

ANKARA ÜNİVERSİTESİ.
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRK POPULASYONUNDA
D1S80, D4S95, D17S30 VE TP53 VNTR LOKUSLARININ
POLİMORFİZMLERİ**

Bio. Güvem GÜMÜŞ

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

**TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Bu tez, Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2001-08-09-071

proje numarası ile desteklenmiştir

Tez No: 123808

123808

2002 - ANKARA

Birlikte yaşamaya doyamadığım

Ersancan KARSAN (1995 – 2000)

Murat ÖZKANLI (1981 – 2000)

ve

Emrah AKDAĞ (1970 – 2000)'in anısına...

~~DOKTORA~~
YÜKSEK LİSANS TEZ SINAV TUTANAĞI

Öğrencinin Adı Soyadı : GÜVEM GÜMÜŞ
Öğrenci No :
Anabilim Dalı : TIBBİ BİYOKİMYA
Programı : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Tez Konusu : Türk Populasyonunda D1S80, D4S9S, D17S30 ve TP53 VNTR Lokuslarının
polimorfizmleri
Sınav Tarihi : 09.07.2002
Sınav Başlama Saati : 14.30
Sınav Bitiş Saati : 17.00

Karar : Tez sınavı sonucunda, yukarıda konusu belirtilen tezin, aşağıdaki gerekçeler doğrultusunda;

- Kabulüne
 Düzeltilmesine
 Reddine

Oybirliği / oyçokluğu ile karar verilmiştir.

Gerekçe :

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Feriit Kökelerinciy
[Signature]

Üye

İst. Doç. Dr. Timur Tuncalı
[Signature]

Üye

Prof. Dr. İbrahim Bökeoay
[Signature]

Üye

İst. Doç. Dr. Hakan Engin Erdoğru
[Signature]

Üye

İst. Doç. Dr. Asım Sinirgözü
[Signature]

Ekler:

- Tez jürisi bireysel raporları
- Dinleyici listesi.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması sırasında bana manevi yönden çok büyük destek olan anne ve babam başta olmak üzere her konuda desteğini gördüğüm Danışmanım Sayın Doç. Dr. Asuman Sunguroğlu'na, deneylerin gerçekleştirilmesi sırasında hiçbir yardımlarını esirgemeyen Sayın Öğr. Gör. Dr. Halil Gürhan Karabulut ve Sayın Bio. Aydın Rüstemov'a ve ayrıca beni sonuna kadar destekleyen anabilim dalımız tüm akademik ve idari personeline teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ÇİZELGELER	vii
ŞEKİLLER	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Canlılarda Genom Büyüklükleri : C - Değerleri	1
1.2. C – değeri Paradoksu (Çelişkisi)	2
1.3. Ökaryotlarda Genomun Organizasyonu	4
1.4. Ökaryotlarda DNA Tekrar Dizileri	6
1.5. Minisatelitler ve Mikrosatelitler	9
1.6. VNTR'lerde Yüksek Polimorfizm (Hypervariability)	10
1.7. VNTR'lerin Oluşum Mekanizmaları	13
1.8. Genetik Çeşitlilik Ölçüsü – Heterozigosite	18
1.9. Amaç	21
2. GEREÇ VE YÖNTEM	22
2.1. İncelenen Lokuslar	22
2.1.1. D1S80	22
2.1.2. D4S95	23
2.1.3. D17S30 (D17S5 = YNZ22)	23
2.1.4. TP53	23
2.2. Çalışma Grubu	25
2.3. DNA Eldesi ve Miktar Tayini	25
2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	27
2.5. Alel Polimorfizmlerinin Belirlenmesi	30
2.6. İstatistiksel Değerlendirme	31
2.6.1. Alel Sıklıkları (Frekansları) ve Hardy- Weinberg Dengesi	31
2.6.2. Heterozigosite	32
2.6.3. Ayırım Gücü (Power of Discrimination = PD)	33
2.6.4. F_{ST} Değerlerinin Hesaplanması ve Dendrogram Çizimi	34
3. BULGULAR	35
3.1. D1S80 Lokusu Polimorfizmi	35
3.3. D17S30 (pYNZ22) Lokusu Polimorfizmi	44
3.4. TP53 Lokusu Polimorfizmi	47
3.5. Heterozigosite	50
3.6. Ayırım Gücü (PD) ve Bileşik Ayırım Gücü	50
3.7. F_{ST} Değerleri	52
3.8. Haplotip Analizi	54
4. TARTIŞMA	59
4.1. D1S80 Lokusu	59
4.2. D4S95 Lokusu	64
4.3. D17S30 Lokusu	65
4.4. TP53 Lokusu	67

4.5. Haplotip Analizi	68
5. SONUÇLAR	69
ÖZET	72
SUMMARY	73
KAYNAKLAR	74
EK	78



KISALTMALAR

STR	Kısa Ardışık Tekrar (Short Tandem Repeat)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
rDNA	Ribozomal DNA
VNTR	Değişken sayıdaki ardışık tekrarlar (Variable Number of Tandem Repeats)
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetikasit
STE	Sodyum Tris EDTA
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
dH₂O	Distile su
ddH₂O	Deiyonize distile su
OD	Optik Dansite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
bç	baz çifti (bp = base pair)
kb	kilobaz

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.1	Farklı bakteri taksonlarında gözlenen genom büyüklükleri	1
Çizelge 1.2.1	Farklı ökaryot taksonlarında gözlenen genom büyüklükleri	3
Çizelge 1.4.1	Ökaryotlarda DNA tekrar dizilerinin genel özellikleri	7
Çizelge 1.6.1	İnsan DNA'sında tespit edilen farklı VNTR örnekleri ve bunların tekrar birimleri	10
Çizelge 2.1.1	D1S80, D4S95, D17S30ve TP53 VNTR lokuslarının genel özellikleri	22
Çizelge 2.1.1.1	D1S80 lokusu alellerinin genel sınıflandırılması	24
Çizelge 2.1.2.1	D4S95 lokusu alellerinin genel sınıflandırılması	24
Çizelge 2.1.3.1	D17S30 lokusu alellerinin genel sınıflandırılması	24
Çizelge 2.1.4.1	TP53 lokusu alellerinin genel sınıflandırılması	24
Çizelge 2.4.1	Çalışılan lokusların primer dizileri	27
Çizelge 3.1.1	D1S80 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları	38
Çizelge 3.2.1	D4S95 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları	42
Çizelge 3.3.1	D17S30 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları	45
Çizelge 3.4.1	TP53 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları	48
Çizelge 3.5.1	D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 lokuslarının gözlenen ve beklenen heterozigositeleri	50
Çizelge 3.6.1	D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 lokusları için hesaplanan PD değerleri	51
Çizelge 3.6.2	D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 lokuslarının farklı kombinasyonları için hesaplanan bileşik PD değerleri	51

Çizelge 3.7.1	D1S80 lokusu için altı farklı popülasyonun ikişerli olarak karşılaştırılması ile elde edilen F_{ST} ve p değerleri	52
Çizelge 3.8.1	Dört VNTR lokusu itibariyle çalışılan 100 kişiden elde edilen sonuçlar	54-56
Çizelge 3.8.2	Dört VNTR lokusu itibariyle tespit edilen haplotipler ve sıklıkları	57-58
Çizelge 4.1.1	Farklı popülasyonlarda D1S80 lokusu için tespit edilmiş alel sıklıkları	61-62



ŞEKİLLER

Şekil 1.3.1	Ökaryotik genomun organizasyonu	5
Şekil 1.4.1	Farklı tip ardışık tekrar birimlerinin kromozomal yerleşimleri	8
Şekil 3.1.1	D1S80 lokusu için tespit edilen alellerin % sıklıkları	36
Şekil 3.1.2	D1S80 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları	39
Şekil 3.1.3	8 farklı bireye ait D1S80 lokusu PCR ürünlerinin %3'lük Nusieve GTG agaroz jel elektroforezi sonuçları	37
Şekil 3.2.1	D4S95 lokusu için tespit edilen alellerin % sıklıkları	41
Şekil 3.2.2	D4S95 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları	43
Şekil 3.2.3	9 farklı bireye ait D4S95 lokusu PCR ürünlerinin %4'lük denatüre poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları	44
Şekil 3.3.1	D17S30 lokusu için tespit edilen alellerin % sıklıkları	45
Şekil 3.3.2	D17S30 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları	46
Şekil 3.3.3	5 farklı bireye ait D17S30 lokusu PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları	47
Şekil 3.4.1	TP53 lokusu için tespit edilen alellerin % sıklıkları	47
Şekil 3.4.2	TP53 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları	49
Şekil 3.4.3	15 farklı bireye ait TP53 lokusu PCR ürünlerinin %6'lık denatüre poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları	49
Şekil 3.7.1	D1S80 lokusu için hesaplanan F_{ST} değerlerine bağlı olarak altı farklı populasyon arasındaki ilişkinin dendrogram şeklinde gösterimi	53

1. GİRİŞ

1.1. Canlılarda Genom Büyüklükleri : C - Değerleri

Haploid genomdaki DNA miktarı, **genom büyüklüğü** veya **C-değeri** (**C-value**) olarak tanımlanmaktadır ve bu değer her tür için karakteristik olup bir tür içinde sabittir. C-değerleri hem prokaryot hem ökaryot türleri arasında oldukça çeşitlilik göstermektedir (Li ve Graur, 1991; Strachan ve Read, 1999, Freeman ve Herron, 1998; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000) .

Bakterilerin farklı türlerinin genomik büyüklükleri yani C-değerleri incelendiğinde yaklaşık 20 misli değişkenlik gösterdiği görülmektedir (Çizelge 1.1.1). Bu değerler hücre içi zorunlu parazitlerde $\sim 6 \times 10^5$ iken birçok mavi-yeşil algde $\sim 10^7$ civarındadır. Bakterilerin sahip oldukları gen sayısının yaklaşık 500 - 8.000 arasında değiştiği bilinmektedir. Diğer bir deyişle bakteri türleri arasında C-değerlerinde gözlenen değişkenlik ile gen sayısı bakımından gözlenen değişkenlik uyumlu görülmektedir. Nitekim bakteri genomunda kodlamayan DNA bölgelerinin fazla olmaması yani % 8 – 12 civarında olması da bu uyumu desteklemektedir (Li ve Graur, 1991; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000) .

Çizelge 1.1.1. Farklı bakteri taksonlarında gözlenen genom büyüklükleri (Li ve Graur, 1991)

Taksa	Genom büyüklükleri (kb)	Oran (En yüksek / En düşük)
Öbakteriler	650 – 13.200	20
Gram negatif	650 – 7.800	12
Gram pozitif	1.600 – 11.600	7
Mavi-yeşil algler	3.100 – 13.200	4
Mikoplazmalar	650 – 1.800	3
Arkeo bakteriler	1.600 – 4100	3

1.2. C – değeri Paradoksu (Çelişkisi)

Ökaryotların C-değerleri, prokaryotların C-değerlerine nazaran oldukça büyüktür. Bunun istisnai durumları da mevcuttur. Örneğin *Saccharomyces cerevisiae*, birçok gram pozitif bakteri ve mavi-yeşil algden daha küçük genom büyüklüğüne sahiptir (Li ve Graur, 1991; Freeman ve Herron, 1998; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000).

Bununla beraber ökaryotların C değerleri arasındaki değişkenlik, prokaryotlarda gözlenenden oldukça fazladır. Ökaryotlarda C değerleri 8.8×10^6 bç'den 6.9×10^{11} bç'ne kadar değişebilmektedir yani genomik büyüklükleri arasında 80.000 misli bir değişkenlik söz konusudur (Çizelge 1.2.1) (Li ve Graur, 1991; Freeman ve Herron, 1998; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000).

En fazla çeşitlilik özellikle tek hücrelilerde ~30.000 ve kökbacaklı amiplerde ~20.000 misli gibi yüksek seviyede görölmektedir. Bunun aksine memeliler, kuşlar ve sürüngenlerin C-değerlerinde gözlenen çeşitlilik yaklaşık 2-4 misli gibi oldukça düşük seviyededir (Li ve Graur, 1991; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000).

Canlılarda her filumdaki en düşük DNA miktarına sahip canlı, o filum için gerekli minimum C-değeri olarak alınmaktadır. Minimum C-değerleri kıyaslandığında, canlılarda genom büyüklüğü arttıkça organizmanın gelişmişlik seviyesi (organizmal kompleksite)nin de arttığı görölmektedir (Li ve Graur, 1991; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000). Ancak evrimsel ağacın üst basamaklarındaki yüksek ökaryotik canlılara baktığımızda, DNA miktarı ile organizmal kompleksite arasındaki uyumun kaybolduğu da gözlenmektedir. Örneğin amfibilerden *X. leavis* ile insanın aynı genetik kompleksiteye (DNA uzunluğu) sahip olmalarını gelişmişlik seviyeleri ile açıklamak mümkün değildir. Kaldı ki, böcek, amfibi ve bitki türleri arasında

bile C-değerlerinde ~ 75-6000 kat farklılıkların bulunduğu da görülmektedir (Li ve Graur, 1991; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000).

Çizelge 1.2.1. Farklı ökaryot taksonlarında gözlenen genom büyüklükleri (Li ve Graur, 1991).

Taksa	Genom büyüklükleri (kb)	Oran (En yüksek / En düşük)
Tek hücreliler	23.500 – 686.000.000	29.191
Kamçılılar	98.000 – 2.350.000	24
Silliler	23.500 – 8.620.000	367
Kök bacaklılar	35.300 – 686.000.000	19.433
Mantarlar	8.800 – 1.470.000	167
Hayvanlar	49.000 – 139.000.000	2.837
Süngerler	49.000 – 53.900	1
Halkalı solucanlar	882.000 – 5.190.000	6
Yumuşakçalar	421.000 – 5.290.000	13
Kabuklular	686.000 – 22.100.000	32
Böcekler	98.000 – 7.350.000	75
Derisi dikenliler	529.000 – 3.230.000	6
Çenesizler	637.000 – 2.790.000	4
Kıkırdaklı balıklar	1.470.000 – 15.800.000	11
Kemikli balıklar	382.000 – 139.000.000	364
Kurbağalar	931.000 – 84.300.000	91
Sürüngenler	1.230.000 – 5.340.000	4
Kuşlar	1.670.000 – 2.250.000	1
Memeliler	1.420.000 – 5.680.000	4
Bitkiler	50.000 – 307.000.000	6.140
Algler	80.000 – 30.000.000	375
Eğreltiler	98.000 – 307.000.000	3.133
Çıplak tohumlular	4.120.000 – 76.900.000	17
Kapalı tohumlular	50.000 – 125.000.000	2,500

Türler arasında genom büyüklükleri bakımından gözlenen yüksek orandaki çeşitliliği ne organizmal kompleksite ile ne de taşıdıkları kodlayıcı gen sayısı ile ilişkilendirmek mümkün olmadığı için ortaya oldukça ilginç bir durum çıkmaktadır; örneğin, memeli türleri ile kıyaslandıklarında, evrimsel açıdan daha basit canlılar olan bir çok protist türünde DNA miktarının memelilerinkinden daha fazla olması organizmal kompleksiteyi yansıtmamaktadır. Buna ilaveten, komplekslikleri bakımından birbirine yakın türlerin ve hatta fenotipik olarak birbirlerinden ayırdedilemeyen ikiz türlerin bile C-değerleri birbirlerinden farklı olabilmektedir. Bu çelişki yani, genomdaki

genetik bilgi (genetik kompleksite) ile organizmal kompleksite arasında belirgin bir ilişkinin bulunmaması **C-değeri paradoksu (çelişkisi)** olarak ifade edilmektedir(Li ve Graur, 1991; Freeman ve Herron, 1998; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000).

1.3. Ökaryotlarda Genomun Organizasyonu

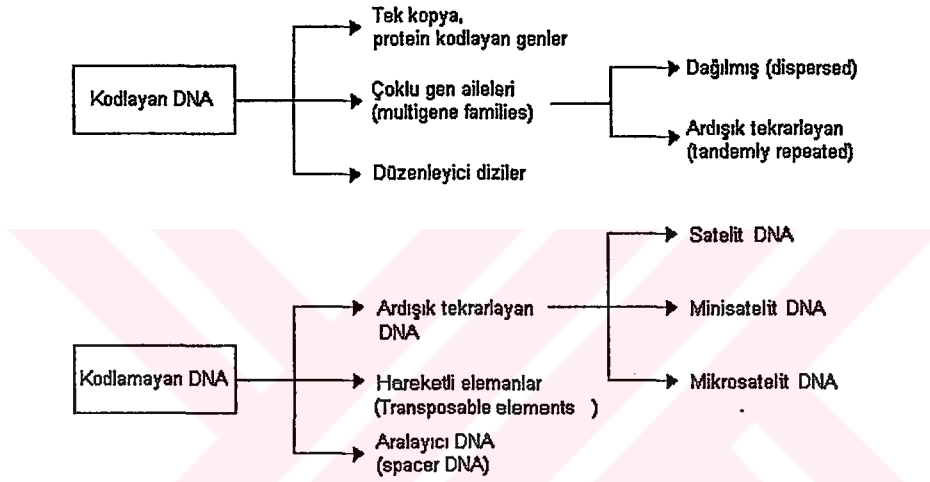
C-değeri çelişkisinin nedenlerini anlayabilmek amacıyla mukayeseli olarak ökaryotik canlılarda DNA / DNA hibridizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde Britten ve Kohne 1968 yılında, DNA yeniden birleşme (hibridizasyon/reassosiasyon) kinetiklerinin analizi sonucu ökaryotik genomlarda farklı Cot değerleri ile karakterize edilebilen üç farklı tip DNA dizilerinin bulunduğunu göstermişlerdir:

1. Yüksek derecede tekrarlayan DNA (highly repetitive DNA)
2. Orta derecede tekrarlayan DNA (moderately repetitive DNA)
3. Tek kopya DNA (single copy DNA)

Yüksek derecede tekrarlayan DNA dizileri birkaç yüz bç'lik tekrar birimlerinin ortalama 500.000 defa tekrarlanması sonucu meydana gelmektedir. Orta derecede tekrarlayan DNA dizilerinin ise yaklaşık 100 ila 1000 bç uzunluğundaki tekrar birimlerinin yaklaşık 100 defa tekrarlanmasıyla oluştuğu görülmektedir (Li ve Graur, 1991; Freeman ve Herron, 1998; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000).

Organizmaların sahip oldukları gen sayıları ile organizmal kompleksiteleri arasında pozitif korelasyon görülmektedir. Ökaryotlarda kodlayan genlerin sayısı yaklaşık olarak 3.000'den 100.000'e kadar değişmektedir. Gen sayısında gözlenen bu ~33 katlık çeşitliliğin, C-değerleri arasındaki 80.000 katlık çeşitliliği açıklamak için yetersiz kaldığı da açıkça görülmektedir. Ökaryotlarda kodlayıcı ve düzenleyici dizilerin genomik oranının yaklaşık %3

gibi çok düşük seviyede olduğu gösterilmiş bulunmaktadır. Bu durumda geriye kalan % 97 gibi oldukça yüksek seviyede kodlamayan dizilerin varlığı C-değeri çelişmesini güçlendirmektedir. Diğer bir deyişle, ökaryotik genomun büyük bir çoğunluğu herhangi bir genetik bilgi içermeyen DNA dan oluşmaktadır. Ökaryotlarda bu kodlamayan DNA dizilerinin miktarı 3×10^6 bç'den 1×10^{11} bç'ne kadar değişmektedir ($\times 100.000$) (Li ve Graur, 1991; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000). Ökaryotlarda genomik organizasyon Şekil 1.3.1'de özetlenmektedir.



Şekil 1.3.1. Ökaryotik genomun organizasyonu (Page ve Holmes, 2000).

Farklı organizmalar arasında, kodlayan ve kodlamayan DNA bölgelerinin ortalama uzunlukları arasındaki farklılıklar ile bu organizmaların gen uzunlukları ve genom büyüklükleri arasında da belirgin bir ilişki bulunmamaktadır. Fakat rDNA'daki genlerin tekrar derecesi ile genom büyüklükleri arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (Page ve Holmes, 2000).

Genomda kodlayan DNA dizileri içinde yer alan ve tekrarlamayan DNA segmentleri, tek kopya DNA (single copy DNA) veya özgün DNA (unique DNA) olarak isimlendirilmektedir ve yapısal gen olarak kabul edilmektedirler. Kodlamayan ökaryot DNA dizilerinin büyük bir kısmını oluşturan tekrar dizilerinin herhangi bir ürünü yoktur. Herhangi bir ürün kodlamamasına rağmen çok sayıda tekrarlar içeren bu diziler her zaman ilgi konusu olmuştur

(Li ve Graur, 1991; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000). Bu diziler hakkında bildiklerimiz arttıkça, ökaryotik genoma şekil veren evrimsel mekanizmalar hakkında da daha fazla bilgi sahibi olacağımız açıktır; örneğin, bu dizilerin bazılarının tamamen kendi yararları için genom içerisinde dağıldıkları tartışılmaktadır ve bu nedenle söz konusu diziler bencil DNA (selfish DNA) olarak adlandırılmaktadır. Hatta bu dizilerin bazıları, diğer genlerin fonksiyonlarını engellemek suretiyle, kendi kopya sayılarını artırdıkları için "ultra-selfish DNA" olarak düşünülmektedir. Ayrıca kodlamayan tekrar dizilerinin niteliği ve tekrar sayılarındaki türe özgü farklılıklar, genomik büyüklüklerin aynı filumda yer alan türler arasında farklılık göstermesinin başlıca sebebi olarak kabul edilmektedir (Page ve Holmes, 2000).

1.4. Ökaryotlarda DNA Tekrar Dizileri

Ökaryotlarda DNA tekrar dizileri, genom içinde ardışık veya dağılmış olarak buldukları gibi farklı uzunluklarda da olabildikleri ve genellikle aynı tekrar birimlerinden oluşmalarına rağmen farklı kompozisyondaki nükleotit dizilerinden de oluşabildikleri bilinmektedir. Herhangi bir genomda kodlamayan DNA dizileri içinde yer alan tekrar dizilerinin oranı farklı taksonlarda çeşitlilik göstermektedir (Li ve Graur, 1991; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000). Bu oranlar mayada %20 iken, memelilerde %60, bitkilerde ise %80 civarındadır (Li ve Graur, 1991; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000).

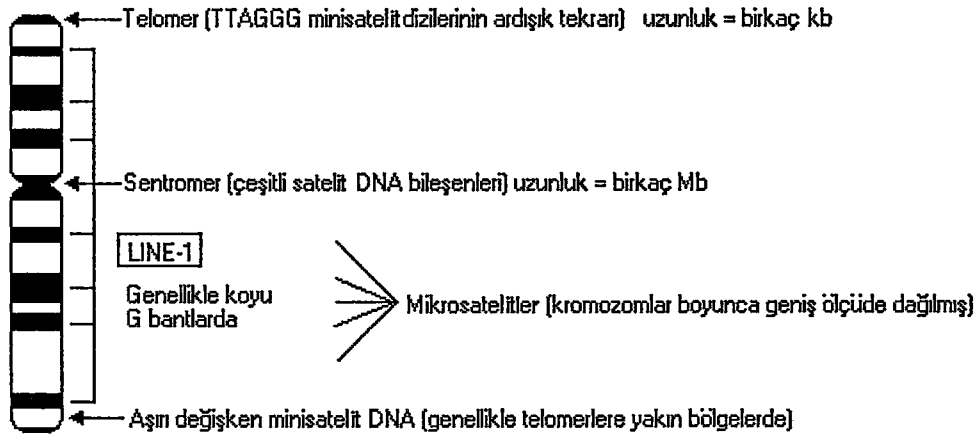
Ökaryotlarda DNA tekrar dizilerinin genom içindeki lokalizasyonlarına göre, genel olarak lokalize ardışık tekrar dizileri ve dağılmış tekrar dizileri şeklinde iki gruba ayrıldığı da bilinmektedir. Ökaryotlarda DNA tekrar dizilerinin genel özellikleri Çizelge 1.4.1'de verilmektedir.

Çizelge 1.4.1. Ökaryotlarda DNA tekrar dizilerinin genel özellikleri (Page ve Holmes, 2000).

DNA Tekrar dizileri	Tekrar (kopya) Sayısı	Organizasyon
Satelit DNA	Yüksek derecede tekrarlanan (highly repetitive, > 10 ⁴)	Ardışık tekrar
Minisatelit ve mikrosatellitler	Orta derecede tekrarlanan (moderately repetitive)	Ardışık tekrar
Hareketli Elementler	Orta ve yüksek derecede tekrarlanan	Dağılmış

Birçok ökaryotik genomun birbiri ardınca, yüksek derecede tekrarlayan DNA dizilerini içerdikleri görülmektedir. Örneğin bir kanguru türü olan *Dipodomys ordii* genomunun %50'si üç tip tekrar dizisi ailesinden oluşmaktadır: AAG (240 milyon defa), TTAGGG (220 milyon defa) ve ACACAGCGGG (120 milyon defa). Bu aileler tamamen homojen değildir ve konsensus dizilerinde bir veya iki nükleotitik farklılık bulunduran varyant formları da içermektedir. Nitekim, TTAGGG ailesi tekrarlarının bazı birimlerindeki dizilerin TTAGAG olduğu bilinmektedir (Li ve Graur, 1991). Fakat yine de yüksek derecede tekrar eden ve ardışık olarak genomun belirli bir bölgesinde lokalize olan bu diziler aynı nükleotit kompozisyonuna sahip olarak kabul edilir. Söz konusu diziler CsCl yoğunluk gradyanı ile ayırdıklarında, esas DNA bandından ve "smear" oluşturan çeşitli uzunlukta diğer heterojen kompozisyondaki DNA fragmanlarından, bir veya daha fazla sayıda kalın bantlar şeklinde ayrılırlar. Bu nedenle bu diziler **satelit DNA** olarak isimlendirilirler. Satelit DNA dizilerinin ayırıcı özellikleri arasında yaklaşık 100-270 bç.'lik tekrar bloklarından oluşması, tekrar bloklarının farklı tekrar dizileri taşıması, tekrar dizilerinin heterojen olması sayılabilir (Li ve Graur, 1991; Strachan ve Read, 1999; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000).

Bazı türlerde, yüksek derecede tekrarlayan ardışık diziler farklı kromozomlarda dağılmış olarak bulunurken, bazı türlerde ise bu dizilerin yerleşimlerinin özel kromozomlara sınırlandığı görülmektedir. Örneğin satelit DNA dizilerinin *Drosophila nasutoides* genomunun %60'ını oluşturduğu ve dört kromozomdan yalnızca birinde lokalize olduğu görülmektedir (Li ve Graur, 1991; Strachan ve Read, 1999; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000). Satelit DNA genellikle işe yaramayan DNA (junk DNA) olarak kabul edilse de sentromer dizilerini oluşturduğu, kinetokor yapısında yer aldığı ve bölünme sırasında kromozomların ayrılmasında rol oynadığı kabul edilmektedir (Li ve Graur, 1991; Strachan ve Read, 1999; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000). Satelit dizilerden oluşan sentromer dizilerinin yapısal (konstitütif) heterokromatin yapıda olduğu da bilinmektedir. Buna karşılık 2-5 bç ve 6-100 bç uzunluğundaki daha kısa ardışık tekrar dizilerine sırasıyla mikrosatelitler (STR=Short Tandem Repeats) ve minisatelitler denilmektedir. Bu diziler satelit dizilere nazaran kromozomlar üzerinde türe özgü bir şekilde dağılık olarak bulunurlar. Mikrosatelitlerdeki tekrar dizileri yüksek homojenliğe sahiptirler (Li ve Graur, 1991, Debrauwere ve ark., 1997; Strachan ve Read, 1999; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000) (Şekil 1.4.1). Hareketli elementler bencil (selfish) DNA grubuna girerler ve transpozisyon yoluyla genom içinde dağılık şekilde bulunurlar (Page ve Holmes, 2000).



Şekil 1.4.1. Farklı tip ardışık tekrar dizilerinin kromozomal yerleşimleri (Strachan ve Read, 1999).

1.5. Minisatelitler ve Mikrosatelitler

Minisatelitler ve mikrosatelitler aynen satelit DNA'da olduğu gibi birbiri ardınca tekrarlayan daha kısa ve homojen motiflerden oluşmakla beraber, satelit DNA dan farklı olarak daha az sayıda kopya içermektedirler. Bu nedenle söz konusu diziler orta derecede tekrarlayan DNA (moderately repetitive DNA) olarak ifade edilirler. Bu kısa tekrar motiflerinin eşit olmayan krossover (unequal krossover) ve replikasyon kayması (replication slippage) olaylarının ürünü olan duplikasyonlar sonucu oluştuğu kabul edilmektedir (Li ve Graur, 1991; Debrauwere ve ark., 1997; Strachan ve Read, 1999; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000).

Farklı tip ardışık tekrar dizilerinin genomdaki yerleşimleri belli bir kromozomda sınırlandırılmış olabileceği gibi, farklı kromozomlar üzerine yüksek derecede dağılmış olabilirler. Genom içerisinde dağılmış mikrosatelit tekrar dizilerinin de farklı kromozomal bantlar içerisinde spesifik lokalizasyonlara sahip oldukları da görülmektedir. Minisatelitlerin sıklıkla telomerlerde veya bu dizilere yakın bölgelerde yerleşimli oldukları görülmektedir (Şekil 1.4.1). Her ikisi de heterokromatin bölgelerde lokalize olabildikleri gibi ökromatin bölgelerde de lokalize olabilirler (Strachan ve Read, 1999).

Minisatelitler genellikle 6-100 bç uzunluğundaki tekrar birimlerinden oluşurken mikrosatelitlerin 2-5 bç gibi daha kısa tekrar birimlerinden oluştukları bilinmektedir. Minisatelitler tekrar sayılarında aşırı değişkenlikler nedeniyle VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)'ler olarak adlandırılırlar. Ayrıca VNTR'ler ortak bir çekirdek diziyeye sahip olmalarına karşın farklı tekrar birimleri taşımaları sebebiyle daha yüksek derecede polimorfizm gösterdikleri için genetik polimorfizm çalışmalarında özellikle tercih edilirler (Jeffreys, 1986; Li ve Graur, 1991; Vandebroek ve ark., 1996; Strachan ve Read, 1999; Lewin, 2000; Page ve Holmes, 2000).

1.6. VNTR'lerde Yüksek Polimorfizm (Hypervariability)

VNTR'ler, omurgalılarda, mantarlarda ve bitkilerde ökromatik bölgelerde bulunmaktadır ve kısa motiflerin birbiri ardınca tekrarlamasıyla kromozom boyunca 50 kb'ne kadar ulaşabilmektedirler. Çizelge 1.6.1'de insan DNA'sında tespit edilen farklı VNTR'lerin tekrar birimleri gösterilmektedir. Pek çoğunda iki zincir arasında pürin / pirimidin asimetrisi görülmektedir. İnsan insülin geni ile α -globin 3' HVR gen kümelerindeki VNTR'lerin tekrar birimleri dizi olarak kıyaslandığında bazı benzerliklerin görülmesi, bu tip dizilerin VNTR oluşturmak yönünde eğilimli olduğu fikrini gündeme getirmektedir (Jeffreys, 1986; Page ve Holmes, 2000).

Çizelge 1.6.1. İnsan DNA'sında tespit edilen farklı VNTR örnekleri ve bunların tekrar birimleri (Page ve Holmes, 2000).

Minisatelit probu	Dizi*
Çekirdek dizi (Jeffreys)	GGAGGTGGGCAGGARG
Myoglobin	CTAAAGCTGGAGGTGGGCAGGAACGACCGARRT
33.15	AGAGGTGGGCAGGTGG
33.6	AGGGCTGGAGG
p λ g3	AGAAAGGCGGGYGGTGTGGGCAGGGAGRGGCAGGAAT
λ MS1	GTGGATAGG
YNH24	CAGCAGCAGTGGGAAGTACAGTGGGGTTGGTT
İnsülin	ACAGGGGTGTGGGG
Harvey ras c1	GGGGGAGTGTGGCGTCCCCTGGAGAGAA
α -globin 3' HVR	AACAGCGACACGGGGGG
D14S1	GGYGGYGGYGGYGGYGGY...
Çekirdek dizi (Nakamura)	GGGNGTGGGG

* R= A veya G; Y= C veya T; N= herhangi bir baz

Jeffreys ve ark. (1985) insan myoglobin geninin dizi analizi çalışmaları sırasında, bu genin bir intronunda 33 bç'lik birimlerin dört defa

tekrarlamasından oluşan küçük bir VNTR tespit etmişlerdir. Bu VNTR'nin, monomorfik olmasına karşılık diğer VNTR'ler ile benzerlik gösterdiği ve diğer lokuslarla zayıf derecede hibridize olduğu dikkati çekmiştir. Hibridize olan bu lokuslardan 8 tanesi rastgele seçilerek klonlanmış ve her bir lokusun özelliği belirlenmiştir. Tüm klonların 16-64 bp uzunluğundaki tekrar birimlerinden oluştuğu ve seçilen klona bağlı olarak tekrar sayısının 3-29 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 4 klonun tekrar birimi sayısı bakımından alelik çeşitlilik gösterdiği, en polimorfik lokusun 12-25 tekrar birimi içeren 8 alel ihtiva ettiği ve heterozigositesinin yaklaşık %80 olduğu saptanmıştır. Myoglobin VNTR'si ve söz konusu 8 klondan elde edilen VNTR'ler mukayese edildiğinde bu dizilerin herbir tekrar biriminde 11-16 bp uzunluğunda, çok ufak farklılıklar içeren ortak bir "çekirdek (core) dizi" (GGAGGTGGGCAGGARG) ihtiva ettikleri dikkati çekmiştir (Jeffreys, 1986).

Farklı VNTR'lerde çekirdek dizi dışında kalan dizilerin benzerlik göstermemesi nedeniyle, çekirdek dizi içeren VNTR'lerin büyük bir olasılıkla evrimsel olarak birbirleriyle ilişkili dizileri oluşturmadığı fikri ileri sürülmesine rağmen, çekirdek dizilerinin buldukları DNA dizilerinde başlangıç duplikasyonunu teşvik ederek ve / veya eşit olmayan krossover ya da replikasyon kayması yoluyla aşırı değişken VNTR'lerin oluşumuna yardımcı oldukları fikri yaygın olarak kabul görmektedir (Jeffreys, 1986).

VNTR'ler üzerinde seleksiyon etkisinin olmadığı varsayıldığında, insan popülasyonlarında gözlenen VNTR tekrar sayısındaki çeşitlilik için gerekli olan eşit olmayan değişimlerin hızını, nötral mutasyon-genetik kayma modeli (Neutral mutation-Random genetic drift modeli) ile hesaplamak mümkündür. Hesaplanan hız, bir minisatelitin her kilobazı için 10^{-4} gibi yüksek bir değerdir ve bu durum bugüne kadar pedigrilerde tespit edilen yeni mutant alellerin sayısı ile uyumludur. İnsan DNAsı boyunca ortalama mayotik rekombinasyon hızının her kilobaz için 10^{-5} gibi 10 misli daha düşük bir değer dikkate alındığında çekirdek dizi ihtiva eden VNTRler, rekombinasyon

“hot spot” ları olarak görülmektedirler (Jeffreys, 1986; Jeffreys, 1999; Strachan ve Read, 1999; Richard ve Paques, 2000, Lewin 2000).

Çekirdek dizi, hem uzunluk hem de G nükleotit içeriği bakımından *E. Coli*'de *rec BC* gen ürünü olan Endonükleaz V'in bağlanma dizileri olarak rekombinasyonun başlamasında rol oynadığı düşünülen Chi dizisi (Cross-over hotspot initiator sequence, GCTGGTGG) ile oldukça benzerlik göstermektedir. Bu nedenle çekirdek dizinin, prokaryotik chi dizisinin memelilerdeki homoloğu veya analogu olduğu ileri sürülmektedir (Jeffreys, 1986; Jeffreys, 1999; Strachan ve Read, 1999; Richard ve Paques, 2000, Lewin 2000).

Yüksek derecede polimorfik (hypervariable) VNTR'lerde tekrar birimleri homojen ve tek bir tekrar birimine sınırlı değildir. Birbirleriyle sıkıca ilişkili tekrar motifleri tek bir alelde varolabilir ve genellikle bir çok komşu olmayan tekrar dizisi ile difüze olma eğilimindedirler. Geniş duplikasyon ve delesyon noktalarının tespit edilmesi, alelik polimorfizmde öncelikli mekanizmaların replikasyon kayması, eşit olmayan krossover ve gen dönüşümü (gene conversion) olduğunu göstermektedir (Dedrauwere, 1997; Jeffreys, 1999; Richard ve Paques, 2000) .

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

Yapılan araştırmalar, VNTR'lerdeki heterozigositenin oldukça yüksek olduğunu ve herbir kuşakta, gamet oluşumu sırasında ortalama %1-2 sıklıkla yeni tiplerin ortaya çıkmasına yol açtığını göstermektedir. Bazı VNTR'lerdeki değişkenliğin %15'e kadar ulaşabildiği de gösterilmektedir. Normalde ortalama bir gendeki mutasyon hızı her kuşakta 10^{-5} - 10^{-6} kadardır

(Jeffreys, 1986; Nachman ve Crowell, 2000). VNTR'lerde değişkenlik hızının yüksek olması, tekrar sayısının yani alel büyüklüğünün kişiler arasında farklılık göstereceği ve dolayısıyla tek bir populasyonda bile çok sayıda alelin bulunacağı anlamına gelmektedir. Sonuç olarak VNTR'ler yüksek mutasyon hızına sahip olmaları nedeniyle yüksek derecede polimorfik yapı göstermeleri ve Mendelyen kalıtım göstermeleri sonucu çok önemli birer moleküler marker kaynağı oluşturmaktadırlar (Jeffreys, 1986; Connealy, 1994; Jeffreys 1999; Lewin, 2000) .

VNTR'ler kişiler arasında uzunluk bakımından farklılıklar göstermeleri nedeniyle genetik markerlar olarak bir populasyonda bireylerin birbirinden ayırımında DNA parmak izi, haplotip analizi, bağlantı (linkage) haritalarının çıkarılmasında, kıyaslamalı populasyon genetiği ve kimerizm çalışmalarında genetik markerlar olarak başarıyla kullanılmaktadırlar (Jeffreys, 1986; Budowle ve ark. 1990; Leeuwen ve ark., 1991; Gasparini ve ark., 1993; Pena ve Chakraborty, 1994; Regidor ve ark., 1998; Cimino ve ark., 1999; Mifflin ve ark., 1999; Nei ve Kumar, 2000).

1. 7. VNTR'lerin Oluşum Mekanizmaları

VNTR lokuslarında oluşan bazı yeni alellerin parental alelden sadece tek bir tekrar birimi kadar farklı olduğunun gözlenmesi sebebiyle, yeni alellerin sadece mayotik alel içi eşit olmayan krossover sonucu oluşmadığı, bu oluşumun replikasyon kayması mekanizması sonucu da olduğu fikrini gündeme getirmektedir. Bu durum, replikasyon sırasında yeni sentezlenen iplikçik ve komplementeri arasındaki normal eşleşmenin yerine tekrar birimlerinin biribiri üzerinde kayması ve tekrarların normalden farklı olarak birbirleriyle eşleşmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle söz konusu mekanizma, **replikasyon kayması** veya **polimeraz kayması** olarak isimlendirilmektedir. Replikasyon kayması sonucu farklı tekrar birimlerinin

eşleşmesi; replikasyon sırasında sıklıkla görülebildiği gibi, bölünmeyen hücrelerde onarımsal replikasyon sonucu düşük sıklıkla da olsa görülmektedir. Bunun sonucu mikro duplikasyonlar / delesyonlar oluşmaktadır. Ayrıca ardışık tekrarlar arasında meydana gelen yanlış eşleşmeye ilave olarak, ardışık olmayan tekrar dizileri arasında yanlış eşleşmeler sonucu ortaya çıkan replikasyon kaymalarının, geniş duplikasyonlara ve delesyonlara neden olabileceği ve bu durumun genomun evriminde önemli mekanizmalardan birini teşkil edeceği ileri sürülmektedir (Li ve Graur, 1991; Debrauwere ve ark., 1997; Jeffreys, 1999; Strachan ve Read, 1999; Richard ve Paques, 2000).

Homolog rekombinasyon (Eşit rekombinasyon–Kurallı rekombinasyon), mayozda birbirinin aynısı veya benzeri olan alelik DNA dizileri arasındaki eşit miktardaki parça değişimini tanımlamaktadır. Bu tip rekombinasyon inter-aleliktir. Homolog rekombinasyonda, normal olarak eşit miktarda alış veriş söz konusudur yani kırılma ve tekrar birleşme olayları her bir kromatitte aynı pozisyonda meydana gelmektedirler. Ancak VNTR adı verilen DNA tekrar dizilerinde karşılıklı gelen alellerdeki uzunluk polimorfizmine bağlı olarak, farklı tekrarlar arasında gerçekleşen krossover sonucu, farklı rekombinant alellerin oluştuğu da bilinmektedir. Böylece homolog rekombinasyon yoluyla iki VNTR aleli arasında krossover sonucu, bir kısmı bir alelden, geri kalan kısmı diğer alelden oluşan yeni bir tip alel yani hibrit alel oluşmaktadır ve çeşitliliklerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Li ve Graur, 1991; Debrauwere ve ark., 1997; Jeffreys, 1999; Strachan ve Read, 1999, Richard ve Paques 2000, Lewin, 2000).

Kardeş kromatit değişimi, homolog rekombinasyonun başka bir türü olup, özellikle VNTR'ler gibi tekrar dizilerine sahip lokuslarda gözlenen alelik bir rekombinasyondur ve aynı bir kromozomun kardeş kromatitlerinde aynı lokustaki alellere ait farklı tekrar birimlerinin birleştirilmesiyle oluşmaktadır. Bununla beraber kardeş kromatit değişimleri, normal olarak fazla genetik çeşitlilik yaratmamaktadırlar. Çünkü kardeş kromatitler birbirinin aynı DNA

dizilerine sahiptirler (Li ve Graur, 1991; Debrauwere ve ark., 1997; Jeffreys, 1999; Strachan ve Read, 1999, Bölüm 9, Richard ve Paques 2000).

Non-homolog rekombinasyon (Eşit olmayan-Kuraldışı Rekombinasyon), alelik olmayan diziler arasında gerek mayoz gerekse mitoz sırasında gerçekleşen kural dışı krossover olarak tanımlanmaktadır ve non-alelik (alelik olmayan)tir. Kural dışı rekombinasyonda %100 homoloji yoktur ve bu değişimde eşitsizlik görülmektedir. Non-homolog rekombinasyon, homolog kromozomlar arasında olabildiği gibi non-homolog kromozomlar arasında da gerçekleşebilmektedir. Non-homolog rekombinasyonda parça değişimi karşılıklı olsa da eşit değildir. Bu tip krossoverin gözlemlendiği dizilere bakıldığında zaman dikkate değer ölçüdeki ve uzunluktaki dizi benzerliği yanlış eşleşmiş kromozomların stabilizasyonunu açıklamaktadır. Yanlış eşleşmiş kardeş olmayan homolog ve non-homolog kromatitler arasında meydana gelen eşit olmayan krossover sonucu, kural olarak, değişim olayına iştirak eden kromatitlerden birisinde delesyon, diğerinde ise duplikasyon / insersiyon ortaya çıkmaktadır (Li ve Graur, 1991; Debrauwere ve ark., 1997; Jeffreys, 1999; Strachan ve Read, 1999, Richard ve Paques 2000).

Eşit olmayan kardeş kromatit değişiminin nadiren de olsa kardeş kromatitler arasında meydana gelmesi sonucu ortaya çıktığı da bilinmektedir. Bu tip değişim, özellikle benzer tipteki tekrar dizilerinden oluşan VNTR'leri farklı lokuslarda taşıyan kromozomlarda gerçekleşen non-alelik bir rekombinasyondur.

VNTRler gözönünde bulundurulduğunda, farklı alelik veya non-alelik tekrar dizileri arasında yüksek derecede dizisel homolojinin bulunması sonucu, kardeş olmayan kromatitler arasında olduğu kadar kardeş kromatitlerde de yanlış eşleşme kolaylaşmaktadır. Kromatitlerin bu şekilde yanlış eşleşmesi sonucu bu dizilerdeki tekrar birimlerinin sayısında artma veya azalma olmaktadır (Li ve Graur, 1991; Debrauwere ve ark., 1997; Jeffreys, 1999; Strachan ve Read, 1999; Richard ve Paques 2000).

Gen dönüşümü (gene conversion), bir rekombinasyon sonunda karşılıklı olmayan bilgi aktarımıyla sonuçlanan bir durumu ifade etmektedir. Gen dönüşümü alelik DNA dizileri arasında olabileceği gibi non-alelik DNA dizileri arasında da ortaya çıkabilmektedir. Diziler arasındaki değişim tek yönlü olmaktadır. Bunun sonucu, rekombinasyon ürünleri arasında gözlenen oranlar beklenenden farklılık göstermektedirler. Gen dönüşümünde, birbiriyle etkileşime giren dizilerden verici olarak isimlendirilen dizi değişmeden kalırken, alıcı DNA dizisinin sahip olduğu dizinin bir kısmının veya tamamının verici diziyeye dönüştüğü görülmektedir.

Gen dönüşümü, rekombinasyon sırasında verici genden gelen DNA zinciri ile alıcı genden gelen komplementer zincir arasında heterodubleks oluşumunu takiben yanlış eşleşme onarımı sonucu meydana gelmektedir. DNA onarım enzimleri heterodublekstekki iki zincirin arasında oluşan yanlış eşleşmeleri onarıırken alıcının DNA dizisini, verici zincire komplementer olacak şekilde düzeltmektedir (Li ve Graur, 1991; Debrauwere ve ark., 1997; Freeman ve Herron, 1998; Jeffreys, 1999; Strachan ve Read, 1999; Lewin, 2000, Richard ve Paques 2000).

Gen dönüşümü, ilkin, tüm sekiz mayoz ürününün askosporlar olarak elde edilip çalışılabildiği (tetrat analizi) *Neurospora crassa* (ekmek küfü mantarı)da oldukça iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Tetrat analizlerinde mayotik ürünlerin beklenen 4:4 oranından 3:5 veya 2:6 şeklindeki sapmalar gen dönüşümünü yansıtmaktadır (Strachan ve Read, 1999).

Kompleks organizmalarda gen dönüşümünün belirlenmesindeki güçlüğe rağmen memeli genomunda bir lokustaki bir alelin, aynı türün başka bir lokusundaki diğer alellerin mutasyon modellerine benzer mutasyonlar içerdiği pekçok örnek mevcuttur. Memelilerde bir VNTR lokusunda ortaya çıkan niteliksel bir değişikliğin birlikte gen dönüşümü (co-conversion / concerted evolution) sonucu aynı veya farklı lokuslardaki VNTR tekrar birimlerine de yayıldığı bilinmektedir (Strachan ve Read, 1999).

Yüksek derecede mutasyona uğrayabilen bazı VNTR lokusları genellikle her gamet başına %1 veya daha fazla sıklıkta yüksek eşey hattı mutasyon hızına sahiptirler ve tekrar birimlerinin herbiri, tekrar alt sınıflarının ayırılmasına olanak tanıyacak şekilde nükleotit farklılıkları göstermektedirler. Bu özelliklerinden dolayı eşey hattı mutasyonları, her bir gamette mutant VNTR alellerinin tespit ve karakterize edilmesi suretiyle çalışılabilmektedir. Bunu gerçekleştirmek için Jeffreys ve ark. "small pool PCR (SP-PCR)" adını verdikleri bir yöntemde herbir spermden izole edilmiş DNA'nın çoklu dilüsyonlarını yaparak her tüpte en fazla 100 sperm DNA'sı bulunacak şekilde kalibre ederek PCR gerçekleştirmektedirler. Herbir dilüsyondan elde edilen PCR ürünleri, uzunlukları öncü alelden belirgin şekilde ayırılabilen yeni aleller ile sonuçlanan mutasyonlar için analiz edilmektedir. Eşey hattı mutasyonları için tekrar dizileri içeren 3 farklı VNTR lokusları üzerinde yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar komşu markerlarla birlikte incelemeye alındığında iki önemli tespit yapılmıştır. Birincisi mutasyonların büyük bir çoğunluğunun tekrar dizileri içeren VNTR lokuslarıyla sınırlı kalması ancak komşu markerlarda görülmemesidir. İkincisi alellerden sadece birinde tekrar sayısının artması, yani bu olayın karşılıklı dizi değişimi sonucu olmamasıdır. Bu iki özellik birlikte alelik gen dönüşümü olayını, VNTR'lerdeki tekrar sayısı artışında rol oynayan önemli mekanizmalardan birisi olarak gündeme getirmektedir (Strachan ve Read, 1999, Bois 1999).

SP-PCR çalışmalarında da gösterildiği gibi tekrar dizilerinden oluşan alelik DNA dizilerinin yüksek derecede uzunluk polimorfizmi göstermeleri nedeniyle VNTR'ler, bireyler arası ayırımın yapılması amacıyla DNA parmak izi çalışmalarında kullanılmaktadırlar. Farklı kromozom bölgelerinde olduğu bilinen ve benzer / aynı tekrar dizileri taşıyan lokuslardaki non-alelik polimorfizmler birlikte değerlendirildiğinde bireyin haplotipi çıkarılmaktadır (Budowle ve ark., 1990; Gasparini ve ark., 1991; Hansen ve Morling, 1993, Pena ve Chakraborty, 1994) .

1.8. Genetik Çeşitlilik Ölçüsü – Heterozigosite

Geleneksel olarak populasyon genetikçileri tarafından kullanılan verilerin önemli bir kısmını, genlerin farklı formlarının bir populasyon içerisindeki göreceli sıklıkları oluşturmuştur. Mutasyonlar sonucu oluşan genin farklı formları **alel** olarak tanımlanır. Bir genin iki veya daha fazla sayıda alele sahip olması, populasyonun söz konusu gen bakımından **polimorfizm** gösterdiği anlamına gelir. Bir populasyonun genetik yapısındaki farklılıkların varlığı ve birden fazla farklılığın bir arada bulunması genetik polimorfizm olarak ifade edilir. Polimorfizmin temel özellikleri: genomun belli bir bölgesindeki baz çifti dizisindeki farklılıkların olması, bu farklılıkların o populasyonda kalıcı olması, yani bir sonraki nesile aktarılabilmesi ve sıklığının %1'den az olmaması şeklinde özetlenebilir (Li ve Graur, 1991; Page ve Holmes, 2000; Nei ve Kumar, 2000, Bölüm 12) .

Bir populasyonda polimorfizm görülen bir lokusta en yüksek sıklıkla bulunan alel **yaban tip**, daha nadir olarak gözlenen alel ise **varyant tip** olarak isimlendirilir. Alel sıklıklarının neden gözlemlendiği şekilde olduğunu anlamak için, alel sıklıklarının matematiksel modeller şeklinde ifade edilmesi gerekmektedir (Page ve Holmes, 2000).

A ve a olarak ifade edilen iki alele sahip bir gen lokusu en basit modeli göstermektedir. Bu durumda söz konusu alellerin belli bir populasyon içindeki sıklıkları matematiksel olarak sırasıyla p ve q'dur. DNA seviyesinde ortaya çıkan çok fazla miktardaki genetik çeşitliliğe geçmeden önce, basit görünmekle beraber, yalnızca iki alele sahip bir genin ele alındığı matematiksel model konunun anlaşılmasında ilk basamak olması bakımından önemlidir (Page ve Holmes, 2000).

Üzerinde çalışılan organizmaların çoğu diploid olduğundan, bir gen, her biri homolog kromozomların birinde bulunan iki alele sahiptir ve bireyler alel kombinasyonları düşünüldüğünde 3 farklı genotipe sahip olabilirler: AA, Aa ve aa. AA ve aa genotipindeki bireyler aynı tipteki alelleri taşıdıkları için

homozigot, Aa genotipindeki bireyler ise farklı iki alel taşıdıkları için **heterozigot** olarak ifade edilirler. Heterozigot bireylerin fenotipi aleller arası ilişkiye bağlıdır. Bazı lokuslar itibariyle heterozigot bireylerde bir alel diğerine nazaran fenotipte daha fazla ifade bulur. Bu durumda söz konusu alel **dominant (baskın)**, diğeri ise **resesif (çekinik)**, ve bu tip aleleler arası ilişki dominant-resesif alel ilişkisi olarak isimlendirilir. Dominant-resesif alel ilişkisinde ($A > a$) Aa genotipine sahip bir bireyin fenotipi AA genotipteki bireyle aynı olacaktır. Bu lokus itibariyle bir populasyonda genotipik sıklıkları (p, q) bulmak için dominant fenotipteki bireylerin genotipinin homozigot veya heterozigot olduğunu tespit etmek gerekmektedir. Heterozigot genotipli bireylerin fenotipinde şayet her iki alel birden aynı oranda ifade buluyor ise bu aleller **kodominant (eşbaskın)** olarak tanımlanırlar. Kodominans görülen karakterler itibariyle heterozigot bireylerin üçüncü bir fenotipi oluşturması heterozigot bireylerin kolayca tanımlanabilmesine olanak sağlar. Bu nedenle, populasyon genetiği çalışmalarında kullanılan protein ve DNA markerlarının çoğu kodominanttır (Li ve Graur, 1991; Nei ve Kumar, 2000; Page ve Holmes, 2000) .

Yukarıda belirtilen genotiplerin (AA, Aa ve aa) bir populasyon içerisindeki sıklıkları, f_{AA} , f_{Aa} ve f_{aa} olarak ifade edilecek olursa, A ve a sıklıklarını p ve q şeklinde hesaplamak kolay olacaktır.

$$p = f_{AA} + \frac{1}{2} f_{Aa},$$

$$q = f_{aa} + \frac{1}{2} f_{Aa}$$

$$p + q = 1 \text{ 'dir.}$$

Özetleyecek olursak bir alelin sıklığı, o alel itibariyle populasyonda mevcut homozigotların sıklığı ile heterozigotların sıklığının yarısının toplamına eşittir (Li ve Graur, 1991; Nei ve Kumar, 2000; Page ve Holmes, 2000) .

Alel sıklıkları p ve q , bir populasyonda var olan genetik çeşitliliğin miktarının basit bir ifadesi olarak kullanılmaktadır. Ancak bir populasyonda herhangi bir

lokusla ilgili olarak genellikle ikiden fazla alel bulunduğunda bunların sıklıkları ile ilgilenmek her zaman kolay olmayabilir. Bu nedenle, herhangi bir popülasyondaki genetik çeşitliliğin ölçüsü olarak **heterozigosite** terimi kullanılır (Page ve Holmes, 2000). Heterozigosite, bir popülasyonda mevcut heterozigotların toplam sıklıklarının ifadesidir. Heterozigosite aşağıda verilen basit formülle hesaplanmaktadır (Page ve Holmes, 2000).

$$H = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

m, bir lokusta tespit edilen toplam alel sayısı

X_i , i. alelin sıklığı'dır.

Heterozigosite, bir lokusla ilgili çok sayıda ve birbirine eşit sıklıkta aleller bulunduğu durumlarda en büyük değerini almaktadır (Page ve Holmes, 2000; Nei ve Kumar, 2000) .

Yakın zamana kadar, heterozigosite genellikle protein elektroforezi yoluyla tespit edilen elektroforetik mobiliteleri farklı olan allozimik enzimlere bağlı olarak allozim sıklıkları şeklinde tespit edilmiştir. Hernekadar allozim çeşitlilikleri üzerindeki çalışmalar popülasyon genetiği çalışmalarının temelini oluşturmuş olsa da, günümüzde yapılan popülasyon genetiği çalışmaları, kesin ve doğrudan bilgilendirici olması nedeniyle DNA seviyesindeki farklılıklar üzerinde yoğunlaşmış bulunmaktadır (Li ve Graur, 1991; Page ve Holmes, 2000; Nei ve Kumar, 2000) .

Popülasyonlar arası genetik farklılaşmanın en yaygın olarak kullanılan ölçüsü ise F_{ST} (Fixation index) değeridir. Bir popülasyondaki genetik çeşitliliğin ölçüsünün ise heterozigosite olduğu bilinmektedir. Herhangi bir polimorfik lokus için popülasyonlar arası genetik farklılaşmanın belirlenmesinde kullanılan F_{ST} değeri, bu lokus itibarıyla farklı popülasyonlarda belirlenen heterozigosite değerlerinin ikiye bölünmesi olarak

birbirlerinden ne kadar farklı olduğunun F_{ST} istatistiği ile hesaplanması sonucu elde edilmektedir. F_{ST} değeri ne kadar küçük ise söz konusu lokus için karşılaştırılan iki popülasyonun birbirine o kadar yakın olduğu anlaşılır. F_{ST} değerinin küçük çıkması için karşılaştırılan iki popülasyonun heterozigositeleri arasındaki farkın küçük olması gerekmektedir ki bu da ancak iki popülasyon arasında gen göçü olması durumunda söz konusu olmaktadır. Büyük F_{ST} değeri ise tam tersi bir durumu ifade etmektedir. Başka bir ifadeyle herhangi bir lokus için karşılaştırılan iki popülasyonun genetik açıdan birbirinden farklı olduğu anlaşılır (Nei ve Kumar, 2000; Page ve Holmes, 2000).

1.9. Amaç

Bir popülasyondaki kişiler arasında, çeşitli VNTR lokuslarında çok sayıda ve polimorfik alellerin olduğu bilinmektedir. Heterozigositesi yüksek VNTR lokusları popülasyon genetiği, adli tıp ve kemik iliği nakli sonrası kimerizm tayini gibi çeşitli genetik çalışmalarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar (Jeffreys, 1986; Budowle ve ark. 1990; Leeuwen ve ark., 1991; Gasparini ve ark., 1993; Pena ve Chakraborty, 1994; Regidor ve ark., 1998; Cimino ve ark., 1999; Mifflin ve ark., 1999; Nei ve Kumar, 2000). İncelenen VNTR lokuslarının heterozigositelerinin yüksek olması VNTR lokuslarının seçiminde önemlidir. Bu nedenle bir popülasyonda, sayılan amaçlar için kullanılacak uygun VNTR lokuslarının belirlenmesi için öncelikle popülasyon çalışmalarının yapılması önem kazanmaktadır (Lewantin ve Daniel, 1991).

Bu tez çalışmasında farklı popülasyonlardaki polimorfizmleri çalışılmış bulunan ve özellikle kemik iliği nakli sonrası kimerizm tayini amacıyla yaygın olarak kullanılan dört otozomal VNTR (D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53) lokusunun Türkiye'deki polimorfizmlerinin belirlenmesi ve yukarıda belirtilen uygulamalara yönelik olarak uygun lokusların tayini hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. İncelenen Lokuslar

Bu çalışmada 4 otozomal VNTR lokusu çalışılmıştır. Bu lokuslar D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 VNTR lokuslarıdır. Bu lokusların genel özellikleri Çizelge 2.1.1.'de özetlenmektedir (<http://www.gdb.org>).

Çizelge 2.1.1. D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 VNTR lokuslarının genel özellikleri

VNTR Lokusu	Kromozomal Lokalizasyonu	Tespit Edilen Maksimum Heterozigosite	Tespit Edilen Alel Sayısı	Tekrar Dizisi Uzunluğu (bç)
D1S80	1p36-1p35	0,8080	26	16
D4S95	4p16.3-4p16.3	0,8440	13	20-60
D17S30	17p13.3-17p13.3	0,8625	19	70
TP53	17p13.1-17p13.1	0,6940	6	5

2.1.1. D1S80

Bu VNTR lokusu 1p36-1p35'e lokalize edilmiş olup 16 bç'lik tekrar dizileri içermektedir. Bu güne kadar birçok farklı populasyon için polimorfizmi çalışılan bu lokus için en yüksek heterozigosite 0,8080 olarak bulunmuştur. Bu lokus itibarıyla uzunlukları 382 - 798 bç arasında değişen 26 farklı alel tespit edilmiştir (<http://www.gdb.org>). Çizelge 2.1.1.1'de D1S80 lokusu alellerinin genel sınıflandırılması verilmektedir.

2.1.2. D4S95

Bu lokus 4p16.3-4p16.3'e lokalize edilmiştir. Bu lokus için bugüne kadar saptanan en yüksek heterozigosite 0,8440 olarak bulunmuştur ve uzunlukları 990 ila 1600 bç. arasında değişen 13 farklı aleli saptanmıştır. Çizelge 2.1.2.1.'de D4S95 lokusuna ait alellerin uzunlukları verilmektedir(<http://www.gdb.org>).

2.1.3. D17S30 (D17S5 = YNZ22)

17p13.3-17p13.3'te lokalize olan bu lokus 70 bç'lik tekrar dizileri ihtiva etmektedir. Farklı populasyon çalışmalarında D17S30 lokusu için tesbit edilen en yüksek heterozigosite 0,8625'tir ve uzunlukları 168 ila 938 bç. arasında değişen 19 farklı aleli saptanmıştır. Çizelge 2.1.3.1'de D17S30 lokusuna ait aleller ve uzunlukları gösterilmiştir (<http://www.gdb.org>).

2.1.4. TP53

17p13.1-17p13.1'de lokalize olduğu tesbit edilmiştir. 5 bç.'lik tekrar dizileri ihtiva eden bu lokus için saptanan en yüksek heterozigosite 0,6940 olarak bulunmuştur. TP53 geninin ilk intronunda tanımlanan bu VNTR lokusunda uzunlukları 105 ila 140 bç. arasında değişen 6 farklı alel tespit edilmiş bulunmaktadır. Çizelge 2.1.4.1'de TP53 lokusu için tespit edilmiş olan aleller ve uzunlukları verilmektedir (<http://www.gdb.org>).

Çizelge 2.1.1.1 D1S80 lokusu alellerinin genel sınıflandırılması

Alel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Tekrar Sayısı	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Uzunluk (bp)	382	398	414	430	446	462	478	494	510	526	542	558	574	590	606	622	638	654	670	686	702	718	734	750	766	782

Çizelge 2.1.2.1 D4S95 lokusu alellerinin genel sınıflandırılması

Alel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Uzunluk (kb)	1.60	1.56	1.52	1.50	1.48	1.44	1.33	1.24	1.18	1.15	1.09	1.03	0.99

Çizelge 2.1.3.1 D17S30 lokusu alellerinin genel sınıflandırılması

Alel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Uzunluk (bp)	168	238	308	378	448	518	588	658	728	798	868	938	1008	1078	1148	1218	1288	1358	1428

Çizelge 2.1.4.1 TP53 lokusu alellerinin genel sınıflandırılması

Alel	1	2	3	4	5	6
Uzunluk (bp)	140	130	125	120	115	105

2.2. Çalışma Grubu

Bu çalışma kapsamında Türkiye’de yaşayan ve rastgele seçilen, birbiri ile akraba olmayan 83-99 birey çalışılmıştır. Kan örnekleri alınan kişiler, çalışmanın amacı ve yöntemi hakkında bilgilendirilmiş, ayrıca yeterince bilgilendirildikleri ve kendi iradeleriyle bu çalışmaya katıldıklarını gösteren bir onam formu kişiler tarafından imzalanmıştır. Onam formu örneği Ek’te sunulmaktadır.

2.3. DNA Eldesi ve Miktar Tayini

DNA izolasyonu, 5ml periferik kandan aşağıda tanımlanan standart fenol-kloroform yöntemiyle yapılmıştır.

- EDTA (100 µl, 0,5 M) ’lı tüpe 5 ml periferik kan alınır.
- 3500 rpm’de 20 dakika santrifüj edilip (lonetics medical products, Centurion 6000) serum uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 10 ml lizis tamponu (0.154 M NH₄Cl [Sigma, A9434], 0.0092M KHCO₃ [Sigma, P4913], 0.0001 M EDTA [Sigma, E5134]) eklenir ve 1 saat buz üzerinde bekletilir.
- 3500 rpm’de 20 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır, pelet üzerine 5 ml 1x STE (0.1 M NaCl [Merk, 1.06400], 0.01 M Tris pH=8,0[Sigma, T8524], 0.001 M EDTA) eklenir ve karıştırılır.
- 3500 rpm’de 20 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant atılıp pelet üzerine 4.5 ml 1x STE, 0.5 ml %10 SDS (Sodium Lauryl Sülfat [Sigma, L4390]) ve 50 µg/ml Proteinaz K (Sigma, P4914) eklenir, yavaşça karıştırılır ve bir gece 37⁰C’de etüvde (Heraus, FB 420) inkübe edilir.
- Ertesi gün solüsyon üzerine eşit hacimde doymuş fenol (Sigma, P4557) eklenip karıştırıldıktan sonra 3500 rpm’de 20 dakika santrifüj edilir.

- Süpernatant temiz bir tüpe alınıp üzerine eşit hacimde kloroform:izoamil alkol karışımı (24:1) (Sigma, C2432:Sigma, I9392) eklenir ve karıştırılır.
- 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir ve süpernatant temiz bir tüpe aktarılır.
- Solüsyon üzerine eşit hacimde saf etanol (Carlo Erba, 414608) ilave edilir ve yavaşça karıştırılarak DNA'nın presipite olması beklenir. Presipite olan DNA mikropipet ile 1.5 ml'lik mikrofüj tüpüne aktarılır.
- Bir kez saf etanol, bir kez de % 70 etanol ile 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj (Herolab, MikroCen 13D) edilir, süpernatant atılır ve DNA kurumaya bırakılır.
- Kurutulan DNA 500 µl dH₂O ile çözülür.

Elde edilen DNA'nın miktar ve saflığının tespit edilmesi için spektrofotometrik ölçüm aşağıdaki gibi yapılmıştır.

- Çözülmüş DNA örneğinden 20 µl alınıp quartz tüp içinde dH₂O ile hacmi 2 ml'ye tamamlanır, iyice karıştırılır.
- Spektrofotometrede OD₂₆₀ ve OD₂₈₀ değerleri ölçülür (Jasco UV/VIS Spectrophotometer, V-530).
- 260 ve 280 nm'deki optik dansite değerlerinin oranı (OD₂₆₀/ OD₂₈₀) hesaplanarak DNA'nın saflığı belirlenir. Aşağıdaki formül kullanılarak elde edilen DNA'nın konsantrasyonu belirlenir.

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times 0.05 \times 100 \text{ (sulandırma katsayısı)}$$

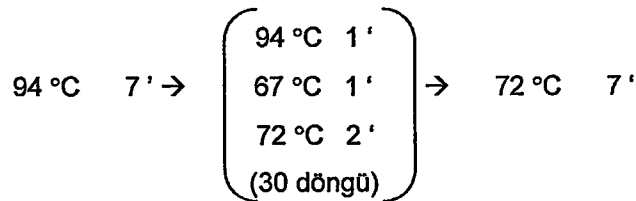
2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu çalışma kapsamında öngörülen dört VNTR lokusu uygun primerler (Biotech) kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Kullanılan primer dizileri Çizelge 2.4.1'de verilmektedir (Kasai ve ark.,1990; Allitto ve ark., 1991; Futreal ve ark., 1991; Kijas ve ark., 1994).

Çizelge 2.4.1. Çalışılan lokusların primer dizileri

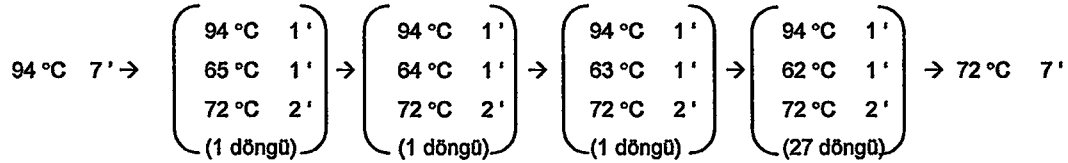
VNTR Lokusu	Primer dizileri (5'→3')
D1S80	PF - GAA ACT GGC CTC CAA ACA CTG CCC GCC G PR - GTC TTG TTG GAG ATG CAC GTG CCC CTT GC
D4S95	PF - GCA TAA AAT GGG GAT AAC AGT AC PR - GAC ATT GCT TTA TAG CTG TGC CTC AGT TT
D17S30	PF - CAC AGT CTT TAT TCT TCA GCG PR - CGA AGA GTG AAG TGC ACA GG
TP53	PF - GCA CTT TCC TCA ACT CTA CA PR - AAC AGC TCC TTT AAT GGC AG NPF - GCA CTT TCC TCA ACT CTA CA NPR - CCA TTG CAC TCC AGC CTG GG

D1S80 VNTR lokusunun çoğaltılması için Budowle ve ark. (1995)'nin yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla içerisinde 1Ü Taq Polimeraz (MBI Fermentas EP0402), 10 mM TrisHCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 20 pmol her bir primer (Biotech), 200 µM her bir dNTP (Sigma, dNTP-100), 0,1 µg genomik DNA içeren toplam 50 µl reaksiyon karışımında thermocycler'da (Biometra T1 Thermocycler™, 050-901 T1 96) PCR gerçekleştirilmiştir. Uygulanan PCR protokolü aşağıdaki gibidir.

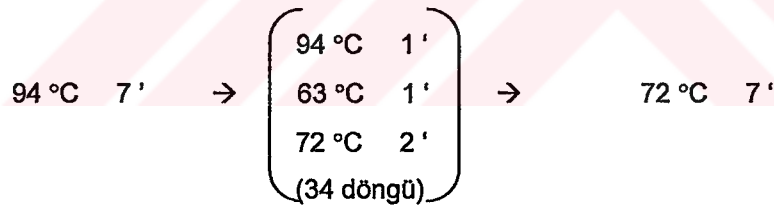


D4S95 VNTR lokusunun çoğaltılması için, 1Ü Taq Polimeraz (MBI Fermentas, EP0402), 10 mM TrisHCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 20 pmol her bir primer (Biotech), 200µM her bir dNTP (Sigma, dNTP-100) ve

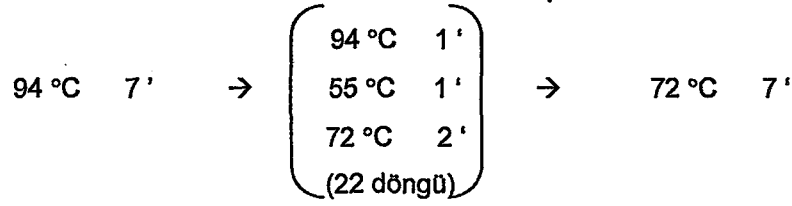
0,1 µg genomik DNA içeren toplam 50µl reaksiyon karışımında thermocycler'da (Biometra Personal Cycler™,050-500) "touch down PCR" gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları aşağıda gösterildiği gibidir.



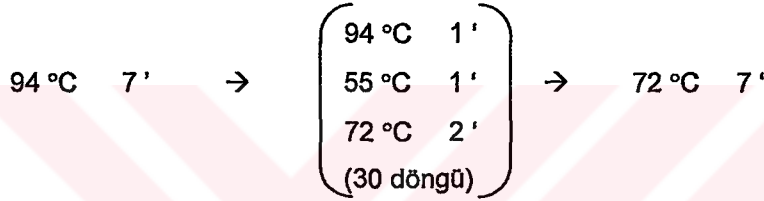
D17S30 VNTR lokusunun PCR ile çoğaltılması için Cimino ve ark. (1999) yöntemi modifiye edilmiştir. Bu amaçla, içerisinde 0,5 Ü Taq Polimeraz (MBI Fermentas EP0402), 10 mM TrisHCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 20 pmol her bir primer (Biotech), 200µM her bir dNTP (Sigma, dNTP-100), 0,1 µg genomik DNA içeren toplam 50µl reaksiyon karışımında thermocycler'da (Biometra T1 Thermocycler™, 050-901 T1 96) PCR ile çoğaltılmıştır. Kullanılan PCR koşulları aşağıdaki gibidir.



TP53 VNTR lokusu için iki farklı primer çiftiyle "nested PCR" gerçekleştirilmiştir. Birinci tur için, içerisinde 0,5 Ü Taq Polimeraz (MBI Fermentas, EP0402), 10 mM TrisHCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0,1 pmol her bir primer (PF ve PR) (Biotech), 200µM her bir dNTP (Sigma, dNTP-100), 50 ng genomik DNA içeren toplam 20 µl reaksiyon karışımında thermocycler'da (Biometra Personal Cycler™,050-500) PCR gerçekleştirilmiştir (Futreal ve ark., 1991). Kullanılan PCR koşulları aşağıdaki gibidir.



İkinci tur PCR için içerisinde 0,5 Ü Taq Polimeraz (MBI Fermentas EP0402), 10 mM TrisHCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 pmol her bir primer (NF ve NR) (Biotech), 200µM her bir dNTP (Sigma, dNTP-100), 2 µl birinci tur PCR ürünü içeren toplam 20 µl reaksiyon karışımında thermocycler'da (Biometra Personal Cycler™,050-500) PCR gerçekleştirilmiştir. Uygulanan PCR protokolü aşağıda verildiği gibidir.



Her PCR uygulamasında negatif kontrol olarak genomik DNA yerine dH₂O içeren tüplerle PCR gerçekleştirilmiştir.

Her lokus için PCR işlemi bittikten sonra ürünün varlığını kontrol etmek amacıyla %1'lik agaroz jelde elektroforez yapılmıştır. Jel, 1xTBE (0.089M Trizma base [Sigma, T8524], 0.089M Borik asit [Sigma, B6768], 0.002M EDTA) içinde 0.1 µg/µl Etidyum bromid (Sigma, E8751) içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR ürünlerinden 10 µl alınarak agaroz jelde 90 V'da 0,5 saat yürütüldükten sonra (Biometra-Agagel Mini, 020-000), UV-transilüminatör üzerinde reaksiyon sonuçları değerlendirilmiştir.

2.5. Alel Polimorfizmlerinin Belirlenmesi

D1S80 lokusu alellerinin uzunlukları, önce agaroz jel elektroforezinde varlığı tespit edilen PCR ürünlerinin %3'lük Nusieve GTG agarozda (FMC Bioproducts, 50080) uzunlukları bilinen kontrol markerlarıyla birlikte [50 bp DNA step ladder (Sigma, S7025)] 70 V'da 18 saat yürütülmesi ile tespit edilmiştir. Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel Etidyum Bromid (0,5 µg / ml) içeren 1 x TBE içerisinde 1 saat boyanmış ve sonuçlar UV transilüminatör üzerinde değerlendirilmiştir.

D4S95 ve TP53 VNTR lokuslarına ait alellerin uzunlukları sırasıyla % 4'lük ve %6'lık denatüre poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemleriyle tespit edilmiştir. %4'lük denatüre PAGE : 20 gr üre (Sigma, U5378), 4 ml %40 akrilamid:bisakrilamid stok solüsyonu (38:2) (Sigma, A9099 : Sigma, M2022), 4 ml 10xTBE ve 17.3 ml ddH₂O ve % 6'lük denatüre PAGE : 20 gr üre (Sigma, U5378), 6 ml %40 akrilamid:bisakrilamid stok solüsyonu (38:2) (Sigma, A9099 : Sigma, M2022], 4 ml 10xTBE ve 15.3 ml ddH₂O'dir.

Agaroz jel elektroforeziyle varlığı tespit edilen PCR ürünleri 95⁰C'de 2 dakika denatüre edildikten sonra jele yüklenmiştir. D4S95 lokusu için örnekler uygun markerlardan oluşan kontrol [100 bp DNA ladder (Invitrogen, 15628-019)] eşliğinde, 250 V'da 18 saat yürütülmüştür (Scie-Plas Vertical Electrophoresis Units, V20-CDC). TP53 lokusu için kontrol olarak pUC Mix Marker, 8 (MBI Fermentas, SM0301) eşliğinde, 1500 V'da 3 saat elektroforez (Scie-Plas Vertical Electrophoresis Units, V20-CDC) gerçekleştirilmiştir.

Bantlar aşağıda tanımlanan gümüş boyama tekniği ile tespit edilmiştir.

PAGE bittikten sonra jel %10 etanol içeren fiksatif solüsyonunda 15 dakika muamele edilir.

- %1 HNO₃ solüsyonunda 3 dakika muamele edilir.
- Jel ddH₂O ile 1dakika yıkanır.

- % 0,2 AgNO₃ ve % 0,1 formaldehit solüsyonunda 25 dakika muamele edilir.
- ddH₂O ile hızlı şekilde 1dakika yıkanır.
- %3 Na₂CO₃ (Merck, 6398) solüsyonu içerisinde %2 Na₂S₂O₃ solüsyonundan 100µl/L olacak şekilde, taze hazırlanan developer solüsyonunda bantlar görülene kadar muamele edilir.
- Fiksatif solüsyonunda 2-3 dk bekletilir.
- ddH₂O ile yıkama yapılır.

D17S30 lokusuna ait alellerin uzunluklarının tespiti, deneyde elde edilen PCR ürünlerinin herbirinin arası 100 bç olan fragmanlar içeren marker [100 bp DNA ladder (Invitrogen, 15628-019)] eşliğinde, % 1'lik agaroz jelde 70 V'da 2 saat yürütülmüş (Biometra-Agagel Mini, 020-000) ve UV transilüminatör üzerinde sonuçlar değerlendirilmesiyle yapılmıştır. %1'lik agaroz jel, 1xTBE (0.089M Trizma base [Sigma, T8524], 0.089M Borik asit [Sigma, B6768], 0.002M EDTA) içinde 0.1 µg/µl Etidyum bromid (Sigma, E8751) içerecek şekilde hazırlanmıştır.

2.6. İstatistiksel Değerlendirme

2.6.1. Alel Sıklıkları (Frekansları) ve Hardy- Weinberg Dengesi

Herhangi bir alelin bir populasyon içerisindeki göreceli sıklığı **alel sıklığı** olarak isimlendirilmektedir. Bir populasyondaki alellerin sıklık (frekans)larındaki değişiklikler genellikle o populasyonda meydana gelen genetik değişikliklerin bir ölçüsü olarak alınabilir. Bu nedenle alel sıklıklarının tespitini yapmak önem kazanmaktadır (Li ve Graur, 1991, Bölüm 2; Nei ve Kumar, 2000, Bölüm 12; Page ve Holmes, 2000).

İki alelli bir sistemde alel sıklığı Eşitlik 2.6.1.1'e göre hesaplanmaktadır.

Eşitlik 2.6.1.1.

$$\text{Alel sıklığı} = \frac{(2 \times \text{Homozigot bireylerin sayısı}) + (\text{Heterozigot bireylerin sayısı})}{[2 \times \text{Toplam birey sayısı (N)}]}$$

VNTR ler ikiden fazla alele sahiptirler fakat genotip sıklıkları, iki alelli bir lokusta olduğu gibidir. Bu çalışma kapsamında incelen 4 VNTR lokusu (D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53) için tespit edilen alellerin sıklıkları aşağıda verilen Eşitlik 2.6.1.2'ye göre hesaplanmıştır.

Eşitlik 2.6.1.2.

$$x_i = \frac{2m_{ii} + \sum_{i \neq j} m_{ij}}{2m}$$

x_i , i. alelin sıklığı

m_{ii} , A_iA_i genotipine sahip homozigot bireylerin sayısı

m_{ij} , A_iA_j genotipine sahip heterozigot bireylerin sayısı

m , Toplam birey sayısıdır.

Herbir lokusun Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığını anlamak için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları arasındaki uyum Arlequin Version 2.000 programında mevcut olan Fisher'in kesin χ^2 testi (Fisher's exact test) ile değerlendirilmiştir.

2.6.2. Heterozigosite

Heterozigosite veya başka bir ifadeyle gen farklılığı, bir populasyonda mevcut genetik çeşitliliğin en kabul gören ölçüsüdür (Page ve Holmes, 2000; Nei ve Kumar, 2000) .

D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 VNTR lokusları için gözlenen (H_0) ve beklenen heterozigosite (\hat{h}) değerleri aşağıda verilen Eşitlik 2.6.2.1'e ve 2.6.2.2'ye göre hesaplanmıştır.

Eşitlik 2.6.2.1.

$$\text{Gözlenen Heterozigosite (} H_0 \text{)} = \frac{\text{Heterozigot bireylerin sayısı}}{\text{Toplam birey sayısı}}$$

Eşitlik 2.6.2.2.

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

x_i , i. alelin sıklığı

n , Toplam birey sayısıdır (Nei ve Kumar, 2000)

2.6.3. Ayırım Gücü (Power of Discrimination = PD)

Ayırım gücü, populasyondan seçilen iki bireyin, ilgilenilen bir alel bakımından birbirinden farklı olması olasılığıdır. Çalışılan 4 VNTR lokusunun PD değerleri aşağıda verilen Eşitlik 2.6.3.1'e göre hesaplanmıştır.

Eşitlik 2.6.3.1.

$$PD = 1 - P_1$$

$$P_1 = \sum x_i^2$$

Burada , x_i , i. genotipin sıklığıdır. x_i^2 ise, bir populasyondan rastgele seçilen iki bireyin ilgilenilen lokus bakımından genotiplerinin aynı olması olasılığıdır ve "aynılık olasılığı (Probability of identity = Matching probability)" olarak ifade edilmektedir. P_1 değeri ne kadar küçük ise, o lokusa ait PD değeri artacaktır. Bilindiği gibi, PD değeri arttıkça söz konusu lokusun bir populasyondaki bireyler arasındaki ayırım gücü artmaktadır.

Bileşik ayırım gücü (combined power of discrimination) herbir lokus için tespit edilen P_1 değerlerinin çarpılmasıyla elde edilen değer 1'den çıkartılmasıyla elde edilir.

2.6.4. F_{ST} Değerlerinin Hesaplanması ve Dendrogram Çizimi

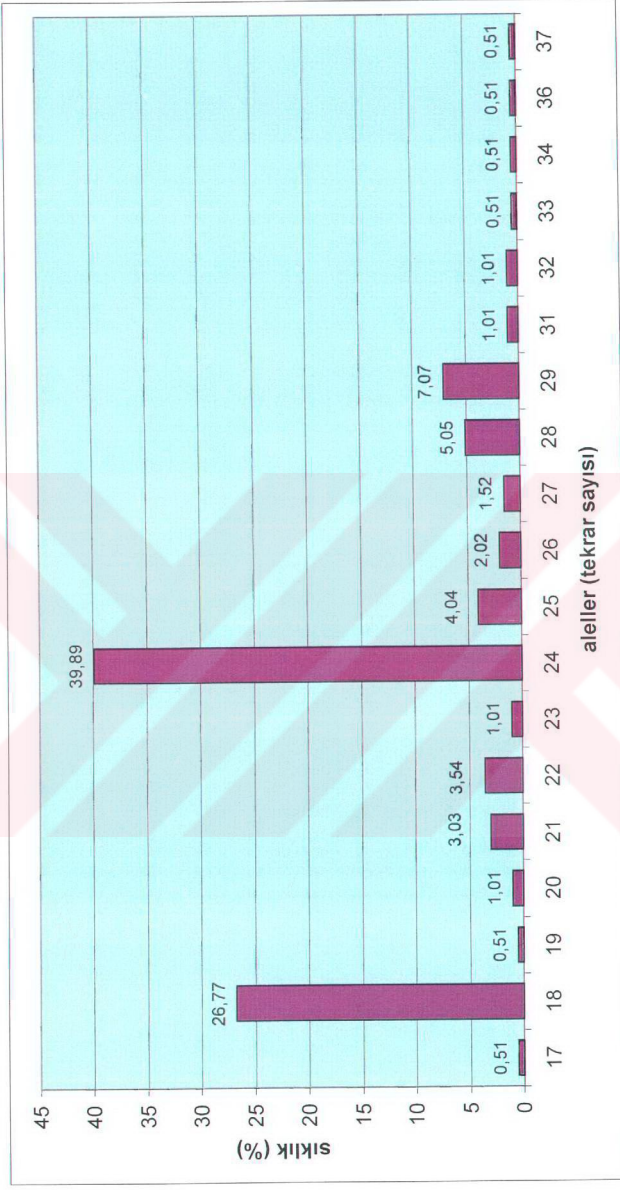
F_{ST} değeri populasyonlar arası genetik farklılaşmanın bir ölçüsü olarak değerlendirilmektedir. D1S80 lokusu itibariyle toplumlar arası karşılaştırma yapabilmek için F_{ST} değerlerinin hesaplanmasında Arlequin Version 2.000 programı kullanılmıştır. Bu programdan elde edilen veriler MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analyses) Version 2.1 programına aktararak UPGMA yöntemine göre dendrogram çizdirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. D1S80 Lokusu Polimorfizmi

Türkiye'den rastgele seçilen ve birbiriyle akraba olmayan toplam 99 kişiye ait DNA'lar, D1S80 lokusu tekrar polimorfizmi açısından çalışılmıştır. D1S80 lokusu itibariyle toplam uzunlukları 414-734 bp arasında değişen 19 farklı alel ve bu aleller itibariyle 37 farklı genotip tespit edilmiştir. Tespit edilen aleller ve gözlenen sıklıkları Şekil 3.1.1'de verilmektedir.

Çalışma grubumuzda en sık gözlenen alellerin %39,89 oranında 526 (24) ve %26,77 oranında 430 (18) olduğu tespit edilmiştir.

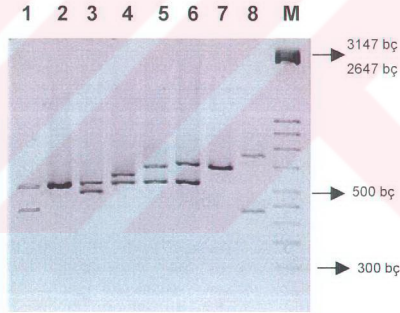


Şekil 3.1.1. D1S80 lokusu için tespit edilen alellerin % sıklıkları

Bu çalışmada D1S80 lokusu için sözkonusu 19 alel itibariyle toplam 37 farklı genotiple ilgili gözlenen ve beklenen sıklıklar Çizelge 3.1.1'de ve Şekil 3.1.2'de verilmektedir. En sık gözlenen genotipler, 526/526 (24/24): 18 kişi, 430/526 (18/24): 18 kişi ve 430/430 (18/18): 10 kişi olarak bulunmuştur.

D1S80 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları arasında fark olmadığı ($p > 0,05$), diğer bir deyişle çalışma grubunun D1S80 lokusu için Hardy-Weinberg dengesinde bulunduğu tespit edilmiştir. Çalışma grubunda tespit edilmeyen fakat teorikte olması beklenen genotiplerin beklenen sıklıkları tabloda gösterilmemiştir bu nedenle genotiplerin beklenen sıklıklarının toplamı 1'e eşit gözükmemektedir.

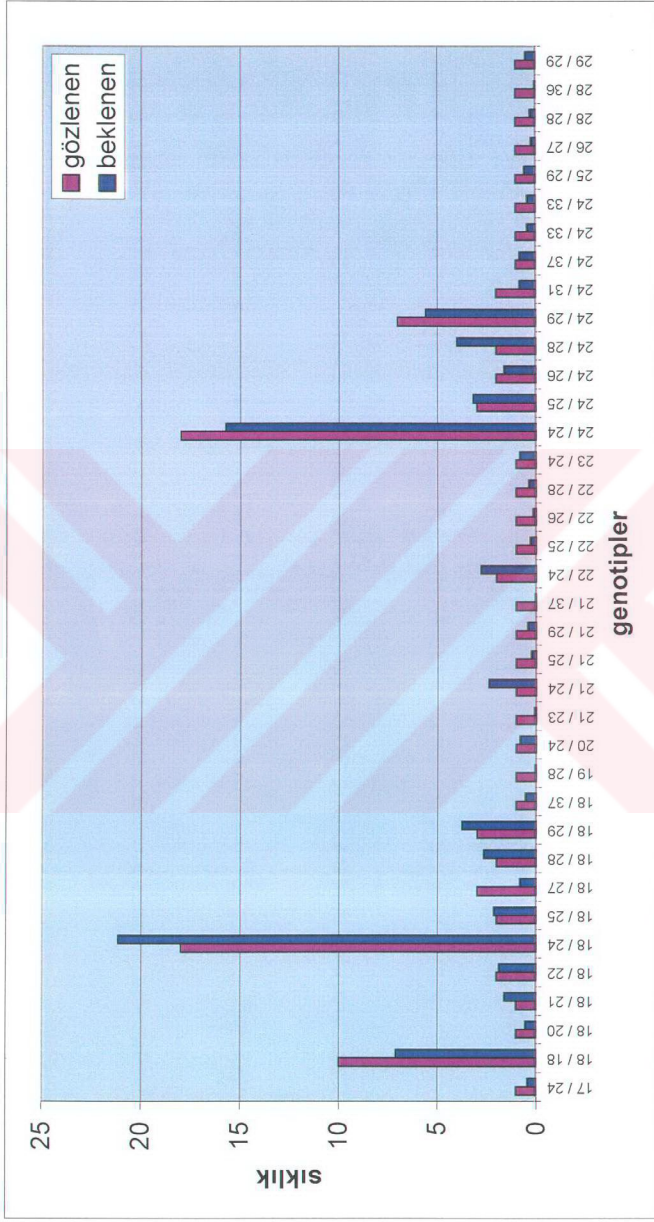
D1S80 lokusu için tespit edilen alellerden bazılarının jeldeki görüntüsü Şekil 3.1.3'de verilmektedir.



Şekil 3.1.3. 8 farklı bireye ait D1S80 lokusu PCR ürünlerinin %3'lük Nusieve GTG agaroz jel elektroforezi sonuçları görüntüsü. 1: 430/526, 2: 526/526, 3: 494/526, 4: 526/558, 5: 526/590, 6: 526/606, 7: 590/590, 8: 430/654, M: Marker (50 bp DNA step ladder: 3147, 2647, 900, 800, 700, 600, 500, 450, 400, 350, 300).

Çizelge 3.1.1. D1S80 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları

Genotip		Sıklık	
Tekrar Sayısı	Uzunluk (bp)	Gözlenen	Beklenen
17 / 24	414 / 526	1	0,4059
18 / 18	430 / 430	10	7,0983
18 / 20	430 / 462	1	0,5346
18 / 21	430 / 478	1	1,6038
18 / 22	430 / 494	2	1,8810
18 / 24	430 / 526	18	21,1464
18 / 25	430 / 542	2	2,1384
18 / 27	430 / 574	3	0,8019
18 / 28	430 / 590	2	2,6730
18 / 29	430 / 606	3	3,7521
18 / 37	430 / 654	1	0,5346
19 / 28	446 / 590	1	0,0495
20 / 24	462 / 526	1	0,8019
21 / 23	478 / 510	1	0,0594
21 / 24	478 / 526	1	2,3958
21 / 25	478 / 542	1	0,2475
21 / 29	478 / 606	1	0,4257
21 / 37	478 / 734	1	0,0297
22 / 24	494 / 526	2	2,7918
22 / 25	494 / 542	1	0,2871
22 / 26	494 / 558	1	0,1386
22 / 28	494 / 590	1	0,3564
23 / 24	510 / 526	1	0,8019
24 / 24	526 / 526	18	15,7509
24 / 25	526 / 542	3	3,1878
24 / 26	526 / 558	2	1,5939
24 / 28	526 / 590	2	3,9897
24 / 29	526 / 606	7	5,5836
24 / 31	526 / 638	2	0,8019
24 / 37	526 / 654	1	0,8019
24 / 33	526 / 670	1	0,4059
24 / 33	526 / 686	1	0,4059
25 / 29	542 / 606	1	0,5643
26 / 27	558 / 590	1	0,2079
28 / 28	590 / 590	1	0,2574
28 / 36	590 / 718	1	0,0495
29 / 29	606 / 606	1	0,4950
Toplam		99	85,0509



Şekil 3.1.2. D1S80 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları

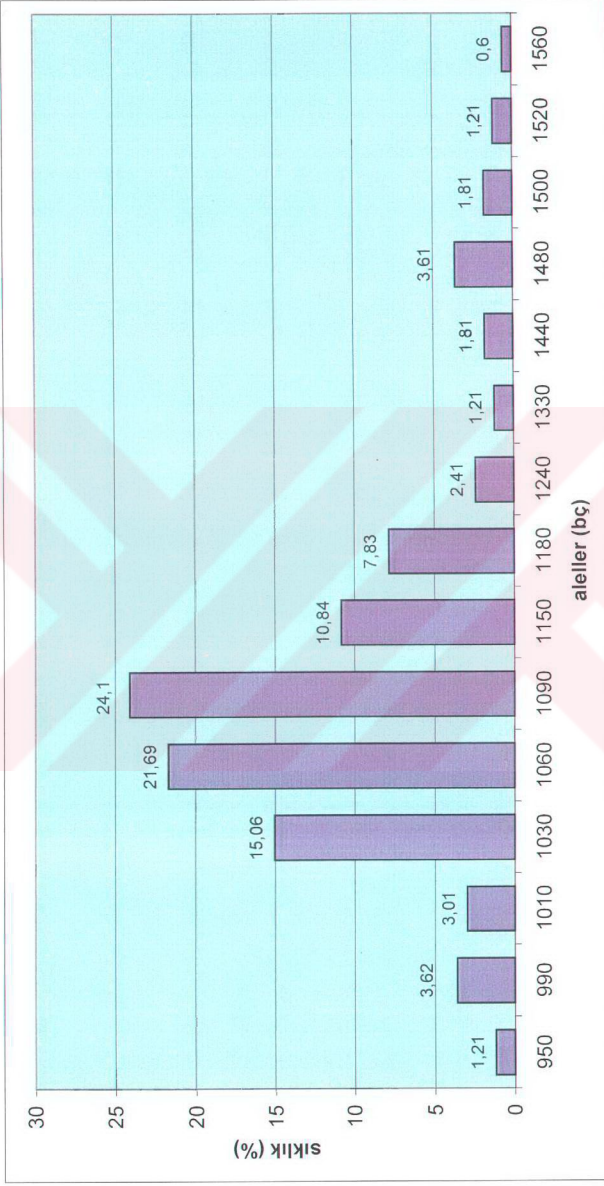
3.2. D4S95 Lokusu Polimorfizmi

D4S95 lokusunda tekrar sayısı polimorfizmini araştırmak amacıyla 83 birey çalışılmıştır. Çalışılan grup için D4S95 lokusuna ait 15 farklı alel saptanmıştır. Bu alellerin uzunlukları 950-1560 arasında değişmektedir. Tespit edilen alellerin gözlenen % sıklıkları Şekil 3.2.1'de verilmektedir.

En sık gözlenen aleller sıklık sırasına göre 1090 (%24,1), 1060 (%21,69), 1030 (%15,6), 1150 (%10,84) ve 1180 (%7,83) alelleridir.

Ayrıca sonuç elde edilebilen 83 bireyde D4S95 lokusu için 32 farklı genotip belirlenmiştir. Söz konusu genotipler ve bunların gözlenen ve beklenen sıklıkları izelge 3.2.1 ve Şekil 3.2.2'de gösterilmektedir.

Tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuş ($p < 0,001$) ve Türk populasyonunu temsil ettiği düşünülen çalışma grubunun bu lokus itibariyle Hardy-Weinberg dengesinden saptığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.2.1. D4S95 lokusu için tespit edilen alellerin gözlenen % sıklıkları

Çizelge 3.2.1. D4S95 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları

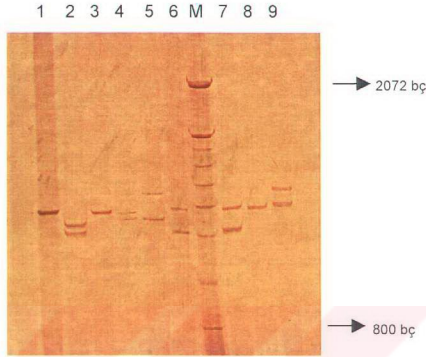
Genotip	Gözlenen sıklık	Beklenen sıklık
950 / 1030	2	0,3071
990 / 990	2	0,1079
990 / 1090	1	1,4525
990 / 1180	1	0,4731
1010 / 1010	1	0,0747
1010 / 1090	3	1,2035
1030 / 1030	4	1,8841
1030 / 1060	6	5,4199
1030 / 1090	5	6,0258
1030 / 1150	4	2,7141
1060 / 1060	8	3,9093
1060 / 1090	8	8,6818
1060 / 1150	2	3,9010
1060 / 1180	4	2,8220
1090 / 1090	5	4,8223
1090 / 1150	3	4,3409
1090 / 1180	5	3,1291
1090 / 1330	1	0,4897
1090 / 1440	2	0,7221
1090 / 1480	1	1,4442
1090 / 1520	1	0,4897
1150 / 1150	3	0,9794
1150 / 1180	1	1,4110
1150 / 1480	1	0,6474
1150 / 1500	1	0,3237
1180 / 1240	1	0,3154
1180 / 1520	1	0,1577
1240 / 1240	1	0,0498
1240 / 1330	1	0,0498
1440 / 1560	1	0,0166
1480 / 1480	1	0,1079
1480 / 1500	2	0,1079
Toplam	83	58,5814

Gözlenen genotipler dışında kalan olası tüm genotipler çizelgede gösterilmemiştir.



Şekil 3.2.2. D4S95 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları

D4S95 lokusu için 9 farklı bireye ait PCR ürünlerinin poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları Şekil 3.2.3'de görülmektedir.

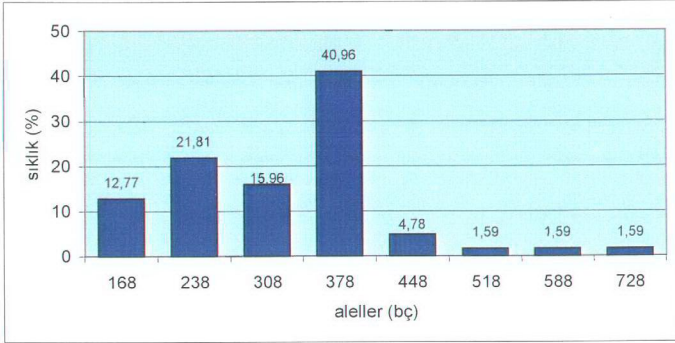


Şekil 3.2.3. 9 farklı bireye ait D4S95 lokusu PCR ürünlerinin %4'lük denatüre poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları. M : Marker (100 bp ladder: 2072, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800 bp), 1: 1090/1090, 2: 1030/1060, 3: 1090/1090, 4: 1060/1090, 5: 1060/1180, 6: 1010/1090, 7:1010/1090, 8: 1090/1090, 9: 1090/1180.

3.3. D17S30 (pYNZ22) Lokusu Polimorfizmi

D17S30 lokusu için 96 kişi çalışılmıştır. Bu lokus itibariyle tespit edilen sekiz farklı alelin gözlenen sıklıkları Şekil 3.3.1'de verilmektedir.

En sık gözlenen aleller ve sıklık oranları sırasıyla 378 (%40,96), 238 (%21,81), 308 (%15,96) ve 168 (%12,77) olarak bulunmuştur.

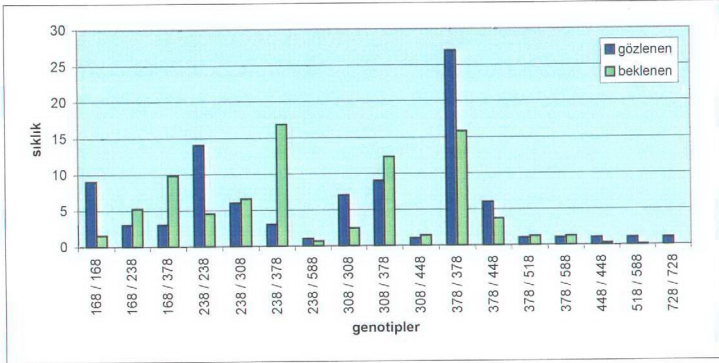


Şekil 3.3.1. D17S30 lokusu için tespit edilen alellerin % sıklıkları.

D17S30 lokusu için 17 farklı genotip tespit edilmiş olup bunlardan en sık gözlenen genotipler sırasıyla 378/378 (24 kişi) ve 238/238 (14 kişi)dir. Tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları Çizelge 3.3.1 ve Şekil 3.3.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.3.1. D17S30 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları

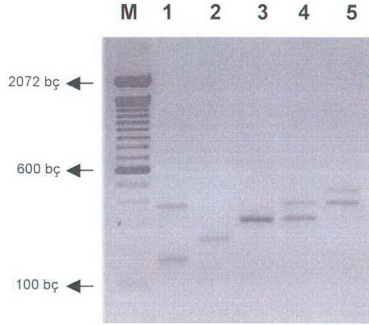
Genotip	Gözlenen sıklık	Beklenen sıklık
168 / 168	9	1,5322
168 / 238	3	5,2358
168 / 378	3	9,8324
238 / 238	14	4,4744
238 / 308	6	6,5424
238 / 378	3	16,7978
238 / 588	1	0,6486
308 / 308	7	2,3970
308 / 378	9	12,2858
308 / 448	1	1,4382
378 / 378	27	15,7732
378 / 448	6	3,6848
378 / 518	1	1,2220
378 / 588	1	1,2220
448 / 448	1	0,2162
518 / 588	1	0,0470
728 / 728	1	0,0282
Toplam	94	83,378



Şekil 3.3.2. D17S30 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları.

D17S30 lokusunun gözlenen ve beklenen sıklıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış ($p < 0,001$) ve söz konusu lokusun Hardy-Weinberg dengesinden saptığı tespit edilmiştir. Tespit edilen aleller bakımından çalışma grubunda gözlenmeyen genotipler çizelgeye dahil edilmemiştir.

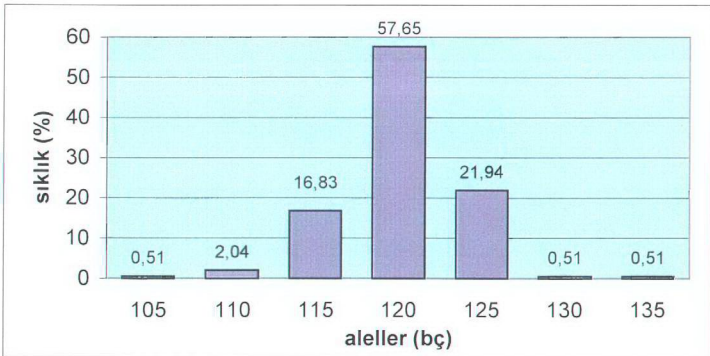
D17S30 lokusu için 5 bireye ait PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.3.3'de verilmektedir.



Şekil 3.3.3. 5 farklı bireye ait D17S30 lokusu PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları. M: Marker (100 bp ladder: 2072, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bç), 1: 168/378, 2: 238/238, 3: 308/308, 4: 308/378, 5: 378/448.

3.4. TP53 Lokusu Polimorfizmi

TP53 lokusunun Türkiye'deki polimorfizmini araştırmak için rastgele seçilen 98 kişi çalışılmıştır. Bu lokus itibarıyla uzunlukları 105-135 bç arasında değişen yedi farklı alel tespit edilmiştir. Bu alellerin gözlenen % sıklıkları Şekil 3.4.1'de verilmektedir.



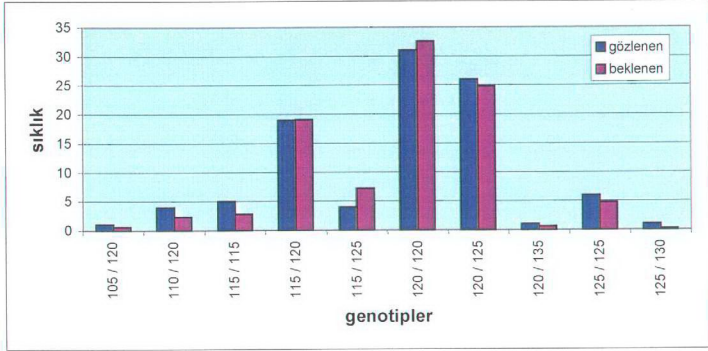
Şekil 3.4.1. TP53 lokusu için tespit edilen alellerin % sıklıkları.

Bu lokus için en sık gözlenen alel, %57,65 sıklıkla 120 bç'lik aleldir. Tespit edilen 7 alel bakımından, TP53 lokusu için 10 farklı genotip saptanmış olup, bunların gözlenen ve beklenen sıklıkları Çizelge 3.4.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.4.1. TP53 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları

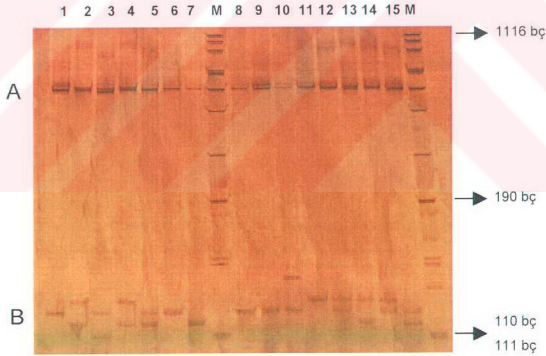
Genotip	Gözlenen sıklık	Beklenen sıklık
105 / 120	1	0,5782
110 / 120	4	2,3030
115 / 115	5	2,7734
115 / 120	19	19,0218
115 / 125	4	7,2422
120 / 120	31	32,5752
120 / 125	26	24,7940
120 / 135	1	0,5782
125 / 125	6	4,7138
125 / 130	1	0,2156
Toplam	98	94,7954

Ayrıca diğer 3 lokusta olduğu gibi TP53 lokusu içinde Hardy-Weinberg dengesi araştırılmıştır. Gözlenen ve beklenen genotip sıklıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması nedeniyle bu lokusun Türk popülasyonunda Hardy-Weinberg dengesinde olduğu saptanmıştır ($p>0,05$). TP53 lokusuna ait belirlenen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları karşılaştırmalı olarak Şekil 3.4.2'de verilmiştir.



Şekil 3.4.2. TP53 lokusu için tespit edilen genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları.

TP53 lokusu için 15 farklı bireye ait PCR ürünlerinin %6'lık denatüre poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları Şekil 3.4.3'de verilmektedir.



Şekil 3.4.3. 15 farklı bireye ait TP53 lokusu PCR ürünlerinin (A: birinci tur, B: ikinci tur) %6'lık denatüre poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları. M: Marker (pUC Mix Marker, 8: 1116, 883, 692, 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67), 1: 120/120, 2: 115/125, 3: 110/120, 4: 115/125, 5: 115/120, 6: 120/120, 7: 115/115, 8: 120/120, 9: 120/120, 10: 120/135, 11: 125/125, 12: 120/125, 13: 115/125, 14: 120/125, 15: 115/120.

3.5. Heterozigosite

Çalışılan dört lokusun (D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53) gözlenen ve beklenen heterozigositeleri Çizelge 3.5.1'de özetlenmektedir. Buna göre gözlenen en yüksek heterozigosite D4S95 lokusu için tespit edilmiştir (%69,88). D1S80 ve TP53 lokuslarının heterozigositeleri sırasıyla %69,7 ve %63,27 olarak bulunmuştur. En düşük gözlenen heterozigosite ise D17S30 lokusu için %37,23 olarak tespit edilmiştir.

Beklenen heterozigosite değerleri hesaplandığında en yüksek değer %85,42 olarak D4S95 lokusuna ait olduğu saptanmıştır. Daha sonra sırasıyla D1S80 (%76,25), D17S30 (%74,37) ve TP53 (%59,37) lokusları gelmektedir.

Çizelge 3.5.1. D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 lokuslarının gözlenen ve beklenen heterozigositeleri.

Lokus	D1S80	D4S95	D17S30	TP53
Gözlenen heterozigosite	0,6970	0,6988	0,3723	0,6327
Beklenen heterozigosite	0,7605	0,8542	0,7437	0,5937

3.6. Ayırım Gücü (PD) ve Bileşik Ayırım Gücü

PD değerleri her dört lokus için hesaplanmış olup, sonuçlar Çizelge 3.6.1.'de verilmektedir. Buna göre en yüksek ayırım gücünün %94,93 ile D4S95 ve %91,07 ile D1S80 lokuslarına ait olduğu tespit edilmiştir. D17S30 lokusuna ait PD değeri %85,95'tir ve en düşük PD değeri %78,20 ile TP53 lokusu için tespit edilmiştir.

Çizelge 3.6.1. D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 lokusları için hesaplanan PD değerleri.

Lokus	D1S80	D4S95	D17S30	TP53
PD	0,9107	0,9493	0,8595	0,7820
PI	0,0893	0,0507	0,1405	0,2180

Ayrıca bu dört lokus için bileşik PD değerleri de hesaplanmıştır (Çizelge 3.6.2).

Çizelge 3.6.2. D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 lokuslarının farklı kombinasyonları için hesaplanan bileşik PD değerleri.

Lokuslar	Bileşik Ayırım Gücü
D1S80 – D4S95	0,9955
D1S80 – D17S30	0,9875
D1S80 – TP53	0,9805
D4S95 – D17S30	0,9929
D4S95 – TP53	0,9890
D17S30 – TP53	0,9694
D1S80 – D4S95 – D17S30	0,9994
D1S80 – D4S95 – TP53	0,9990
D1S80 – D17S30 – TP53	0,9973
D4S95 – D17S30 – TP53	0,9985
D1S80 – D4S95 – D17S30 – TP53	0,99996

Çizelgeden de görüldüğü gibi en yüksek PD değerine söz konusu dört lokus kombine olarak kullanıldığında ulaşılmaktadır.

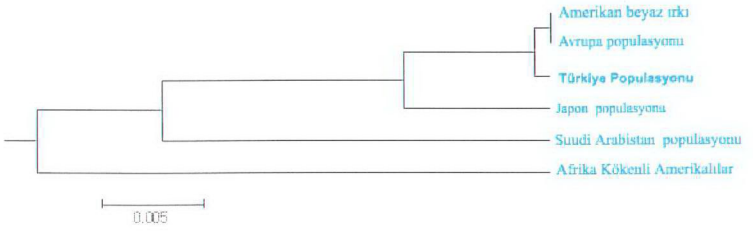
3.7. FST Değerleri

Türkiye’de polimorfizmi çalışılan dört lokustan D1S80 lokusunun polimorfizmi farklı populasyonlarda yaygın olarak çalışılmıştır. Bunun dışında kalan lokuslar itibariyle polimorfizm çalışmalarının daha az sayıda olması ve bu verilerin tamamına ulaşılamaması nedeniyle populasyonlar arası mukayese sadece D1S80 lokusu için yapılabilmektedir.

D1S80 lokusu için altı farklı populasyonunun ikiyeşerli olarak karşılaştırılması sonucu elde edilen Fst değerleri Çizelge 3.7.1’de ve bu değerlere bağlı olarak çizdirilen dendrogram Şekil 3.7.1’de verilmektedir.

Çizelge 3.7.1. D1S80 lokusu için altı farklı populasyonunun ikiyeşerli olarak karşılaştırılması ile elde edilen FST ve p değerleri.

	Türkiye Populasyonu	Suudi Arabistan Populasyonu	Amerikalı Beyaz İrk (US Caucasians)	Afrika Kökenli Amerikalılar (US Africans)	Japonlar	Avrupalılar
Türkiye Populasyonu	0,00000 *	*	*	*	*	*
Suudi Arabistan Populasyonu	0,02581 p=0,00000	0,00000 *	*	*	*	*
Amerikalı Beyaz İrk (US Caucasians)	0,00225 p=0,25225	0,03620 p=0,00000	0,00000 *	*	*	*
Afrika Kökenli Amerikalılar (US Africans)	0,05249 p=0,00000	0,09547 p=0,00000	0,04076 p=0,00000	0,00000 *	*	*
Japonlar	0,02411 p=0,00000	0,06431 p=0,00000	0,00804 p=0,03604	0,02374 p=0,0000	0,00000 *	*
Avrupalılar	0,00113 p=0,22523	0,02672 p=0,00000	-0,00046 p=0,44144	0,04056 p=0,00000	0,01139 p=0,00000	0,00000 *



Şekil 3.7.1. D1S80 lokusu için hesaplanan F_{ST} değerlerine bağlı olarak altı farklı popülasyon arasındaki ilişkinin dendrogram şeklinde gösterimi.

3.8. Haplotip Analizi

Bu çalışmada değerlendirilen 100 bireyden 78'i için her dört VNTR lokusu için sonuç elde edilebilmiştir (Çizelge 3.8.1).

Çizelge 3.8.1. Dört VNTR lokusu itibarıyla çalışılan 100 bireyden elde edilen sonuçlar.

ÖRNEK NO.	D1S80	D4S95	D17S30	TP53
1	430/430	1090/1090	378/378	120/120
2	430/574	-	238/308	115/120
3	430/430	-	378/378	110/120
4	526/526	1480/1500	378/378	120/120
5	526/606	1090/1440	308/378	125/130
6	526/526	1030/1060	168/168	115/115
7	430/606	1060/1090	168/238	120/125
8	494/590	-	-	115/120
9	430/526	1030/1030	308/308	120/120
10	414/526	1060/1150	308/378	120/120
11	526/638	-	-	115/120
12	462/526	1060/1090	238/308	115/120
13	430/526	1480/1500	168/168	115/120
14	494/526	1090/1180	308/378	120/125
15	430/430	-	378/378	115/115
16	430/526	-	308/308	120/125
17	590/718	-	378/378	115/120
18	430/478	1030/1090	168/168	115/120
19	430/574	1090/1090	378/378	115/120
20	526/686	-	308/308	115/120
21	478/510	1030/1030	238/238	120/120
22	430/606	1030/1060	238/378	120/120
23	430/526	-	238/238	120/125
24	526/526	-	378/378	120/120
25	526/526	1060/1060	168/168	115/125
26	430/526	1030/1090	238/238	120/120
27	526/542	950/1030	238/308	120/125
28	526/606	1030/1060	168/168	120/120
29	430/526	-	378/378	110/120
30	494/542	990/1180	168/168	-
31	430/430	1030/1090	168/168	120/120
32	430/574	1090/1330	378/378	120/125
33	526/526	1030/1030	378/448	120/125
34	526/558	1030/1030	308/308	120/120
35	526/526	1090/1440	308/378	120/120
36	526/606	950/1030	-	120/120

Çizelge 3.8.1. (Devam)

ÖRNEK NO.	D1S80	D4S95	D17S30	TP53
37	526/526	1030/1090	238/238	120/120
38	526/526	1030/1090	238/238	120/125
39	478/542	1090/1150	378/378	120/125
40	526/526	-	168/378	115/120
41	430/526	990/990	378/448	110/120
42	430/494	1030/1150	238/308	115/120
43	430/606	-	238/238	120/125
44	526/526	990/990	238/588	120/125
45	430/430	1060/1060	378/448	120/125
46	526/638	1060/1060	238/238	120/120
47	430/590	1240/1240	378/378	125/125
48	430/526	1150/1150	378/378	120/125
49	430/526	1030/1060	378/448	120/125
50	526/590	990/1090	378/378	120/125
51	430/526	1060/1090	238/308	115/115
52	430/542	1060/1090	168/238	115/120
53	526/526	1030/1150	378/378	120/120
54	478/734	1060/1060	378/378	115/120
55	430/526	1240/1330	308/378	120/120
56	526/558	1030/1150	238/238	115/120
57	510/526	1150/1500	238/238	120/125
58	526/606	1180/1520	378/378	120/120
59	430/462	1480/1480	308/378	120/120
60	430/430	1090/1150	308/308	120/120
61	542/606	1180/1240	378/448	120/120
62	430/430	1030/1150	238/308	110/120
63	526/606	1090/1180	238/378	120/120
64	430/526	1060/1090	168/168	120/120
65	430/526	-	378/378	120/120
66	430/494	1060/1060	378/378	120/125
67	430/526	1010/1010	168/238	120/120
68	526/542	1090/1090	378/518	120/125
69	494/558	1150/1150	378/378	115/120
70	430/526	1090/1150	238/238	115/120
71	478/526	1090/1180	378/378	120/125
72	526/526	1060/1150	378/378	120/125
73	430/526	1060/1060	378/448	120/125
74	430/526	1010/1060	168/378	115/125
75	430/654	-	168/168	125/125
76	430/542	1090/1090	238/378	120/125
77	606/606	1090/1180	238/238	125/125
78	526/670	1150/1180	378/378	120/120
79	430/430	1090/1090	308/378	115/115

Çizelge 3.8.1. (Devam)

ÖRNEK NO.	D1S80	D4S95	D17S30	TP53
80	526/542	1030/1060	728/728	120/125
81	430/430	1090/1480	378/378	115/125
82	430/430	1060/1090	308/378	105/120
83	-	1010/1090	-	115/115
84	590/590	1060/1180	238/238	115/120
85	526/526	1010/1090	238/238	120/125
86	558/590	1010/1090	238/238	125/125
87	494/526	1090/1520	168/378	120/120
88	526/606	1090/1180	378/378	120/120
90	526/606	1060/1060	378/378	120/120
91	526/526	-	-	120/135
92	526/526	1060/1180	308/308	120/125
93	430/590	1060/1180	378/378	120/120
94	526/526	1150/1480	518/588	115/120
95	526/654	1060/1090	378/378	125/125
96	446/590	1440/1560	308/448	120/125
97	526/526	1060/1180	448/448	115/125
98	526/526	1060/1090	308/378	120/125
99	526/590	1150/1150	308/308	115/120
100	430/526	1030/1060	378/588	-

D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 lokusları birlikte değerlendirilmeye alındığında 78 kişi itibarıyla toplam 125 farklı tip haplotip tespit edilmiştir. Söz konusu haplotipler ve sıklıkları Çizelge 3.8.2'de verilmektedir. En sık gözlenen haplotipler 4/156 sıklıkla 430-1090-378-120 ve 430-1060-378-120'dir. İkinci yüksek sıklıkta tespit edilen haplotipler 3/156 oranında 526-1150-378-120, 430-1090-378-115 ve 526-1090-238-120' dir. 2/156 sıklıkla tespit edilen haplotipler, Çizelge 3.8.2'de h7, h8, h9, h11, h15, h19, h26, h27, h37,h42, h57, h59, h79, h83, h87, h88, h94, h96, ve h133 olarak belirtilen haplotiplerdir. Diğer haplotipler 1/156 sıklıkla tespit edilmiştir.

Çizelge 3.8.2. Dört VNTR lokusu itibariyle tespit edilen haplotipler ve sıklıkları

Haplotip Sıklık		Haplotip Sıklık	
h1	4 430 1090 378 120	h44	1 430 990 378 110
h2	1 526 1480 378 120	h45	1 526 990 448 120
h3	1 526 1500 378 120	h46	1 430 1030 238 115
h4	1 526 1090 308 125	h47	1 494 1150 308 120
h5	1 606 1440 378 130	h48	1 526 990 238 120
h6	1 526 1030 168 115	h49	1 526 990 588 125
h7	2 526 1060 168 115	h50	4 430 1060 378 120
h8	2 430 1060 168 120	h51	1 430 1060 448 125
h9	2 606 1090 238 125	h52	1 526 1060 238 120
h10	1 430 1030 308 120	h53	1 638 1060 238 120
h11	2 526 1030 308 120	h54	1 430 1240 378 125
h12	1 414 1060 308 120	h55	1 590 1240 378 125
h13	3 526 1150 378 120	h56	1 430 1150 378 120
h14	1 426 1060 238 115	h57	2 526 1150 378 125
h15	2 526 1090 308 120	h58	1 430 1030 378 120
h16	1 430 1480 168 115	h59	2 526 1060 448 125
h17	1 526 1500 168 120	h60	1 526 990 378 120
h18	1 494 1090 308 120	h61	1 590 1090 378 125
h19	2 526 1180 378 125	h62	1 430 1060 238 115
h20	1 430 1030 168 115	h63	1 526 1090 308 115
h21	1 478 1090 168 120	h64	1 430 1060 168 115
h22	3 430 1090 378 115	h65	1 542 1090 238 120
h23	1 574 1090 378 120	h66	1 478 1060 378 115
h24	1 478 1030 238 120	h67	1 734 1060 378 120
h25	1 510 1030 238 120	h68	1 430 1240 308 120
h26	2 430 1030 238 120	h69	1 526 1330 378 120
h27	2 606 1060 378 120	h70	1 526 1030 238 115
h28	1 526 1060 168 125	h71	1 558 1150 238 120
h29	3 526 1090 238 120	h72	1 510 1150 238 120
h30	1 526 950 238 120	h73	1 526 1500 238 125
h31	1 542 1030 308 125	h74	1 526 1180 378 120
h32	1 526 1030 168 120	h75	1 606 1520 378 120
h33	1 606 1060 168 120	h76	1 430 1480 308 120
h34	1 430 1030 168 120	h77	1 462 1480 378 120
h35	1 430 1090 168 120	h78	1 430 1090 308 120
h36	1 574 1330 378 125	h79	2 430 1150 308 120
h37	2 526 1030 378 120	h80	1 542 1180 378 120
h38	1 526 1030 448 125	h81	1 606 1240 448 120
h39	1 558 1030 308 120	h82	1 430 1030 238 110
h40	1 526 1440 378 120	h83	2 606 1180 378 120
h41	1 526 1030 238 120	h84	1 526 1090 168 120
h42	2 478 1090 378 120	h85	1 494 1060 378 125
h43	1 542 1150 378 125	h86	1 430 1010 168 120
		h87	2 526 1010 238 120

Çizelge 3.8.2. (Devam)

Haplotip Sıklık

h88	2	526	1090	378	120
h89	1	542	1090	518	125
h90	1	494	1150	378	115
h91	1	558	1150	378	120
h92	1	430	1090	238	115
h93	1	526	1150	238	120
h94	2	526	1060	378	120
h95	1	430	1010	168	115
h96	2	526	1060	378	125
h97	1	430	1090	238	120
h98	1	542	1090	378	125
h99	1	606	1180	238	125
h100	1	670	1180	378	120
h101	1	430	1090	308	115
h102	1	526	1030	728	120
h103	1	542	1060	728	125
h104	1	430	1480	378	125
h105	1	430	1060	308	105
h106	1	590	1060	238	115
h107	1	590	1180	238	120

4. TARTIŞMA

Bir populyasyonda kişiler arasında yüksek derecede polimorfizm gösteren VNTR lokusları özellikle populyasyon genetiği, adli tıp ve kemik iliği nakli sonrası kimerizm tayini gibi konularda sıkça kullanılmaktadırlar. Bu nedenle, bu tez çalışmasında farklı populyasyonlarda polimorfizmleri çalışılmış olan D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 lokuslarının polimorfizmlerinin Türk populyasyonunda araştırılması hedeflenmiştir.

4.1. D1S80 Lokusu

1p36-1p35'te lokalize olan ve 16 bç'lik tekrar dizileri içeren D1S80 lokusu polimorfizmi bugüne kadar farklı populyasyonlarda çalışılmıştır (Kasai ve ark., 1990; Budowle ve ark., 1995; Sebetan ve ark., 1998; Biondolillo ve ark., 1999; Mastana, 1999; Acuna ve ark., 2000; Klitz ve ark., 2000; Tahir ve ark., 2000; Çakır ve ark., 2001). Bu lokus yüksek derecede polimorfizm göstermesi nedeniyle, özellikle populyasyon genetiği, adli tıp ve kemik iliği nakli sonrası kimerizm tayini konularında yaygın olarak kullanılmaktadır (Casado ve ark., 1996; Martinelli ve ark., 1997; Sreenan ve ark., 1997; Briz ve ark., 1998; Cimino ve ark., 1999).

Bu çalışmada D1S80 lokusunun alel ve genotip sıklıkları hesaplanmıştır. Türk populyasyonu için tespit edilen alel sıklıkları daha önce çalışılmış populyasyonlarla karşılaştırıldığı zaman (Çizelge 4.1.1), en yüksek sıklıkla gözlenen alel 526 (24)'ünün diğer populyasyonlarda da en sık karşılaşılan alel olduğu görülmektedir. Bu lokusa ait en sık gözlenen ikinci alel 430 (18) olup diğer populyasyonlarda da bu alel genellikle ikinci en sık gözlenen alel olarak tespit edilmiştir (Kasai ve ark., 1990; Budowle ve ark., 1995; Sebetan ve ark., 1998; Biondolillo ve ark., 1999; Mastana, 1999; Acuna ve ark., 2000; Klitz ve ark., 2000; Tahir ve ark., 2000). Örneğin, Çizelge 4.1.1'de de görüldüğü gibi

Afrika kökenli Amerikalı (US Africans)'larda en sık gözlenen ikinci alel 430 (18) olmayıp, 478 (21)'dir. Yine Japonlarda bu çalışmadan farklı olarak en sık gözlenen ikinci alel, 430 (18) ile birlikte 622 (30) alelleridir (Klitz ve ark., 2000). Türkiye'de bu konuda yapılan tek çalışmada yine en sık gözlenen aleller bizim çalışmamızla uyumlu bulunmuştur (Çakır ve ark., 2001).

Daha önceki araştırmalarda tespit edilen 622 (30), 702 (35) ve 782 alellere bu çalışmada rastlanmamıştır. 17 alel ve 30 farklı genotip tespit edilen Çakır ve ark. (2001)'nin yaptıkları çalışmada 382 (15) alelinin Türk popülasyonunda %0,9 sıklıkla tespit edilmesine rağmen, bu alele de çalışma grubumuzda rastlanmamıştır. Buna karşın, bu çalışmada Çakır ve ark.(2001)'nin çalışmasında gözlenmeyen 414 (17), 462 (20), 670 (33) ve 686 (34) alelleri sırasıyla %0,51, %1,01, %0,51 ve %0,51 sıklıklarda tespit edilmiştir. Söz konusu alellerin bizim çalışma grubumuzda birer kişide tespit edildiği görülmektedir ve bu aleller Çakır ve ark.'nın grubuna rastgelmemiş olabilir. Sonuç olarak Çakır ve ark. en yüksek sıklıkla tespit ettikleri allere bakıldığı zaman sonuçlar bizim çalışmamızla uyumlu görülmektedir.

Çizelge 4.1.1. Farklı popülasyonlarda D1S80 lokusu için tespit edilmiş alel sıklıkları (%)

Alel (tekrar sayısı)	Türk popülasyonu N=99	Türk popülasyonu (Çakır ve ark) N=112	Amerikalı Beyaz ırk N= 200	Afrika kökenli Amerikalılar N= 200	Suudi Arabistan Popülasyonu N=220	Japonya Popülasyonu N=89	Avrupa Popülasyonu N=216
15	0	0,9	0	0	0,91	0	0
16	0	0	0	0	0	4,5	0
17	0,51	0	0	4,8	1,36	0,6	0
18	26,77	20,1	23,8	9,8	14,09	14,6	21
19	0,51	0,4	1	0,3	0	1,7	0
20	1,01	0	4	3,3	0,46	0	2
21	3,03	1,8	1,8	11,5	1,36	1,7	2
22	3,54	7,6	3	8,8	3,18	2,2	4
23	1,01	0,9	0,8	2,3	0,91	0	2
24	39,89	46	34,8	19,3	55	21,9	36
25	4,04	4,5	4	2,3	3,18	1,1	5
26	2,02	2,7	1,5	0,8	1,82	0,6	2
27	1,52	0,4	1,3	1,3	0,91	3,4	1
28	5,05	5,4	6,3	15,3	4,55	9	8
29	7,07	4	5,3	5,5	9,55	5,1	5
30	0	1,3	0,8	0,8	0	14,6	1

Çizelge 4.1.1. (Devam)

Allel (tekrar sayısı)	Türk popülasyonu N=99	Türk popülasyonu (Çakır ve ark) N=112	Amerikalı Beyaz ırk N= 200	Afrika kökenli Amerikalılar N= 200	Suudi Arabistan Popülasyonu N=220	Japonya Popülasyonu N=89	Avrupa Popülasyonu N=216
31	1,01	2,2	8	4,8	2,273	12,4	6
32	1,01	0,9	1,3	0,5	0	0	0
33	0,51	0	0,3	0,5	0,070	1,7	0
34	0,51	0	0,3	7,3	0,46	1,1	0
35	0	0	0,3	0	0	0	0
36	0,51	0,4	0,5	0,3	0	0	0
37	0,51	0,4	0,8	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	1,7	0
40	0	0	0,3	0,3	0	0,6	0

Bu çalışmada en yüksek sıklıkla tespit edilen genotipler, diğer çalışmalarda da olduğu gibi 526/526 (24/24), 430/526 (18/24) ve 430/430 (18/18) genotipleridir (Sebetan ve ark., 1998; Biondolillo ve ark., 2000).

D1S80 lokusunun heterozigositesi %76,05 olarak hesaplanmıştır. Bu değer söz konusu lokusun diğer popülasyonlarda olduğu gibi, Türk popülasyonu için de oldukça polimorfik olduğunu göstermektedir (Kasai ve ark., 1990; Budowle ve ark., 1995; Sebetan ve ark., 1998; Biondolillo ve ark., 1999; Mastana, 1999; Acuna ve ark., 2000; Klitz ve ark., 2000; Tahir ve ark., 2000).

D1S80 lokusunun gözlenen ve beklenen genotip sıklıkları arasında anlamlı fark olup olmadığı değerlendirildiğinde, bu lokusun Türk popülasyonunda Hardy-Weinberg dengesinde bulunduğu anlaşılmıştır ($p>0,05$).

D1S80 lokusu için hesaplanan yüksek PD değeri (%91,07), diğer çalışmalarda tespit edilen (%86,5-%95,6) değerlerle uyumlu görülmektedir (Mastana, 1999; Biondolillo ve ark., 2000; Tahir ve ark., 2000; Çakir ve ark., 2001) ve bu lokusun Türk popülasyonu için adli tıp ve kemikliği nakli sonrası kimerizm tayininde kullanılabilecek uygun bir marker olduğu ortaya çıkmaktadır.

Bugüne kadar D1S80 lokusunun beş farklı popülasyondaki polimorfizmi ile ilgili ulaşılabilen veriler (Klitz. ve ark. 2000; Tahir ve ark., 2000; <http://www.gdb.org>) bu çalışmada elde edilen verilerle birlikte Arlequin Version 2.000 programında F_{ST} değerleri hesaplatılarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.1.3). Bu değerlendirmeler sonucu Türk popülasyonu ile Avrupa popülasyonu arasındaki en düşük F_{ST} değeri dikkati çekmektedir. Bu açıdan ele alındığında ikinci sırada Amerikan beyaz ırkı (US Caucasians) görülmektedir ve her iki popülasyonla ayrı ayrı değerlendirmede Türk popülasyonu ile Avrupa ve Amerikan beyaz ırkı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmektedir ($p>0,05$). Bu durum Türk popülasyonunun genetik yapısı itibarıyla öncelikle Avrupa ve ikinci olarak

Amerikan beyaz ırkı popülasyonlarıyla benzerliğe sahip olduğunu ifade etmektedir. Diğer taraftan en yüksek F_{ST} değeri Türk popülasyonu ile Afrika kökenli Amerikalılar arasında gözlenmektedir. Afrika kökenli Amerikalılara ilaveten Suudi Arabistan ve Japonya popülasyonları ile Türk popülasyonu arasında F_{ST} değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,001$). Bu durumda Türk popülasyonu ile söz konusu üç popülasyon arasında genetik açıdan yakınlık görülmemektedir. Ancak, bu tip mukayeseli popülasyon genetiği çalışmalarında, popülasyonlar arası genetik benzerlikleri ifade edebilmek için daha fazla sayıda bireyin çalışılması gerekmektedir.

4.2. D4S95 Lokusu

Bu çalışmada Huntington hastalığından sorumlu IT15 geninin belirlenmesinde kullanılan D4S95 lokusunun Türk popülasyonundaki polimorfizmi çalışılmış ve sonuçta 15 alel ve 32 genotip tespit edilmiştir. En sık gözlenen aleller sırasıyla 1090, 1060, 1030, 1150 ve 1180 alelleridir. En düşük sıklıkta tespit edilen alel ise 1560 alelidir. Allitto ve ark. (1991)'nin Beyaz ırk üzerinde yaptıkları çalışmada en sıklıkla gözlenen aleller sırasıyla 1090, 1150 ve 1030 olarak tespit edilmiştir. En sık ve en nadir gözlenen aleller bakımından kıyaslandığında bu çalışma Allitto ve ark.'nın çalışmasıyla uyumlu görülmektedir. Ancak bu tez çalışmasında tespit edilen 950, 1010 ve 1060 alelleri Allitto ve ark.'nın çalışmasında bildirilmemektedir. Bu alellerin Türk popülasyonuna özgü olup olmadığının anlaşılabilmesi için farklı popülasyonlara ait daha fazla sayıda veriye ihtiyaç duyulduğu açıktır. Honda ve ark. (1995) Japon popülasyonunda yaptıkları çalışmada en sık gözlenen alelin 1030 olduğunu ve bu lokus için 14 farklı alel tespit ettiklerini bildirmektedirler. Bizim çalışmamızda ise 15 farklı alel saptanmıştır. Ayrıca bu tez çalışmasında en yüksek sıklıkla gözlenen genotipler 1060/1060 ve 1060/1090 genotipleridir.

D4S95 lokusu için hesaplanan heterozigosite değeri %85,42 olup bu değer Allitto ve ark. (1991)'nın yaptığı çalışma ile uyumlu görülmektedir (%84,4). Sonuç olarak D4S95 lokusunun Beyaz ırkta olduğu gibi Türk popülasyonunda da yüksek derecede polimorfizm gösterdiği bulunmuştur. Türk popülasyonu için bu lokusa ait başka veri bulunmadığından bu çalışmada elde edilen sonuçlar ilk bulgular olması açısından önemlidir.

D4S95 lokusu için hesaplanan PD değeri % 94,93 olup bu çalışmada polimorfizmi araştırılan dört lokus içerisinde en yüksek PD değerine sahip lokus olarak tespit edilmiştir. Bu değer Honda ve ark. (1995) tarafından Japon popülasyonu için bildirilen % 87,6 değerinden daha yüksektir. Sonuç olarak bu lokusun adli tıpta ve kemikliği nakli sonrası kimerizm tayininde kullanılabilir bir marker olabileceğine karar verilmiştir.

D4S95 lokusu için gözlenen ve beklenen genotip sıklıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,001$). Bu durum Türk popülasyonunda D4S95 lokusunun Hardy-Weinberg dengesinden saptığını göstermektedir. Hardy-Weinberg dengesini bozan faktörleri dikkate aldığımızda Türkiye'de son yıllarda üst seviyeye ulaşmış göç faktörü önem kazanabilir. Ancak yine de incelemeye alınan birey sayısının bu lokusu değerlendirmede Türk popülasyonunu yeterince temsil edip etmediği de tartışma konusu kabul edilebilir.

4.3. D17S30 Lokusu

Bu çalışmada Türk popülasyonunda polimorfizmi araştırılan D17S30 lokusu için sekiz farklı alel ve 17 farklı genotip tespit edilmiştir. En sık gözlenen alel %40 sıklıkla tespit edilen 378 aleli olarak bulunmuştur. Batanian ve ark. Avustralyalı beyaz ırk (Australian Caucasians) ve Alonso ve ark (1998)'nin Kuzey İspanya'da yaptıkları çalışmalarında en yüksek sıklıkla 378 alelinin bildirmektedirler (<http://www.gdb.org>). Ancak bu alel Avustralya yerlilerinde

(Australian Aborigines) (Kijas ve ark. 1994) nadir olarak gözlenen alellerden birisi olarak bildirilmektedir. Bu tez çalışmasında D17S30 lokusuna ait en nadir olarak tespit edilmiş olan aleller %1,59 sıklıklarda gözlenen 518, 588 ve 728 alelleridir. Bu alellerden 588, Batanian ve ark.'nın çalışmasında da en nadir görülen alel olarak bildirilmektedir (<http://www.gdb.org>). Ayrıca bu tez çalışmasında en yüksek sıklıkla gözlenen genotipler 378/378, 238/238 olarak bulunmuştur. Batanian ve ark. çalışmalarında genotip sıklıklarını bildirmedikleri için bu açıdan kıyaslama yapılamamıştır. D17S30 lokusu için Türk popülasyonuna ait herhangi bir veri bulunmamaktadır. Elde edilen veriler ilk olması nedeniyle önem taşımaktadır.

D17S30 lokusunun heterozigositesi %74,37 olarak hesaplanmıştır. Bu değer Batanian ve ark.'nın hesapladıkları %86,25 değerinden düşük gibi gözükmektedir. Bu fark Batanian ve ark.'nın çalışmasında gözlenen fazla alel sayısı (13) ile açıklanabilir. Bir çok yayında kemik iliği nakli sonrası kimerizm tayini amacıyla kullanıldığı bildirilen (Leeuwen ve ark., 1991; Casado ve ark., 1996; Martinelli ve ark., 1997; Sreenan ve ark., 1997; Boiron ve ark., 1998; Briz ve ark., 1998; Cimino ve ark., 1999) bu lokusun Türk popülasyonunda yüksek heterozigosite göstermesi nedeniyle kimerizm amacıyla kullanılmasının uygun olduğu anlaşılmıştır.

D17S30 lokusu için bulunan genotiplerin gözlenen ve beklenen sıklıkları mukayese edildiğinde bu değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,001$). Konumu itibarıyla Türkiye'nin son yıllarda yüksek derecede göçe maruz kaldığı bilinmektedir. Bu nedenle popülasyonun gen havuzu (gene pool)ndaki alel sıklıklarında değişimin ortaya çıkmış olabileceği düşünülebilirse de Hardy-Weinberg dengesini bozan bazı faktörlerin de bu sapmaya neden olabileceği ve çalışılan grubun Türk popülasyonunu tam olarak yansıtmayı yansıtmadığı da sorgulanabilir.

4.4. TP53 Lokusu

Beş bç'lik tekrar birimlerinden oluşan TP53 lokusu için Türk popülasyonunda 7 alel ve 10 farklı genotip saptanmıştır. En yüksek sıklıkla gözlenen alel 120 bç'lik aleldir ve Futreal ve ark. (1991) tarafından orijini bildirilmemiş 25 kişilik bir grup üzerinde yapılan çalışma ile uyumlu gözükmektedir. Bu tez çalışmasında en nadir olarak gözlenen aleller ise 105, 130 ve 135 alelleridir. Bizim çalışmamızda gözlenen 110 bç'lik alel Futreal ve ark. (1991)'nin çalışmasında tespit edilmemiştir. Bu çalışmada %2,04 sıklıkla tespit edilen 110 bç'lik alelin Türk popülasyonuna özgü olup olmadığını söyleyebilmesi için farklı popülasyonlara ait daha fazla sayıda veriye ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, Futreal ve ark. (1991)'nin çalışmasında tespit edilen 140 bç'lik alele bu çalışmada rastlanmamıştır. Literatürde Futreal ve ark. dışında TP53 lokusunun polimorfizmine ait başka bir yayına rastlanmamıştır. Türk popülasyonu için elde edilen veriler ilk olması nedeniyle önemlidir.

TP53 lokusu için heterozigosite % 59,37 olarak hesaplanmıştır. Futreal ve ark. (1991) bu lokus için heterozigositeyi %69,4 olarak ifade etmektedirler. Ancak bu farkın çalışılan birey sayısından kaynaklanabileceği söylenebilir. Bu değerler bir VNTR lokusu için beklenenden daha düşük değerdedirler. Bu durum TP53 lokusunun Türk popülasyonunda yeterince polimorfizm göstermediğini ifade etmektedir.

Bu lokus için hesaplanan PD değeri %78,2 dir. Heterozigositesinin düşük olmasına rağmen ayırım gücünün nispeten yüksek bir değer olması bu lokusun kemik iliği nakli sonrası özellikle diğer lokuslarla kombine olarak kimerizm tayininde kullanılabileceğini göstermektedir.

TP53 lokusunun gözlenen ve beklenen genotip oranları karşılaştırıldığında bu lokusun Türk popülasyonunda Hardy-Weinberg dengesinde olduğunu anlaşılmıştır ($p > 0,05$).

4.5. Haplotip Analizi

Yüksek heterozigositeye sahip olmaları nedeniyle farklı VNTR lokuslarının birlikte kombinasyonu bireysel ayrımların yapılması amacıyla haplotip analizlerinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, çalışılan 100 kişiden 78'inde her dört VNTR lokusu için sonuç elde edilebilmiştir. D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 lokusları birlikte değerlendirmeye alınmış ve oluşturdukları haplotipler ve sonuçları Çizelge 3.7.2'de verilmiştir. Çizelgeden de görüleceği gibi 78 kişide toplam 125 farklı haplotip tespit edilmiştir. En sık gözlenen iki haplotip 4/156 sıklıkla 430-1090-378-120 ve 430-1060-378-120 olmakla beraber bu haplotiplerden 101 tanesi 1/156 sıklıkla ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar söz konusu dört VNTR lokusu için hesaplanan bileşik ayırım gücü sonuçlarını destekler niteliktedir (Çizelge 3.6.2). Literatürde bu dört lokusun birden oluşturduğu haplotiplere ait bir bilgi bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasının söz konusu dört VNTR lokusu için haplotip veri tabanlarının oluşturulmasında öncülük edeceği düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 VNTR lokuslarının Türkiyede'ki polimorfizmleri rastgele seçilen ve akraba olmayan 83-99 sağlıklı bireyde araştırılmıştır.

D1S80 lokusu için en yüksek sıklıkla tespit edilen aleller sırasıyla % 39,89 sıklıkla 526 (24) ve %26,77 sıklıkla 430 (18) alelleridir. Bu çalışmada D1S80 lokusu için 19 farklı alel ve 37 farklı genotip belirlenmiştir. Gerek heterozigositesinin yüksek olması (%76,05) gerekse yüksek derecede ayırım gücü (PD)'ne (%91,07) sahip olması nedeniyle D1S80 lokusu Türk popülasyonunda adli tıp ve kemik iliği nakli sonrası kimerizm tayini için kullanılabilir uygun bir lokus olarak değerlendirilmiştir.

D1S80 lokusu itibarıyla Türk popülasyonuna en yakın popülasyonun Avrupa popülasyonu olduğu ve bu iki popülasyon arasında genetik benzerliğin yüksek derecede olduğu tespit edilmiştir. Nitekim Amerikan Beyaz Irkı ile aramızdaki benzerlik de anlamlı bulunmuştur.

D4S95 lokusu için 15 farklı alel itibarıyla 32 farklı genotip tespit edilmiştir. En sık gözlenen alleler uzunluk sırasıyla 1030 (% 15,06), 1060 (% 21,69), 1090 (% 24,10), 1150 (% 10,84) ve 1180 (% 7,83)'dir. D4S95 lokusu için hesaplanan heterozigosite ve PD değerleri sırasıyla %85,42 ve %94,93 olup bu değerler çalışılan lokuslar içinde en yüksek değerlerdir. Bu tez çalışmasında D4S95 lokusuna ait veriler Türk popülasyonu için ilk olduğundan önemlidir.

Bu çalışmada Türk popülasyonunda D17S30 lokusu için sekiz farklı alel ve 17 farklı genotip tespit edilmiştir. En sık gözlenen alelin %40,96 ile 378 aleli olduğu belirlenmiştir. D17S30 lokusu için heterozigosite % 74,37 ve PD

değeri %85,95 olarak hesaplanmıştır. D17S30 lokusu için bu tez çalışmasında elde edilen veriler Türk popülasyonuna ait ilk veriler olması açısından önemlidir.

TP53 lokusunun Türkiye'deki polimorfizminin araştırılması sonucu bu lokus için yedi farklı alel ve 10 farklı genotip tespit edilmiştir. En yüksek sıklıkla gözlenen alelin 120 (%57,65) olduğu bulunmuştur. TP53 lokusu için hesaplanan heterozigosite ve PD değerleri sırasıyla %59,37 ve % 78,20 olarak bulunmuştur. Hetrozigositesinin bir VNTR lokusu olmasına karşılık düşük olması bu lokusun Türk popülasyonunda yeterince yüksek derecede polimorfizm göstermediği anlamına gelmektedir. Bu tez çalışması Türk popülasyonunda TP53 lokusuna ait ilk veriler olması bakımından önem taşımaktadır.

Dört lokus dikkate alınarak yapılan haplotip analizi sonucu 78 kişide 125 farklı haplotip tespit edilmiştir. Düşük sıklıkta tespit edilen haplotiplerin Türk popülasyonuna özgü olup olmadığının anlaşılabilmesi ve bu haplotipler itibarıyla popülasyonlar arası karşılaştırmalar yapabilmek için daha fazla sayıda veriye gereksinim bulunmaktadır. Bu dört lokus itibarıyla haplotip veri tabanlarının oluşturulmasına öncülük etmesi açısından bu çalışma önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada Türkiye'deki polimorfizmi çalışılan D1S80, D4S95 ve D17S30 lokuslarının yüksek heterozigositeleri ve PD değerleri nedeniyle oldukça polimorfik oldukları ve kemik iliği nakli sonrası kimerizm tayini amacıyla kullanılmalarının uygun olduğu düşünülmüştür.

Türkiye popülasyonu için en yüksek PD değerine sahip (% 94.93) D4S95 lokusu ile D1S80 lokusunun (% 91.07) birlikte kombine değerleri % 99.55 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bu çalışmada seçilen dört polimorfik VNTR lokusunun birlikte %99,996 ayırım gücüne sahip oldukları bulunmuştur. Sonuç olarak D4S95 ve D1S80'nin birlikte kullanımı ve ilave olarak diğer

lokusların kullanımı kemik iliği nakli sonrası kimerizm tayini için uygun markerlar olarak belirlenmiştir



ÖZET

Türk Populasyonunda D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 VNTR Lokuslarının Polimorfizmleri

İnsan genomunda 6-100 bazçifti (bç) uzunluğunda, ardışık olarak tekrarlayan ve genellikle herhangi bir fonksiyonu bulunmayan diziler mevcuttur. Bu diziler minisatelit veya VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) olarak adlandırılırlar. VNTR (variable number of tandem repeat) lokuslarının çoğu yüksek heterozigotluk oranı içerdiklerinden özellikle populasyon genetiği, adli tıp ve kimerizm tayini konularında uygun markerlar olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 VNTR lokuslarının Türkiye'deki polimorfizmleri 100 sağlıklı bireyde araştırılmıştır. Heterozigosite oranları; D1S80 %76.05, D4S95 %85.42 , D17S80 %74.37 ve TP53 %59.37 olarak belirlenmiştir.

Türkiye populasyonu için en yüksek PD değerine sahip (% 94.93) D4S95 lokusu ilk sırada olmak üzere, D1S80 % 91.07 PD değeri ile birlikte kombine değerleri % 99.55 olarak hesaplanmıştır. D17S30 lokusuna ait PD değeri % 85.95'dir ve en düşük PD değeri % 78.20 ile TP53 lokusu için tesbit edilmiştir. Sonuç olarak, D4S95 ve D1S80'nin birlikte kullanımı ve ilave olarak diğer lokusların kullanımı uygun markerlar olarak belirlenmiştir.

İlave olarak, D1S80 lokusunun farklı populasyonlardaki polimorfizmleri ve Türkiye populasyonu Arlequin Version 2.000 programında değerlendirildiğinde, Türkiye populasyonunun öncelikle Avrupa populasyonuna ve ikinci sırada Amerikan beyaz ırkına yakınlık gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: D1S80, D4S95, D17S30, TP53, polimorfizm, Türkiye

SUMMARY

D1S80, D4S95, D17S30 and TP53 VNTR Loci Polymorphisms in Turkish Population

The human genome contains 6-100 bp long tandemly repeated sequences called minisatellites or VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats). VNTR loci generally have no function and contain suitable markers for their uses in population genetics, forensics and chimerism detection because of their high heterozygosity ratio.

In this study, four polymorphic VNTR loci namely, D1S80, D4S95, D17S30 and TP53 were examined in 100 healthy individuals from Turkish population and heterozygosity ratios of each were calculated as 76.05 %, 85.42 %, 74.37 % and 59.37 % respectively.

D4S95 revealed the highest PD value (94.93%) amongst the four loci studied. The combined PD value of D1S80 and D4S95 reached to 99.55%. The other PD values were, 85.95% for D17S30 and 78.20% for TP53 as the lowest. As a result, combined utilization of D4S95 and D1S80 with the edition of other two loci could be preferred for polymorphic studies.

In addition, various polymorphism studies performed from different populations in D1S80 locus allowed the comparison of the results of Turkish population and resides close to the European population to a lesser extent to American Caucasians.

Key Words: D1S80, D4S95, D17S30, TP53, polymorphism, Turkey

KAYNAKLAR

- ACUNA, M., JORQUERA, H., ARMANET, L., CIFUENTES, L. (2000). Gene frequencies for four hypervariable DNA loci in a Chilean population of mixed ancestry. *Journal of Forensic Science*, **45(5)**:1160-1161.
- ALLÍTO, B. A., HORN, G. T., ALTHERR, R., RICHARDS, B., MCCLATCHEY, A. I., WASMUTH, J. J., GUSELLA, J.F. (1991). Detection by PCR of the VNTR polymorphism at D4S95. *Nucleic Acids Research*, **19(14)**: 4015
- ALONSO, S., FERNANDEZ, I., CASTRO, A., PANCORBO, M. M. (1998). Genetic characterization of APOB and D17S5 AFLP loci in a sample from the Basque Country. *Human Biology*, **70(3)**: 491
- BIONDOLILLO, M., MAMOLINI, E., MANNI, F., SCAPOLI, C., LORENZETTI, L., BARRAI, I. (2000). Allele and genotype frequencies for D1S80 and 3' APOB in Recanati, central Italy. *Journal of Forensic Science*, **45(5)**: 1080-1082.
- BOIRON, J-M., COTTERET, S., CONY-MAKHOUL, P., MEREL, P., MICHEAU, M., PEREL, Y., BELLOC, F., BERNARD, P., REIFFERS, J. (1998). Stable mixed chimerism without relapse after related allogeneic umbilical cord blood transplantation in a child with severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplantation*, **22**: 819-821.
- BOIS, P., JEFFREYS, A. J. (1999). Minisatellite instability and germline mutation. *CMLS*, **55**: 1636-1648.
- BRIZ, M., REGIDOR, C., MONTEAGUDO, D., SOMOLÍNOS, N., GARAULET, C., FORES, R., POSADA, M., FERNANDEZ, M.N. (1998). Detection of maternal DNA in umbilical cord blood by polymerase chain reaction amplification of minisatellite sequences. *Bone Marrow Transplantation*, **21**: 1097-1099.
- BUDOWLE, B., BAECHTEL, F. S., GIUSTI, A. M., MONSON, K. L. (1990). Applying highly polymorphic variable number of tandem repeats loci genetic markers to identity testing. *Clin. Biochem.*, **23**: 287-293.
- BUDOWLE, B., BAECHTEL, F. S., SMERICK, J. B., PRESLEY, K.W., GIUSTI, A. M., PARSONS, G., ALEVY, M. C., CHAKRABORTY R. (1995). D1S80 population data in African Americans, Caucasians, Southeastern Hispanics, and Orientals. *Journal of Forensic Science*, **40(1)**: 38-44.
- ÇAKIR, A.H., AÇIK, L., KESICI, T., (2001). Distribution of amplified fragment length polymorphism D1S80 alleles in Turkish population. *Journal of Forensic Science*, **46(4)**:1002.
- CASADO, LF., STEEGMANN, JL., PICO, M., REQUENA, MJ., RAMIREZ, M., MADERO, L., VICARIO, JL., ALEGRE, A., GOMEZ, C., FERNANDEZ – RANADA, JM., (1996). Study of chimerism in long-term survivors after bone marrow transplantation for severe acquired aplastic anemia. *Bone Marrow Transplantation*, **18**: 405-409

CIMINO, G., RAPANOTTI, M. C. ELIA, L., IORI, A. P., GUGLIELMI, C., SCRENCI, M., CARMINI, D., DE FELICE, L., MOLETI, M. L., MENGARELLI, A., MANDELLI, F., ARCESE, W. (1999). A prospective molecular study of chimaerism in patients with haematological malignancies receiving unrelated cord blood or bone marrow transplants: detection of mixed chimaerism predicts graft failure with or without early autologous reconstitution in cord blood recipients. *British Journal of Haematology*, **104**: 770-777.

CONNELLY, P. M. (1994). Human genetic polymorphisms. *Dev. Biol. Stand.*, **83**: 107-110.

COOPER, D.N. (1999). *Human Gene Evolution*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, Chapter 8.

DEBRAUWERE, H., GENDREL, C. G., LECHAT, S., DUTREIX, M. (1997). Differences and similarities between various tandem repeat sequences: minisatellites and microsatellites. *Biochimie*, **79**: 577-586.

FREEMAN, S., HERRON, C. (1998). *Evolutionary Analysis*. USA: Prentice- Hall, Inc., Chapters 5 and 7.

FUTREAL, P.A., BARRETT, J.C., WISEMAN, R.W., (1991). An alu polymorphism intragenic to the TP53 gene. *Nucleic Acids Research*, **19(24)**: 6977.

GASPARINI, P., MANDICH, P., NOVELLI, G., BELLONE, E., SANGIUOLO, F., DE STEFANO, F., POTENZA, L., TRABETTI, E., MARIGO, M., PIGNATTI, P. F., DALLAPICCOLA, B., AJMAR, F. (1991). Forensic applications of molecular genetic analysis: an Italian collaborative study on paternity testing by the determination variable number of tandem repeat DNA polymorphisms. *Hum Hered.*, **41**: 174-181.

HANSEN, H. E., MORLING, N. (1993). Paternity testing with VNTR DNA systems. *Int. J. Leg. Med.*, **105**:197-202.

HONDA, K., NAKATOME, M., ISLAM, M. N., BAI, H., OGURAY, Y., KUROKI, H., YAMUZAK, M., TERADA, M., WAKASUGI, C. (1995). Amplification and detection of the VNTR locus D4S95 in a Japanese population. *Int. J. Legal Med*, **108(1)**: 43-44

JEFFREYS, A. J. (1987) Highly variable minisatellites and DNA fingerprints. *Biochemical Society Transactions*, **15**: 309-317

JEFFREYS, A. J., WILSON, V., THEIN, S. L. (1985). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, **314**: 67-73.

JEFFREYS, A. J., BARBER, R., BOIS, P., BUARD, J., DUBROVA, Y. E., GRANT, G., HOLLIES, C. R. H., MAY, C. A., NEUMANN, R., PANAYI, M., RITCHIE, A. E., SHONE, A. C., SINGER, E., STEAD, J. D. H., TAMAKI, K. (1999). Human minisatellites, repeat DNA instability and meiotic recombination. *Electrophoresis*, **20**: 1665-1675.

KASAI, K., NAKAMURA, Y., WHITE, R. (1990). Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science. *Journal of Forensic Science*, **35(5)**: 1196-1200.

KIJAS, J.M.H., FOWLER, J.C.S., VAN DAAL, A., (1994). PCR amplification of alleles at locus D17S5: detection of new and rare long-length alleles by oligoprobing in a survey of Australian populations. *Human Biology*, **66(2)**: 329

KLITZ, W., REYNOLDS, R., CHEN, J., ERLICH, H. A. (2000). Analysis of genotype frequencies and interlocus Sassociation for the PM, DQA1, and D1S80 loci in four populations., **45(5)**: 1009-1015.

LEWIN, B. (2000). *Genes VII*. New York: Oxford University Press, Inc., Chapters 3 and 4.

LEWONTIN, R. C., HARTL, D. L. (1991). Population genetics in forensic DNA typing. *Science*, **254**: 1745-1750.

LI, W., GRAUR, D. (1991). *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers, Chapters 2 and 8

MARTINELLI, G., TRABETTI, E., FARABEGOLE, P., TESTONI, N., BANDINI, G., MOTTA, M. R., VITTONI, A., TERRAGNA, C., PIGNATTI, P. F. (1997). Early detection of bone marrow engraftment by amplification of hypervariable DNA regions. *Hematologica*, **82**: 156-160.

MASTANA, S. (1999). Genetics analysis of the D1S80 locus in five North Indian populations. *Annals of Human Biology*, **26(5)**: 405-411.

NACHMAN, M. W., CROWELL, S. L. (2000). Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics*, **156**: 297-304.

NEI, M., KUMAR, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press, Inc., Chapter 12.

PAGE, R. D. M., HOLMES, E. C. (2000). *Molecular Evolution, A Phylogenetic Approach*. Malden: Blackwell Science Ltd., Chapters 3 and 4.

PENA, S. D. J., CHAKRABORTY, R. (1994). Paternity testing in the DNA era. *TIG*, **10(6)**: 204-209.

RICHARD, G., PAQUES, F. (2000). Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Reports*, **1(22)**: 122-126.

SEBATAN, I. M., HAJAR, H. A., ISOBE, E. (1998). Frequency distribution of D1S80. *Human Biology*, **70(1)**: 129-136.

SREENAN, J. J., PETTAY, J. D., TBAKHI, A., TOTOS, G., SANDHAUS, L. M., MILLER, M. L., BOLWELL, B., TUBBS, R. R. (1997). The use of amplified variable number of tandem repeats (VNTR) in the detection of chimerism following bone marrow transplantation. *Hematopathology*, **107(3)**: 292-298.

STRCHAN, T., READ, A.P. (1999). *Human Molecular Genetics 2*. New York: John Wiley & Sons, Chapters 7 and 9.

TAHIR, M. A., SINHA, S. K., A-AL-KUBAIDAN N., TAHIR, U.A., BUDOWLE, B., AMJAD, M., (2000). Distribution of amplified fragment length polymorphism D1S80 alleles in a Saudi Arabian populations. *Journal of Forensic Science* **45**(5): 1159

VAN DENBROECK, K., CONSIGLIO, A., MARTINO, G., GRIMALDI, L. M. E. (1996). Improved conditions for the analysis of large variable number of tandemly repeated (VNTR) unit polymorphisms. *Electrophoresis*, **17**: 678-680.

VAN LEEUWEN, J.E.M., VAN TOL, M.J.D., BODZINGA, B.G., WIJNEN, J.T.H., VAN DER KEUR, M., JOESTEN, A.M., TANKE, H.J., VOSSEN, J.M., MEERA KHAN, P., (1991). Detection of mixed chimareism in flow-sorted cell subpopulation by PCR-amplified VNTR markers after allogeneic bone marrow transplantation. *British Journal of Haematology*, **79**: 218-225

<http://www.gdb.org>

EK

ONAM FORMU

Bu form, katılmanız önerilen araştırma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek amacıyla düzenlenmiştir.

Araştırmanın Adı: Türk popülasyonunda D1S80, D4S95, D17S30 ve TP53 VNTR Lokuslarının Polimorfizmleri.

Bu çalışmada, yukarıda adları geçen, herhangi bir hastalıkla ilişkisi bulunmayan ve bireyler arasında farklılık gösteren DNA üzerindeki 4 bölgenin toplumdaki farklılıkları incelenecektir. Elde edilecek toplumsal veriler genetikle ilgili farklı alanlarda kullanılabilir ve bu verilerin kullanımında kişisel gizlilik esas alınacaktır.

Bu amaçla araştırmaya katılacak bireylerden 10 ml kan alınacak ve bu kandan izole edilecek DNA ile çalışılacaktır. Araştırma 100 kişi ile sınırlandırılmıştır.

Gönüllü kişinin, daha fazla açıklama istediğinde araştırmacıdan açıklama yapmasını isteme hakkı vardır. Bu araştırmaya katılmak kişiye hiçbir mali yük getirmeyecektir. Kişi istediğinde araştırmadan ayrılabilir. Artan DNA'lar kişinin izni olmadan diğer bilimsel çalışmalarda kullanılmayacaktır.

Ben....., bu araştırma ile ilgili bilgilendirildim. Araştırma ile ilgili sorularımı Biyolog Güvem Gümüş'e sorarak açık ve doyurucu yanıtlar aldım. Bu şartlarda çalışmaya kendi isteğimle katılıyorum.

Tarih:../../2001

İmza:

Adres:

Doğum Yeri:

Bio.Güvem GÜMÜŞ

İmza:

Tanıklık eden kurum yetkilisi

İmza:



**Т.С. ТҮБСЗКӨСНЕТІН КҮТӨЛДІ
БОРҰМАНТАСЫҢ ИЖЕСІДІ.**