 5 SNP lokusunun allel frekansı oranlarının grafik.....	
üzerinde görünümü.....	78

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1</b> X kromozomu üzerinde çeşitli SNP' lerin rs numaraları ve bulunduğu bölgeler .....	7
<b>Tablo 3.1</b> Kullanılan kimyasal maddeler .....	43
<b>Tablo 3.2</b> PAGE için gerekli malzemeler ve miktarları .....	45
<b>Tablo 3.3</b> Kullanılan cihaz ve gereçler .....	46
<b>Tablo 3.4</b> SNaPshot minisekanslama yönteminin genel akış şeması .....	47
<b>Tablo 3.5</b> PCR primerleri .....	49
<b>Tablo 3.6</b> PCR karışım tablosu .....	50
<b>Tablo 3.7</b> PCR döngüsü.....	50
<b>Tablo 3.8.</b> İkinci PCR primerlerinin oranları.....	53
<b>Tablo 3.9</b> 2.PCR karışımı hazırlama tablosu .....	54
<b>Tablo 3.10</b> İkinci PCR döngüsü.....	54
<b>Tablo 3.11</b> SNaPshot primer dizini ve beklenen son ürün uzunlukları .....	55
<b>Tablo 3.12</b> 3100 Genetik Analizör cihazı için ayarlanan parametreler .....	56
<b>Tablo 4.1</b> SNaPshot multipleks kiti pozitif kontrol reaksiyonunda beklenen sonuçlar .....	58
<b>Tablo 4.2</b> 3100 ve 3130 analizör cihazlarında yürütülen ürünlerin gözlenen ve beklenen boyutları arasındaki farklar .....	64
<b>Tablo 4.3</b> Tekrarlanabilirlik çalışmasına ait örneklerin son ürün uzunlukları ortalamaları ve standart sapmaları .....	68

<b>Tablo 4.4</b> SNP noktalarının beklenen son ürün uzunlukları, son ürün uzunluğu ortalaması ve standart sapma değerleri .....	73
<b>Tablo 4.5</b> Erkek bireylere ait SNP profilleri.....	74
<b>Tablo 4.6</b> Kadın bireylere ait SNP profilleri.....	75
<b>Tablo 4.7</b> 5 SNP lokusunun allel frekansı oranları.....	77
<b>Tablo 4.8</b> Sırasıyla X018, X036, X047, X131, X142 lokuslarının Fst değerleri.....	79

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Adli bilimler, çok genel olarak bilimin yasalara uygulanması şeklinde tanımlanır ve birçok bilim dalı ve teknolojiden destek alan bilimler topluluğudur. Bu bilimlerin bir dalı olan adli genetikte, ailesel ilişkilerin araştırılmasının yanı sıra kitlesel felaketler ya da doğal ve doğal olmayan şekilde ölen, kimliği belirsiz cesetlerin tanımlanması ve olay yerindeki olası failin varlığını kanıtlayacak, insan orjinli olay yeri örneklerinin genetik profilinin karşılaştırılması suretiyle biyolojik örnekler analiz edilmektedir (Schneider P.M, 2007).

İlk olarak ABO kan grup tayini ile başlayan kimliklendirme süreci kan alt grupları, serum proteinleri ve eritrosit enzim tayini ile devam etmiştir. Fakat daha sonra DNA analiz yöntemleri bunların yerini almıştır (Budowle B. ve ark, 2008).

ISFG (Uluslararası adli genetik topluluğu), babalık testi ve tüm kriminal araştırma alanları için DNA tiplendirme metodlarının önemini farketmiş ve hibridizasyona dayalı tek ya da çoklu problemler ile yeni PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) tiplendirme sistemlerinin kullanımını gerektiren konuları ele almıştır. Bu sistemler, şüpheli olan veya suçlu olduğu kanıtlanmış failerin DNA profillerini içeren ulusal DNA veritabanlarının kurulmasına öncülük etmiştir (Schneider P.M, 2007).

Adli alanda, biyolojik materyalleri kimliklendirmek için kullanılan genetik belirteç çeşitleri ve bunların analizini sağlayan teknoloji hızlı gelişme göstermiştir. Günümüzde DNA profillemesi yüksek ayırt etme gücü olan STR (kısa tekrar dizileri) analizleri ile yapılmaktadır. Ancak çok az miktarda DNA içeren adli örneklerde rutin olarak kullanılan STR analizi yetersiz kalabilmektedir. STR'ların yetersiz kaldığı durumda SNP (tek nükleotid polimorfizmleri) belirteçlerinin kullanılması, akrabalık ilişkilerinin analizinde ve insana ait kalıntılar gibi zorlu adli örneklerin analizinin yanı sıra evrimsel çalışmalarda genetik

karakterizasyonu belirlemek açısından oldukça önemlidir (Budowle B. ve ark, 2008). Otozomal kromozomlara göre mutasyon ve rekombinasyon oranı düşük olan X'e bağı SNP'ler popülasyonların genetik karakterizasyonunu belirlemede kullanılmaktadır (Tomas C, 2008). Özellikle karmaşık akrabalık ilişkilerinin olduğu davalarda otozomal ve Y kromozomu belirteçlerini tamamlayıcı niteliktedir (Szibor R. ve ark, 2003). Genom haritasında X kromozomu üzerinde toplam 153.146 SNP varlığı gösterilmiştir (Ross M.T. ve ark, 2009). X kromozomu üzerindeki bu lokusların çok az bir kısmının adli bilimler açısından kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.

Bu çalışmada X kromozomu üzerinde bulunan genetik belirteçlere dikkat çekmek ve Tomas C. ve arkadaşlarının çalışmaları referans alınarak seçilen 5 adet X-SNP (X018, X036, X047, X131, X142) lokusunun SNaPshot minisekanslama tekniği kullanılarak optimizasyon, validasyon ve analizinin yapılması, ayrıca bu lokusların adli bilimlerde olgu aydınlatmadaki faydası ve ülkemizdeki alel sıklıklarının araştırılması amaçlanmıştır.



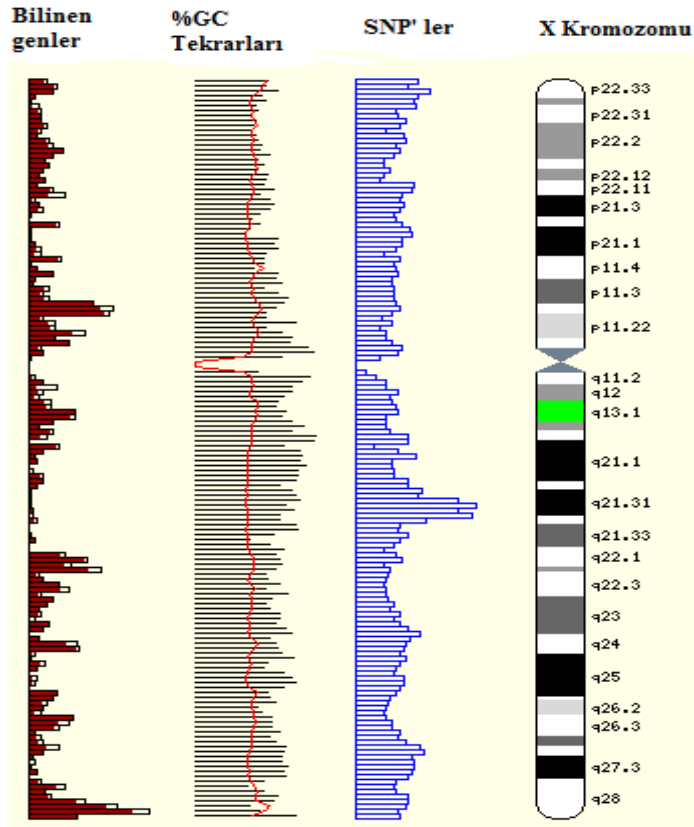
## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1 X KROMOZOMUNUN ÖZELLİKLERİ

Normal 23 çift insan kromozomu içinde yalnız bir çifti, erkek ve dişilerde farklı konfigürasyon göstermektedir (Klug W.S, 2003). Bu iki kromozom X ve Y eşey kromozomu olarak tanımlanmaktadır ve bu iki cinsiyet kromozomu olan X ve Y'nin, 300 yıl önce bir otozomal kromozomdan köken aldığı düşünülmektedir (Zarrabeitia M.T. ve ark, 2007).

Dişi birey iki X kromozomu, erkek birey ise bir X ve bir Y kromozomu taşımaktadır. Bu eşey kromozomlarının yapıları incelendiğinde X kromozomunun ökromatin bölgesi, Y kromozomunda bu bölgeye karşılık gelen kısma göre daha aktif ve daha büyüktür. Ayrıca X ve Y kromozomlarının uzun ve kısa kollarının uç kısımlarında birbirleriyle homoloji gösteren iki bölge bulunmaktadır. Bu bölgeler **yalancı otozomal bölgeler (pseudoautosomal regions, PARS)** olarak adlandırılır (Klug W.S, 2003).

Y kromozomunda 78 gen varken X kromozomunda 1098 gen bulunmaktadır ve X kromozomunda yaklaşık 153 milyondan fazla baz çifti bulunmaktadır (Klug WS, 2003) (Şekil 2.1). X kromozomu üzerinde toplamda 153,146 SNP genom haritasında eşleştirilmiş ve VEGA veri tabanında gösterilmiştir (Ross M.T. ve ark, 2009).



**Şekil 2.1** X kromozomuyla ilgili genel bilgi içeren şematik görünüm (<http://www.ensembl.org/> Ensembl Genome Browser)

X kromozomu üzerinde bulunan birçok genin Y kromozomunda homolojisi olmadığı için, erkeklerde X kromozomundaki her allel doğrudan fenotipte ifade edilmektedir. Erkekler X-bağlantılı genler için ne homozigot ne de heterozigottur. Bu durum **hemizigot** olarak tanımlanmaktadır. X kromozomu üzerinde yer alan genler otozomal genlerle karşılaştırıldığında, özgün bir kalıtım örneği sergilemektedir. **X-bağlantılı** terimi bu tip durumları tanımlamak için kullanılmaktadır. İnsanlarda çeşitli hastalıklardan sorumlu X-bağlantılı genler tanımlanmıştır (Renk körlüğü, hemofili A ve B, kasüler distrofi, hunter sendromu ve fabry's hastalığı gibi.) (Stern C, 1973).

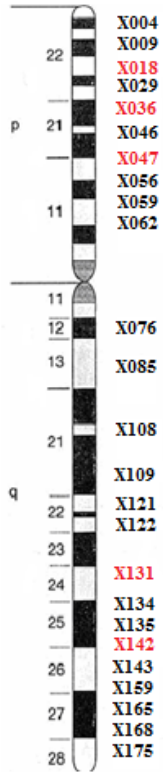
Dişi bireyler, X kromozomundan iki kopyaya sahip olmaları nedeniyle X'e bağlı gen ürünlerini de iki kat fazla üretme potansiyelleri bulunmaktadır. Bu nedenle X

kromozomundan kaynaklanan doz eşitsizliğinin dengelenmesi için memelilerde bir genetik mekanizma oluşmuştur. Günümüzdeki deneysel kanıtlar, bunu **eşey kromatin cismi** ya da basitçe **Barr cisimciği** olarak adlandırmışlar ve bunun inaktive edilmiş (etkisizleştirilmiş) X kromozomu olduğunu bulmuşlardır. **Lyon hipotezine** göre, X kromozomu inaktivasyonu, embriyonik gelişimin erken evrelerindeki somatik hücrelerde rastgele olmakta ve bütün oğul hücrelerde aynı X kromozomu inaktive edilmektedir. Lyon hipotezinin genellikle geçerli olduğu kabul edilmekte ve X kromozomunun Barr cisimciğine inaktivasyonu bazen **İyonizasyon** olarak da ifade edilmektedir (Lyon M.F. ve ark, 1961).

Yeni doğan çocuklarda belirlenemeyen ve beklenmedik anormal karyotipler, X-kromozomu belirteçleri kullanılarak analiz edilen akrabalık testlerinin doğruluğunu etkilemektedir (Szibor R, 2007). Bu nedenle X kromozomu anomalileri adli bilimler açısından oldukça önemlidir. Bilim adamları 1940'larda, X kromozomlarının mayoz sırasında ayrılmamasının sonucu olarak iki kromozom anomalisi tanımlamışlardır. Bunlar Klinefelter sendromu ve Turner sendromudur. Klinefelter sendromu olan bireyler fazladan bir X kromozomuna sahiptirler. Bu karyotipe sahip bireyler 47,XXY olarak gösterilmektedir. Turner sendromu olan bireyler ise çoğunlukla monozomiktir ve bir tanesi X kromozomu olmak üzere sadece 45 kromozoma sahiptirler. Bu kişiler 45,X olarak tanımlanmaktadır. Klinefelter sendromu, her 1000 yeni doğan erkek bireylerden yaklaşık 2'sinde gözlenmektedir. 48,XXXXY, 48,XXYY, 49,XXXXXY ve 49,XXXYY karyotipleri fenotipik olarak 47,XXY'e benzerler, fakat hastalığın belirtileri ve şiddeti X kromozom sayısı fazla olan bireylerde daha şiddetlidir. Turner sendromu ise, yaklaşık olarak 3000 yeni doğan dişi bireyden birinde görülür (Reddy K.S, 1998). Diğer bir anormal oluşum ise 47,XYY sendromudur. Normal erkek karyotipinden farklı olarak ilave bir Y kromozomunun olması ve diploit özellikten sapmanın görüldüğü bu tür çalışmalar ilginç bir tartışmayı da beraberinde getirmiştir. Patricia Jacobs, 1965'te İskoçya' da sıkı güvenliğinin olduğu bir hapisanedeki 315

erkeğin 9'unun 47,XYY karyotipi taşıdığını bulmuştur. Boyları ortalamanın oldukça üstünde ve çoğunun zeka seviyesi normalin altında olan bu erkeklerin, ciddi sosyal sorunlara neden olan suçları bulunmaktadır. Sosyal olmayan ve suç unsuru içeren davranışlarla kromozom bileşimi arasındaki olası bir ilişkinin varlığı ilginç bulunmuş ve bu durum, toplumdaki 47,XYY karyotipinin frekansı ve fenotipik durumu ile ilgili olarak birçok çalışmanın yapılmasına neden olmuştur (Witkin H.A. ve ark, 1976).

X kromozomunun genotiplendirilmesi, özellikle karmaşık akrabalık ilişkilerinin olduğu davalarda önemlidir ayrıca otozomal ve Y kromozomu belirteçlerini tamamlayıcı niteliktedir (Szibor R. ve ark, 2003). X kromozomu üzerinde çeşitli STR ve SNP lokusları bulunmuştur (Genom veritabanı; <http://www.gdb.org>). X kromozomu üzerinde toplamda 26 trinükleotid ve 90 tetranükleotid tekrar polimorfizmi belirlenmiştir, ancak sadece 18 tetranükleotid, 3 trinükleotid ve bunlara ek olarak DXS52 VNTR lokusunun adli uygulamalarda yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir (Szibor R. ve ark, 2003). Ayrıca X kromozomu üzerindeki SNP lokusları üzerine de birçok çalışma yapılmıştır. Tomas C. ve arkadaşları 25 X-SNP lokusu tespit etmişlerdir. Bu SNP'lerin X kromozomu üzerindeki yerleşimleri (Şekil 2.2) ve rs numaraları Tablo 2.1'de belirtilmiştir (Tomas C. ve ark, 2008).



**Şekil 2.2** X kromozomu üzerindeki bazı tek nükleotid polimorfizmlerinin yerleşimi (Bu çalışmada kullanılan SNP lokusları kırmızı ile gösterilmiştir)

**Tablo 2.1** X kromozomu üzerinde yer alan ve bu çalışmada kullanılan SNP'lerin rs numaraları ve bulunduğu bölgeler (Tomas ve ark. 2008)

SNP adı	rs numarası	Bulunduğu bölge
X018	rs1534285	Xp22.3
X036	rs1373592	Xp22.1
X047	rs1557054	Xp21
X131	rs2190288	Xq24
X142	rs149910	Xq25

### 2.1.1.X kromozomu Üzerinde Bulunan Genetik Belirteçlerin Adli Bilimlerdeki Önemi

Otozomal kromozomlar üzerinde bulunan belirteçlere ek olarak,

- Sadece annelik sorulduğunda,
- Baba adayının ölmesi, bulunamaması gibi nedenlerle otozomal DNA profilinin çalışılmadığı durumlarda baba adayının yakınları çalışılarak sonuca gitme imkanı bulunmaktadır. Yalnız bu durum çocuğun kız olması halinde geçerlidir. Çünkü söz konusu çocuğun iki X alelinden birisi annesinden gelirken diğeri babasından gelmektedir. Bu durumda çocuğun biyolojik annesinde bulunmayan alellerin babadan geçmiş olduğu varsayılır ve baba adayının taşıyacağı X alellerinin kaynağı ise onun annesi olduğundan bu amaçla baba adayının annesi veya babaannenin X aktardığı her iki cinsten kardeşleri bu amaçla çalışılabilmektedir.
- Biyolojik babaları aynı olan iki kız kardeşin aynı paternal X kromozoma sahip olmaları gerekmektedir. Dolayısıyla iki kız kardeşin aynı babadan olup olmadıklarının incelenmesi gerektiğinde X kromozomal belirteçlerin çalışılması çözüm sunabilir.
- Yakın akraba iki erkeğin baba adayı olduğu durumlarda çocuğun kız olması koşulu ile X-kromozomal belirteç analizi otozomal belirteçlere göre daha yararlı olmaktadır. Özellikle bu iki baba adayı erkeğin, baba oğul olmaları halinde X-kromozomal belirteçler son derece bilgi verici olurlar. Çünkü bu durumda her iki baba adayının taşıdığı X kromozomu farklı biyolojik kaynaktan gelmektedir. Aynı durum kuzenler için de geçerlidir.
- X kromozomal belirteç analizi babaanne-kız torun arasındaki ilişkiyi ortaya koymada son derece yararlı olmaktadır. Çünkü kız torunların taşıdığı baba kaynaklı X kromozomu mutlaka babaannenin iki X kromozomundan birisidir.

- Abortus materyalinden babalık tayini gerektiğinde eğer fetus dişi ise X-kromozomal belirteç analizi büyük kolaylık sağlamaktadır. Çünkü kürtaj materyalinden fetal dokunun gözle ayırt edilmesi gebeliğin yaşı ile ters orantılı olarak hemen hemen imkansızdır. Bu nedenle rastgele yapılan örnekleme sonucunda yapılan DNA analizi sıklıkla sadece anneye ait allelleri içerirken şanslı olunan bazı vakalarda anne ile fetusun allellerinin karışım olarak yer aldığı bir sonuçla karşılaşılabilir. Böyle bir karışık örneğinin otozomal belirteçlerde çalışılmış olması halinde değerlendirme güçlüğü yaratacağı ve bu durumun yarattığı şüpheli durumdan sanığın yararlanacağı bu konuda çalışanların malumudur. Oysa dişi bir fetusun X-kromozomal belirteç analiz sonucunda her lokustaki annede bulunmayan allel babadan kalıtılmıştır.
- Babalık davalarında X-kromozomal belirteçlerin otozomal belirteçlere nazaran üstünlüğü baba adayının daha kolaylıkla dışlanabilmesidir. Çünkü X-kromozomal belirteçlerin dışlama olasılığı benzer PIC (Polymorphism information contents) değerine sahip otozomal belirteçlere göre daha yüksektir. Bunun nedeni baba adayının X kromozomu açısından hemizigot olmasıdır.
- Erkekler X-kromozomu açısından hemizigot olduğundan MEC (Mean Exclusion chance) değerleri otozomal belirteçlerden daha yüksek olmaya eğilimlidir. Bu nedenle X-kromozomal belirteçler kullanılarak arzu edilen istatistiksel değerleri elde etmek mümkündür (Aşçıoğlu F, 2006).
- X kromozomu, otozomal kromozomlarla karşılaştırıldığında heterozigotluk seviyesinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Ross M.T. ve ark, 2009).

## **2.2 Adli Bilimlerde Kimliklendirmede Kullanılan Sistemlerin Tarihsel Gelişimi**

Yaklaşık 25 yıl önce bireylerin ayırt edilmesinde çeşitli polimorfik belirteçler kullanılmaktaydı. Bu belirteçlerden ilki kan gruplarıdır. Landsteiner, 1900 yılında meslektaşlarının kanlarını alarak serum ve eritrositlerini ayırmış ve bunları karşılıklı olarak

birbiri ile karıştırdığında kırmızı hücrelerin diğerlerinin serumlarında aglütine olup olmadığına bakmıştır. Bunun üzerine insanlarda A, B ve O olmak üzere 3 tip kan grubu olduğunu bulmuştur. Bir yıl sonra da Landsteiner'in öğrencileri AB kan grubunu bulmuşlardır. 1910 yılında kan gruplarının mendel kalıtım gösterdiği ortaya konmuştur. 1927 yılında MN ve P kan grup sistemleri, 1940 yılında da Rh kan grubu sistemleri bulunmuştur (Daniels G, 1996). İnsan alyuvarlarının yüzeyinde, genetik olarak denetlenen, genellikle glikolipid ve glikoprotein yapısında olan, antijen-antikor reaksiyonlarına neden olabilen yüksek derecede antijenik yapıda en az 30 antijen bulunur. Kan grubu sistemlerini oluşturan bu antijenler, kromozomların belirli lokuslarındaki genler tarafından kodlanmaktadır. ABO kan grubu sistemi 9., MNS kan grubu sistemi 4., Rh kan grubu sistemi ise 1. kromozomda yer alan genler tarafından kodlanmaktadır (Boorman K.E, 1988).

1955 yılında Smithies ve Waller tarafından serum proteinlerinin kalıtsal özellikleri keşfedilmiştir. Serum proteinlerine örnek olarak, immünoglobülin sistemleri, haptoglobülin ve Gc (Group specific component) sayılabilir. Haptoglobülinler, alfa-2-globülin yapısındadır ve hemoglobin bağlama özellikleri vardır. Haptoglobülin genlerinin sıklığı, toplumdan topluma değişmektedir. Haptoglobülin geni Afrika'daki sıklığı %80'den fazla iken Avustralya yerlilerinde %20 kadardır. Türkiye' de Hp<sub>1</sub> geni %27, Hp<sub>2</sub> geni ise %73 civarında bulunmuştur. Serum proteinleri, nişasta jel, poliakrilamid jel, selüloz asetat gibi birçok elektroforez yöntemi kullanılarak bantlar halinde ayrılabilir (Hancı H, 2002).

Genetik olarak kontrol edilen protein ve enzim sistemlerindeki polimorfizmden yararlanarak, biyolojik materyalden yapılan kimlik tespitinin önem kazanmasıyla birlikte keşfedilen diğer bir sistem ise lökosit membranına yerleşen İnsan Lökosit antijeni (HLA) dir. İmmün cevabın düzenlenmesinden sorumlu çok sayıda gen lokusu 6 numaralı kromozomun kısa kolunda yer almaktadır. HLA sistemleri organ ve doku nakli konusu ile adli bilimlerde



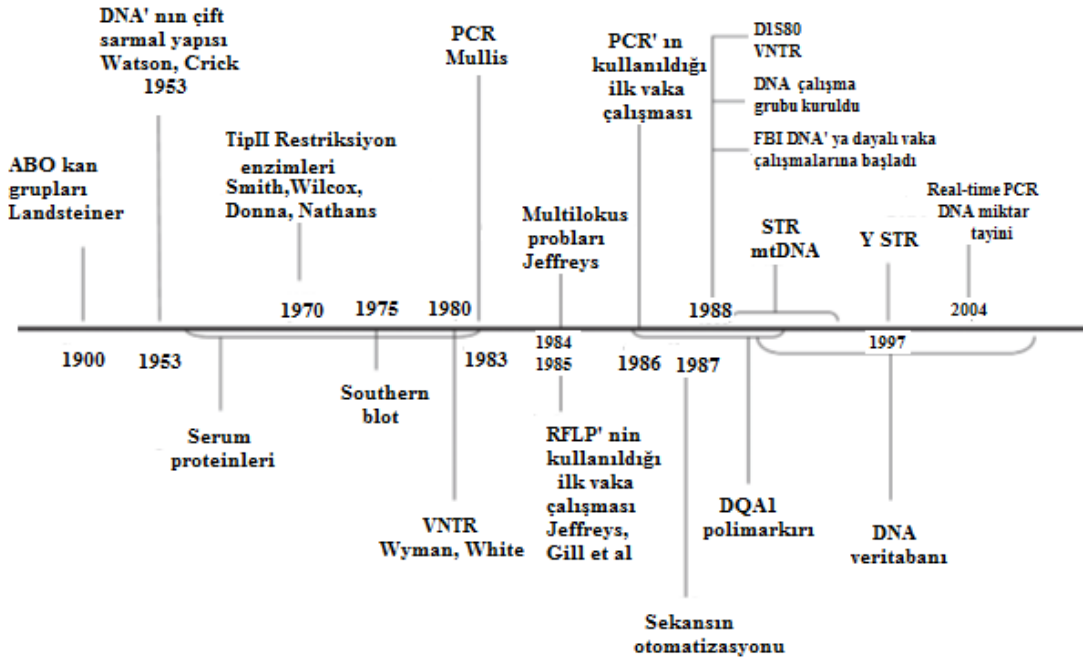
kimliklendirme çalışmalarında büyük öneme sahiptir. Sistemin, kan gruplarına göre daha geniş polimorfizm göstermesi önemini daha da arttırmıştır (Hancı H, 2002).

Babalık testleri açısından bakıldığında ise sadece kan grupları ile şüpheli babayı bulmak kesin değildir, fakat kesin red durumu vardır. ABO, MN grupları ile babayı bulma olasılığı %33' dür. Rhesus sistemi bu olasılığı %84 oranına yükseltebilir. Diğer faktörler de hesap edildiğinde oran %95 üzerine çıkar. Bu faktörler; Kell (K), P, Lutheran (Lu), Dufy (Fy), Kidd (JK) ve Lewis (Le)'dir. Bu oran 100 baba adayından 95'inin babalığının reddini sağlar. Babalığın tespitinde kan grubu, kan alt grupları ve faktörleri ile HLA sistemi birlikte kullanıldığında ise olguların çoğunda %99,8 gibi bir oranla doğru sonuca varmak mümkündür (Hancı H., 2002). Ancak, çeşitli faktörler protein-temelli genetik sistemlerin adli kullanımını kısıtlamaktadır. Bu sistemlerin ayırım gücü düşüktür, bu nedenle kimliklendirme mümkün değildir. Ayrıca proteinler birçok dokuda tiplendirme için yeterli miktarda bulunmamaktadır. Genetik polimorfizmlerin DNA seviyesinde tiplendirmesi bu kısıtlamaların üstesinden gelmeye yardımcı olmaktadır. Öncelikle, kimliklendirme testleri için yararlanılacak DNA bölgelerinde büyük oranda değişkenlik vardır. İkincisi, çekirdekli hücre içeren herhangi bir biyolojik materyal tiplendirilebilir. Üçüncüsü, DNA proteinlere nazaran daha stabil olma eğilimindedir. Tüm bu nedenlerden dolayı DNA tiplendirme teknikleri ile analiz edilen polimorfizmler, klasik protein-temelli genetik belirteçlere nazaran daha hassas, daha spesifik ve daha bilgi vericidir. Bunun da ötesinde, DNA teknolojisi adli bilimcilere biyolojik örneklerle yanlışlıkla ilişkilendirilmiş bireylerin dışlanması ve dahil edilen olası bireylerin sayısını azaltmak açısından (eğer şüpheli birey sayısı birden fazla ise) büyük bir avantaj sağlamaktadır (Budowle B, 2008).

DNA bulguları ilk olarak 1986'da İngiltere'deki bir davada kullanılmıştır. Amerika da ise 1987 yılında Florida'daki bir tecavüz davasında kullanılmıştır. 1997'de FBI, yargılanmış mahkumların ve olay yerinden elde edilen örneklerin DNA profillerini toplayarak

bir veri tabanı oluşturmuştur. Veri tabanı büyümesi suç dosyalarının çözülmesinde önemli bir araç haline gelmiştir. Olay yerinden elde edilen DNA' nın, veri tabanındaki DNA profilleriyle karşılaştırılmasıyla Amerika'da 2000-2003 yılları arasında sadece DNA bulguları kullanılarak 1600'den fazla vaka çözülmüştür (Klug W.S, 2011).

Amerikada ve diğer birçok ülkedeki kimliklendirme testleri için rutinde kullanılan ilk yöntem (1980'lerin ortalarında) restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP)'dir. RFLP ile değişken sayıda bitişik tekrar dizileri (VNTR) analiz edilmektedir. RFLP analizi ile VNTR tiplendirme çok büyük bir ayırım gücü sağlamaktadır (Budowle B. ve ark 2008). Bu teknik 1980'lerde Alec Jeffreys tarafından geliştirilmiştir ve ilk olarak İngilterede öldürülen iki kız öğrencinin cinayetini çözmek için kullanılmıştır (Klug W.S, 2011).



Şekil 2.3. Adli genetik analizlerini etkileyen önemli gelişmelerin zaman çizelgesi (Budowle B ve ark, 2008).

RFLP analizi on yıldan daha uzun bir süredir yerini PCR ile amplifikasyona bırakmıştır. PCR pikogram seviyesinde DNA içeren örneklerin analizine imkan vermekte ve analiz hassaslığını iki katına çıkarmaktadır (Budowle B. ve ark, 2008).

STR lokusları ise son derece polimorfik olan VNTR lokusları ile yer değiştirmiştir. Şu anda dünya çapındaki adli laboratuvarlarda rutin araştırmalarda kullanılan STR analizleri ile çok sayıda lokus birarada amplifiye edilebilmektedir (Budowle B. ve ark, 2008). STR'ların birçok avantaj ve dezavantajlarına rağmen diğer hiçbir belirteç STR analizlerinin yerini alamamıştır.

### 2.3 POLİMORFİZM

Polimorfizm, bir populasyonda iki ya da daha fazla sayıda birbirinden ayrılmış ya da farklı fenotiplerin varlığı olarak tanımlanmaktadır. DNA molekülündeki polimorfizmler, kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan bölgelerdeki polimorfizmler olmak üzere iki ana sınıfta toplanmaktadır. Özellikle kodlayıcı olmayan bölgelerdeki polimorfizmler adli araştırmalarda önem taşımaktadır. Bunlar:

- 1- Minisatellitler (VNTR) ve mikrosatellitleri (STR) kapsayan değişken sayıda ardışık tekrar polimorfizmleri,
- 2- Tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) dir.

Minisatellitler, VNTR (variable number of tandem repeats=değişken sayıda ardışık tekrarlar) DNA bölgeleri olarak da bilinirler. 10 ila 100 nükleotid uzunluğundaki DNA tekrar bölgelerinden oluşmaktadırlar (Karakuş O, 2009). Bu tip dizi tekrarları insan genomunda dağınık şekilde yayılmıştır. Her bölgedeki tekrar sayısı 2 ila 100 arasında olabilmektedir. Tekrar eden dizilerin sayısı kişiler arasında büyük değişkenlik gösterir ve her farklı tekrar sayısı bir VNTR allelini oluşturmaktadır. Her bir bölge için düzinelerce farklı allelin varlığına bağlı olarak, heterozigotluk oranı da çok yüksek olmaktadır. Standart adli testlerde detaylı bir

DNA parmakizi profili elde etmek için, dört ile on arasında VNTR probu kullanılmaktadır (Klug W.S, 2011).

VNTR dizileri RFLP yöntemi ile analiz edilir. RFLP yönteminde VNTR dizileri restriksiyon enzimleri ile kesilip, Southern blot ile görüntülediği zaman, ortaya bir bant profili çıkar. Bu profile DNA parmakizi adı verilir. Bu profiller gerçek bir parmakizidir, çünkü, DNA kaynağı olarak hangi doku kullanılırsa kullanılsın, bant profili belirli bir birey için her zaman aynıdır, fakat bu profil tıpkı parmakizinde olduğu gibi bireyden bireye farklılık göstermektedir. VNTR'lerle yapılan analizin hibridizasyon temelli bir metod olması analiz için fazla miktarda DNA gerekmesi ve optimizasyonundaki zorluklar nedeniyle VNTR'lerin populasyon genetiği, gen haritalama ve birey tanımlamada kullanımı sınırlıdır. Sonuç olarak, DNA parmakizi suç vakalarından çok babalık testlerinde daha kullanışlıdır. Çünkü çocuk, anne ve olası babadan alınan kanda, DNA izolasyonu ve analizi için taze ve bozulmamış sınırsız hücre kaynağı bulunmaktadır. Buna karşılık STR tiplendirmesi daha ucuzdur, daha az emek gerektirir ve RFLP analizinden daha hızlı olduğundan VNTR'lerin yerini almıştır (Klug W.S, 2011).

Mikrosatelitler, kısa ardışık tekrarlar (short tandem repeats) olarak bilinmektedir. STR'lar 2-7 uzunluğundaki (TT, TTA, GTCA gibi) dizilerin ardışık sıralı tekrarlarından oluşurlar. İnsan genomunda yaklaşık 500.000 STR vardır ve her 15 kb'da bir trimerik (üç baz çifti tekrarı) ve tetramerik (dört baz çifti tekrarı) tekrarlara rastlamak mümkündür (Lee HY. ve ark, 2005). Çoğu mikrosatelit lokusunun tekrar bölgeleri standart PCR yöntemi ile verimli bir şekilde çoğaltılabilmektedir. STR lokuslarının allel sayısı genellikle 5-20 allel aralığında değişmektedir. Adli alanda mikrosatelitler ilk olarak cinayet kurbanı bir kişinin iskelet kalıntılarını kimliklendirmede kullanılmıştır (Tamaki K. ve ark, 2005). Günümüzde farklı sayıda tekrar dizilerine sahip STR (CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D21S11, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D18S51, Vwa, TPOX, FGA, Amelo,

D5S818) lokusları ülkemizde ve dünya çapında tüm adli bilimler laboratuvarında çalışılmaktadır. Bu dizilerin nispeten küçük boyutlarda olması çoklu (multipleks) PCR yöntemiyle de hızlı ve etkin bir şekilde amplifikasyonuna olanak sağlamaktadır (Lee H.Y. ve ark, 2005). Kullanılan multipleks otozomal STR lokusları, tüm yarı-otomatize sistemlerde, yüksek hassasiyet, yüksek spesifite, yüksek ayırım gücü ve kısıtlı miktarda ya da degrade örneklerde tiplendirme imkanı sağlamaktadır (Budowle B. ve ark, 2008). STR analizlerinin sonuçları istatistik, olasılık ve populasyon genetiği kullanılarak hesaplanmakta ve analiz edilmektedir.

## 2.4 TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİ

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP, single nucleotide polymorphism) genom dizisi içerisinde A,T,C ya da G bazlarından birisinin değişmesiyle meydana gelen DNA dizi farklılıklarıdır. Örneğin, GGCTAC dizisinin GGGTAC dizisi şekline dönüşmesi ile bir SNP oluşur. Belirli bir SNP'den söz etmek için, o SNP'nin populasyonda en az %1 oranında görülmesi gerekmektedir (Sherry S.T. ve ark, 2001). İnsanlar arasında genetik farklılıkların %90'nını oluşturan SNP'ler, genomda yaklaşık her bin bazda bir meydana gelmektedir. Genomda SNP yoğunluğu on kattan fazladır. Bu SNP'lerin yaklaşık yarısının, protein kodlama bölgesinde olduğu ve insanlar arası tüm kalıtsal varyasyonların sebebini oluşturduğu bilinmektedir. Fonksiyonel bir SNP, bir proteinin aminoasit dizisini veya ekspresyonunu değiştirerek, kişinin davranış özelliklerini, hastalıklara yatkınlığını ve tedaviye verdiği yanıtı değiştirebilmektedir.

DNA dizisindeki farklılıkların bakteri, virüs, toksinler, kimyasallar ve ilaçlar gibi çevresel etkenlere ve hastalıklara verilen yanıt üzerinde büyük etkisi olduğu belirtilmektedir. Bu yüzden SNP'lerin belirlenmesi, biyomedikal çalışmalarda ve farmakolojik ürünlerin geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır. Ayrıca SNP'lerin kuşaklar arası geçişte fazla değişmemeleri, populasyon çalışmalarının kolay izlenmesini sağlamaktadır.

İnsan genomunun SNP haritasının çıkarılması konusunda dünyada çok sayıda grup çalışmaktadır. Bu gruplar içerisinde en önemli olanlar, SNP Konsorsiyumu (TSC Project) ve International HapMap Project ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org))'tir. SNP konsorsiyumu, Şubat 1999'da insan genomunda eşit dağılım gösteren ~300.000 SNP'nin tanımlanması ve bu SNP'lerle ilgili bilginin halka aktarımını sağlamak amacı ile kurulmuş bir organizasyondur. Hedefi iki yıl içerisinde 300.000 SNP'nin tanımlanması olan SNP Konsorsiyumu'nun 2001 yılı sonunda yayımlanan raporunda, 1.4 milyon SNP açıklanmıştır. 2003 yılında HapMap projesi ile 2.8 milyon SNP keşfedilmiş ve 2006 yılında da veritabanında 10 milyonda fazla SNP bulunduğu açıklanmıştır (Weissman D. ve ark, 2001). İnsan genomunun SNP haritasının çıkarılması konusunda çalışan diğer gruplar aşağıda verilmiştir:

ALFRED: <http://alfred.med.yale.edu>.

dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.

HGDP-CEPH: <http://www.cephb.fr/en/hgdp/>.

HapMap: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>.(Kidd K.K, 2012).

## **2.5 SNP'lerin Adli Bilimlerde Kullanımı**

SNP'lerin büyük çoğunluğu bi-aleliktir, bu nedenle kimliklendirme testlerinde kısa tekrar dizileri (STR'lar) kadar bilgi verici değildirler. Ancak, PCR ampikon boyutu 60-80 baz çifti uzunluğuna indirgenebildiğinden dolayı, DNA degrade olduğunda ve STR analizi için gereken miktarın altında olduğunda bu yöntemle tiplendirme yapmak mümkün olmaktadır. Ayırım gücü açısından STR ile benzer seviyeyi elde etmek için 50-100 arasında SNP lokusu gerekmektedir (Budowle B, 2004).

SNP'ler, adli genetik çalışmalar açısından avantaj sağlayan özelliklere sahiptir. İlk olarak insan genomunda sayıları çok fazladır. İkincisi, yüksek verimlikte analiz ve standardizasyona uygun düşük maliyetlerle tiplendirme yapılabilir. Üçüncüsü de

degrade DNA örneği gibi kısa fragmentler PCR ile çoğaltılarak analiz edilebilmektedir (Sanchez J.J. ve ark, 2008).

Adli kimliklendirme testlerinde SNP tiplendirmesinin diğer uygulamaları şunları içermektedir: Soy-temelli çalışmalar için Y-kromozom SNP'leri, biyocoğrafik köken değerlendirilmesi ve muhtemel donörün saç, göz rengi gibi fiziksel özelliklerinin belirlenmesidir (Budowle B, 2004). Y kromozomu babadan sadece erkek çocuklara ve mtDNA da anneden çocuklarına kalıtıldığı için yani tek geçişli kalıtım göstermelerinden ve genelde rekombinasyona uğramamaları nedeniyle mtDNA ve Y kromozomu üzerinde lokalize olan SNP'ler adli bilimler açısından önem taşımaktadır. Bu yapılarda bulunan SNP'ler haplotip blokları halinde kalıtılırlar. Bu sebeple özellikle göç yolları ve bunlar arasındaki bağlantıların belirlenmesinde, insan genetiği çalışmalarında ve antropolojik çalışmalarda kullanılmaktadırlar (Quintans B. ve ark, 2004).

Adli örneklerde insan DNA'sının kalitesi çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Kitlesel felaketlerden elde edilen örneklerin laboratuvara ulaştırılması genellikle zor olduğundan, Dünya Ticaret Merkezi vakasında olduğu gibi, aktarım sürecinin otomasyonu önemlidir (Budowle B, 2004). SNP'ler kitlesel felaketlerde en uygun tiplendirme aracıdır ve STR'lar ile tiplendirmeye nazaran otomasyona daha uygundur (Senge T. ve ark, 2011).

Ayrıca çeşitli populasyon verileriyle oluşturulan çok sayıda veri tabanına erişilebildiğinden SNP'leri değerlendirmekte problem yaşanmamaktadır. Adli uygulamalarda SNP'lerin kullanımının artması için populasyonlarda her bir SNP'nin allel ve genotip frekanslarını hesaplanması gerekmektedir (Li L. ve ark, 2010).

Adli kimliklendirme amacıyla çalışılan SNP'lerin seçiminde bazı kriterler bulunmaktadır. İlk olarak populasyonlar arasındaki SNP frekanslarına dikkat edilmelidir. Hesaplama dahil edilen populasyon frekanslarında rastgele eşleşme olasılığının çok büyük olması nedeniyle SNP'ler farklı populasyonlarda çok farklı frekanslarda bulunmaktadır.

STR'lar ise çoğu populasyonda düşük frekansta çok sayıda allele sahiptirler fakat populasyonlar arasında çok büyük farklar yoktur. İkinci olarak da genomda tek kopya olarak bulunmalı ve sadece insan genomunda lokalize olmalıdırlar (Giardina E. ve ark, 2007).

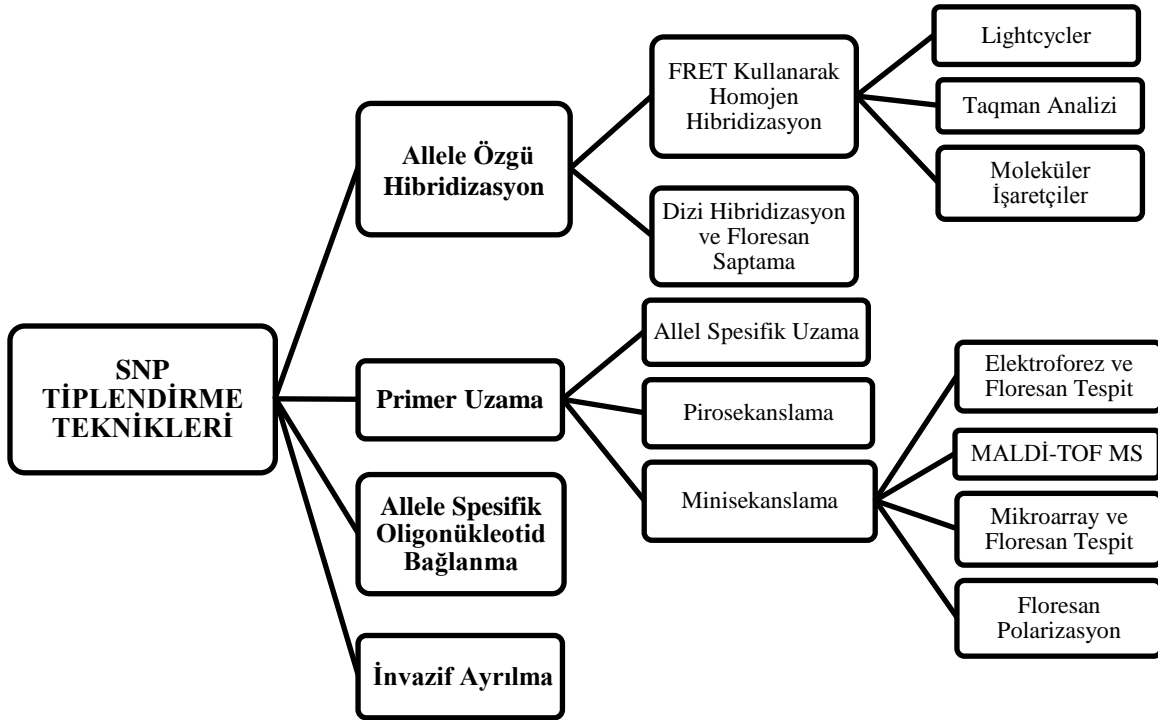
SNP'lerin varlıkları, çok sayıda farklı moleküler yöntem ile ortaya konulabilmektedir.

## **2.6 TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİNİ TİPLENDİRME TEKNİKLERİ**

Geçtiğimiz yıllarda, çeşitli allelik ayırım ve tespit için çok sayıda farklı SNP tiplendirme teknikleri geliştirilmiştir (Şekil 2.4). Bu alanın hızlı ve devamlı evrimi nedeniyle genellikle teknikleri güncel tutmak ve mevcut en iyi seçeneklere karar vermek oldukça zordur. Tekniklerin herbirini anlamak için allelik ayırım reaksiyonları, analiz formatları ve tespit metodları arasındaki ayırım önemlidir. Allelik ayırım reaksiyonlarının ürünleri birden fazla yöntem ile tespit edilebilir ve aynı deteksiyon yöntemi ile farklı reaksiyon ya da analiz formatlarından elde edilen ürünlerin analizi yapılabilir. SNP genotiplendirme testlerinin büyük çoğunluğu moleküler mekanizmaya dayanan 4 gruba ayrılabilir: Allele özgü hibridizasyon, primer uzama, oligonükleotid ligasyonu ve invazif kesilme. Her bir reaksiyonda ürünlerin analizi için tespit metodları (floresans, lüminesans, kütle ölçümü vs...) bulunmaktadır.

Analiz formatları için iki farklı kategori mevcuttur: 1-Solüsyonda meydana gelen homojen reaksiyonlar. 2- Cam slayt, çip, boncuk vs gibi katı destek üzerindeki reaksiyonlar. Genellikle, homojen reaksiyonlar otomasyon için daha uygundur çünkü allelin tespiti sonrası ayırma ve saflaştırma basamağı bulunmamaktadır. Ancak, homojen reaksiyonların en önemli özellikleri multipleks kapasitesine sahip olmalarıdır. Katı destekli reaksiyonlar ise daha fazla sayıda çoklu analiz yapma kapasitesine sahiptir, ancak bu reaksiyonlar için de ileri manipülasyon gerekmektedir (Sobrino B. ve ark, 2005).



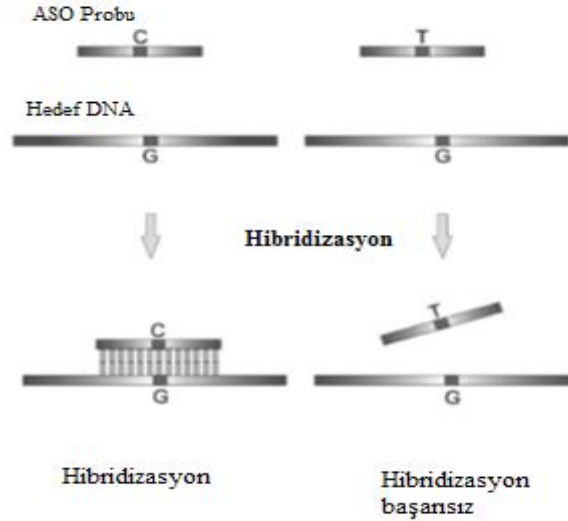


Şekil 2.4 SNP analizinde kullanılan tiplendirme teknikleri

### A. Alele özgü hibridizasyon

Alele özgü hibridizasyon yöntemi, aynı zamanda alele özgü oligonükleotid hibridizasyon (ASO) olarak da bilinmektedir. Bu hibridizasyon yöntemi, tek bir nükleotid konumunda farklılık gösteren iki hedef DNA arasındaki ayrıma dayanmaktadır. Bu yöntem için iki adet alele özgü prob dizayn edilir. Prob dizisindeki (sekansında) merkezi bir pozisyonda bulunan polimorfik baz ile tam eşleşme sağlayan, prob-hedef hibritleri stabil olurken tek baz uyumsuzluğuna sahip hibritler kararsızdır (Şekil 2.5). Adli alanda, PCR ile çoğaltılan polimorfizmleri tespit etmek için ilk olarak ASO problemleri kullanılmıştır ve yerini büyük ölçüde STR analizlerine bırakmış olmasına rağmen bazı laboratuvarlarda kullanımına hala devam edilmektedir. SNP tiplendirmesinde yeni ASO problemlerinden tam olarak

yararlanabilmek için yüksek kesinlik, yüksek hassaslık ve yüksek verimlilik sağlayan tespit metodlarının kullanımı gereklidir ( Sobrino B. ve ark, 2005).



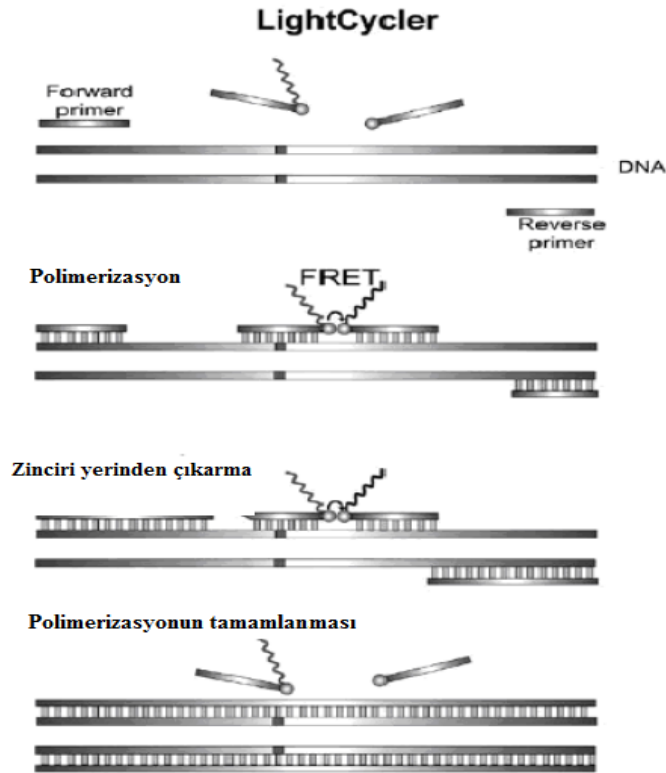
**Şekil 2.5** Alel spesifik hibridizasyon yönteminin genel şematik görünümü (Sobrino B. ve ark, 2005).

### A.1 Fret kullanarak homojen hibridizasyon

Bu yöntemde floresans boyalarla işaretli hibridizasyon probu da denilen iki oligonükleotid prob dizayn edilir. İki floresans boyadan biri diğerine yakın olduğunda ve bir floroforun emisyon spektrumu diğer bir floroforun eksitasyon spektrumu ile çakıştığında, floresans rezonans enerji transferi (FRET) meydana gelir. Bu tespit yöntemiyle analiz yapılan Real-time (gerçek zamanlı) PCR reaksiyonları ve kuantifikasyona (miktar tayini) sahip ASO problemleri gibi genotiplendirme metodları birleştirilerek alel ayrımı yapılabilir. Genotiplendirmede bu problemlere ek olarak iki PCR primeri de gerekmektedir. Floresansdaki artış PCR sırasında ya da PCR tamamlandığında gerçek zamanlı olarak ölçülebilmektedir. Aynı prensibe dayanan çeşitli varyasyonlar da bulunmaktadır. Bu yöntem Light Cycler (Roche), Taqman yöntemi ve Moleküler işaretçiler adı verilen yöntemler için kullanılır (Sobrino B. ve ark, 2005).

## LightCycler

Bu yöntemde, PCR'da kullanılan komponentlerin yanında, iki tane özel dizayn edilmiş, diziye özgün olan ve floresans boyalarla işaretlenmiş oligonükleotidler kullanılmaktadır. Denatürasyon basamağında bu oligonükleotidler (hibridizasyon problemleri) solüsyon içerisinde ayrı ayrı bulunmaktadır. Bir probun 3' ucu floresanla, ikinci probun 5' ucu ise LC Red 640 ile işaretlenmiştir. Birinci proba bağlı boyanın emisyon enerjisi ikinci boyayı uyarır ve uyarılan ikinci boya da emisyon enerjisi yayar. Bu enerji transferi FRET (floresans rezonans enerji transfer) olarak tanımlanmaktadır. Enerji transferinin sağlanmasında iki prob arasındaki uzaklık önemlidir (1-5 baz). Ekstansiyon basamağının sonunda her iki prob tekrar hedef DNA dizisinden ayrılmaya başlar (Şekil 2.6). LC Red boyası tarafından yayılan ışığın yoğunluğu filtrelenir ve LightCycler cihazında bulunan optik okuyucular tarafından ölçülür. Enerji transferi sonucu oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine yani PCR siklus süresince oluşan ampliconların miktarına bağlı olarak artar. LC Red yalnızca her iki nükleotid hibridize olduğunda sinyal yaydığından dolayı, floresans ölçümü annealing (primer bağlanma) adımı sonrasında gerçekleştirilir. Enerji transferinin olması için, problemlerden birinin merkezi pozisyondaki polimorfik baz ile eşleşmesi, diğerinin ise hemen bitişiğinde yer alması gerekmektedir. Bu reaksiyonda tek bir eşleşmeme oligonükleotidlerin erime sıcaklığını indirgeyebilmektedir ve bu indirgeme öncelikli olarak oligonükleotid uzunluğuna ve eşleşmeme pozisyonuna bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu yöntem, mutant ile eşleşen ve yabancıl-tip (doğal suş) ile eşleşmeyen hibridizasyon problemlerinin kullanılmasıyla ve ayrıca birden fazla SNP için farklı erime sıcaklıklarına sahip problemlerin ve farklı floresans işaretlerin kullanılmasıyla genotiplendirmelerin yapılmasına imkan vermektedir.



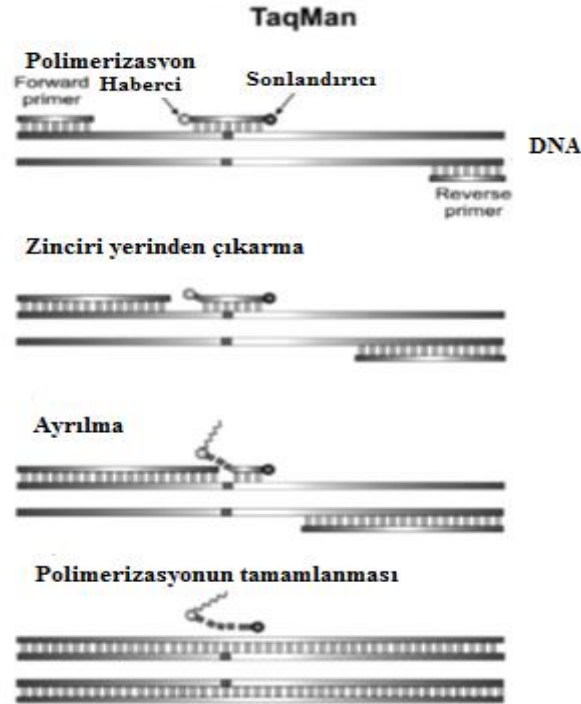
**Şekil 2.6** Lightcycler yönteminin genel şematik görünümü (Sobrin B. ve ark, 2005).

LightCycler'in ilk versiyonunda yalnızca iki adet floresans işareti tespit edebilmekteydi, ancak cihazın yeni sürümü dört farklı işaretin kullanımını mümkün kılmaktadır. Bu sistemin temel avantajı yüksek hassasiyettir.

### ***TaqMan analizi (5' ekzonükleaz aktivitesi)***

TaqMan analizi (Applied Biosystems) hedef DNA'ya hibridize olmuş oligonükleotid problemlerini kırarak ya da yerinden çıkararak floresans sinyal üreten Taq polimerazın 5' nükleaz aktivitesine dayanmaktadır. Bu yöntem için polimorfik yerleşimi farklı iki adet TaqMan probu gerekmektedir; problemlerden biri yabancıl tip (doğal suş) alel, diğeri ise varyant allel ile eşleşmektedir. Probu 3' ucunda Quencher (sonlandırıcı) bağlıken, 5' ucunda farklı bir floresans boya bulunmaktadır. Problemler eşleştiğinde, sonlandırıcı floroforla etkileşime girer ve floresansı sonlandırır. PCR annealing (primer bağlama) aşaması sırasında, TaqMan problemleri

hedef DNA'ya hibridize olur. Ekstansiyon (Zincir uzama) aşamasında 5' uçtaki floresans boya, Taq polimerazın 5' nükleaz aktivitesi ile kırılır ve bu reporter boyanın floresansında artışa neden olur (Şekil 2.7). Bağlanmayan probler fragmentasyona neden olmaksızın uzaklaştırılır. Bir örneğin genotipi, iki farklı boyanın sinyal yoğunluğunun ölçülmesi suretiyle belirlenmektedir (Sobrinio B. ve ark, 2005).



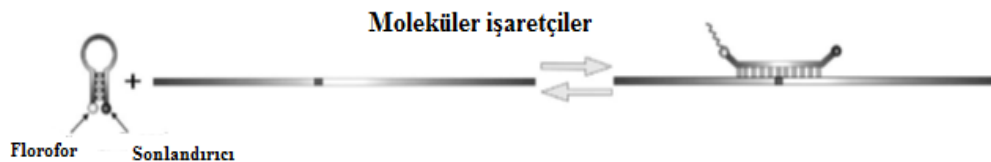
**Şekil 2.7** Taqman yönteminin genel şematik görünümü (Sobrinio B. ve ark, 2005).

5' nükleaz aktivitesinin kullanıldığı başka bir tespit yöntemi ise floresans polarizasyon (FP)'dur. FP yönteminde genotipleme için kullanılan prob bir floresan boya ile işaretlenir. Bu yöntemde polarize ışık ile uyarılan boyalar bağlı oldukları moleküllerin kütleleri sabit olduğu sürece polarize kalmaya devam ederler. Ancak, molekül kütlelerinde oluşacak bir değişiklik sonucu polarize ışık kaynağı ile floresans boyalar arasındaki açılar değiştiğinden boyaaların ışımaya şiddetleri de değişmektedir. Sentezlenen probun, reaksiyon başında çok daha yüksek bir moleküler ağırlığı varken reaksiyon sırasında bazı enzimlerce kesilmesi sonucu probun moleküler ağırlığı azalmakta ve FP'de değişiklikler oluşmaktadır (Sobrinio B. ve ark, 2005).

### Moleküler işaretçiler

Moleküler işaretçiler, 3' ucunda sonlandırıcı (quencher), 5' ucunda ise bir florofor bulunan, hedef DNA'nın tamamlayıcı dizisine komşu 2 tamamlayıcı diziye sahip oligonükleotid problarıdır (Şekil 2.8). Hedefde hibridizasyon olmadığında, prob bir hairpin-loop (saç tokası şeklinde ilmek) formasyonu edinir ve florofor, quencher tarafından sonlandırılır. Böylece herhangi bir floresans yayılımı söz konusu olmaz. Moleküler işaretçi, tamamlayıcı hedefe mükemmel bir şekilde bağlandığında ise florofor ve sonlandırıcı ayrılır ve floresans oluşur.

SNP tiplendirmede, birisi yabancıl tip (doğal suş) allel, diğeri ise mutant allele spesifik iki adet moleküler işaretçi kullanılmaktadır. Bunların her biri bir PCR reaksiyonunda alelik ayrımı mümkün kılacak farklı boylarla işaretlenmişlerdir. Farklı hedefler aynı reaksiyonda tespit edilebilmektedir. Bu her bir hedef için farklı moleküler işaretçilerin kullanılması ve her birine farklı renkte floroforun bağlanması ile başarılmaktadır. Aynı reaksiyonda kullanılabilen farklı floroforların sayısı mevcut cihazların tespit kapasitesi ile sınırlıdır. Floresans gerçek zamanlı olarak görüntülenirken, PCR işlemi yapan cihaz lazer ya da ışık-yayan diyotlar gibi monokromatik bir ışık kaynağı kullanır. Kullanılan proplar, aynı monokromatik ışık kaynağından yayılmasına rağmen, farklı renklere sahip bir dizi floresans ışık yayarlar. Bu yaklaşım SNP tiplendirilmesinde multipleks yeteneğini arttırmaktadır. Bu yöntemin başlıca avantajı herhangi bir post-PCR (PCR-sonrası) sürecinin gerekli olmaması ve PCR ile analizin aynı reaksiyonda gerçekleştirilebilmesidir (Sobrinho B. ve ark, 2005).



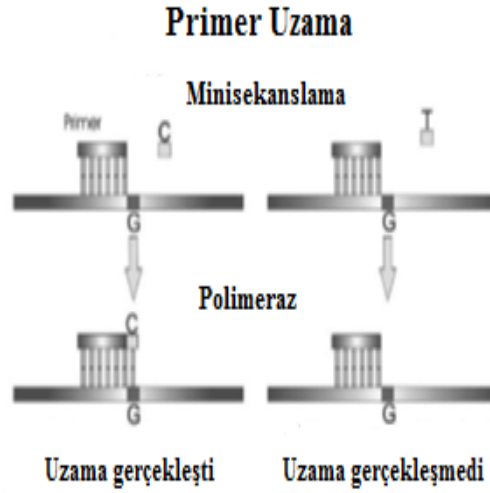
Şekil 2. 8 Moleküler işaretçi yönteminin genel şematik gösterimi (Sobrinho B. ve ark. 2005).

## **A.2 Array (Dizi) hibridizasyonu ve floresans saptama**

Bu yaklaşımda kısa oligonükleotidler bir mikroarray (mikrodizi) yaratmak üzere katı bir desteğe bağlanır ve SNP dizisini içeren işaretli PCR ürünleri ile hibridize olur. Bu paralel olarak birçok SNP'nin analizi için uygundur. Ancak, hibridizasyon verimliliği ve hibritlerin stabilitesi yalnızca polimorfik alana değil aynı zamanda komşu diziye de bağlıdır. Bu nedenle, çok sayıda SNP'nin aynı anda analizinin yapılabilmesi için uygun şartların sağlanması çok zordur. Bu güçlük, GeneChip sistemde (Affymetrix) her bir SNP için onlarca ASO probu kullanılmasıyla çözülür. Problar, polimorfik alandaki olası tüm dizileri ve SNP'ye komşu bazı nükleotidler içerir. Bu metotta, özel ekipmanlara ihtiyaç duyulduğundan mevcut adli vakalarda yaygın olarak kullanılmamaktadır (Sobrin B. ve ark, 2005).

## **B.Primer uzama**

Primer uzama, DNA polimerazın, kalıp DNA dizisine tamamlayıcı spesifik deoksiribonükleotidlerin (dNTP) birleşme yeteneğine bağlıdır. Primer uzama reaksiyonunun çeşitli varyasyonları bulunmaktadır; ancak iki ana reaksiyon tipine ayrılabilir. Birincisi, DNA zincirine spesifik olan primere bir ddNTP eklenmesiyle (DNA polimeraz enzimi yardımıyla), minisekanslama reaksiyonu (tek baz uzaması) gerçekleşmektedir. İkinci reaksiyon da ise, yalnızca primerlerin kalıba hibridize olmasıyla (bağlanması) DNA polimerazın çoğalttığı allele özgü uzama yöntemidir (Şekil 2.9). DNA dizileme için diğer bir alternatif yaklaşım ise DNA polimeraz reaksiyonuna dayanan pirodizilemedir ( Sobrin B. ve ark, 2005).



**Şekil 2.9** Primer uzama yönteminin genel şematik görünümü (Sobrinio B. ve ark, 2005).

### **B.1 Minisekanslama (Minidizileme)**

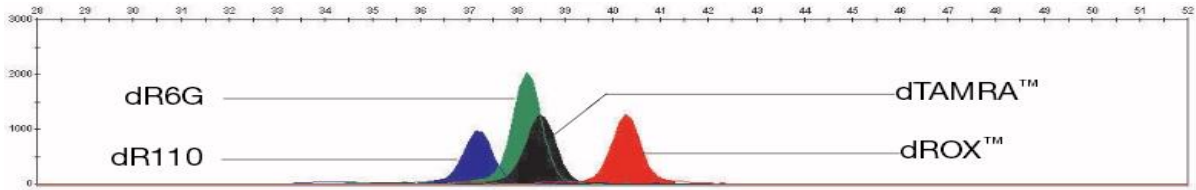
Minidizileme reaksiyonunda, SNP'ye komşu olan bölgeden DNA'ya bağlanan bir primer, polimorfik alanın tamamlayıcısı olan bölgeye tek nükleotidin eklenmesiyle (DNA polimeraz enziminin aktivitesiyle) sonucu uzama gerçekleşir. Bu yöntem, DNA polimeraz tarafından eklenen nükleotidin bağlanma başarısına bağlıdır. İnsan genomu ve diğer büyük genomlardaki SNP'lerin tespiti, değişken alana komşu olan bölgenin bir önceki PCR amplifikasyonunu gerektirir ve amplifikasyon sonrası bağlanmayan PCR primerleri ve dNTP'leri uzaklaştırmak amacıyla saflaştırma işlemi yapılır. Primer uzama ürünlerinin analizi için farklı teknolojiler söz konusudur. Minisekanslama reaksiyonunda, işaretli ve işaretli olmayan nükleotidlerin kullanımı, dNTP ile birleşen ddNTP ya da yalnızca ddNTP'nin kullanımı ürünlerin tespiti için seçilecek yöntemle bağlıdır. Çoklu analiz yeteneği de kullanılan teknolojiye bağlıdır.

Minisekanslama ürünlerinin analizi için kullanılan en yaygın teknolojiler; elektroforez ve floresans tespit, matriks desteklenmiş lazer desorpsiyon/time-of-flight iyonizasyonu (MALDI-TOF) kütle spektrometrisi (MS) ve mikroarraylerdir (Sobrinio B. ve ark, 2005).



### Elektroforez ve floresans tespit ( SNaPshot yöntemi )

Elektroforez ve floresans ile tespit edilen, minisekanslama reaksiyonuna dayanan en yaygın ticari teknolojilerden biri Applied Biosystem tarafından sağlanan SNaPshot reaksiyon kitidir. Bu yöntemde hedef DNA'ya komplementer ve SNP'ye komşu diziyeye bağlanan bir primer, DNA polimeraz ve floresans işaretli ddNTP'ler kullanılır (Şekil 2.10). İşaretlenmemiş primer, 3' ucu ile SNP bölgesinin upstream bölgesine bağlanır. Primerin floresans işaretli her biri farklı renkte bulunan dört adet ddNTP'den (ddGTP, ddTTP, ddATP, ddCTP) biri ile etkileşime girmesiyle zincir uzar (Şekil 2.11). Fakat ddNTP'ler 3'OH taşımamaları nedeniyle kendisinden sonra nükleotid ilave edemezler.

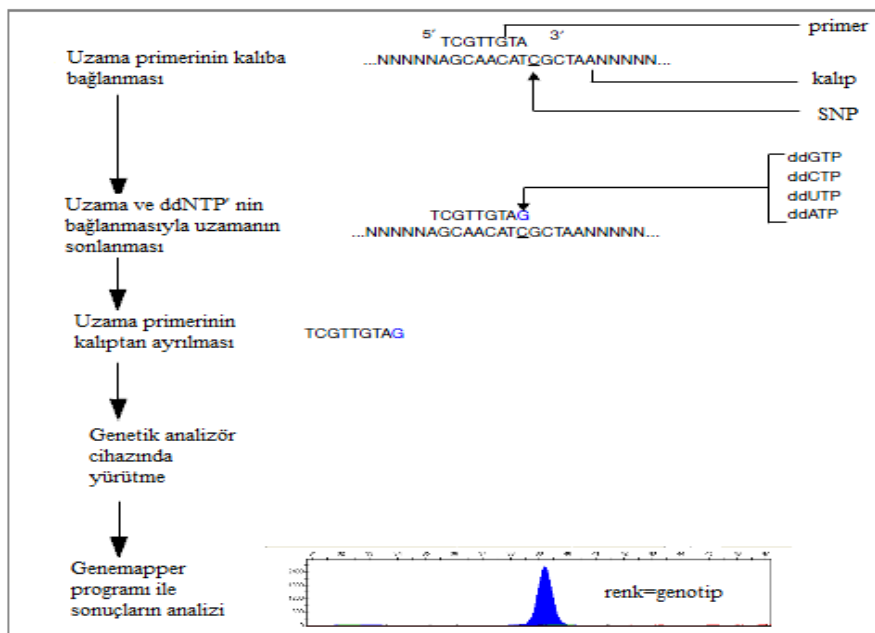


**Şekil 2. 10** Farklı floresan işaretli ddNTP'lerin analizi (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzers,2005)

Daha iyi bir ayırım sağlanması için farklı uzunlukta bulunan uzama primerlerinin 5' ucuna kuyruk eklenir (poli T, poli C gibi veya agtctgacaa gibi dizi tekrarları) ve ürünler elektroforezde boyutlarına göre ayrılır. Uzama primerinin kuyruk eklenmesiyle birlikte toplam uzunluğu elektroforezde hedef SNP'nin son ürün uzunluğunu verir.

Yöntem multipleks çalışmaya oldukça elverişlidir. Üretici protokolüne göre tek bir reaksiyonda 10 bölge çalışılabilmektedir. Bunun yanı sıra daha çok bölgenin çalışıldığı reaksiyonlar da mevcuttur (Sobrinho B. ve ark, 2005).

SNaPshot yöntemi basit ve güvenilir bir yöntemdir. Bunun da ötesinde, adli laboratuvarlarda zaten var olan cihazlar kullanılarak PCR, elektroforez ve floresans deteksiyonu başarılabileceğinden uygulama için yeni bir ekipmana ya da uzmana ihtiyaç yoktur (Budowle B, 2004).



Şekil 2.11 SNaPshot yöntemi (SNaPshot® Kit Analysis Getting Started Guide, 2009 )

## MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS yöntemi ile minisekanslama reaksiyonunda üretilen ürünlerin moleküler ağırlıkları ölçülmektedir. Bu nedenle, işaretli moleküller tarafından yayılan floresansın görüntülenmesiyle ürünün analizinin yapıldığı diğer yöntemler ile kıyaslandığında en doğrudan yöntemdir. Primer uzamasıyla eklenen bazın kütlesi, eklenen ddNMP rezidülerinin artan kütlesi ile saptanır. En küçük kütle farkına sahip ddA ve ddT arasındaki 9

Da' luk fark dahi belirlenebilir. MALDI-TOF MS'nin kararlılığı çok yüksektir; böylece hangi ddNTP'in primer uzamaya ekleneceğini ayırt etmek mümkündür.

Minisekanslama ürünleri bir plakanın üzerine ya da çip yüzeyindeki matriks üzerine yerleştirilmiştir. Matriks ve DNA ürünü, desorpsiyon olarak adlandırılan bir işlem sayesinde, lazer ışını ile vurulur. Lazer ışınının enerjisi matrikse transfer edilir ve örnek buharlaştırılır. Bunun sonucunda bir flight tüpü içinde tutulmakta olan az miktardaki DNA ürününe elektriksek akım uygulandığında ürün dedektöre doğru ivme kazanır. Elektriksek akım uygulanması ile DNA ürününün detektöre çarpışması arasındaki süre flight time (uçuş süresi) olarak adlandırılmaktadır. Moleküllerin ağırlığı ile kütle uçuş süresi direkt bağlantılı olduğundan, bu işlem DNA ürünlerinin moleküler ağırlığının tam ölçümünü sağlar. Hafif moleküller daha hızlı uçar ve daha ağır moleküllere göre dedektöre daha hızlı çarpar. Özel programlar kullanılarak uçuş süreleri kesin moleküler ağırlığa dönüştürülür. MALDI-TOF ile SNPLerin tiplendirilmesi ile ilgili farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. Bunlardan prob yönteminde (MassEXTEND, Sequenom), bir SNP'nin alelleri arasındaki kütle farklılığını arttırmak için, ddNTP ile dNTPler ile birleştirilir. PinPoint analizinde (Applied Biosystems) ise yalnızca ddNTPler kullanılmaktadır (Sobrin0 B ve ark. 2005).

MALDI-TOF MS ile 9 Da'luk en küçük kütle farkı tespit edilebilmesine rağmen, A/T, A/A ve T/T genotiplerini ayırt etmek güçtür. MALDI-TOF analizinin bir kısıtlaması da örneğin saflaştırma işleminin çok iyi olması gerekliliğidir. Bu problem modifikasyon primerlerini kullanarak hassasiyeti arttıran GOOD analizi ile çözülür. Bu daha fazla reaksiyon adımı gerektirmesine rağmen tüm reaktifler tek bir tüpe eklenebilir. Eğer minisekans ürünleri aynı kütleyle sahip değilse, çalışma multipleks olarak da yapılabilir. Bu, SNaPshot reaksiyonunda olduğu gibi, primerin 5' ucuna bir kuyruk dizisi eklemek suretiyle başarılmaktadır (Sobrin0 B. ve ark, 2005).

## **Mikrodizin ve floresans tespit**

Bu yöntemde reaksiyon çip yüzeyi ya da solüsyonda gerçekleşir ve minisekanslama ile SNP'lerin genotiplendirilmesinde kullanılmaktadır. İlk olarak, minisekans primerleri bir çipe bağlanır. Bu reaksiyon aynı zamanda Array Primer Uzama (APEX) olarak da bilinmektedir. Primerler işaretli ddNTP'ler ile uzatılır ve floresans ölçümü için mikroarray taranır. İkinci durumda, SNP'ler, 5' ucunda özgün dizi kuyruğuna sahip minisekans primerleri kullanarak tek baz uzaması ile tiplendirilir. Her bir SNP belirgin tanımlayıcı bir diziyeye sahiptir. Solüsyonda gerçekleştirilen multipleks minisekans reaksiyonu sonucu oluşan ürün, çip üzerine dizilmiş komplementer dizilere hibridize olur. Pastinen ve arkadaşları, 80 farklı örneğe kadar analiz imkanı olduğunu açıklamışlardır (Sobrinho B. ve ark, 2005).

### **Floresans polarizasyonu**

FP, reaksiyonlar sonucu ürün kütlelerinde artış ya da azalışı gösteren her türlü genotipleme yönteminde deteksiyon tekniği olarak kullanılabilir. Minisekanslama reaksiyonunda, hedef alel için tasarlanan primerin allele özgü ddNTP'ler tarafından uzatılmasıyla, floroforun moleküler ağırlığı yaklaşık 10-katı kadar artmaktadır. Moleküler ağırlığın değişimiyle de tespit gerçekleştirilmektedir (Sobrinho B. ve ark, 2005).

## **B.2 Pirosekanslama**

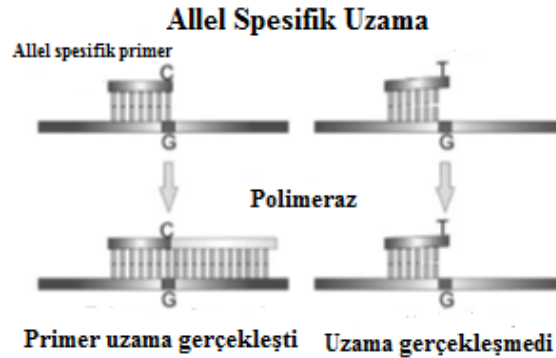
Pirosekanslama sentezleyerek yapılan bir sekanslama yöntemidir. Bu teknolojiyle, nükleotid kalıp DNA ipliğine komplementer olduğunda dört enzim ve spesifik bir substrat içeren kademeli enzim sistemi ile ışık üretilir. Bu ışık sinyali tespit edilir, nükleotid kaydedilir ve bir sonraki nükleotid eklenir. Eğer eklenen nükleotid kalıpdaki bir sonraki baz için tamamlayıcı değilse ışık üretimi olmaz. DNA polimeraz reaksiyonu sırasında açığa çıkarılan

pirofosfat ile tespit sağlanır. Reaksiyon karışımı primer bağlanmış tek zincirli DNA, DNA polimeraz, ATP sülfürlaz, lusiferaz ve apiraz içermektedir. Karışma eklenen dört nükleotid belirli bir düzendedir (örn: CGAT). Eğer eklenen nükleotid kalıp DNA'ya komplementer ise, DNA polimeraz nükleotid ile birleşir ve bunun sonucunda pirofosfat açığa çıkar. Açığa çıkan pirofosfat, ATP sülfürlaz tarafından ATP'ye dönüştürülür. Daha sonra lusiferaz, tespit edilebilir ışık üretmek için ATP kullanır. Işık yoğunluğu bağlanan nükleotid sayısı ile doğru orantılıdır. Her bir fazla nükleotid apiraz tarafından parçalanır. Eğer eklenen nükleotid kalıp DNA ile komplementer baz çifti oluşturmazsa, ışık üretimi söz konusu olmaz. Pirosekanslama hedef DNA'nın 20-30 baz çifti uzunluğundaki zincirin hızlı gerçek zamanlı tespitini mümkün kılmaktadır. Pirosekanslamanın dezavantajları, kalıp DNA'nın reaksiyon öncesi hazırlanması gerekir ve multipleks kapasitesi de sınırlıdır (Sobrinho B. ve ark, 2005).

### **B.3 Allele-özgü uzama**

Allele özgü uzama yönteminin temeli, primerlerin 3' uçlarının eşleşmesi veya eşleşmemesine bağlı olarak DNA polimerazın uzama verimliliğinin farklı olmasına dayanmaktadır. Primerin 3' ucu ile kalıp DNA eşleştiğinde, DNA polimeraz tarafından primer uzama gerçekleşmektedir (Şekil 2.12). Bu reaksiyonda SNP'nin her iki alleleline ait iki primer gereklidir. Ürünü oluşturan primerin tespit edilmesiyle örneğin genotipi belirlenebilir. Bu reaksiyonun ürünü, floresansla işaretlenmiş nükleotidlerin kullanıldığı bir mikroarray üzerinde tespit edilebilir. Bu reaksiyonun başka bir alternatifi allele özgü primerlere ek olarak ortak bir reverse primer kullanımınıdır. Eşleşen primer örnekteki spesifik bir alelin amplifikasyonuna (çoğaltılmasına) izin verir. Bu durumda reaksiyon, allele-özgü PCR olarak adlandırılır. Uygun PCR ürünlerinin tespiti, örneğin genotiplendirilmesini mümkün kılmaktadır. Tag primerlerinin kullanımı, erime eğrisi analizine dayanan bazı durumlar ve

tespit metodu olarak FRET kullanılan diğer bazı analizler PCR ürününün spesifik tanımlanmasına izin verir (Sobrino B. ve ark, 2005).



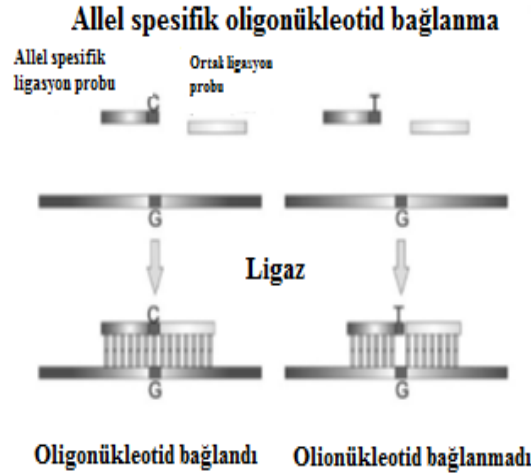
**Şekil 2.12.** Allel Spesifik Uzama yönteminin genel şematik görünümü (Sobrino B. ve ark, 2005).

### C.Alele özgü oligonükleotid ligasyonu

DNA ligaz, DNA'daki eksik fosfodiester bağlarını tamir etmede oldukça spesifik bir enzimdir. Kalıp DNA üzerinde başka bir yere hibridize olduğunda iki oligonükleotide kovalent olarak bağlanacak ligaz enziminin tamir yeteneğine dayanarak oligonükleotid ligasyon metodu (OLA) olarak tanımlanan SNP tiplendirme yöntemidir. Bu yöntemde biri ortak ve diğer ikisi alele özgü olmak üzere 3 prob dizaynı gerekmektedir. Ortak prob hedef DNA'da SNP'nin ilerisine bağlanır. 3' ucu SNP'ye komplementer nükleotid taşıyan allel spesifik prob da ortak probun yanına bağlanır. Bu iki allel spesifik prob, ortak probun hemen bitişiindeki hedef DNA'ya bağlanmak için rekabet halindedir. Bu durum allelin bulunduğu bölgede bir kesik oluşturur. Yalnızca alelik probun hedefle mükemmel şekilde eşleşmesi durumunda, diğer proba kadar DNA ligaz aracılığı ile tamir gerçekleşir ve ligasyon gerçekleşir (Şekil 2.13). Isıya dayanıklı DNA ligazın kullanımı ile tekrarlı termal döngüler oluşmakta bu da lineer olarak artmış ligasyon ürünlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Eğer genomik DNA'nın her iki zinciri oligonükleotid hibridizasyonu için hedef olarak kullanılırsa,

ligasyon ürünlerindeki artışı eksponensiyeldir. Bu reaksiyon ligaz zincir reaksiyonu (LCR) olarak adlandırılır. Her bir hedef zincire tamamlayıcı iki set oligonükleotid kullanılır.

Bağlanmış ürünlerin tespit edilmesi için farklı görüntüleme formatları geliştirilmiştir. Ortak proba biotin ve allele özgü proba reporter grubun bağlanması ile ligasyon ürünü tespit edilebilmektedir. Diğer yöntemlerde ise biotin yerine hareket belirleyici ve allel spesifik proba ise ürünlerin boyları ve renklerine göre ayrılmasını mümkün kılan farklı floresan boyalar kullanılmaktadır. Hareket belirleyici ve floresan boyaların kullanımıyla reaksiyon multipleks olarak gerçekleştirilebilir ve elektroforetik ayırım ile ürünler tespit edilmektedir (Sobrinho B. ve ark, 2005).



**Şekil 2.13.** Allele özgü oligonükleotid bağlanma yönteminin genel şematik görünümü (Sobrinho B. ve ark, 2005).

#### **D. Invazif kesilme (Third Wave™ Technology)**

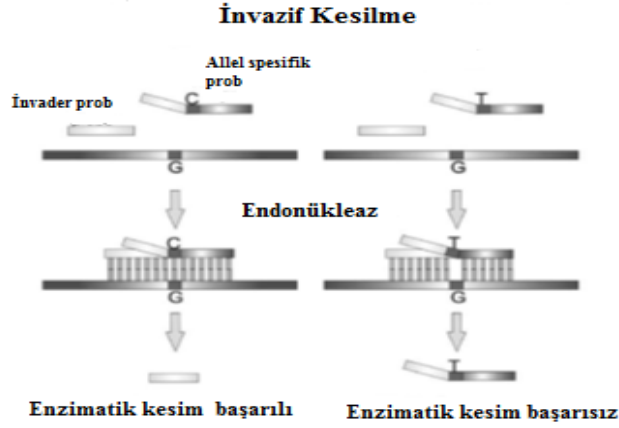
Bu teknik, iki çakışan oligonükleotidin hedef DNA ile mükemmel şekilde hibridize olmasıyla oluşan üç boyutlu yapının Flap endonükleaz tarafından tanınması ve kesilmesine dayanan bir yöntemdir. “İstilacı oligonükleotid” ve “prob” olarak adlandırılan iki oligonükleotid hedef DNA ile kusursuz bağlandıklarında tek bir nükleotid üzerinde çakışma gösterirler. İstilacı oligonükleotid SNP’nin 3’ ucundaki diziyeye tamamlayıcıdır. Prob ise

çakışan bölgede alelik baz bulunacak şekilde dizayn edilmiştir. Allel spesifik prob iki bölgeden oluşmaktadır. Biri SNP'nin allelinin tamamlayıcısıdır ve polimorfik alanın 5' ucundaki diziye tamamlayıcıdır. Diğeri ise tamamlayıcı olmayan 5' koludur (Şekil 2.14). Allelik baz, probdaki baza tamamlayıcı olduğunda prob istilacı oligonükleotidin 3' ucu ile çakışır ve Flap endonükleaz tarafından tanınır. Bunun sonucunda 5' kol endonükleaz tarafından koparılarak ayrılır. Eğer bir eşleşme söz konusu ise, oluşan yapı Flap endonükleaz tarafından tanınmaz ve ayrılma meydana gelmez. Farklı prob dizaynları gerektiren farklı deteksiyon yöntemleri kullanılmaktadır.

İnvazif kesilme reaksiyonu sonucu tespiti sağlamak için kullanılan yöntemlerden biri FRET'dir. İstilacı probun 5' ucunda floresan boya, tamamlayıcı bölgeye de baskılayıcı (quencher) bağlanır. Ayrılma olayı floroforu uzaklaştırır ve floresans oluşturur. Floresans polarizasyon (FP) tekniğinde ise, probun 5' ucu bir floroforla işaretlenmiştir. Prob ayrıldığında floroforun moleküler ağırlığı azalmayla ilişkili ışımda da azalma gözlenir. Eğer deteksiyon metodu kütle spektrometrisi (MS) ise problemler farklı sayıda nükleotid içerecek şekilde dizayn edilirler.

Bu yöntemde ayrılma sonrası probun hızlı bir şekilde denatürasyonunu sağlamak için sıcaklık artırılır ve endonükleazın hedef DNA molekülleri için çoklu kesilmiş prob üretmesi gerekir. Sonuç olarak sinyal amplifiye olur ve ikincil ayrılma reaksiyonu ile birlikte amplifikasyon katlanır. Invader assay bu şekilde öncesinde PCR amplifikasyonu gerektirmeyen bir genotipleme metodudur ancak çok sayıda hedef DNA'ya ihtiyaç vardır. Bu yöntemde aynı zamanda hassaslığı arttırmak için reaksiyonu öncesinde, PCR-Invador assay olarak bilinen bir PCR adımı uygulanabilir (Sobrinho B. ve ark, 2005).





**Şekil 2.14.** İnvazif Klevaj ( kesilme ) yönteminin genel şematik görünümü (Sobrin B. ve ark, 2005).

## 2.7 PCR Yöntemi ile DNA'nın çoğaltılması

Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction=PCR), herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'da, dizisi bilinen herhangi bir bölgenin çoğaltılmasına (amplifikasyon) olanak veren *in vitro* DNA sentez yöntemidir. PCR, tekrarlanan 3 ana basamaktan oluşur:

1. Amplifiye edilecek çift iplikli DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu
2. Primerlerin özgün hibridizasyona olanak verecek sıcaklıkta ( $T_m$  değerinin 3-5<sup>0</sup>C altındaki sıcaklık) hedef bölgelere bağlanması
3. Taq DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği 72<sup>0</sup>C sıcaklıkta, zincirin uzaması

### PCR' da gerekli olan bileşenler;

1. Amplifiye edilecek hedef DNA dizisini içeren kalıp DNA,
2. Amplifiye edilecek hedef DNA dizisinin komplementeri olacak şekilde seçilmiş kısa primerler,
3. Zincirin uzama reaksiyonunu gerçekleştiren termostabil karakterde *Taq* DNA Polimeraz enzimi.
4. Enzimin çalışması için gerekli kofaktör olarak görev yapan  $MgCl_2$ .
5. Amplifikasyona göre değişen miktarda hazırlanılan dATP, dCTP, dGTP ve dTTP karışımı (dNTP).
6. PCR inhibitörlerinin etkisini azaltan BSA (sığır serum albümin)

Primerler, genomik DNA'daki hedef bölge ile hibridize olabilen, 15–30 nükleotid uzunluğunda ve sentetik olarak sentezlenen tek zincirli oligonükleotidlerdir. Hedef bölgeye özgül uygun primer çiftinin (*forward ve reverse primer*) doğru seçimi oldukça önemlidir. Denatürasyonun ardından primerlerin bağlanma aşamasındaki  $T_m$  değerinin saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşmesi açısından büyük önem taşımaktadır.  $T_m = [ 4^{\circ}C ( G+C ) + 2^{\circ}C ( A+T ) ]$  formülü ile kolayca hesaplanır.

Zincirin uzama reaksiyonunu gerçekleştiren *Taq* DNA polimeraz enzimi, *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen, optimal aktivitesini  $72^{\circ}C$ 'de gösteren ve  $94^{\circ}C$ 'de bile aktivitesini kaybetmeyen bir enzimdir. *Taq* DNA polimerazın görevi, tek zincirli DNA'ya bağlanmış komplementer dizilerden itibaren DNA'yı çoğaltmaktır. Polimeraz enzimleri, aktivite gösterebilmek için  $Mg^{+2}$  iyonlarına ihtiyaç duyarlar;  $Mg^{+2}$  iyonları, *Taq* enziminin kofaktörü olarak işlev görürler. Bu nedenle, en uygun  $MgCl_2$  konsantrasyonunun

oluşturulması gerekmektedir.  $Mg^{+2}$  konsantrasyonunun fazla olduğu reaksiyonlarda hatalı eşleşmeler meydana gelirken, düşük olduğu reaksiyonlarda yeterli miktarda hibridizasyon gerçekleşmemektedir.

Zincir, tek iplikli hedef DNA'ya komplementer olan primer ile başlar ve Taq DNA polimeraz, ortamdaki dNTP'leri (deoksinükleotid trifosfat) kullanarak zinciri uzatır. dNTP'ler (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) Taq DNA polimerazın substratlarıdır. Sonuçta tek iplikli DNA çift iplikli forma dönüşür. PCR ile denatürasyon, bağlanma ve uzama adımlarının tekrarlarına dayanan 20–40 döngü sonrasında hedef DNA'nın milyon kopyası elde edilmiş olur (Turner P.C. ve ark, 2004).

### **2.7.1 MULTİPLEKS PCR**

Multipleks (çoklu) PCR terimi birden fazla primer çifti kullanılan PCR'lar için kullanılmaktadır. Tekniğin hedefi, eş zamanlı olarak hedef DNA'nın birçok bölgesini çoğaltmaktır. Böylece maliyet düşer ve zamandan kazanç sağlanmış olur. Aynı zamanda multipleks PCR ile tek bir reaksiyonda birden fazla polimorfizmin tespit edilmesi mümkün olmaktadır. Fakat multipleks PCR'ın oluşturulması oldukça zordur. Primerlerin birbiri ile etkileşime girmesine izin vermemek için reaksiyondaki tüm primerlerin yaklaşık aynı  $T_m$  derecesine sahip olması gerekmektedir. Aynı zamanda primerlerin kalıp DNA'dan bağımsız çoğalmasını engellemek amacıyla özellikle 3' uçları kendi içinde eşleşmemeli veya birbirleriyle komplementer olmamalıdır. Aksi halde primer-dimer yapıları oluşmaktadır (Kashyap V.K. ve ark, 2004).

## 2.8 ELEKTROFOREZ

Elektroforez yüklü moleküllerin elektriksel bir alanda hareketini inceleyen analitik bir yöntemdir. Modern elektroforetik yöntemlerde polimerize jel benzeri matrisler destek materyali olarak kullanılmaktadır. Analiz edilecek örnekler bu matrisle nokta veya ince bantlar şeklinde uygulanmaktadır. Moleküllerin hareketi moleküllerin boyuna, şekline, yüküne, kimyasal içeriğine, matrisin yoğunluğuna ve uygulanan elektriksel şiddete göre değişmektedir. Elektroforez saflaştırılmış birçok biyomolekülün analizine olanak sağlasa da özellikle protein ve nükleik asitlerle ilgili araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüklü moleküllerin elektriksel alandaki hareketleri aşağıdaki eşitlikle ifade edilmektedir:

$$V = Eq/f$$

E= uygulanan elektrik alan (volt/cm)

q= molekülün net yükü

f= molekülün şekli ve kütesine bağlı sürtünme katsayısı

V= molekülün hızı

Yüklü partiküllerin hızı uygulanan elektrik şiddeti ve molekülün yüküyle doğru orantılı artmaktadır. Uygulanan tamponun iyonik gücü ve pH'sı, molekülün kütlesi, şekli, elektrotlar arası uzaklık ve sıcaklığın hareket üzerine ters etkileri olabilmektedir. Voltaj sabit tutulduğunda yüklü moleküllerin hareketi  $q/f$ 'ye bağlı olmaktadır. Bu durumda, benzer konformasyondaki moleküller (örneğin doğrusal DNA parçaları ya da globüler proteinler) için f molekülün biçimine değil boyutuna bağlı olarak değişmektedir. Böylece eşitlikteki değişkenler yük (q) ve kütle (f) olarak kalmakta, bu ise moleküllerin elektriksel alandaki hareketinin yük/kütle ile doğrusal orantılı olmasını sağlamaktadır. Yüklü partiküllerin

elektriksel alandaki hareketi mobilite ( $\mu$ ), elektriksel alan başına düşen hız olarak tanımlanmaktadır.

$$\mu = V/E$$

Her iki eşitlik modifiye edilecek olursa  $\mu = Eq / Ef = q/f$  elde edilir. Hareket eden moleküllerin destek alan ile etkileşimi ve kullanılan tamponun iyonik gücü eşitlikte dikkate alınmayan en önemli faktörlerdir. Karışımdaki her bir molekül kendine özgü yük ve büyüklüğe sahip olduğu için böyle bir molekülün elektriksel alandaki hızı da moleküle özgüdür.

Farklı elektroforetik yöntemlerde temel prensip aynı olmakla birlikte, en önemli farkı kullanılan destek alan oluşturmaktadır. Selüloz, nişasta, agaroz, poliakrilamid, gibi değişik bileşikler destek ortamı olarak kullanılabilir. Elektroforezin dikey ya da yatay oluşu, bu sistemlerde kullanılan tamponlar ve diğer bazı elektroforez koşulları farklılığı oluşturan diğer etmenlerdir (Landers J.P. ve ark, 1997).

### 2.8.1 AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

Agaroz ortalama molekül ağırlığı 12000 olan doğrusal bir polisakkarittir ve kırmızı bir alg türü olan *Agar agar*' dan izole edilir. Yüksek sıcaklıklarda suda çözünmesi ve soğutulduğunda bu polimerde çapraz bağların oluşması sonucu jel yapısı oluşur. Bu olay geri dönüşümlüdür. Agaroz orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için en yaygın destek ortamıdır. Ayrıştırılacak moleküllerin büyüklüğüne bağlı olarak genelde %0,3 ila 2,0 agaroz konsantrasyonları kullanılır.

En çok 50 kb'a kadar olan nükleik asitler agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılabilir. Agaroz konsantrasyonu ayarlanarak jelde moleküllerin hareket ettiği porların çapı değiştirilebilir. Jelin konsantrasyonu arttıkça, porların çapı küçülür. Böylece küçük DNA

parçaları için yüksek, büyük DNA parçaları için ise düşük agaroz konsantrasyonları kullanılarak nükleik asitlerin en iyi şekilde ayrılmaları sağlanır. Agaroz jeller genellikle floresans bir boya olan etidyum bromür ile boyanır ve UV ışığı altında DNA parçaları görüntülenir. DNA'nın jelde görünür hale gelmesi, etidyum bromürün DNA'nın iki zinciri arasına girerek 300 veya 360 nm dalga boyundaki ışığı soğurması sonucu boya floresans etki gösterir ve çift zincirli DNA parçaları görünürleşir (Bardakçı F, 2007).

### **2.8.2 POLİAKRİLAMİT JEL ELEKTROFOREZİ**

Poliakrilamit jeller, vinil polimerizasyonu ile akrilamit monomerlerinin uzun poliakrilamit zincirleri ve genellikle ortama belli miktarda 'bis' ilavesiyle çapraz bağlanmalar yaparak oluşur. Akrilamit/bis karışımı polimerleşmeyi katalizleyen amonyum persülfat ile TEMED varlığında polimerleşerek jel yapısı kazanır. PAGE nispeten küçük DNA moleküllerini (genellikle 20-100 bp büyüklüğündeki parçaları) ayırmak için uygundur. Ayrıca çok ince (0,3 mm kalınlığında) olan %40'luk son derece küçük porları olan poliakrilamit jel, çok küçük DNA moleküllerini (büyüklüğü 1-300 bp aralığındaki) ayırmada kullanılır. Bu jeller sadece birkaç tekrarlı dizi bakımından farklı olan mikrosatelit DNA moleküllerini ayırmak için kullanışlıdır.

Standart poliakrilamit jeller genellikle gümüş nitrat veya etidyum bromür ile boyanarak nükleik asitlerin görüntülenmesi sağlanır. Ancak jeldeki her bant için DNA miktarı 10 ng'dan az ise, bu durumda boyama görüntülemek için çok etkili olmaz. Bunun için çok hassas olan otoradyografik yöntemler kullanılır. Bunun için elektroforez öncesi DNA molekülleri radyoaktif olarak işaretlenir (Bardakçı F, 2007).

### 2.8.3 KAPİLER ELEKTROFOREZİ

Bugün ticari birçok sistem UV ya da UV-görünür absorbands belirleme sistemlerini kullanmaktadır. Bu sistemlerde kapillerin kendisi belirleme hücresi (detection cell) olarak kullanılır. Genel olarak, kapiler elektroforezde kullanılan kapillerler stabilitenin artması için polimer ile doldurulmuştur. Fakat UV ışık sisteminin kullanıldığı kapiler bölümü optik olarak geçirgen olmalıdır. Kapiler elektroforezde belirleme hücresinin yol uzunluğu (~50 µm) UV hücresinden (~1 cm) daha küçüktür. Beer-Lamber kanununa göre, detektörün duyarlılığı hücrenin yol uzunluğu ile orantılıdır. Duyarlılığı arttırmak için yol uzunluğu artırılabilir, fakat bu durumda çözünürlük azalmaktadır.

Floresans belirleyicinin kullanıldığı elektroforez sisteminde ışık demetinin kapillerler üzerinde odaklanması gerekmektedir. Lazerle indüklenen floresansların kullanıldığı kapiler elektroforez sistemlerinde belirleyici sınırlar  $10^{-18}$  -  $10^{-21}$  mol kadar küçük olabilmektedir. Yöntemin duyarlılığı ışık yoğunluğuna ve ışığın doğru bir şekilde kapillerler üzerine odaklanmasına bağlıdır. Kapiler elektroforezde yürütülen örneklerin mobilitesi örneğin büyüklüğüne, taşıdığı yüke, tamponun iyonik gücüne, ve tamponun elektromotik akışına bağlıdır. Tipik sistemlerde elektro-osmotik akış negatif yüklü katoda doğrudur (Landers J.P. ve ark, 1997).

3100 analizör cihazında lazerli bir detektör sistemi kullanılmaktadır. PCR ürünleri elektroforez öncesi elektrokinetik injeksiyon ile kapiler (25-100 µm çaplı) içerisine alınırlar. Kapillerler jel yerine özel polimerler ile doldurulurlar. Bu özel polimer POP4 (performance optimized polymer) olarak bilinir. Kapillerin çapının küçük olması hem yüksek voltaja izin vermekte hem de daha iyi bir ayırım sağlamaktadır. Analizörde kullanılan kapillerler iç yüzey silika ile kaplanmıştır. Elektro-osmotik akış, kullanılan polimerler ile (POP4, POP6 ve POP7)

baskılanmıştır ve bu polimerler DNA için ayırım matriksi olarak görev yaparlar. POP4 polimeri, %4 DMA, 8 M üre, %5 2-pirolidinon ve 100 mM TAPS'dan oluşur. İçeriğindeki yüksek üre miktarı elektroforez sırasında PCR ürünlerindeki denatürasyon durumunun devamını da sağlar. DNA ürünleri uygulanan voltajla katotdan (-) anoda (+) doğru büyüklerine göre ayrılırlar. Floresans boyalarla işaretlenmiş DNA fragmentleri detektör hücresinden geçerken lazer tarafından tespit edilirler. Lazer ışını floresans boyaları etkileyerek belirli dalga boylarında yansıma yapmalarına neden olur. Yansıyan ışığın dalga boyu ve şiddeti ise CCD (charge coupled device) adı verilen özel kamera sistemi tarafından tespit edilir ve bu veri elektronik bilgiye (elektroferogram) dönüştürülür. Son olarak elde edilen elektroferogram yani yürüme modelleri GeneScan, GenoTyper ve GeneMapper gibi yazılım programları kullanılarak analiz edilir (Applied Biosystem, 2001).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında yapılan tüm deneyler Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Ege Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarındaki cihaz ve gereçler kullanılarak gerçekleştirildi. Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalına rutin analizler yaptırmak için başvuran ve bu çalışma için gönüllü onam formu alınan 46'sı kadın 54'ü erkek olmak üzere 100 kişiden (Çalışma Ege Üniversitesi Etik kurulunun 11-10.1/10 sayılı onayı alınarak yapıldı.) kan örnekleri alınarak çalışma yapıldı.

#### 3.1 GEREÇ

##### 3.1.1 Kimyasal Malzemeler

Çalışmamızda kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 3.1'de gösterildi.

**Tablo 3.1** Kullanılan kimyasal maddeler

<b>Kimyasal malzeme</b>	<b>Markası</b>
DNA izolasyon kiti	Roche
Distile su	Thermo scientific
Buffer	Thermo scientific
dNTP	Thermo scientific
Taq DNA polimeraz enzimi	Thermo scientific
Mg <sup>+2</sup>	Thermo scientific
SNaPshot kit	Applied Biosystems
Agaroz	Fermentas
POP4	Applied Biosystems
Hi-Di Formamid	Applied Biosystems
Matrix Standards Set DS-02 kit	Applied Biosystems
GeneScan-120 Liz internal size standart	Applied Biosystems
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase enzimi	Fermentas
Exonuclease I(Exo I)enzimi	Fermentas
K562 (3µg)	Promega

### 3.1.2 Kullanılan Kimyasal Çözeltilerin Hazırlanışı

#### Etidyum Bromür Hazırlanması

10 mg/ml stok solüsyon elde etmek için, 1 g etidyum bromür 100 ml steril distile suda çözüldü ve agaroz jelde kullanılmak üzere karanlık ortamda 4°C'de saklandı.

#### dNTP Hazırlanması

dNTP'lerin (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) her biri 100 µM'lık ayrı tüplerde bulunmaktadır. Bu tüplerin her birinden 20 µl alınarak toplamda 80 µl (dört dNTP karışımı) olan hacim 200 µl'ye tamamlamak için 120 µl steril distile su eklendi Bu karışım 20 µl'lik küçük hacimlere bölünerek -20°C'deki derin dondurucuda saklandı.

#### Amonyum sülfat çözeltisinin hazırlanışı

İstenilen son hacme ve konsantrasyona göre toz halinde bulunan amonyum sülfat çözeltisi tartıldı.  $M = m/MA/V$  formülü kullanılarak hesaplama yapıldı. 2 M amonyum sülfat çözeltisi hazırlamak için toz çözeltilerden 26,4 g tartıldı ve 100 ml distile su içinde eriyinceye kadar karıştırıldı.

Amonyum sülfatın formülü= $(NH_4)_2SO_4$

Amonyum sülfatın molekül ağırlığı=132,14

Hazırlanan bu karışım tüplere bölünerek -20°C'deki derin dondurucuda saklandı.

#### TAE ( Tris-Asetat-EDTA ) Tamponu

Elektroforezde kullanılacak olan TAE tamponu için stok solüsyon olarak 50x TAE hazırlandı. 50x TAE için; 242 g Tris, 500 ml distile su içinde çözüldükten sonra 57,1 ml glasial asetik asit ve 100 ml 0,5 M  $Na_2EDTA$  eklendi ve son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

% 3'lük jelde kullanılacak olan 1x TAE tamponu; 50x TAE stok solüsyonundan 1 ml alınıp, distile su ile 50 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

### **% 3' lük Agaroz Jel Hazırlama**

% 3'lük agaroz için, 0,4 g nusive agaroz ve 0,8 g agaroz 40 ml 1x TAE tamponu içine ilave edildi ve oluşturulan karışım mikrodalga fırında eritildi.

### **Poliakrilamid Jel Hazırlama ( PAGE )**

Jel hazırlanırken malzemelerin Tablo 3.2'deki sıraya göre eklenmesine dikkat edilmelidir:

**Tablo 3.2** PAGE için gerekli malzemeler ve miktarları

<b>Malzemeler</b>	<b>Miktar</b>
ddH <sub>2</sub> O	23,720 ml
5xTBE	8 ml
%30 Akrilamid	8 ml
%10 APS	280 µl
TEMED	14 µl

Jel hazırlanırken dikkat edilmesi gereken birkaç önemli nokta bulunmaktadır. Bunlar:

- %10'luk APS her çalışmada taze olarak hazırlanmalıdır.
- TEMED oda sıcaklığında, %30 akrilamid ve 5x TBE çözeltileri +4°C'de saklanmalıdır.

### 3.1.3 Kullanılan Cihazlar

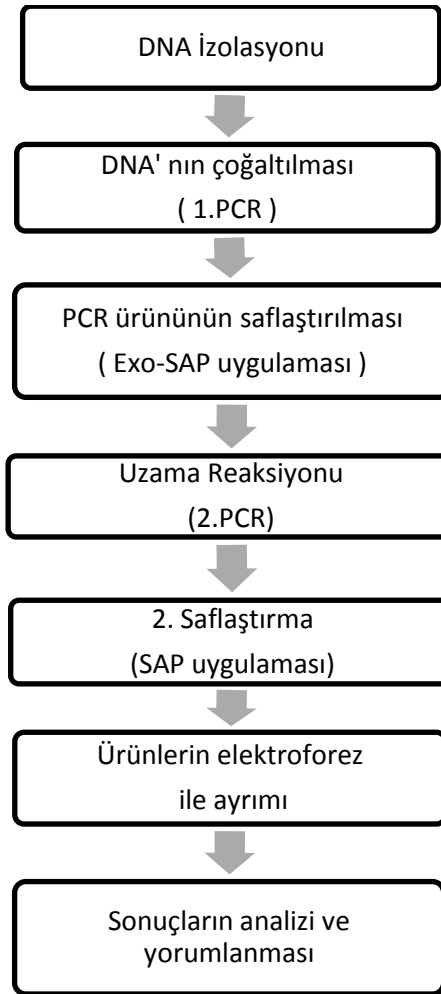
Çalışmada kullanılan cihaz ve gereçler Tablo 3.3’de gösterilmektedir.

**Tablo 3.3** Kullanılan cihaz ve gereçler

<b>Cihaz veya gereç</b>	<b>Markası</b>
Otomatik Pipet 10 µl	Eppendorf
Otomatik Pipet 100 µl	Eppendorf
Santrifüj	Biofuge pico
Buzdolabı( +4 oC )	Arçelik
Buzdolabı( -20 oC)	Uğur
Jel elektroforez tankı ve düzeneği	Thermo
Translüminatör	Vilber Lourmat
3100 Analizör cihazı	Applied Biosystems
PCR cihazı	Corbetta
Laminer Flow	Biosan
DNA izolasyon cihazı (Magna Pure Compact)	Roche
Mikrodalga fırın	Samsung

### 3.2 YÖNTEM

Elde edilen kan örneklerinden SNaPshot minisekanslama tekniği ile X kromozomu üzerindeki 5 SNP noktasının (X018, X036, X047, X131, X142 pozisyonları) genotip tayini yapıldı. SNaPshot minisekanslama tekniğinin optimizasyonu için K562 kontrol örneği (10 ng/ $\mu$ l) kullanıldı. Uygulanan yöntemin çalışma basamakları Tablo 3.4’de sırasıyla verildi.



**Tablo 3.4** SNaPshot minisekanslama yönteminin genel akış şeması

### 3.2.1 DNA İZOLASYONU

DNA izolasyonu için Magna Pure Compact (Roche) cihazı kullanıldı. Cihazda Cortride ID barkotlu sistemle her bir kişi için kartuş cihaza okutuldu. Protokol olarak DNA Blood 100\_400\_V<sub>3</sub>\_2 programı seçildi. Örnek hacmi 100 µl, elüsyon hacmi 200 µl olarak seçildi. Magna Pure Compact DNA izolasyon kiti içerisinde bulunan pipet uçları cihaza yerleştirildi ve kişilerin laboratuvar numaraları girildi. Barkot olmayan tüplere 400 µl kan pipetlendikten sonra cihaz çalıştırıldı.

#### **DNA Miktar Tayini**

DNA miktarı spektrofotometrik yöntemle belirlendi. DNA, ultraviyole ışığı altında sahip olduğu absorpsiyon A ( optik yoğunluk, OD ) değeri üzerinden direkt ölçüldü. 260 nm dalga boyunda UV ışığının absorpsiyon değeri nükleik asitlerin miktarlarını, 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilen değerlerin oranı ise DNA'nın saflığının belirlenmesinde kullanıldı (Saf DNA yaklaşık 1,8 değerini vermelidir). Çalışmada kullanılacak DNA'lar, saflık değerleri ve konsantrasyon miktarları dikkate alınarak seçildi (30-90 ng/µl).

### 3.2.2 I.PCR

#### **I. PCR Primerlerinin sulandırılması ve konsantrasyonlarının ayarlanması**

Tomas C. ve ark tarafından 2008'de yayınlanan makaleden referans alınarak seçilen 5 SNP lokusu için dizayn edilen primer dizisi üretici firmaya (Genmar Lab.) verildi (Tablo 3.5). PCR primerleri ve minisekanslama primerleri üretici firma tarafından HPLC ile saflaştırıldı ve liyofilize edildi. Primerlere protokolüne uygun olarak belirtilen miktar kadar distile su eklendi. Elde edilen 100 µM'lık primerler tüplere bölünerek -20°C'de saklandı.

**Tablo 3.5** PCR primerleri ( Tomas ve ark. 2008 )

Lokus	PCR Primer Dizisi	Tm ( °C )	Amplikon Boyutu( bç )
X018-F	CACTGGTTATTTTCTTCTTCCCTTC	59	62
X018-R	CCACAAGACTAAGCCAAGACCA	60	
X036-F	ACACATGGGTTTTGAGTCAGC	58	67
X036-R	CCATAAGGCCAATGAGTTGTAGAG	59	
X047-F	AACATGTCAGTGTACTTTCATAAGTTGTTA	59	90
X047-R	AGATCATGTTGACATTAGGTTGCT	58	
X131-F	TTGTTGGATGTTATCTGTCATTGAT	58	109
X131-R	CTTCACTGGAAATGCAAATTGATA	59	
X142-F	CTTCACTGGAAATGCAAATTGATA	58	100
X142-R	GCAAGCTCATATATAGATCCATTGTTCA	61	

### I. PCR bileşenlerinin hazırlanması

Kandan izole edilen DNA'ların konsantrasyonları fazla olduğundan (30-90 ng/μl arası) PCR öncesi DNA miktarları 1 ng/μl olacak şekilde sulandırıldı. PCR'da kullanılacak olan bileşenler çalışma öncesi -20 °C'den çıkarıldı ve kısa süre santrifüj edildi. PCR karışımı hazırlanana kadar reaktifler soğuk blokta bekletildi. Taq DNA polimeraz enzimi ise yüksek sıcaklıklarda bozulacağından dolayı karışıma ekleneceği zaman buzdolabından çıkarıldı. Bileşenler Tablo 3.6'da belirtilen miktarlarda karıştırıldı. DNA örnekleri 1-10 ng aralığında olacak şekilde sulandırılarak PCR karışımına eklendi. PCR karışımının bulunduğu ependorf tüp kısa süre santrifüjlendi ve PCR cihazındaki plakaya yerleştirildi. PCR cihazı Tablo 3.7'de belirtilen koşullarda ayarlandı. PCR sonrası tüpler -20 °C'de saklandı.

**Tablo 3.6** PCR karışım tablosu

<b>Bileşenler</b>	<b>Hacim/Reaksiyon (µl)</b>
Steril Distile Su	2.5 µl
Primer mix (0.15µM)	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM/ µl )	1.2 µl
Buffer	1.5 µl
dNTP (10 µM/ µl)	0.3 µl
BSA (3.2 mg/ml)	0.75 µl
Taq DNA Polimeraz( 5 U/µl)	0,3 µl
Genomik DNA (1 ng/ µl)	1,5 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>10 µl</b>

**Tablo 3.7** PCR döngüsü

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>	<b>Döngü sayısı</b>
95 °C	10 dk	1
95 °C	30sn	33
58 °C	30sn	
72 °C	30 sn	
72 °C	7 dk	1
4 °C	∞	



### **Agaroz Jel Elektroforezi**

PCR işleminden sonra hedeflenen DNA'nın çoğalıp çoğalmadığını tespit etmek için agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için %3'lük agaroz jel hazırlandı. Tamamen homojen bir eriyik haline gelen jel biraz soğuduktan sonra, 5 µl etidyum bromür eklenip iyice karıştırıldı ve hazırlanan jel yükleme kuyularını oluşturacak olan tarağın da takılı olduğu elektroforez transfer kabına döküldü. Jelin polimerleşmesini sağlamak için jel buzdolabında (4°C) 5 dk bekletildi. Jel polimerize olduktan sonra, tarak çıkarıldı ve agaroz jelin bulunduğu transfer kabı elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı, jelin 1–2 mm üzerini kaplayacak şekilde 1x TAE tampon çözeltisi ile doldurulup, örnekler kuyucuklara yüklendi.

Jelde ilk kuyucuğa 5 µl DNA marker (50 bp DNA Ladder), diğer kuyucuklara ise 5 µl PCR ürünü + 2 µl 6x yükleme boyası karışımı aktarıldı. Jele yüklenen örnekler 90 V/500 A elektriksel alanda 50 dakika yürütüldükten sonra translüminatör cihazında görüntülenerek analizi yapıldı.

### **Poliakrilamid Jel Elektroforezi ( PAGE )**

Multipleks PCR'in optimizasyonu sırasında çalışılan bölgelerin boyutları birbirine yakın olduğundan, ayırt etme gücü agarozdan daha yüksek olan poliakrilamid jel elektroforezi hazırlandı. Yapılış sırası aşağıda sırasıyla belirtilmiştir:

1. Hazırlanan jel, pastör pipeti yardımıyla daha önce hazırlanan camların arasına aktarıldı.
2. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirildi.
3. Jel polimerize olduktan sonra ( ~1-1.5 saat) yükleme yapıldı.

4. Jel, 110 voltta 4 saat yürütüldü. Yürütme işlemi bittikten sonra translüminatör cihazında görüntülenerek analizi yapıldı.

### **3.2.3 I. PCR ürünlerinin saflaştırılması**

PCR sonrası bağlanmayan primerlerin uzaklaştırılması için tek zincirli DNA'yı hidrolize eden Ekzonükleaz I (Ekzo I) ve bağlanmayan dNTP'leri uzaklaştırmak için Shrimp (Karides) alkalın fosfataz (SAP) enzimi kullanılarak PCR ürünleri saflaştırıldı. Bu işlem için her 2,5 µl PCR ürünü üzerine 0,75 µl (1u/ µl) SAP ve 0,25 µl (20 u/ µl) Exo1 eklendi. Karışım hızlıca santrifüjlenip, 37°C'de 90 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 85°C'de 20 dk bekletilerek enzimin inaktivasyonu sağlandı. Saflaştırılmış PCR ürünleri SNaPshot Reaksiyonu öncesi -20°C'ye kaldırıldı.

### **3.2.4 II. PCR**

İkinci PCR aşamasında saflaştırılan PCR ürünü, SNaPshot reaksiyon karışımı ve uzama primerleri karıştırılarak 5 SNP noktasının tek baz uzama reaksiyonu gerçekleştirildi.

## **II. PCR Primerlerinin Sulandırılması ve Konsantrasyonlarının Ayarlanması**

Firmadan liyofilize halde alınan ikinci PCR primerleri ultra saf su ile sulandırılarak her biri 100 µM olan primer konsantrasyonları hazırlandı. Elde edilen stok çözeltiler -20°C'de muhafaza edildi. Stok primerlerden ikinci PCR da kullanılmak üzere 20 µM'lık ara stoklar oluşturuldu. Tablo 3.8'deki miktarlarda eklenen primer karışımı üzerine 19.75 µl steril saf su ve 4 µl 2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> eklenerek toplam hacim 50 µl olacak şekilde hazırlandı.

**Tablo 3.8** İkinci PCR primerlerinin oranları

<b>İkinci PCR uzama primeri</b>	<b>Primer karışımındaki son konsantrasyon</b>
X018-R	2 $\mu$ M
X036-R	2 $\mu$ M
X047-R	2,5 $\mu$ M
X131-F	1,5 $\mu$ M
X142-R	2 $\mu$ M

### **SNaPshot Reaksiyon Karışımının Hazırlanması**

Saflaştırma işleminden sonra elde edilen ürün, SNaPshot reaksiyon karışımı (AmpliTaq DNA Polimeraz enzimi, floresan işaretli ddNTP ve buffer), uzama primerleri Tablo 3.9’da belirtilen oranlarda karıştırıldı ve Tablo 3.10’da verilen programla PCR döngüsü ayarlandı. Yapılan çalışmalarda herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığını belirlemek amacıyla pozitif kontrol ve negatif kontrol hazırlandı. Pozitif kontrol; SNaPshot kit içinde yer almaktadır. Altı farklı primer ve bir CEPH DNA ampliconu içermektedir. Negatif kontrol, DNA içermemektedir. Burada son hacmi 6  $\mu$ l’ye tamamlamak için ultra distile saf su kullanıldı. 2. PCR primerlerinin beklenen son ürün uzunlukları ve eklenen kuyruk uzunlukları Tablo 3.11’de belirtildi.

**Tablo 3.9** 2.PCR karışımı hazırlama tablosu

<i>PCR bileşenleri</i>	<i>Örnek (µl)</i>	<i>Pozitif kontrol (µl)</i>	<i>Negatif kontrol (µl)</i>
<i>Snapshot reaksiyon karışımı</i>	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
<i>Snapshot primer karışımı</i>	1,5 µl	–	–
<i>Snapshot kontrol primer karışımı</i>	–	1 µl	1 µl
<i>PCR ürünü(exo-SAP ile muamele edilmiş)</i>	2 µl	–	–
<i>Snapshot kontrol DNA</i>	–	2 µl	–
<i>Saf su</i>	–	0,5 µl	2,5 µl
<i>Toplam hacim</i>	6 µl	6 µl	6 µl

**Tablo 3.10** İkinci PCR döngüsü

<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>	<b>Döngü sayısı</b>
95 °C	5 dk	1
96 °C	10 sn	25
50 °C	5 sn	
60 °C	30 sn	
4 °C	∞	

**Tablo 3.11** SNaPshot primer dizini ve beklenen son ürün uzunlukları

SNP adı	Beklenen son ürün uzunluğu	SNP noktaları	Primerler
<b>X018-R</b>	41	C/T	cacgtcgtgaaagtctgacaaCAAGACCAAACATTGCAAG
<b>X036-R</b>	33	C/T	agtctgacaaAGTTGTAGAGCTCAGATTGTAA
<b>X047-R</b>	18	C/T	GTTGACATTAGGTTGCT
<b>X131-F</b>	37	G/T	agtctgacaaTTAGTATTAACATGATTTAGCGCAT
<b>X142-R</b>	25	A/C	aATCCATTGTTCAATTTCAAGGTAT

### 3.2.5 II. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

SNaPshot reaksiyonu sonrasında bağlanmayan floresans işaretli ddNTP'leri uzaklaştırmak için 6 µl SNaPshot Reaksiyon ürünü üzerine 1µl SAP (1U/ µl) enzimi eklendi. Kısa süre santrifüjlendi. Karışım 37°C'de 90 dk, 85°C'de 15 dk inkübe edildi. Hemen kullanılmayacak örnekler elektroforez öncesinde 24 saate kadar 4°C'de bekletildi. 24 saatten fazla saklanacaklar -20°C'ye kaldırıldı.

### 3.2.6 SNaPshot Ürünlerinin ABI 3100 Analizör Cihazı ile Elektroforezi

Bu çalışmada Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim dalı laboratuvarında bulunan ABI Prism 3100 Genetik Analizör (Applied Biosystems) cihazı kullanılarak örneklerin elektroforezi ve görüntülenmesi yapıldı.

#### Elektroforez Parametrelerinin Ayarlanması

Örnekler yürütülmeden önce Matrix Standards Set DS-02 (Applied Biosystems) kitte belirtilen oranlarda (195 µl Hi-Di Formamid ve 5 µl matrix standart) karıştırıldı ve plate kuyucuklarına (10 µl) dağıtıldı. 95°C'de 5 dk denatürasyon işleminden sonra plate 5 dk buz üzerinde tutuldu ve cihaza yüklendi. Boyanın yürümesi kontrol edildikten sonra SNaPshot

minisekanslama reaksiyonu için cihazın parametreleri ayarlandı (Tablo 3.12). 3100 cihazında POP 4 polimer ve GeneScan-120 Liz internal size standardı kullanıldı.

**Tablo 3.12** 3100 Genetik Analizör cihazı için ayarlanan parametreler (Brión M, 2005)

Name	Value	Range
Oven_Temperature	60	18...65 Deg. C
Poly_Fill_Vol	6500	6500...38000 steps
Current_Stability	5.0	0...2000 uAmps
PreRun_Voltage	15.0	0...15 kVolts
Pre_Run_Time	60	1...1000 sec.
Injection_Voltage	2	1...15 kVolts
Injection_Time	60	1...600 sec.
Voltage_Number_Of_Steps	10	1...100 nk
Voltage_Step_Interval	60	1...60 sec
Data_Delay_Time	1	1...3600 sec.
Run_Voltage	15.0	0...15 kVolts
Run_Time	1000	300...14000 sec.

### Örneklerin analizör cihazına yüklenmesi

Örnekler hazır olduğunda reaksiyon başına 9 µl formamid ve 0,3 µl GeneScan-120 Liz internal size standart karıştırıldı. Her bir plate kuyucuğuna 9,3 µl karışım dağıtıldı. Daha sonra örnekten 0,75 µl çekilerek, sırasıyla plate kuyucuklarına yüklendi. Plate 95°C’de 5 dk tutularak denatüre edildi ve 5 dk da buz üzerinde tutuldu. Plate cihaza yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı.

### 3.2.7 VERİLERİN ANALİZİ

ABI 3100 genetik analizöründe yürütülen örneklerin analizi için, Peak Scanner (Applied Biosystems) programı kullanıldı. Yürütme sonrası veriler “add files” komutu

yardımıyla eklendi. Boyut standart bölümüne “GS120LIZ” ve analiz metoduna da “SNaPshot” seçildi. Örnekler bu parametrelerde analiz edildi.

### 3.2.8 İSTATİKSEL ANALİZ

Kadın ve erkekte allel frekansı değerleri SNP Analyzer 2.0 programı kullanılarak hesaplandı. Populasyonlar arasındaki farklılaşma değeri (Fst) ise Arlequin 3.5 programı kullanılarak bulundu.

Yapılan çalışmada sekans sonuçlarının güvenilirliğini ölçmek için elektroforegramda görüntülenen SNP noktalarının ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Standart sapma hesaplamaları yapılırken aşağıdaki formülden yararlandı.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Z_i - \bar{Z})^2}{N-1}}$$

$\sigma$ : Standart sapma

$Z_i$ : Veriler ( $Z_1, Z_2, Z_3, \dots, Z_n$ )

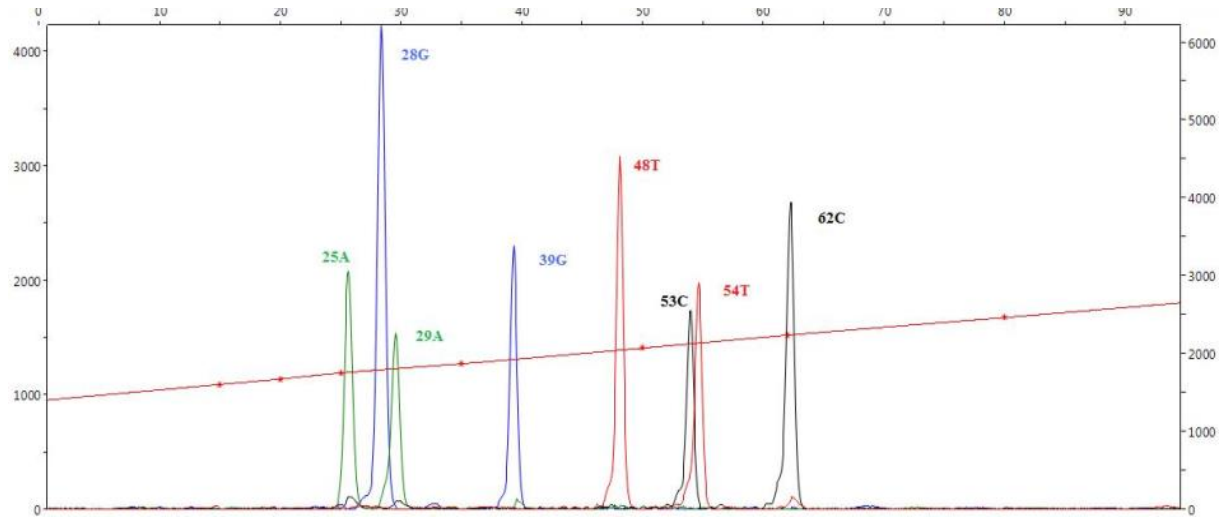
$\bar{Z}$ : Verilerin aritmetik ortalaması

N: Toplam veri sayısı

## 4.BULGULAR

### 4.1 Optimizasyon Çalışmaları

Optimizasyon çalışmasına SNaPshot multipleks kit içerisinde yer alan pozitif kontrol örneği ile başlandı. Matrix Standard cihazda yürütüldükten sonra SNaPshot yöntemi için gerekli parametreler cihaza kaydedildi. Bu işlemlerden sonra çalışmanın güvenilir olduğundan emin olmak için kit içerisindeki pozitif kontrol örneği ve negatif kontrol örneği Tablo 3.9’da belirtilen oranlarda yürütüldü. Yürütme sonucunda pozitif kontrol örneğinin elektroforegram görüntüsü Şekil 4.1’de , negatif kontrol örneğinin elektroforegram görüntüsü Şekil 4.3’de gösterildi.



Şekil 4.1 SNaPshot kit pozitif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü

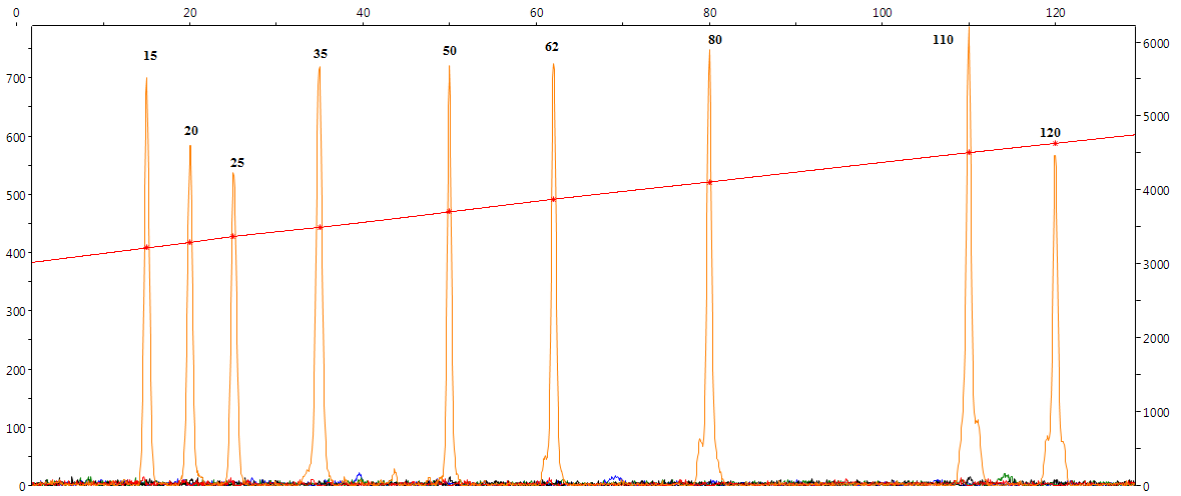
Tablo 4.1 SNaPshot multipleks kiti pozitif kontrol reaksiyonunda beklenen sonuçlar

Multipleks Kontrol Primer Karışımı	Son Ürün Uzunluğu ( size )	Sinyal Rengi	Heterozigotluk
20A Primeri	21	Green	Homozigot
28G/A Primeri	29	Blue, Green	Heterozigot
36G Primeri	37	Blue	Homozigot
44T Primeri	45	Red	Homozigot
52C/T	53	Black, Red	Heterozigot
60C	61	Black	Homozigot

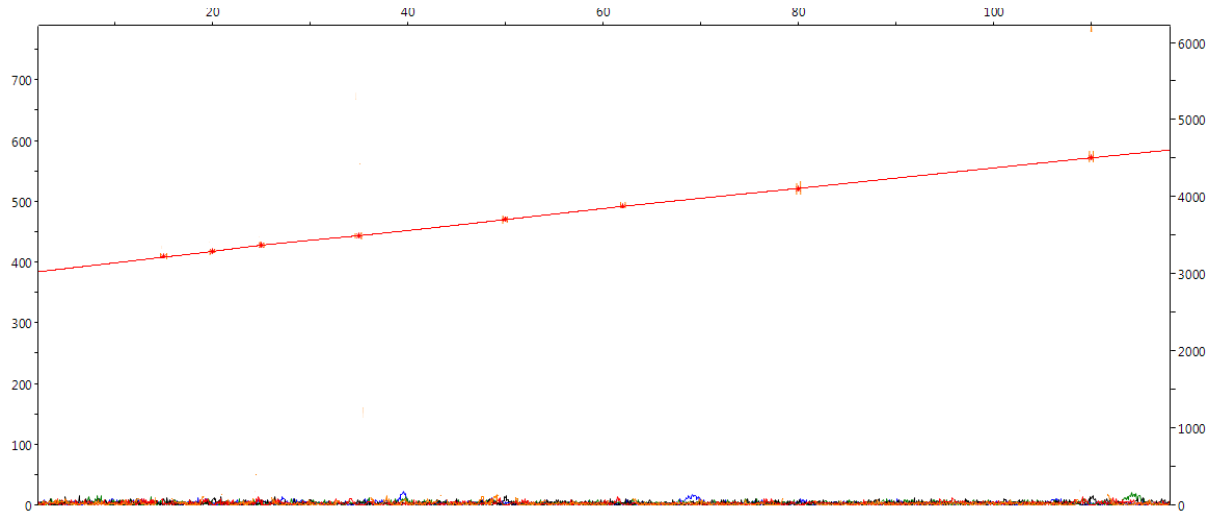


Tablo 4.1’de görülen verilerle pozitif kontrol örneği yürütme sonuçları karşılaştırıldığında, pozitif kontrol örneğinde beklenen son ürün uzunluklarında kayma olduğu görüldü. Özellikle 25 bazın altında bulunan örnek boyutlarında 5-6 baz kayma meydana gelirken 25 bazın üstünde olan örneklerde 1-3 arası kayma gözlemlendi.

Analizörün yürütme şartlarını kontrol etmek için *GeneScan-120 Liz internal size standart* kullanıldı (Şekil 4.2).

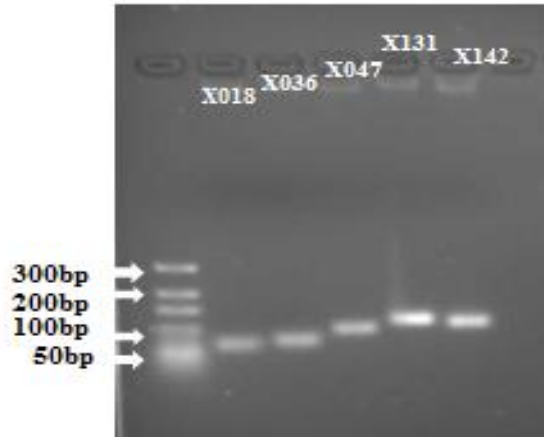


**Şekil 4.2** *GeneScan-120 Liz internal size standart* uzunlukları



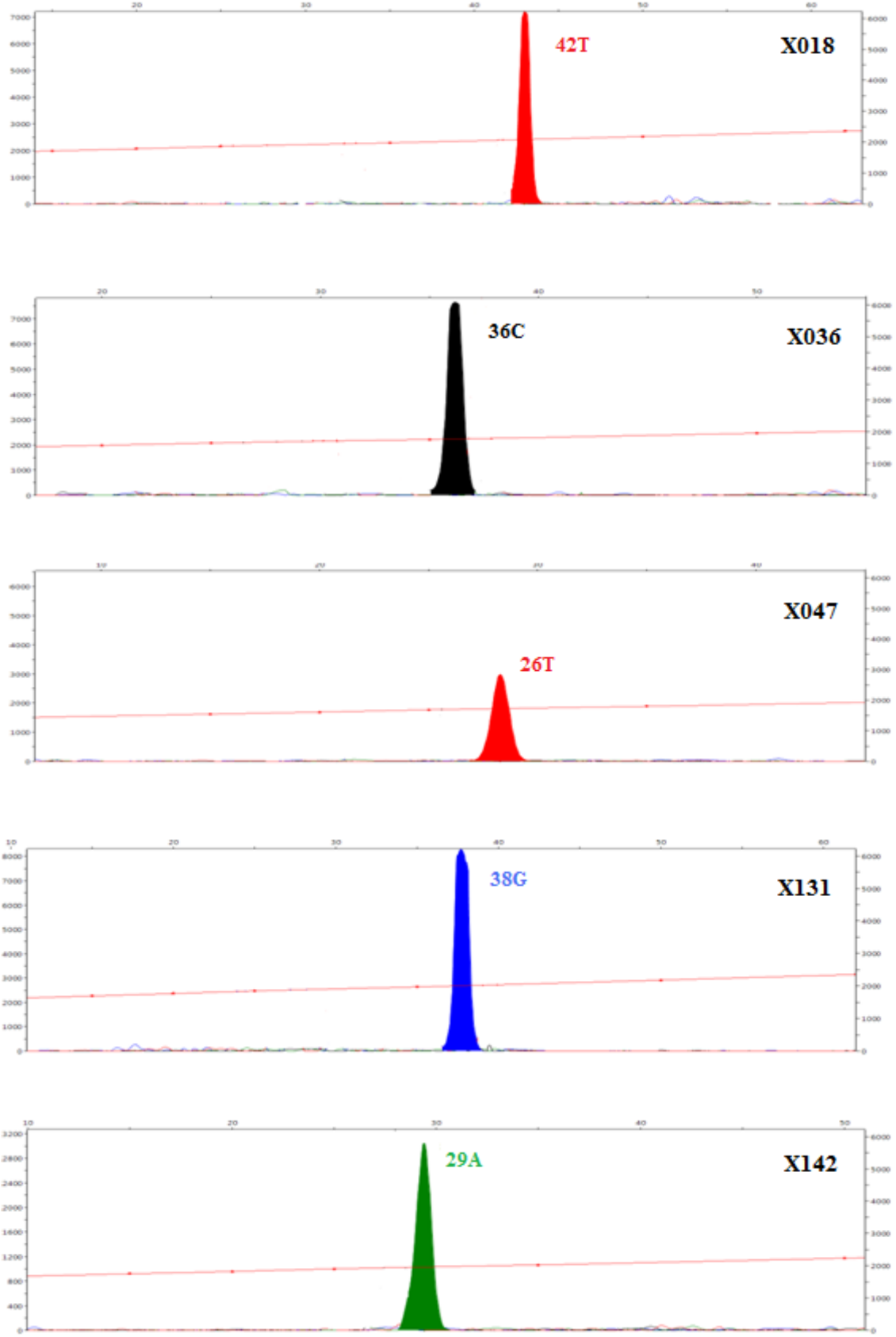
**Şekil 4.3** SNaPshot kit negatif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü

Örneklerin optimizasyonuna başlarken K562 kontrol örneği kullanıldı. Genetik analizör cihazında araştırılan noktaların boyutlarının saptanması amacıyla her bir SNP noktası için singlepleks PCR tasarlandı. 5 SNP bölgesi çoğaltıldı ve agaroz jelde yürütüldü. Belirteç yardımıyla çoğaltılması amaçlanan bölgenin bant profili kontrol edildi (Şekil 4.4).



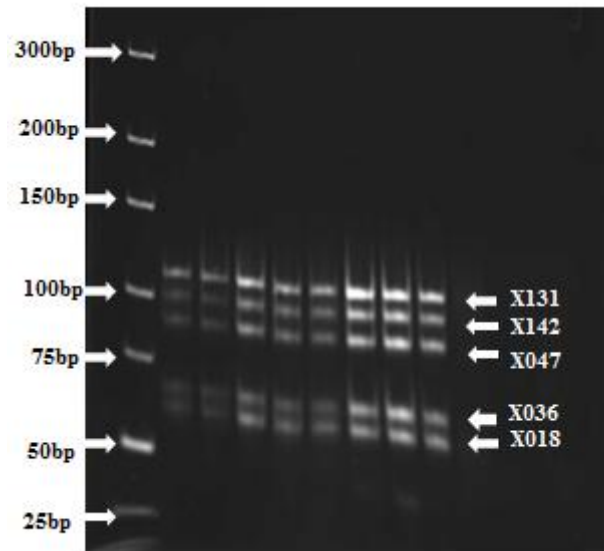
**Şekil 4.4** Singlepleks PCR sonrası ürünlerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Agaroz jel elektroforezinde bant parlaklığını sağlamak amacıyla primer konsantrasyonu arttırıldı. Fakat bu sekans sonuçlarını olumsuz etkiledi. Bunun üzerine 0,3  $\mu$ M olarak ayarlanan PCR primerlerinin konsantrasyonları yarıya indirilerek 0,15  $\mu$ M olarak ayarlandı. Primer konsantrasyonunun yarıya indirilmesiyle sekansta meydana gelen kirlilik yok edildi.



**Şekil 4.5** Sırasıyla X018-X036-X047-X131-X142 SNP noktalarının elektroforegram görüntüsü

K562 kontrol örneğinde incelenen SNP noktalarının elektroforegramdaki görüntüleri Şekil 4.5’de gösterilmiştir. Elektroforez sonrası incelenen bölgelerin boyutları saptandıktan sonra multipleks PCR’ın optimizasyonuna geçildi. Aynı reaksiyonda 5 bölgenin çoğaltılmasında sorunlar yaşanabildiğinden multipleks PCR sonrası sekans sonucu değerlendirildiğinde bazı SNP noktalarında beklenen pikler görülmedi. Bundan dolayı ilk PCR sonrası jel elektroforezi ile bant profili kontrol edildi. Çoğaltılan bölgelerin boyutları birbirine yakın olduğundan agaroz jel elektroforezi ile istenilen ayırım sağlanamadı. Bundan dolayı örnekler poliakrilamid jel elektroforezinde (PAGE) yürütüldü (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6** Multipleks PCR sonrası ürünlerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü

Multipleks olarak çoğaltılan kontrol örneğinin (1 ng/μl) optimizasyon basamakları aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

- Çalışmanın optimizasyonu sırasında örnekleri saflaştırmada sorun yaşandı. Sekans sonrası örneklerin elektroforegram görüntüsünde istenmeyen pikler gözlemlendi ve bu artefakt oluşumunu yok etmek için farklı yollar denendi.

- İlk olarak konvansiyonel PCR karışımına BSA ( sığır serum albümin ) eklenerek PCR inhibitörlerinin azaltılması amaçlandı.
- İlk PCR'da spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için PCR döngü sayısı 40 iken 33'e indirildi.
- İlk PCR basamağında *forward* ve *reverse* primerlerinin oranları 0,3  $\mu$ M iken ekstra oluşan pikleri engellemek için bu oran yarıya düşürüldü (0,15  $\mu$ M/10 $\mu$ l).
- **Primerleri sulandırırken ve PCR karışımı hazırlarken** UltraPure™ DEPC su kullanıldı.
- İlk saflaştırma basamağında 37°C'de 15 dk olarak önerilen inkübasyon süresi 90 dk'ya çıkarıldı.
- İstenmeyen piklerin temizlenmesi için gereç ve yöntemler kısmında belirtilen oranlarda minisekanslama primer karışımına amonyum sülfat eklendi.
- SNaPshot multipleks reaksiyon karışımı için kitte tavsiye edilen miktar 5  $\mu$ l iken tez çalışması için bu oran 2.5  $\mu$ l' ye indirildi. Her iki oran da denendi fakat sonuçlar değerlendirilirken aralarında fark görülmedi.
- Minisekanslama primerlerinin oranları eşit hacimde ( 1,5  $\mu$ M ) ayarlandığında cihazda yürütme sonrası bazı lokusların analiz eşiğinin altında kaldığı gözlemlendi. Buna bağlı olarak bu noktalardaki primer konsantrasyonları arttırıldı. X018, X036 ve X142 lokuslarının konsantrasyonu 2  $\mu$ M, X047 lokusu ise 2,5  $\mu$ M olarak ayarlandı. X131 SNP lokusunun primer konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik yapılmadı.
- İlk saflaştırma basamağında bazı örneklerde Ekzonükleaz ve SAP enziminin bir arada bulunduğu Exo-SAP kit (invitrogen) kullanıldı. 2,5  $\mu$ l ürüne 1,5  $\mu$ l Exo-SAP karışımı aynı inkübasyon süresinde bekletilerek analiz edildi. Diğer sonuçlarla karşılaştırıldığında saflaştırmada bir fark görülmedi.

- 3130 analizör cihazında SNP noktalarının son ürün uzunluklarını 3100 analizör cihazı ile karşılaştırma yapmak amacıyla 10 adet örnek 3130 genetik analizör cihazında yürütüldü. 3130 analizör cihazına minisekanslama reaksiyonu için gerekli parametreler girildikten sonra (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzers, 2009) yürütme yapılarak sonuçlar değerlendirildi. 3100 analizör cihazıyla yapılan sekans sonuçları karşılaştırıldığında tüm SNP noktalarında kaymalar gözlemlendi (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2** 3100 ve 3130 analizör cihazlarında yürütülen ürünlerin gözlenen ve beklenen boyutları arasındaki farklar

Beklenen son ürün uzunlukları	dROX-ddTTP		dTAMRA-ddCTP		dR6G-ddATP		dR110-ddGTP	
	3100	3130	3100	3130	3100	3130	3100	3130
16-25	8,5	13,1	3,3	7,2	4,8	9,8	-	-
32-48	2,5	6,1	3,4	7,0	-	-	1,1	4,6

#### 4.2 Validasyon çalışmaları

Bir çalışma için kullanılacak her türlü metodun önce laboratuvar koşullarında analiz yapan kişi tarafından valide edilmesi gerekmektedir. Validasyon çalışması uygulanan yöntemin güvenilirliğini göstermek amacıyla yapılır. Bu çalışmanın validasyon basamağında yöntemin duyarlılığı (sensitivity), analiz eşiği (limit of detection) ve tekrarlanabilirliği (repeatability) test edildi. Ayrıca karışım örnekleri çalışıldı.

#### 4.2.1. Analiz Eşiğinin Belirlenmesi

Analiz eşiği (limit of detection, LOD) minimum tespit sınırıdır. Örnekleri analiz etmek için kullanılan ABI 3100 genetik analizör cihazı için geçerli olan analiz eşiğini belirlemek amacıyla 10 adet negatif kontrol örneği yürütüldü. Yürütmeye birlikte gözlenen en yüksek RFU (Relative Fluorescent Unit) değerlerinin ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Bu değerler kullanılarak aşağıda verilen formüle göre analiz eşik değeri hesaplandı.

$$\text{Analiz Eşiği} = *EBPYO + (3 X **EBPYS)$$

$$= 103,7 + (3 X 50,12218)$$

$$= \mathbf{254,06}$$

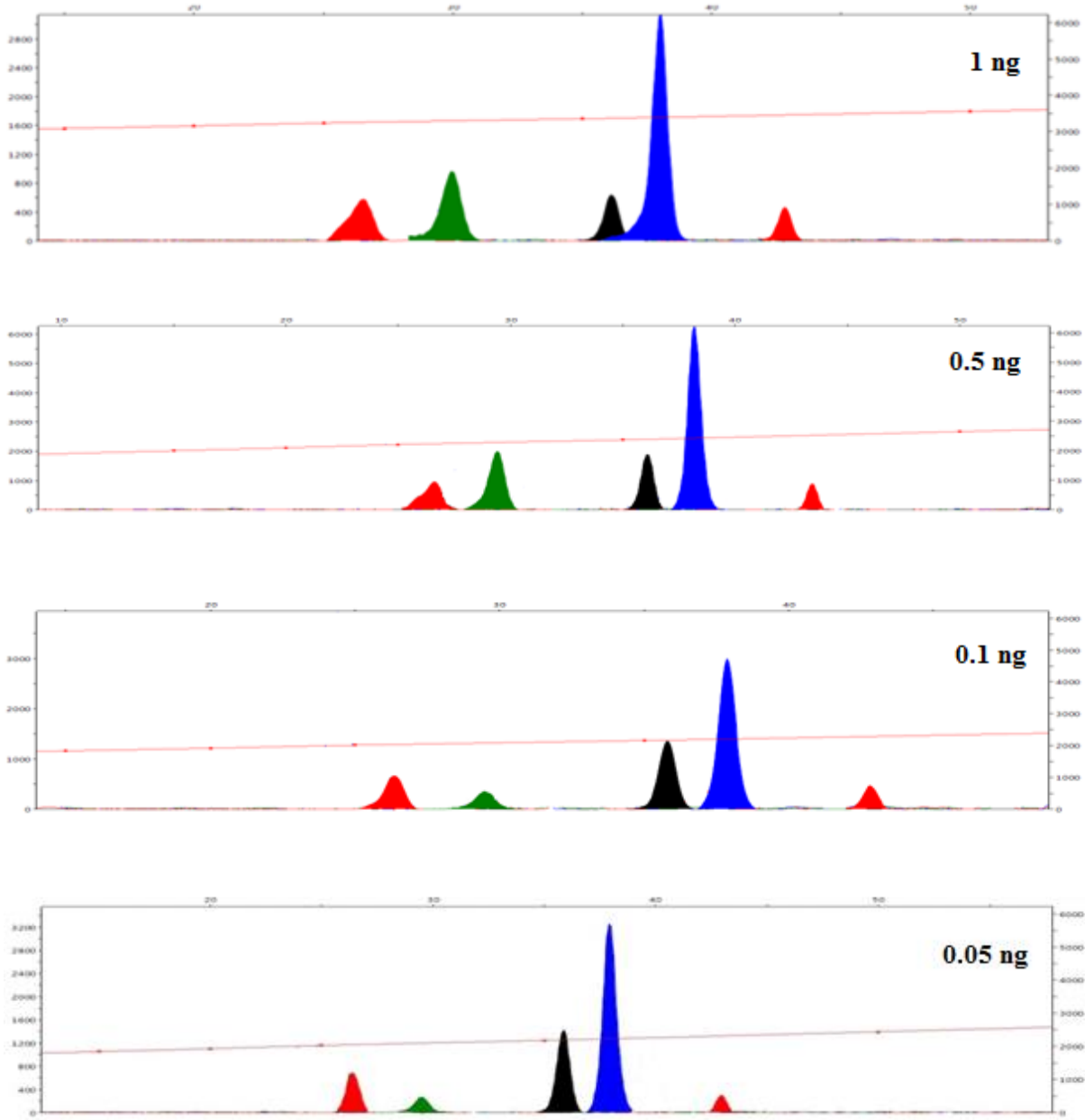
\*EBPYO: En büyük pik yükseklikleri ortalaması

\*\*EBPYS: En büyük pik yükseklikleri standart sapması

Analiz eşik değeri Microsoft Excel 2010 programı yardımıyla hesaplandı ve 254 RFU olarak belirlendi.

#### 4.2.2. Duyarlılık çalışması

Duyarlılık çalışması için K562 kontrol örneği (10 ng/μl), 1 ng, 0,5 ng, 0,1 ng, 0,05ng oranlarında sulandırılarak, PCR ile çoğaltıldı. DNA miktarının azalmasına rağmen sekans sonuçlarının değerlendirilmesi neticesinde 5 SNP lokusunda beklenen noktalarda pikler elde edildi. Fakat sulandırılma miktarlarına paralel olarak pik yüksekliklerinde düşmeler gözlemlendi (Şekil 4.7).



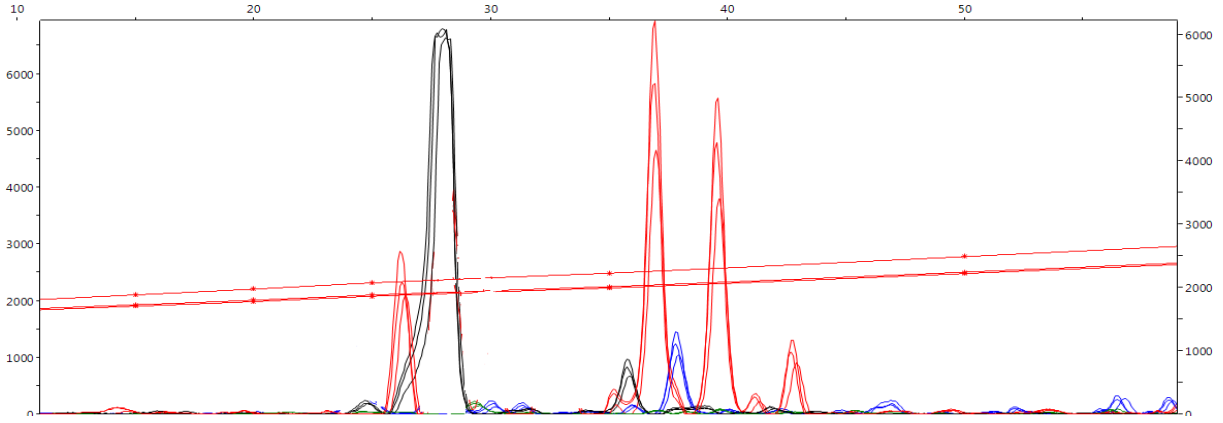
**Şekil 4.7** K562 kontrol örneğinin duyarlılık çalışması sonucunda elde edilen görüntüler (sırasıyla 1 ng, 0,5 ng, 0,1 ng, 0,05ng )

0,05 ng oranında sulandırılan örneğin en düşük pik yüksekliği 267 RFU olduğu görüldü. Bu değer analiz eşiğinin üstünde olması nedeniyle değerlendirmeye alındı. Bu çalışma neticesinde 0,05 ng'a kadar sulandırılan DNA örneklerinin analiz edilebileceği sonucu çıkarıldı.



### 4.2.3 Tekrarlanabilirlik çalışması

Tekrarlanabilirlik çalışmasında aynı örnek farklı zamanlarda 6 kere çalışıldı. Bu örneklerin elektroforegram görüntüleri üstüste çakıştırılarak şekil 4.8'deki görüntü elde edildi.



**Şekil 4.8** Analizi yapılan bir örneğin farklı zamanlarda 6 kere yürütülmesi sonucu görüntülerin çakıştırılması ile elde edilen elektroforegram görüntüsü

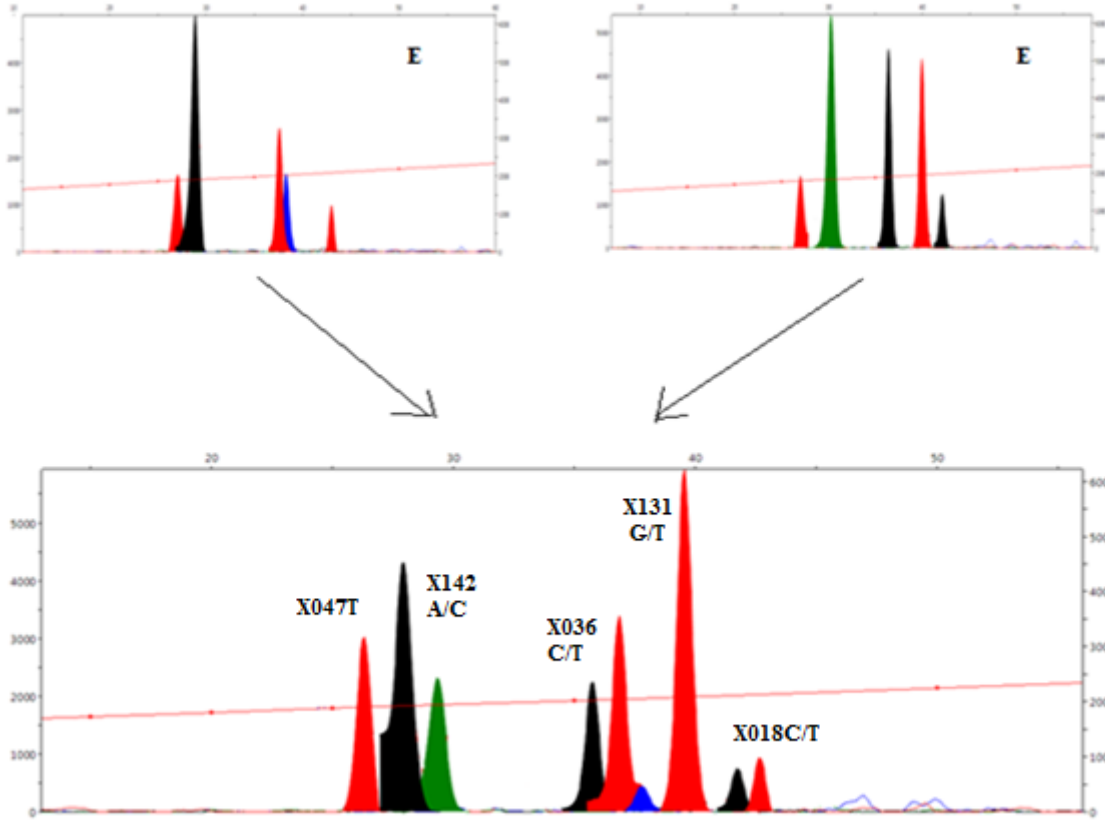
Sekans sonuçları değerlendirilerek 5 SNP lokusunun son ürün uzunlukları belirlendi. Microsoft excel 2010 programı yardımı ile bu noktaların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı (Tablo 4.3). Hesaplanan standart sapma değerleri 0,5'in altında sonuç verdiğiinden çalışmanın tekrarlanabilir olduğu görüldü. İstatistiksel analiz bölümünde bu hesaplamada kullanılan formül gösterilmiştir.

**Tablo 4.3** Tekrarlanabilirlik çalışmasına ait örneklerin son ürün uzunlukları ortalamaları ve standart sapmaları

İncelenen SNP noktaları		Örneklerin beklenen son ürün uzunlukları	Örneklerin son ürün uzunluğu ortalaması(n=100)	Örneklerin standart sapması(n=100)
<b>X018</b>	<b>A</b>	41	42,798	0,136638
<b>X036</b>	<b>A</b>	33	37,064	0,261209
<b>X047</b>	<b>A</b>	18	26,418	0,366906
<b>X131</b>	<b>T</b>	37	39,688	0,191494
<b>X142</b>	<b>G</b>	25	28,084	0,32807

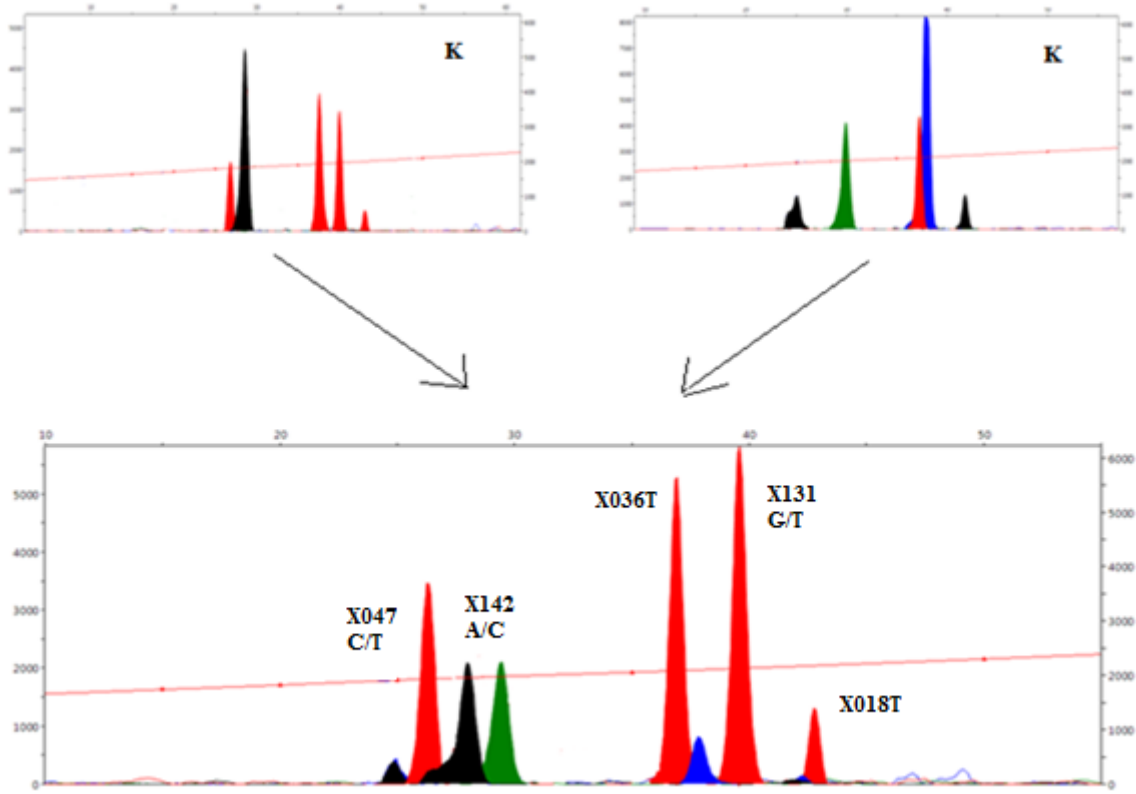
#### 4.2.4. Karışım örnek çalışması

Karışım örnekleri oluşturulurken bir kadın bir erkek DNA'sı, iki erkek DNA'sı ve iki kadın DNA'sı eşit oranlarda (1/1 oranında) karıştırıldı.



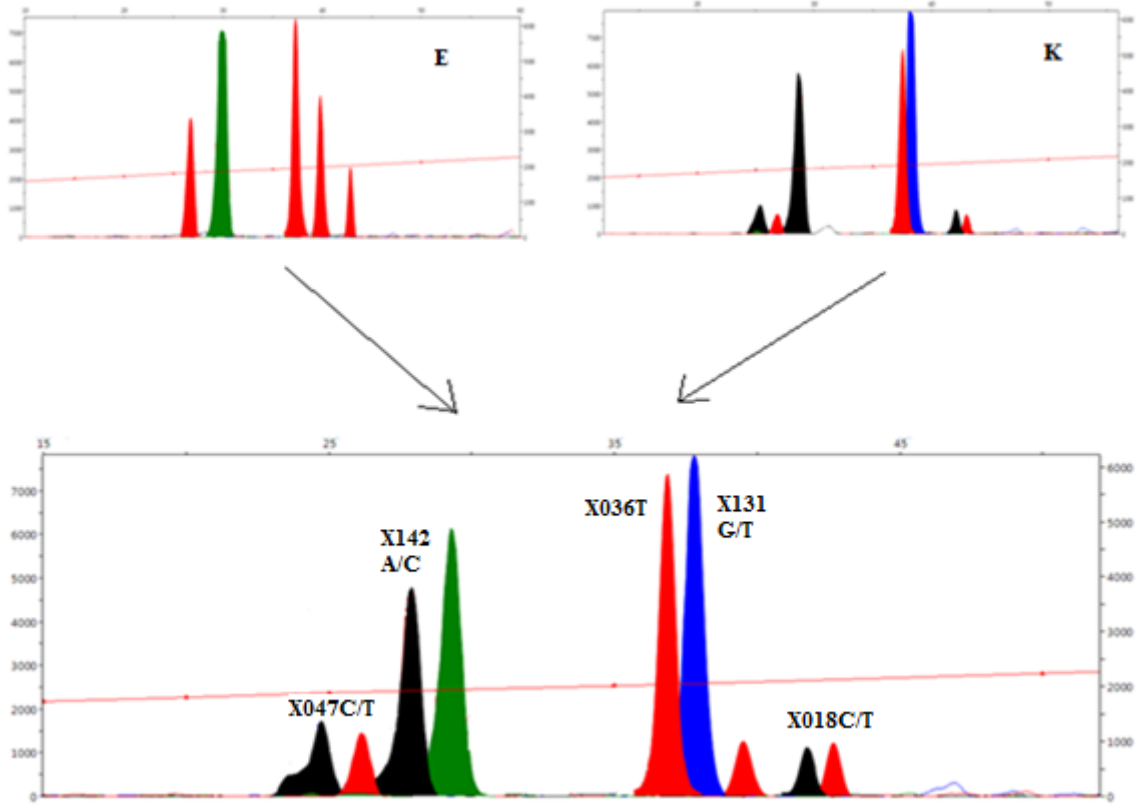
**Şekil 4.9** İki erkeğe ait DNA örneklerinin 1/1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen elektroforegram görüntüsü

Önceden sekansı yapılmış iki erkeğe ait elektroforegram görüntüsü ve bu DNA özütlерinin 1/1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen görüntü Şekil 4.9'da gösterildi. X131 kodlu SNP noktasında allel düşmesi (bu noktada beklenen G allelinin pik yüksekliğinin beklenenden düşük çıkması) gözlemlendi. Diğer allellerin karışımı oluşturan profili yansıttığı görüldü. X018, X036, X131 ve X142 noktalarında ayırım yapılabilirken, X047 noktasında iki kişide de aynı allel gözlemlendiğinden ayırım yapılması beklenmemektedir.



**Şekil 4.10** İki kadına ait DNA örneklerinin 1/1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen elektroforegram görüntüsü

Önceden sekansı yapılmış iki kadına ait elektroforegram görüntüsü ve bu DNA özütlерinin 1/1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen görüntü Şekil 4.10'da gösterildi. X131 kodlu SNP noktasında allel düşmesi yaşandı ve bu noktada beklenen G allelinin pik yüksekliğinin beklenenden düşük çıktığı gözlemlendi. X131, X047 ve X142 noktalarında iki farklı allel ile ayırım yapılabildi. X018 kodlu SNP noktasında beklenen C allelinin RFU değeri analiz eşik değerinin çok altında çıktı ve değerlendirmeye alınmadı. X036 noktasında ise aynı alleler gözlemlendiğinden bu lokus için ayırım yapılamadı.



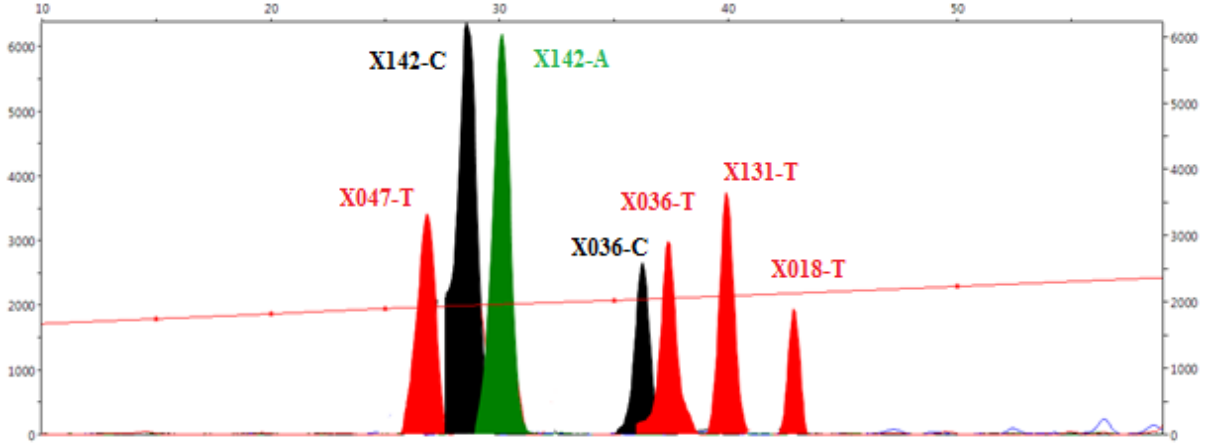
**Şekil 4.11** Bir erkek ve bir kadına ait DNA örneklerinin 1/1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen elektroforegram görüntüsü

Önceden sekansı yapılmış bir erkek ve bir kadına ait elektroforegram görüntüsü ve bu DNA özütlelerinin 1/1 oranında karıştırılmasıyla elde edilen görüntü Şekil 4.11’de gösterildi. Kadın ve erkek profilinde görülen tüm alleler karışım örneğinde de görüldü. Kadın profilini erkekten ayırmak için erkekte görülen X142 lokusundaki A alleli ile X131 lokusundaki T allelinin faydalı olabileceği gözlemlendi.

### 4.3 Analizi yapılan örneklerin değerlendirilmesi

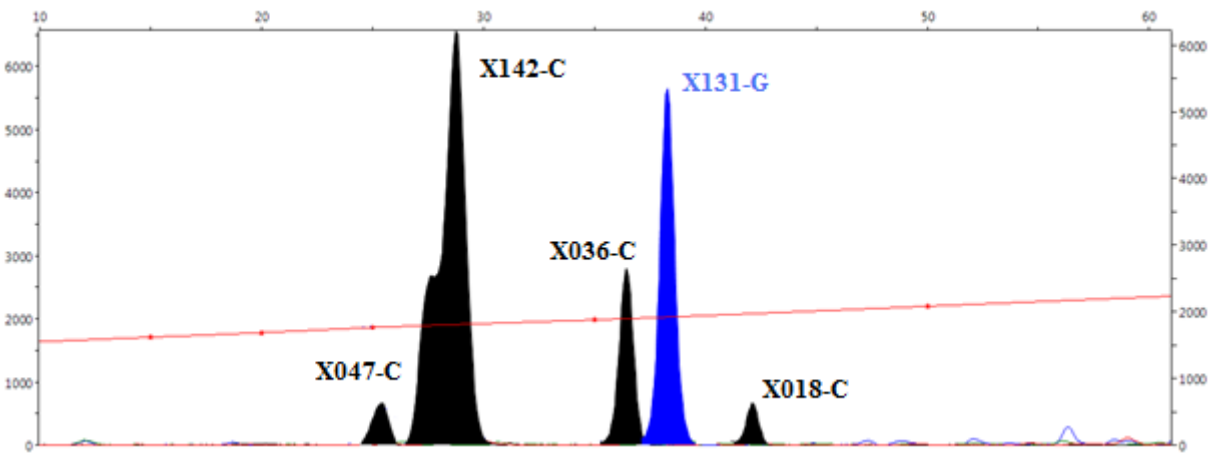
Bu tez çalışmasında X kromozomu üzerinde bulunan 5 SNP lokusu minisekanslama yöntemiyle araştırıldı. 100 kişinin (46 kadın,54 erkek) DNA’ları izole edildi ve SNaPshot yöntemi ile araştırılan lokuslar analiz edildi. Analiz sonuçları Tablo 4.5 ve Tablo 4.6 verildi.

Kadın ve erkeğe ait elektroforegram görüntüleri ise Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de örnek olarak gösterildi.



Şekil 4.12 Bir kadına ait elektroforegram görüntüsü

Şekil 4.12’de görülen kadın profilinde X142 ve X036 SNP noktalarında heterozigotluk görülürken diğer üç nokta homozigot olarak değerlendirildi. SNaPshot kitte florofor yayılım oranları yaklaşık olarak 4:2:1:1 dR110 (mavi): dR6G (yeşil): TAMRA (siyah): dROX (kırmızı) kabul edilir. Bu nedenle heterozigot olarak değerlendirebilmek için C ve T noktalarının pik yüksekliklerinin bire bir oranında olmasına dikkat edilmelidir.



Şekil 4.13 Bir erkek örneğe ait elektroforegram görüntüsü

SNP noktası, tek baz uzama primerinin F (forward) veya R (reverse) zincirinde bulunmasına göre isimlendirilir. Çalışılan 5 SNP lokusunun 4 tanesinin uzama primeri R zincirinden, bir tanesinin uzama primeri de F zincirinden seçildi. SNP'lerin adlandırılması F zincirine göre yapıldığı için, incelenecek bölgenin primeri R zincirine ait ise, bu bölgenin karşı zincirine denk gelen baz söylenir. Örneğin, uzama primeri R zincirinden seçilen X047 lokusunda görülen siyah ve kırmızı renkli pikler adlandırılırken C yerine karşı zincirinde olan G, T yerine de A kullanılır.

**Tablo 4.4** SNP noktalarının beklenen son ürün uzunlukları, son ürün uzunluğu ortalaması ve standart sapma değerleri

İncelenen SNP noktaları		Örneklerin beklenen son ürün uzunlukları	Örneklerin son ürün uzunluğu ortalaması(n=100)	Örneklerin standart sapması(n=100)
<b>X018</b>	<b>G</b>	41	41,95564	0,147288
	<b>A</b>		42,86107	0,136773
<b>X036</b>	<b>G</b>	33	36,1845	0,227137
	<b>A</b>		37,37596	0,198398
<b>X047</b>	<b>G</b>	18	25,20875	0,162195
	<b>A</b>		26,71525	0,262876
<b>X131</b>	<b>G</b>	37	38,03078	0,227866
	<b>T</b>		39,86583	0,163347
<b>X142</b>	<b>T</b>	25	29,93304	0,34446
	<b>G</b>		28,49457	0,264896

Analiz edilen örneklerin 5 SNP lokusunun son ürün uzunlukları belirlendi. Microsoft excel 2010 programı yardımı ile bu noktaların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı (Tablo 4.4).

Standart sapmaların 0,5'in altındaki sonuçların güvenilir olduğu ifade edilmiştir (Ölçen A.M, 2011). Bu çalışmada da standart sapma değerleri 0,5'in altında kaldığından sonuçların güvenilir olduğu tespit edildi.

**Tablo 4.5** Erkek bireylere ait SNP profilleri

Örnek no	İncelenen SNP noktaları				
	X018-R	X036-R	X047-R	X131-F	X142-R
1	G	A	G	G	G
2	A	G	A	G	G
3	G	G	G	G	G
4	A	A	A	G	G
5	A	G	A	G	T
6	G	G	A	G	T
7	A	A	A	G	T
8	G	G	G	G	G
9	A	A	A	G	G
10	A	G	A	G	G
11	A	A	A	T	G
12	G	A	G	G	T
13	A	A	A	T	T
14	A	A	A	G	T
15	G	G	G	G	T
16	A	G	A	G	T
17	G	A	G	G	G
18	G	A	A	G	G
19	A	G	A	G	G
20	A	A	A	T	G
21	G	A	G	T	G
22	G	A	G	G	T
23	G	G	G	T	G
24	G	G	G	T	G
25	G	G	G	G	T



26	G	A	G	G	G
27	A	A	A	T	G
28	A	A	A	T	G
29	A	A	A	T	G
30	A	A	A	G	G
31	A	G	A	T	G
32	G	A	G	G	G
33	A	A	A	G	G
34	A	A	A	G	T
35	A	G	A	G	T
36	A	G	A	G	G
37	G	G	A	T	T
38	G	G	G	G	G
39	A	A	A	T	G
40	A	A	A	G	T
41	G	G	G	G	T
42	G	G	G	G	G
43	A	G	A	G	G
44	A	G	A	G	T
45	G	G	A	G	T
46	-	G	G	G	G
47	A	G	A	G	G
48	A	G	A	G	T
49	A	G	A	G	G
50	A	G	A	G	T
51	A	A	A	T	T
52	A	G	A	G	T
53	A	A	G	G	T
54	A	G	A	T	G

**Tablo 4.6** Kadın bireylere ait SNP profilleri

Örnek no	İncelenen SNP noktaları				
	X018-R	X036-R	X047-R	X131-F	X142-R
1	AA	AA	AA	GG	TT
2	AG	AA	AG	GG	GT
3	AG	GG	AA	GG	GT
4	AG	GG	AA	GG	TT
5	AG	GG	AA	GG	GG
6	AA	GG	AA	GG	GG
7	GG	AA	GG	GG	TT
8	AG	AA	AG	TT	TT

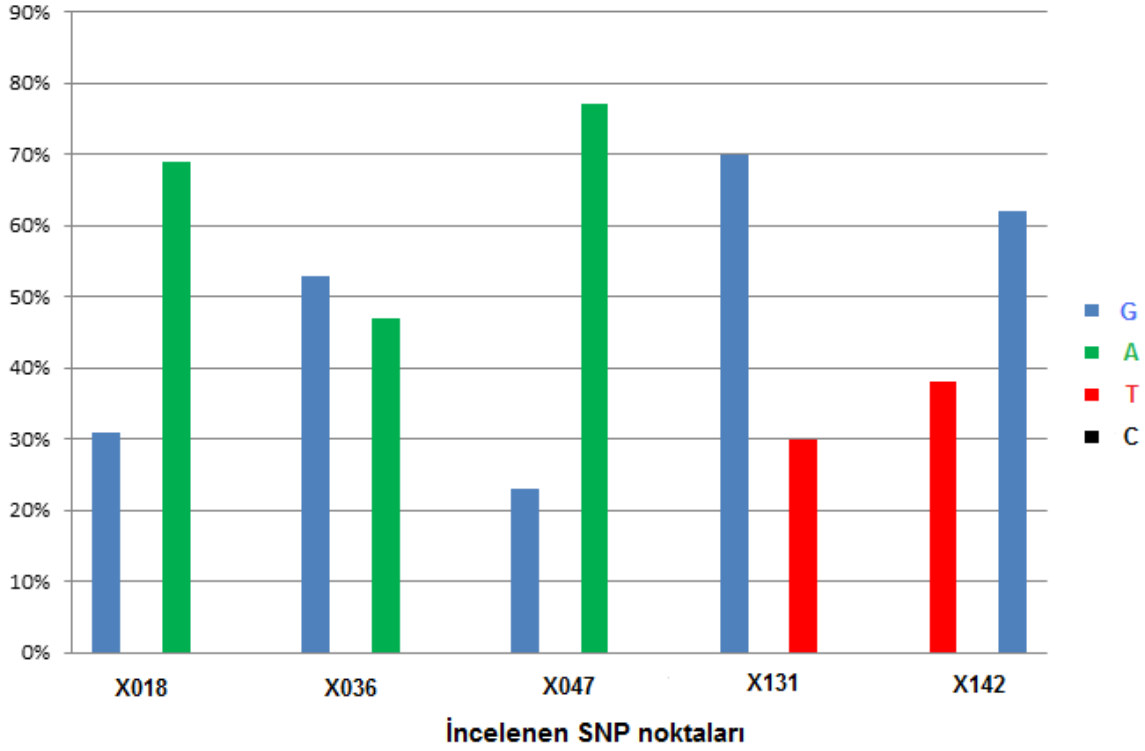
9	AA	AA	AA	GT	GT
10	AA	AG	AA	GG	GG
11	AG	AG	AG	GG	GT
12	AA	AG	AA	TT	GT
13	AA	GG	AA	GT	GT
14	AG	GG	AA	GG	GG
15	AA	AG	AA	GT	GT
16	AA	GG	AA	GT	GG
17	AG	GG	AA	GG	GG
18	AA	AA	AA	TT	GT
19	AA	AG	AA	TT	GT
20	GG	AA	GG	GG	GG
21	AA	GG	AA	GT	GT
22	AA	AA	AA	TT	GG
23	AG	AG	AA	GT	GG
24	AG	AG	AA	GT	GG
25	AG	AA	AA	GT	GT
26	AG	GG	AA	GG	TT
27	AG	AA	AG	GG	GG
28	AG	AG	AA	TT	GG
29	AG	GG	AA	GG	GG
30	AA	AG	AA	GG	GG
31	AA	AA	AA	GG	GG
32	AA	AA	AA	TT	GG
33	AG	AA	GG	GG	TT
34	AA	AA	AA	TT	GG
35	AA	GG	AA	TT	GG
36	-	GG	AA	GT	GG
37	AG	GG	AA	GT	GT
38	AA	AG	AA	GT	GG
39	AA	AA	AA	GT	TT
40	-	GG	AA	GG	GG
41	AA	AG	AA	GT	TT
42	AA	AG	AA	GG	GG
43	AA	GG	AA	GG	GT
44	AA	GG	AA	GG	GT
45	AA	GG	AA	GG	GT
46	AA	GG	AA	GG	GT

#### 4.4 İSTATİSTİKSEL BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen kadın ve erkeklerde 5 X-SNP lokusunun görülme sıklıkları hesaplandı. Allel frekansı, frekansı hesaplanacak allel sayısı toplam allel sayısına bölünerek elde edildi. SNP Analyzer 2.0 programı kullanılarak hesaplanan allel frekansı verileri Tablo 4.7’de verildi. Toplam allel frekansı verilerinin grafik üzerinde görünümü de Şekil 4.14’de gösterildi.

**Tablo 4.7** 5 SNP lokusunun allel frekansı oranları

İncelenen SNP noktaları		Erkek (n=54)	Kadın (n=46)	Toplam (n=100)
<b>X018</b>	<b>G</b>	0,377	0,238	0,314
	<b>A</b>	0,623	0,761	0,686
<b>X036</b>	<b>G</b>	0,518	0,543	0,530
	<b>A</b>	0,482	0,456	0,470
<b>X047</b>	<b>G</b>	0,333	0,109	0,230
	<b>A</b>	0,666	0,892	0,770
<b>X131</b>	<b>G</b>	0,741	0,663	0,705
	<b>T</b>	0,259	0,337	0,295
<b>X142</b>	<b>T</b>	0,407	0,348	0,380
	<b>G</b>	0,593	0,652	0,620



Şekil 4.14 5 SNP lokusunun allel frekansı oranlarının grafik üzerinde görünümü

Şekil 4.14’de görülen grafikte dikey doğru allel frekanslarının % oranlarını, yatay doğru ise incelenen SNP noktalarını göstermektedir.

Genetik yapı nedeniyle oluşan populasyon farklılıklarını ölçmek için Fst (fixation index) değeri kullanılmaktadır. Arlequin 3.5 programı yardımıyla Fst değeri hesaplanmıştır (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8** Sırasıyla X018, X036, X047, X131, X142 lokuslarının Fst değerleri

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp>)

<b>X018</b>	Türkiye	Afrika	Avrupa	Japonya	Çin
Türkiye	0,00000	-	-	-	-
Afrika	-0,00915	0,00000	-	-	-
Avrupa	0,01339	0,01705	0,00000	-	-
Japonya	0,20927	0,20268	0,32995	0,00000	-
Çin	0,09718	0,09257	0,20129	0,01598	0,00000

<b>X036</b>	Türkiye	Afrika	Avrupa	Japonya	Çin
Türkiye	0,00000	-	-	-	-
Afrika	0,04530	0,00000	-	-	-
Avrupa	-0,00148	0,09074	0,00000	-	-
Japonya	0,09720	0,00070	0,15339	0,00000	-
Çin	0,12494	0,01196	0,18437	-0,00929	0,00000

<b>X047</b>	Türkiye	Afrika	Avrupa	Japonya	Çin
Türkiye	0,00000	-	-	-	-
Afrika	0,09948	0,00000	-	-	-
Avrupa	0,09948	-0,00328	0,00000	-	-
Japonya	-0,00369	-0,00328	0,10373	0,00000	-
çin	-0,00369	0,04954	0,02107	0,02029	0,00000

<b>X131</b>	Türkiye	Afrika	Avrupa	Japonya	Çin
Türkiye	0,00000	-	-	-	-
Afrika	0,37476	0,00000	-	-	-
Avrupa	0,02796	0,21983	0,00000	-	-
Japonya	0,22513	0,02558	0,09225	0,00000	-
Çin	0,19176	0,04391	0,06772	-0,00932	0,00000

<b>X142</b>	Türkiye	Afrika
Türkiye	0,00000	-
Afrika	0,01974	0,00000

Diğer populasyonlarla karşılaştırılarak hesaplanan  $F_{st}$  değerleri aşağıda verilen özelliklere göre değerlendirildi;

- 0 – 0,05 arasında bir değer taşırsa= küçük bir genetik farklılaşma

-0,05 – 0,15 arasında bir değerse =orta düzeyde farklılaşma

-0,15 – 0,25 arasında bir değerse = büyük bir genetik farklılaşma

-0,25'ten büyük değerse = çok büyük bir genetik farklılaşmanın olduğunu göstermektedir.

Hesaplamalar sonucunda, çalışılan SNP noktaları için Türkiye populasyonları ile diğer populasyonlar (Afrika, Avrupa, Çin ve Japonya) karşılaştırılmıştır. X018 lokusuna bakıldığında, Japonya populasyonu ( $F_{st}=0,20927$ ) ile Türkiye populasyonu arasında büyük bir genetik farklılaşma vardır. X036 lokusu açısından bakıldığında, Türkiye ile Çin populasyonu ( $F_{st}=0,12494$ ) arasında orta düzeyde bir farklılaşma gözlenmektedir. X047 lokusunda ise, Türkiye ile Afrika ve Avrupa populasyonları ( $F_{st}=0,09948$ ) arasında orta düzeyde farklılaşma görülmektedir. X131 lokusuna bakıldığında, Türkiye ile diğer populasyonlar arasında büyük genetik farklılıklar ( $F_{st}=0,19176-0,37476$ ) gözlenirken, Avrupa populasyonu ile orta düzeyde fark gözlenmiştir. X142 lokusunda ise Afrika ile küçük bir genetik farklılaşma görülmüştür. X142 lokusu açısından veritabanında yeterli veri olmadığında diğer populasyonlarla karşılaştırılmamıştır.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada çeşitli populasyonlarda önemli farklılıklar gösteren X kromozomu üzerindeki 5 SNP lokusunun (X018, X036, X047, X131, X142) Türk toplumundaki allel frekansı dağılımı tespit edildi ve SNaPshot minisekanslama tekniğinin optimizasyonu ve validasyonu sağlanarak analiz sonuçları diğer populasyonlarla karşılaştırılmıştır.

X kromozomu belirteçlerinin, ebeveynlerin bulunamadığı nesep tayini olgularının çözümünde büyük yarar sağladıkları belirtilmektedir. Özellikle baba-kız gibi ikili akrabalık ilişkilerinin analizinde sıklıkla kullanılmış ve baba adaylarını dışlama oranı yüksek bulunmuştur (Li L. ve ark, 2010). Ayrıca iki kız kardeşin kardeşliğinin ispatlanması ya da kuzenler arasındaki akrabalık ilişkisinin ispatlanması gibi özel durumlarda da son derece işlevseldir. Bu gibi avantajlarının görülmesinin ardından X-STR'lar üzerine birçok çalışma yapılmış ve diğer genetik belirteçleri (otozomal STR, Y-STR ve mitokondrial DNA) tamamlayıcı özelliğinin olduğu görülmüştür (Liu Q.L. ve ark, 2008). Yalnız STR belirteçleri birey tanımlamada kesin sonuç verse de, DNA miktarının yetersiz olduğu durumlarda ve degradasyon (DNA'nın küçük parçalara ayrılması, bozulma) varlığında STR ile yapılan analizler başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Bu gibi durumlarda analizine başvuru SNP 'ler degrade DNA örneklerin analiz edilebilmesi gibi avantajlarının yanında düşük mutasyon oranına sahip olması, genomda çok sayıda bulunması nedeniyle adli araştırmalarda tercih sebebidir (Tomas C. ve ark, 2008). Diğer özel bir durum da parafine gömülü arşiv dokular ve yanmış kemikler gibi bozulmuş örneklerde X-SNP tiplendirme, mini-STR analizine ek olarak kullanılabilecek güçlü bir araçtır (Li L. ve ark, 2010).

Son dönemde birçok araştırmacı adli araştırmalar için SNP'leri tercih etmeye başlamıştır ve farklı kombinasyonlarla SNP setleri oluşturulmuştur. Bu SNP setlerine ulaşmak

ve populasyonların allel sıklıklarının görebilmek için Kidd K.K. tarafından bir veritabanı (<http://alfred.med.yale.edu>.) oluşturulmuştur (Kidd K.K., 2012). Bu çalışmada daha önce yapılmış X-SNP çalışmaları incelenmiş ve Türk toplumundan örneklerin bulunduğu çalışma referans alınarak en uygun X-SNP lokusları seçilmiştir.

Petkovski E. ve arkadaşları Fransız toplumuyla yaptıkları çalışmada MALDI-TOF MS yöntemiyle 36 otozomal SNP ve 5 X-SNP lokusunu analiz etmişler ve 5 X-SNP lokusunu incelediklerinde 28 kadında 23 farklı profil elde ederlerken, erkekler X kromozomu bakımından hemizigot olduklarından dolayı 120 erkekten 29 farklı profil belirlemişlerdir. X kromozomuyla ilgili çok sayıda veri olmasına rağmen X kromozomal belirteçler arasındaki linkaj dengesizliğinin miktarını belirlemek için daha ileri araştırmaların gerektiğini bildirmişlerdir (Petkovski E. ve ark, 2005). Katoh ve ark. X kromozomu üzerinde 6 SNP lokusunu Moğolistan'da yaşayan Türk kökenli, az sayıda bireyden orjinlenen Khoton populasyonunda çalışmışlardır. Moğolistanda bulunan diğer populasyonlar için daha önce yapılan mtDNA ve Y kromozomundaki çalışmalar düşük genetik çeşitlilik göstermesine rağmen X kromozomuyla karşılaştırma yapıldığında yüksek oranda genetik çeşitlilik görülmüştür (Katoh T. ve ark, 2005). Lee H.Y. ve ark. Kore populasyonundan seçtikleri 30 kişinin 24 SNP lokusunu (22 otozomal, X ve Y kromozomlarını) SNaPshot yöntemini kullanarak belirlemişler. X'e bağlı SNP lokuslarında kimliklendirme olasılığı (P<sub>1</sub>) kadınlarda %37 iken erkeklerde %50 bulunmuştur. (Lee H.Y. ve ark, 2005). Zarrabeitia M. T. ve ark 2007'de X-bağlantılı STR ve SNP analizleriyle Kuzey İspanyada yer alan iki populasyon arasındaki farkları mikrocoğrafik seviyede belirlemişler. X kromozomu üzerinde bulunan 6 STR ve 10 SNP lokusu seçilmiş. İki populasyon karşılaştırıldığında STR lokuslarında farklılıklar görülürken, Taqman yöntemiyle yapılan SNP analizlerinde 10 SNP' den yalnız birinin ayırt etme gücü yüksek bulunmuştur. SNP'lerin ayırım gücü STR'lardan daha düşük



bulunsa da SNP ve STR sistemleri birarada çalışıldığında kadın örneklerde ayırt etme gücünün % 99,8'den daha fazla olduğu görülmüştür (Zarrabeitia M.T. ve ark, 2007). Li Li ve ark 2010'da yaptıkları çalışmada Çin popülasyonunda X'e bağlı 14 SNP lokusunu Taqman yöntemi ile belirlemişler. Bu çalışma sonucunda kadın ve erkeklerde lokusların dışlama gücü ( $P_D$ ) %99'un üzerinde bulunmuştur (Li L. ve ark, 2010). Aynı araştırmacıların 2011'de yaptıkları çalışmada ise X bağlantılı 67 SNP lokusu MALDI-TOF MS yöntemiyle belirlenmiştir. Bu 67 SNP lokusundan 56'sı adli kimliklendirme için anlamlı bulunmuştur (Li L. ve ark, 2011). Harayama Y. ve arkadaşlarının aynı yıl yaptıkları çalışmada ise degrade DNA örneklerinde 4 X-SNP lokusunu iki ayrı yöntemle (Taqman ile SNaPshot yöntemleri) analiz ederek karşılaştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda DNA miktarı çok az olan örneklerde (amplikon boyutu 70 baz çiftinden daha kısa) Taqman ile SNaPshot yöntemlerinin eşit doğrulukta sonuç verdiği görülmüştür (Harayama Y. ve ark, 2011). Oki T. ve arkadaşları X kromozomu üzerinde bulunan 16 SNP lokusunu belirlemişlerdir. 400 kişiden oluşan Japon popülasyonunda bu lokusların genotiplendirmesi yapılmış ve Japon popülasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca çalışmalarında degrade DNA örneklerinin analizi için SNaPshot'ın kullanışlı bir yöntem olduğunu ileri sürmüşlerdir (Oki T. ve ark, 2012).

Tomas C. ve arkadaşları 2008'de 13 farklı popülasyona ait 1078 erkek birey ile çalışmışlardır. 57 Türk'ün yer aldığı 11 farklı Akdeniz popülasyonu ayrıca Somali (91) ve Danimarka (93) popülasyonlarında X kromozomunun farklı bölgelerinde yer alan önemli 25 SNP lokusu belirlemişlerdir. En uzun PCR ürünü 120 bp, uzama primerlerinin boyutları da 18-85 nükleotid arasında seçilmiştir. Bu SNP'ler SNaPshot yöntemi ile analiz edilmiştir. 13 popülasyona ait 1078 erkek bireyde bu SNP'ler için allel frekansı incelendiğinde en düşük allel frekansı 0,103 olarak bulunmuştur. 11 Akdeniz popülasyonunda aynı lokusların

genotiplendirmesi sonucunda Fas dışında tüm populasyonların kendi arasında homojenite gösterdiğini bulmuşlardır (Tomas C. ve ark, 2008). Aynı grup 2011' de yaptıkları çalışmada aynı SNP lokusları ile 122 Asyalı ve 88 Afrikalı populasyonda çalışılmış ve daha önce yayınlanan sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Çalışılan bu populasyonlarda da tüm belirteçlerin allel frekansları 0,048 ile 0,500 arasında hesaplanmıştır. Tayvan populasyonunda bazı SNP'ler arasında bağlantı dengesizlikleri görülmüş bunun nedeni olarak da bu populasyonun demografik tarihi veya az sayıda kişinin genotiplendirmesi gösterilmiştir. Afrika populasyonu ile diğer populasyonlar arasında önemli farklar bulunmuştur. Asya kıtasında bulunan Tayvan ve Çin populasyonları arasında önemli sayılabilecek fark görülmezken, Bangladeş populasyonu ile diğer iki populasyon arasında anlamlı bir fark görülmüştür. Afrika ve Asya kıtalarındaki genetik farklılıkları daha iyi anlamak için farklı coğrafik bölgeler çalışılarak bu verilerin karşılaştırılması önerilmiştir (Tomas C. ve ark, 2011). Tomas C. ve arkadaşları (2011) Portekiz populasyonunda X'e bağlı 25 SNP ile çalışılmış ve allel frekansları 0,014 ile 0,500 arasında bulunmuş, sonuçlar diğer Akdeniz populasyonlarıyla karşılaştırılmış ve Kuzey Portekiz ile Türkiye arasında önemli farklar tespit edilmiştir. Türkiye toplumu için gen çeşitliliğinin 0,449 değerinde olduğu gösterilmiştir (Tomas C. ve ark, 2011).

Bu çalışmada Avrupa, Afrika ve Asya kıtalarındaki toplam 19 populasyonda önemli farklılıklar gösteren 5 SNP lokusu (X018, X036, X047, X131, X142) SNaPshot minisekanslama tekniği kullanılarak çalışılmıştır. Çalışmada 54 erkek 46 kadın toplam 100 bireyin genotipleri belirlenmiştir. Türk toplumundaki allel frekansları saptanmış ve çalışma sonucunda araştırılan 5 X-SNP lokusunun Türkiye populasyonunda da polimorfik olduğu tespit edilmiştir ve en düşük allel frekansı 0,230 olarak bulunmuştur. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp> adresinde araştırmaya dahil edilen tüm SNP lokusları incelenmiş. Avrupa, Asya ve Afrika toplumundaki populasyonların verileriyle bu çalışmada elde edilen sonuçlar Fst değeri kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Türkiye popülasyonunda X018 lokusu incelendiğinde, A alleli %69, G alleli ise %31 oranında bulunmuştur ve Fst değeri diğer popülasyonlarla karşılaştırıldığında Türk popülasyonu ile Afrika popülasyonu benzerken, Avrupa popülasyonu arasında küçük, Çin popülasyonu arasında orta, Japonya popülasyonu arasında büyük bir genetik farklılaşma gözlenmiştir. X036 lokusunda, A alleli (%47) ve G alleli (%53) birbirine yakın oranlarda saptanmıştır. Popülasyonlar arası karşılaştırma yapıldığında verilerin Avrupa popülasyonu ile daha uyumlu olduğu görülmüştür. Afrika popülasyonu ile Türkiye arasında küçük bir fark varken, Japonya ve Çin gibi Asya ülkelerinde orta düzeyde genetik farklılaşma görülmüştür. X047 lokusu incelendiğinde; A alleli %77, G alleli %23 oranında bulunmuştur. Japonya ve Çin popülasyonları karşılaştırıldığında Türkiye ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Avrupa ve Afrika popülasyonları ile karşılaştırıldığında ise orta düzeyde bir farklılaşma görülmektedir. X131 lokusunda G alleli %70, T alleli %30 oranında bulunmuştur. Avrupa popülasyonu ile orta düzeyde bir farklılaşma varken, diğer popülasyonlarda büyük bir genetik farklılaşma görülmüştür. X131 lokusuyla elde edilen verilerin Türk toplumu için özgün bir bulgu olabileceği düşünülmüştür. X142 alleli incelendiğinde ise G alleli %62, T alleli %38 oranında olduğu saptanmıştır. Afrika popülasyonu ile Türk toplumu arasında küçük bir genetik farklılaşma görülmüştür. Ancak veritabanında bu lokus ile ilgili bilgilere bakıldığında diğer popülasyonlarla ilgili veriye rastlanmadığından karşılaştırma yapılamamıştır.

SNP tespit teknolojileri, yoğun iş gücü, özen ve çaba gerektiren birbirine paralel birçok adımı olan, otomatize süreçlerden oluşmaktadır. Tüm araştırmacıların ihtiyaçlarını karşılayan tek bir protokol bulunmamaktadır. Hangi yöntemin adli açıdan daha uygun olduğunu belirleyebilmek için hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve çoklu analiz imkanı gibi farklı bakış açıları dikkate alınmalıdır. Ayrıca teknolojinin esnekliği, zaman tüketimi ve maliyet de (hem gerekli ekipmanların hem de genotip başına fiyat) üstünde durulması gereken diğer parametrelerdir (Sobrina B. ve ark, 2005).

Tüm bu parametreler arasında adli genetik için en önemli kısıtlayıcı adım her bir genotip için gerekli olan DNA miktarıdır. Çünkü kriminal araştırmalarda analiz edilecek DNA, az miktarda bulunmaktadır. SNPlex, Illumina ve Invader assay gibi yöntemleri uygulamadan önce PCR ile amplifikasyona ihtiyaç duyulmamakta ve genomik DNA'dan doğrudan SNP tespit sağlanmaktadır. Fakat bu tekniklerin analizi için de DNA miktarının fazla olması gerekmektedir (Kwok P. ve ark, 2003, Sobrina B. ve ark, 2005).

Adli genetikteki diğer bir önemli konu ise karışım halinde bulunan örneklerin ayırt edilebilmesidir. SNP'lerin büyük çoğunluğunun bialelik doğası nedeniyle, örnekleri ayırt etmek oldukça güçtür. Bu nedenle, örnekteki her bir alelin miktarının belirlenmesiyle, karışım örneğinin profili çıkarılabilir. Kütle spektrometrisi ve pirosekanslama gibi bazı teknikler miktarın belirlenmesine imkan tanımaktadır ve adli genetik açısından avantajlıdır. Fakat bu yöntemlerin de otomasyonu zordur. LightCycler, TaqMan ve Moleküler İşaretçiler gibi FRET kullanarak gerçekleşen homojen hibridizasyona bağlı teknolojilerde, PCR ve alelik ayırım reaksiyonu aynı reaksiyonda gerçekleştirilir. Temel dezavantajı ise aynı anda birçok SNP tespitinin zor olmasıdır. Sonuç olarak, bu teknolojiler aday SNP'lerin validasyonu için ve kriminal veri tabanı oluşturulması açısından iyi bir seçenektir, ancak adli vakalarda rutin çalışmalar için uygun değildir (Kwok P. ve ark, 2003, Sobrina B. ve ark, 2005).

Günümüzde mikrodizin, MALDI-TOF MS ve SNaPshot gibi minisekanslama teknolojilerinin adli amaçlı kullanımı yaygındır. Ancak, mikrodizin ve MALDI-TOF MS yöntemlerinin temel dezavantajı, spesifik ekipman gerekliliğidir. Bunun da ötesinde, MALDI-TOF' un multipleks yeteneği diğer minisekanslama tekniklerinden daha düşüktür. Mikroarray ile tespit etmedeki temel sorun ise tekrarlanabilirlik ve validasyonun çok zor olmasıdır. Bu teknolojilerin hepsi gelişme aşamasındadır ve adli amaçlı kullanılabilirliğinin test edilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Adli laboratuvarlarda kullanılacak en popüler metot ise SNaPshot yöntemidir. Çünkü analiz işlemi STR analizleri için de kullanılmakta olan

otomatik kapiller elektroforez cihazında gerçekleştirilir. Çok az miktarda DNA örneği ile sonuç vermesi ve aynı reaksiyonda çok sayıda polimorfizm analiz edilebildiğinden adli ihtiyaçlar için çok uygun bir yöntemdir, ancak her bir SNP primer setinin (uzama primeri ve PCR primerleri) dizaynı ve primer konsantrasyonlarının optimizasyonunun yapılması gereklidir. Bu dezavantajına rağmen analiz hızlı, güvenilir ve ucuz olduğundan tez çalışması için SNaPshot yöntemi tercih edilmiştir. SNP genotiplendirme teknolojileri son birkaç yıl içinde hızla gelişme göstermiştir (Kwok P. ve ark, 2003, Sobrina B. ve ark, 2005).

Çoklu kapiler sekans cihazı ile yüksek verimlilikte performans göstererek polimorfizmlerin tiplendirmesini sağlayan SNaPshot multipleks kitin (Applied Biosystems) içerisinde pozitif kontrol, negatif kontrol ve SNaPshot reaksiyon karışımı bulunmaktadır. Optimizasyon çalışmasına ilk olarak SNaPshot multipleks kit içerisinde yer alan pozitif kontrol örneği ile başlanmıştır. Pozitif kontrol örneğinin yürütülmesi neticesinde sonuçlar kitte belirtilen sekans görüntüleriyle karşılaştırılmıştır ve beklenen son ürün uzunluklarında kayma olduğu görülmüştür. Özellikle 25 nükleotitten daha kısa örnek boyutlarında beklenenden 5-6 nükleotid kayma meydana gelirken 25 nükleotidin üstünde olan örneklerde 1 ila 3 nükleotid arası kayma gözlenmiştir. Bu durum bu çalışmada analizi yapılan örneklerde de görülmüştür. Quintans B. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada bu duruma dizi, uzunluk ve boyanın neden olabileceğine ve bu etmenlerin elektroforetik hareketi etkilediği sonucuna varmışlardır. Sinyal yükseklikleri incelendiğinde ise dR100 ile işaretlenmiş guanin bazının elektroforegramda diğerlerinden daha güçlü sinyal verdiği görülmüştür. Ancak, bu durumun elektroferogramda okunabilirliği çok fazla etkilemediği bildirilmiştir (Quintans B. ve ark, 2004). Fakat alleleri değerlendirme aşamasında florofor yayılım oranlarına dikkat edilmelidir. Yayılım oranları 4:2:1:1 olan boyalar sırasıyla dR110 (mavi):dR6G (yeşil):TAMRA (siyah):dROX (kırmızı) renklerini temsil etmektedir (Freire-Aradas A. ve ark, 2012 ).

SNaPshot minisekanslama tekniği ile analizi yapılan 5 SNP noktasının optimizasyonunu yapmak amacıyla K562 kontrol örneği ile çalışılmıştır. Araştırılan SNP lokuslarının boyutları birbirine yakın olduğundan her bir SNP için singlepleks PCR hazırlanmıştır ve analizörde yürütme sonucunda SNP noktalarının elektroforegramda boyutları saptanmıştır. Her birinin elektroforegramdaki yerleri tespit edildikten sonra multipleks PCR yapılmıştır. Multipleks PCR sonrası yapılan yürütmelerde istenmeyen ekstra (artefakt) pikler gözlenmiştir. Bu piklerin neden olduğu kirliliğin giderilmesi için farklı yollar izlenmiştir. İlk basamakta PCR ile çoğaltılan ürüne ekzonükleaz (primerleri uzaklaştırmak için) ve SAP enzimi (dNTP'leri uzaklaştırmak için) eklenerek yapılan saflaştırma basamağında 15 dk olarak tavsiye edilen inkübasyon süresi 90 dk'ya çıkarılmıştır. Bu uygulamadan sonra fark gözlenirse de çok temiz bir elektroforegram görüntüsü elde edilememiştir. Bunun üzerine 1. PCR aşamasında araştırılan SNP'nin bulunduğu diziyi çoğaltmak amacıyla tasarlanan *forward(ileri)* ve *reverse(geri)* primerlerinin konsantrasyonları yarıya düşürölmüş ve 40 olan PCR döngü sayısı 33'e indirilmiştir. Ayrıca uzama primerleri arasındaki spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için uzama primeri karışımına amonyum sülfat çözeltisi eklenmiştir (Freire-Aradas A. ve ark, 2012). Bu uygulamalar sonucunda temiz bir elektroforegram görüntüsü elde edilmiştir.

Analiz aşamasında bazı örnekler 3130 genetik analizör cihazına yüklenmiştir. Minisekanslama reaksiyonu için gerekli parametreler girildikten sonra (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzers, 2009) yürütme yapılarak sonuçlar değerlendirilmiş ve 3100 cihazıyla yapılan sekans sonuçları karşılaştırıldığında tüm SNP noktalarında kaymalar gözlenmiştir. Bu sonuçlar 3130 ile çalışılan diğer çalışmalarla (Bölböl O. ve ark, 2009) karşılaştırıldığında son ürün uzunluklarındaki kayma miktarının yaklaşık 5 nükleotid daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Validasyon alışmaları için birçok parametre mevcuttur. Uygulanan yöntem sonucu analiz edilen sonuçların güvenilirliğinden emin olmak için validasyon çalışmalarının

yapılması gerekmektedir. Bu çalışmanın validasyon basamağında yöntemin duyarlılığı, analiz eşiği, tekrarlanabilirliği test edilmiştir. Öncelikle örneklerin yanlış değerlendirmesini önlemek amacıyla 3100 genetik analizör cihazının minimum tespit sınırı (LOD değeri) hesaplanmıştır. Kullanılan bu cihaz için analiz eşik değeri 254 RFU olarak belirlenmiştir. Son ürün uzunluklarının elektroforegramda gösterdiği sapmayı belirlemek için daha önce cihazda yürütülen ve analizi yapılan bir DNA örneği kullanılmıştır. Aynı örnek farklı zamanlarda 6 kere yürütülmüş ve deney sonuçları üst üste karşılaştırılmıştır. Her bir SNP noktasının ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. 0,136-0,336 aralığında çıkan standart sapma değerleri çalışmanın tekrarlanabilir ve güvenilir olduğunu göstermiştir.

Kapiler elektroforez cihazı için analiz eşiğinin üzerinde olmak şartı ile tam profil elde edilebilen en düşük hedef DNA konsantrasyonunun belirlenebilmesi amacıyla çalışmanın duyarlılığı test edilmiştir. Duyarlılık çalışması için K562 kontrol örneği, 1 ng, 0,5 ng, 0,1 ng, 0,05 ng oranlarında sulandırılarak çalışılmıştır. Tam profil elde edilen en düşük konsantrasyon 0,05 ng/µl olarak belirlenmiştir.

İki kişinin DNA özütlelerinin karıştırılması sonucu DNA profillerinin ortaya çıkarılması amacıyla 3 adet DNA karışımı hazırlanmıştır. Westen A. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada DNA özütleleri, 1:8 ve 8:1 aralığında karıştırılmış ve en iyi sonucun 1:1 olarak hazırlanan karışımlar olduğunu görmüşlerdir (Westen A. ve ark, 2009). Parsons T. J. ve arkadaşlarının hazırladıkları karışım örneklerinde de 1:1 oranındaki karışımlarda sinyal yoğunluğuna bağlı problemlerin yaşanmadığı görülmüştür (Parsons T.J. ve ark, 2006). Bu nedenle bu çalışmada daha önce analizi yapılan 6 DNA örneği farklı kombinasyonlarla (kadın-erkek, erkek-erkek, kadın-kadın) 1:1 oranında karıştırılmıştır. İki karışım örneğinde (kadın-kadın, erkek-erkek) X131 kodlu SNP noktasında G allelinin RFU değerinin beklenenden düşük çıktığı gözlenmiştir. Bir karışım örneğinde (kadın-kadın) de X018 kodlu SNP noktası, analiz eşik değerinin altında kaldığından değerlendirmeye alınmamıştır.

SNP'lerin biallelik olması nedeniyle yüksek ayırım gücüne sahip olmadıklarından kadın-erkek karışım örneklerinde STR'leri tamamlayıcı olarak kullanılabilirliğinin olduğu düşünülmektedir.

Optimizasyon ve validasyon çalışmaları tamamlanmış 5 X-SNP lokusunun son uzunluk ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanarak çalışmanın ve kullanılan yöntemin tekrarlanabilirliği ispatlanmıştır.

Bu çalışmada adli soruşturmada karşılaşılabilecek sorunları çözmek için X kromozomu üzerinde bulunan belirteçlerin önemi vurgulanmak istenmiştir. Türk toplumundan alınan örnekler üzerinde yapılan bu çalışmada X kromozomu üzerinde lokalize olan 5 SNP lokusu SNaPshot minisekanslama tekniği ile çalışılmış, özgün optimizasyon ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan istatistiksel analizler neticesinde, çalışılan X-SNP'lerin adli bilimler alanında kimliklendirme çalışmaları için uygun lokuslar olduğu belirlenmiştir. Bu lokuslardan özellikle X131 lokusunun, Türk toplumuna özgün bir polimorfizm gösterdiği düşünülmektedir.

Bu çalışma ilgili X-SNP'lerin adli bilimlerde kimliklendirme çalışmalarında daha sonra yapılacak çalışmalara referans olabileceği düşünülmektedir. Ancak çalışmanın daha fazla sayıdaki örnek ve daha çok sayıdaki X'e bağlı SNP belirteci eklenerek yapılması ayırt etme gücünü arttırmaya yardımcı olacaktır.



## 6.ÖZET

Adli genetik DNA analizi ile karşılaştırma yaparak, babalık testleri, olay yerinde bulunan biyolojik kanıtların kimlik tespitini yapmak, insan kalıntılarında kayıp kişileri kimliklendirme gibi hukuki problemleri çözümlenmeye yardımcı olmaktadır. Her kişide tek olan DNA dizileri karşılaştırılarak örnekler analiz edilir. Adli bilimlerde kimlik ve nesep tayininde genellikle STR lokusları kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda kimliklendirmede ve babalık testlerinde STR analizlerine alternatif olarak SNP analizleri kullanılmaktadır.

Bu çalışmada 5 adet X-SNP ( X018, X036, X047, X131, X142) lokusunun SNaPshot minisekanslama tekniği kullanılarak optimizasyon, validasyon ve analizinin yapılması, ayrıca bu lokusların adli bilimlerde olgu aydınlatmadaki faydası ve ülkemizdeki alel sıklıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada 54 erkek 46 kadın bireyin genotipleri belirlenmiştir. Araştırılan 5 X-SNP lokusunun Türkiye populasyonunda da polimorfik olduğu tespit edilmiştir ve en düşük allel frekansı 0,230 olarak bulunmuştur. Avrupa, Asya ve Afrika toplumundaki populasyonlar ile  $F_{st}$  değeri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Optimizasyon ve validasyon çalışmaları tamamlanmış 5 X-SNP lokusunun son uzunluk ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanarak çalışmanın ve kullanılan yöntemin tekrarlanabilirliği ispatlanmıştır. Bu lokuslardan özellikle X131 lokusunun, Türk toplumuna özgün bir polimorfizm gösterdiği düşünülmektedir. Çalışılan X-SNP'lerin adli bilimler alanında kimliklendirme çalışmaları için uygun lokuslar olduğu, ancak çalışmanın daha fazla sayıdaki örnek ve X'e bağlı SNP belirteci eklenerek yapılmasının ayırt etme gücünü arttırmaya yardımcı olacağı sonucuna varılmıştır.

## 7. SUMMARY

Forensic genetics is the branch of genetics that, through DNA analysis and comparison, helps to resolve legal problems such as paternity tests, establishing identity in criminal cases where biological evidence is found at crime scenes, inheritance matters and identification of missing persons from human remains. In forensic genetics, DNA samples are analyzed by comparing DNA sequences that are unique to each individual. Forensic scientists often use STR loci for identification. In the last few years genetic identification and paternity testing are used SNP (Single Nucleotide Polymorphism) typing as an alternative to STR analysis.

In this study, using the technique of SNaPshot 5 X-SNP (X018, X036, X047, X131, X142) locus optimization, validation and analysis, as well as lighting have the benefit of our country and the allele frequencies of loci in forensic science to investigate the case. 54 male 46 female individual genotypes were determined. 5 X-SNP locus researched were found to be polymorphic in the Turkey population and the lowest allele frequency was found to be 0,230. European, Asian and African society populations were compared using the  $F_{st}$  value. 5 X-SNP locus optimization and validation studies have been completed to by calculating last length averages and standard deviations of repeatability is proven of study and the method. Especially X131 loci, a polymorphism in Turkish society thought to the original. Worked X-SNPs locus are suitable for the identification in forensic science, but more work is done by adding numerous examples and X-linked SNP markers will help to increase the discriminative power is concluded.

## 8. KAYNAKLAR

1. Applied Biosystem (2001) ABI Prism 3100 Genetic Analyzer User' s Manual
2. Applied Biosystem (2009) SNaPshot® Kit Analysis Getting Started Guide
3. Applied Biosystems (2005) Using the SNaPshot® Multiplex System with the POP-7™ Polymer on Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzers and 3130/3130xl Genetic Analyzers
4. Aşıcıoğlu F, (2006) X-Kromozomal STR Polimorfizmi (DXS8377, DXS101, DXS6789, SSTRX-1, HUBHPRTB) ve Türk Toplumundaki Allel Frekansları, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
5. Bardakçı F, Yenidünya A.F, (2007) Moleküler biyoloji laboratuvar teknikleri II. İçinde: Moleküler Biyoloji-Protein Sentezi ve Yıkımı, Yıldırım A,Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B. Nobel yayınevi, Ankara, s. 579-582
6. Boorman K.E. (1988) Blood Group Serology 6th ed. Churchill Livingstone, Londons:44-48
7. Brión M, (2005) Y chromosome SNP analysis using the single-base extension içinde: *Forensic DNA Typing Protocols*, Carracedo A. Humana Press Inc. New Jersey, 230-42
8. Budowle B. (2004) SNP typing strategies. *Forensic Sci Int* **146**:139–142
9. Budowle B, van Daal A, (2008). Forensically relevant SNP classes. *BioTechniques* **44**: 603-10
10. Bulbul O, Phillips C, Argac D, Shahzad M S, Fondevilla M, et al. (2009) Internal validation of 29 autosomal SNP multiplex using a ABI 310 genetic analyser. *Forensic Sci Int.* **2**: 129-130

11. Coble MD, Vallone PM, Just RS, Diegoli TM, Smith BC, Parsons TJ. (2006) Effective strategies for forensic analysis in the mitochondrial DNA coding. *Int J Legal Med.* **120**: 27-32.
12. Daniels G, (1996) Human Blood Groups. Oxford: Blackwell Sciences
13. Freire-Aradas A, Fondevila M, Kriegel AK, Phillips C, Gill P, et al. (2012) A new SNP assay for identification of highly degraded human DNA. *Forensic Sci Int Genet.* **6**: 341-9.
14. Giardina E, Predazzi I, Pietrangeli I, Asili P, Marsala P, Gabriele L, et al. (2007) Frequency assessment of SNPs for forensic identification in different populations. *Forensic Sci Int Genet.* **1**:e1-3
15. Hancı H, (2002) *Adli Tıp ve Adli Bilimler*, Seçkin Yayıncılık, Ankara, s. 9-21.
16. Harayama Y, Oki T, Hayashi T, Tsukada K, Ota M et al. (2011) A comparative study on the techniques of SNPs analysis for degraded DNA samples. *Forensic Sci Int Genet.* **3**: 180–81
17. Karakuş O., (2009) *Biyolojik incelemeler. İçinde: Kriminalistik*, Semizoğlu İ. Adalet yayınları, Ankara s.218-255
18. Kashyap VK, Sitalaximi T, Chattopadhyay P, Trived R (2004), DNA Profiling Technologies in Forensic Analysis, *Int J Hum Genet*, **4**: 11-30
19. Katoh T, Mano S, Munkhbat B, Tounai K, Oyungerel G. et al. (2005) Genetic features of Khoton Mongolians revealed by SNP analysis of the X chromosome. *Gene.* **357**: 95- 102
20. Kidd KK, Kidd JR, Speed WC, Fang R, Furtado MR et al. (2012) Expanding data and resources for forensic use of SNPs in individual identification, *Forensic Sci Int Genet.* **6**: 646–52

21. Klug WS, Cummings MR (2003) Genetik teknolojisinin uygulamaları ve ahlaki yönü. İçinde: Genetik Kavramlar, Öner C.Palme yayınları, Ankara, s. 577-589
22. Kwok P, Chen X (2003) Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Curr. Issues Mol. Biol.* **5**: 43-60
23. Landers JP, (1997) Handbook of Capillary Electrophoresis, ikinci baskı, CRC Press
24. Lee HY, Park MJ, Yoo JE, Chung U, Han GR (2005) Selection of twenty-four highly informative SNP markers for human identification and paternity analysis in Koreans, *Forensic Sci Int.* **148**: 107–12
25. Li L, Li C, Zhang S, Zhao S, Liu Y et al. (2010) Analysis of 14 highly informative SNP markers on X chromosome by TaqMan SNP genotyping assay. *Forensic Sci Int Genet.* **4**: 145–48
26. Li L, Liu Y, Lin Y, Li CT, Zhang SH (2011) Linkage disequilibrium analysis of 67 SNP loci on X chromosome, *Forensic Sci Int Genet.* **3**
27. Liu QL, Lv DJ, Wu XL, Sun HY, Wu XY (2008). Development of a five ChX STRs loci typing system. *Int J Legal Med.* **122**:261–5
28. Lyon MF, (1988) X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes. *Am J Hum Genet.* **42**:8-16.
29. Oki T, Hayashi T, Ota M, Asamura H (2012). Development of multiplex assay with 16 SNPs on X chromosome for degraded samples. *Leg Med.* **14**: 11–6
30. Ölçen AM. (2011) Mt-DNA'nın kodlama bölgesindeki 10 SNP Lokusunun Adli Örneklerde Kullanımı, Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul
31. Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. (1996) Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* **379**:131-7

32. Pereira V, Tomas C, Amorim A, Morling N, Gusmão L, Prata MJ. (2011) Study of 25 X-chromosome SNPs in the Portuguese. *Forensic Sci Int Genet.* **5**: 336-8
33. Pereira V, Tomas C, Amorim A. et al. (2011) Study of 25 X-chromosome Single Nucleotide Polymorphisms in African and Asian populations. *Forensic Sci Int Genet.* **3**: 139-40
34. Petkovski E, Keyser-Tracqui C, Hienne R, Ludes B. (2005) SNPs and MALDI-TOF MS: Tools for DNA Typing in Forensic Paternity Testing and Anthropology. *J Forensic Sci.* **50**: 535-41
35. Quintáns B, Alvarez-Iglesias V, Salas A, Phillips C, Lareu MV, Carracedo A, (2004) Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. *Forensic Sci Int.* **140**: 251-7.
36. Reddy KS, Sulcova V. (1998). Pathogenetics of 45,X/46,XY gonadal mosaicism. *Cytogenet Cell Genet.* **82**: 52-7
37. Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K (2005) The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* **434**:325–337
38. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD. et al. (2001) The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* **409**:928-33.
39. Sanchez JJ, Børsting C, Balogh K, Berger B, Bogus M. (2008) Forensic typing of autosomal SNPs with a 29 SNP-multiplex—Results of a collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet.* **2**: 176–83
40. Schneider PM. (2007) Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic Sci Int.* **165**: 238–43
41. Senge T, Madea B, Junge A, Rothschild MA, Schneider PM. (2011) STRs, mini STRs and SNPs – A comparative study for typing degraded DNA. *Leg Med.* **13**: 68–74

42. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. (2001) db SNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* **29**: 308-11
43. Sobrino B, Brión M, Carracedo A. (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int.* **154**: 181–94
44. Stern C. (1973) Principles of human genetics. 3rd ed. W.H. Freeman, New York
45. Szibor R. (2007) X-chromosomal markers: Past, present and future. *Forensic Sci Int Genet.* **1**: 93–9
46. Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, Krause D, (2003) Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med.* **117**: 67–74
47. Tamaki K, Jeffreys AJ. (2005) Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Leg Med.* **7**: 244–50
48. Tomàs C, Sanchez JJ, Barbaro A, Brandt-Casadevall C, Hernandez A, Ben Dhiab M, Ramon MM, Morling N (2008) The Mediterranean basin: A population genetic study based on 25 X-chromosome SNPs. *Forensic Sci Int Genet.* **1**: 170–2
49. Tomas C, Sanchez JJ, Barbaro A, Brandt-Casadevall C, Hernandez A, Ben Dhiab M, Ramon M, Morling N. (2008) X-chromosome SNP analyses in 11 human Mediterranean populations show a high overall genetic homogeneity except in North-west Africans (Moroccans). *BMC Evol Biol.*, **8**: 1-14
50. Turner PC, McLennan A.G, Bates A.D (2004) PCR. İçinde: Moleküler biyoloji önemli notlar, Konuk M.Nobel yayınevi, Ankara s. 165
51. Westen AA, Matai AS, Laros JF, Meiland HC, Jasper M, de Leeuw WJ, de Knijff P, Sijen T. (2009) Tri-allelic SNP markers enable analysis of mixed and degraded DNA samples. *Forensic Sci Int Genet.* **3**: 233–41
52. Witkin HA, Mednick SA, Schulsinger F, Bakkestrom E, Christiansen KO. et al. (1976) Criminality in XYY and XXY men. *Science* **193**:547-55

53. Zarrabeitia MT, Mijares V, Riancho JA. (2007) Forensic efficiency of microsatellites and single nucleotide polymorphisms on the X chromosome. *Int J Legal Med* **121**:433–7
54. <http://www.gdb.org> (Erişim tarihi: 23.06.2013)
55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>. (Erişim tarihi: 26.07.2013)



## ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad: Selin YEŞİL

Doğum Tarihi: 07.03.1986

Doğum Yeri: ANKARA

Eğitim Bilgileri:

2000-2004 Dikmen Süper Lisesi, Ankara

2005-2010 Ege Üniversitesi, İzmir

Lisans, Moleküler Biyoloji ve Genetik ağırlıklı biyoloji bölümü

2010-2013 İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü

Fen Bilimleri Anabilim Dalı, Yüksek lisans

Sertifika:

Ege Üniversitesi 1. Moleküler Biyoloji ve Genetik kongresi

Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik kongresi

Ekim 2007-Mart 2008 İzmir Adli Tıp Kurumu, staj

Temmuz 2008 Ankara Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim dalı, staj

Ağustos 2008 Ankara Adli Tıp Kurumu, staj

Haziran 2009 Ankara Üniversitesi Kök hücre kongresi

Ağustos 2009 Ankara Hıfıfıshha Enstitüsü, staj