

Türk Populasyonu İçin Adli Tıp Kurumunda Belirlenen HLA DQA1, LDLR, GYPA, HBG, D7S8 ve GC Alellerinin Gen Frekansları

EYÜP ATLIOĞLU, HÜLYA GÜNDÜZ, SATI KOLUAÇIK, SEVGİ YILMAZ, ÜMİT ÇETİNKAYA,
EMİNE AKÇALI, SERHAT GÜRPINAR

Adli Tıp Kurumu Başkanlığı, İstanbul, Türkiye.

GENE FREQUENCIES OF HLA DQA1, LDLR, GYPA, HBG, D7S8 and GC ALLELES TURKISH POPULATION WERE DETERMINED AT THE COUNCEL OF FORENSIC MEDICINE

Summary

The gene frequencies of HLA DQA1, LDLR, GYPA, HBG and GC alleles have been investigated in unrelated 455 individuals sent to the Council of Forensic Medicine by the courts for parentage. The frequencies of alleles that were determined are compared with other investigations and various population.

The results for all systems are in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium.

Key Words: DNA polymorphism, Turkish population, Forensic Medicine, parentage, PCR, HLA DQA1, LDLR, GYPA, HBG, D7S8, GC.

Özet

Mahkemeler tarafından Adli Tıp Kurumu'na nesep-babalık tayini için gönderilen kişilerden aralarında akrabalık bağı bulunmayan 455 kişinin HLA DQA1, LDLR, GYPA, HBG, D7S8 ve GC lokus alellerinin gen frekansları belirlenerek diğer araştırmaların bulguları ve değişik populasyonların gen frekansları ile mukayese edildi.

Elde edilen değerlerin Türk populasyonu için Adli Hemogenetik kimliklendirme ve nesep-babalık tayinlerinde kullanılabilir olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: DNA polimorfizm, Türk populasyonu, adli tıp, nesep tayini, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), HL DQA1, LDLR, GYPA, HBG, D7S8, GC.

GİRİŞ

Nesep davalarında biyolojik babanın (veya biyolojik annenin) belirlenmesinde ve diğer adli vakalarla ilgili kimliklendirmelerde DNA tekniğinden büyük ölçüde yararlanılmaktadır. Özellikle fethi kabir materyalinin kimliklendirilmesinde DNA analizleri önemli bir araç haline gelmiştir. Bu önem tekniğin gücünden kaynaklanmaktadır (1-13).

PCR'a dayalı DNA analizleriyle belirlenen lokus alellerinin nesep tayinlerinde olasılık ve paternite indeksi hesaplamalarında kullanılabilmesi için ilgili toplumun gen frekanslarının bilinmesi gerekir (1,14,15). Bu amaçla; Türkiye'nin değişik bölgelerinden mahkemeler, hakimlikler ve savcılıklar tarafından nesep tayini için Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesi'ne gönderilen kişilerden çocuklar ve akraba olanlar ayrıldıktan sonra akrabalık bağı bulunmayan 455 kişinin kan örnekleri incelenerek DNA tiplerini yapıldı.

Bu çalışmamızda; HLA DQA1, LDLR, GYP A, HBGG, D7S8 ve GC lokuslarının alel frekansları Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Allel Spesifik Oligonükleotid Hibridizasyonu (ASO) teknikleri kullanılarak saptandı (13,15-18).

GEREÇ VE YÖNTEM

Kan örnekleri EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) li tüplere alındı.

DNA ekstraksiyonu (çekitilmeleri) amonyum asetat, Chelex ve fenol-kloroform yöntemleri ile yapıldı (16,19,20). İzole edilen DNA'ların miktarları ve saflık derecelerini tayin etmek için UV-VİS spektrofotometrede 260-280 nm.lerde absorbanları ölçüldü. A260/A280 değeri 1.7-2.0 arasında olan DNA örnekleri HLA DQA1, LDLR, GYP A, HBGG, D7S8 ve GC lokuslarına özgün primerler kullanılarak PTC-200 MC Research marka ısı döngü cihazında PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yürütüldü (18,21,22). Elde edilen PCR ürünleri % 3'lük agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve UV'de değerlendirildi. Amplifikasyonu gerçekleştiren PCR ürünleri hibridizasyona tabi tutuldu. Bu işlem sırasında hibridizasyon kitinde önerilen oranda PCR ürünü kullanıldı. Boyama işleminden sonra sonuçlar değerlendirildi (16).

BULGULAR

Türkiye'nin değişik yörelerinden gelen her iki cinsten 455 kişinin kan örnekleri DNA analizlerine tabi tutuldu.

Elde edilen değerler Tablo 1'de görülmektedir.

Diğer araştırmacılar tarafından Türk, İsviçre, Amerikan (beyaz ve siyah ırk), İtalyan, İspanyol, Arap, Kore ve Japon populasyonları için belirtilen frekanslar ve araştırmamızda Türk populasyonu için belirlediğimiz frekanslar Tablo 4'de görülmektedir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

DNA analizleriyle nesep tayini ve genetik kimliklendirme günümüzde Adli Tıp alanında önemli bir yer almış bulunmaktadır (1,6,10,13,15). DNA analizleri sonucunda eğer suçlanan kişinin incelenen lokus alellerinde uyumsuzluk saptanırsa kişi biyolojik baba değildir. Şayet kişinin babalığı reddedilmezse paternite indeksi, babalık olasılık hesaplamaları yapılır (15,23,24). Bu hesaplamaların yapılabilmesi için ilgili populasyonun gen frekanslarının bilinmesi gerekir (1,14,15).

Tablo 1. Türk popülasyonunda HLA DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC lokus alellerinin frekansları

Lokus	Kromozom	Alel Sayısı	Alel	Frekans
HLA DQA1	6	7	1.1	0.159
			1.2	0.147
			1.3	0.113
			2	0.078
			3	0.172
			4.1	0.301
			4.2 (4.3)*	0.030
LDLR	19	2	A	0.411
			B	0.589
GYPA	4	2	A	0.596
			B	0.404
HBGG	11	3	A	0.387
			B	0.599
			C	0.014
D7S8	7	2	A	0.641
			B	0.359
GC	4	3	A	0.235
			B	0.196
			C	0.569

Suçlanan kişinin biyolojik baba olarak kabul edilebilmesi için Türkiye'de kabul edilen babalık olasılık oranı % 99.73 ve üstüdür (25).

Bu amaçla; bu çalışmamızda Türk popülasyonunun HLA DQA1, LDLR (düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü), GYPA (glikoforin A), HBGG (hemoglobin gamoglobin), D7S8 ve GC (gruba özgü bileşen) lokusları incelendi. Belirlenen alel frekans değerleri tablo 1'de görülmektedir. Sonuçlar Hardy-Weinberg dengesine uymaktadır. Gözlenen ve beklenen değerler ile X^2 (Ki-Kare) sonuçları tablo 2 ve tablo 3'de yer almaktadır. Türk popülasyonu için belirlediğimiz gen frekans değerleri ve araştırmacıların belirlediği değerler tablo 4'de görülmektedir. Tablo 4'de yer alan ülke popülasyonlarına ait veriler kıyaslandığında; HLA DQA1 lokusuna ait aleller arasında Japon popülasyonunda üç aleli fazla sayıda görülürken diğer ülke popülasyonlarında 4 alelinin fazla sayıda olduğu; tüm ülke popülasyonlarında LDLR lokusunun B aleli; GYPA lokusunun A aleli D7S8 lokusunun A aleli; HBGG lokusunun B aleli yüksek oranda görülmesine karşın HBGG lokusunun A aleli ABD'deki beyaz ve siyah ırkta daha fazla sayıda görülmüştür. Amerikan siyah ırkı, Kore ve Japon popülasyonlarında GC lokusunun B aleli fazla sayıda bulunurken Türk popülasyonu ve tabloda yer alan diğer ülke popülasyonlarında C aleli fazla sayıda bulunmuştur (6,15,26-32).

Bunun nedenleri; genetik farklılık (Genetic Difference), örnek değişikliği (Sampling Variance) ya da az sayıda örnek (Small Sampling Size) ile çalışma olabilir.

Tablo 2. İncelenen HLA DQA1 lokusunun genotipleri, gözlenen ve beklenen değerleri (n=455).

Lokus	Genotip	Gözlenen	Beklenen
HLA DQA1	1.1,1.1	9	11
	1.1,1.2	23	21
	1.1,1.3	20	16
	1.1,2	17	11
	1.1,3	23	25
	1.1,4.1	38	43
	1.1,4.2 (4.3)	6	4
	1.2,1.2	6	10
	1.2,1.3	14	15
	1.2,2	14	10
	1.2,3	26	23
	1.2,4.1	43	40
	1.2,4.2 (4.3)	1	4
	1.3,1.3	5	6
	1.3,2	6	8
	1.3,3	24	18
	1.3,4.1	25	31
	1.3,4.2 (4.3)	4	3
	2,2	3	3
	2,3	7	12
	2,4.1	21	21
	2,4.2 (4.3)	0	2
	3,3	10	13
	3,4.1	54	48
	3,4.2 (4.3)	1	4
	4.1,4.1	41	44
	4.1,4.2 (4.3)	12	8
	4.2 (4.3), (4.2 (4.3)	2	1

*Elde edilen değerler Hardy-Weinberg dengesine uymaktadır $\chi^2=26$, $p<0.1$

Türk populasyonu için araştırmacılar tarafından belirlenen frekanslar bulgularımızla kıyaslandığında önemli bir farklılık görülmemiştir (30,31,33). İncelediğimiz örnekler Türkiye'nin her bölgesinden gelen kişilere ait olduğundan elde edilen sonuçlar Türk populasyonu için frekans hesaplamalarına uygun; adli açıdan kullanılabilir oldukları ortaya çıkarmıştır.

Sonuç olarak; bu çalışmada adli amaçlarla kişilerin belirlenmesi ve nesep tayinlerinde kullanmak üzere Türk populasyonunun HLA DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 ve GC polimorfik lokuslarının bir veri tabanını (database) belirlenmiştir.

Değişik lokuslar için elde edilen gen frekans dağılımları Hardy-Weinberg dengesine uymaktadır.

Tablo 3. İncelenen LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 ve GC lokuslarının gözlenen ve beklenen değerleri ile Hardy-Weinberg dengesine uyumu (n=455).

Lokus	Genotip	Gözlenen	Beklenen
LDLR	AA	79	77
	BB	160	158
	AB	216	220
$X^2=0.14997$, S.D. =1,0,5<p<0.7			
GYPA	AA	153	162
	BB	66	74
	AB	236	219
$X^2=0.26844$, S.D. =1,0,1<p<0.2			
HBGG	AA	58	68
	BB	152	163
	CC	1	0
	AB	233	211
	AC	3	5
	BC	8	8
$X^2=6.3058$, S.D. =3,0,05<p<0.1			
D7S8	AA	180	187
	BB	52	59
	AB	223	209
$X^2=2.030$, S.D. =1,0,1<p<0.2			
GC	AA	25	25
	BB	25	18
	CC	151	147
	AB	38	42
	AC	126	122
	BC	90	101
$X^2=4.5409$, S.D. =3,0,2<p<0.3			

Elde edilen değerlerin Türk popülasyonu için adli hemogenetik, kimliklendirme ve nesep tayinlerinde kullanılabilir olduğu saptandı.

KAYNAKLAR

1. Budowle, B., Lindsey, J.A., Deccu, J.A., Koons, B.W., Giusti, A.M. and Comey, C.T. (1995) Validation and population studies of the loci LDLR, GYPA, HBG, D7S8 and GC (PM loci) and HLA DQo using a Multiplex amplification and Typing Procedure. *Journal of Forensic Science*, **40**; **1**: 45-54.
2. Gill, P., Ivanov, P.L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., Evett, I., Hagelberg, E., Sullivan, K. (1994) Identification of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genet.*, **6**: 130-135.
3. Hagelberg, E., Gray, I.C., Jeffreys, A.J. (1991) Identification of the skeletal remain of the murder victim by DNA analysis. *Nature.*, **352**; 427-429.
4. Hanaoka, Y., Inoue, M., Tsai, T.H. and Ninauchi, K. (1995) Fundamental and Practical Study for DNA Analysis Using Tooth as a Source of DNA. *Jpn J Legal Med.*, **49**; **1**: 1.
5. Higuchi, R., von Beroldingen, H., Sensabaugh, G., Erlich, H.A. (1988) DNA typing from single hairs. *Nature*, **6164**; 543-546.
6. Hoechmeister, M.N., Budowle, B., Borer, U.V., Drinhofer, R. (1995) wiss population data on the loci HLA DQAo, LDLR, GYPA, HBG, D7S8, Gc and D1S80. *Forensic Science International*, **67**; 175-184.
7. Höss, M., Paabo, S. (1993) DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research*, **21**; **16**, 3913-4.
8. Lassen, C., Hummel, S., Herrmann, B. (1994) Comparison of DNA extraction and amplification from ancient human bone and mummified soft Tissue. *International Journal Legal Medicine*, **107**; 152-155.
9. Lee, H.C., Pagliaro, E.M. (1991) DNA analysis in human bone tissue: RFLP Typing. *JFSS*, **31**(2): 209-212.
10. Roy, R., Reynolds, R. (1995) Ampli Type PM and HLA DQo typing from pap smear, semen smear and post-coital slides. *J of Forensic Sciences.*, **40**; 266-269.
11. Wiegand, P., Bajanowski, T. and Brinkmann, B. (1993) DNA typing of debris from fingernails. *Int J Leg. Med.*, **106**; 81-83.
12. Wilson, R.B., Ferrara, J.L., Baum, H.J., Shaler, R.C. (1994) Guidelines for internal validation of the HLA DQo typing system. *Forensic Science International*, **66**; 9-22.
13. Comey, C.T., Budowle, B., Adams, D.E., Baumstrak, A.L. and Presley, L.A. (1993) PCR amplification and typing of HLA DQo gene in forensic samples. *Journal of Forensic Science*, **38**: 239-249.
14. Paternity Establishment (1990) *Department of Health and Human Services Family Support Administration office of child support Enforcement National Institute for child support Enforcement* Washington, 3th ed.
15. Helmuth, R., Fildes, N., Blake, E., Luce, M.C. et al. (1990) HLA DQAo Allele and Genotype Frequencies in various Human Population, Determined by using Enzymatic Amplification and Oligonucleotide Probes. *Am J Hum., Genet.*, **47**: 515-523.
16. *AmpliType User Guide* (1993) The Perkin-elmer corporation.
17. Blair, G.E. and Blair-Zajdel, M.E.B. (1992) The Polymerase Chain Reaction-Already an Established Teqnique in Biochemistry. *Biochemical Education*: **20**(2), 87-91.
18. Reynold, R. and Sensabaugh, G. (1991) Analysis of Genetic Markers in Forensic DNA samples using the PCR. *Analytical Chemistry*; **63**:1;1-15.
19. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, J. (1989) *Molecular Cloning a Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory*, 2nd ed. New York.
20. Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-Based Typing from forensic material. *Bio Techniques*, **10**; 4.

- 42 E.ATLIOĞLU, H.GÜNDÜZ, S.KOLUAÇIK, S.YILMAZ, Ü.ÇETİNKAYA, E.AKÇALI, S.GÜRPINAR
21. Erlich, H.A. (1990) *PCR Protocols. A Guide to Methods and Application*; Ed. Innis, M. et al. pp.261-271, Academic Press, Inc. San Diego, California, New York.
22. Innis, M.A., Gelfand, Y.D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (1990) *PCR Protocol, A Guide to methods and applications*. Academic Press, New York.
23. Sawson-Saunders, B., Trapp, R.G. (1990) *Basic and Clinical Bioistatistics* Appleton and Lange. International ed.
24. Siegel, S. (1956) *Nonparametric Statistics for the behavioral Science* (Int Student ed) Mc Graw-Hill Company.
25. *Yargıtay Kararları Dergisi* (1993) cilt: 19, sayı: 12.
26. De Stefano, F., Casarino, L., Mannucci, A., Delfino, L., Canale, M. and Ferrara, G.B. (1992) HLA DQA Allele and Genotype Frequencies in a Northern Italian Population. *Forensic Sciences, International*, **55**: 59-66.
27. Tagliabracci, A., Giorgetti, R., Agostini, A., Buscemi, L., Cingolani, M. and Ferra, S.D. (1992) Frequency of HLA DQA alleles in on Italian Population. *Int J Leg Med.*, **105**: 161-4.
28. Alkhatat, A., Alshamali, F., Budowle, B. (1996) Population data on the PCR-Based loci LDLR, GYPA, HBG, D7S8, HLA DQA and D1S80 from Arabs from Dubai, *Forensic Sciences, International*, **81**: 29-34.
29. Woo, K.M., Budowle, B. (1995) Korean Population Data on the PCR-Based loci LDLR, GYPA, HBG, D7S8, GC, HLA DQA and D1S80. *J of Forensic Sciences*, **40**, **4**: 645-8.
30. Yükseloğlu (Şişman), E.H. (1996) Master tezi, İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.
31. Vural, B., Athioğlu, E., Kulusayın, Ö., Togan, I., Büyükdevrim, S., Özçelik, T. (1998) Turkish Population data on the HLA DQo, LDLR, GYPA, HBG, D7S8 and Gc loci. *Int J Legal Med.*, **111**, 43-45.
32. Nakajima, T., Matsuki, T., Ohkawara, H., Nara, M., Furukawa, K., Kishi, K. (1996) Evaluation of 7 DNA markers (D1S80, HLA DQo, LDLR, GYPA, HBG, D7S8 and GC) and in a japanesc population. *Int J Legal Med.* **109**: 47-48.
33. Özçelik, T., Vural, B., Athioğlu, E., Öztürk, M., Kulusayın, Ö., Büyükdevrim, S. (1994) Altı farklı genomik lokusun allel ve genitop frekanslarının Türk topluluğunda dağılımının DNA analizi ile sap tanması ve nesep (babalık) tayininde kullanımı. *J. Adli Bilimler Kongre Kitabı*, 12-15 Nisan 1994, Adana, s.140.

Ayrı Baskı İçin :

Mik.Bio.Dr. Eyüp Athioğlu
Adli Tıp Kurumu Başkanlığı
34246 İstanbul, Türkiye.