

T.C

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Havva ALTUNÇUL

**TÜRK TOPLUMUNDA MİTOKONDRIYAL DNA'DA
(8389-8865 BAZ ÇİFTİ) MUTASYON TARAMASI**

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖMER KARATAŞ

BİYOLOG

İSTANBUL 2012

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin gerçekleşmesinde katkıda bulunan İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. İmdat ELMAS ve Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı değerli hocamız Prof. Dr. Salih CENGİZ'e, çalışmam boyunca bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan ve karşılaştığım problemlerin çözümünde deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Havva ALTUNÇUL'a, bilgi ve deneyimleriyle tezime katkıda bulunan Yrd. Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU'na, yardımlarından dolayı Fulya Eylem YEDİAY, Gülten RAYİMOĞLU ve Akın KATOGLU'na, sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili aileme,

Teşekkür ederim...

Ömer KARATAŞ

14131 numaralı bu tez projesi İ.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiş ve 19245 numaralı Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulunca onaylanmıştır.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Mitokondriyal DNA.....	3
2.2 Mitokondriyal DNA'nın Yapısı.....	4
2.3 Mitokondriyal DNA'da Gen Anlatımı.....	5
2.4 Mitokondriyal DNA'da Replikasyon.....	5
2.5 Mitokondriyal DNA'da Heteroplazmi.....	6
2.6 Mitokondriyal DNA'nın Uygulama Alanları.....	6
2.6.1 Evrim.....	6
2.6.2 Adli Bilimlerde Mitokondriyal DNA.....	7
2.7 Mitokondriyal DNA Dizin Analiz Yöntemleri.....	7
2.7.1 Maxam Gilbert Yöntemi.....	7
2.7.2 Sanger Yöntemi.....	8
2.7.3 ShotGun Yöntemi.....	9
2.7.4 Pyrosequencing Yöntemi.....	9
2.8 Elektroforez Analizi.....	10

2.8.1	Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	11
2.8.2	Kapiller Elektroforez.....	11
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1	Örneklerin Toplanması.....	14
3.2	DNA İzolasyonu.....	14
3.3	DNA Miktarlarının Belirlenmesi.....	14
3.4	Primerlerin Hazırlanması.....	14
3.5	DNTP Karışımının Hazırlanması.....	15
3.6	Birinci PCR Aşaması (8389-8865 bölgesinin çoğaltılması)	15
3.7	Birinci PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	17
3.8	İkinci PCR Aşaması.....	17
3.9	İkinci PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	19
3.10	Kapiller Elektroforezde Dizinleme Aşaması.....	20
3.11	Sonuçların Kontrol Edilmesi.....	20
4.	BULGULAR.....	21
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	34
6.	ÖZET.....	37
7.	SUMMARY.....	38
8.	KAYNAKLAR.....	39
9.	EKLER.....	44

Ek 1 DNA izolasyon Prosedürleri.....	44
Ek 2 Florometrik yöntem ile DNA miktarının tayini.....	45
Ek 3 Zymogen Sequencing Clean Up Kit prosedürü.....	45
Ek 4 Cambridge Reference Sequence.....	46
Ek 5 Gönüllülerden Alınan Aydınlatılmış Onam Formu.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	49

KISALTMALAR

A	Adenin
Ark	Arkadaşları
ATP	Adenozin trifosfat
bç	Baz çifti
C	Sitozin
CE	Kapiler elektroforez
CSB	Conserved sequence box (Korunmuş dizi kutusu)
D lopp	Displacement loop
ddNTP	Dideoksiribonükleik asit
Del	Delesyon
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ETS	Elektron taşıma sistemi
EXO 1	Exonuclease 1
G	Guanin
H zinciri	Ağır zincir
HV1	Hypervariable I (İleri değişken bölge 1)
HV2	Hypervariable II (İleri değişken bölge 2)
HV3	Hypervariable III (İleri değişken bölge 3)
İns	İnsersiyon

L zinciri	Hafif zincir
M	Molarite
mRNA	Messenger RNA
mtDNA	Mitokondriyal DNA
ng	Nanogram
nDNA	Çekirdek DNA'sı
Oh	Ağır zincir replikasyon orijini
Ort	Ortalama
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ph	Ağır zincir promoter bölgesi
PPi	Pyrophosphate
RNA	Ribonükleik Asit
ROX	Carboxy-X-rhodamine
Rpm	Dakikadaki tur sayısı
rRNA	Ribosomal RNA
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
ssDNA	Tek zincirli DNA (Single-Stranded DNA)
STR	Mikrosatelit (Short tandem repeat)

T	Timin
TAMRA	Carboxytetramethyl-rhodamine
TAS	Termination associated sequences
tRNA	Taşıyıcı RNA
VNTR	Minisatellit (Variable Number Tandem Repeat)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Mitokondriyal DNA'nın genetik haritası.....	4
Şekil 2. Mitokondriyal DNA'nın çalışma sistemi.....	5
Şekil 3. Dideoksinükleotid yapısı.....	9
Şekil 4. Deoksinükleotid yapısı.....	9
Şekil 5. Birinci PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	21
Şekil 6. Örneğin ilk kez çalışılmasına ait elektroforegram.....	22
Şekil 7. Örneğin tekrar çalışılarak elde edilen 2. elektroforegram.....	22

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Primer dizileri ve 100 μ M'lık stok çözeltiler hazırlamak için eklenen distile su miktarları.....	15
Tablo 2. PCR bileşenleri konsantrasyonları ve eklenen miktarlar.....	16
Tablo 3. Birinci PCR parametreleri.....	16
Tablo 4. Exo-Sap karışımının hazırlanması.....	17
Tablo 5. BigDye Terminator 3.1 kit içeriği.....	18
Tablo 6. BigDye kiti içeriğindeki ddNTP'ler ve işaretlemeye kullanılan flüoresan boyalar.....	18
Tablo 7. İkinci PCR karışım miktarları.....	19
Tablo 8. İkinci PCR koşulları (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protokol 2002).....	19
Tablo 9. Dizin analizi parametreleri.....	20
Tablo 10. Kodlanan bölgedeki tespit edilen polimorfizmler.....	24
Tablo 11. Mitokondriyal DNA'nın mutasyon oranları açısından Alman ve Tayvan Toplumunu ile karşılaştırılması.....	28
Tablo 12. Haplotip Grupları.....	29
Tablo 13. Baz Değişimleri.....	32

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adli Bilimler suçun başladığı ve olayların geliştiği her yerdedir ve çözüme ulaşmak için ihtiyaç duyulan önemli bir multidisipliner bilim dalıdır.

Gelişen Deoksiribonükleik Asit (DNA) teknolojileri ve polimeraz zincir reaksiyonu uygulamaları (Polymerase chain reaction, PCR) ile analizdeki birçok zorluk ortadan kalkmıştır. Adli Bilimlerde çekirdek DNA'sı (nDNA) kullanımı yaygındır, fakat adli olaylarda genellikle laboratuvarlara gelen DNA örneklerinin miktarı azdır. Bu nedenle bazı durumlarda mitokondriyal DNA (mtDNA) analiz için tercih edilir. Çünkü bir hücrede bir çekirdek ve içinde bir nükleer DNA bulunurken, bir hücrede çok sayıda mitokondri ve her mitokondri içinde çok sayıda mtDNA bulunur. Bu nedenle hücre içinde mtDNA'nın birden fazla kopyası bulunmaktadır (1). Analizi çok duyarlıdır ve bir hücrede çok sayıda kopyası bulunduğu için, kemik, diş, saç ve özellikle yüksek oranda bozulmuş DNA içeren materyallerle çalışıldığında, nükleer DNA'ya göre daha avantajlıdır (2, 3).

Mitokondriyal DNA'nın adli amaçlı kullanımında genellikle polimorfik olan ve kodlama yapmayan D-loop bölgesi incelenmektedir (4). Kimliklendirme veya soy bağı araştırmalarında genellikle bu bölgede yer alan HV1 ve HV2 segmentlerinin dizin analizi yapılmaktadır (5, 6). Ancak buradan elde edilen bilgi sınırlıdır, ayırım gücü düşüktür. Ayırım gücünü artırmak için mtDNA'nın kodlayan bölgeleri baz sayısı ve hastalıklarla ilişkisinin en düşük seviyede olan kısımları incelenmeye başlanmıştır (7). Bu çalışmada mitokondriyal DNA'nın 8389-8865 baz çifti aralığı dizin analizi yapılarak mutasyon ve SNP açısından incelenecektir. Literatür taraması sonucunda bu bölgenin hem hastalıklardan uzak hem de çalışmaya elverişli bir uzunlukta olduğu saptanmıştır (8). İncelenen bölgenin sınırları belirlenirken bölgeye yakın 8344 Myoclonic epilepsy, ragged-red fiber (9), 8363 ataxia (10) ve 8993 nörojenik kas güçsüzlüğü, ve 8356 retinitis pigmentosa (11) gibi hastalıklar ile ilgili bölgelerin çalışmanın dışında kalmasına dikkat edilmiştir (12,13).

Adli bilimlerde gerek kimliklendirme gerekse nesep tayinlerinde kullanılacak lokusların allel veya genotiplerin toplumda gösterdiği dağılımını bilmek önemlidir. Bu nedenle mutlaka söz konusu bölgelerin populasyon çalışmalarının yapılması gereklidir. Türk toplumunda, mtDNA'nın 8389-8865 bazları arasındaki bölgede rastlanan

mutasyon ve SNP bilgileri bulunmamakta olup, söz konusu bölgelerden olgu aydınlatma yararlanılabilmesi için populasyon çalışmasının yapılarak toplumdaki dağılımının belirlenmesi gerekmektedir. Mutasyon oranları toplumdan topluma değişmektedir. Bu nedenle Türk Toplumunu için mutasyonların belirlenmesi zorunludur. Bu çalışmanın amacı mtDNA'nın kodlama yapan kısmında yer alan 8389-8865 baz çiftleri arasındaki bölgenin dizin analizi yaparak Türkiye Toplumundaki mutasyonları belirlemek ve polimorfizm açısından adli bilimlerde kullanmaya elverişli olup olmadığını tespit etmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Mitokondriyal DNA

Mitokondri 1850'de Kollicker tarafından böbrek çizgili kas hücrelerinden izole edilmiş ve 150 yıl önce değişik tuzlu solüsyonlar içinde bu yapıların osmotik reaksiyonları gözlemlenmiştir. Altmann tarafından 1894'de mitokondrinin ilk tanımlaması yapılmıştır. Işık mikroskobu ile hücre içinde granüler ve iplikçi yapılar şeklinde görülen bu organel 1897'de Benda, "ipliksi granül" anlamına gelen "mitokondrion" adını vermiştir (14). Mitokondrinin oksidatif fosforilasyonun merkezi olduğu 1948'de Eugene Kennedy ve Albert Lehinger tarafından ortaya konmuştur. Nass ve arkadaşları ise 1963'de mitokondri içerisinde iplikçikler şeklinde DNA molekülleri olduğunu gözlemlemişlerdir (15).

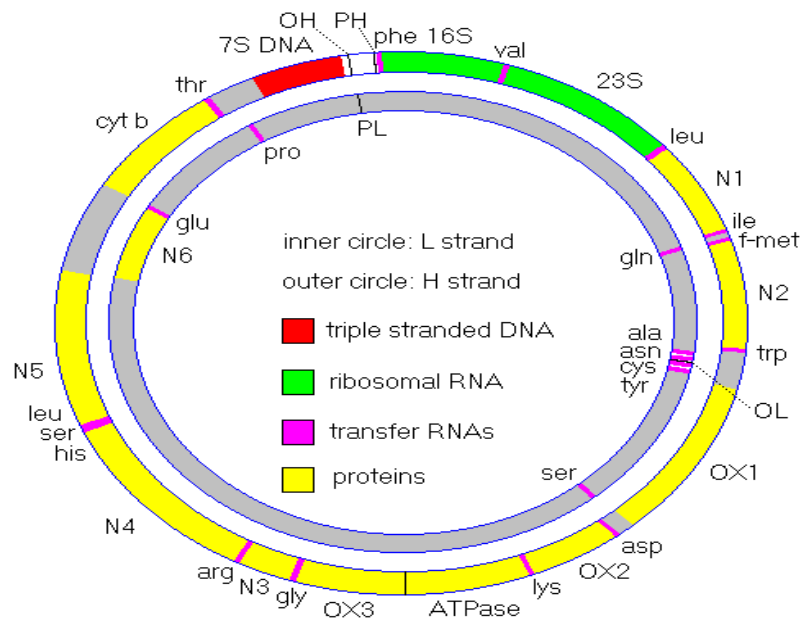
Mitokondri tüm ökaryotik hayvansal ve bitkisel hücrelerin sitoplazmasında yer alan hücrenin enerji üretiminden sorumlu organeldir. Prokaryotik hücrelerde ve memelilerin alyuvarlarında mitokondri bulunmaz. Her mitokondride 2 ila 10 arası değişen sayıda mtDNA bulunmaktadır. Bu sayı türler arası, kişiler arası, dokular arası ve hücreler arası farklılık göstermektedir (16). Kendine özgün DNA molekülüne sahip mitokondri her bir hücrede enerji gereksinimine veya fonksiyonuna bağlı olarak farklı sayılarda bulunur. Bu sayının yumurta hücrelerinde embriyogenesis öncesinde replikasyon olmaması ve daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulması nedenleriyle 10.000'lere ulaştığı bilinmektedir (17,18). Yeşil bitkiler hayvansal hücrelere kıyasla çok az mitokondri içerirler. Çünkü mitokondrilerin bazı görevleri kloroplastlar tarafından yerine getirilir. MtDNA, nDNA'dan bağımsız olarak replikasyon, transkripsiyon ve translasyon yapma yeteneğine sahiptir. Her bir mitokondri kopya sayısı kendine özgü değişkenlik gösteren (10-100) DNA'ya sahiptir ve mitokondriyal DNA (mtDNA), sitoplazmik genom veya mitokondriyal genom olarak isimlendirilmektedir (19).

Wallace ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmalarda ilk kez mtDNA'nın birçok hastalıkta nDNA gibi önemli bir rolü olduğunu ortaya koymuş ve bu konudaki çalışmalara öncülük etmiştir (20).

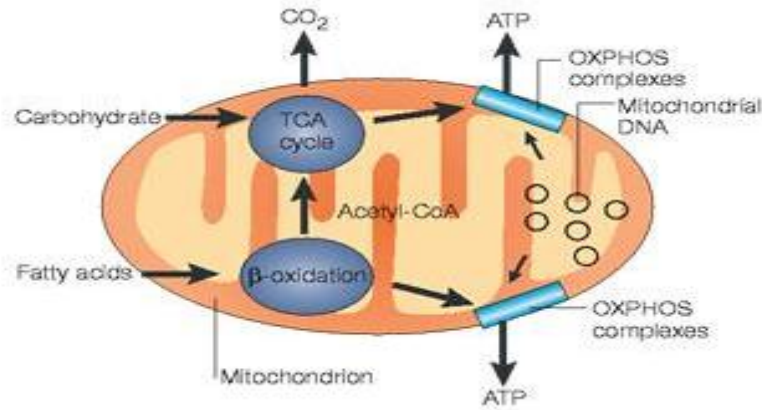
2.2 Mitokondriyal DNA'nın Yapısı

İnsan mtDNA'sı 16569 baz çifti (bç) uzunluğunda, halkasal, çift zincirli, bir DNA molekülü olup tüm dizisi ilk olarak Anderson ve arkadaşları tarafından 1981 yılında tanımlanmıştır (1). Her bir mtDNA molekülü hücre solunumunda (oksidatif fosforilasyon-OXPHOS) görev yapan 13 polipeptid ve kendi translasyon sistemi için gerekli olan 2 rRNA ve 22 tRNA olmak üzere 37 gen kodlamaktadır. Halkasal yapıda bulunan mtDNA'nın guanince zengin olan zinciri ağır zincir (heavy strand) sitozince zengin olan zinciri ise hafif zincir (light strand) olarak tanımlanmaktadır. MtDNA tarafından kodlanan 37 genin 28'i ağır zincirde diğer 9 tanesi ise hafif zincirde kodlanmaktadır (21). Oksidatif fosforilasyon için gerekli olan diğer polipeptidler nükleer genom tarafından kodlanmaktadır (22,23).

OXPHOS olayı mitokondrinin yağ ve karbonhidratlardaki hidrojenlerin okside edilmesi sonucu adenosin trifosfat (ATP) ve O_2 elde edilmesi olayıdır. Kullanılan enzimlerin büyük bir bölümü nDNA tarafından kodlandıktan sonra mitokondriye geçer. OXPHOS'da görev yapan sitokrom C oksidaz alt üniteleri (I, II, III), ATPaz alt ünitesi 6 ve 8, sitokrom b (Cytb) ve NADH dehidrogenazın alt üniteleri (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6) ise mitokondri tarafından kodlanmaktadır (24).



Şekil 1. Mitokondriyal DNA'nın genetik haritası



Şekil 2. Mitokondriyal DNA'nın çalışma sistemi.

2.3 Mitokondriyal DNA'da Gen Anlatımı

Dloop bölgesinde bulunan promotör bölgede üç adet değişmez baz dizisi bulunmaktadır. Bu diziler CSBI 213-215, CSBII 299-315, CSBIII 346-363 baz çiftleri arasındadır ve Conserved Sequence Box (Korunmuş dizi kutusu) adını taşırlar. Ağır zincirin promotörü (PH) 392-445 bç arasında yer almaktadır. Transkripsiyon zıt yönlü olarak D-loop (Displacement-loop) bölgesindeki iki promotörden aynı anda başlar ve iki zincirde transkripsiyona uğrar. Oluşan tRNA, Messenger RNA (mRNA) ve ribozomal RNA (rRNA) serbest kalır ve öncül RNA daha sonra kesilir (25). Mitokondri DNA'sında kodlanan bazı aminoasitler nDNA ile farklılıklar gösterir. nDNA'da protein sentezini sonlandırmakla görevli UGA kodonu mitokondride triptofan aminoasitini kodlar. İzolösini kodlayan AUA kodonu ise mitokondride metionini kodlamakla görevlidir. AGA ve AGG arginin aminoasiti olarak adlandırılan kodonlar ise sonlandırıcı kodon görevini üstlenmişlerdir. Başlatıcı kodonlar ise AUA ve AUU'dur (26).

2.4 Mitokondriyal DNA'da Replikasyon

MtDNA replikasyon yapmak için kendine özgü DNA polimeraz (mtDNA polimeraz) içermektedir. Bu mtDNA polimeraz nDNA tarafından kodlanmaktadır (27). Her iki zincirin birbirinden bağımsız iki replikasyon orijini vardır. Bir diğer korunmuş dizi olan TAS kutusu (Termination Associated Sequences) D-loop bölgesinde (16147-

16172) yer almakta ve ağır zincirin replikasyonunu üstlenmektedir (25). Bu zincirde TAS bölgesinde 5'-3' yönünde (O_H) sentezinin başlamasıyla H zinciri açılır ve sentezlenen yeni zincirin L zincirinin replikasyon noktasına gelir. Bu noktada ise ters yönde L zincirinin sentezi başlar. Bu süreklilik sayesinde Okazaki fragmentleri oluşmaz. Fakat burada gerçekleşen replikasyonun hata oranı nDNA'ya göre daha yüksektir ve nDNA'daki gibi bir tamir mekanizması yoktur. Bu yüzden heteroplazmilere daha sık rastlanabilir (28).

2.5 Mitokondriyal DNA'da Heteroplazmi

Heteroplazmi bireyde birden fazla çeşit mtDNA profilinin oluşmasıdır. Birkaç değişik şekilde gözlemlenebilir. Bunlar:

- Bir dokuda birden fazla farklı mtDNA bulunması,
- mtDNA'nın bir dokuda heteroplazmik diğer dokuda homoplazmik olarak gözlemlenmesi,
- Farklı dokularda farklı mtDNA profillerinin gözlemlenmesi şeklinde olabilir.

Uzunluk ya da nokta heteroplazmisi şeklinde görülen bu değişimler hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. mtDNA anneden kalıtıldığı için bu hastalıklar ve heteroplazmiler sıklıkla çocuklara da aktarılmaktadır (29).

2.6 Mitokondriyal DNA'nın Uygulama Alanları

2.6.1 Evrim

MtDNA HV1 ve HV2 bölgeleri insan evriminin araştırılmasında kullanıldı ve modern insanların yaklaşık 200.000 yıl önce Afrika'dan dünyaya yayıldığı ortaya çıktı(30).

189 örnekte yapılan çalışmaya göre atalarımızın 166.000 ile 249.000 yıl önce Afrika'da yaşadığı görüldü. HV1 bölgesinde yapılan çalışmada Neanderthallerin mtDNA'larının modern insanlardan ayrıldığı görüldü ve mtDNA havuzuna katılmadı. Modern insan ile Neanderthallerin ayrılması günümüzden yaklaşık 365.000 ile 853.000

yıl önce olmuştur. Yapılan çalışmalarda günümüz Avrupalılarının 150 kez daha düşük frekanslı mtDNA'ya sahip olduğu görülmüştür (31, 32, 33).

2.6.2 Adli Bilimlerde Mitokondriyal DNA

mtDNA yalnız anneden çocuğa aktarılmaktadır ve sadece mutasyonlarla değişime uğradığı için insan popülasyonları arasında olduğu gibi kişiden kişiye de farklılar göstermektedir. mtDNA'dan kimliklendirme ve kalıtımı maternal olduğu için annelik belirlenmesinde yararlanılmaktadır (34). Adli bilimlerde rutin olarak polimorfik olan mtDNA HV1 ve HV2 bölgeleri incelenmektedir. Ayrıca at, eşek gibi hayvanlarda tür tayini için kullanılmaktadır (33). Bu denli geniş alanda kullanılmasının nedeni saç, kıl, kemik gibi son derece bozulmuş ve az miktarda nDNA içeren biyolojik örneklerde dahi çok sayıda mtDNA bulunması nedeniyle net sonuçlar alınabilmesidir (28).

mtDNA'nın maternal kalıtım göstermesinin nedeni döllenme sırasında sperm ve yumurtanın birleşmesindeki özellikten kaynaklanmaktadır. Spermin hareketli olan kuyruk kısmında enerji gereksinimi karşılamak üzere çok sayıda mitokondri bulunur. Baş kısmı ise nükleer DNA ve çok az miktarda mtDNA içermektedir. Yumurtada ise sperme oranla çok fazla mtDNA bulunmaktadır. Döllenme sırasında yalnız sperm başının yumurtayla birleşmesi, dolayısıyla sadece sperm başındaki az miktarda bulunan mtDNA'nın yumurtaya giriş yapması söz konusudur. Babadan da mtDNA geldiğine dair çalışmalar olsa da spermden yumurtaya geçen mtDNA'ların yaşam süreleri ve yok olmaları tam olarak netlik kazanmamıştır (29).

2.7 Mitokondriyal DNA Dizin Analiz Yöntemleri

2.7.1 Maxam Gilbert Yöntemi

1977'de Allan Maxam ve Walter Gilbert tarafından geliştirilen yöntem DNA'nın kimyasal reaksiyonlarla işlem görmesi ve bazların kesilmesi temeline dayanmaktadır. Sık görülmeyen bazların tespitinde yararlı olsa da yöntemin teknik kısmı rutin çalışmalarda, kitlerde kullanılmasını zorlaştırdığı ve zararlı kimyasal reaksiyonları içerdiği için dezavantajlıdır. Ayrıca 250 baz çiftine kadar dizinleme yapmaya olanak sağlamaktadır (35).

Yöntem DNA'nın 5' ucunun ^{32}P ile işaretlenmesi ve parçaların saflaştırılması temeline dayanmaktadır. Bazlar tek tek veya çiftler halinde kimyasal reaksiyona sokulur ve daha sonra uygun enzimlerle kesim yapılır ve işaretli DNA parçaları oluşturulur. 4 tüpte hazırlanan karışımlarda pürinler için bazik ve asidik ortam oluşturulur ve kesim için piperidin enzimi kullanılır. Ortam bazik olursa Guanin bazından, asidik olursa Adenin bazından kırılma sağlanır. Primidinlerde ise kırılma hidrazin ile sağlanır. Hidrazin hem timin hem sitozinden kırılma sağlar. Ayırt etmek için ortam koşulları değiştirilip bol tuzlu ve bazik hale getirilirse sitozinden kırılma sağlanır. Bu parçalar akrilamid jel elektroforezinde yürütülerek bant oluşumu sağlanır ve dizi görüntülenir (26).

2.7.2 Sanger Yöntemi

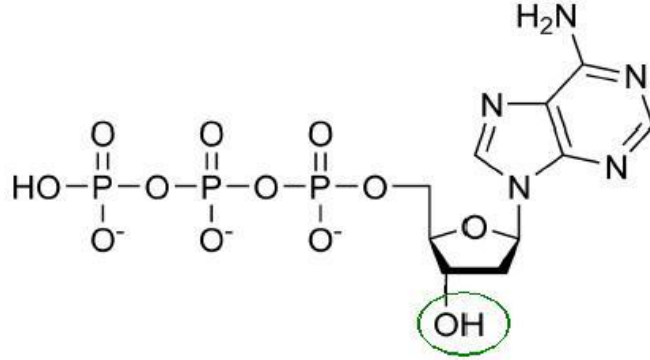
Sanger tarafından 1977'de geliştirilen yöntem enzimatik DNA sentezine dayanır, hücrede gerçekleşen replikasyonun laboratuvar ortamında sağlanmasına benzemektedir.

4 tüpte gerçekleşen reaksiyon için :

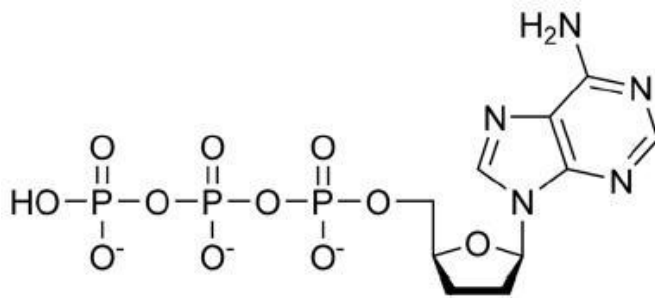
- Amplifikasyon yapılmış tek zincirli DNA (ssDNA)
- Radyoaktif olarak işaretlenmiş 4 adet dNTP
- ddNTP
- Primer
- E. Coli'den elde edilmiş DNA polimeraz enzimi (klenow) 'a

ihtiyaç vardır. Sanger'in temelinde yatan prensip DNA polimerazın dNTP'lerde olduğu gibi 3'OH grubu içermeyen ddNTP'leri de substrat olarak kullanabilmesi, ribozun 3. karbon atomu deoksi halde olduğundan fosfodiester bağı oluşmaması ve yeni nükleotidler katılmadığı için zincirin sonlanmasına dayanmaktadır (36). Öncelikle 4 tüp içinde karışım hazırlanır. Bu karışımlara konulan DNA'lar ya da primerler daha sonra görüntüleme yapabilmek için boyanır. Her bir tüpe dNTP, kalıp DNA, primer, bir çeşit ddNTP konularak karışım hazırlanmaktadır. Bu noktada ddNTP konsantrasyonunun diğerlerinden düşük olmasına dikkat edilmelidir. Oluşan karışımlar inkübasyona bırakıldığında uzamalar meydana gelmektedir. ddNTP'ler ile dNTP'ler substrat olarak kullanılır ve dideoksilerin araya girdiği noktada uzama durur. Böylece her tüpte farklı uzunlukta birçok DNA parçası oluşur. Karışım poliakrilamid jel

elektroforezinde yürütülerek uzunluklarına göre ayrılması sağlanır. En küçük parça en önde yürür. Oluşan bantlar görüntüleme sisteminde incelenir. En küçük parçadan başlayarak 5' 3' yönünde dizi belirlenir.



Şekil 3. Dideoksinükleotid yapısı



Şekil 4. Deoksinükleotid yapısı

2.7.3 ShotGun Yöntemi

Bu yöntemde DNA parçalara ayrılarak incelenir. DNA parçaları kesildikten sonra vektör aracılığıyla konak hücrelere yüklenip çoğalması sağlanır. Daha sonra bu parçalar DNA izolasyonu yapılarak alınır. Dizilemesi yapılan parçalar bilgisayarda birleştirilerek asıl dizi elde edilir (37). İnsan genomu ve drosophila melanogaster gibi birçok genom haritası bu yöntem kullanılarak elde edilmiştir (38, 39).

2.7.4 Pyrosequencing Yöntemi

ShotGun dizileme tekniğinin işlemlerinin uzun sürmesi nedeniyle yeni arayışlar içine giren bilim insanlarının sentez yoluyla dizileme prensibi üzerine çalışmalarıyla ortaya çıkan bir tekniktir. Özel bir şirketin yöntemi satın alması ve geliştirmesi ile adı

454 Sequencing ya da 454 Pyrosequencing olarak anılmaya başlamıştır (40). Yöntemin temeli DNA polimeraz aktivitesini tespit etmek için kemilüminesan enzim kullanımına dayanır. DNA polimeraz, lüsiferaz, apiraz, ATP sülfiraz ve lüsiferin ile sabitlenen DNA inkübe edilir. Ortama A, C, G, T nükleotidleri ayrı ayrı eklenir. Sabitlenmiş zincirin üzerinden tamamlayıcı zincir sentezlenirken nükleotidlerinin tamamlayıcı olduğu noktalarda pirofosfat açığa çıkar. ATP sülfiraz enzimi ise pirofosfatı ATP'ye dönüştürür. ATP ise lüsiferaz enzimine etki ederek lüsiferinin oksilüsiferine dönüşmesine yol açar. Bu sırada bir ışık oluşmaktadır. Bu ışık sinyalin hangi nükleotidin bağlanması sırasında oluştuğunu anlamamıza yarar. Işığın derecesini bilgisayar yardımıyla ölçülür ve tek seferde ortama verilen nükleotidlerden kaç tanesinin zincire bağlandığını tespit edilir (41).

Kaydedilen görüntüler bilgisayar yardımıyla kaydedilerek dizileme verilerine dönüştürülür. Sanger metodunun aksine burada nükleotidler sürekli eklenir ve zincir uzamaya devam eder bu sayede tüm genom daha kısa sürede çoğaltıp incelenebilmektedir. Diğer yöntemlerde prensip DNA'nın çoğaltılıp incelenmesine dayanmaktadır ve çoğaltılmayan bölgeler atlanır (42). Bu yöntem daha karardır ve heterokromatin gibi çoğaltılmayan bölgeler bile dizinlenebilir. Bu yöntemin şimdilik tek dezavantajı uzaması tamamlanmamış bölgelerde ya da aynı nükleotidlerin basit tekrarlarındaki okuma problemidir. Oluşan piklerin büyüklüğü ve ortama verilen baz miktarı yüzünden her okuma yüz baz çiftiyle sınırlıdır ve bundan daha uzun bölgelerde ayırım yapmada problemler yaşanmaktadır. Fakat bu teknoloji üstüne yapılan son çalışmalar ve yeni cihazlar ile bu okuma uzunluğu dört yüz baz çiftine kadar arttırılmıştır (43, 44). Neandertal ve mamut türünün tüm genomu diğer analiz yöntemlerine kıyasla çok daha kısa bir süre içinde dizinlenmiştir (32, 33).

2.8 Elektroforez Analizi

Elektroforez, bir çözeltide asılı halde bulunan yüklü bir molekülün elektrik alanı etkisi ile ayrılmasıdır. Arne Tiselius tarafından geliştirilmiştir. Elektroforezin temel prensibi molekül ağırlığı ve molekülde bulunan elektrik enerjisinin jel içinden bir yükten diğerine giderken kat ettiği mesafe farklılıklarına dayanır. Elektroforetik sistemde analizi yapılacak örnek bir destek ortamına uygulanır. Modern elektroforetik tekniklerde destek ortamı olarak daha çok jeller tercih edilmektedir. Jeller içine uygun tampon yerleştirilerek elektroforez gerçekleştirilir. Analiz edilecek örnek jelde

oluşturulan kuyucuklara bir leke ya da ince bir bant halinde uygulanır. Katı jel desteği ile ayrımı yapılacak moleküllerin hareketi, moleküllerin yüküne, boyutuna, biçimine, kimyasal içeriğine ve uygulanan elektriksel alana bağlıdır (45).

2.8.1 Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Poliakrilamid jel elektroforezinde ise akrilamidin polimerizasyonu ile hazırlanan poliakrilamid jellerin elektroforetik ayırımlarında çeşitli üstünlükleri vardır. Küçük ya da orta boydaki (yaklaşık 1 milyon dalton kadar) nükleik asitler ve proteinler için yüksek ayırıştırma gücüne sahiptir. Çünkü ayırım hem moleküler ekleme hemde elektroforetik harekete dayanır. Göç eden moleküllerle jel arasındaki etkileşim minimum düzeydedir. Jel fiziksel olarak oldukça kararlı ve dayanıklıdır. Jel sentetik bir madde olan akrilamid ile akrilamid türevi olan N-N'-metilen bisakrilamidin polimerleşmesiyle oluşturulur. Kimyasal polimerizasyon bir başlatıcı-katalizör (amonyum persülfat-TEMED) sistemi tarafından kontrol edilir. Fotokimyasal polimerizasyon,UV ışığı altında riboflavin tarafından gerçekleştirilir. Bir jelin ayırıştırma gücü ve molekül boyutu aralığı, akrilamid ve bis akrilamid konsantrasyonuna bağlıdır. Düşük konsantrasyonda daha büyük porlar oluşur ve yüksek molekül ağırlıklı biyolojik moleküllerin yüksek konsantrasyonlarda ise küçük porlar oluşur ve düşük molekül ağırlıklı moleküllerin ayrımı yapılır (46). Ayrıca sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında ürünler denatüre edilerek molekül ağırlığına göre de ayırım yapılabilir (47).

Fakat jelin hazırlanması, örneklerin yüklenmesi esnasında yapılan hatalar ve jelin tekrar kullanımı deney sonucuna olumsuz yönde bir etki yapabilir. Bu yüzden gelişen teknoloji ile gradient jel teknolojisi geliştirilmiştir (48). Bu gelişme küçük çapta örneklerin analizi için sonuçlara ve çalışmaya katkı sağlasa da insan genomu, neandertel genomu gibi tüm genom araştırmalarında kısa sürelerde verimli sonuçlar elde etmek imkansızdır.

2.8.2 Kapiller Elektroforez

Kapiller elektroforez ise (CE) 25-75 µm çaplı, 100 cm. uzunluğunda silika kapiller boru kullanılarak gerçekleştirilen bir yöntemdir. Farklı modelleri bulunmaktadır. Genel olarak ince silika kapiller bir boru, iki elektrolit tampon haznesi,

bir yüksek voltaj güç kaynağı ve bir veri değerlendirme detektöründen oluşmaktadır. Isı dağılımı 25-30 kV'luk voltaj aralığında bir uygulamaya izin verir. Bu yüksek voltaj daha kısa sürede daha kaliteli bir ayırım yapmamızı ve daha fazla sayıda fraksiyonun elde edilmesini sağlar. Kapillerin sonundan yüksek bir voltaj uygulandığında örnek moleküller, iç kapiller yüzeyde aşırı (+) iyonların katoda doğru hareketinin sonucunda oluşan bir hacim akışı olan elektroozmotik akışla ayrılır. Örnekte bulunan yüke bakmaksızın bir kapillerdeki elektro-ozmotik akış normalde tüm iyonları katoda taşıyacak kadar güçlüdür. Bu nedenle örnek kapillere anodik uçtan verilir. Net hareket katoda doğru olduğundan ayırım anoda doğru geri geçiş hızlarındaki farklılıklara dayanır. Termal etkilere bağlı olarak kapiller duvarı ile merkez arasında viskozite farklılıkları bulunur. Örnekteki (+) iyonlar, elektroozmotik akış ve iyon hareketinin aynı yönde olması nedeniyle kapiller çıkışa daha erken gelirler. Örnekteki (-) iyonlar, aynı zamanda kapiller çıkışa hareket ederler, ama hızları daha yavaştır. Kapilerden geçen maddenin tespiti çeşitli detektörler aracılığı ile yapılmaktadır (49).

Kapiller elektroforezi, kısa analitik zaman, ayırım gücü, düşük reaktif (sadece tampon) sarfiyatı ve mikro düzeyde örnek hacmi ile çalışabilme özellikleri ile konvansiyonel elektroforez ve HPLC'ye göre avantaj sağlamaktadır. Dar çaplı tüplerde çalışılması nedeniyle artmış ısı dağılımı, azalmış örnek hacmi gerektirmesi ve otomasyona daha uygun olma gibi avantajlar sağlamaktadır. Ayırım çok yüksek uygulanabilen voltajla 10 dakikadan az bir sürede tamamlanabilir. Kapiller elektroforezin enstrümental avantajları ise otomasyonda kolaylık sağlaması ve detektör kullanımında çeşitliliğe izin vermesidir (48).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın deneysel bölümü İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü öğrenci laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışma esnasında kontaminasyon riskini önlemek için gerekli tüm önlemler alındı ve çalışmanın her aşamasında tek kullanımlık eldiven, bone ve maske kullanıldı.

Çalışma esnasında aşağıdaki aletlerden yararlanıldı:

- Derin Dondurucu
- Etüv
- ABI 310 genetik analizör
- Biometra Jel Görüntüleme Sistemi
- Blok Isıtıcı
- Geneamp 9700 PCR cihazı
- Mikro santrifüj
- Buzdolabı
- Florimetri
- Vorteks
- Agaroz jel elektroforez sistemi

Deneyler aşağıda belirtilen plana göre gerçekleştirildi.

- Örneklerin toplanması
- DNA izolasyonu
- DNA miktarının belirlenmesi
- Primerlerin hazırlanması
- dNTP karışımının hazırlanması
- Taq DNA polimeraz, 10X PCR tamponu ve $MgCl_2$ çözeltilerinin hazırlanması
- Birinci PCR aşaması (8389-8365 bölgesinin çoğaltılması)
- Agoroz jel elektroforezi
- Birinci PCR ürünlerinin saflaştırılması
- İkinci PCR aşaması (dizinleme için programlanmış PCR)
- İkinci PCR ürünlerinin saflaştırılması
- Örneklerin elektroforeze hazırlanması

- Elektroforez
- Analiz aşaması ve değerlendirme

3.1 Örneklerin Toplanması

Tez çalışmasında kullanılacak 150 kan örneği Türkiye'nin 7 farklı bölgesinden nüfus yoğunluğu göz önünde bulundurularak toplandı. Kan örnekleri alınan kişilere bilgilendirilmiş onam formu imzalatıldı. EDTA'lı tüplerde kontamine olmayacak koşullarda -20 derecede saklandı.

3.2 DNA İzolasyonu

İncelenmek üzere toplanan kan örneklerinden, DNA izolasyonu silika temelli İnvitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit® kullanılarak yapıldı. Kite ait prosedür Ek 1'de verilmiştir.

3.3 DNA Miktarlarının Belirlenmesi

Elde edilen izolatların DNA miktarı Quant-iT dsDNA HS Assay kit (invitrogen) kullanılarak Qubit® fluorometer cihazı ile ölçüldü. Miktar ölçümü yapılan örnekler PCR koşullarına uygun olacak şekilde distile su ile $M1 \times V1 = M2 \times V2$ formülü ile 1ng/ μ l DNA konsantrasyonunda olacak biçimde sulandırıldı. Miktar tayininde kullanılan prosedür Ek 2'de verilmiştir.

3.4 Primerlerin Hazırlanması

Liyofilize olarak sentezlenmiş primerlerden öncelikle stok çözelti hazırlandı. 100 μ M stok çözelti hazırlamak için kullanılan primerler, primer dizileri, primer miktarları ve eklenen steril distile su miktarları Tablo 1'de görülmektedir.

PCR aşamasında kullanılmak üzere hazırlanan primer ana stoklarından 2 μ M'lık primer çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti ve 2 μ M'lık primer çözeltileri -20 °C'de saklandı.

Tablo 1. Primer dizileri ve 100 μM 'lık stok çözeltiler hazırlamak için eklenen distile su miktarları.

Primer adı	Primer Dizisi	Miktar (nmol)	Eklenen (μl)	Su
TT20173-F	5'-CCCCTCTAGAGCCCATAAAGC-3'	44.9	449	
TT29174-R	5'-GTGCATGAGTAGGTGGCCTGC-3'	49.4	494	

3.5 Dntp Karışımının Hazırlanması

10 mM'lık paketler halinde satın alınan dATP, dCTP, dTTP, dGTP çözeltilerinden PCR aşamasında kullanmak üzere 1.25 mM konsantrasyonunda bir dNTP karışımı hazırlandı. Karışım, steril bir tüp içine her bir dNTP tüpünden 125 μl aktarıldıktan sonra üzerine 500 μl steril distile su eklenerek, toplam hacmi 1000 μl olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan dNTP karışımı $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

3.6 Birinci PCR Aşaması (8389-8865 bölgesinin çoğaltılması)

DNA konsantrasyonları 1ng olacak şekilde sulandırılan örnekler, hazırlanan PCR karışımına eklendi ve 9700 Geneamp PCR cihazında çoğaltıldı. Tzen ve arkadaşlarının metodu modifiye edilerek uygulandı. PCR karışım içeriği Tablo 2'de ve PCR parametreleri Tablo 3'te görülmektedir. Tzen ve ark. kullandığı metotta verilen primer konsantrasyonu ile sonuç elde edilemediği için 5nM, 10nM ve 1 μM primer konsantrasyonları hazırlandı ve en iyi sonuç alınan 1 μM Primer konsantrasyonu çalışmanın geri kalan bölümünde kullanıldı.

Tablo 2. PCR bileşenleri konsantrasyonları ve eklenen miktarlar

PCR bileşenleri	Eklenen hacimler (μ l) /reaksiyon	Reaksiyon konsantrasyonları
Taq polimeraz (5U/ μ l)	0.2 μ l	1 U/reaksiyon
MgCl ₂ (25mM)	2.0 μ l	1.5 mM/reaksiyon
10 X PCR tamponu	5.0 μ l	1 X/reaksiyon
dNTP karışımı (2.5 mM)	4.0 μ l	0.125 mM/reaksiyon
F primeri (5 μ M)	1.00 μ l	1 μ M/reaksiyon
R primeri (5 μ M)	1.00 μ l	1 μ M/reaksiyon
DNA	1-2ng	1 - 2 ng/reaksiyon
Distile su	Toplam hacim 50 μ l ye tamamlandı	

Tablo 3. Birinci PCR parametreleri

Aşama	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95 °C	10 dakika	1
	94 °C	1 dakika	
Bağlanma	56 °C	1 dakika	32
	72 °C	1 dakika	
Uzama	72 °C	10 dakika	1
Bekletme	4 °C	∞	

PCR aşamasında DNA'nın çoğalıp çoğalmadığını kontrol etmek için agaroz jel elektroforezi yapıldı. % 2'lik agaroz jel hazırlamak için beher içerisinde 1 gr agaroz tartıldı ve üzerine 50 ml 0,1 X TBE buffer (Tris-Borik asit-EDTA, pH:8) eklendi. Tampon içindeki agaroz eriyip ve şeffaflaşana kadar ısıtıcıda kaynatıldı. Ilık oluncaya kadar beklendikten sonra Etidyum bromür (EtBr) eklendi ve karıştırılarak homojen hale getirildi. Daha sonra jel agaroz tepsinine döküldü ve tarak yerleştirilerek polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra tarak yavaşça çıkarıldı ve tepsi içerisinde 0,1X TBE buffer bulunan tankın içerisine yerleştirildi. Bufferın jelin üzerini kapatmasına dikkat edildi. 3 μ l PCR ürünü 1.5 μ l yükleme tamponu (6x Loading Buffer, Takara) ile karıştırılarak jele yüklendi. Jel 90 V'da 20 dakika yürütüldü ve sonuçlar Biometra Jel Görüntüleme Sisteminde incelendi

3.7 Birinci PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünlerinin içerisinde hedef bölge dışında bağlanmamış primerler ve dNTP'ler bulunmaktadır. Bunların parçalanarak uzaklaştırılması için EXO 1 (Exonuclease 1) ve SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) karışımı hazırlandı. EXO 1 ortamdaki bağlanmamış primerlerin, SAP ise ortamdaki bağlanmamış dNTP'lerin parçalanması için kullanıldı. Kullanılan miktarlar Tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 4. Exo-Sap karışımının hazırlanması

Bileşenler	Kullanılan Miktar (μl/reaksiyon)
Shrimp Alkaline Phosphatase (1U/ μl)	0.65
Exonuclease 1 (5U/ μl)	0.35
PCR ürünü	3.75

Hazırlanan karışım PCR cihazına yerleştirildi ve önceden programlanmış EXO-SAP programı çalıştırıldı. Bağlanmamış primerlerin ve dNTP'lerin parçalanıp uzaklaştırılması için EXO ve SAP'ın aktif olduğu 37°C'de 90 dakika ve enzimlerin inaktivasyonu için 80°C'de 20 dakika inkübe edildi.

3.8 İkinci PCR Aşaması

Birinci PCR ürünlerinin saflaştırıldıktan sonra dizinlemesi için BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit kullanıldı. Sanger Zincir Sonlandırma prensibine dayanan kitin içeriği Tablo 5 de görülmektedir. Kitin içeriğinde bulunan ddNTPler'in işaretlendiği flüoresan boyalar Tablo 6'da görülmektedir.

Tablo 5. BigDye Terminator 3.1 kit içeriği

BigDye Terminator 3.1 kit içeriği	Bileşenleri	Saklama koşulları
Hazır reaksiyon karışımı	AmpliTaq DNA Polimeraz Farklı floresan boyalarla işaretlenmiş ddNTPler Reaksiyon tamponu İşaretlenmemiş dNTPler	-20°C
5 X Dizinleme tamponu	-	2-8 °C
Kontrol DNA	pGEM®-3Zf(+) çift zincirli DNA	-20°C
Kontrol primer karışımı	-21 M13 Kontrol Primer 3.2 µM	-20°C

Tablo 6. BigDye Kit'i içeriğindeki ddNTP'ler ve işaretlemede kullanılan flüoresan boyalar.

Dideoksi bazlar	Flüoresan boya	Elektroforegram rengi
ddATP	dR6G	Yeşil
ddCTP	DTAMRA	Mavi
ddGTP	dR110	Siyah
ddTTP	dROX	Kırmızı

İkinci PCR karışımı sıcaktan etkilenmemesi için soğuk kalıp üzerinde hazırlandı. Tek bir tamamlayıcı zincir oluşturarak dizini tespit etmek için bu aşamada yalnızca forward primeri kullanıldı. İkinci PCR aşamasında örneklerin çoğaltılması için hazırlanan PCR karışımında dizinleme primeri ve saflaştırılmış PCR ürün miktarları, Bigdye Terminator 3.1 Kit prosedürünün önerdiği miktarlar modifiye edilerek kullanıldı.

İkinci PCR için karışımında Tablo 7'de belirtilen miktarlar kullanıldı. PCR tüplerinin iç kısmında kalan damlaları dibe indirmek için kısa süre santrifüj yapıldı. Tüpler PCR cihazına yerleştirildi ve Tablo 8'de verilen PCR koşullarında ikinci PCR aşaması gerçekleştirildi.

Tablo 7. İkinci PCR karışım miktarları.

Bileşenler	Örnek (µl/reaksiyon)	Negatif Kontrol (µl/reaksiyon)	Pozitif Kontrol (µl/reaksiyon)
Bigdye Terminator 3.1 hazır reaksiyon karışımı	4	8	8
5 X dizileme tamponu	2	0	0
Dizileme primeri	1.5	0	0
Saflaştırılmış PCR ürünü	1	0	0
-M13 kontrol primeri	0	1	1
pGEM®-3Zf(+) çift zincirli Kontrol DNA DNA	0	0	1
Distile su	12.5	11	10

Tablo 8. İkinci PCR koşulları (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protokol 2002)

Aşama	Sıcaklık	Zaman (saniye)	Döngü sayısı
Denatürasyon	96 °C	10	25
Bağlanma	50 °C	5	
Uzama	60 °C	240	
Bekletme	4 °C	∞	

3.9 İkinci PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

İkinci PCR ürünlerinin dizinlenebilmesi için ortamda bulunan bağlanmamış flüoresan işaretli ddNTPlerin uzaklaştırılması için ayrı bir kit kullanıldı. Zymogen Sequencing Clean Up Kit ile yapılan saflaştırmanın prosedürü Ek 3'te verilmiştir.

3.10 Kapiller Elektroferezde Dizinleme Aşaması

Saflaştırılmış ikinci PCR ürünleri ABI 310 Genetik Analizör'de (Applied Biosystems) cihazına uygun 0,5 ml'lik steril tüplere aktarıldı ve üzerleri septa ile kapatıldı. Daha sonra tüpler ABI 310 Genetik Analizör cihazının örnek yükleme tablasına yerleştirilerek elektroferez gerçekleştirildi.

ABI 310 Genetik Analizöre yüklenen örneklerin elektroferez işlemi Tablo 9'daki parametreler seçilerek yapıldı.

Tablo 9. Dizin analizi parametreleri.

Parametre	Pop 4 ile yapılan yürütme
Matriks	Sequencing matrix
Run modüle	P4RapidSeq (1 mL) E
Dye Set/Primer (Mobility) File	DT310POP4{BDv3}v1.mob

3.11 Sonuçların Kontrol Edilmesi

ABI 310 genetik analizör cihazında yürütülerek elde edilen ham veriler Seqscape (versiyon 2.7), Finch TV, Sequencher 4.10.1 programları ile analiz edildi. SeqScape programına önceden yüklenmiş olan Cambridge Referans dizi ile örneklerden elde edilen mtDNA profilleri karşılaştırılarak polimorfik noktalar belirlendi.

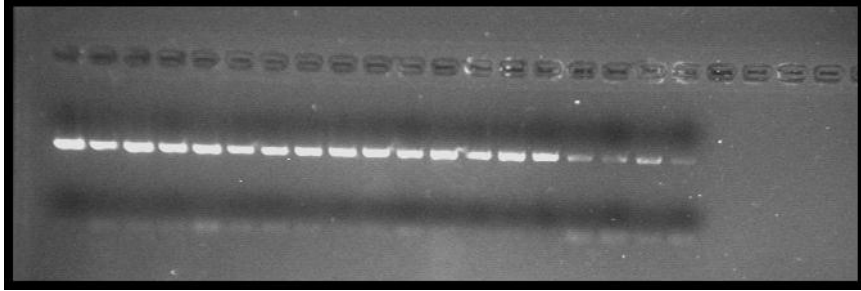
4. BULGULAR

Tez çalışmasında aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan, rastgele seçilen, Türkiye'nin yedi farklı bölgesinden nüfus dağılımına göre belirlenen sayıda, toplam 150 kişiden alınan kan örnekleri gereç ve yöntem bölümünde de verildiği gibi aşağıdaki sıralamaya göre incelendi:

- Örneklerin toplanması
- DNA izolasyonu
- DNA izolatlarındaki DNA miktarının belirlenmesi
- Birinci PCR aşaması
- Agaroz jel elektroforezi
- Birinci PCR ürünlerinin saflaştırılması
- İkinci PCR aşaması
- İkinci PCR ürünlerinin saflaştırılması
- Elektroforez

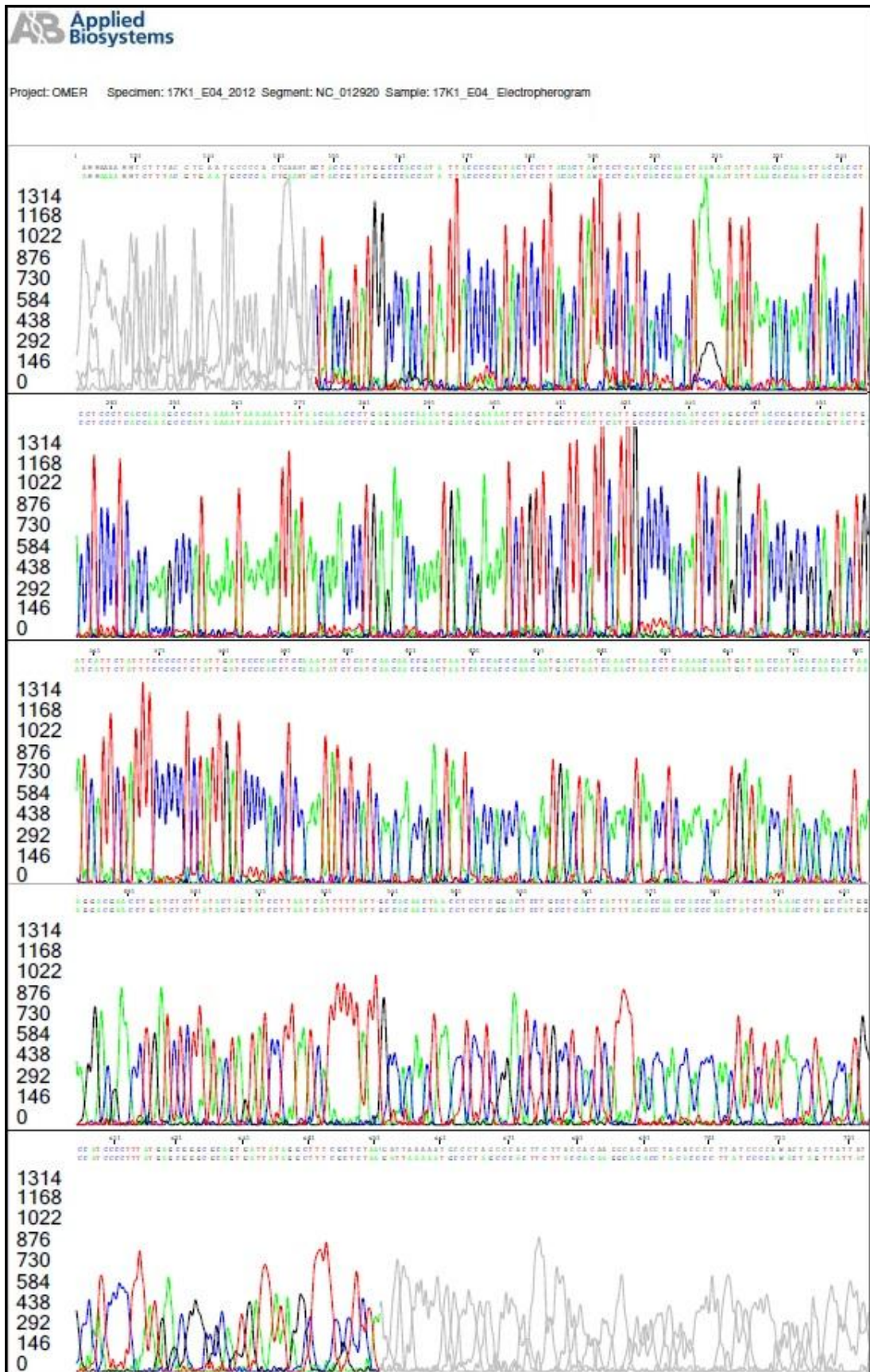
Şekil 5'te Birinci PCR aşamasında DNA'nın çoğaldığını göstermek üzere yapılan agaroz jel elektroforez sonucu görülmektedir.

Şekil 5. Birinci PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.



Yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermek için rastgele seçilen 5 örnek farklı zamanlarda aynı kişi tarafından tekrar çalışıldı ve aynı genotip elde edildi. Tekrarlanabilirlik çalışması yapılan bir örneğe ait iki elektroforegram Şekil 6 ve Şekil 7'de görülmektedir.

Şekil 7. Örneğin tekrar çalışılarak elde edilen ikinci elektroforegramı.



Çalışılan tüm örneklerin Cambrige Reference Sequence dizisi ile karşılaştırılmaları sonucu belirlenen polimorfik noktalar Tablo 10’da verildi. Tabloda “ * ” ile gösterilen örnekler incelenen bölge için Cambrige Reference Sequence dizisi ile aynı genotipi göstermektedir. Cambrige Reference Sequence dizisi Ek 5’te verildi.

Tablo 10. Kodlanan bölgedeki tespit edilen polimorfizmler.

Örnek Numarası	Kodlanan Bölgedeki Tespit Edilen Polimorfizmler
1	8460delA 8563a>G 8695delA 8753t>A 8754c>T 8755a>C 8755-8756insAT 8784-8785insA 8855-8856insC 8860a>G
2	8573g>A 8860a>G
3	8691a>C 8692-8693delCA 8697g>A 8828delA 8860a>G
4	8398delC 8417c>T 8430t>A 8448t>A 8449a>T 8484delA 8495delA 8563a>G 8622delC 8642delA 8679delA 8701delA 8718delA 8828-8829delAC 8860a>G
5	8447a>T 8448t>A 8691a>C 8692-8693delCA 8860a>G
6	8679delA 8691delA 8718delA
7	8860a>G
8	8495-8496insA 8522c>A 8714c>T 8722c>G 8731t>A 8738t>A 8765c>G
9	8860a>G
10	8675t>C 8684c>T 8860a>G
11	8495delA 8860a>G
12	8860a>G
13	8860a>G
14	8631delA 8691delA 8711delA 8752delA 8771c>T 8772-8773delTA 8788delC 8847delC
15	8860a>G
16	8860a>G
17	8860a>G
18	8414c>T 8701a>G 8860a>G
19	8697g>A 8860a>G
20	8563a>G 8794c>T 8860a>G
21	8860a>G
22	8481c>T 8860a>G
23	8840c>G 8860a>G
24	8697g>A 8860a>G
25	8691delA
26	8860a>G
27	8642a>G
28	8860a>G
29	8697g>A 8860a>G
30	8512a>G
31	8512-8513insA
32	8860a>G
33	8817delA

Tablo 10. Devamı

Örnek Numarası	Kodlanan Bölgedeki Tespit Edilen Polimorfizmler
35	8447delA 8502delA 8642delA 8679delA 8691a>C 8692-8693delCA 8752delA 8772t>A 8775c>A 8789t>G 8790-8791delGC
36	8473t>C
37	8811-8812insCA 8812a>C
38	8860a>G
39	8860a>G
40	8697g>A 8860a>G
41	8649-8650insACT 8650c>A 8654t>C
42	*
43	8496t>A 8497a>T 8503t>A 8504t>A 8506-8507insTATA 8522c>A 8523-8524insCA 8532c>A 8533g>C
44	8454delA 8472c>T 8495-8496insA 8502-8503insA 8537-8538insA
45	*
46	8697g>A
47	8860a>G
48	8698a>G 8860a>G
49	8502-8503insA 8512-8513insA 8527-8528insA 8537-8538insA 8543-8544insT
50	*
51	8730-8731insA 8763t>G 8771c>A 8772t>C
52	8860a>G
53	8860a>G
54	8860a>G
55	8398delC 8557g>A
56	8860a>G
57	8697g>A 8860a>G
58	*
59	8840c>G
60	8691delA 8697g>A 8765c>G 8840c>G 8860a>G
61	8715-8716insT 8808a>C 8812a>C
62	8847delC 8860a>G
63	8512delA 8557g>A 8754c>T 8755a>C 8755-8756insAT 8779-8780insC
64	8447delA 8796c>A
65	8752-8753insA 8828delA 8847delC
66	*
67	8847delC 8860a>G
68	8538t>C
69	8485g>A 8584g>A 8691delA 8701a>G 8718-8719insAG 8860a>G
70	8389delA 8455c>T 8567t>C 8697g>A 8847c>T 8860a>G
71	8472c>T 8836a>G 8847delc 8860a>G

Tablo 10. Devamı

Örnek Numarası	Kodlanan Bölgedeki Tespit Edilen Polimorfizmler
73	8860a>G
74	8725a>G 8860a>G
75	8697g>A 8860a>G
76	8527a>T 8528t>G
77	8860a>G
78	8557g>A 8860a>G
79	8697g>A 8860a>G
80	8447-8448insA 8496t>A 8519g>A 8523c>A 8538t>A 8539c>T 8540t>G 8561-8562insCC 8580-8581insC 8592-8593insG
81	*
82	8455c>T 8697g>A 8860a>G
83	*
84	8502-8503insA 8522c>A 8537-8538insA 8575-8576insC 8605c>T 8610t>C
85	8847delC
86	8860a>G
87	8860a>G
88	8860a>G
89	8860a>G
90	8481c>T 8695delA
91	8860a>G
92	8440delA
93	8631delA 8691a>C 8692-8693delCA 8701delA 8718delA 8725delA 8752delA 8842a>T 8843-8844delTC
94	8481c>T
95	8485g>A
96	8697g>A
97	*
98	8512-8513insA
99	*
100	8557g>A
101	8485g>A 8502-8503insA 8549c>T 8550a>C 8551t>A 8553c>T 8554a>T
102	8679delA 8705t>C
103	8860a>G
104	8566delA 8860a>C 8575delC
105	8815delC 8847delC 8860a>G
106	8858delG 8860a>G
107	*
108	8589-8590insA
109	8447delA 8860a>G
110	*
111	8691delA

Tablo 10. Devamı

Örnek Numarası	Kodlanan Bölgedeki Tespit Edilen Polimorfizmler
112	8447-8448insA 8481c>T 8860a>G
113	8481c>T 8807c>G 8860a>G
114	8447delA 8527delA
115	8456a>C 8472c>T 8836a>G 8860a>G
116	8860a>G
117	8860a>G
118	8631delA 8691a>C
119	8401a>G 8697g>A 8860a>G
120	8860a>G
121	8455c>T 8597t>C 8697g>A
122	8860a>G
123	8691delA 8697g>A 8860a>G
124	8860a>G
125	8860a>G
126	8742a>G 8860a>G
127	8860a>G
128	8817delA 8839insG 8860a>G
129	8860a>G
130	8691delA 8815delC 8860a>G
131	8392insG 8573insG 8691delA 8860a>G
132	8860a>G
133	8842delC 8860a>G
134	8503t>C 8860a>G 8894delA
135	8472c>T 8502delA 8562insC
136	8711delA 8817delA 8691a>C 8697g>A 8860a>C
137	8587delG
138	8679delA 8691delA 8711delA
139	8455c>T 8567t>C 8697g>A 8860a>G
140	8495a>T 8815delc
141	8735t>C
142	8828dela 8843t>C 8860a>G
143	8691dela 8817dela 8828a>C 8830c>T 8860a>G
144	8373a>C 8860a>G
145	8679delA 8691delA 8828delA
146	8701a>G 8815delc 8860a>G
147	8817dela 8835delc 8860a>G
148	8691dela 8815delc 8828dela 8860a>G
149	8860a>G
150	*

İncelenen örneklerde en çok görülen mutasyon 88 kişide tespit edilen 8860a>G, 19 kişide 8697g>A, 8 kişide 8847delc ve 13 kişide 8691dela'ndi. Ayrıca 12 kişide Cambridge Reference Sequence dizisi ile aynı genotip saptandı. Türkiye Toplumunda sık rastlanan mutasyonlar ve diğer ülkeler ile yapılan karşılaştırma sonuçları Tablo 11'de görülmektedir.

Tablo 11. Mitokondriyal DNA'nın mutasyon oranları açısından Alman ve Tayvan Toplumunu ile karşılaştırılması

Pozisyon	Kişi sayısı (n=150)	Türk Toplumu (%)	Alman (%) *	Tayvan (%) **	Tayvan (%) ***
8860a>G	88	58.6	64	61.2	51.2
8697g>A	19	12.6	6.1	-	-
8691delA	13	8.6	-	-	-
8847delC	8	6	-	-	-
8679delA	6	4.34	-	-	-
8828delA	5	3.62	-	-	-
8481c>T	5	3.62	-	-	-
8815delC	5	3.62	-	-	-
8817delA	5	3.62	-	-	-
8691a>C	4	2.89	-	-	-
8701a>G	3	2.17	-	52.5	39.5
8354c>T	-	-	3.3	-	-
8448t>C	-	-	2.8	-	-
8473t>C	1	0.72	2.8	-	-
8584g>A	1	0.72	-	-	14.3
8414c>T	1	0.72	-	-	8.4

* Poetscha ve ark. 2003'te Alman popülasyonu için 119 adli tıp olgusu üzerinde yaptıkları çalışma sonuçları (12).

** Tayvan popülasyonunda 80 kişi üzerinde yapılan “A Polymorphic Study Of Mitochondrial DNA In The Coding Region and Its Forensic Application” adlı tez çalışmasının sonuçları (52).

*** Tzen ve ark. 2001 yılında 18. yy’da Tayvan’a göç ile gelen Çin topluluklarının çoğunlukta olduğu, 119 kişilik bir popülasyon üzerine yapılan çalışma sonuçları (5).

Bu çalışmada tespit edilen polimorfizmlere göre haplotipler gruplandırıldı (Tablo 12), bu gruplandırmaya Cambrige Reference Sequence dizisi ile aynı genotip gösteren kişiler dahil edilmedi. Ayrım gücü ve rastgele eşleşme olasılıkları hesaplandı.

Tablo 12. Haplotip Grupları

	Polimorfizmler	Görüldüğü Kişi Sayısı	Xi	Xi²
1	8460delA 8563a>G 8695delA 8753t>A 8754c>T 8755a>C 8755-8756insAT 8784-8785insA 8855-8856insC 8860a>G	1	0,0072	0,000052
2	8573g>A 8860a>G	1	0,0072	0,000052
3	8691a>C 8692-8693delCA 8697g>A 8828delA 8860a>G	1	0,0072	0,000052
4	8398delC 8417c>T 8430t>A 8448t>A 8449a>T 8484delA 8495delA 8563a>G 8622delC 8642delA 8679delA 8701delA 8718delA 8828-8829delAC 8860a>G	1	0,0072	0,000052
5	8447a>T 8448t>A 8691a>C 8692-8693delCA 8860a>G	1	0,0072	0,000052
6	8679delA 8691delA 8718delA	1	0,0072	0,000052
7	8860a>G	36	0,2609	0,068053
8	8495-8496insA 8522c>A 8714c>T 8722c>G 8731t>A 8738t>A 8765c>G	1	0,0072	0,000052
9	8675t>C 8684c>T 8860a>G	1	0,0072	0,000052
10	8495delA 8860a>G	1	0,0072	0,000052
11	8631delA 8691delA 8711delA 8752delA 8771c>T 8772-8773delTA 8788delC 8847delC	1	0,0072	0,000052
12	8414c>T 8701a>G 8860a>G	1	0,0072	0,000052
13	8697g>A 8860a>G	7	0,0507	0,002573
14	8563a>G 8794c>T 8860a>G	1	0,0072	0,000052
15	8481c>T 8860a>G	1	0,0072	0,000052
16	8840c>G 8860a>G	1	0,0072	0,000052
17	8691delA	2	0,0145	0,000210

	Polimorfizmler	Görüldüğü Kişi Sayısı	X_i	X_i^2
18	8642a>G	1	0,0072	0,000052
19	8512a>G	1	0,0072	0,000052
20	8512-8513insA	2	0,0145	0,000210
21	8817delA	1	0,0072	0,000052
22	8697g>A	3	0,0217	0,000473
23	8447delA 8502delA 8642delA 8679delA 8691a>C 8692-8693delCA 8752delA 8772t>A 8775c>A 8789t>G 8790-8791delGC	1	0,0072	0,000052
24	8473t>C	1	0,0072	0,000052
25	8811-8812insCA 8812a>C	1	0,0072	0,000052
26	8649-8650insACT 8650c>A 8654t>C	1	0,0072	0,000052
27	8496t>A 8497a>T 8503t>A 8504t>A 8506-8507insTATA 8522c>A 8523-8524insCA 8532c>A 8533g>C	1	0,0072	0,000052
28	8454delA 8472c>T 8495-8496insA 8502-8503insA 8537-8538insA	1	0,0072	0,000052
29	8698a>G 8860a>G	1	0,0072	0,000052
30	8502-8503insA 8512-8513insA 8527-8528insA 8537-8538insA 8543-8544insT	1	0,0072	0,000052
31	8730-8731insA 8763t>G 8771c>A 8772t>C	1	0,0072	0,000052
32	8398delC 8557g>A	1	0,0072	0,000052
33	8840c>G	1	0,0072	0,000052
34	8691delA 8697g>A 8765c>G 8840c>G 8860a>G	1	0,0072	0,000052
35	8715-8716insT 8808a>C 8812a>C	1	0,0072	0,000052
36	8847delC 8860a>G	3	0,0217	0,000473
37	8512delA 8557g>A 8754c>T 8755a>C 8755-8756insAT 8779-8780insC	1	0,0072	0,000052
38	8447delA 8796c>A	1	0,0072	0,000052
39	8752-8753insA 8828delA 8847delC	1	0,0072	0,000052
40	8538t>C	1	0,0072	0,000052
41	8485g>A 8584g>A 8691delA 8701a>G 8718-8719insAG 8860a>G	1	0,0072	0,000052
42	8389delA 8455c>T 8567t>C 8697g>A 8847c>T 8860a>G	1	0,0072	0,000052
43	8472c>T 8836a>G 8847delc 8860a>G	1	0,0072	0,000052
44	8725a>G 8860a>G	1	0,0072	0,000052
45	8527a>T 8528t>G	1	0,0072	0,000052
46	8557g>A 8860a>G	1	0,0072	0,000052

	Polimorfizmler	Görüldüğü Kişi Sayısı	Xi	Xi²
47	8447-8448insA 8496t>A 8519g>A 8523c>A 8538t>A 8539c>T 8540t>G 8561-8562insCC 8580-8581insC 8592-8593insG	1	0,0072	0,000052
48	8455c>T 8697g>A 8860a>G	1	0,0072	0,000052
49	8502-8503insA 8522c>A 8537-8538insA 8575-8576insC 8605c>T 8610t>C	1	0,0072	0,000052
50	8847delC	1	0,0072	0,000052
51	8481c>T 8695delA	1	0,0072	0,000052
52	8440delA	1	0,0072	0,000052
53	8631delA 8691a>C 8692-8693delCA 8701delA 8718delA 8725delA 8752delA 8842a>T 8843-8844delTC	1	0,0072	0,000052
54	8481c>T	1	0,0072	0,000052
55	8485g>A	1	0,0072	0,000052
56	8512-8513insA	1	0,0072	0,000052
57	8557g>A	1	0,0072	0,000052
58	8485g>A 8502-8503insA 8549c>T 8550a>C 8551t>A 8553c>T 8554a>T	1	0,0072	0,000052
59	8679delA 8705t>C	1	0,0072	0,000052
60	8566delA 8860a>C 8575delC	1	0,0072	0,000052
61	8815delC 8847delC 8860a>G	1	0,0072	0,000052
62	8858delG 8860a>G	1	0,0072	0,000052
63	8589-8590insA	1	0,0072	0,000052
64	8447delA 8860a>G	1	0,0072	0,000052
65	8447-8448insA 8481c>T 8860a>G	1	0,0072	0,000052
66	8481c>T 8807c>G 8860a>G	1	0,0072	0,000052
67	8447delA 8527delA	1	0,0072	0,000052
68	8456a>C 8472c>T 8836a>G 8860a>G	1	0,0072	0,000052
69	8631delA 8691a>C	1	0,0072	0,000052
70	8401a>G 8697g>A 8860a>G	1	0,0072	0,000052
71	8455c>T 8597t>C 8697g>A	1	0,0072	0,000052
72	8691delA 8697g>A 8860a>G	1	0,0072	0,000052
73	8742a>G 8860a>G	1	0,0072	0,000052
74	8817delA 8839insG 8860a>G	1	0,0072	0,000052
75	8691delA 8815delC 8860a>G	1	0,0072	0,000052
76	8392insG 8573insG 8691delA 8860a>G	1	0,0072	0,000052
77	8842delC 8860a>G	1	0,0072	0,000052
78	8472c>T 8502delA 8562insC	1	0,0072	0,000052
79	8711delA 8817delA 8691a>C 8697g>A 8860a>C	1	0,0072	0,000052
80	8587delG	1	0,0072	0,000052
81	8679delA 8691delA 8711delA	1	0,0072	0,000052

	Polimorfizmler	Görüldüğü Kişi Sayısı	Xi	Xi²
82	8455c>T 8567t>C 8697g>A 8860a>G	1	0,0072	0,000052
83	8495a>T 8815delc	1	0,0072	0,000052
84	8735t>C	1	0,0072	0,000052
85	8828dela 8843t>C 8860a>G	1	0,0072	0,000052
86	8691dela 8817dela 8828a>C 8830c>T 8860a>G	1	0,0072	0,000052
87	8679delA 8691delA 8828delA	1	0,0072	0,000052
88	8701a>G 8815delc 8860a>G	1	0,0072	0,000052
89	8817dela 8835delc 8860a>G	1	0,0072	0,000052
90	8691dela 8815delc 8828dela 8860a>G	1	0,0072	0,000052
	TOPLAM	138	1,0000	0,076359

En çok rastlanan haplotipler 8860a>G (36 kişi), 8697g>A 8860a>G (7 kişi), 8847delC 8860a>G (3 kişi), 8691delA (2 kişi), 8512–8513insA (2 kişi) ve 8697g>A (3 kişi).

Çalışmada toplam 38 insersiyon, 95 delesyon tipi değişim görülmüştür. Transversiyon sonucu oluşan baz değişimleri ise Tablo 13’de verilmiştir.

Tablo 13. Baz Değişimleri

Mutasyon Tipi		Mutasyon Tipi	
Transisyon	Sayısı	Transversiyon	Sayısı
t>C	13	a>C	16
c>T	27	c>A	9
g>A	29	a>T	7
a>G	100	t>A	13
TOPLAM	169	g>T	0
		t>G	4
Mutasyon Tipi	Sayısı	g>C	1
İnsersiyon	38	c>G	7
Delesyon	95	TOPLAM	57

İstatistik Verileri

X_i : Haplotip sayısı, n : Toplam kişi sayısı

X_i : Görülen kişi sayısının toplam kişiye bölünmesiyle hesaplandı.

Rastgele eşleşme olasılığı

$$P = \sum (X_i^2)$$

$$= 0,076359$$

Ayrım gücü

$$DP = 1 - \sum (X_i^2)$$

$$= 0,923641$$

Genetik çeşitlilik

$$h = \frac{(1 - \sum X^2)n}{(n-1)}$$

= 0,9303827 olarak hesaplandı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

nDNA analizi adli bilimlerde rutin olarak uygulanan ve birçok davayı çözümlenmede yardımcı olan bir tekniktir. Rutin olarak uygulanan analiz yöntemleri ile sonuç alınamadığı durumlarda mtDNA dizin analizi gibi alternatif yöntemler kullanılmaktadır. Mitokondriyal DNA dizin analizi tekniği kullanılarak çözülmeye çalışılan olgularda genellikle mtDNA'nın HVI ve HVII bölgelerindeki polimorfizm sonuçlarına göre bir değerlendirme yapılmaktadır. Ancak bu bölgelerin ayırım gücü sınırlıdır. Söz konusu ayırım gücünü artırmak için mtDNA'nın kodlama yapan bölgeleri de incelenmeye başlanmıştır. Bu çalışmanın amacı mtDNA'nın kodlama yapan kısmında yer alan 8389-8865 baz çiftleri arasındaki bölgenin dizin analizi yapılarak Türkiye Toplumundaki mutasyonları belirlemek ve polimorfizm açısından adli bilimlerde kullanmaya elverişli olup olmadığını tespit etmektir. Bu çalışmanın tamamlanması ile çalışmaya konu olan bölge de, mtDNA ile yapılan idantifikasyon çalışmalarında ayırım gücünü artırmak için kullanılabilir.

Adli bilimlerde DNA analizlerinde incelenen bölgelerin seçilmesi sırasında etik değerler göz önüne alınmalı, kişinin etnik kökeni ve hastalıkları ile ilgili olmayan bölgeler seçilmelidir. Bu nedenle çoğunlukla mtDNA dizin analizlerinde kontrol bölgesinde yer alan ve kodlama yapmayan HV1 ve HV2 bölgeleri kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında seçilen bölge ise giriş bölümünde bahsedildiği gibi kodlama yapmasına rağmen fenotipe etkisi azdır, hastalıklarla ilişkili kısmı çalışma dışında tutulmuştur. Adli bilimlere etiğine uygunluk açısından 8344 Myoclonic epilepsy, ragged-red fiber (9), 8363 ataxia (10) ve 8993 nörojenik kas güçsüzlüğü, ve 8356 retinitis pigmentosa (11) gibi hastalıklar çalışma dışında tutulmuştur (12,13).

Adli laboratuvarlarda rutin olarak STR analizleri yapılmaktadır. Bu analiz için gerekli olan PCR ve kapiller elektroforez aynı zamanda Sanger dizinleme yönteminde de kullanılabilir. Bu nedenle adli bilimlerde laboratuvarında ayrıca bir alt yapı yatırımı gerektirmeyen Sanger dizinleme yöntemi tercih edilmektedir. Bu çalışmanın temel prensibi de Sanger dizinleme yöntemidir. Ayrıca bu çalışmada hastalıklarla ilişkisi bulunmayan ve DNA çoğaltma ve dizin analizinde düşük mtDNA miktarıyla çalışmaya uygun olan Chin-Yuan Tzen ve arkadaşlarının PCR koşulları uygulandı.

Çalışmanın tekrarlanabilirliği için rastgele seçilen 5 örnek farklı zamanlarda aynı kişi tarafından iki kez çalışıldı. İki çalışma sonucunda elde edilen genotipler karşılaştırıldı ve aynı genotiplerin elde edildiği belirlendi. Bu şekilde çalışmanın tekrarlanabilirliği tespit edilmiş oldu.

Cambridge reference sequence ile 150 kişinin dizin analizleri karşılaştırıldı ve SeqScape programı ile doğrulanarak mutasyonlar belirlendi. Andrews ve Ark. tarafından yapılan bir çalışma ile Cambridge reference sequence yeniden analiz edilmiş, ilkiyle karşılaştırılmış ve 8860 pozisyonundaki a>G baz değişiminin tüm dünyada çok sık görülen bir polimorfizm olduğu belirtmiştir(50,51). Bu çalışmada da en sık rastlanan mutasyon % 58.6 oranıyla 8860 pozisyonundaki a>G değişimidir. Söz konusu mutasyon Alman toplumunda % 64(12), Tayvan toplumunda yapılan iki farklı çalışmanın birinde % 61.2 (52) ve diğerinde % 51.2 (4) olarak tespit edilmiştir. İkinci en sık görülen mutasyon ise %12.6 ile 8697g>A değişimidir. Bu noktanın Alman popülasyonunda görülme sıklığı ise % 6.1'dir. Sırası ile diğer sık rastlanan polimorfizmler ise %8.6 ile 8691delA, % 6 ile 8847delC, % 4.34 ile 8679delA, %3.62 ile 8828delA, %3.62 ile 8481c>T, % 3.62 ile 8815delC, %3.62 ile 8817delA, %2.89 ile 8691a>C, % 2.17 ile 8701a>G ve % 0.72 ile 8473t>C, 8584g>A, 8414c>T değişimleridir. 8701a>G değişimi Tayvan toplumunda bir çalışmada %52.5 (52) ve diğerinde %39.5 (4) olarak saptanmıştır. Bu oran Türkiye Toplumuna (%2.17) göre oldukça yüksektir. Türkiye Toplumunda % 0.72 olarak saptanan 8473t>C değişimi ise Alman Toplumunda % 2.8 gibi daha yüksek bir oranda saptanmıştır. Türkiye Toplumunda % 0.72 olarak saptanan 8584g>A ve 8414c>T değişimi ise Tayvan Toplumunda sırası ile %14.3 ve %8.4 gibi yüksek oranda saptanmıştır. Ayrıca 8691delA, 8847delC, 8679delA, 8828delA, 8481c>T, 8815delC, 8817delA, 8691a>C değişimleri Türkiye Toplumunda görülürken Alman ve Tayvan Toplumlarında rastlanmamıştır. Alman Toplumunda 8354c>T değişimine % 3.3 oranında ve 8448t>C değişimine ise % 2.8 oranında rastlanırken Türkiye ve Tayvan Toplumlarında görülmemektedir. Bu karşılaştırmadan da anlaşılacağı gibi mutasyonların görülme sıklıkları toplumdan topluma değişmektedir.

Bu çalışmada toplam 169 bir purin bazının diğer bir purin bazına dönüşümünü ifade eden transisyon tipi mutasyona, 57 bir purin bazının primidine veya bir primidin bazının purine dönüşümünü ifade eden transversiyon tipi mutasyona, 38 diziyeye bir bazın eklendiğini ifade eden insersiyon tipi mutasyona ve 95 diziden bir bazın

eksildiğini ifade eden delesyon tipi mutasyona rastlanmıştır. Söz konusu mutasyon tiplerine ait dağılım Tablo 13’de görülmektedir. Bu çalışmada g>T değişimi gösteren transisyon tipi mutasyona rastlanmamıştır. Bu sonuçlar Türkiye Toplumunda mutasyon tipi açısından da önemli bir çeşitlilik bulunduğunu göstermektedir.

İki farklı bireyin incelediğimiz bölge üzerinde aynı genotipe sahip olma olasılığı 0,076359 olarak hesaplandı. Bu oran Türkiye Toplumunda iki kişinin tesadüfen aynı genotipe sahip olma olasılığının oldukça düşük olduğunu göstermektedir. Buna rağmen ayırım gücü 0,923641 olarak hesaplandı. İncelediğimiz bölgenin ayırım gücü tek başına adli bilimciler için yeterli olmasa da, incelenen bölgenin hastalıklarla ilişkisi olmayan 9021 bazına kadar genişletilerek incelenmesi, HVI ve HVII gibi mtDNA’nın polimorfik bölgelerinin birlikte değerlendirilmesi durumunda ayırım gücü artacaktır.

Günümüzde mtDNA analizlerinde heteroplazmiye rastlanabileceği bilinmektedir. Bu çalışmada her hangi bir heteroplazmiye rastlanmamış olmakla birlikte, bu aynı kişilerin farklı dokuları çalışıldığında da rastlanmayacağı anlamına gelmez. Bu nedenle adli bilimlerde idantifikasyon amaçlı iki örnek karşılaştırıldığında heteroplazmiye dikkat etmek gerekmektedir. Heteroplazmik bir durum söz konusu olduğunda değerlendirme yapmak zor olmaktadır.

Bu popülasyon çalışması Türkiye Toplumunda mtDNA’nın kodlama yapan kısmında yer alan 8389-8865 baz çiftleri arasındaki bölgenin oldukça polimorfik olduğu ve adli bilimlerde idantifikasyon amacı ile kullanılabilceğini göstermektedir.

6. ÖZET

Mitokondriyal DNA genellikle düşük miktarda DNA içeren ve degrede örneklerde kullanılmaktadır. Her bir hücrede tek bir nükleer DNA bulunmasına rağmen yüksek mitokondri kopyası nedeniyle mitokondriyal DNA'nın çok sayıda kopyası mevcuttur. Bu sebeple degrede örneklerde mtDNA ile çalışmak avantaj sağlamaktadır. Adli bilimlerde rutin olarak HV1 HVII ve HVIII bölgeleri kimliklendirme amacıyla kullanılmaktadır. Fakat bu bölgelerin ayırım gücü sınırlıdır. Bu bölgelerle beraber alternatif olarak, kodlanan bölgenin de çalışılması ayırım gücünü yükseltecektir.

Türkiye popülasyonuna ait aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 150 kişiden alınan örneklerle kodlanan bölgenin 8389-8865 baz çiftleri arasındaki bölüm çalışıldı. DNA izolasyonu, silika tabanlı İnvitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit®'i kullanılarak yapıldı. Söz konusu bölgenin PCR Tzen ve arkadaşlarının yöntemine uygun şekilde çoğaltıldı. PCR ürünlerinin dizin analizi ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit ile yapıldı. Görüntülenen diziler Cambrige Reference Sequence ile karşılaştırıldı. En yaygın polimorfizmlerin 8860G, 8697A, 8847delC, 8691delA olduğu tespit edildi. Çalışılan bölgenin ayırım gücü 0.923641, rastgele eşleşme olasılığı 0.076359 ve genetik çeşitlilik 0.9303827 olarak hesaplandı. Farklı ülkelerde yapılan benzer çalışmalar ile sonuçlar karşılaştırıldı.

Bu verilerin doğrultusunda incelediğimiz bölge ile kişiler arası ayırım yapabileceğimiz ve HVI, HVII, HVIII bölgeleri ile beraber çalışılarak ayırım gücünü artırılabilceği saptandı.

7. SUMMARY

Mitochondrial DNA can be used for forensic casework especially when biological samples are degraded and contained a low amount of DNA. Despite the presence of a nuclear DNA in each cell there are high copy number of mitochondria and mtDNA per cell. For this reason, to study with mtDNA is more advantageous on degrade samples. The hypervariable region I, II and III are currently used for mtDNA to identify people's profiles or compare with each other in forensic cases. Therefore, the coding region of mitochondrial DNA is an alternative test region to increase the power of discrimination.

We studied nucleotide of 8389-8865 on coding region in 150 unrelated individuals from Turkish population. DNA was isolated from blood samples by using a silica based Invitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit®. Amplification of the coding region encompassing position 8389 to 8865 PCR performed according to Tzen at al. The PCR products were sequenced using the ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Sequences were aligned and compared to the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) using SeqScape1 Version 2.7 (Applied Biosystems). The sequence polymorphisms have been found the most common 8860G and the others mutations are 8697A, 8485A, 8388 delT, 8847 delC, 8691delA. Random match probability, genetic diversity and the power of discrimination were calculated 0.076359, 0.9303827, 0.923641 respectively. The results were compared with the similar results which were studied in other countries.

According to these results the polymorphic sites within coding region can be useful in combination with control region (HVI, HVII, HVIII) in order to increase discrimination power for forensic application.

8. KAYNAKLAR

1. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H. (1981) Young Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.*, 290: 457-465.
2. Wilson M., Van Ravenstein E., Miller N., Clem L., Middleton D., Warr G. (1995) cdna sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. *Dev Comp Immunol* 19: 153-164.
3. Carracedo A., Bar W., Lincoln P., Mayr W., Morling N., Olaisen B., Pascali V., Prinz M., Roewer L., Schneider P.M., Sajantila A., Tyler Smith C. (2000) DNA commission of the international society for forensic genetics guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Science Int.* 110: 79-85.
4. Kato H., Maeno Y., Ohira, H., Yamada, Y. (2008) Molecular analysis of mitochondrial hypervariable region 1 in 394 Japanese individuals, *Leg Med (Tokyo)*, 1: 443-445.
5. Chin-Yuan Tzen, Tsu-Yen Wu, Hsin-Fu Liu (2001) Sequence polymorphism in the coding region of mitochondrial genome encompassing position 8389-8865. *Forensic Science Int.* 120: 204-209
6. Eugene D. Robin, Ronald Wong. (1988) Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cell Physiology.* 136: 507-513
7. William W. Hauswirth, David A. Clayton. (1985) Length heterogeneity of a conserved displacement-loop sequence in human mitochondrial DNA. *Nucl. Acids Res.*, 8093-8104.
8. Johns M.D., Donald R. (1995) Mitochondrial DNA and Disease. *The New England Journal Of Medicine*, 333: 638-644.
9. Orcesi S., Gorni K., Termine C., Uggetti C., Veggiotti P., Carrara F., Zeviani M., Berardinelli A., Lanzi G. (2006) Bilateral putaminal necrosis associated with the mitochondrial DNA A8344G myoclonus epilepsy with ragged red fibers (MERRF) mutation: an infantile case. *J Child Neurol*, 79-82.

10. Casali G.M., Fabrizi F.M., Santorelli G. Colazza, Villanova M., Dotti M.T., Cavallaro E., Cardaioli C., Battisti L., Manneschi G.C., DiGennaro D., Fortini M., Spadaro C., Morocutti A. Federico (1999) Mitochondrial G8363A mutation presenting as cerebellar ataxia and lipomas in an Italian family. *Neurology* 52: 1103.
11. Mitani M., Jinnai K., Takahashi K., Koide R., Tsuji S. (2000) A case of NARP (neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa) with a T-to-C point mutation at nt 8993 of mitochondrial DNA 40: 600-604.
12. Micaela P., Holger W., Dieter K., Eberhard L. (2003) The impact of mtDNA analysis between positions nt8306 nt 9021 for forensic casework. *Mitochondrion* 3: 133-137.
13. John Donald R., (1995) Mitochondrial DNA and Disease. *The New England Journal of Medicine* 333: 638-644.
14. M.Daniel Lane, Peter L. Pedersen, Albert S. Mildvan (1986) The Mitochondrion Updated *Science Magazine* 234: 526-527.
15. Margit M.K., Nass S. Intramitochondrial Fibers With DNA Characteristics *J Cell Biology* 19: 593-611.
16. Brigitte P., Mark S., (2005) Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet* 6:165–83.
17. Wiesner R.J., Ruegg J.C., Morano I. (1992). "Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction, copy number of mitochondrial DNA in rat tissues". *Biochim Biophys Acta*. 183 (2): 553–559.
18. Sutovsky, P., et al. (Nov. 25, 1999). "Ubiquitin tag for sperm mitochondria". *Nature* 402 (6760): 371–372.
19. Iborra F.J., Kimura H., Cook P.R. (2004). "The functional organization of mitochondrial genomes in human cells". *BMC Biol.* 2: 9.
20. Wallace D.C. (1992) Diseases of the mitochondrial DNA, *Annu Rev. Biochem*, 61: 1175.
21. Schork N., Guo S. (1993) Pedigree Models for Complex Human Traits Involving Mitochondrial Genom. *Am J Hum Genet.* 53: 1320 - 1337.
22. Strachan T., Rean A.P., (2004) Human Molecular Genetics, 3. edition, Garland Science, New York.

23. Wrischnik L.A., Higuchi R.G., Stoneking M., Erlich H.A., Arnheim N., Wilson A.C. (1987) Length mutations in human mitochondrial DNA: direct sequencing of enzymatically amplified DNA, *Nucl. Acids Res.* 15: 529-542.
24. Melon T., Peterson R., Redd A.J., Saha N., Sofro A.S., Martinson J., Stoneking M. (1995) Polynesian genetic affinities with Soutcast Asian populations as identified by mtDNA analysis, *Am. J. Hum. Genet.* 57: 403-414.
25. John J.C., Facucho-Oliveira J., Jiang Y., Kelly R., Salah R. (March 2010) "Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells". *Hum Reprod Update* 16 (5): 488–509.
26. Tully G., Bâr W., Brinkmann B., Carracedo A., Gill P., Morling N., Parson W., Schneider P. (2001) Consideration by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices. nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci Int.*;124:83-91.
27. Stewart J.E., Fisher C.L., Aagaard P.J., Wilson M.R., Isenberg A.R., Polansky D., Pokorak E., DiZinno J.A., Budowle B. (2001) Length variation in HV2 of the human mitochondrial DNA control region, *J. Forensic Sci.*, 46: 862–870.
28. Holt I.J., Harding A.E., Petty R.K.H., Morgan-Hughes J.A. (1990) A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet.* 46: 428-433.
29. Shitara H., Hayashi J.I., Takahama S., Kaneda H., Yonekawa H. (1998) "Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage". *Genetics* 148 (2): 851–7.
30. Cann R.L., Stoneking M., Wilson AC. (1987) Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325: 35-6.
31. Vigilant L., Stoneking M., Harpending H., Hawkes K., Wilson AC.(1991) African populations and evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253: 1503-7.
32. Ovchinnikov I.V., Gotherstrom A., Romanova G.P., Kharitonov V.M., Liden K., Goodwin W. (2000) Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature* 404: 490-3.

33. Hsich H.M., Chiang H.L., Tsai L.C., Lai S.Y., Huang N.E., Linaere A. (1998) Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Sci Int* 98: 169-78.
34. Bendall K.E., Macaulay V.A., Baker J.R., Sykes B.C. (1996) Heteroplasmic Point Mutations in the Human mtDNA Control Region, *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 1276-1287.
35. Maxam A.M., Gilbert W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 74: 560-564.
36. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Natl. Acad. Sci.*
37. Venter J. C. (2006) Shotgunning the Human Genome: A Personal View. *Encyclopedia of Life Sciences.*
38. Adams M.D. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*, *Science* 287: 2185–2195.
39. Green P.(1997) Against a whole-genome shotgun, *Genome Res.* 410–417.
40. Elahi et al.; Ronaghi M., (2004). "Pyrosequencing: a tool for DNA sequencing analysis". *Methods Mol Biol* 255: 211–219.
41. Fakhrai-Rad et al.; Pourmand N., Ronaghi M. (2002) "Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms". *Hum Mutat.* 19 (5): 479–85.
42. Ronaghi M., Nygren M., Lundeberg J., Nyren P. (1999) Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing. *Anal Biochem.*: 267: 65-71
43. Metzker M. (2005). "Emerging Technologies in DNA Sequencing". *Genome Research* 15 (12): 1767–76.
44. Langaee T., Ronaghi M. (June 2005) "Genetic variation analyses by Pyrosequencing". *Mutat. Res.* 573 (1-2): 96–102.
45. Brooks S.E., Newton K., Seitzinger L.M. Richard A. Keller and Steven A.(1990) Detection of single fluorescent molecules. *Chemical Physics Letters*, 553–557.
46. Davis L.M., Fairfield F.R., Harger C.A., Jett J.H., Keller R.A., Hahn J.H., Krakowski L.A., Marrone B.L., Martin J.C., Nutter H.L., Rapid. (1991) DNA sequencing based upon single molecule detection. *Genet Anal Tech Appl* 8: 1-7.
47. Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. (2007) Principles of Instrumental Analysis 6th ed. Thomson Brooks/Cole Publishing: Belmont, CA

48. Swerdlow H., Gesteland R. (1990) Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing *Nucleic Acids Res.* 18: 1415–1419.
49. Petersen J.R., Amin A. M. (2001) *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*. New York: Humana P,
50. Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., Howell N. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 23, 147.
51. Sabine L.B., Ulrike S., Tanja S., Stefan P. (2003) Sequence polymorphisms within the human mitochondrial genes MTATP6, MTATP8 and MTND4 *Int J Legal Med* 117: 133–142.
52. Noppadon C. A Polymorphic Study Of Mitochondrial DNA In The Coding Region And It's Forensic Application Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.

9. EKLER

Ek 1 DNA izolasyon Prosedürü

Kan örneklerinden İnvitrogen Purelink Genomic DNA Mini Kit® DNA izolasyonu prosedürü

1. DNA izolasyonunu başlamadan önce etüv 55 °C'ye ayarlandı.
2. Steril mikrosantrifüj tüpüne 200ul tam kan eklendi.
3. Tam kanın üzerine 20ul Proteinaz K eklendi.
4. Karışıma 20ul RNase A eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi.
5. Daha sonra karışıma 200ul PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve vortekslendi.
6. Örnekler 55 °C'ye getirilmiş etüve yerleştirildi ve 10 dakika inkubasyona bırakıldı.
7. Örneklerin bulunduğu karışımlara 200ul etanol eklendi ve homojen bir karışım oluşana kadar vortekslendi.
8. Kitin içeriğinde bulunan Purelink Spin kolonuna lizat eklendi.
9. Kolon 13.000 rpm de 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
10. Alttaki 2 ml'lik topmala tüpü atılarak, Purelink Spin kolon, 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
11. 500 µl Wash Buffer tamponu eklenerek, 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Alttaki 2 ml'lik topmala tüpü atılarak, PureLink kolonu, 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
13. 500 µl Wash Buffer 2 tamponu eklenerek, 13000 rpm'de santrifüj edildi.
14. Membranın kurumasını sağlamak için, PureLink kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
15. PureLink kolon, 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpüne yerleştirilerek, 50 µl PureLink Genomic Elution Buffer eklendi, oda ısısında 3 dakika inkübe edildikten sonra, 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
16. Elde edilen izolatlar kısa süreli kullanım için, +4 °C'de, uzun süreli saklama için -20°C'de muhafaza edildi.

Ek 2 Florometrik yöntem ile DNA miktarının tayini

1. Ölçülecek örnek sayısı ve cihazın kalibrasyonu için gerekli 2 adet standart için yeterli sayıda 0.5 ml'lik steril tüpler ayırıldı.
2. Tüplerin kapaklarına örneklerin kodları yazıldı tüplerin yanına herhangi bir yazı yazılmamasına dikkat edildi.
3. Miktar tayin kitinin içeriğinde bulunan Quant-iT™ dsDNA HS reaktifi, ölçümü yapılacak her örnek için 200:1 oranında Quant-iT™ working solüsyonu ile seyreltilerek, 200 µl'lik karışımlar hazırlandı.
4. Hazırladığımız karışımdan standartların ölçüleceği tüplere 190 µl örneklerin ölçüleceği tüplere ise 199 µl aktarıldı.
5. Standartlardan 10 µl çekildi ve tüplere eklendi.
6. Örneklerden 1 µl çekildi ve tüplere eklendi.
7. Karışımlar kısa bir süre vortekslendi ve oda ısısında 5 dakika inkubasyona bırakıldı.
8. Standartlar sırasıyla Qubit™ fluorometer cihazında ölçüldü ve aletin kalibrasyonu yapıldı.
9. Örnekler sırasıyla okutuldu ve DNA miktarları not alındı.

Ek 3 Zymogen Sequencing Clean Up Kit prosedürü

1. 20ul BigDye dizinleme ürününe 240 ul Sequencing Binding Buffer eklenir.
2. Karışım Zymo-Spin IB Kolonuna aktarılır ve toplama kolonuna yerleştirilir.
3. Kolon 13.000 rpm de 30 saniye boyunca santrifüjlenir.
4. Karışıma 300 ul Sequencing Wash Buffer eklenir ve tekrar 13.000 rpm de 30 saniye santrifüjlenir.
5. Son olarak 12ul su kolon matriksine gelecek şekilde aktarılır ve kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konularak 13.000 rpm de 30 saniye santrifüjlenir.
6. Yürütme daha sonra yapılacaksa saflaştırdığımız DNA -20'de, yürütme kısa süre içinde yapılacaksa DNA +4 de saklanır.

Ek 4 Cambridge Reference Sequence

8341 agaaccaaca cctctttaca gtgaaatgcc ccaactaat actaccgtat ggcccacat
8401 aattaccccc atactcctta cactattcct catcacceaa ctaaaaatat taaacacaaa
8461 ctaccaccta cctccctcac caaagcccat aaaaataaaa aattataaca aacctgaga
8521 accaaaatga acgaaaatct gttcgcttca tcattgccc ccacaatcct aggcctacce
8581 gccgcagtac tgatcattct atttcccct ctattgatcc ccacctcaa atatctcacc
8641 aacaaccgac taatcaccac ccaacaatga ctaatcaaac taacctcaaa acaaatgata
8701 accatacaca aactaaagg acgaacctga tctcttatac tagtatecctt aatcatttt
8761 attgccacaa ctaacctcct cggactcctg cctcactcat ttacaccaac cacccaacta
8821 ctataaacc tagccatggc catcccctta tgagcgggca cagtgattat aggctttcgc
8881 tctaagatta aaaatgcct agcccacttc ttaccacaag gcacacctac accccttacc

Ek 5 Gönüllülerden Alınan Aydınlatılmış Onam Formu

Aydınlatılmış Onam Formu

Bu form, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi, Ömer Karataş tarafından hazırlanan “Türk Toplumunda Mitokondriyal DNA'da (8389-8865 Baz Çifti) Mutasyon Taraması” konulu tez çalışması ile ilgilidir.

Bu araştırmada, gönüllü katılımcılardan kan alınıp, laboratuvar ortamında DNA'ları çokitlenerek, mitokondriyal DNA 8389-8865 bölgeleri dizin analizi yapılacaktır.

Çalışmaya katılacak gönüllü sayısı, 150 erişkin kadın ve erkekten oluşacaktır. Araştırmanın katılımcıya herhangi bir etkisi yoktur. Gönüllü, araştırmaya katılmayı red etme hakkına sahiptir. Gönüllü, istediği anda araştırmacıya haber vererek araştırmadan çekilmek isteyebilir ve araştırmacı, katılımcının örneklerini derhal imha edecektir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcının araştırma dışı bırakılacağı bildirilebilir. Gönüllü katılımcı, araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyecektir. Ayrıca kendisine bir ödeme yapılmayacaktır.

Gönüllü katılımcının kimlik bilgileri son derece gizli tutulacaktır ve hiçbir surette kimse ile paylaşılmayacaktır. Bilgilerin kullanımında şifre kullanılacaktır. Katılımcının çalışmadan herhangi bir neden ile ayrılması durumunda; tüm kayıtları silinecektir.

Biyolog Sayın Ömer KARATAŞ tarafından İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nda yapacak olduğu “Türk Toplumunda Mitokondriyal DNA'da (8389-8865 Baz Çifti) Mutasyon Taraması” konulu yüksek lisans tezi için yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir

memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı-soyadı	İmzası	Yaşı	Telefon numarası	Adresi	Tarih
------------	--------	------	------------------	--------	-------

Araştırmacının

Adı-soyadı	İmzası
------------	--------

Ömer Karataş

ÖZGEÇMİŞ

Adı-soyadı: Ömer KARATAŞ

Doğum Tarihi: 09.03.1986

İletişim Adresi: Silivrikapı Mahallesi, Çağlayan Sokak, Gaye Apartmanı No:2 Daire 1

Fatih/İstanbul

Telefon: 0554 808 64 08

Eğitim Durumu

Orhangazi Eyüp Topçu Anadolu Lisesi (2000-2004)

İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2005-2009)

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Yüksek Lisans Programı (2009- Halen)