

ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. Serap Tutgun ONRAT'ın danışmanlığında, Ömer Avni YEŞİLDAĞ tarafından hazırlanan “ADLİ TIPTA KULLANILAN MOLEKÜLER GENETİK YÖNTEMLER VE UYGULAMALARI” başlıklı bu çalışma, lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca

... / ... /

tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında
yüksek lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı, SOYADI

İmza

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Cevdet UĞUZ
(Başkan)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. SERAP TUTGUN ONRAT
(Danışman)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sait BULUT

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

... / ... / tarih ve

.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Zehra BOZKURT
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ADLI TIPTA KULLANILAN MOLEKÜLER GENETİK YÖNTEMLER VE UYGULAMALARI

Ömer Avni YEŞİLDAĞ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç.Dr.Serap TUTGUN ONRAT

Adli Tıpta ebeveyn tayini, kimlik tespiti, cinayet ve tecavüz vakalarında suçluların tespiti gibi çalışmalarda ve daha birçok alanda DNA temeline dayalı pek çok moleküler genetik yöntem ve yeni teknolojiler kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemlerin adli kullanımlarını değerlendirmektir. Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden İstanbul Adli Tıp Kurumu Başkanlığı Biyoloji İhtisas Dairesi'ne gelen adli örneklerden manuel ve M48 biorobot izolasyon protokollerine uygun olarak DNA izolasyonu yapıldı. Ancak değerlendirmeler otomatik izolasyon sonuçlarına göre yapılmıştır. Elde edilen DNA izolatları, Qigen marka izolasyon kit'i kullanılarak touch down PCR protokolü'ne göre çoğaltılmıştır. Tipleme ABI Prism 3130x cihazında kapiller elektroforez yöntemi ile yapılmıştır. Değerlendirme adli vakalarda talep edilen analize bağlı olarak RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR (Polymerase Chain Reaction), VNTR (Variable Number Tandem of Repeat Polymorphism), ASO (Allel Specific Oligonucleotide Reverse Dot Blot Analysis), STR (Short Tandem Repeat Polymorphism), X-STR, Y-STR yöntemleri baz alınarak yapılmıştır. Bu çalışmada intikal eden vakaların büyük çoğunluğunda olay yeri materyali ile şüpheliye ait örneklerden elde edilen kapiller elektroforez görüntülerinin birebir örtüştüğü bulunmuştur. Adli Tıp'ta identifikasyon uygulamalarında PCR, STR, X-STR, Y-STR yöntemlerinin diğer yöntemlere göre daha çok kullanıldığı sonucuna varılmıştır.

2009, 91 sayfa

Anahtar Kelimeler: Moleküler Genetik Yöntemler, PCR, RFLP, VNTR, ASO, STR, X-STR, Y-STR,

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

THE MOLECULAR GENETIC METHODS USED IN FORENSIC MEDICINE and THEIR APPLICATIONS

Ömer Avni YEŞİLDAĞ

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology

Supervisor: Assistant Professor. Serap TUTGUN ONRAT

Many molecular genetic methods and new technologies which are based on DNA base, have been used for determining identity, criminals in killing and physical abuse and parents in forensic medicine. The aim of this study is to evaluate legal use of molecular methods which are used, commonly. DNA isolation had been made in pursuance of isolation protocols of manuel and M48 biorobot from various regions of Turkey the forensic cases which come to Biology Expert Bureau of İstanbul Forensic Medicine Foundation Management. However, evaluations had been made in respect of the results of otomatic isolation. Obtained DNA isolates had been reproduced or increased in respect of touch down PCR protocol by using isolation kit by Qigen mark. Typecasting had been made by capiller elektroforez method in ABI Prism 3130x tool. Evaluation had been made or applicated by using the methods of RFLP (Restriction Fragment Lentht Polymorphism), PCR 8Polymerase Chain Reaction), VNTR (Variable Number Tandem of Repeat Polymorphism), ASO (Allel Specific Oligonucleotid Dot Blot Analyses), STR (Short Tandem Repeat Polymorphism), X-STR, Y-STR according as demanded analyses. In this study, materials which are scene of crime, with capiller elektroforez views or images overlap as one to one in many of the events which were occured. It is argued that PCR, STR, X-STR, Y-STR methods are more used in relation to the other methods in identification applications in forensic medicine.

2009, 91 pages

Key Words: Molecular Genetic Methods, PCR, RFLP, VNTR, ASO, STR, X-STR, Y-STR

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında bana kılavuzluk yapan, bilgi, deneyim ve tecrubesini benden esirgemeyen saygı değer danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Serap TUTGUN ONRAT'a, bu ęalıőmanın Adli Tıp Kurumu'nda yapılması için bana referans olan Prof. Dr. Faruk AŞICIOğLU'na, yapıcı eleŐtirileri ve katkılarından dolayı tez tez jüri üyeleri Doç. Dr. Cevdet UğUZ'a ve Yrd. Doç. Dr. Sait BULUT'a, tez ęalıőmam boyunca bana gerekli izinleri sağlayan bünyesinde ęalıŐtıęım Őube müdürlerime, İstanbul'da bulunan ve bu ęalıőmanın geręekleŐmesinde tüm imkanlarını kullandıran Adelet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Başkanlığı Biyoloji İhtisas Dairesi'ne ve emeği geçen bütün ęalıőanlarına, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda hissettiğim EŐim ve Ailem'e teŐekkürlerimi sunarım.

Ömer Avni YEŐILDAę
AFYONKARAHİSAR, Őubat 2009

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa no</u> |
|--|-----------------|
| ÖZET | iii |
| ABSTRACT | iv |
| TEŞEKKÜR | v |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | ix |
| RESİMLER DİZİNİ | xi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xii |
| 1. GİRİŞ ve AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Moleküler Genetik | 4 |
| 2.2. Adli Bilimlerde Delillerin Önemi | 5 |
| 2.3. Delillerin Yaygın Tipleri | 6 |
| 2.4. Biyolojik Deliller | 8 |
| 2.5. Biyolojik Delillerin Toplanması | 9 |
| 2.6. DNA ve Polimorfizm..... | 10 |
| 2.6.1. Dizi (Sekans) Polimorfizmi. | 11 |
| 2.6.2. Uzunluk Polimorfizmi..... | 12 |
| 2.7. DNA Analizinde Kullanılan Yöntemler | 14 |
| 2.7.1. RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) | 14 |
| 2.7.2. PCR (Polymerase Chain Reaction) | 16 |
| 2.7.3. VNTR(Variable Number Tandem Repeat Polymorphism) | 19 |
| 2.7.4. ASO (Allel Specific Oligonucleotid-Reverse Dot-Blot Analys) ... | 20 |
| 2.7.5. STR (Short Tandem Repeat Polimorphism) | 21 |
| 2.7.6. Y Kromozomu Polimorfizmi (Y-STR)..... | 23 |
| 2.7.7. X-STR Polimorfizmi | 25 |
| 2.7.8. Mitokondriyal DNA ve Adli Tıpta Kullanımı | 29 |
| 3. MATERYAL ve METOD..... | 33 |
| 3.1. Materyal..... | 33 |
| 3.1.1. Çalışma Materyali..... | 33 |
| 3.1.2. Primerler | 33 |

| | |
|--|------|
| 3.1.3. Kimyasal Malzemeler..... | 34 |
| 3.1.4. Plastik ve Diğer Malzemeler..... | 34 |
| 3.1.5. Kullanılan Çözeltiler ve Boyalar | 34 |
| 3.1.6. Kullanılan Araç ve Gereçler | 36 |
| 3.2 METOD | 37 |
| 3.2.1.DNA İzolasyonu | 37 |
| 3.2.2. Kemik ve diş örneklerinden DNA izolasyon Protokolü | 37 |
| 3.2.3. Sperm örneklerinden DNA izolasyon Protokolü | 39 |
| 3.2.4. Doku örneklerinden DNA izolasyon Protokolü | 41 |
| 3.2.5. Kan örneklerinden DNA izolasyon Protokolü | 43 |
| 3.2.6. Kıl örneklerinden DNA izolasyon Protokolü | 46 |
| 3.2.7. Tırnak örneklerinden DNA izolasyon Protokolü | 48 |
| 3.2.8. Cenin örneğinden DNA izolasyon Protokolü | 50 |
| 3.2.9. Tükürük örneği içeren örneklerden DNA izolasyon Protokolü | 51 |
| 3.2.10. Amnion sıvısından DNA izolasyon protokolü | 52 |
| 3.2.11 Kantitasyon | 53 |
| 3.2.12 İzole Edilen DNA'nın Çoğaltılması..... | 54 |
| 3.2.13 Polimeraz Zincir Reaksiyonu | 54 |
| 3.2.14 Kapilarelektroforez | 55 |
| 4. BULGULAR | 57 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ | 74 |
| 6. KAYNAKLAR | 78 |
| 6.1.İnternet Kaynakları | 89 |
| ÖZGEÇMİŞ | xiii |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-------------------|---|
| RFLP : | Restriction Fragment Length Polymorphism |
| PCR : | Polimerase Chain Reaction |
| ASO : | Alele Specific Oligonucleotid Hybridization-Alele Özgü Oligonükleotid Hibridizasyonu (reverse dot-blot hibridizasyon) |
| LTRs : | Long Tandem Repeats |
| STR : | Short Tandem Repeat Polimorphism |
| VNTR : | Variable Number of Tandem Repeats |
| SNP : | Single Nucleotid Polymorphism-Tek Nukleotid Polimorfizmi |
| PIC : | Polimorphism Information Content |
| MACS : | Magnetic Activated Cell Sorting |
| LİZ(ILS) : | Internal Line (Size) Standart |
| EDTA : | Ethylen diamin tetra acetic acid |
| UV : | Ultraviyole Işık |
| DTT : | Dithiothreitol |
| RBC : | Red Blood Cell- Kırmızı kan hücresi lizis çözeltisi |
| PBS : | Phosphate Buffer solution |
| Y-STR : | Y Kromozm Polimorfizmi |
| X-STR : | X Kromozom Polimorfizmi |
| mtDNA : | Mitokondrial DNA |
| HLA : | Human lococyt Antigene |
| TM : | Melting Temperature |
| GC : | Group Specific Component |
| LDLR : | Low Density Lipoprotein Receptor |
| GYPA : | Glycophorin A |
| HBGG : | Haemoglobin Gamma Globin |
| EDNAP : | Eupopean DNA Profiling Group |
| MEC : | Mean Exclution Chance |
| nDNA : | Nükleer DNA |
| POP-4 : | Performansı optimize edilmiş polimer |
| MSY1 : | Y kromozomal minisatellit tekrarları |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Sekil no</u> | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| 3.1. Luminol'ün kimyasal yapısı | 44 |
| 3.2. Luminol'ün H ₂ O ₂ ile reaksiyonu gösterilmesi | 45 |
| 4.1. 3130x Genetik Analiz cihazında POP-4 Polimeri kullanılarak GeneScan 500 LIZ® Size Standardının elektroferogramı. | 57 |
| 4.2. Standart primerlere ait ham verilerin kapiller elektroforez görüntüsü | 58 |
| 4.3. AmpFISTR Identifiler kit'inde yer alan floresan işaretli primerlerin içerisinde yer aldığı lokuslara ait renkleri gösteren ideogram | 58 |
| 4.4. Babalık testi- STR allellerin ailesel kalıtımı (D13S317) (İnt.Kyn. 4). | 59 |
| 4.5. Bir cinayet vakasında şüphelinin kanından izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü. | 67 |
| 4.6. Aynı vaka ile ilgili olay yerinde bulunan izmaritten izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü. | 67 |
| 4.7. Bir cinayet vakasında şüphelinin kanından izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü. | 68 |
| 4.8. Bir cinayet vakasında maktulün tırnak kiri materyalinden izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü. | 68 |
| 4.9. Bir cinayet vakasında olay yerinde bulunan kıl örneğinden izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü. | 69 |
| 4.10. Aynı vaka ile ilgili şüphelinin kanından izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü. | 69 |
| 4.11. Bir cinayet vakasında şüpheliye ait kandan izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü | 70 |

| <u>Sekil no</u> | <u>Sayfa No</u> |
|---|------------------------|
| 4.12. Bir cinayet vakasında olay yerinde bulunan pet şişeden izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü | 70 |
| 4.13. Bir nesep davasında ceninden izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü. | 71 |
| 4.14. Aynı dava ile ilgili baba adayına ait kandan izole edilen DNA'nın ait kapiller elektroforez görüntüsü. | 71 |
| 4.15. Bir cinayet davasında şüpheli üzerinde bulunan bıçaktaki kan lekesinden izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü. | 72 |
| 4.16. Aynı davayla ilgili maktulün kanından izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü. | 72 |
| 4.17. Kimliği belirsiz bir cesede ait doku örneğinden izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü. | 73 |
| 4.18. Mevtanın kendi çocukları olduğundan şüphelenen aile tarafından, mevtanın şahsi yastığı üzerinden temin edilen kıl örneğinden izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü. | 73 |

RESİMLER DİZİNİ

| <u>Resim no</u> | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| 3.1. A-Kimliği meçhul bir cesede ait kemik örneği. B-Kimliği meçhul bir cesede ait kemik ve diş örnekleri | 37 |
| 3.2. Bir tecavüz vakasına ait örnekler. A- vajinal frotti. B- İç çamaşırlar. C- Şort. D-Anal frotti | 39 |
| 3. 3. Bir cinayet vakasına ait doku örnekleri. A-Kemikli doku. B-Kas doku. | 41 |
| 3. 4. A- Bir şüpheliye ait Whatman'a emdirilmiş kuru kan örneği. B- Mağdura ait kan örneği. C- Mağdura ait giysiler. D-Olay yerinde bulunan bıçak. | 43 |
| 3.5. Luminol ile kan lekelerinin gösterilmesi | 44 |
| 3. 6. A-Olay yerinde bulunan kıl örneği. B-Cesede ait kıl örneği. C-Cesedin üzerinde bulunan kıl örneği. | 46 |
| 3.7. A-Bir cesede ait tırnak örnekleri. Şüpheliye ait tırnak içi swab'ları. B-Sol el, A-Sağ el | 48 |
| 3.8. Bir tecavüz vakasında mağdurdan tahliye edilen cenin. | 50 |
| 3.9. Bir adli vaka'da olay yerinde bulunan, A-Elma artığı B-Sigara izmariti | 51 |
| 3.10. Bir nesep davasında mağdurdan alınan Amnion sıvısı | 52 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Cizelge no</u> | <u>Sayfa No</u> |
|---|------------------------|
| 3.1. Kimyasal malzemeler | 34 |
| 3.2. Kullanılan araç ve gereçler | 36 |
| 3.3. İzole DNA ve PCR karışım oranları | 54 |
| 3.4. PCR Döngü Parametreleri | 55 |
| 4.1. Şekil 4.5-4.6'da gösterilen olay yerinde bulunan izmaritten izole edilen DNA ile şüpheliye ait kan örneğinden elde edilen DNA'ların elektroforez görüntülerine ait veriler. | 60 |
| 4. 2. Şekil 4.7-4.8'de gösterilen cinayet vakasında maktülün tırnak kirinden izole edilen DNA ile şüpheliye ait kan örneğinden elde edilen NA'ların elektroforez görüntülerine ait veriler. | 61 |
| 4. 3. Şekil 4.9-4.10'da gösterilen bir cinayet vakasında olay yerinde bulunan kıl örneğinden izole edilen DNA ile şüpheliye ait kan örneğinden elde edilen DNA'ların elektroforez görüntülerine ait veriler. | 62 |
| 4. 4. Şekil 4.11-4.12'de gösterilen bir cinayet vakasında olay yerinde bulunan pet şişeden izole edilen DNA ile şüpheliye ait kan örneğinden elde edilen DNA'ların elektroforez görüntülerine ait veriler. | 63 |
| 4. 5. Şekil 4.13-4.14'de gösterilen bir nesep davasında cenin'den izole edilen DNA ile baba adayına ait kan örneğinden elde edilen DNA'ların elektroforez görüntülerine ait veriler. | 64 |
| 4. 6. Şekil 4.15-4.16'da gösterilen bir cinayet davasında şüpheli üzerinde bulunan bıçaktan izole edilen DNA ile maktüle ait kan örneğinden elde edilen DNA'ların elektroforez görüntülerine ait veriler. | 65 |
| 4. 7. Şekil 4.17-4.18'de gösterilen kimliği meçhul cesede ait doku örneğinden izole edilen DNA ile cesede ait olabileceği değerlendirilen kıl örneğinden elde edilenDNA'ların elektroforez görüntülerine ait veriler. | 66 |

1.GİRİŞ ve AMAÇ

İnsanlar, küçük veya büyük topluluklar halinde yaşarlar ve yaşadıkları çevrede bir sosyal düzen geliştirirler. Sosyal düzenin olduğu her yerde bu düzeni bozan kişiler ve eylemler de olmaktadır. Bu da "suç ve suçlular" kavramını ortaya çıkarmaktadır. Bu kişilerin sosyal düzene karşı işledikleri suçlara reaksiyon olarak toplumdan soyutlanmaları ve bir şekilde ceza çekmeleri de bir gerekliliktir. Toplumsal huzuru sağlamak ve insanlarda düzene karşı güven duygusunu pekiştirmek için, işlenen suça uygun ve yeterli cezayı belirlemek ve uygulamak hukuk biliminin çalışma alanına girer. İnsanlara karşı işlenen ve şahısların herhangi bir şekilde zarar gördüğü suçlarda, zararın niteliğini ve derecesini belirlemek ise tıbbi ilgilendiren bir konudur. Tıbbın adalete yardımcı olması nedeniyle, tıp ve hukuk bilimleri en eski zamanlardan beri birbirleriyle yakın bağlantı içinde olmuşlardır. Onaltıncı yüzyıldan sonra, başta İtalya ve Almanya olmak üzere çeşitli ülkelerde Adli Tıp ayrı bir bilim dalı olarak önem kazanmış, özellikle 19. yüzyıldan itibaren hızla gelişmiştir. Günümüzde tıp bilimlerinde, özellikle genetik ve Moleküler Biyoloji alanlarındaki gelişmeler, hukukun adil ve hızlı işlemesi için alınan önlemlerle birleşince, Adli Tıp, dolayısıyla Adli Tıp'ta kullanılan moleküler genetik çok önemli bir bilim dalı haline gelmiştir (Soysal ve Eke 1999).

Son 20 yıl içinde DNA temeline dayalı pek çok moleküler genetik yöntem ve yeni teknolojiler geliştirilmiştir. Bu teknolojiler popülasyonların tanımlanmasında, gen fonksiyonlarının belirlenmesinde, genom haritalarının çıkarılmasında, Adli Tıp'ta ebeveyn tayini, kimlik tespiti, cinayet ve tecavüz vakalarında suçluların tespiti gibi çalışmalarda ve daha birçok alanda kullanılmaktadır. Mahkemeler, hâkimlikler, savcılıklar tarafından gönderilen çeşitli materyalleri incelemek ve sonuçlarını raporla tespit etmekle görevlendirilen İhtisas Daireleri ve İhtisas Kurulları şunlardır:

Adli Tıp İhtisas Daireleri

Morg İhtisas Dairesi; otopsi, kemik ve organ incelemeleri

Fizik İncelemeler İhtisas Dairesi; yazılı belge, silah vb. incelemeler

Kimyasal Tahliller İhtisas Dairesi; ilaç, zehir, madde incelemeleri

Biyoloji İhtisas Dairesi; doku, leke vb. incelemeler, kimliklendirme, babalık araştırmaları
Gözlem İhtisas Dairesi; hukuki sorumluluk, ceza sorumluluğu gibi adli psikiyatrik
muayeneler

Trafik İhtisas Dairesi; trafik kazalarında kusur vb. incelemeler

Adli Tıp İhtisas Kurulları

1. İhtisas Kurulu; ölümlü olaylar
2. İhtisas Kurulu; yaralanmalar, ırza geçmeler...
3. İhtisas Kurulu; kaza yaralanmaları, maluliyet
4. İhtisas Kurulu; ceza sorumluluğu, hukuki sorumluluk vb.
5. İhtisas Kurulu; Zehirlenmeler, babalık değerlendirmeleri vb.
6. İhtisas Kurulu; Ahlaka aykırı cürümler, çocuk düşürme, yaş tespiti vb.
görevleri üstlenmektedir.

Adli Tıp Genel Kurulu: Adli Tıp İhtisas Daireleri, İhtisas Kurulları ve diğer sağlık
kuruluşları tarafından kesin karara bağlanamamış konuları, bu birimlerin verdikleri rapor ve
görüşler arasında çıkan çelişkileri inceler ve kesin karara bağlar.

Biyoloji İhtisas Dairesi'nin görevleri şöyle belirlenmiştir ;

- a) Mahkemeler, hâkimlikler, savcılıklar tarafından gönderilen kanlı eşya, sperm lekesi,
lekeli eşyadan kan grupları ve faktörleri, babalığın tayini, kan sayımı; kan ve omurilik
sıvısında bakteriyolojik ve serolojik incelemeler yaparak sonucunu raporla mahalline
bildirmek,
- b) Gönderilen suç aletleri, giysi, eşya üzerinde sperm ve diğer biyolojik lekeleri aramak,
- c) Besin maddelerinin biyolojik ve bakteriyolojik incelemelerini yaparak Gıda
Maddeleri Tüzüğüne uygunluğunu araştırmak,
- d) Vajinal ve anal frottilerde spermatozoid aramak,
- e) Spermiogram yapmak,
- f) Gebelik testi yapmak,
- g) Kan lekelerinin insan veya hayvana ait olup olmadığını, mümkünse kaynağını, insana
ait ise grup ve faktörlerini belirlemek. Bunların dışında lekenin ne zaman meydana

geldiğinin, kadına mı erkeğe mi ait olduğunun tespiti gibi araştırmaların yapılması da istenebilir (Tunalı 1995).

Biyolojik delillerde antijenlerin dayanma sürelerini bilmek önemlidir. Çünkü bu deliller adliye emanetinde bazen ayları bulan sürelerde bekletildikten sonra savcılık tarafından Adli Tıp laboratuvarlarına gönderilmektedir. Antijenlerin dayanıklılık süresi ve bunun önemi bilinmediğinden, antijenik aktivitenin kaybolması nedeniyle önemli adli hatalar yapılabilmektedir.

Bu tez çalışmasında, yukarıda belirtilen ihtisas daireleri ve kurullarına intikal eden adli olaylarda, adli tıbbın delilden suçluya ulaşma sürecinde kullandığı moleküler genetik yöntemler ve uygulamalarının gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Moleküler Genetik

Moleküler Biyoloji alanındaki son 20 yılda ortaya konan hızlı gelişim, bu konunun bugün biyoteknoloji olarak adlandırdığımız ve yaşam bilimlerinin her türlü alanında uygulamaya giren teknolojinin kullanımı ile gerçekleşmiştir. DNA'nın manupule edilebilmesini sağlayan restriksiyon enzimlerinin kullanımı ile başlayan süreç bugün pek çok canlının tüm genomunun araştırılabilmesini sağlayan teknolojik ve metodolojik uygulama araçlarının kullanımını günlük uygulamamıza sokmuştur.

Moleküler Biyoloji devam eden süreçte önem kazanan genetik, biyokimya, hücre biyolojisi ve biyofizik gibi dalların gelişmesiyle ortaya çıktı. Canlı organizmada hayati önemleri oldukça fazla olan nükleik asitler, proteinler ve enzimlerin yapılarının tamamen aydınlatılması Moleküler Biyolojinin ilgi alanıdır. Bu maksatla X ışınları difraksiyonu ve elektronmikroskopu gibi ileri tekniklerden faydalanılmaktaydı. İnsan ve diğer canlıların genomları aydınlanmaya başladıktan sonra Moleküler Biyolojinin genel ilgi alanı canlılardaki nükleik asitlerin, proteinlerin ve onların üstlendikleri görevleri ve birbirleriyle olan etkileşimleri anlamaya yönelmiştir. Bu günlerde Moleküler Biyoloji alanında ortaya çıkan yeni yöntemlerin yardımıyla hızlı bir gelişme sürecine girmiş ve hem hastalıkların gerçek nedenleri anlaşılmasına başlanmış hem de biyoteknolojik ve biyoteknolojik gelişmelerin yolu açılmıştır. DNA mikroçipleri ile genlerin ekspresyon profillerinin alınması olası hale gelmiş, gerçek zamanlı PCR ile gen ekspresyonunun incelenebilmesine olanak vermiştir. Floresan antikor ve protein teknolojileri, bu floresan proteinlerin hücre içinde sentezlenmesiyle veya ilgilenilen proteinlere kaynaştırılmasıyla proteinlerin hücre içinde takibi mümkün olmuş ve hangi hücrelerin hangi şartlar altında bu proteinleri nasıl ve nerede kullandığının anlaşılmasını sağlamıştır. Bir çok hücre türünün kültüre edilmesi genetik hayvan deneylerinde hangi genetik faktörlerin hangi sorunlara yol açtığını anlamayı kolaylaştırmıştır. Rekombinant DNA teknolojileri ile canlılar arası gen alış verişini mümkün olmuş ve birçok alanda yeni ürünlerin üretilme yolu açılmıştır. Bu gelişmelerin en önemlisi moleküler genetik yöntemlerin adli vakaların çözümünde kullanılmasıdır.

2.2. Adli Bilimlerde Delillerin Önemi

Çok eski zamanlardan beri suçların ispatında " itiraf " esas alınmıştır. Özellikle Orta Çağ'da itiraf ettirme amacıyla özel yöntemler ve aletler geliştirilmiştir. Ancak bu yöntemler kişileri bazen işlemedikleri suçları işlemiş gibi itirafa zorlamıştır. Oysa amaç her zaman gerçeği ortaya çıkarmak olmalıdır ve bunun için zanlının suçlu olup olmadığını bilimsel verilerle ispat etmek gerekir.

Suç işleyenler ne kadar profesyonel olurlarsa olsunlar, her suç belli bir gayreti, belli yerlere teması gerektirdiğinden olay yerinde mutlaka delil bırakırlar (Sander 1997). Bu delilleri olay yerinde araştırma, usulüne uygun olarak toplama, saklama ve laboratuvara ulaştırma aşamalarının gereken özen gösterilerek yapılması zanlının suçluluğunu ya da suçsuzluğunu ortaya çıkaracaktır. Büyük bir hızla ilerleyen teknolojinin olanakları, adli bilimlerde de delillerin belirlenmesinden başlayarak tüm aşamalarda kullanılmaktadır. Bilimsel yaklaşımla elde edilen sonuçlarda hata veya yanılma olmayacağından toplumda adalet ve düzene güven duygusunu da arttıracaktır. Bu nedenle her tür delili başlangıç aşamalarından itibaren dikkatle araştırmak ve değerlendirmek büyük önem taşımaktadır (Grunbaum and Crim 1982).

Kriminal olaylarda, olaya ilk müdahale eden güvenlik güçlerinin görevi; güvenliğini sağlamak, olay yerini bozmadan korumak, delillerin kaybolmasını önlemek, olayla bağlantısı olabilecek kişilerin olay yerinden uzaklaşmasını önlemektir. Hakim veya savcının gerekli incelemelerini yapmasından sonra resmi veya sivil uzmanlardan oluşan ekipler tarafından deliller toplanır (Sander 1997).

Deliller hakim veya savcıya teslim edildikten sonra gerekli incelemelerin yapılması için ilgili daireye gönderilir. Delillerin biyolojik kaynaklı olanlarında kontaminasyon ve bozulma riskinin yüksek olması nedeniyle alınmaları, saklanmaları ve incelenecekleri laboratuvarlara ulaştırılmaları doğru yöntemlerle ve olabildiğince hızlı olmalıdır (Muralidharan and Wemmer 1994).

Deliller niteliği, miktarı, boyutları farklı olabilen çeşitli materyallerdir. Bu anlamda çok önemlidirler. Çünkü; araştırmaları kurbanı, şüpheliye ve çevreye yönlendirir, parçaları anlamlı kılar ve bir araya getirirler. İşlenmiş ya da işlenecek suçun anahtar noktalarını ispatlayabilirler. Suç ile kişilerin kimlikleri arasında ilişki kurulmasını sağlarlar.

Suçsuzu ortaya çıkarırlar. Mağdurun tanıklığını güçlendirirler. Detayları belirledikleri için şüphelinin itiraf etmesini sağlarlar (Sander 1997, İnt.Kyn.2).

2.3. Delillerin Yaygın Tipleri

Delillerin bazıları sabit veya hareket ettirilemeyecek kadar ağır cisimlerin üzerinde bulunabilirler. Topraktaki ayak izleri, tekerlek izleri bu tür sabit delillere örnek olarak verilebilir. Taşınabilir deliller ise olay yerinden alınıp laboratuvar incelemelerinde ve araştırmalarda kullanılan delillerdir. Delillerin ayrımı uygulanacak laboratuvar incelemesinin tipine göre de yapılabilir ancak bunu her delil için uygulamak mümkün değildir. Örneğin bir şantaj mektubu , üzerindeki parmak izlerinin araştırılması için "Fizik İncelemeler İhtisas Dairesi", zarfın yapışkan yerindeki ve pulun arkasındaki tükürük örneğinden kimlik belirlenmesi için "Biyoloji İhtisas Dairesi" tarafından incelenebilir.

Kriminal olaylarda delillerin yaygın tipleri şunlardır:

1. Biyolojik Materyaller: Olay yerinde bulunan veya suçla ilişkisi kurulan insan veya hayvan kaynaklı kıllar, kan, meni, tükürük ve benzeri çeşitli vücut sıvıları ve bunların lekelerini taşıyan kumaş, sigara izmariti, bardak gibi nesnelere bu kategoriye girer. Bu materyallerin serolojik ve biyokimyasal incelenmesiyle orijinlerinin belirlenmesi ve bireyselleştirilmesi mümkündür. Ayrıca organ, doku parçaları, vücut sıvıları ve kıllardan çeşitli toksik madde, ilaç ve alkol analizi için yararlanır.
2. Dökümanlar: Üzerinde daktilo, bilgisayar veya el ile yazılmış yazı olan kağıtlar, mürekkep, özellikle silinmiş, değiştirilmiş yazılar, yanmış dökümanlar sahtecilik açısından araştırılır.
3. İlaçlar: Üretim, dağıtım ve satımı yasalarla düzenlenmiş, saldırganlık veya şiddet yaratabilen uyuşturucu ilaçların varlığı ve içeriği araştırılır.
4. Patlayıcılar: Patlayıcı içeren nesnelere ve bir patlamadan sonra geriye kalan tüm kalıntıları içerir.
5. Ateşli silahlar: Mermiler, boş kovanlar, mermi çekirdekleri ateşli silahlar incelenir.
6. Lifler: Tüm sentetik veya doğal lifler nesnelere, kişiler ve olay arasında ilginin kurulmasına yardımcı olabilirler.
7. Parmak izleri: Çeşitli eşyalar üzerinde görünen veya gizli tüm parmak izleri incelenir.

8. Cam: Hırsızlık, trafik kazalarında vurup kaçma olaylarında, ne taraftan ateş edildiğinin belirlenmesinde olay yerinde bulunan bir cam parçacığı veya bir aletle kesilmiş, delinmiş pencere camı olayın aydınlatılmasına yardımcı olur.

9. İzler: Damgalar, topraktaki ayak izleri ve yiyecek, giyecek üzerindeki fabrika baskıları gibi delillerdir.

10. Boya: Kuru veya sıvı olsun herhangi bir boya, bir objenin yüzeyinden bir başka objenin yüzeyine bulaşabilir. Yaygın bir örnek, otomobil kazalarında bir araçtan diğerine boya transferidir. ABD'de her yıl üretilen araçlara o yıl için bir boya standardı verilmektedir. Yabancı veya eski araçlar bu boylarla boyanamadıkları için boya analizi ile aracın hangi yıla ait olduğu anlaşılmaktadır.

11. Petrol ürünleri: En yaygın olarak görülenler, kundakçılık olaylarında elde edilen yağ lekeleri veya benzindir.

12. Toprak ve mineraller: Özel bir bölgeye ait toprak ve minerallerden, kişi veya nesnenin o bölge ile bağlantısını kurdurabilecek ayrıntılar elde edilebilir.

13. Çeşitli yiyecekler: Elbise, ayakkabı veya nesnelere üzerinde herhangi bir yiyecek parçasının bulunması kişi veya nesne ile olay arasında bağlantı kurdurabilmektedir.

14. Alet izleri: Herhangi bir olayda kullanılan bir aletin bir başka nesne üzerinde oluşturduğu izlerdir. Bir kapı kilidini açmak için kullanılan bir tornavidanın bıraktığı sürtünme ve baskı izleri örnek olarak verilebilir.

15. Araç ışıkları: Araçların farlarının açık veya kapalı olması zamanın belirlenmesi amacıyla kullanılır (Sander 1997, Güney 1998).

Ayrıca düğme, ip, toprak, kül, talaş, kömür, bitkiler, kozmetikler, yiyecek paketleri ve benzeri çeşitli deliller olayla mağdur ve şüpheliler arasındaki bağlantının kurulmasını sağlar. Delilleri dikkatle araştırma ve değerlendirmenin önemini vurgulayan bir örnek olarak Aldo Moro cinayetini verebiliriz. 1978 yılında Kızıl Tugaylar tarafından kaçırılan İtalya Başbakanı Aldo Moro'nun cesedi bir arabanın bagajında bulunduktan sonra, çoklu teknik yaklaşımıyla deliller araştırılmıştır. Moro'nun giysileri, ayakkabıları, arabanın içi ve dışı incelenmiş, bulunan toprak ve bitki örneklerinin değerlendirilmesi sonucu suçlular yakalanmıştır (Lombardi 1999).

Mikroskobik boyutlarda da olsa fiziksel deliller araştırmanın önemli bir aşamasını

oluştururlar. Eğer delillerin araştırılması, incelenmesi ve korunması, başlangıç aşamasından itibaren gereken dikkat, duyarlılık ve beceri gösterilmeksizin yapılırsa olayların açıklığa kavuşturulması zorlaşır (Moenssens et al. 1995).

2.4. Biyolojik Deliller

Lockhart'ın "her temas kendi izini bırakır" sözü Adli Tıp'ta delilin önemini vurgulamaktadır. Bu iz ne kadar küçük olursa olsun gelişmiş teknolojik olanakların dikkatli kullanımıyla belirlenmesi ve analiz edilmesi mümkündür. Bir kan damlası veya sigara izmariti yoluyla çözümlenen kriminal olayların anlatıldığı programlar televizyonlarda ilgiyle izlenmektedir. Özellikle son yıllarda geliştirilen yöntemler sayesinde çok küçük miktardaki biyolojik örneklerle olayları aydınlatmak mümkün hale geldiğinden bu tür deliller daha da önem kazanmışlardır.

Kan, meni, tükürük, ter, gözyaşı, vajen ifrazatı, gaita, süt ve süt ağzı, idrar ve bunların lekeleri ile kıllar, organ parçaları, tırnak ve kemikler biyolojik delilleri oluştururlar. Bu delillerle ilgili araştırmaları yapmak Adli Biyoloji disiplininin görevleri içine girmektedir.

Özellikle cinayet, tecavüz, saldırı gibi şiddet içeren olaylarda kan, meni, tükürük lekeleri bazen tek delil olmaktadır. Bu nedenle bu lekelerin tespitiyle başlayan incelemeler büyük önem taşımaktadır. Fizik yapılarının özellikleri, vücut dokuları ve sıvıları kişilere diğer insanlardan ayırdedilmelerini sağlayan bireysel özgünlüğü kazandırır. Birçok kriminal olayın aydınlatılmasında ve babalık tayininde kalıtsal olarak aktarılan bu özelliklerden yararlanır. Bu amaçla kullanılan vücut sıvıları ve bunların lekeleri arasında önem bakımından kandan sonra tükürük lekeleri gelmektedir. Özellikle tecavüz ve cinayet olaylarında tükürük lekesinden yararlanılarak fail ve mağdurun kimliklerini belirlemek ve böylece olayı aydınlatmak mümkündür. Kişinin sekretörlük denen genetik özelliğe sahip olması durumunda, antijenik kuvvetinin daha fazla olması nedeniyle, kandan çok daha az miktarda tükürük ile kan grubunu belirlemek mümkündür (Matsuzawa et al 1985, Carolina et al. 2007).

Adli Tıp yönünden taşıdığı öneme ve avantajlara rağmen, ülkemizdeki Adli Tıp literatüründe tükürük ve tükürük lekelerine yeteri kadar yer verilmediği görülmüştür.

Yabancı çalışmalarda ise grup tayini yöntemleri üzerinde durulmuş, ancak grup özelliği veren antijenlerin dayanma süreleri hakkında yapılmış bir araştırmaya rastlanılmamıştır.

2.5. Biyolojik Delillerin Toplanması

Teknik olanaklar, ekipman, bilgi birikimi ve deneyim ne kadar gelişmiş olursa olsun esas belirleyici faktör delilin durumudur. Bu nedenle biyolojik delillerle yapılan çalışmalarda, delilin belirlenmesiyle başlayan tüm aşamalar titizlikle ve dikkatle uygulanmalıdır (Fisher and Block 1998).

Delil toplamanın önemini gösteren bir örnek, Amerika Birleşik Devletleri'nde yüzyılın davası olarak isimlendirilen profesyonel futbol oyuncusu Orenthal James Simpson davasıdır. Eşini ve eşinin erkek arkadaşını öldürmekle suçlanan Simpson'ın avukatları, polisin delil toplamadaki hataları üzerinde durmuşlardır. Gerçekten olayın araştırılması sırasında özellikle kan ve parmak izi gibi delillerin toplanması ve saklanmasında gereken duyarlılık ve beceri gösterilmediğinden deliller değer kaybetmişlerdir ve olay açıklığa kavuşturulamamıştır (İnt.Kyn.3)

Kriminal bir araştırmanın başarıyla sonuçlanmasında biyolojik delilleri inceleme aşamaları büyük öneme sahiptir. Adli serolojinin klasik uygulama alanı olan babalık reddi ve kan grubu, alt grup ve faktörlerinin saptanmasının yanısıra, çeşitli suç olaylarının aydınlatılmasında vücut sıvılarının ve eser miktarda da olsa bunların lekelerinin yüksek güvenilirlik oranına sahip kanıtlar olarak kullanılabilirliğiyle, bireysel tanımlama (identifikasyon) ve ayırım (diferansiasyon) yapmak mümkündür (Albek 1999).

Bu kanıtların standartlara uygun bir şekilde toplanmalarını, saklanmalarını, incelenecekleri laboratuvarların teknik kapasiteleri ve uzmanların bilgi düzeyleri belirler. Eğer araştırmacı biyolojik kanıtları doğru yerde aramaz, onları ayırt edemez veya laboratuvarında yapılacak araştırmalara uygun şekilde almaz ve saklamaz ise laboratuvarın teknik kapasitesi ne kadar gelişmiş olursa olsun doğru sonuca ulaşmak mümkün değildir. Aynı şekilde, tüm bu aşamalar doğru yapıldığında, laboratuvardaki uzmanın bilgi düzeyinin yetersizliği, acemiliği veya dikkatsiz çalışması, sonucu etkileyecektir. Bu nedenlerle başarılı bir kriminal araştırma biyolojik delilleri toplama ve korumada standardize edilmiş yöntemlerin uygulanması çok gereklidir (Presley 1997).

Biyolojik delil sıvı halde ise mümkün olduğunca çabuk steril olan plastik veya cam bir taşıyıcıya alınmalıdır. Bu işlemler sırasında delili toplayanın hem kendi sağlığı için, hem de delili kontamine etmemek için eldiven kullanması gereklidir. Lekeler dikkatle dökümanlanıp fotoğraflanmalıdır. Lekenin kuru veya sıvı halde olmasına, üzerinde bulunduğu materyalin özelliğine ve büyüklüğüne uygun malzeme ve yöntemler kullanılarak deliller toplanır. Tükürük genellikle ısıruk izleri ile birlikte bulunur. Tükürük bulunan bu bölgelerin fotoğrafı çekildikten sonra nemlendirilmiş bir svap veya gazlı bez ile örnek toplanmalıdır. Gazlı bez boyutlarını mümkün olduğu kadar küçük ölçüde tutmak gerekir. Kumaş üzerinde bulunan leke kesilerek alınabileceği gibi bazen giysiler yeniden örnek oluşturmak amacıyla kullanılabilirdiğinden tümüyle alınabilir. Islak tükürük veya diğer vücut sıvılarını içeren giysilerin dışına ve içine kağıt katmanları konulmalı, kuru yerinden tutulup kağıt taşıyıcıya yerleştirildikten sonra ikinci bir kağıt taşıyıcıya konulmalıdır. Sigara izmariti, yiyecek artıkları, peçete, kürdan gibi tükürük örneği taşıyabilecek materyaller el değmeden, pensle alınmalı ve her örnek ayrı taşıyıcıya konulmalıdır. (Grunbaum 1989)

Dökümantasyon, kriminal ve toplumsal araştırmalarda hem hukuki hem de bilimsel yönden önemlidir. Her materyalin orijinal konumu ve diğer bağlantılı bilgiler not edilmelidir çünkü dökümantasyondan sonuca götürücü bilgiler elde edilir. Taşıyıcılar kapatılıp mühürlendikten sonra buzdolabında saklanıp, mümkün olduğunca çabuk laboratuvara ulaştırılmalıdır (Güney 1998, Wright 1998).

2.6. DNA ve Polimorfizm

Adli Tıp alanında DNA analizi ile kimlik tespiti, son yıllarda tüm dünyada buna paralel olarak ülkemizde de gündeme gelmiş bulunmaktadır. Bu gelişmeye moleküler genetik veya bir başka deyişle rekombinant DNA teknolojisinde kaydedilen ilerlemeler neden olmuştur. Rekombinant DNA teknolojisinin bu gelişimi, tek yumurta ikizleri hariç her bir kişi için özgün olan profilleri adli makamlar ve bilim adamlarının işbirliği ile cezai ve hukuki davaların çözümünde kesin delil sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Bu davaların kapsamına çeşitli cinayet ve tecavüz olaylarının çözümü, babalık tayini ve diğer soy tayinleri girmektedir (Dinger 1996, Özçelik 1996, Tobe and Linacre 2007).

İnsan genomu yaklaşık 3×10^9 baz çiftinden oluşmaktadır ve genetik bilgiyi taşıyan yaklaşık 30,000 gen 46 kromozom içerisinde bulunmaktadır. İnsan DNA'sının yaklaşık %99,8'i iki insan arasında aynıdır ve insanlardaki genetik çeşitlilik DNA zincirindeki küçük farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bazı DNA sekanslarındaki farklar insan genetik yapısını etkilememekte bazıları ise direkt farklılıklara neden olmaktadır. Bunlar anatomik, fizyolojik, tedaviye cevap, ilaçlara karşı yan etki, enfeksiyonlara yatkınlık, kansere yatkınlık ve kişilik özellikleri gibi genetik farklılıklardır. Bir genin özgün bir kromozom bölgesinde (lokus) bulunan DNA dizisinin birkaç alternatif formundan her birine "**allel**" denir. İnsanlar her otozomal lokusunda biri anneden diğeri babadan gelen iki allel bulundurur. Farklı genom lokuslarındaki allellerde çok çeşitli mutasyonlar bulunmaktadır. Bu mutasyonlar toplumda çeşitli varyasyonlar meydana getirir. Bir lokusta birden fazla allelin bulunması şeklindeki DNA nükleotid değişimlerine polimorfizm adı verilir. Allellerin genel popülasyondaki kromozomların %1'inden fazlasında bulunması "**genetik polimorfizmi**" oluşturur. Allelik sıklık %1'den küçük ise bunlara "nadir varyantlar" denir. Genlerin regülatör (düzenleyici) bölgelerinde bulunan polimorfik alleller genlerin transkripsiyonel regülasyonunu etkileyerek fenotipik değişikliklere neden olabilirler.

2.6.1. Dizi (Sekans) Polimorfizmi

İlk bulunan polimorfizmlerdir. DNA molekülünü oluşturan baz dizisindeki insersiyon, delesyon veya yer değişikliği (substisyon) sonucu oluşurlar. HLA geninin aşırı değişken bölgeleri ve mitokondrial DNA'nın D-loop bölgesi sekans polimorfizmi gösteren ve adli amaçlı kimliklendirmede sıklıkla kullanılan bölgelerdir. (Lee et al. 1994, Balazs 1990)

İnsan genomunda tekrarlanmayan "unique" nükleotid dizilerinin yanı sıra birkaç defadan binlerce ye kadar değişen sayıda tekrar edilen nükleotid dizileri de bulunur. Bu dizilerin kopya sayılarındaki çeşitlilik, DNA'daki nükleotid değişimleri Polimorfizm olarak isimlendirilir. DNA Polimorfizmleri Mendel kurallarına göre aktarıldıkları için genetik işaret olarak kullanılırlar. Birinci sıklıkla genlerin protein kodlamayan bölgelerinde, ikinci olarak protein kodlayan bölgelerde veya gen dışında bulunurlar.

Mutant gen içinde veya yakınında oluşan DNA dizi polimorfizmi mutant genin oğul döllere geçişini göstermek için kullanılır (Chantal and Fourtney 1992, Dinger 1996, Lee et al. 1998, Özçelik 1996).

İnsanda 6. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan HLA-DQA1 lokusu son yıllara kadar gerek nesep davalarında gerekse adli amaçlı kimliklendirmede sıklıkla kullanılmıştır. Mt DNA dizilemesi sureti ile kimliklendirmede ise özel koşulların varlığında kullanılan ve DNA dizi polimorfizmine dayalı bir diğer yöntemdir. Özellikle maternal kalıtımın gösterilmesi gereken durumlar ile çekirdek DNA'sının degrade olduğu durumlarda yararlı olmaktadır. Son yıllarda adli bilimler alanında kullanım alanı bulan bir diğer sekans(dizi) polimorfizmine dayalı analiz yöntemiye SNP (Single Nucleotid Polymorphism) analizi olarak adlandırılan tek nükleotid polimorfizmleridir.

2.6.2. Uzunluk Polimorfizmi

İnsan genomunda belirli baz dizilerinden oluşan çekirdek ünitenin birbiri ardı sıra değişik sayıda tekrarından oluşan DNA fragmanları bulunmaktadır. Ardışık olarak tekrar eden bu dizilerin tekrar sayıları toplumu oluşturan bireyler arasında farklılıklar gösterdiği için bu polimorfizmlerden adli amaçlı kimliklendirmede yararlanılmaktadır. Bireyler arasındaki tekrar sayısı değişikliği bu spesifik fragmanın uzunluğunun değişik olmasına yol açmaktadır. Uzunluk farkı gösteren bu DNA bölgeleri VNTR'lar (Variable Number of Tandem Repeats-Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Polimorfizmi) olarak adlandırılmaktadır. VNTR'lar nükleotid veya nükleotidlerin delesyon, insersiyon ve/veya eşit olmayan krosing-over'i sonucu oluşabilmektedir. Mendel yasalarına göre kalıtılırlar. Yüksek ayırt etme gücüne sahiptirler. VNTR'lar tekrar dizilerinin içerdikleri baz sayısına göre ikiye ayrılırlar. Tekrar dizisi altı baz çiftinden fazla ise Uzun Ardışık Tekrarlar (Long Tandem Repeats; LTRs) ya da minisatellit, iki ile altı baz çifti arasında ise Kısa Ardışık Tekrarlar (Short Tandem Repeat-STRs) ya da mikrosatellit olarak adlandırılırlar (Serin 2002, Chung at al. 2008).

DNA polimorfizmlerinin büyük bir kısmını nötral tek baz çifti değişimleri oluşturur. Bunlar restriksiyon enziminin tanıma bölgesini ortadan kaldıran veya yeni bir tanıma bölgesi oluşturan değişimlerdir. Enzimin iki tanıma bölgesi arasındaki delesyon veya

insersiyon, enzim kesimi esnasında fragmentlerin boyutlarında farklılıklar meydana getirir, oluşan bu farklar restriksiyon fragmentlerinin uzunluk polimorfizmleri olarak tanımlanır (Huang 1995, Jeffreys 1985, Özçelik 1996, Dinger 1996).

Son yıllara kadar hasta lokuslarının, haritalanmasında insan linkage (bileşiklik) haritalarının oluşturulmasında, hastalıkların tanısında, anormal mayozların ve mitozların gösterilmesinde genetik işaret olarak RFLP'lerden yararlanılmaktaydı (Dinger 1996, Özçelik 1996, Dilmec 2008).

Bugün insanda yapılan genetik analizler multiallelik olan ve allellerin heterozigot olma yüzdesi yüksek olan DNA polimorfizmleri ile yapılmaktadır. Bunlar ardarda tekrarlayan DNA dizileridir. Tekrarlanan dizilerin oluşturduğu DNA işaretleri çok sayıda allel içerirler. Bu tip işaretler için bireyin heterozigot olma olasılığı çok yüksektir (Dinger 1996, Erdağ 1994, Özçelik 1996).

Tekrarlanan DNA dizileri minisatellit tekrarlar ve mikrosatellit tekrarlar olarak ikiye ayrılırlar. Minisatellit tekrarlar 10-15 baz çifti uzunluğunda bir kor dizisi içeren 30-35 baz çifti uzunluğunda bir DNA dizisidir. Tekrar sayısının farklılığına göre boyutları 200 baz çiftinden 1000-2000 baz çiftine kadar değişim gösterir. Oluşan VNTR polimorfizmi tekrarlanan dizilerin sayısına bağlıdır (Dinger 1996, Erdağ 1994, Özçelik 1996).

Mikrosatellitler ise iki, üç, dört veya beş nükleotitten oluşan kısa DNA dizilerinin değişken sayıda ardarda tekrarlanması ile oluşurlar. Bunlar kısa tekrar gösteren DNA dizileri (STR) olarak isimlendirilir. STR'lar VNTR'lara göre daha küçük DNA dizileri olduklarından daha kolay bir metodoloji ile analiz edilirler. Ortalama insan genomunun her 30.000 baz çiftinde bir bulunurlar. Tekrarlanan dizinin kopya sayısı her iki homolog kromozomda farklılık gösterir. Bu ise tekrarlanan kopya sayısı farklılığına bağlı olarak, heterozigot yüzdesini artırır (Dinger 1996, Erdağ 1994, Jeffreys 1985, Özçelik 1996).

Dinükleotid tekrarlar, insandaki genetik çeşitliliğin en önemli kaynağını oluştururlar. Genomda çok yaygın oldukları için yaklaşık her gen içinde veya yakınında bir çok dinükleotid marker içerir. STR marker ailelerinin çeşitliliği mutant genin tanımlanmasına ve ailelerdeki geçişine olanak verir (Dinger 1996, Edwards et al. 1991, Graul 1989).

Çok kısa dizi tekrarları dahil olmak üzere aşırı değişken lokusların PCR ile çoğaltımı DNA tiplleme sistemlerinin hassasiyetini büyük ölçüde belirlenmesi yeteneğini arttırmıştır. Bunlar normalde farklı sayıda allelleri gösterir. Parçanın uzunluğundaki polimorfizmin diğer tiplerinin (RFLP) aksine parçaların düşük molekül ağırlıklı DNA'dan çoğu kez başarılı bir şekilde amplifiye edilebilirler. Çünkü tekrar dizileri daha kısadır ve sayıca az sıklıktadır. Bu özellikler STR lokuslarının adli analizlerde kullanımı açısından ideal örnekler oldukları anlaşılmaktadır (Dinger 1996, Erdağ 1994, Özçelik 1996, Yüreğir 1994).

2.7. DNA Analizinde Kullanılan Yöntemler

2.7.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism)

Tek nukleotid değişimi ile ortaya çıkan polimorfizmlerin incelenmesi uzun süre genellikle RFLP denilen ve uzunluk farklılığına dayanan teknik vasıtası ile yapılmıştır. Yöntem çift zincirli DNA'nın restriksiyon enzimleri vasıtası ile bu enzimlere spesifik olan bölgelerden kesilmesi esasına dayanır.

Restriksiyon enzimleri bakterilerde doğal olarak bulunan enzimlerdir. Her enzim DNA'da kendine özgü farklı bir bölgeyi tanır ve DNA bu kesim noktalarından kesilir. Bu nedenle restriksiyon enzimlerine "moleküler makas" ismi verilmektedir. Hae III, Hinf I, Pst I, EcoRI adli amaçlı RFLP analizinde sık kullanılmış olan restriksiyon enzimlerinden dir. Kesim işlemi sonucunda uzun DNA molekülü restriksiyon fragmanları olarak adlandırılan çok sayıda, nispeten küçük DNA parçacıklarına ayrılır. Bu parçacıkların uzunluğu birkaç yüz ile birkaç bin baz çifti uzunlukta olabilir. Ekstrakte edilen DNA'nın tek bir enzimle dahi sindirilmesinden sonra farklı dizi ve uzunlukta yüz binlerce kesilmiş DNA fragmanı oluşur.

Bu fragmanların görünür hale getirilmesinde kullanılan teknik 1975 yılında Edwin Southern tarafından geliştirilen ve adına izafeten "Southern Blot" olarak anılan yöntemdir (Southern 1975). Yöntemin esası restriksiyon enzimi ile kesilerek bir çok fragmana ayrılan DNA'nın bu fragmanlarının agaroz veya akrilamid jel elektroforezi ile elektroforetik olarak

ayrılmasını takiben fragmanların denature edilmesi ve naylon membrana transferi sonrasında spesifik prob lar ile hibridizasyonuna dayanır. Problar komplementer DNA dizisine spesifik olarak hazırlanmış, tek zincirli, radyoaktif izotoplarla işaretlenmiş, kısa DNA parçacıklarıdır. Hibridizasyon uygun hibridizasyon solusyonları içeren banyolarda gerçekleştirildikten sonra nonspesifik bağlanmalar yıkanarak uzaklaştırılır ve oluşan bandlar X-ray'de otoradyografik olarak gösterilir. Yöntem adli amaçlı kimliklendirmede bir çok single-lokus prob kullanımı ile uygulanabildiği gibi Jeffrey ve arkadaşları tarafından geliştirilen multi-lokus problar ile de yapılabilmektedir. Tek lokus için oluşturulan RFLP polimorfizmi single-lokus RFLP adını alırken, çeşitli kromozomlarda bulunan benzer tekrar dizilerin bulunduğu çok sayıda lokustaki alelik varyasyonların bir arada tanımlanmasına multi-lokus RFLP adı verilmektedir. Bu şekilde elde edilen otoradyogramlar parmak izi gibi bireye özgü olduğundan DNA parmak izi olarak adlandırılmakta ve görünümleri marketlerdeki barkodları andırdığı için sistemin sonuçlarını değerlendirmek oldukça güç olmaktadır (Jeffreys et al 1985, Dilmec 2008).

Multi lokus RFLP yönteminin ayırt etme gücü çok yüksek olmakla birlikte sadece degrade olmamış DNA varlığında başarılı sonuçlar alınabilmesi ve yaklaşık 500 ng yüksek moleküler ağırlıklı DNA'ya ihtiyaç duyması yöntemin kullanımını sınırlamaktadır. Oysa single-lokus RFLP için 20-100 ng genomik DNA yeterli olmaktadır. Multi-lokus probların bir diğer zayıf yönü bir biri ile ilişkisiz türler arasında çapraz reaksiyonlar görülebilmesidir (Kanter et al 1986, Nakona et al. 2008).

Yöntem son derece güvenilir olmasına rağmen uzun sürmesi, zahmetli olması, radyoaktif madde ile temas gerektirmesi ve fazla miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulması gibi sınırlayıcı yönleri vardır. Sayılan bu nedenlerden dolayı bunun için yerini PCR tekniğine dayalı STR analizlerine bırakmıştır.

2.7.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Rekombinant DNA teknolojisi 1970'lerin başında geliştirilmiş ve takip eden yıllarda genetikçilerin ve moleküler biyologların araştırmalarında devrim yaratarak, biyoteknoloji endüstrisinde patlamaya neden olmuştur. 1986 yılında ise Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain Reaction; PCR) adı verilen diğer bir teknik geliştirilmiş ve biyolojik araştırmalarda hızlı bir şekilde yerini almıştır. PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır ve bu yöntemin uygulanabilmesi için, yok denecek kadar az miktardaki DNA bile yeterlidir (Öner 2002). Bu teknik Cetus firmasının insan genetiği departmanında çalışan araştırmacı Kary Mullis tarafından 1985'te bulunmuş ve patenti alınmıştır. PCR; ilk defa, aynı yıl R. Saiki, K. Mullis ve arkadaşları tarafından orak hücre anemisinin tanısının konulmasında uygulamaya sokulmuştur. Bu çalışma 1993 yılında Kary Mullis'e Nobel ödölünü kazandırmıştır (İnt.Kyn1).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), dizisi bilinen bir DNA bölgesinin in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan ve DNA molekülünün milyonlarca, hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan bir tekniktir. Bu teknikte tek bir gen bölgesi çoğaltılabileceği gibi, genin sadece bir parçası da çoğaltılabilir. PCR ile genellikle 10 kilobaz (kb) uzunluğa kadar DNA bölgeleri çoğaltılabilmektedir, ancak bazı metodlarla bu uzunluk 40 kb'a kadar ulaşabilmektedir. Yöntemin esası çoğaltılması istenen hedef DNA bölgesinin hemen yakınındaki dizilere komplementer olarak sentez edilen oligonükleotidlerin denatüre edilen DNA zincirlerinin farklı uçlarına bağlanması ve bu bağlanma noktalarından itibaren DNA polimeraz enzimi yardımı ile DNA'nın 3' ucu yönünde komplementerinin sentez edilmesine dayanır. Bu yöntem ile başlangıçta var olan DNA'daki hedef bölgelerin milyonlarca kopyasının elde edilmesi işleme amplifikasyon adı verilir (Erlich 1989, Wiegand and Kleiber 2001, Niederstatter at al 2007, Weibin at al. 2009).

PCR işlemleri üç basamakta gerçekleşir:

1. DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması (Denatürasyon)

Başlangıçtaki inceleme konusu DNA çift zincirli olup bunun tek zincirli hale getirilmesine, yani iki zincirin arasındaki hidrojen bağlarının kopararak birbirinden ayrılması işlemine denatürasyon adı verilir. Denatürasyon biyoloji, biyokimya, tıbbi genetiğin bir çok alanında DNA'yı formamid gibi kimyasallarla muamele ederek, ısıya maruz tutarak oluşturulabilir. Ancak PCR'da bu işlem DNA'nın yüksek ısıda belirli bir süre tutulması ile elde edilir. Bu ısı ve süre genellikle 90-95 C° de beş dakikadır.

2. Primerlerin bağlanması (Annealing)

Tek zincir haline gelen her bir DNA'nın çoğaltılması istenen bölümüne bitişik nükleotidlere komplementer olan bir oligonükleotid grubu (primer olarak adlandırılır) yaklaşık 90-95 C° derecelik ısının düşürülmesi ile komplementeri olan dizileri tanır ve onlara bağlanır. Bu işlem için uygun sıcaklık 50-70 C° arasında değişmektedir. Annealing ısı primerin nükleotid içeriğine göre değişir. Optimal "annealing" sıcaklığı T_m (melting temperature) derecesinden 5°C daha düşüktür. 0.5-2 dakika "annealing" için yeterlidir. Eğer spesifik olmayan PCR ürünleri elde ediliyorsa her defasında "annealing" derecesi 1-2 °C artırılarak optimize edilebilir. Primerin yapısındaki Guanin Sitozin sayısı arttıkça annealing için uygun olan ısı da yükselir. Çok sayıda primerin optimize edildiği multipleks PCR'larda primerlerin bağlanma ısısının birbirine yakın olması PCR verimliliği açısından çok önemlidir. Primerlerin içerdiği nükleotid sayısı 18-30 arasında değişmekle birlikte sıklıkla 20 civarındadır.

3. Zincir uzaması (Ekstansiyon)

Ortama eklenmiş olan DNA polimeraz enziminin, primerlerden itibaren hedef diziyeye komplementer nükleotidleri eklemesi ile zincirin uzamasıdır. Bunun için DNA polimeraz enziminin optimum aktivite gösterebileceği bir ısıya (68-72 C°) ihtiyaç vardır. Bu şekilde hedef DNA bölgesi replike olmuş olur. Yeni sentezlenmiş bu komplementer dizi daha sonra tekrar denatüre edilir ve bir sonraki döngü için hedef diziyi oluşturur.

Döngü sayısı: Kalıp DNA miktarı 10 kopyadan az ise 40 döngü uygulanabilir. DNA miktarının yüksek olduğu durumlarda 25-35 döngü uygulanır. Amplifikasyon hiçbir

zaman % 100 başarı ile gerçekleşmez. Genellikle 30 döngü sonrasında hedef dizinin 106 - 107 adet kopyası elde edilmiş olur. Primerlerde fiziksel olarak amplifikasyon ürünleri ile birleşir.

Bu yöntemin avantajları eser miktardaki biyolojik örneklerden dahi DNA tiplemesine olanak vermesidir. Yöntemin hızlı ve kolay olması ise bir diğer avantajıdır (Turrina at al. 2007, Wiegand and Kleiber 2001, Ross 1990).

Temel Bileşenleri

- 1- Çoğaltılacak DNA bölgesini içeren DNA kalıbı,
- 2- Çoğaltılacak bölgenin başını ve sonunu belirleyen iki primer,
- 3- Çoğaltılacak bölgeyi kopyalayacak olan DNA polimeraz enzimi,
- 4- Yeni zincirin yapımında kullanılacak olan nükleotid trifosfatlar,
- 5- DNA polimeraz enzimi için gerekli olan kimyasal ortamı sağlayan tampon sistemi.

Değişkenler

Mg⁺⁺: Mg iyonu, primer ile DNA arasındaki bağlanmayı ve DNA polimerazın kalıp-primer kompleksi ile birleşerek oluşturduğu replikasyon kompleksini stabilize eder. Önerilen konsantrasyon aralığı 1-4 mM'dır.

Kalıp DNA miktarı: PCR oldukça etkili bir teknik olduğu için çok küçük DNA miktarları yeterlidir. Genellikle 50 µl reaksiyon karışımı için 0,1-1 µg genomik DNA kullanılır.

Enzim: Taq polimeraz enziminin hata yapma oranı oldukça yüksektir. Çünkü bu enzimin 3'-5' hata tamiri (proofreading) aktivitesi yoktur. Eğer yüksek oranda doğruluk gerekiyorsa "proofreading" aktivitesi olan enzimler tercih edilmelidir. Kullanılan enzim miktarının artırılması PCR etkinliğini artırır. 50 µl reaksiyon karışımı için 1-1.5 µl taq polimeraz kullanılır.

dNTP: Reaksiyon karışımında her bir dNTP'nin konsantrasyonu genelde 200 µM'dır. Reaksiyon karışımında her bir dNTP'den eşit miktarda bulunması oldukça önemlidir. Büyük PCR fragmanlarının amplifikasyonu için daha fazla dNTP kullanılması gerekir.

Primerler: Primerlerin konsantrasyonu 3 µM'a kadar artırılabilir. Ancak yüksek primer/kalıp oranı spesifik olmayan amplifikasyonlara ve primer dimerlerinin oluşumuna neden olur.

Kullanım Alanları

1. DNA'nın dizi analizi ve DNA haritalamasında,
2. İnsan genom projesindeki araştırmalarda,
3. Genetik hastalıkların teşhisinde,
4. DNA parmak izi analizinde,
5. Adli Tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde,
6. Allellik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde,
7. Tarımda (tohum saflığının belirlenmesi),
8. Sistematik ve biyoçeşitlilik çalışmalarında (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde),
9. Klonlama deneylerinde,
10. Mutagenez çalışmalarında,
11. Fosil DNA çalışmalarında,
12. Gen ifadelerinin karşılaştırılmasında kullanılmaktadır.

2.7.3. VNTR (Variable Number Tandem Repeat Polymorphism)

VNTR insan genomundaki farklı sayıda birbiri ardına tekrarlayan bölgelere verilen addır. Bunların daha kısa tekrar gruplarından oluşan alt gruplarına ise STR adı verilmektedir. Genellikle 2-6 bc (baz çifti) uzunluktaki çekirdek ünitenin 10-50 kez ardı ardına tekrarından oluşan ve sıklıkla toplam olarak 100-400 baz çifti uzunluğundaki DNA tekrar üniteleridir. ilk kez 1991 yılında Edwards ve arkadaşları tarafından tanımlandıktan kısa süre sonra geniş kullanım alanı bulmuş ve birbiri ardına çok sayıda yeni STR lokusu tanımlanmıştır (Edwards et al. 1991).

Bu tekrar dizilerine genom boyunca ortalama her 6-10 kb (kilobaz) da bir rastlanır. Genom boyunca yaklaşık 500.000 STR lokusunun olduğu tahmin edilmektedir. Genomda iki nükleotid tekrarlarına daha sık rastlanmaktadır. Ancak iki nükleotid tekrarlarındaki iki bazlık bir farkın ayırımı güç olduğundan adli amaçlı olarak genellikle tetranükleotid tekrarlar kullanılmaktadır. VNTR ana sınıflamasında yer alan ve daha uzun tekrar

ünitelerinin (7-16 bc) daha fazla tekrarından oluşan minisatellit tekrar unitelerinin (LTRs-Long Tandem Repeats) PCR tekniği kullanılarak çoğaltılması sureti ile çalışılan polimorfizme Amplifiye Parça Uzunluk Polimorfizmi adı verilmektedir (Murphy 2007).

STR'lar VNTR'lar arasında yer alan kısa tekrar unitelerinin nispeten az sayıdaki tekrarından oluştuğu için alelik varyasyonları minisatellitlere nazaran az olup dolayısı ile ayırım güçleri daha düşüktür. Ancak bu eksiklikleri çok sayıda lokus bir arada amplifiye edilerek fazlası ile giderilir. Günümüzde daha kısa DNA fragmanları içermesi nedeni ile kısmen degrade örneklerde dahi sonuç alınabilmesi, çalışma kolaylığı ve bir çok lokusun bir arada amplifiye edilebilmesi nedeni ile yüksek ayırım gücü göstermesi gibi üstün özellikleri sayesinde STR'lar adli amaçlı kimliklendirme ve nesep davalarında tercih edilen hakim yöntem olmuştur (Aşıcıoğlu 2006).

2.7.4. ASO Hibridizasyon (Allel Specific Oligonucleotid-Reverse Dot-Blot Analizi)

PCR'nin adli amaçlı kullanımı ilk olarak alele özgü oligonukleotidler kullanılarak olmuştur. RFLP'nin tersine uzunluk polimorfizminin değil dizi polimorfizminin gösterilmesi esasına dayanır. Ayırım gücü RFLP'ye nazaran düşüktür. Bu amaçla yıllarca 7 alel içeren HLA, DQAI, takibinde LDLR (Low Density Lipoprotein Receptor), GYPA (Glycophorin A), HBG (Haemoglobin Gamma Globin), D7S8 ve GC (Group Specific Component) lokuslarını içeren PM (Polymarker) kitleri kullanılmıştır. LDLR, GYPA ve D7S8 iki alel, HBG ve GC lokusları ise üç alele sahiptir ve her iki sistemde reverse dot blot yöntemiyle çalışılmaktaydı.

Yöntemin aşamaları aşağıda kısaca özetlenmiştir:

■ **Amplifikasyon:** HLA, DQAI ve PM lokusları tek PCR reaksiyonu ile bir kerede amplifiye edilir. Amplifikasyon amacı ile kullanılan primerler Biotin ile işaretlenmiştir. Bu aşamaya kadar ki sure STR'lar ile aynıdır.

■ **Hibridizasyon:** Uygun ısı ve tuz solusyonları bulunan ortamda amplifiye edilmiş PCR ürünleri, "prob"ların emdirilmiş olduğu test çubukları (strip) üzerine gönderilerek hibridizasyon gerçekleştirilir. Test çubukları çalışılacak lokusların sahip olduğu tüm olası

alellere komplementer dizilerin sentez edilmesinden oluşan "prob"ların emdirilmesi esasına dayanmaktadır. Enzim konjugat olarak streptoavidin horseradish peroxidase kullanılarak işaretleme işlemi gerçekleştirilir.

■ **Renklendirme:** Renk gelişimi her bir örnek için sitrat tamponu, hidrojen peroksit ve kromojen reaktifleri kullanılarak karanlık ortamda gerçekleştirilir (Budowle et al. 1995, Helmuth et al. 1990).

2.7.5. STR (Short Tandem Repeat Polimorphism-Kısa Ardışık Tekrar Polimorfizmi)

STR lokusları düşük, orta ve yüksek düzeyde mutasyona uğrayabilmektedir. Ancak bir STR lokusunun Adli Tıp'ta kullanılabilir olması için bazı kriterlere sahip olması gerekir.

- 1.Lokusun ayırım gücünün %90'nın üzerinde olması,
- 2.Gözlenen heterozigote oranının %70'in üzerinde olması,
- 3.En kısa ve en uzun alelinin 90-500 bp arasında yer alması,
- 4.Amplifikasyon hassasiyetinin yüksek olması,
- 5.Düşük mutasyon oranına sahip olması,
- 6.Uygun olmayan biyolojik örnek (delil) varlığında dahi sonuç alınabilmesi gereklidir (Sparkes et al. 1996).

STR'lar nokta mutasyonları gösterebildikleri gibi sıklıkla tekrar artışı ya da azalması şeklinde mutasyon gösterebilirler. Nokta mutasyonları insersiyon ve delesyonlar şeklindedir. Mikrosatellitlerde lokuslar arasında kısmi farklılıklar olmakla birlikte mutasyon oranının her jenerasyonda 10^{-3} ile 10^{-4} arasında değişmekte olduğu bildirilmektedir (Jin et al. 1996, Brinkmann et al. 1998). Lokuslar arasında şimdiye kadar bildirilen en yüksek mutasyon oranı ACTBP2 (SE33) lokusundadır (Moller et al. 1994). Mikrosatellitlerde mutasyon tekrar dizisini içeren bölgenin replikasyon sırasında ayrıldıktan sonra shift (kayma) sonucu yanlış birleşmesi ile ortaya çıkar. Bu yanlış birleşme bir tekrar artışına ya da bir tekrar azalışına yol açan delesyon veya insersiyona sebep olur

(Di Rienzo et al. 1994). Araştırmacılar mutasyon oranının lokusun tekrar sayısı ve dolayısı ile uzunluğu arttıka fazlalaştığı konusunda hem fikirdirler (Farrall and Weeks 1998). Bu durum replikasyon sırasındaki kaymanın tekrar sayısı fazla olan uzun lokuslarda meydana gelme olasılığının artması ile açıklanmaktadır (Aşıcıoğlu 2004).

Mutasyon oranı türler arasında farklılık gösterdiği gibi aynı tür içinde lokuslar arasında da farklılık göstermektedir (Rubinsztein 1995, Henke 1999). Erkekler de mutasyon sıklığı kadınlardan fazladır (Rolf et al 2002).

STR'ların adli amaçlı kullanım alanları:

- 1.Adli olaylarda failin tesbiti,
- 2.Nesep tayini ve her türlü akrabalık ilişkisinin ortaya çıkarılması,
- 3.Göçmen alımlarında,
- 4.Kitlesel felaketlerde ölenlerin kimliklendirilmesi amaı ile kullanılmaktadır

(Ross and Harding 1989, Hallenberg and Morling 2001, Holland et al. 2003,).

STR'lar insanlardaki bu kullanımının yanında veterinerlik alanında saf kan atların ya da ülkemizde zaman zaman rastlandığı gibi dava konusu olmuş kk ve büyük baş hayvanların nesep tayini amaı ile kullanılmaktadır. Hayvan DNA'sından STR analizinin yabancı ülkelerdeki kullanımı ise daha fazla kedi, köpek gibi evcil hayvanların biyolojik örnekleridir. Çünkü bu hayvanlar ev, iş yeri gibi ortamlarda beslenmesi nedeni ile bir çok kriminal olayda fail ile olayın ilişkilendirilmesinde delil değeri taşıyabilmektedirler. Bu amaçla cinayet, ırza geçme gibi olayların cereyan ettiği olay yerinde ve/veya failin giysi veya üzerinde saptanan mağdur/e'ye ait evcil hayvanların kılı bir çok olayın üzümünde yardımcı olmaktadır (Hudlow at al. 2008, Becker at al. 2007, Aşıcıoğlu 2006, Raymond at al. 2005, Padar at al. 2002,)

2.7.6. Y Kromozomu Polimorfizmi (Y-STR)(Kısa Ardışık Tekrar Dizinleri)

STR (mikrosatellit)'lar değişken sayıda tekrar eden ve minisatellit olarak adlandırılan VNTR'ların bir alt gurubudur. İnsan genomunda yaklaşık 500.000 STR lokusu olduğu tahmin edilmektedir. Bunun 6000-10,000'i trimerik ve tetramerik tekrarlardan oluşmaktadır. Her 15 kb'da bir bu tür tekrarlara rastlamak mümkündür. İnsan genomu üzerinde çok fazla sayıda tanımlanmış STR lokuslarına rağmen çok az sayıda Y kromozomuna özgü STR lokusları tanımlanabilmiştir. Y kromozomuna özgü şu ana kadar di-, tri-, tetra- ve penta nükleotid tekrarları tanımlanabilmiştir. Y STR' lar rutin adli çalışmalar ve popülasyon genetiği çalışmaları açısından oldukça bilgi vericidir (Pritchard at al. 1999,). Özellikle itham edilen babanın ölmüş olması durumunda olayın aydınlatılması için şüpheli kişinin erkek yakın akrabalarından elde edilebilecek DNA örneği ile babalık davası aydınlatılabilir (Gusmao at al. 1999, Dubut at al. 2009).

Ancak bu tür çalışmaların yapılması daha önceden tamamlanmış frekans hesaplarıyla mümkün olmaktadır. Frekansları hesaplanmış birkaç çalışmaya, Norveç (Dupuy at al. 2001), Güney Amerika (Tarazona at al. 2001), Almanya (Hidding at al. 2000), Japonya (Ago at al. 2000), Pakistan (Mohyuddin at al. 2001), Yerli Amerikan toplumu (Kızılderili) (Ruiz-Linares at al. 1999), Çin (Hou at al. 2001), İspanya (Martin at al. 2007) ve Baltık Ülkelerinin (Lessig at al. 2001), popülasyonları örnek olarak verilebilir.

Avrupa Adli Bilimler Laboratuvarlarında çalışılan STR sistemlerinin uygulanabilirliği ilk defa 1994 (Gill at al. 1994), Y STR sistemlerinin uygulanabilirliği ve standardizasyonu ile ilgili ise ilk çalışmalar EDNAP (European DNA Profiling Group, Avrupa DNA Tipleme Grubu) üyeleri tarafından 1998 yılında başlatılmıştır. Bu çalışmanın 4 amacı vardı;

- 1) Laboratuvarlar arasında Y STR sonuçlarının uyumlu olup olmadığınıın saptanması.
- 2) Adli laboratuvarlar arasında Y STR'lar kullanılarak minimum düzeyde kalite kontrolünün yapılması.
- 3) Avrupalı erkekler arasındaki tabakalaşmış popülasyonun büyüklüğünün

değerlendirilmesi.

4) Adli amaçlı kullanılacak Y STR haplotip frekanslarının güvenilir bir şekilde hesaplanması.

Bahse konu çalışmada 9 lokus (minimal lokus sayısı) için standardizasyon yapıldı. Daha sonraki çalışmalarda bu lokuslar üzerine yine aynı grup tarafından yeni lokuslar için eklemeler gerçekleştirildi. Özellikle adli tıpta çokça kullanılacak leke analizleri, kişi identifikasyonu ve akrabalık ilişkileri açısından geniş bir veri tabanı oluşturuldu. Elde edilen veriler sonucunda Y STR' ların Avrupa toplumu içinde ayırım gücünün %99'un üzerinde olduğu görüldü. Ayrıca elde bulunan bu DNA izolatları ile daha sonra tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP) çalışmak üzere saklandı (Roewer at al. 2000).

Şu anda adli amaçlı kullanılacak birçok multiplex Y STR kitleri ticari olarak üretilmektedir. Y STR ile ilgili EDNAP tarafından tamamlanan ve seneler içerisinde gerçekleştirilen tüm veri tabanları adli amaç dışında antropolojik, arkeolojik ve diğer bilimsel çalışmalar için kullanılmak üzere, internette online olarak kullanıma sunulmuştur (Roewer at al. 2001).

Çok tartışmalı bir konu olmasına rağmen Y kromozomu çalışmaları ile Amerika Birleşik Devletlerinin Başkanlarından biri olan Thomas Jefferson'un köle bir kadından olma çocuğu tespit edilmiş durumdadır. Bu çalışmada Y kromozomu ile ilişkili 19 işaret çalışılmıştır. Bunlar içerisinde bialelik işaretler (SNP), mikrosatellitler (STR), minisatellitler (MSY1) kullanılarak Thomas Jefferson ve onun oğlu olduğu iddia edilen kişi ile aynı haplotipler taşıdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde soyağacı çalışmalarına dayanılarak yapılan mtDNA çalışmalarında Fransa Kralı 16. Louis ve Marie-Antoinette arasındaki ilişkiden doğan erkek çocuğu ve Tsar (Çar) Nicholas II ve onun ailesinden geri kalanlar ile yapılan çalışmalarla babalık davaları çözüme kavuşturulmuştur (Murci L.Q. ve ark.2001).

Otozomal STR'lar ile Y STR' ların mutasyona uğrama hızları birbirinden farklıdır. Her ikisi arasındaki bu fark bir takım spesifik dizin parametrelerine bağlıdır. Bu parametrelerden biri, kendilerine ait genetik işaret lokusunun moleküler yapısına bağlı olarak değişmektedir. Sonuç itibariyle Y STR' lardaki ortalama mutasyon oranı her bin

yılda yaklaşık 3 defa meydana gelmekte ve bu özellik babadan erkek çocuğuna aktarılmaktadır. Yüksek mutasyon oranından dolayı mikrosatellitler (STR) popülasyona özgü çalışmalarda daha az kullanım alanı bulmaktadırlar. Yapılan mikrosatellit çalışmalarında erkek mutasyon oranı, kadın mutasyon oranına 17:3 gibi oldukça anlamlı bir fark görülmüştür. Y kromozomal mikrosatellitler ile otozomal mikrosatellitler arasındaki mutasyon oranı birbirlerinden farklı olmalarına rağmen özellik olarak birbirleri ile tutarlıdır. Bu durum, genel mikrosatellit mutasyon mekanizmalarının, rekombinasyondan bağımsız olduğuna işaret etmektedir. Daha önceden belirtildiği gibi mikrosatellitler yüksek bir mutasyon oranına sahiptir ve bu özelliği ile mikrosatellitler aynı zamanda, toplumda heterozigotların yoğun olmasından dolayı, soyağacı (pedigree) tabanlı bağlantı analizlerinin yapılması için ideal işaretlerdir. Buna karşılık bialelik SNP' ler yine daha önce belirtildiği gibi düşük mutasyon oranına sahiptirler ve bu grup işaretler (SNP) daha çok popülasyon bazlı haritaların oluşturulması açısından ideal yapılardır. Y STR'ların mutasyon oranları soyağacı (pedigree) çalışmalarının saptanabilmesi için yeterli hızdadır. Bu mutasyon oranlarını hesaplamanın değişik yöntemleri kullanılmaktadır (Krawczak at al. 2001).

Y kromozomal mikrosatellit mutasyon oranlarının bilinmesi, babalık davaları ve adli çalışmaların güvenli yapılması açısından bilinmesi gerekmektedir. Bu durum özellikle babalık davalarında, potansiyel yanlış dışlamamanın olabileceği durumların değerlendirilmesinde gereklidir. Y mikrosatellitleri tüm insan Y kromozomları için birleşik zamanın tahmininde kolaylık sağlamaktadır. Son zamanlardaki çalışmalar Y haplotipi tabanlı dizin verilerinin ortalama oluş zamanını tahmini üzerine yoğunlaşmıştır. Y ilişkili bir çok mikrosatellitin ileride bu tür hesaplar için çok daha fazla imkan sağlayacağı doğrultusundadır (Goldstein at al. 1995, Willuweit at al 2007)

2.7.7. X-STR Polimorfizmi

X kromozomu yaklaşık 6 pm uzunluğundadır ve 165 milyon baz çifti içermektedir. Şimdiye kadar X kromozoma bağlı ikiyüzden fazla bozukluk tarif edilmiştir. Kadınlar cinsiyet kromozomu olarak iki adet X kromozomuna sahip olup bu homolog çiftten bir tanesinin inaktive olarak Barr cisimciğine dönüştüğü kabul edilmektedir. X inaktivasyonu

dişi somatik hücrelerinde rastgele oluşsa da bu durumun bazı istisnaları vardır. Yapısal olarak anomalili olan X kromozomunun tercihen inaktive olması bu istisnalardan birisidir. Tercihli inaktivasyon X kromozomal monozomilerin ve trizomilerin her zaman ölümcül seyretmemesini açıklayan bir durumdur (Alberts at al. 2002, Lyon 1961, Margaret at al.1991).

Ebeveynlerin gonozomal kromozomlarındaki bir düzensizliğe sıklıkla infertilite eşlik eder. Buna rağmen bazen gonozomal karyotip bozukluğu çocuklarda ortaya çıkabilmektedir. Örneğin 45, X karyotipine sahip Turner sendromuna her 5000 canlı dişi doğumda bir rastlanmaktadır. Olguların bir kısmı mozaisizm göstermekle birlikte hastalığın oluşmasına neden olan temel kusur, kadındaki X kromozomlarından birinin monozomisi ya da parsiyel delesyonudur. Turner sendromunda gözlenen diğer karyotipler ise X kromozomun uzun veya kısa kolunun izokromozomu, uzun ya da kısa kolun delesyonu ve yüzük X kromozomu şeklindedir. Fenotipik olarak kadın olan diğer seks kromozom düzensizlikleri ise Trizomi X (47, XXX), Tetrazomi X (47, XXXX) ve Pentazomi X (47, XXXXX) Sendromlarıdır. Bir diğer dişi karyotip bozukluğu androjen duyarsızlığı ve buna bağlı testiküler feminizasyon olup 46, XY genotipine sahip, genetik olarak erkek olan bu bireyler dişi fenotipe sahiptirler.

Erkek fenotipi gösteren seks kromozom düzensizliklerinin başında ise Klinefelter Sendromu gelmektedir. Bu vakaların %80'i 47, XXY karyotipine sahip iken vakaların %20'sinde 49, XXX Y; 48, XXXY; 48, XXYY; 47, XYY; 46, XX gibi farklı karyotipler görülebilmektedir. Sözkonusu karyotiplerden özellikle 47, XYY Sendromu adli tıp açısından özellik arzeder. Bu bireyler anti sosyal davranışlar gösterdiklerinden bir çok kriminal olayın faili olabildikleri gibi fertilizasyon yeteneklerini kaybetmeyip sıklıkla kromozomal bakımdan normal çocuk sahibi olurlar. Paternite testlerini olumsuz etkileyen bu gibi durumlarda, tüm bu olasılıklar gözönüne alınarak baş edilebilmektedir. Paternite testi sırasında amaç dışı olarak herhangi bir gonozomal bozukluk saptandığında etkilenen tarafça açık bir şekilde talep edilmedikçe durum bildirilmemelidir (Margaret at al. 1991, Başaran 1996, Szibor 2007).

X kromozom üzerinde şimdye kadar 26 üç ve 90 dört tekrarlı polimorfizm tanımlanmıştır. Bunlardan 18 tetranükleotid, 3 trinükleotid tekrarı yanında DXS52 VNTR lokusunun adli genetik incelemelerde kullanımı ortaya konmuştur (Asamura at al. 2006).

Bu X-STR lokuslarından bazıları dizilenmiştir. Xp21 ve Xq28 arasında lokalize olan DXS9895, DXS8378, DXS7132, DXS6800, DXS7133, GATA172DO5, DXS7423 ve DXS8377 lokuslarının dizilemek sureti ile tekrar baz içerikleri ortaya konmuştur (Edelmann at al. 2002).

Adli amaçlı kullanımı olan lokuslardan DXS6801 lokusu 8-15 arasında sekiz tetranükleotid alel içermektedir. Bu lokus ile ilgili bir çalışmada alel frekansları açısından kadın erkek arasında fark tespit edilmemiş olup DXS6809 ve DXS6789 lokusları ile lokalizasyon olarak birbirine yakın oldukları ve aralarında bağlantı olduğu gösterilmiştir. Şimdye kadar adli amaçlar için çalışılmış diğer bazı X-STR lokusları aşağıdaki gibidir: HumARA, HPRTB, DXS6807, DXS9898, DXS6789, DXS101 ve DXS 10011 (Kishida at al. 1997).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada HumARA lokusunun bazı genetik hastalıklarla ilişkisi saptanmış ve bu lokusun adli amaçlı kullanılmaması şiddetle tavsiye edilmiştir (Szibor at al. 2005).

Şimdye kadar üç, dört, beş ve son olarak ta yedi (DXS6789, HUMARA, DXS 10011, DXS7423, HPRTB, DXS6807 ve DXS101) X STR lokusu bir arada amplifiye edilmiştir. 268 erkek ve 268 kadının baz alındığı bir çalışmada alel frekansları açısından cinsiyet farkı saptanmadığı gibi yedi lokusun tümünün bir arada amplifiye edildiği, 158 erkekte saptanan hiçbir haplotip, birbirinin aynı olmamıştır. Multipleks PCR çalışmalarında bazı güçlükler bildirilmiştir. Bunlar arasında HPRTB, DXS101, HumARA, DXS7423 ve DXS8377 lokuslarının çalışıldığı bir çalışmada DXS101'in primerinin donup çözülmeye çok hassas olduğu, stutter bantlarının sıklıkla oluştuğu, ancak bunların sadece HumARA ve DXS8377 lokuslarında gerçek bandın %20'sine yakın büyüklüğe ulaşabildiği, yine bu iki lokusun DNA miktarı 1 ng'ın altına indiğinde iyi amplifiye olmadığı bildirilmiştir (Amigo at al. 2002).

Baba adayının ölmesi, bulunamaması gibi nedenlerle otozomal DNA profilinin çalışılmadığı durumlarda baba adayının yakınları çalışılarak sonuca gitme imkanı olabilir. Bu durum çocuğun kız olması halinde geçerlidir. Söz konusu çocuğun iki X alelinden birisi annesinden gelirken diğeri babasından gelmek durumundadır. Bu durumda çocuğun biyolojik annesinde bulunmayan alellerin babadan geçmiş olduğu varsayılır. Baba adayının taşıyacağı X alellerinin kaynağı ise onun annesi olduğundan bu amaçla baba adayının annesi veya babaannenin X aktardığı her iki cinsten kardeşleri bu amaçla çalışılabilir. Biyolojik babaları aynı olan iki kız kardeşin aynı paternal X kromozoma sahip olmaları gerekir. Dolayısı ile iki kız kardeşin aynı babadan olup olmadıklarının inceleme konusu olduğu durumlarda X kromozomal STR'ların çalışılması radikal bir çözüm sunar (Aşıcıoğlu 2006, Zarrabeitia at al. 2008).

Yakın akraba iki erkeğin baba adayı olduğu durumlarda çocuğun kız olması koşulu ile X-STR analizi otozomal STR'lara göre daha yararlı olabilirler. Özellikle bu iki baba adayı erkeğin baba oğul olmaları halinde X-STR'lar son derece bilgi verici olurlar. Çünkü bu durumda her iki baba adayının taşıdığı X kromozomu farklı biyolojik kaynaktan gelmiştir. Aynı durum kuzenler içinde geçerlidir. X STR analizi babaanne kız torun arasındaki ilişkiyi ortaya koymada son derece yararlı olacaktır. Çünkü kız torunların taşıdığı baba kaynaklı X kromozom mutlaka babaannenin iki X kromozomundan birisi olacaktır (Wiegand at al. 2003).

Abortus materyalinden babalık tayini gerektiğinde eğer fetus dişi ise X-STR analizi büyük kolaylık sağlar. Çünkü kürtaj materyalinden fetal dokunun gözle ayırt edilmesi gebeliğin yaşı ile ters orantılı olarak hemen hemen imkansızdır. Bu nedenle rastgele yapılan örnekleme sonucunda yapılan DNA analizi sıklıkla sadece anneye ait alelleri içerirken şanslı olunan bazı vakalarda anne ile fetusun alellerinin miks olarak yer aldığı bir sonuçla karşılaşılır. Böyle bir miks örneğin otozomal STR çalışılmış olması halinde değerlendirme güçlüğü yaratacağı ve bu durumun yarattığı şüpheli durumdan sanığın yararlanacağı bu alanda çalışanlar tarafından bilinir. Oysa dişi bir fetusun X-STR analiz sonucunda her lokustaki annede bulunmayan alel babadan kalıtılmıştır (Szibor at al. 2003).

X-STR'ların babalık davalarında otozomal STR'lara nazaran üstünlüğü baba adayının daha kolaylıkla dışlanabilmesidir. Çünkü X-STR'ların dışlama olasılığı benzer PIC (Polimorphism Information Content) değerine sahip otozomal STR'lara göre daha yüksektir. Bunun nedeni baba adayının X STR açısından hemizigot olmasıdır (Edelmann at al. 2002).

DNA'nın fethi kabir materyalinden veya eski kemiklerden elde edildiği vakalarda genellikle kısa DNA fragmanına sahip STR'lar başarı ile amplifiye edilebilmektedir. Bu durumda yeterli istatistiksel değer elde edilebilmesi güçtür. Erkekler X-komozom açısından hemizigot olduğundan MEC (Mean Exclusion chance) değerleri otozomal STR'lardan daha yüksek olmaya eğilimlidir. Bu nedenle X-STR'lar kullanılarak istenilen istatistik değerleri elde etmek mümkündür (Turrina at al. 2004, Szibor 2007).

2.7.8. Mitokondriyal DNA ve Adli Bilimler

Maalesef, çeşitli nedenlerden ötürü, biyolojik deliller, PCR sonrası bile, yeterli miktarda kaliteli DNA elde edilmesine her zaman olanak vermemektedir. En olası neden DNA'nın çevre koşulları ve mikroorganizmalar nedeniyle degrade olmasıdır (Webb et al.1993). Belirli koşullar altında mtDNA adli DNA tiplendirmesi için faydalı bir lokus sağlamaktadır. Kod bilgisi içermeyen kontrol bölgelerinin çok değişken kısımları, yüksek oranda nükleotid polimorfizmleri veya dizi varyantları içermektedir (Tajima et al. 1984). Bu sayede bireyler ve biyolojik örnekler arasında dışlama (diskriminasyon) yapılabilmektedir. Nükleer DNA ile karşılaştırıldığında, mtDNA kopya sayısı hücre başına 100-1000 arasında değişmektedir. Bunun bir sonucu olarak, kas, kemik, saç, deri, kan ve diğer vücut sıvıları gibi farklı biyolojik örnekler, çevresel ya da zamana bağlı olarak degrade olmuş olsalar bile, mtDNA tiplendirmesi için yeterli genetik materyali sağlamaktadır (Wilson at al. 1995). Ayrıca, biyolojik örneklerle doğrudan karşılaştırmak için referans DNA'nın bulunmadığı durumlarda, mtDNA'nın maternal kalıtımının bir sonucu olarak, maternal ilişkisi olan herhangi bir birey referans örnek verebilir (Case at al. 1981).

Adli amaçlı lokus tiplendirmede, nDNA ile karşılaştırıldığında, mtDNA'nın avantaj ve dezavantajları söz konusudur. Daha önce bahsedildiği gibi, mtDNA'nın maternal kalıtımı nedeniyle, maternal olarak akrabalık ilişkisi olan bireylerin mtDNA'nın aynı

profilde olması beklenmektedir (Hutchison at al. 1974). Örneğin, referans elde edilebilmesi açısından kayıp bireylerin örneklerinin alınmadığı birçok olayda, mtDNA örneğini maternal akrabalığı olan herhangi bir kişi verebilir. nDNA'nın diploit kalıtımı ve rekombinasyonu nedeniyle, birinci derece akrabalarından kayıp kişilere ulaşılmasında kullanılmamaktadır. Sadece aynı maternal soydan gelen kişiler, aynı mtDNA profiline sahiptir. STR marker'ları gibi multilokuslu nükleer DNA tiplendirme profilleri, oldukça yüksek bir dışlama gücü sağlamaktadır ve oldukça güvenilirdir (Inman at al. 1997).

Dünyadaki hiçbir insanın STR marker'ı diğeri ile aynı değildir. Bu sebeple, mtDNA gibi bir adli marker, nükleer marker'ların dışlama gücünü asla sağlayamaz. Bu nedenle adli bilimciler, mtDNA analizlerinin sınırlı çalışma gücünü göz önünde bulundurup, nükleer tiplendirmenin mümkün olmadığı örneklerde bu analizi kullanma yoluna gitmelidirler. Temel olarak, mtDNA tiplendirme analizleri en çok: 1) saç gövdeleri, 2) kuvvetli asit, yüksek ısı veya yüksek neme maruz kalmış kemikler ve dişler. 3) svap materyali veya doku (deri, kas, organ) gibi nükleer marker'larla daha önce başarısız olarak tiplendirilmiş veya tiplendirilememiş olan örnekler ve 4) folikül, doku ya da kökü olmayan dökülmüş kıl örneklerine uygulanmaktadır. Örneğin, saç kökü mevcut ise, araştırmacı şaft denilen gövdeyi ayırmak, şaftta yer alan mtDNA'ları analiz etmeden önce, nükleer DNA marker'larını ayrıca çalışmak durumundadır. Negatif ve pozitif kontroller gibi uygun protokolleri takiben, yetkili bir laboratuvar tarafından saç kökü örneğinden DNA'nın (nükleer veya mitokondriyal) ekstraksiyonu, mtDNA tiplendirmesi için uygulanabilir. mtDNA tiplendirmesi, degrade olmuş DNA örneği gibi başarısız nükleer tiplendirmesi sonrasında da gerçekleştirilebilir. Esasen sadece 100 kopyadan daha az mtDNA molekülü içeren ve hemen hiç nükleer DNA içermeyen saç gövdeleri mtDNA analizi için uygundur (Bendall at al. 1997, Chen at al. 2007).

Benzer biçimde eski iskelet kalıntısı örnekleri de mtDNA analizi için uygundur. Kan lekelerinin mtDNA tiplendirmesi mümkün olsa dahi, kombinasyonlarında gözlenmesi olasıdır. Saç ve kemik örneklerinden farklı olarak kan lekelerinin, DNA ekstraksiyonu öncesi temizlenmesi güçtür. Bu tip analizleri gerçekleştiren laboratuvarların resmi olmayan istatistiki sonuçlarına göre, mtDNA analizleri, nDNA'dan daha hızlı gerçekleştirilmekte ve

zaman kaybını önlemektedir. Saç gibi bir takım örneklerle mtDNA analizinde, nDNA ile karşılaştırıldığında tüm örneğin kullanılması gerekliliği söz konusudur. Örneğin, tek bir mtDNA analizi için, 0.5-2 cm saç teli gereklidir (Wilson at al. 1995).

Dizi konfirmasyonunda (teyidinde) testin ikinci kez tekrarlanabilmesi için 4 cm uzunluğunda saç teli gereklidir. İki analizde de, iki saç teli tamamen kullanılacaktır. Ancak, nükleer tiplendirmede, saç, folikül veya kökün bağlı olduğu cilt dokusu olan diğer bir DNA kaynağı da kullanılacaktır (Monnat at al. 1986).

Bez ya da kumaş parçası, swab, leke, kemik ve diş gibi diğer tip örnekler, analizde kullanılırken bölündüğü ve geri kalan kısmı saklandığı için, tümüyle tüketilmemektedir. Sadece, yeterli DNA'nın elde edilmesi güç olduğunda, bu tür örneklerinde tamamen tüketilmesi söz konusu olabilir; bu nedenle, analiz öncesi. mikroskopi, fotoğraf çekilmesi dokümantasyon için kritik öneme sahiptir. mtDNA'nın adli amaçlı analizi, nükleer DNA tiplendirmesi yapılmadığında veya nükleer DNA tiplendirilmesi yapıp, başarısız olduğunda gerçekleştirilmelidir. Bu durumlarda, mtDNA analizi birey ve biyolojik örnek arasındaki ilişki ile ilgili olarak bilgi sağlayacaktır. mtDNA analizleri, sistematik ve göç yolları çalışmaları yanında adli amaçlı DNA analizlerinde de önemli bir yer bulmuştur (Holland and Parsons 1999, Tobe and Linacre 2008).

mtDNA'yı adli olayları aydınlatmada kullanmanın bir avantajı, hücre içinde çok sayıda kopyasının olmasıdır. Adli analizlerde kullanılan nükleer otozomal lokus sayısı hücre başına sadece iki kopya iken, mtDNA, bir memeli hücresinde yaklaşık 500-2.000 kopya halinde bulunmaktadır. Buradan, olay yerinde bulunan kanıt niteliğindeki biyolojik örnek degrade olmuş olsa bile, en azından amplifiye edilebilecek birkaç mtDNA kopyasının bulunma ihtimalinin çok yüksek olduğu sonucunu çıkarabiliriz. mtDNA analizi yapılabilen tipik örnekler, kan lekesi, kemik, tükrük, tırnak ve saç gövdesi şeklindedir. Saç gövdesinden mtDNA'nın tiplendirilmesi, olay yerinde genellikle bulunan bir kanıt olduğu için özel bir önem taşımaktadır (Barinaga 1989).

Günümüzde, kanıta dayalı olarak olay yerindeki saç örnekleri ile referans örneklerin karşılaştırılması, bir takım morfolojik karakteristiklerine dayandırılmaktadır. Bu analizler subjektif nitelikte olup, araştırmacının tecrübeleri ile sınırlıdır. Bu subjektifliği ortadan

kaldırmak için, mtDNA analizi gerçekleştiren laboratuvarların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Sonuç olarak, STR lokuslarından farklı olarak mtGenom, rekombinasyon göstermeyen bir moleküldür. Ayrıca, çok değişken bölge 1 (hypervariable region 1 (HVI)) ve çok değişken bölge 2 (hypervariable region 2 (HVII)) olarak adlandırılan, mtDNA kodlamayan bölgesinde yer alan iki dizinin oldukça polimorfik olduğu ve identifikasyon için ideal oldukları bulunmuştur (Wilson at al. 1995). HV1 ve HV2’de mevcut polimorfizmlerin popülasyondaki frekansları, mtDNA profilinin frekansını belirlemede kullanılamaz (Stewart at al. 2001).

Yukarıda sıralanan nedenlerden ötürü, mtDNA tek başına kesin bir belirleyici olarak düşünülmemelidir. mtDNA uyumunu belirlemek açısından, araştırmacılar, ilgili bir veri tabanında bu polimorfizmin gözlenen sıklığını referans olarak almalıdır (Holland and Parsons 1999).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma Materyalleri

Bu tez çalışması Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Başkanlığı Biyoloji İhtisas Dairesi'nin (İstanbul) imkanlarından yararlanılarak hazırlanmıştır. Çeşitli adli vakalar sonucu kuruma gelen; ırza tecavüz, cinayet ve trafik kazası vakalarında çevrede bulunan biyolojik deliller (kıl, kemik, kan, sperm, doku parçası, tükürük, kepek, idrar, svap'lar vb.), vajen veya anüste spermatozoid aramak üzere alınan frottiler ve fiziksel deliller (mağdurlara ait giysiler, olay yerinde bulunan yiyecek artıkları, kullanılmış malzemeler, izmarit, çiğnenmiş sakız, pul vb.) bazı nesep ve miras davaları için Fethi-Kabir materyali (degrade kemik) bu tez çalışmasında materyal olarak kullanılmıştır.

Ön inceleme-ön tanı

Kuruma gelen vaka'nın içeriğine göre işlem yapılır. Eğer gelen vaka nesep tayini ise kan örneği veya swab (ağız epiteliden) alınır. Eğer gelen vaka delil torbası ise dikkatli bir şekilde tutanakla açılır. Savcılıklardan gelen biyolojik ve fiziksel örneklerin tasnifi yapılarak leke ön incelemesi ve ön tanı işleri yapılır.

Mor ötesi (UV) ışık

Elbise, halı, çarşaf gibi geniş alanlar üzerindeki seminal lekelerin gösterilmesinde, 250-365 nm dalga boylarında mor ötesi ışık genellikle yeterli olur. Bu dalga boylarındaki ışık altında seminal lekeler soluk mavi-beyaz flouresans verirler

3.1.2. Primerler: PCR yöntemi ile çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı özellikte bir çift sentetik oligonükleotid dizisi primer olarak adlandırılır. Her bir dizi genel olarak 18-25 baz uzunluğundadır. Çalışmamızda Qiagen firmasına ait hazır kit primerler kullanılmıştır.

3.1.3. Kimyasal Malzemeler

Çizelge 3.1 Kimyasal Malzemeler

| Kimyasal Malzeme | Markası | Kullanıldığı Aşama |
|--|--------------------|--------------------|
| Quantifiler PCR reaction mix | Applied Biosystems | Kantitasyon |
| Quantifiler Human Primer mix | Applied Biosystems | Kantitasyon |
| Quantifiler Human DNA standart | Applied Biosystems | Kantitasyon |
| Buffer MVI | Qiagen | İzolasyon |
| Buffer MTL | Qiagen | İzolasyon |
| RNase-Free water | Qiagen | İzolasyon |
| MagAttract suspension B | Qiagen | İzolasyon |
| 10x PCR buffer | Qiagen | PCR |
| Hotstart Taq polimeraz | Qiagen | PCR |
| Primer mix | Qiagen | PCR |
| Gene Scan-500 LIZ.(moleküler cetvel) | Applied Biosystems | Gen Analizi |
| HI-DI Formamid | Applied Biosystems | Gen Analizi |
| İdentifiler Allelic ladder | Applied Biosystems | Gen Analizi |
| POP-4 performansı optimize edilmiş polimer | Applied Biosystems | Gen Analizi |

3.1.4. Plastik ve Diğer Malzemeler

- 1 Otomatik pipet uçları 10,100, 1000 mikrolitrelik (μ l), steril.
- 2 0,2 mililitrelik (ml) polipropilen santrifüj tüpü
- 3 0,5 mililitrelik (ml) polipropilen santrifüj tüpü
- 4 1,5 mililitrelik (ml) polipropilen santrifüj tüpü
- 5 Enjektör, EDTA'lı kan tüpü, tüp askıları,
- 6 Buz kalıbı

3.1.5. Kullanılan Çözeltiler ve Boyalar

EDTA (0,5M pH 8): 18,61 gr EDTA 80 ml distile su içerisinde çözüldü ve pH'sı NaOH ile ayarlandı.

Ethidium Bromid (5 mg/ml stok): 10 μ g ethidium bromid'e 1 ml distile su içinde çözünmesi ile hazırlanır.

Pan Reaktifi (Zn testi): Pan Solüsyonu 1 gr. PAN 0,2 ml triton X-100 içinde bir çubukla karıştırılarak çözülür ve 9,8 ml tris solüsyonu ile karıştırılır. PAN solüsyonu buzdolabında 2 haftadan fazla dayanabilir.

Fenol fytalein : 1g fenolftalein 50 ml % 95'lik etil alkolde çözülür ve 100 ml'lik balonjojeye aktarılır. Hacim çizgisine kadar %95'lik etil alkol ile tamamlanır. Çözeltinin rengi pH 8,3-10,0 aralığında renksizlikten kırmızıya dönüşür

Fenol : Kristal halde 250 g fenol, 50 ml distile suda eritilir. Üzerine pH'sı 8'e ayarlanmış 50 ml tampon eklenerek karıştırılır. Fenol ve su fazı ayrıldıktan sonra üstte kalan su fazının pH'sı 8,0'ın altındaysa su fazı alınır ve pH 8 olana kadar bu işlem tekrar edilir. Son olarak üstte bir miktar tampon bırakılarak +4 °C'de ve renkli cam şişede saklanır.

DTT: 1 mM Dithiothreitol ($C_4H_{10}O_2S_2$, MW = 154,25) 0,1542 gr DTT 1 ml steril distile su içerisinde çözüldü. 0,01 M NaOAc (pH 5.2) +4°C de saklandı.

RBC :(Red Blood Cell -Kırmızı kan hücresi) lizis solüsyonu (155 mM NH_4Cl , 10 mM $KHCO_3$, 1,1 M EDTA)

PBS : Phosphate Buffer Solution (Saline) (1X Solüsyon 10 mM Sodyum Fosfat %09 NaCl pH 6,8), $MgCl_2$

Corin-Stockis; 0,50 gr Erytrosine, 100 cc amonyak içinde çözülür.

Hematoksilen: Çözünürlük 1 gr/100 ml su ve 30-40 gr/100 ml etil alkoldür. Hematoksilen boya çözeltilerinin hazırlanması esnasında, oksidasyonla hemateine dönüşür.

Eozin: Çözünürlük 40 gr/100 ml su, 2 gr/100 ml etil alkoldür, normalde sarı-yeşil çözeltisi olan eosine %1 oranında asetik asit ilavesiyle, çözelti kırmızı renge dönüşür.

Malasit Green Yeşili: 1 g Malaşit yeşili havana konur, üzerine 100 cc distile su azar azar ilave edilerek ezilir ve şişeye alınır. Bir gün bekletildikten sonra süzülür ve şişelerde saklanır.

$MgCl_2$: (25 mM) 0,127g $MgCl_2$. 25 ml distile suda eritilir

Etanol: %96-100

3.1.6. Kullanılan Araç ve Gereçler

Çizelge 3.2 Kullanılan Araç ve Gereçler

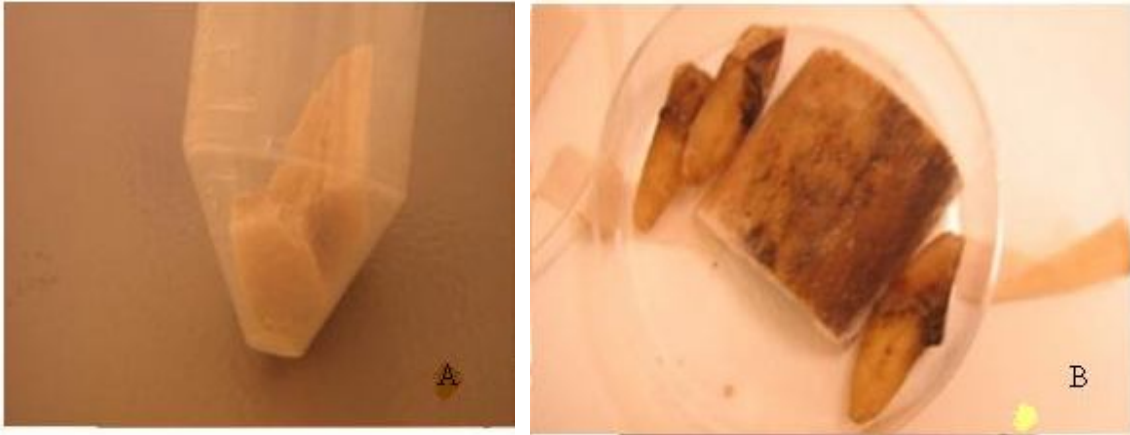
| Cihaz veya Gereç | Markası |
|---|---|
| Mikropipet Takımı 2µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, | Gilson ALBİO Kimyevi Maddeler A.Ş. |
| Vorteks (Karıştırıcı) | Gilson ALBİO Kimyevi Maddeler A.Ş. |
| Santrifüj Eppendorf 5415 | İncekaralar A.Ş. |
| Santrifüj – Jouan B4i | Altan A.Ş. |
| Santrifüj Mikro 200 | Hettich Zentrifugen |
| Santrifüj – Megafuge 1.0.R | Gilson ALBİO Kimyevi Maddeler A.Ş. |
| Multiplaces Isıtıcı Blok | Tetra-Selecta |
| Etüv Nüve EN400 | ALTAN A.Ş. |
| UV Lambası (İntevsive UV Source 366 nm) | Desaga |
| Tur Motor Kemik Temizleme Cihazı | Universal (Dişçi Tipi Askılı Motor) |
| Kemik öğütme makinası Retsch mm301 | Kutay A.Ş. |
| Hibridizasyon Fırını Biometra Compact Line OV4 | ALBİO OV4 |
| Thermal Cycler Isı döngü Cihazı Applied Biosystem 9700 | Genomed Sağlık Hizmetleri A.Ş. |
| PCR Set-UP (Hazırlama araçları) Laminar Air Flow | 1.Faster BH-2004, 2.Faster BİO 48 |
| DNA Kantitasyon Cihazı ve Ekipman ABI PRİSM (7000 Sequence Detection System) | Genomed Sağlık Hizmetleri A.Ş. |
| Genetik Analyzer 3130x Hitachi (Applied Biosystem) | Genomed Sağlık Hizmetleri A.Ş. |
| Biorobot- İzolasyon Robotu Qigen –Biorobot EZ1 Qigen –Biorobot M48 | MEDEK veya GENOVA medikal ürünler A.Ş. |
| Görüntü Ataçmanlı Mikroskop | HİTAŞ Elektronik ve Tıbbi Cihazlar LTD. |
| PALM (Lazer Mikroskop) | GLİA Medikal |
| Buzdolabı (+4'C) | Arçelik |
| Deep-freeze (-20°C) | Arçelik |
| Tartı | Sartorius |
| | |

3.2 METOD

3.2.1.DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu Biorobot M48 (robotik izolasyon) ve manuel olmak üzere, Qiagen marka izolasyon prosedürü ile iki şekilde yapıldı. Kemik materyali dışındaki tüm materyallerden, birkaç ön incelemeden sonra belirli bir miktar 1,5 ml'lik santrifüj tüpü'ne konarak robotik sistem Biorobot M48 protokolüne göre DNA izolasyonu yapılmıştır. Manuel izolasyon ise, kan, sperm, kemik, diş, kıl , tükürük, idrar, tırnak kiri, amnion sıvısı, doku vb. materyallerden ön inceleme işleminden sonra herbiri için uygun protokole göre DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu protokoller aşağıda ayrıntılı bir şekilde yazılmıştır. Elde edilen DNA PCR için eksi 20°C'de saklandı.

3.2.2. Kemik ve diş örneklerinden DNA izolasyon Protokolü



Resim 3. 1 A-Kimliği meçhul bir cesede ait kemik örneği. B-Kimliği meçhul bir cesede ait kemik ve diş örnekleri

Kemikten DNA izolsyon Prosedürü

1. Biyoloji İhtisas Dairesine gelen kemik örneği öncelikle şu şekilde temizlenir.
 - a- Distile su ile yıkanır.
 - b- Çamaşır suyunda 25 dk. Bekletilir.
 - c- Üst tabaka bistrü ile kazınır.

- d-Distile su ile yıkanır.
- e- Alkol içerisinde 20-25 dk. bekletilir.
- f- Dietileter içerisinde eter tamamen uçup örnek kuruyana kadar bekletilir.
2. Kemik kırılarak toz haline getirilir.
 3. DNA izolasyon aşamalarından önce oda kilitlenerek 30 dk. UV ışığı ile sterilizasyon sağlanır.
 4. İlk aşamada 0,1-0,2 gr kemik tozu 2 ml'lik santrifüj (eppendorf) tüpüne konur, üzerine 1000 µl 0,5 M EDTA , 5 damla 0,1% Triton-X, 100 µl Proteinaz-K ilave edilir ve bir gece 56 °C de hibridizasyon fırınında inkübe edilir.
 5. Bir gece sonunda 5 dk. 14000 rpm devirde santrifüj edilir.
 6. Oluşan 3 fazın ortasındaki faz 2 ml'lik temiz eppendorf tüpüne alınır, üzerine hacim/hacim oranında fenol eklenir ve çok iyi vortekslenir.
 7. Tam devir 14000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilir.
 8. Üst faz atılır altta kalan faz'a hacim/hacim oranında kloroform ilave edilir
 9. 14000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilir.
 10. Üst faz 2 ml'lik temiz bir tüpe alınır hacim/hacim oranında kloroform ilave edilir.
 11. 14000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilir.
 12. Üst faz temiz Centicon-30 tüpüne aktarılır, üzerine alabildiği kadar steril distile su ilave edilir.
 13. 4000 rpm devirde 20 dk. santrifüj edilir.
 14. Süzüntü atılır ve tekrar alabildiği kadar steril distile su ilave edilir.
 15. 4000 rpm devirde 15 dk. santrifüj edilir.
 16. 14. ve 15. İşlemler tekrarlanır

17. Centricon-30 ters çevrilerek içine 100 µl steril distile su ilave edilir.

18. 4000 rpm devirde 5 dk. santrifüj edilir.

19. Süzülen DNA materyali PCR için hazırdır (+4 °C de saklanır)

20. Çalışma sonunda Kemikten DNA izolasyon formu doldurulur.

3.2.3. Sperm örneklerinden DNA izolasyon Protokolü



Resim 3. 2 Bir tecavüz vakasına ait örnekler. **A-** vajinal frotti. **B-** İç çamaşırlar. **C-** Şort. **D-** Anal frotti.

Adli bilimler, cinsel saldırı olgularında çok büyük bir rol üstlenmektedir. Cinsel saldırı iddiasını kesin ispatlayacak, sanığa ait semen ve/veya spermatozoa, mağdurun vücut

boşluklarından, giysilerinden ya da olay yerinden elde edilebilir. Vücut boşluklarındaki semen veya spermatozoa, drenajla veya kişinin yıkamasıyla dilüe olarak ya eser miktarda kalacaktır ya da yok olacaktır.

Ön tanı aşamasında spermatozoalar, morfolojik olarak Corin-Stockis, Hematoksilen-Eosin boyaları ile gösterilmiştir. İkinci aşamada ise adli bilimler açısından semenin ispatında önemli bir belirteç olan PSA, Seratec PSA Semiquant test kullanılarak gösterilmiştir.

Sperm için Çinko (PAN reaktifi (1Pyridyl_(2)_Azo_Naphthol_(2)) ve Asitfosfataz (Phosphatesmo KM testi uygulanır ayrıca yayma preparatı hazırlanarak mikroskopi yapılır. Sperm için bir başka öntanı metodu PSA kartlarıdır. PSA (prostat spesifik antijen = prostate specific antigen) testi; erkeklerde serumdaki PSA miktarını ölçen testtir. PSA, erkeklerde bulunan prostatın epitel hücrelerinde bulunan glikoprotein (şeker ekli protein denilebilir) yapıda bir maddedir. Tüm yetişkin erkeklerin kanlarında az miktarda saptanabilir.

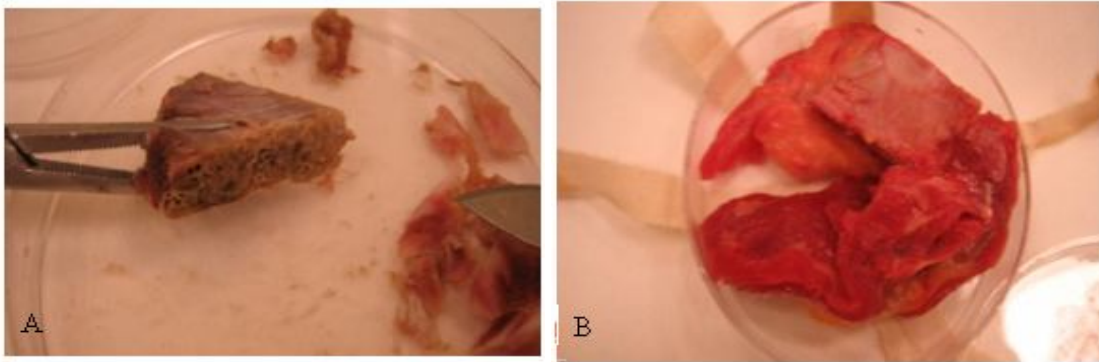
Gelen örneklerden alınan parçalar tüpler içine konarak distile su eklenir. Daha sonra bagetleme yapıldıktan sonra (mikropipet ucu ile) 8000 rpm de 4-10 dakika santrifüj edilir. Santrifüjden sonra tüpler çıkarılarak süpernatant kısmı atılır. Çökeltiden bir miktar alınarak lam üzerine yayma yapılır, geri kalanı izalasyon için kullanılır. Lam üzerine alınan örnek solüsyonu inkübatör üzerinde kurutulduktan sonra boyama yapılır. Boyama için hematoksilen eozin ve Corin-Stockis kullanılır.

Spermden DNA izolasyon prosedürü ;

- 1) Materyali içerecek şekilde örnekten 0.5 cm² kesilerek iyice ufalandıktan sonra 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınır. Üzerine 300 µl Buffer ATL, 20 µl Proteinaz K, 20 µl 1M DTT eklenir ve 10 saniye vortekslenir.
- 2) 56 C°de 1 saat inkübatörde bekletilir.
- 3) 900 rpm'de 6 dakika çevrilerek süpernatant atılır.
- 4) Peletin üzerine 300 µl Buffer AL (eklemeden önce iyice kanştırılır) eklenir ve 10 saniye vortekslenir
- 5) 70 C°de 10 dakika inkübatörde bekletilir.

- 6) 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
- 7) Süpernatant dikkatlice atılır.
- 8) Eppendorfta geri kalan çözeltinin tümü spin kolona boşaltılır ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 9) Toplama kabı değiştirilerek spin kolona 500 mikrolitre AW1 eklenir ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 10) Toplama kabı yeniden değiştirilip 500 mikrolitre AW2 eklenir ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 11) Toplama kabı yeniden değiştirilip 14000 rpm de 3dakika santrifüj edilir. Membranın tamamen kuruması için
- 12) Toplama kabı yeniden değiştirilip daha Önce 56 C° de bekletilmiş olan AE tamponundan 20-50 µl eklenir ve 5 dakika oda ısısında bekletilir. 14000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir
- 13) Bu defa üstteki filtrelili taraf atılarak toplama kabındaki izolat etiketlenip ağzı kapatılır.

3.2.4. Doku örneklerinden DNA izolasyon Protokolü



Resim 3. 3 Bir cinayet vakasına ait doku örnekleri. **A**-Kemikli doku. **B**-Kas doku.

- 1) Aşağı yukarı 0.5-20 mg taze veya dondurulmuş yumuşak doku (örn; karaciğer, böbrek, dalak vb.) 1,5 ml veya 2,0 ml mikrosantrifüj tüpüne konulur. Bağlantılı dokular (Örn; kas, deri), örnek materyalleri toz haline getirmede kullanılan sıvı nitrojenle öğütülebilir. Üzerine 180 µl Buffer ATL, 20 µl Proteinaz K eklenir.
- 2) 56 C°de 1 saat inkübatörde bekletilir.
- 3) 900 rpm'de 6 dakika çevrilerek süpernatant atılır.
- 4) Peletin üzerine 300 µl Buffer AL (eklemeden önce iyice kanştırılır) eklenir ve 10 saniye vortekslenir
- 5) 70 C°de 10 dakika inkübatörde bekletilir.
- 6) 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir
- 7) Süpernatant dikkatlice atılır.
- 8) Eppendorfta geri kalan çözeltinin tümü spin kolona boşaltılır ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 9) Toplama kabı değiştirilerek spin kolona 500 mikrolitre AW1 eklenir ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 10) Toplama kabı yeniden değiştirilip 500 mikrolitre AW2 eklenir ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 11) Toplama kabı yeniden değiştirilip 14000 rpm de 3dakika santrifüj edilir. Membranın tamamen kuruması için
- 12) Toplama kabı yeniden değiştirilip daha Önce 56 C° de bekletilmiş olan AE tamponundan 20-50 µl eklenir ve 5 dakika oda ısısında bekletilir. 14000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir
- 13) Bu defa üstteki filtrelili taraf atılarak toplama kabındaki izolat etiketlenip ağzı kapatılır.

3.2.5. Kan örneklerinden DNA izolasyon Protokolü

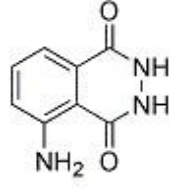


Resim 3. 4 A- Bir şüpheliye ait Whatman'a emdirilmiş kuru kan örneği. B- Mağdura ait kan örneği. C- Mağdura ait gıysiler. D-Olay yerinde bulunan bıçak.

Kan lekeleri için; fenol fytaleyn +H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) çözeltisi damlatılarak test yapılır. Koyu pembe renk- nar çiçeği rengi pozitif sonuç anlamına gelir. Luminol ve Lauco Malasit Green reaktifleride kullanılan maddelerdir.

Delil torbasından çıkan ve kan materyal i olarak değerlendirilen örneklerin insan veya hayvan kanı ayırımı Hemdirect testi ile yapılır.

Adli olay mahalinde, kan izlerini arayan uzmanlar, bazı kimyasallar kullanarak kan izlerini bulmaya çalışırlar. Olay yerindeki eser miktardaki ve hatta temizlenmiş kan izlerini bulan kimyasal Luminol denilen ve kan ile tepkimeye girdiğinde, mavi-yeşil renkli ışık saçan aşağıda yapısı verilen bir âmin türevidir.



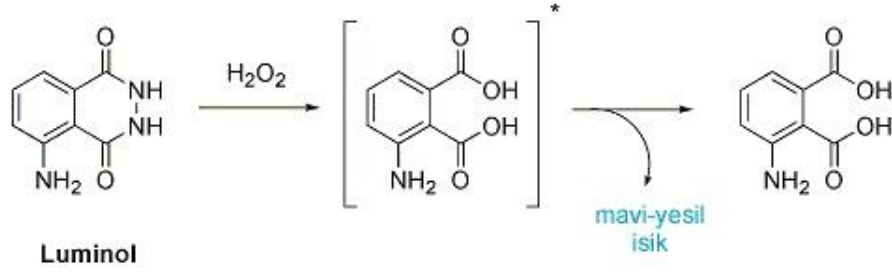
Luminol

Şekil 3.1 Luminol kimyasal yapısı



Resim 3. 5 Luminol ile kan lekelerinin gösterilmesi

Kimyasal bir tepkimenin gündelik yaşama gayet fonksiyonel bir şekilde uygulanmış halidir. Kanıt toplama ekiplerinin en büyük yardımcısı olan luminol görünmeyen kan lekelerini görünür hale getirir. Tepkimenin temeli kemiluminesans dediğimiz olaydır. Burada luminol maddesi, hidrojen peroksit ile birlikte kan olduğu tahmin edilen bölgeye sıkılarak ve eğer kan kalıntıları varsa, kandaki hemoglobinin Fe^{2+} iyonları, luminol'un hidrojen peroksit ile yükseltgenmesi tepkimesini katalizleyip, luminol'un, aminoftalat'a yükseltgenmesini sağlamaktadır. Yani, aslında hidrojen peroksit ile luminol karışımı kendi kendine tepkimeye girmemekte ama bir metal katalizörüne ihtiyaç duymaktadır. Kan kalıntılarındaki gözle görülmeyen demir iyonları bile bu iş için yeterli olmakta ve bize mavi-yeşil ışık saçarak kanın varlığını ispat etmektedir.



Şekil 3. 2 Luminol'ün H_2O_2 ile reaksiyonunun gösterilmesi

Oluşan yüksek enerjili aminoftalat enerji fazlalığından dışarıya foton yani ışık yayarak kurtulmaktadır. Kemiluminesans olarak bildiğimiz bu tepkime adli incelemelerde oldukça işe yaramaktadır.

Kandan DNA izolasyon prosedürü:

- 1) 5 veya 10 ml'lik plastik tübe 1 ml kan konarak üzerine 1x RBC (Red Blood Cell) lizis tamponundan 4 ml eklendi.
- 2) 10 saniye kadar alt üst edildi.
- 3) 25 dakika oda ısısında bekletildi.
- 4) 1200 rpm'de 6 dakika çevrilerek süpernatant atıldı.
- 5) Kalan pelletin üzerine 400 mikrolitre PBS eklendi ve pipetle karıştırıldı.
- 6) Çökelti 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 40 mikrolitre Proteinaz K eklenerek pipetle karıştırıldı.
- 7) 400 mikrolitre AL (eklemeden önce iyice karıştırılır) tamponundan eklendi ve 15 saniye vortekslendi.
- 8) 56 C°de 10 dakika su banyosunda bekletildi.
- 9) 400 mikrolitre %98 etanol eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Vorteksledikten sonra çok kısa bir süre santrifüj yapıldı.
- 10) Eppendorftaki çözeltinin tümü spin kolona boşaltıldı ve 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- 11) Toplama kabı değiştirilerek spin kolona 500 mikrolitre AW1 eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika çevrildi.

12) Toplama kabı yeniden değiştirilip 500 mikrolitre AW2 eklendi ve 14.000 rpm' de 3 dakika çevrildi.

13) Toplama kabı yeniden değiştirilip daha Önce 56 C° de bekletilmiş olan AE tamponundan 100 mikrolitre eklendi ve 5 dakika oda ısısında bekletilerek 8000 rpm'de 1 dakika çevrildi.

14) Alttaki eppendorfu kaldırmadan üzerine yeniden 50 mikrolitre AE tamponundan eklenip 8000 rpm'de 1 dakika çevrildi.

15) Bu defa üstteki filtreli taraf atılarak toplama kabındaki izolat etiketlenip ağzı kapatıldı.

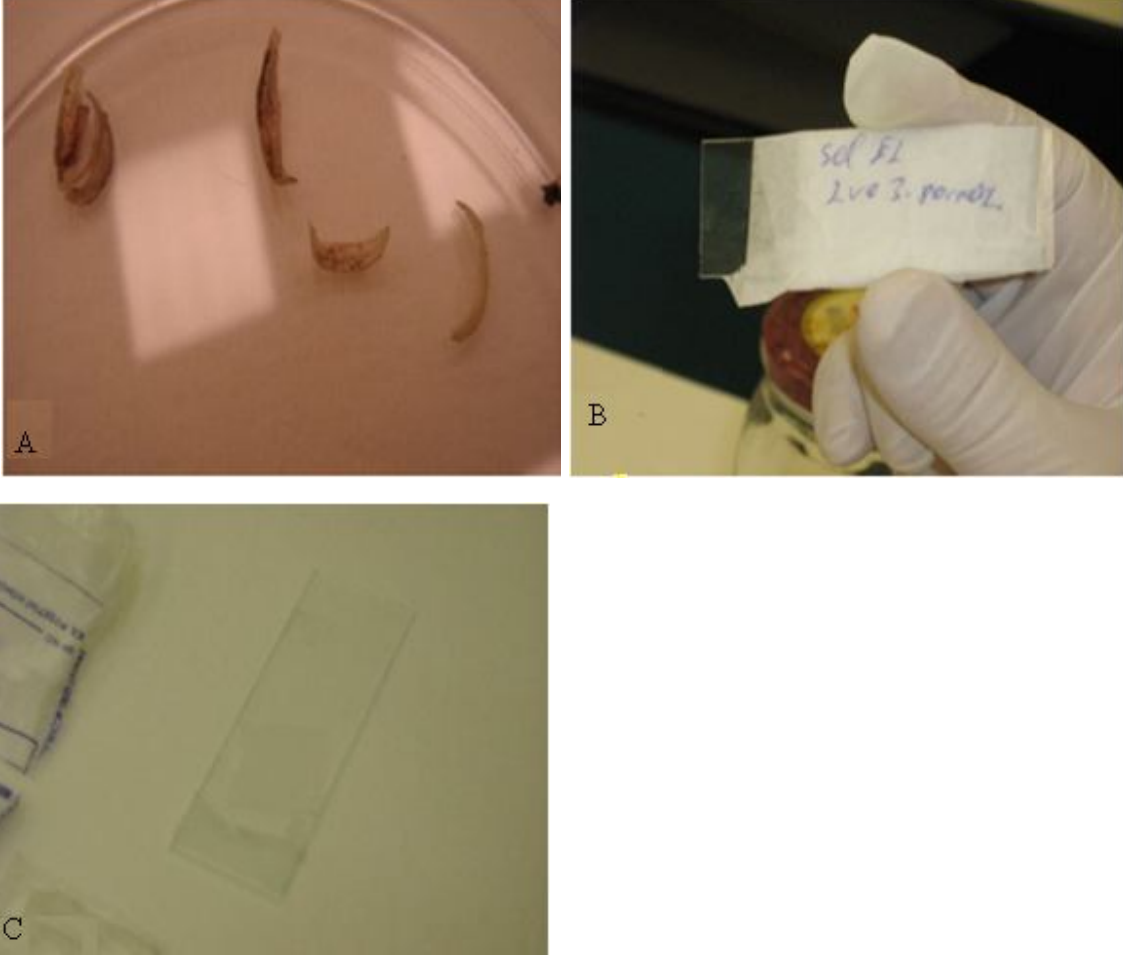
3.2.6. Kıl örneklerinden DNA izolasyon Protokolü



Resim 3. 6 A-Olay yerinde bulunan kıl örneği. B-Cesede ait kıl örneği. C-Cesedin üzerinde bulunan kıl örneği.

- 1) Kıl kökünüde içine alacak şekilde 0.5-1 cm kıl parçası 1,5 veya 2.0 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konur. Üzerine 300 µl Buffer ATL, 20 µl Proteinaz K ve 20 µl 1M DTT eklenir ve 10 saniye vortekslenir.
- 2) 56 C°de 1 saat inkübatörde bekletilir.
- 3) 900 rpm'de 6 dakika çevrilerek süpernatant atılır.
- 4) Peletin üzerine 300 µl Buffer AL (eklemeden önce iyice kanştırılır) eklenir ve 10 saniye vortekslenir
- 5) 70 C°de 10 dakika inkübatörde bekletilir.
- 6) 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir
- 7) Süpernatant dikkatlice atılır.
- 8) Eppendorfta geri kalan çözeltinin tümü spin kolona boşaltılır ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 9) Toplama kabı değiştirilerek spin kolona 500 mikrolitre AW1 eklenir ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 10) Toplama kabı yeniden değiştirilip 500 mikrolitre AW2 eklenir ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 11) Toplama kabı yeniden değiştirilip 14000 rpm de 3dakika santrifüj edilir. Membranın tamamen kuruması için.
- 12) Toplama kabı yeniden değiştirilip daha Önce 56 C° de bekletilmiş olan AE tamponundan 20-50 µl eklenir ve 5 dakika oda ısısında bekletilir. 14000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir
- 13) Bu defa üstteki filtrelili taraf atılarak toplama kabındaki izolat etiketlenip ağzı kapatılır.

3.2.7. Tırnak örneklerinden DNA izolasyon Protokolü



Resim 3. 7 A-Bir cesede ait tırnak örnekleri. Şüpheliye ait tırnak içi swab'ları, **B**-Sol el, **C**-Sağ el

- 1) Tırnak kirini içerecek materyal 1,5 veya 2.0 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınır. Üzerine 300 µl Buffer ATL, 20 µl Proteinaz K ve 20 µl 1M DTT eklenir ve 10 saniye vortekslenir.
- 2) 56 C°de 1 saat inkübatörde bekletilir.
- 3) 900 rpm'de 6 dakika çevrilerek süpernatant atılır.
- 4) Peletin üzerine 300 µl Buffer AL (eklemeden önce iyice kanştırılır) eklenir ve 10 saniye vortekslenir

- 5) 70 C°de 10 dakika inkübatörde bekletilir.
- 6) 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir
- 7) Süpernatant dikkatlice atılır.
- 8) Eppendorfta geri kalan çözeltinin tümü spin kolona boşaltılır ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 9) Toplama kabı değiştirilerek spin kolona 500 mikrolitre AW1 eklenir ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 10) Toplama kabı yeniden değiştirilip 500 mikrolitre AW2 eklenir ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 11) Toplama kabı yeniden değiştirilip 14000 rpm de 3dakika santrifüj edilir. Membranın tamamen kurumması için.
- 12) Toplama kabı yeniden değiştirilip daha Önce 56 C° de bekletilmiş olan AE tamponundan 20-50 µl eklenir ve 5 dakika oda ısısında bekletilir. 14000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 13) Bu defa üstteki filtreli taraf atılarak toplama kabındaki izolat etiketlenip ağzı kapatılır.

3.2.8. Cenin örneğinden DNA izolasyon Protokolü



Resim 3. 8 Bir tecavüz vakasında mağdurdan tahliye edlinen cenin.

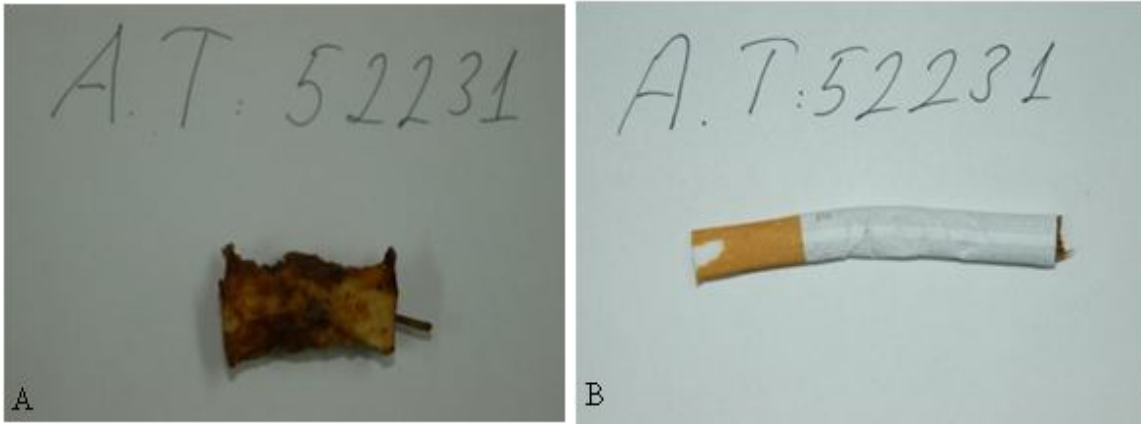
- 1) Aşağı yukarı 0.5-20 mg taze veya dondurulmuş yumuşak doku 1.5 ml veya 2.0 ml mikrosantrifüj tüpüne konulur. Üzerine 300 µl Buffer ATL, 20 µl Proteinaz K eklenir.
- 2) 56 C°de 1 saat inkübatörde bekletilir.
- 3) 900 rpm'de 6 dakika çevrilerek süpernatant atılır.
- 4) Peletin üzerine 300 µl Buffer AL (eklemeden önce iyice kanştırılır) eklenir ve 10 saniye vortekslenir
- 5) 70 C°de 10 dakika inkübatörde bekletilir.
- 6) 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir
- 7) Süpernatant dikkatlice atılır.
- 8) Eppendorfta geri kalan çözeltinin tümü spin kolona boşaltılır ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 9) Toplama kabı değiştirilerek spin kolona 500 mikrolitre AW1 eklenir ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 10) Toplama kabı yeniden değiştirilip 500 mikrolitre AW2 eklenir ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir.

11) Toplama kabı yeniden değiştirilip 14000 rpm de 3 dakika santrifüj edilir. Membranın tamamen kuruması için

12) Toplama kabı yeniden değiştirilip daha Önce 56 C° de bekletilmiş olan AE tamponundan 20-50 µl eklenir ve 5 dakika oda ısısında bekletilir. 14000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir

13) Bu defa üstteki filtrelili taraf atılarak toplama kabındaki izolat etiketlenip ağzı kapatılır.

3.2.9. Tükürük örneği içeren örneklerden DNA izolasyon Protokolü



Resim 3. 9 Bir adli vaka'da olay yerinde bulunan, **A**-Elma artığı **B**-Sigara izmariti

Sigara ve elma artığından(tükürük) DNA izolasyon prosedürü: İzolasyon, Qiagen marka ticari DNA çekitleme kiti protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

1) Sigara için kahverengi filtre kağıdının (3-5 mm) veya bir parça izmaritin küçük bir kısmı, elma için amilazın yoğun olduğu değerlendirilen bölümü kesilerek materyal 1.5 ml veya 2.0 ml santrifüj tüpüne alınır. Üzerine distile su eklenir.

2) 56 C°de 1 saat inkübatörde bekletilir.

3) 900 rpm'de 6 dakika çevrilerek süpernatant atılır.

- 4) Peletin üzerine 300 µl Buffer AL (eklemeden önce iyice kanştırılır) eklenir ve 10 saniye vortekslenir.
- 5) 70 C°de 10 dakika inkübatörde bekletilir.
- 6) 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir
- 7) Süpernatant dikkatlice atılır.
- 8) Eppendorfta geri kalan çözeltinin tümü spin kolona boşaltılır ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 9) Toplama kabı değiştirilerek spin kolona 500 mikrolitre AW1 eklenir ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 10) Toplama kabı yeniden değiştirilip 500 µl AW2 eklenir ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 11) Toplama kabı yeniden değiştirilip 14000 rpm de 3 dakika santrifüj edilir. Membranın tamamen kuruması için
- 12) Toplama kabı yeniden değiştirilip daha Önce 56 C° de bekletilmiş olan AE tamponundan 20-50 µl eklenir ve 5 dakika oda ısısında bekletilir. 14000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir
- 13) Bu defa üstteki filtrelili taraf atılarak toplama kabındaki izolat etiketlenip ağzı kapatılır

3.2.10. Amnion sıvısından DNA izolasyon protokolü



Resim 3. 10 Bir nesep davasında mağdurdan alınan amnion sıvısı.

- 1) materyal 1.5 ml veya 2.0 ml santrifüj tüpüne 1ml örnek meryal alınır.
- 2) 56 C°de 1 saat inkübatörde bekletilir.
- 3) 900 rpm'de 6 dakika çevrilerek süpernatant atılır.
- 4) Peletin üzerine 300 µl Buffer AL (eklemeden önce iyice kanştırılır) eklenir ve 10 saniye vortekslenir.
- 5) 70 C°de 10 dakika inkübatörde bekletilir.
- 6) 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir
- 7) Süpernatant dikkatlice atılır.
- 8) Eppendorfta geri kalan çözeltinin tümü spin kolona boşaltılır ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 9) Toplama kabı değiştirilerek spin kolona 500 mikrolitre AW1 eklenir ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 10) Toplama kabı yeniden değiştirilip 500 µl AW2 eklenir ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir.
- 11) Toplama kabı yeniden değiştirilip 14000 rpm de 3dakika santrifüj edilir. Membranın tamamen kuruması için
- 12) Toplama kabı yeniden değiştirilip daha Önce 56 C° de bekletilmiş olan AE tamponundan 20-50 µl eklenenir ve 5 dakika oda ısısında bekletilir. 14000 rpm de 1 dakika santrifüj edilir
- 13) Bu defa üstteki filtreli taraf atılarak toplama kabındaki izolat etiketlenip ağzı kapatılır

3.2.11 Kantitasyon

Numunede araştırılan gen ürünleri, DNA veya RNA miktarının belirlenmesidir. DNA miktarı, morötesi spektrofotometresi ile belirlenir. 260 nm dalga boyunda 1 birim optik yoğunluk, 50 mikrogram çift sarmal DNA'ya karşılık gelir. DNA nın saflığıysa, örneğin

nükleik asitlerin ışığı aldığı 260 nm (A 260) ve proteinlerin ışığı aldığı 280 nm'de (A 280) ölçülerek A260/A280 değerinin bulunmasıyla saptanır. Saf DNA molekülü için bu değer 1.8-2.0 dir. 1.8 in altındaki değerler ortamda bir miktar protein veya peptidin varlığına işaret eder. Bu tez çalışmasında kantitasyon ABI PRISM 7000 sequence detection system cihazı ile yapılmıştır.

3.2.12 İzole Edilen DNA'nın Çoğaltılması

Her örnek için Çizelge 3.3 'de belirtilen miktarlarda 10x Reaction Buffer, Primer mix, DNA polimeraz enzimi ve distile su içeren master mix hazırlandı. Her örnek için hazırlanan 0,2 mililitrelik (ml) polipropilen santrifüj tüpüne 10 µl dNTP mix dağıtıldı ve 2,5 µl örnek DNA eklendi.

Çizelge 3.3 İzole DNA ve PCR karışım oranları

| | |
|--------------------------------------|---------|
| DNA | 2,5 µl |
| Reaction Buffer (Qiagen) | 1,25 µl |
| Primer Mix (Qiagen) | 2,80 u1 |
| Enzim(Hotstart Taq polimeraz-Qiagen) | 0,31 µl |
| dH2O | 5,64 µl |
| dNTP mix | 10 µl |

3.3.13 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR, DNA üzerindeki seçilmiş olan bir bölgenin çoğaltılmasını, sıcaklık seviyelerini kısa süreler içerisinde değiştiren ve düzenleyen termal cyclus adı verilen cihazlar ile, otomatik olarak sağlayan bir metottur. Primer adı verilen yapay oligonükleotidlerin bağlanabildiği aynı kromozom kolu üzerindeki iki nokta arasında bulunan hedef DNA bölgesinin in vitro olarak, 32 döngü sonrasında, 10^6 kez çoğaltılması sağlanır. Reaksiyonun gerçekleşebilmesi için ortamda hedef DNA, bu bölgeye özgü bir çift primer, deoksiribonükleotidler (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz (Taq polimeraz) bulunmalıdır. Mg^{2+} iyonu konsantrasyonu büyük öneme sahiptir.

PCR işleminde 3 farklı basamak vardır;

- 1) **DNA denatürasyonu:** DNA çift zinciri ısı ile denature edilerek ayrılır.
- 2) **Primer bağlanması:** Diziye özgü primerler DNA zincirlerine bağlanırlar.
- 3) **Primer uzaması:** Hedef bölgeye karşılık gelen zincir 5'- 3' yönünde primerden başlanarak yeni zincir sentez edilir ve çift sarmal DNA oluşur. PCR'nun döngü parametreleri Çizelge 3.4'de gösterilmiştir. Bu üç aşama bir döngü olarak kabul edilir.

Çizelge 3.4 PCR Döngü Parametreleri

| | Isı | Süre | Siklus sayısı | Gerçekleşn olaylar |
|------|---------|---------|---------------|--------------------|
| | 95°C | 11 dak. | 1 | Denaturasyon |
| ↓ | 94°C | 60sn. | 7* | Denaturasyon |
| | 61°C | 60 sn. | 1 | Bağlanma |
| | 60.5°C | 60 sn. | 1 | Bağlanma |
| | 60°C | 60 sn. | 1 | Bağlanma |
| | 59.5°C | 60 sn. | 1 | Bağlanma |
| | 59°C | 60 sn. | 1 | Bağlanma |
| | 58.5°C | 60 sn. | 1 | Bağlanma |
| | 58°C | 60 sn. | 1 | Bağlanma |
| | 72°C | 60 sn. | 7* | Uzatma |
| | 94°C | 60sn. | 1 | Denaturasyon |
| 58°C | 60 sn. | 1 | Bağlanma | |
| 72°C | 60 sn. | 7 | Uzatma | |
| 60°C | 1 saat. | 1 | Son uzatma | |
| 4°C | ∞ | | Bekletme | |

Amplifikasyon Applied Biosystem 9700 ısı döngü cihazında "touch down" PCR protokolüne göre yapılmıştır. Çizelgede aşamaların ilerleme durumu görülmektedir.

3.2.14 Kapilarelektroforez

Kapiler elektroforez ABI PRISM 3130x Gen Analiz cihazında gerçekleştirildi. Elektroforez için örnekler 0,5 mililitrelik (ml) polipropilen santrifüj tüplerinde 20 µl Hi-Di formamid ve 0,5 µl Gene Scan-500 LIZ[®] (size standart) ile birlikte hazırlandı. Size standart olarak

Applied Biosystems firmasının Gene Scan-500 Qiagen floresan boyalı, 35-500 baz çifti arasında değişen 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490, ve 500 baz çifti uzunluğunda olmak üzere toplam 16 DNA fragmanından oluşan moleküler cetveli kullanıldı. Değerlendirme için her 10 örnekte bir yürütme yapmak üzere bilinen tüm alelleri içeren Alelik Ladder hazırlandı. örnekler 95°C sıcaklıkta 5 dakika denatüre edildi.

Renatürasyonu engellemek için hemen buz kalıbı üzerine alınarak 3 dakika bekletildi.

Elektroforez şartları Data Collection programında: Module: GS STR POP-4 (1 ml) A.md4

Örnek Alma Süresi: 5 saniye

Örnek Alma Voltajı :15 000 volt

Elektroforez Voltajı : 15000 volt

Elektroforez Sıcaklığı :60°C

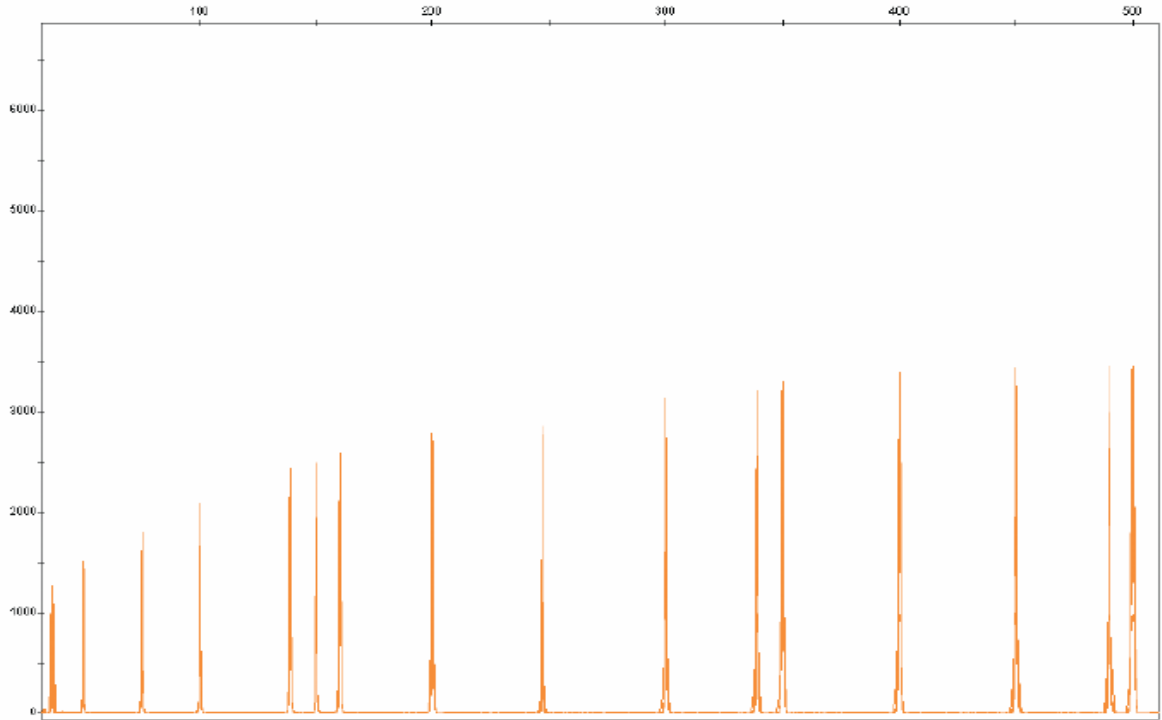
Elektroforez Süresi: 30 dakika

Matrix : FourDyeA.mtx olarak belirlendi.

Analizi için GeneScan programında Parameters ve Size Standart dosyaları oluşturuldu. Bu değerler kullanılarak analiz gerçekleştirildi. Alelik Ladder ile karşılaştırma yapılarak değerlendirme yapıldı. Ladder dışında oluşan piklerin büyüklükleri kaydedildi.

4. BULGULAR

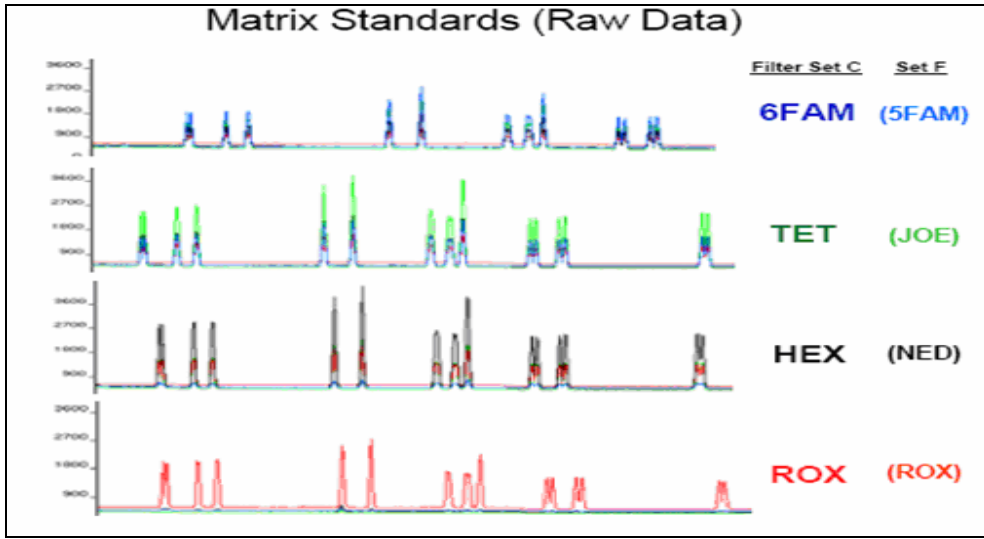
Çalışmamızda kullanılan moleküler cetvel Gene Scan-500 LIZ (internal line size standard) olup, toplam 16 DNA fragmanından oluşmaktadır. Bu fragmanlar başlangıçtan 200 baz çiftine kadar 20, bu seviyeden itibaren 35 baz çiftinde bir pik vermektedir. Moleküler cetvelin elektroforez sonrasındaki görünüşü şekil 4.1 'de verilmiştir.



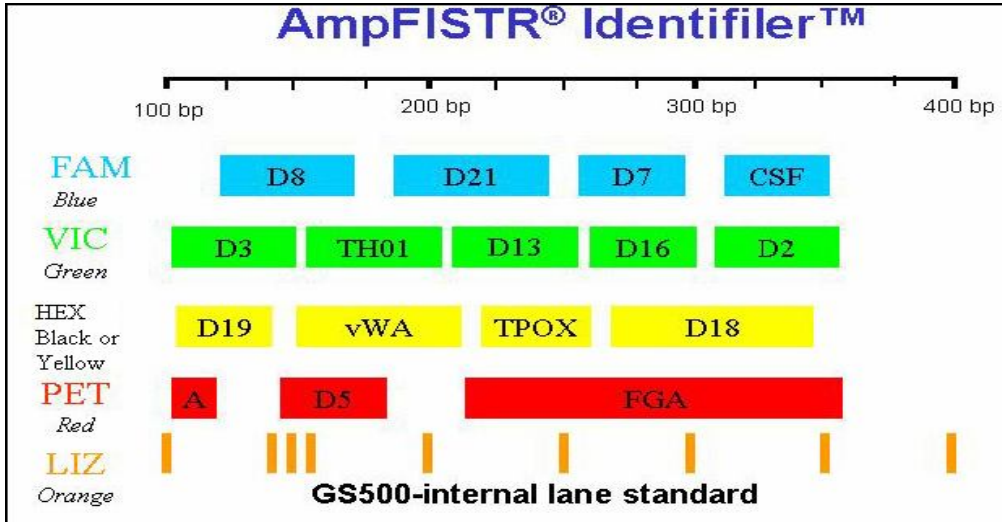
Şekil 4.1 3130x Genetik Analiz cihazında POP-4 Polimeri kullanılarak elde edilen GeneScan 500 LIZ® Size Standardının elektroferogramı.

“ABI Prism Big Dye™” terminatör reaksiyon kiti içerisinde bulunan karışım içerisinde PCR için gerekli tüm kimyasallar yanında her bir bazın eşit miktarda ddNTP (Dideoxynucleoside triphosphates)’leri de bulunur. Bu ddNTP’lerin her biri farklı bir floresan boya ile işaretlenmiştir. Floresan boyalara ait renkler şekil 4.2 ve şekil 4.3 gösterilmiştir. Kapiller elektroforez işlemi ABI 3130x genetik analizör cihazı kullanılarak yapılmıştır. Kapiller elektroforez için FAM, VIC, HEX (NED), PET flourosan boylarıyla

etiketli primerlerle yapılmış PCR reaksiyonlarından, her bir örnek için 0,5 µl PCR ürünü alınmış, 9,8 µl Hi-Di Formamid ve 0,2 µl LIZ-500 size standart ile birlikte bir kuyucuğa yüklenmiştir. Daha sonra 95 °C’de 5 dk bekletilerek denatüre olması sağlanmış ve denatürasyon sonrası 5 dk da buzda bekletilerek DNA’nın tek iplikçik halinde ABI 3130x cihazına yüklenmesi sağlanmıştır.

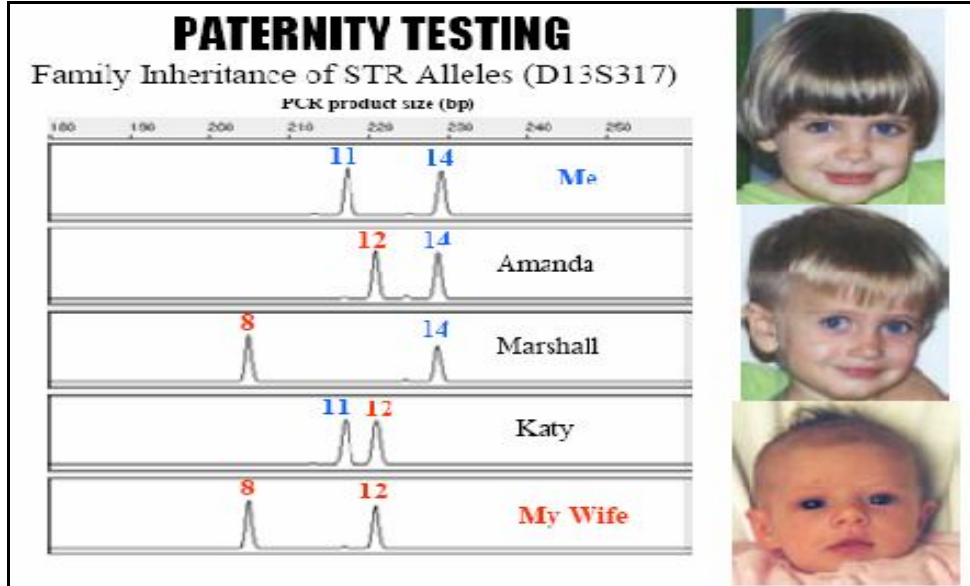


Şekil 4.2 Standart primerlere ait ham verilerin kapiller elektroforez görüntüsü



Şekil 4.3 AmpFISTR Identifiler kit’inde yer alan floresan işaretli primerlerin içerisinde yer aldığı lokuslara ait renkleri gösteren ideogram.

Çalışmamızda ırza tecavüz, cinayet ve trafik kazası gibi adli vakalarda, çevrede bulunan biyolojik deliller (kıl, kemik, kan, sperm, doku parçası, tükürük, kepek, idrar, swab'lar vb.), vajen veya anüste spermatozoid aramak üzere alınan frottiler ve fiziksel deliller (mağdurlara ait giysiler, olay yerinde bulunan yiyecek artıkları, kullanılmış malzemeler, izmarit, çiğnenmiş sakız, pul vb.) bazı nesep ve miras davaları için Fethi-Kabir (degrade kemik) gibi materyallerden izole edilen DNA'lara ait kapiller elektroforez görüntüleri ile herbir adli vakayla ilgili şüpheli veya şüphelilerden alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'lara ait kapiller elektroforez görüntülerinin karşılaştırması sırasıyla şekil 4.8 ile şekil 4.21 arasında verilmiştir. Kullanılan moleküler cetvele göre DNA üzerinde bulunan 16 STR lokus'u (Amelogenin, CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA) baz alınarak değerlendirme yapıldığında, şekil 4.16-4.17'de gösterilen nesep vakası hariç herbir adli vakada olay yeri materyali ve şüpheliye ait elektroforez görüntülerinin birebir örtüştüğü bulunmuştur. Nesep vakasında da tiplemesi yapılan alellerin yarısının çakıştığı bulunmuştur, şekil 4.4. da konuyla ilgili bir örnek verilmiştir. Karşılaştırmada kolaylık olması açısından görüntüler alt alta olacak şekilde aynı sayfada verilmiştir.



Şekil 4.4 Babalık testi- STR allellerin ailesel kalıtımı (D13S317) (İnt.Kyn. 4).

Çizelge 4.1 Şekil 4.5-4.6’da gösterilen olay yerinde bulunan izmaritten izole edilen DNA ile şüpheliye ait kan örneğinden elde edilen DNA’ların elektroforez görüntülerine ait veriler.

| Bulduğu lokus | Alel no | |
|---------------|---------------------|--------------|
| | Olay yeri materyali | Şüpheli kanı |
| Amelogenin | XY | XY |
| CSF1PO | 9-12 | 9-12 |
| D2S1338 | 18-24 | 18-24 |
| D3S1358 | 15-16 | 15-16 |
| D5S818 | 11-12 | 11-12 |
| D7S820 | 10-12 | 10-12 |
| D8S1179 | 14-15 | 14-15 |
| D13S317 | 9-11 | 9-11 |
| D16S539 | 11-13 | 11-13 |
| D18S51 | 15-20 | 15-20 |
| D19S433 | 14 | 14 |
| D21S11 | 29 | 29 |
| FGA | 22-24 | 22-24 |
| TH01 | 7 | 7 |
| TPOX | 8-9 | 8-9 |
| Vwa | 14-16 | 14-16 |

Çizelge 4.2 Şekil 4.7-4.8’de gösterilen cinayet vakasında maktûlün tırnak kirinden izole edilen DNA ile şüpheliye ait kan örneğinden elde edilen DNA’ların elektroforez görüntülerine ait veriler.

| Bulunduğu lokus | Alel no | |
|-----------------|---------------------|--------------|
| | Olay yeri materyali | Şüpheli kanı |
| Amelogenin | XY | XY |
| CSF1PO | 10 | 10 |
| D2S1338 | 24 | 24 |
| D3S1358 | 15-16 | 15-16 |
| D5S818 | 11 | 11 |
| D7S820 | 7-12 | 7-12 |
| D8S1179 | 13-14 | 13-14 |
| D13S317 | 9-13 | 9-13 |
| D16S539 | 9-12 | 9-12 |
| D18S51 | 13-18 | 13-18 |
| D19S433 | 14-15.2 | 14-15.2 |
| D21S11 | 31.2-32.2 | 31.2-32.2 |
| FGA | 21 | 21 |
| TH01 | 9 | 9 |
| TPOX | 8 | 8 |
| vWA | 19 | 19 |

Çizelge 4. 3 Şekil 4.9-4.10’da gösterilen bir cinayet vakasında olay yerinde bulunan kıl örneğinden izole edilen DNA ile şüpheliye ait kan örneğinden elde edilen DNA’ların elektroforez görüntülerine ait veriler.

| Bulduğu lokus | Alel no | |
|---------------|---------------------|--------------|
| | Olay yeri materyali | Şüpheli kanı |
| Amelogenin | XY | XY |
| CSF1PO | 12 | 12 |
| D2S1338 | 18-21 | 18-21 |
| D3S1358 | 16-17 | 16-17 |
| D5S818 | 11-12 | 11-12 |
| D7S820 | 11-12 | 11-12 |
| D8S1179 | 13-15 | 13-15 |
| D13S317 | 10-12 | 10-12 |
| D16S539 | 12-13 | 12-13 |
| D18S51 | 13-19 | 13-19 |
| D19S433 | 13-15.2 | 13-15.2 |
| D21S11 | 31.2 | 31.2 |
| FGA | 21 | 21 |
| TH01 | 8-9 | 8-9 |
| TPOX | 8 | 8 |
| vWA | 17-20 | 17-20 |

Çizelge 4. 4 Şekil 4.11-4.12’de gösterilen bir cinayet vakasında olay yerinde bulunan pet şişeden izole edilen DNA ile şüpheliye ait kan örneğinden elde edilen DNA’ların elektroforez görüntülerine ait veriler.

| Bulduğu lokus | Alel no | |
|---------------|---------------------|--------------|
| | Olay yeri materyali | Şüpheli kanı |
| Amelogenin | XY | XY |
| CSF1PO | 10-12 | 10-12 |
| D2S1338 | 22-25 | 22-25 |
| D3S1358 | 18 | 18 |
| D5S818 | 10-12 | 10-12 |
| D7S820 | 10 | 10 |
| D8S1179 | 14-15 | 14-15 |
| D13S317 | 9-11 | 9-11 |
| D16S539 | 11-12 | 11-12 |
| D18S51 | 11-16 | 11-16 |
| D19S433 | 14-15.2 | 14-15.2 |
| D21S11 | 29-32.2 | 29-32.2 |
| FGA | 21-24 | 21-24 |
| TH01 | 6-9.3 | 6-9.3 |
| TPOX | 11 | 11 |
| vWA | 14-19 | 14-19 |

Çizelge 4. 5 Şekil 4.13-4.14’te gösterilen bir nesep davasında cenin’den izole edilen DNA ile baba adayına ait kan örneğinden elde edilen DNA’ların elektroforez görüntülerine ait veriler.

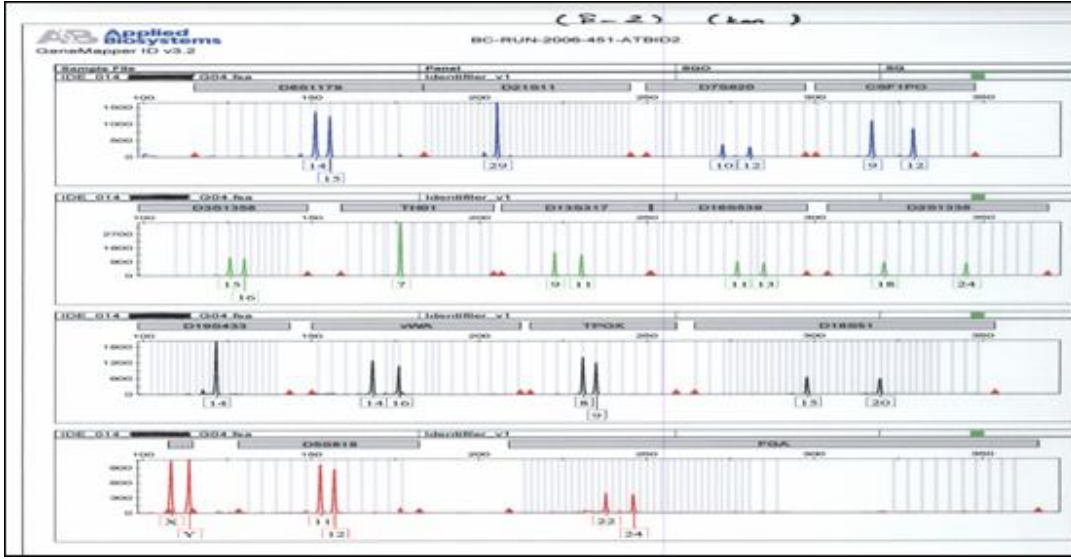
| Bulunduğu lokus | Alel no | |
|-----------------|---------------|-------|
| | Çocuk (cenin) | Baba |
| Amelogenin | XY | XY |
| CSF1PO | 10-11 | 10-11 |
| D2S1338 | 21-23 | 21-24 |
| D3S1358 | 15-18 | 15-18 |
| D5S818 | 11-12 | 11 |
| D7S820 | 8-9 | 8-9 |
| D8S1179 | 11-14 | 11-12 |
| D13S317 | 8-12 | 8-13 |
| D16S539 | 10 | 9-10 |
| D18S51 | 14-15 | 13-15 |
| D19S433 | 12-13 | 12-15 |
| D21S11 | 29-33 | 27-29 |
| FGA | 21-24 | 19-24 |
| TH01 | 6-9.3 | 7-9.3 |
| TPOX | 8-9 | 9-11 |
| vWA | 17 | 17-20 |

Çizelge 4. 6 Şekil 4.15-4.16’da gösterilen bir cinayet davasında şüpheli üzerinde bulunan bıçaktan izole edilen DNA ile maktüle ait kan örneğinden elde edilen DNA’ların elektroforez görüntülerine ait veriler.

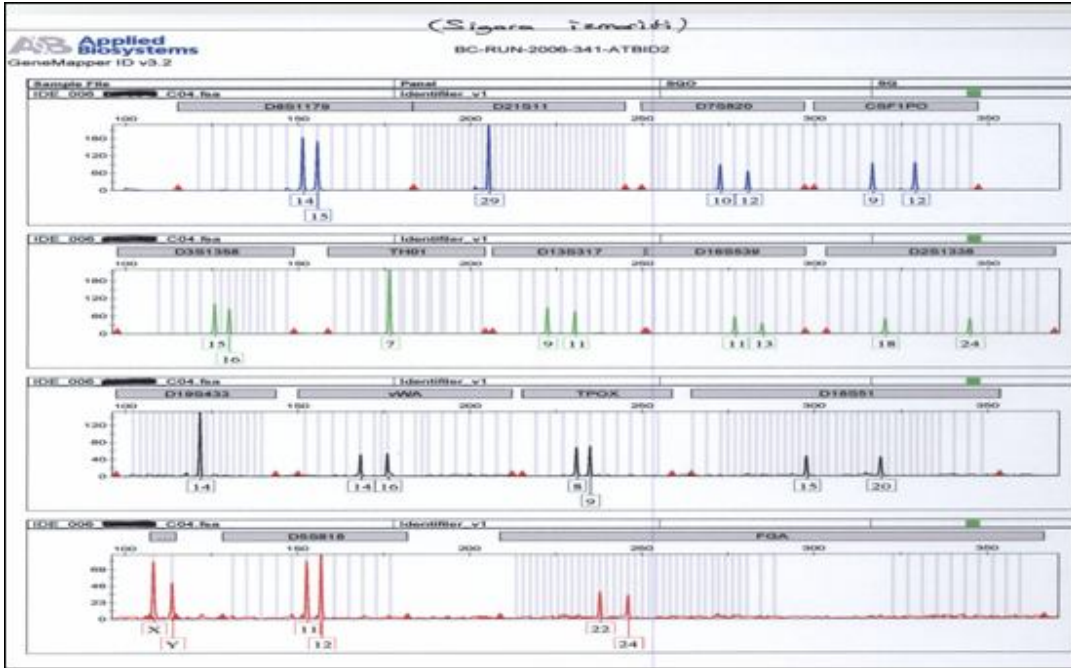
| Bulunduğu lokus | Alel no | |
|-----------------|---------------------|-------------|
| | Olay yeri materyali | Maktül kanı |
| Amelogenin | X | X |
| CSF1PO | 10-11 | 10-11 |
| D2S1338 | 17 | 17 |
| D3S1358 | 15-16 | 15-16 |
| D5S818 | 11-12 | 11-12 |
| D7S820 | 10-12 | 10-12 |
| D8S1179 | 13-17 | 13-17 |
| D13S317 | 8-12 | 8-12 |
| D16S539 | 11 | 11 |
| D18S51 | 15-20 | 15-20 |
| D19S433 | 14-15 | 14-15 |
| D21S11 | 28-32.2 | 28-32.2 |
| FGA | 22-24 | 22-24 |
| TH01 | 6 | 6 |
| TPOX | 10-11 | 10-11 |
| vWA | 17 | 17 |

Çizelge 4. 7 Şekil 4.17-4.18’de gösterilen kimliği meçhul cesede ait doku örneğinden izole edilen DNA ile cesede ait olabileceği değerlendirilen kıl örneğinden elde edilen DNA’ların elektroforez görüntülerine ait veriler.

| Bulunduğu lokus | Alel no | |
|-----------------|---------------------|-------------|
| | Olay yeri materyali | Maktül kanı |
| Amelogenin | X | X |
| CSF1PO | 11 | 11 |
| D2S1338 | 17-20 | 17-20 |
| D3S1358 | 15-18 | 15-18 |
| D5S818 | 12 | 12 |
| D7S820 | 11-12 | 11-12 |
| D8S1179 | 11-13 | 11-13 |
| D13S317 | 8-12 | 8-12 |
| D16S539 | 9-11 | 9-11 |
| D18S51 | 12-20 | 12-20 |
| D19S433 | 12-14 | 12-14 |
| D21S11 | 30-33.2 | 30-33.2 |
| FGA | 24-26 | 24-26 |
| TH01 | 7-9 | 7-9 |
| TPOX | 10-11 | 10-11 |
| vWA | 14-17 | 14-17 |



Şekil 4.5 Bir cinayet vakasında şüphelinin kanından izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü.



Şekil 4.6 Aynı vaka ile ilgili olay yerinde bulunan izmaritten izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü.



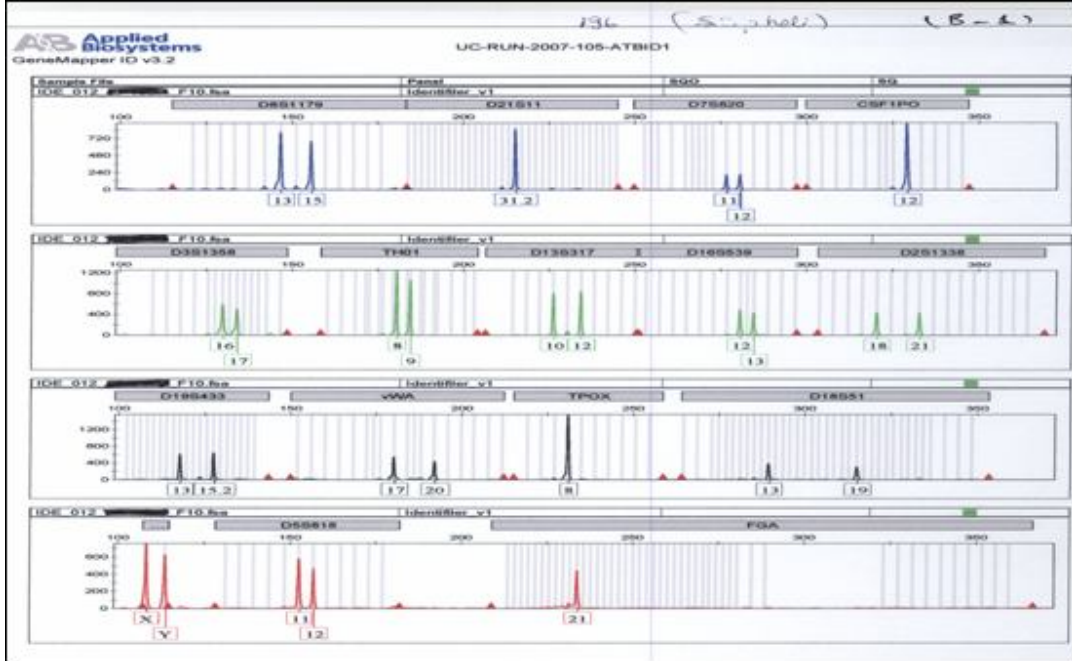
Şekil 4.7 Bir cinayet vakasında şüphelinin kanından izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü.



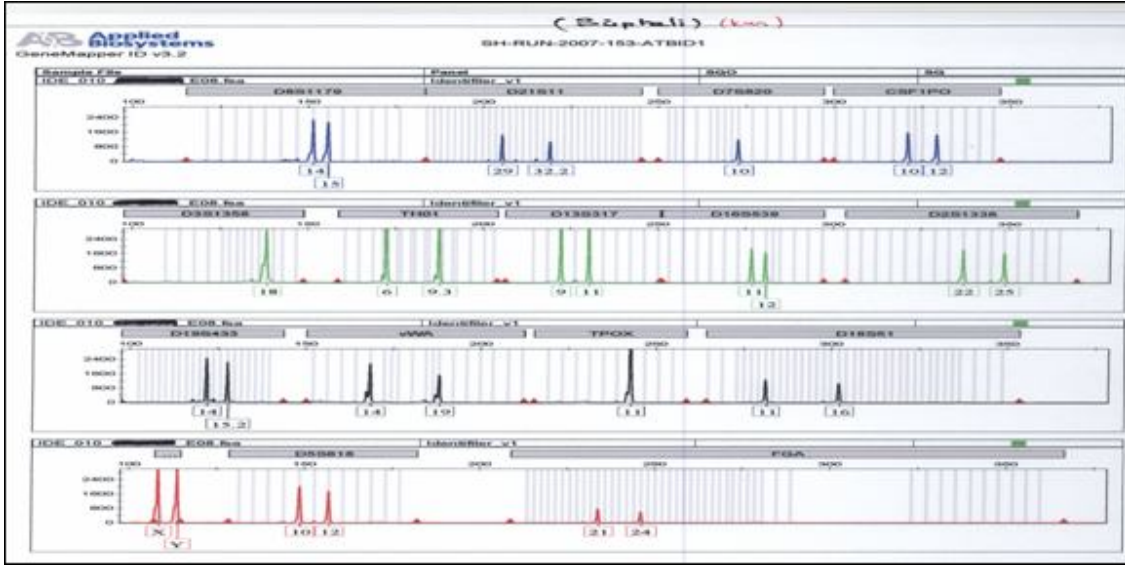
Şekil 4.8 Bir cinayet vakasında maktulün tırnak kiri materyalinden izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü.



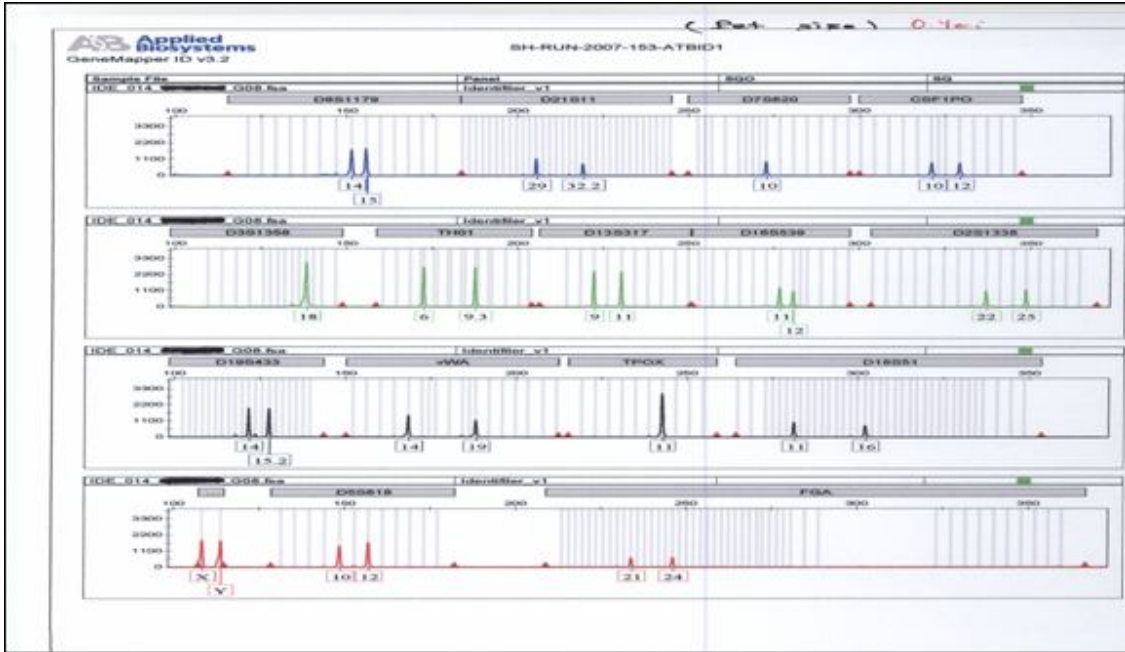
Şekil 4. 9 Bir cinayet vakasında olay yerinde bulunan kıl örneğinden izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü



Şekil 4. 10 Aynı vaka ile ilgili şüphelinin kanından izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü.



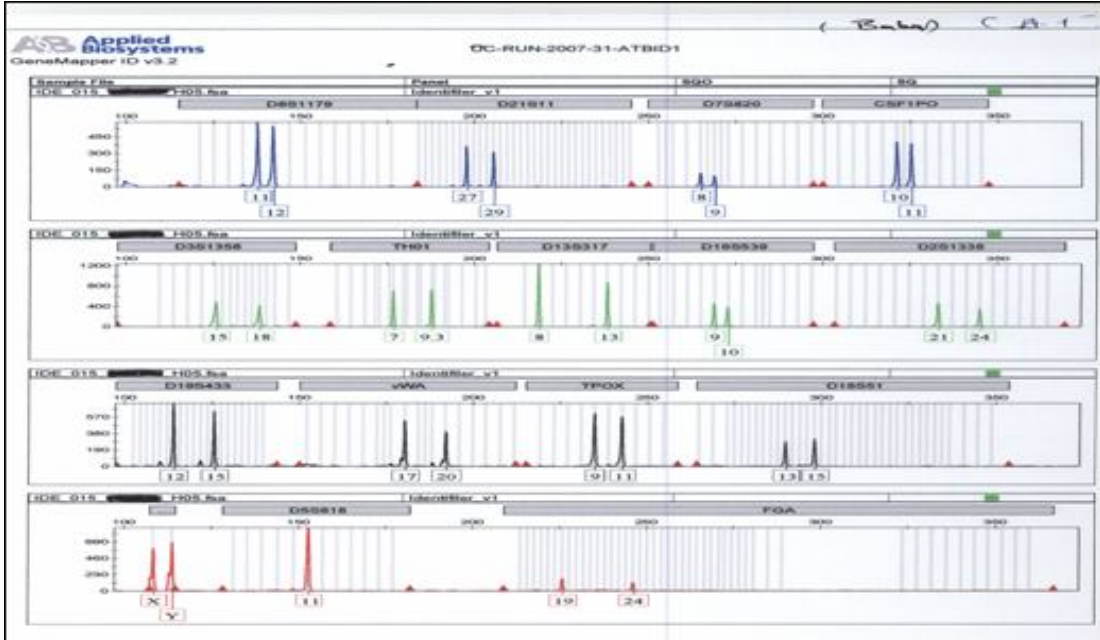
Şekil 4.11 Bir cinayet vakasında şüpheliye ait kandan izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü



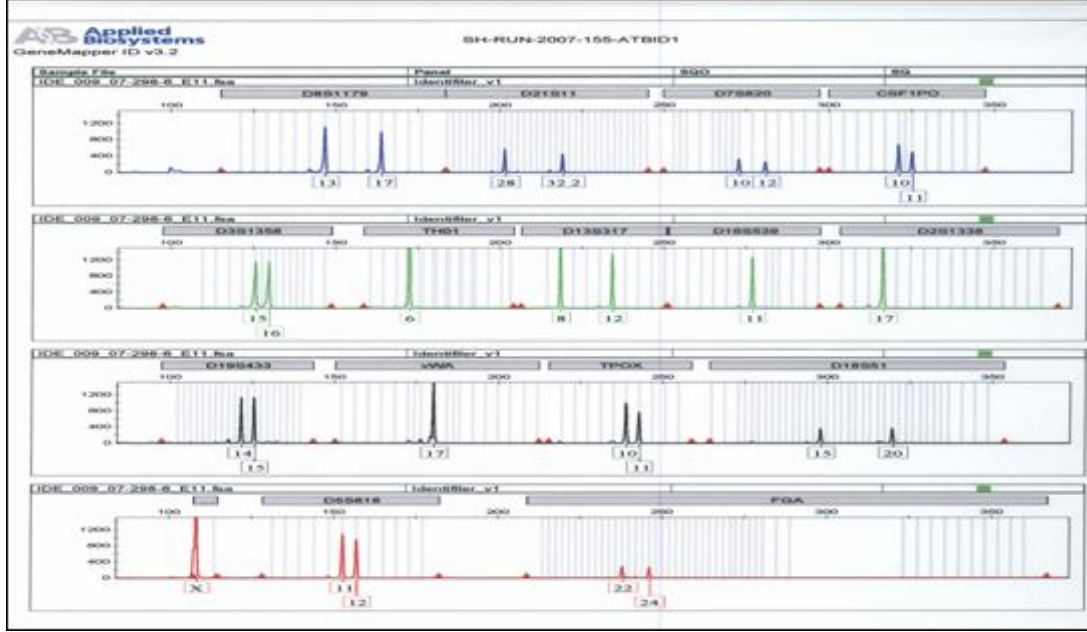
Şekil 4. 12 Bir cinayet vakasında olay yerinde bulunan pet şişeden izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü.



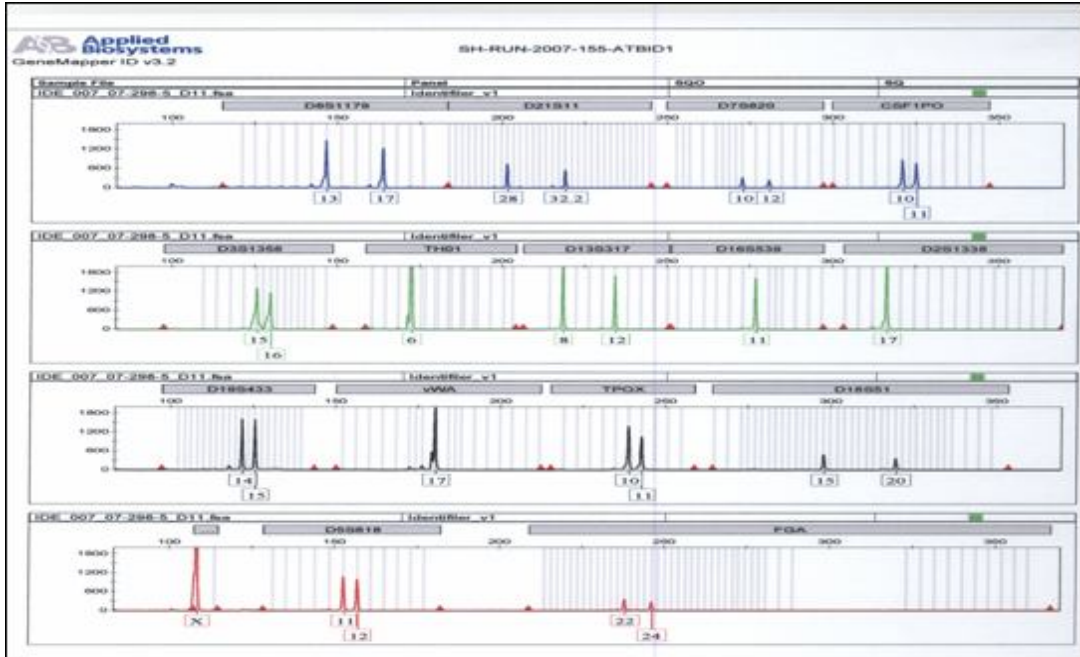
Şekil 4. 13 Bir nesep davasında ceninden izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü.



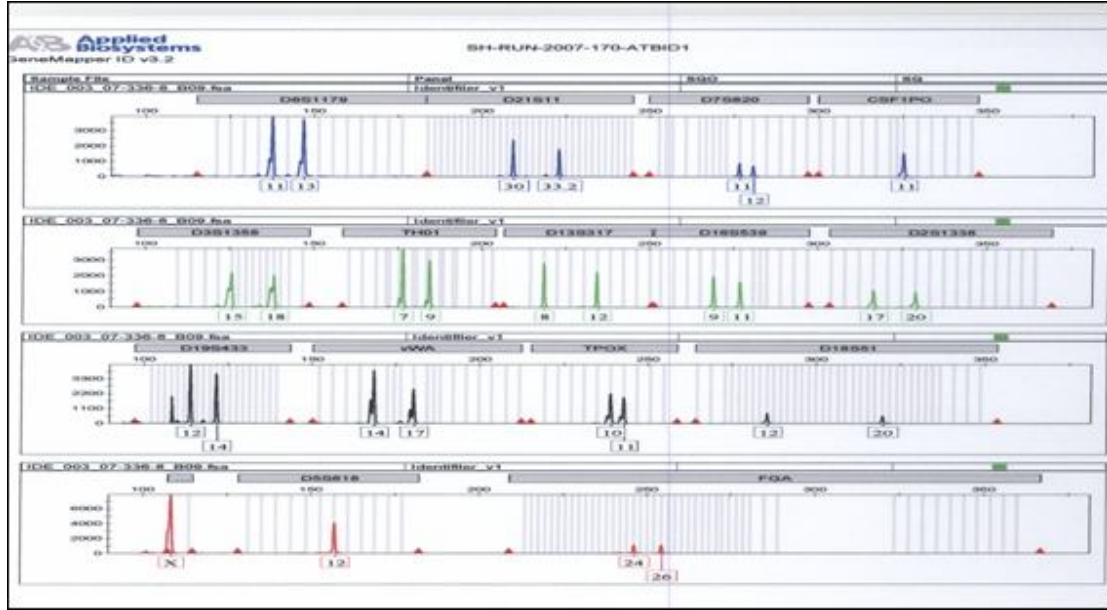
Şekil 4. 14 Aynı dava ile ilgili baba adayına ait kandan izole edilen DNA'nın ait kapiller elektroforez görüntüsü.



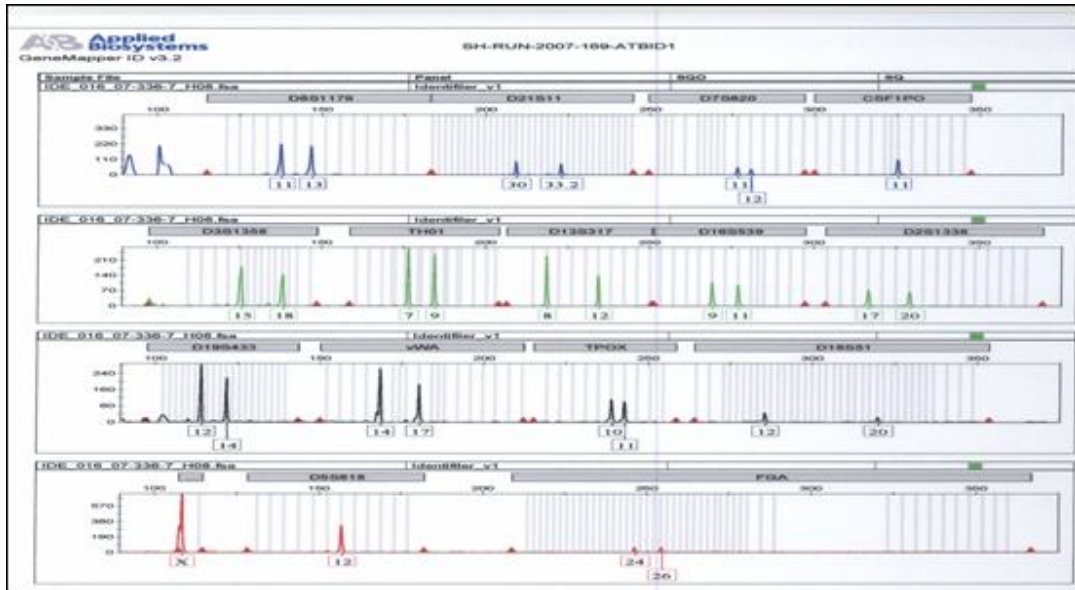
Şekil 4. 15 Bir cinayet davasında şüpheli üzerinde bulunan bıçaktaki kan lekesinden izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü.



Şekil 4. 16 Aynı davayla ilgili maktulün kanından izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü.



Şekil 4. 17 Kimliği belirsiz bir cesede ait doku örneğinden izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü.



Şekil 4. 18 Mevtanın kendi çocukları olduğundan şüphelenen aile tarafından, mevtanın şahsi yastığı üzerinden temin edilen kıl örneğinden izole edilen DNA'ya ait kapiller elektroforez görüntüsü.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızın amacı, adli tıpta moleküler genetik yöntemlerin kullanımı ve uygulamalarını, bu yöntemlerle elde edilen DNA tiplerinin yapılması ve bu yolla kişileştirmenin gerçekleştirilmesinde, bu yöntemlerin adli tıp alanındaki önemini göstermektir.

Adli bilimler alanında moleküler genetik yöntemlerin kullanımı ile günümüz ve gelecekte işlenebilecek suçların aydınlatılması yolunda bir çığır açılmıştır. Günümüzde var olan teknik olanaklarla bugün saç kepeğinden, kullanılmış diş fırçasından, sigara izmaritlerinden ve insan hücresi içerebilecek akla gelen her örnekten hareketle suçluya ulaşmak mümkün olabilmektedir. DNA incelemeleri çok az başlangıç materyali gerektirdiklerinden, olay yerinde bulunabilecek minimal düzeydeki örneklerden hareketle sonuca ulaşılabilir. Ayrıca DNA molekülü stabildir, kan hücreleri ve enzimler gibi bozunmaya eğilimli değildir ve teknik hata olmadığı sürece yanlış kişileştirme yapılmaz. Adli bilimlerde kişileştirme dendiğinde esasen iki biyolojik örneğin genetik materyalinin karşılaştırılması sonucunda, kaynak belirtimine gidebilmek anlaşılır. Bu tür karşılaştırmaların sonucunun mahkemede delil oluşturabilmesi, ancak kullanılan tekniklerin kabul görmüş bilimsel teknikler olması durumunda mümkündür. DNA analizine uygun örnekler çekirdekli hücreleri içeren biyolojik materyal ile sınırlanmıştır. Günümüzde başarıyla DNA izolasyonu ve tiplendirmesi yapılabilen biyolojik materyaller kan ve kan lekesi, semen ve seminal sıvılar, doku ve organlar, kemik ve dişler, saç ve tırnaklar, tükürük, idrar ve diğer biyolojik sıvılar şeklinde sıralanabilir (DEÜ 2000).

İdentifikasyon çalışmalarında STR (kısa tekrar zincirleri) sık kullanılır. STR lar 3 ile 7 baz çifti uzunluğunda tekrarlayan zincirlerdir (Edwards at al. 1991, Wame at al.1991). Bu yaygın tekrarlar insan genomuna iyi yayılmışlardır ve PCR ile kolayca tespit edilebilen polimorfik bölgelerin kaynağıdır (Ausubel et al. 1992, Innis et al.1990). Bölgeler polimorfik olunca her insanda spesifik farklılık gösterir. İşte adli tıp kişi identifikasyonun da bu bölgelerden faydalanır.

Higuchi ve arkadaşları, 1988 yılında, saç kökünün protein kılıfından, taze koparılmış saç köklerinden ve bir tek saç kılından mitokondrial ve nükleer DNA dizilerini araştırdılar. Saç kökünden ve taze koparılmış kılılardan 0,5 µg dan fazla miktarda DNA elde ettiler. Oysaki köksüz saçlardan elde ettikleri DNA miktarı 0,5 µg den daha azdı. Böylelikle Higuchi ve arkadaşları saç kılında DNA'nın çoğunluğunun kök ve kılıf hücrelerinde olduğunu tespit etmişlerdir. Elde ettikleri DNA'ları çoğaltıp, parçacık uzunluklarına göre elektroforezde ayırdılar. DNA çekitmesinde uyguladıkları yöntem Fenol-Klorofom yöntemi idi. Bu yöntemde saf ve yeterli miktarda DNA elde edilmesine karşın bir çok işlem basamakları gerektirmesi, bu basamaklarda DNA izolatını başka kaplara aktarılması, yıkama gerektiren filtrelerin veya kolonların kullanıldığı tuz arıtma işlemi sırasında kontaminasyon ya da örneklerin karşı transfer (cross-transfer) oluşturması, araştırmacıları daha kullanışlı DNA çekitleme yöntemlerine sevk etmiştir. Biz de bu nedenlerden dolayı çalışmamızda DNA izolasyonunu Qiagen izolasyon kiti'ni kullanarak gerçekleştirdik.

Hochmeister ve arkadaşları 1995 yılında, yaklaşık bir yıl önce kaçırıldığı bildirilen bir kadının bulunan iskelet kalıntılarından identifikasyon amacıyla multiplex PCR sistemlerini kullandılar. Femur kemiğinden elde edilen nükleer DNA profili, kadının saç fırçasından çıkarılan saçlarından izole edilen DNA sonuçları ile karşılaştırıldı. Günümüzde kullanımı çok yaygın hale gelen PCR teknolojisine dayanan STR tiplemesi Hochmeister ve arkadaşlarınca saç kılı ve kemik örneklerine uygulandı. Çalışmanın multilocus Prob testi şeklinde yapılması kişileştirmedeki ayırım gücünü ve dışlama olasılığını çok fazla arttırmıştır. Biz de çalışmamızda Multiplex PCR sistemlerinden Qiagen PCR kit ile STR tiplendirme işlemi uyguladık. Hochmeister ve arkadaşları fırçadan aldıkları köklü kılılarda, Fenol Kloroform izolasyon yöntemini kullandılar. Biz ise kemik ve diş örnekleri hariç köksüz kıl da, dahil tüm örneklere Qiagen izolasyon kit protokolünü uyguladık. Kemik ve diş örnekleri için, Fenol-Kloroform izolasyon yöntemini kullandık. Elde edilen DNA lar ile STR sistemlerinin çalışılması kimliklendirmede güvenilir ve başarılı sonuçlar alınmasını sağlamaktadır. Bu STR sistemleriyle yapılan DNA tiplemelerinde dışlama olasılığı, kıl ile kimliklendirmede, diğer yöntemlere oranla daha fazladır. Kendiliğinden

dökülmüş kıllarda ve çok uzun süre beklenmiş kıllarda bile STR sistemleri ile çalışılabilmesi sonucu iyi sonuçlar alınması, kıl kökü enzim polimorfizmine karşı DNA tiplemesinin üstünlüğünü göstermiştir.

İnsan kalıntılarında kimlik tespiti adli bilimlerin ana konularından biridir. Bu amaçla uzun yıllar antropolojik metotlar kullanılmışsa da, bu şekilde her zaman kimliklendirme yapmak mümkün olmamaktadır (Andaras at al. 1996). Bununla birlikte bu yöntemlerle kimliklendirme yapılabildiği durumlarda bile, Josef Mengele olayında olduğu gibi bu sonucu destekleyen bir başka kanıtı ihtiyaç duyulabilmektedir (Jeffreys at al. 1985) Nesep tayini yapılması istenen davalarda, taraflardan biri ölmüş ise gerçeğin ortaya çıkarılmasında bu kişiye ait kemiklerden başka incelenecek örnek yoktur. Bu durumda antropolojik yöntemler işe yaramayacağından kemik örneklerden DNA düzeyinde inceleme yapmak şarttır. Günümüzde aşırı derecede çürümüş, yanmış, iskelet haline gelmiş cesetlerin, kemik dokusundan DNA izolasyon ve tiplendirme teknikleri kullanılarak kimlik veya nesep tayini yapılabilmektedir. Elde edilen DNA bilgisi, mahkemeler tarafından kanıt olarak kabul edilmektedir. Bundan dolayı, gerek kimliği meçhul iskeletlerin kimliklendirilmesi gerekse nesep tayinlerinde söz konusu izolasyon ve tiplendirme tekniklerinin Türkiye’de de kullanılması adli bilimler açısından bir zorunluluk oluşturmaktadır.

İnsan genomu üzerinde çok fazla sayıda tanımlanmış STR lokuslarına rağmen çok az sayıda Y kromozomuna özgü STR lokusları tanımlanabilmiştir. Y STR’ lar rutin adli çalışmalar ve popülasyon genetiği çalışmaları açısından oldukça bilgi vericidir (Pritchard at al. 1999). Özellikle itham edilen babanın ölmüş olması durumunda olayın aydınlatılması için şüpheli kişinin erkek yakın akrabalarından elde edilebilecek DNA örneği ile babalık davası aydınlatılabilir (Gusmao at al. 1999).

Abortus (kürtaj) materyalinden babalık tayini gerektiğinde eğer fetus dişi ise X-STR analizi büyük kolaylık sağlar. Çünkü kürtaj materyalinden fetal dokunun gözle ayırt edilmesi gebeliğin yaşı ile ters orantılı olarak hemen hemen imkansızdır. Bu nedenle rastgele yapılan örnekleme sonucunda yapılan DNA analizi sıklıkla sadece anneye ait

alelleri içerirken şanslı olunan bazı vakalarda anne ile fetusun alellerinin miks olarak yer aldığı bir sonuçla karşılaşılır. Böyle bir miks örneğe otozomal STR çalışılmış olması halinde değerlendirme gücünü yaratacak ve bu durumun yarattığı şüpheli durumdan sanık yararlanacaktır. Oysa fetusun dişi olması koşulu ile X-STR analizi değerlendirme kolaylığı sağlar. Saptanan alellerden annede bulunmayan babadan kalıtılmıştır. Vakanın baba ensesti olması halinde ise bu marker otozomal STR'lardan fazla bir ayırım imkanı tanımaz. Çünkü kız fetusun bir X aleli anneden gelirken sahip olduğu diğer X'in kaynağı annenin babası, yani sözkonusu olaydaki faildir. Bu uyum ancak başka delillerle desteklendiğinde anlamlı olabilir (Szibor at al. 2003).

Anneliğin doğum kayıtları nedeni ile ispatı daha kolay olmakla birlikte varlığı zaman zaman sorgulanmaktadır. Özellikle modern batı toplumunda parçalanmış evlilikler ve tek ebeveynle büyüyen çocuklarda annelik tayini sıklıkla gündeme gelmektedir. Türk toplumunda ise bu tespiti sıklıkla çocuğun bir akrabaya evlatlık verildiği durumlarda ihtiyaç duyulmaktadır. Bu davalar özellikle annenin ölümünden sonra açılmaktadır. Annelik mtDNA yardımı ile araştırılabilir olsa da bu yöntemin zorluğu ve pahalı olması yanında henüz her toplumda yeterli genetik populasyon verisinin bulunmaması gibi kısıtlayıcı tarafları bulunmaktadır. Ayrıca aynı maternal kalıtımın olduğu bireyler arasında ayırım yapılamayacağından elde edilen sonuç STR'lar kadar kesinlik göstermez. Bu durumda X-STR analizi iyi bir alternatiftir. Anne kız arasındaki ilişki açısından otozomal STR'lara bir üstünlüğü yok ise de anne-erkek çocuk ilişkisinde otozomal STR'lardan çok daha etkili bir araçtır. Anne-erkek çocuk vakalarında dışlama olasılığı baba-kız çocukta olduğu gibi otozomal STR'lardan yüksektir (Szibor at al. 2003).

Bu tez çalışmasında adli tıp uygulamalarında moleküler genetik yöntemlerden, PCR, otozomal STR, X-STR, ve Y-STR yöntemlerinin diğer yöntemlere göre daha sık kullanıldığı tespit edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Ago, K., Yuasa, I., Umetsu, K., Ago M., Ogata, M., 2000, "Y chromosomal STR haplotyping in a Japanese population", *Legal Medicine*, Vol.2, pp.163-165.
- Albek, E., Soysal, Z., Çakalır, C., 1999. " Kan ve Vücut Sıvılarından İdentifikasyon ve Diferansiasyon", *Adli Tıp Cilt II, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları Bölüm 22*, s.869-875, İstanbul.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M. and Keith, R., 2002, "Molecular Biology of the Cell", Garland Science, 4.edition, New York.
- Amigo, M.T., Sanudo, C., Zarabeitia, A., Lamuno, D.G. and Riancho, J.A., 2002, "A new pentaplex system to study short tandem repeat markers of forensic interest on X chromosome", *Forensic Science International*, Vol.129, pp.85-89.
- Asamura, H., Sakai, H., Kobayashi, K., Ota, M. ve Fukushima H., 2006, "Mini X-STR multiplex system population study in Japan and application to degraded DNA analysis", *International Journal of Legal Medicine*, Vol.11, pp.1-8
- Andaras, J., Garcia, E., Camara, T., Prieto, L., Lopez, J., 1996, "Identification of human remains using DNA Amplification (PCR)", *Advances in Forensic Haemogenetics*, 6.edition, Berlin, pp.258-260
- Aşıcıoğlu, F., Savran, F.O., Özbek, U., 2004. Mutation rate at commonly used forensic STR loci: paternity testing experience, *Disease Markers*, 20(6):313-5.
- Ausubel, F.M., 1992, "The Polymerase Chain Reaction", In: *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Unit 15, New York.
- Balazs, I., Robertson, J., Ross, A.M., Burgoyne, L.A., 1990. "Properties of hypervariable hypervariable single locus polymorphisms and their application to identity testing, DNA in Forensic Science", Ellis Horwood Limited, England, pp.112-124.

- Barinaga M., 1989, "DNA Fingerprinting Pitfalls Come To Light, Nature, Vol.389, pp.89
- Başaran, N., 1996, "Tibbi Genetik", Bilim Teknik Yayınevi, 6.Baskı, Eskişehir.
- Becker, Dorit., Bender, Klaus., t Edelmann, Jeanet., Gotz, Frank., Henke, Lotte., Sandra Hering , Carsten Hohoff , Karolin Hoppe , 2007, New alleles and mutational events at 14 STR loci from different German populations, Forensic Science International: Genetics Vol.1, pp.232–237
- Bendall K.E. and Sykes B.C., 1995, Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region, American Journal Human Genetik, Vol.57, pp.248-56.
- Budowle, B., Lindsey, J.A., De Cou, J.A., Koons, B.W., Guisti, A.M. and Comey, C.T., 1995. "Validation and population studies of the loci LDLR, GYPA, HBG, D7S8, Gc(PM loci) and HLADQ alpha using a multiplex amplification and typing prosedure", Journal of Forensic Sciences, Vol.40, pp. 45-54.
- Brinkmann, B., Klitschar, M., Neuhuber, F., Huhne, J. and Rolf, B., 1998, "Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat", American Journal of Human Genetics, Vol.62, pp.1408-1415.
- Caroline Murray, Colin McAlister, Keith Elliott, 2007, "Identification and isolation of male cells using fluorescence in situ hybridisation and laser microdissection, for use in the investigation of sexual assault", Forensic Science International: Genetics Vol.1, pp.247–252
- Case, J. and Wallace, D., 1981, "Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts", Somatic Cell Genetics, pp.103-108.
- Chantal J. Fregeau and Ron M. Fourtney 1992. "DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats A sensitive and accurate approach to human, identification." Research Report Biotechniques, Vol.15, No:1, pp. 100-118.

- Chen, J., Kadlubar, F.F., Chen, J.Z. 2007, DNA supercoiling suppresses real-time PCR: a new approach to the quantification of mitochondrial DNA damage and repair, *Nucleic Acids Research* 35, 1377–1388.
- Chung-Yen Pai, Su-Lien Chou, Frank-Fu Yuan Huang, 2007, "Assessment of the role of a functional VNTR Polymorphism in MAOA gene promoter: a preliminary study", *Forensic Science Journal*, Vol.6(2), pp.37-43
- DEÜ, 2000, "İnsan Genomu, Suç ve Suçun önlenmesi" Dokuz Eylül Üniversitesi İnsan Genom Projesi Dergisi.
- Dilmec, Fuat., Uzer, Elmas., Akkafa, Feridun., Elif Kose, AndreB.P. van Kuilenburg, 2008, "Detection of VDR gene ApaI and TaqI polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus using PCR-RFLP method in a Turkish population", Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Harran University, Sanliurfa, Turkey
- Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M. ve Freimer N.B. 1994. "Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.91, pp.3166-3170
- Dinger, D., 1996. "Gen mutasyonları ve DNA polimorfizmleri" *Medikal Biyoteknoloji ve Moleküler Tıp Dergisi*, sayfa 88-95.
- Dupuy, BM., Andreassen, R., Fiones, A.G., Tomassen, K., Egeland, T., Brion, M., Carracedo, A., Olaisen, B., 2001, "Y chromosome variation in a Norwegian population sample" *Forensic Science International*, Vol.117, pp.163-173
- Edelmann, J., Deichsel, D., Hering, S., Plate, I. and Szibor, R., 2002, "Sequence variation and allele nomenclature for the X-linked STRs DXS9895, DXS8378, DXS7132, DXS6800, DXS7133, GATA172D05, DXS7423 and DXS8377", *Forensic Science International*, Vol.129, pp.99-103.

- Edelmann, J., Hering, S., Kuhlisch, E. and Szibor, R., 2002, "Validation of the STR DXS7424 and the linkage situation on the X-chromosome", *Forensic Science International*, Vol.125, pp.217-222
- Edwards, A., Civitello, A., Holl, H. and Thomas, C. 1991. "DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats." *American Journal Human Genetics*, Vol.49, pp 746-756.)
- Erdağ B., Çırakoğlu B. 1994. "DNA Parmakizi Tekniginde Farklı Bir Yaklaşım." 1. Adli Bilimler Kongresi, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, s.196-198.
- Erlich, H.A.(Ed.). 1989. "PCR technology: principles and applications for DNA amplification". New York: Stockton Press, pp.246.
- Dubut, Vincent., Cartault, François., Gilles, Andre., Thionville, Marie-Dominique., Murail, Pascal. 2009, "Genetic data analysis of 10 Y-STR loci in two ethnic groups of Asian ancestry (Gujarat and Guangdong-Fujian provinces) from Reunion Island (Indian Ocean)", *Legal Medicine* Vol.11, pp.104–106.
- Fisher, B.A., Block, S. 1998. *Techniques of Crime Scene Investigation*, CRC Press, 5.edition, Boca Raton, pp.5-26, 34-72.
- Farrall, M. and Weeks D.E. 1998. "Mutational mechanisms for generating microsatellite allele-frequency distributions: an analysis of 4,558 markers", *American Journal of Human Genetics*, Vol.62, pp.1260-1262.
- Gill P., Kimpton C., D'Aloja E., Andersen J.F., 1994, "Report of the European DNA profiling group (EDNAP) towards standardisation of short tandem repeat (STR) loci", *Forensic Science International*, Vol.65, pp.51-59
- Goldstein ,D.B., Linares A.R., Cavalli-Sforza C.C., Feldmann, M.W., 1995, "An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci", *Genetics*, Vol.139, pp.463-471
- Graul A.T., 1989, "Polymerase chain reaction" *Technology* 95-98.
- Grunbaum, B.W., 1989. Admissibility of biochemical analyses results from sexual evidence in the United States courts. *Med Law* 8 (5): 485-492. Review.

- Güney, D. B., 1998, "Kriminal Alanda Bulunan Eser Miktardaki Delillerden DNA Çekitlemesinde Üç Ayrı Yöntemin Karşılaştırılması", Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri ABD, İstanbul.
- Gusmao, L., Bnon, M., Neira, A.G., Lareu, M., Carracedo, A., 1999, "Y Chromosome specific polymorphisms in forensic analysis" *Legal Medicine*, Vol.1, pp.55-60
- Hallenberg, C. ve Morling N., 2001, "A report of the 1997, 1998 and 1999 paternity Testing Workshops of the English Speaking Working Group of the international Society for Forensic Genetics", *Forensic Science International*, Vol.116(1), pp.23-33.
- Helmuth, R., Fildes, N., Blake, E., Luce, M.C., Chimera, J., Madej, R., Gorodezky, C., Stoneking, M., Schmill, N., Klitz, W., Higuchi, R. Ve Erlich, H.A. 1990, "HLADQ a allele and genotype frequencies in various human populations, determined by using enzymatic amplification and oligonucleotide probes", *American Journal of Human Genetics*, Vol.47, pp.515-523.
- Hidding M., Schmitt C, 2000, "Haplotype frequencies and population data of nine Y chromosomal STR polymorphism in a German and a Chinese population", *Forensic Science international*, Vol.113, pp.47-53
- Hill, W.G., 1987, "DNA fingerprinting applied to animal and bird populations", *Nature Journal* Vol.327, pp.124-126.
- Hochmeister, M.N., Budowle, B., Bome, U.V., Rudun, O., Dirnhaler, R., 1995, "Confirmation of identity of human skeletal remains using multiplex PCR amplification and Typing kits", *Journal of Forensic Sciences*, Vol.4, pp.701-705.
- Holland, M.M., Cave, C.A., Holland, C.A and Bille, T.W., 2003, "Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks". *Croatian Medical Journal*, Vol.44(3), pp.264-272.

- Holland, M.M., and Parsons, T.J., 1999, "Mitochondrial DNA Sequence Analysis Validation and Use for Forensic Casework", *Forensic Science Review*, Vol.11, pp.21-50.
- Hou, Y.P., Zhang, J., Li, Y.B., Zhang S.Z., 2001, "Allele sequences of six new Y-STR loci and haplotypes in the Chinese Han population", *Forensic Science International*, Vol.118, pp.153-157
- Huang, N.E, Schim J. and Budowle., 1995, "Chinese population Data on three tetramers short tandem repeat loc: Hum TH01, TPOX, and CSF1PO derived using multiplex PCR and manual Typing", *Forensic International* , Vol.71(2) , pp.131-136.
- Hudlow, William R., Chong, Mavis Date., Swango, Katie L., Timken, Mark D., Martin R. Buoncristiani. 2008, "A quadruplex real-time qPCR assay for the simultaneous assessment of total human DNA, human male DNA, DNA degradation and the presence of PCR inhibitors in forensic samples: A diagnostic tool for STR typing" *Forensic Science International: Genetics* Vol.2 , pp.108–125
- Hutchinson, C.A., Newbold, J.E., Potter, S.S. and EdgeII, M.H., 1974, "Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA", *Nature*, Vol.251, pp.536-538.
- Inman, K. and Rudin, N., 1997, "An Introduction to Forensic DNA Analysis", CRS Press LLC, 1. edition, Boca Raton, USA.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., 1990, "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, London, pp. 28-38
- J. Henke, L. Henke., 1999, "Mutation rate in human microsatellites", *American Journal of Human Genetics* Vol.64, pp.1473-1474.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. ve Thein, S.L.,1985, " Individual specific fingerprints of human DNA", *Nature Journal*, Vol.316, pp.75-79.
- Jeffreys A.J, Wilson, V., Thein, S.L (1985) "Hypervariable minisatellite regions in Human DNA" *Nature Journal*, Vol.314 pp: 67-73.

- Jin, L., Macaubas, C., Hallmayer, J., Kimura, A. ve Mignot E.,1996, "Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol.93, pp.15285-15288.
- Kanter, T., Baird, M., Shaler, R. ve Balazs, I., 1986, "Analysis of restriction fragment length polymorphisms in deoxyribonucleic acid recovered from dried bloodstains", Journal of Forensic Sciences, Vol.31, pp.403-408.
- Kishida, T. and Tamaki, Y., 1997, Japanese population data on Xchromosomal STR locus AR, Japanese Journal of Legal Medicine, Vol.51, pp.376-379
- Krawczak ,M., Alves, C., Amorim, A., Anslinger, K., 2001, "Online reference database of European Y chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes", Forensic Science International, Vol.118, pp.106-113
- Lee H.C., Ladd C, Scherezinger C, 1998 "Forensic Applications of DNA typing", The American Journal of Forensic Medicine And Pathology, Vol.19(1), pp.10-18.
- Lee, H.C., Ladd, C., Bourke, M.T., Pagliaro, E. ve Tirnady F., 1994, "DNA typing in forensic science", American Journal of Forensic Medicine and Pathology, Vol.15(4), pp.269-282.
- Lessig, R., Edelmann, J., Krawczak, M., 2001, "Population genetics of Y chromosomal microsatellites in Baltic males", Forensic Science international, Vol.118, pp.147-152
- Lombardi, L., 1999, "The contribution of forensic geology and other trace evidence analysis to the investigation of the killing of Italian Prime Minister Aldo Moro", Journal of Forensic Sciences, Vol.44(3), pp.634-642.
- Lyon, M.F., 1961, "Gene Action in the X-chromosome of the Mouse", Nature, Vol.190, pp.372-374.
- Margaret, W. T., McInnes, R .R., Huntington, F. W., 1991, "Genetics in Medicine", W.B. Saunders Company, 5.edition, Philadelphia.

- Martin, P., Garcia, O., Albarran, C., Garcia, P., Yurrebaso, I., Alonso, A. 2007, Allele frequencies of six miniSTR loci (D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441 and D1S1677) in a Spanish population, *Forensic Sci. Int.* 169 ,252–254.
- Matsuzawa, S., Kobayashi, Y., Kobayashi, R., Suzuki, H., 1985, "Determination of ABH secretor status by an electronic quantitation method", *Journal of Forensic Sciences*, Vol.30 (3): pp.898-903.
- Menotti-Raymond, M.A., David, V.A., Wachter, L.L., Butler, J.M. and Brien, S.J., 2005, "An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples", *Journal of Forensic Science*, Vol.50(5), pp.1061-1070.
- Mohyuddin, A., Ayub, Q., Oamar, R., Zerjal, T., Helgason, A., Mehdi, S.Q., Tyler-Smith, C., 2001, "Y chromosomal STR haplotypes in Pakistani Populations", *Forensic. Science International*, Vol.118, pp.141-146
- Moller, A., Vigand, P., Griischov, C., Seuchter, S.A., Baur, M.P. and Brinkmann B., 1994, "Population data and forensic efficiency values for STR systems HLTMVWA, HUMIVIBP, HUMFAMBP", *International Journal of Legal Medicine*, Vol.106, pp.183-189.
- Moenssens, A., Starrs, J. E., Henderson, C. E., 1995, "Scientific Evidence In Civil And Criminal Cases, 4.edition, The Foundation Press, Westburg, New York pp.145-152.
- Monnat, R.J. and Reay, D.T., 1986, "Nucleotide sequence identity of mitochondrial DNA from different human tissues", *American Journal Human Genetik*, Vol.43, pp.205-211.
- Muralidharan, K., Wemmer, C., 1994, "Transporting and storing field collected specimens for subsequent DNA extraction and analysis", *Bio Techniques Journal* Vol.17, pp.420- 422.
- Murci, L.Q., Krauzs, C., McElreavey, K., 2001, "The Human Y kromosome: function, evolution and diseases", *Forensic Science International*, Vol.118, pp.169-181.
- Murphy, M., Corcoran, D., Buckley, J.F., O'Mahony, M., Whyte, P., Fanning, S., 2007. Development and application of multiple-locus variable number of tandem repeat

- analysis (MLVA) to subtype a collection of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, pp.187–194.
- Nakano, Yoshio., Takeshita, Toru., Kamio, Noriaki., Shiota, Susumu., Shibata, Yukie., Yasui, Masaki., Yamashita, Yoshihisa., 2008, Development and application of a T-RFLP data analysis method using correlation coefficient matrices, *Journal of Microbiological Methods* Vol.75, pp.501–505
- Niederstatter, H., Kochl, S., Grubweiser, P., Pavlic, M., Steinlechner, M., Parson, W. 2007, "A modular real-time PCR concept for determining the quantity and quality of human nuclear and mitochondrial DNA", *Forensic Sci. Int. Genet.* Vol.1 , pp.29–34
- Öner, CİHAN., 2002, "Genetik Kavramlar", Palme Yayıncılık, 6.Baskı Ankara, Bölüm18, s. 515
- Özçelik, T., 1996 "Adli amaçlı DNA analizleri" *Hacettepe Tıp Dergisi*" Bölüm 27(2), s. 80-82.
- Padar, Z., Egyed, B., Kontadakis, K., Furedi, S., Woller, J., Zoldag, L. ve Fekete, S. 2002, " Canine STR analyses in forensic practice. Observation of a possible mutation in a dog hair", *International Journal of Legal Medicine*, Vol.16(5), pp.286-288.
- Presley, L. A., 1997, "Ensuring error free and high quality results in the forensic science". American Academy of Forensic Science 49th Annual Meeting, New York.
- Pritchard, J.K., Seielstad, M.T., Lezaun, A.P., Feldman, M.W, 1999, "Population growth of human Y chromosome: A study of Y chromosome microsatellites", *Molecular Biology* Vol.16(12), pp.1791-1798
- Roewer L., Kayser M., Henke L., Hidding M., 2000, "A new method for the evolution of matches in non-recombining genomes: application to Y chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes in European males", *Forensic Science International*. Vol.114, pp31-43

- Roewer L., Krawczak M., Willuweit B., Nagy M., Alves C., 2001, "Online reference database of European Y chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes", *Forensic Science International*, Vol.118, pp.106-113
- Rolf, B., Wiegand, P. ve Brinkmann, B., 2002, "Somatic mutations at STR locia reason for three-allele pattern and mosaicism", *Forensic Science International*, Vol.126, pp.200-202.
- Ross, A.M. ve Harding, H.W.J., 1989, " DNA typing and forensic Science", *forensic Science International*, Vol.41, pp.197-203.
- Ross, M.D., 1990, " Polymerase chain reaction", *Archives of Pathoogy and Laboratory Medicine*, Vol.114, pp.627.
- Rubinsztein, D.C., Amos, W., Leggo, J., Goodburn, S., Jain, S., Margolis, R.L., Ross, C.A. ve Ferguson-Smith, M.A., 1995, "Microsatellite evolution evidence for directionality and variation in rate between species", *Nature Genetics*, Vol.10, pp.337-343
- Ruiz, L.A., Ortiz-Bamentos, D., Figueroa, M., Mesa, N., Munera, J.G., Bedoya, O., Velez, I.D., Garcia ,L. F., Perez-Lezaun, A., Bertranpetit, B., Feldman, M.W., Goldstein, D.B., 1999, "Microsatellites provide evidence for Y chromosomal diversity among the founders of the New World", *Proc.Natl. Acad. Vol.96*, pp.6312-6317.
- Russel, Higuchi., Cecillia, H.V.B., George J. S., Henry, A.E., 1989, "DNA typing from single hairs", *Nature Journal*, Vol.322 pp.543-546.
- Sander, E., 1997, "Olay Yerinde Kriminalistik", *Polis Enstitüsü Yayınları*, Ankara, s.11-20, 49-54, 102-104, 138-158, 249-255,
- Serin, A., Alper, B. ve Dag, H., 2002, " Adli Amaçlı Kullanılan DNA Polimorfizmleri ve Tiplendirme Teknikleri", *Adli Tıp Dergisi*, Bölüm 16(2-4), s.72-81
- Soysal, z., Eke, M., Soysal, Z ., Çakalır,C., 1999, " Dünyada Adli Tıbbın Tarihçesi ve Gelişimi", *Adli Tıp Cilt I, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları*, İstanbul, Bölüm I, s.:1-29,

- Southern, E.M., 1975, "Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis", *Journal of Molecular Biology*, Vol.98, pp.503-527.
- Sparkes, R., Kimpton, C., Watson, S., Oldroyd, N., Clayton, T., Barnett, L., Arnold, J., Thompson, C., Hale, R., Chapman, J., Urquhard, A. ve Gill, P., 1996, "The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework: mixtures, ageing, degradation and species studies, (II)artefacts, casework studies, and success rates", *International Journal of Legal Medicine*, Vol.109, pp.186-194, 194-204.
- Stewart, J.E.B., Fisher, C.L., Aagaard, P. J., Wilson, M.R., Isenberg, A.R., Polansky, D., Pokorak, E., DiZinno, J. A. and Budowle, B., 2001, "Length variation in HV1 and HV2 of the human mitochondrial DNA control region". *Journal of Forensic Sciences*, Vol.46, pp.862-870.
- Szibor, Reinhard. 2007, "X-chromosomal markers: Past, present and future", *Forensic Science International: Genetics* Vol.1, pp.93–99
- Szibor, R., Hering, S. ve Edelmann, J., 2005, "The HumARA genotype is linked to spinal and bulbar muscular dystrophy and some further disease risks and should no longer be used as a DNA marker for forensic purposes", *International Journal of Legal Medicine*, Vol.119, pp.179-180.
- Szibor, R., Krawzak, M., Hering, S., Edelmann, J., Kuhlisch, E. and Krause, D., 2003, "Use of X-Linked markers for Forensic purposes", *International Journal of Legal Medicine*, Vol.117, pp.67-74.
- Tajima, F. and Nei, M., 1984, "Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences". *Molecular Biology Evolution*, pp.269-285.
- Tarazona S.E., Carvalho-Silva, D.R., Pettener, D., Luiselli, D., De Stefano, G.F., Labarga, C.M., Rickards, O., Tyler-Smith, C., Pena, S.D.J., Santos, F.R., 2001, "Genetic differentiation in south Amerindians is related to environmental and cultural diversity: Evidence from the Y chromosome", *American Journal Human Genetic* Vol.68, pp.1485-1496.

- Tobe, Shanan S. and Linacre, Adrian M.T. 2008, A technique for the quantification of human and non-human mammalian mitochondrial DNA copy number in forensic and other mixtures, *Forensic Science International: Genetics* 2, 249–256
- Tobe, S., Linacre, A., 2007, "Species identification of human and deer from mixed biological material", *Forensic Science International*, Vol.169, pp.278–279.
- Tunalı, İ., 1995, *Adli Tıp*, 2. Baskı, Atilla Kitabevi, Ankara.
- Turrina, S. and De Leo, D., 2004, "Population genetic comparisons of three X-chromosomal STRs (DXS7172 , DXS7173, GATA 172D05) in North and South Italy", *International Congress Series*, Vol.126, pp.1302-1304.
- Turrina, Stefania., Renzo, Atzei., Giulia Filippini, Domenico De Leo, 2007, "Development and forensic validation of a new multiplex PCR assay with 12 X-chromosomal short tandem repeats", *Forensic Science International: Genetics* 1 , 201–204
- Wame, A., 1991, "Tetranucleotide Repeat Polymorphism at the Human Beta-Actin Related Pseudogene 2 (ACTBP2) Detected Using the Polymerase Chain Reaction, *Nucleic Acids Research*, Vol.19, pp.69-80
- Webb, M.B., Williams, N.J., and Sutton, M.D., (1993) "Microbial DNA challenge studies of variable number tandem repeat (VNTR) probes used for DNA profiling analysis. *Journal of Forensic Sciences*, Vol.5. pp.1172-1175.
- Weibin Bai, Wentao Xu, Kunlun Huang, Yanfang Yuan, Sishuo Cao, Yunbo Luo, 2009, A novel common primer multiplex PCR (CP-M-PCR) method for the simultaneous detection of meat species, *Food Control* Vol.20, pp.366–370
- Wiegand, P. ve Kleiber, M., 2001, "Less is more-length reduction of STR amplicons using redesigned primers", *International Journal of Legal Medicine*, Vol.114, pp.285-287
- Wiegand, P., Berger, B., Edelmann, J., Parson, W., 2003, "Population genetic comparisons of three X-chromosomal STRs", *International Journal of Legal Medicine*, Vol.117, pp.62-65.
- Willuweit S, Roewer L. 2007, On behalf of the international forensic Y chromosome user group Y chromosome haplotype reference database (YHRD): update. *Forensic Science International: Genetics* Vol.1, pp.83–7.

- Wilson, M. R., Poianskey, D., Butler, J., DiZinno, J. A., Repogle, J., and Budowie, B., 1995, "Extraction, PCR amplification, and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts", *BioTechniques*, Vol.18, pp.662-669.
- Wright, F. D., 1998, "Photography in bite mark and patterned injury documentantation-Part", *Journal of Forensic Sciences*, Vol.43 (4), pp.877-880.
- Yüreğir, G.T., 1994, "Biyolojik Artıkların Kimliklendirilmesi" 1. Adli Bilimler Kongresi, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, s.103-107
- Zarrabeitia, Maria T., Pinheiro, Fatima., M. de Pancorbo, Marian., Laura Caine, Sergio Cardoso , Leonor Gusmao , Jose A. Riancho, 2008, Analysis of 10 X-linked tetranucleotide markers in mixed and isolated populations, *Forensic Science International Genetics*, In Press, Corrected Proof, Available online 18 November , pp.402-406

6.1. İnternet Kaynakları

| | Erişim Tarihi |
|--|----------------------|
| 1- http://yunus.hacettepe.edu.tr/coner/gen/04/pcr.htm | 05.07.2008 |
| 2- http://www.calmis.cahwnet.gov/file/occguides/crimnlst.htm | 06.11.2006. |
| 3- http://www.yale.edu/ynhti/curriculum/guides/.x.html | 06.05.2008. |
| 4- http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/NISTpub.htm | 25.10.2008 |

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ömer Avni YEŞİLDAĞ

Doğum Yeri : Akçakale

Doğum Tarihi: 10.10.1981

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu(Kurum ve Yıl)

Lise : Adana Atatürk Lisesi (1996-1999)

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji
Bölümü mezunudur. (2000-2004)

Yüksek Lisans : Afyonkocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler
Biyoloji Ana Bilim Dalı. (2006-2008)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: İçişleri Bakanlığı Emniyet Genel Müdürlüğü

Uşak İl Emniyet Müdürlüğü (2005-2007)

Aydın İl Emniyet Müdürlüğü (2008-)

Yayımları(SCI ve diğer):

Diğer konular: