

575.113.1: 616.419-089.843

i 59 d

MFN: 5571



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

İNSAN DNA PARMAKİZİ TEKNİĞİNİN

KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONLARINDA

TÜRKİYE BİLİMSEL VE KULLANILMASI
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ

PROJE NO: TAG-0910-DPT

1997-253

TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ

Tip Araştırma Grubu

Medical Sciences Research Grant Committee

575. 113. 11. 516 913- 513 243
153 d

**İNSAN DNA PARMAKİZİ TEKNİĞİNİN
KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONLARINDA**

**TÜRKİYE BİLİMSEL KULLANILMASI
T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
KURUMU KÜTÜPHANESİ**

PROJE NO: TAG-0910-DPT

1997-2-4

**Prof.Dr.Beyazıt ÇIRAKOĞLU
Berrin YÜKSEL
İlter GÜNEY
Fevziye FURTUNA**

**ŞUBAT 1994
İSTANBUL**

575. 113. 11. 616. 419- 089. 843

159 d

**İNSAN DNA PARMAKIZI TEKNİĞİNİN
KEMİK İLİĞİ TRANSPLANTASYONLARINDA**

**TEKNEKİF BİLİMİNE KULLANILMASI
TEKNİK ALTYAPISI
KURUMSAL KÜTÜPHANESİ**

PROJE NO: TAG-0910-DPT

1997-253

**Prof.Dr.Beyazıt ÇIRAKOĞLU
Berrin YÜKSEL
İlter GÜNEY
Fevziye FURTUNA**

**ŞUBAT 1994
İSTANBUL**

Bogaz 1994-11064
1997-253

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	3
Tablo ve Şekil Listesi	4
ÖZ	5
SUMMARY	6
GİRİŞ	7-12
YÖNTEMLER VE GELİŞME	13-28
SONUÇ	29-33
REFERANSLAR	33-38
BİBLİOGRAFİK BİLGİ FORMU	39-40

ÖNSÖZ

Bu proje insan DNA parmakizi yöntemini kemik iliği tarsplantasyonlarında rutin olarak kullanma amacıyla geliştirmeyi ve uygulamaya hazır hale getirmeyi amaçlamıştır. Çalışmalarda DAF (DNA Amplification Fingerprinting) tekniği benimsenmiş ve bir dizi oligonukleotid primer tasarlanarak, TÜBİTAK, MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'nde sentezlenmiştir. Bu primerle yapılan çalışmalarla kan, kemik iliği, saç kökü hücrelerinden elde edilen DNA molekülleri Polimeraz Zincirleme Reaksiyonuna tabi tutulmuşlar ve bireylere özgü DNA fingerprintleri (parmakizleri) saptanmıştır. Bu yöntemin Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapılan kemik iliği tarsplantasyonlarında rutin olarak kullanılması için hazırlıklar tamamlanmıştır.

Proje yürütücüsü ve çalışanları verdikleri destek için TÜBİTAK Tıp Araştırma Grubuna teşekkürü borç bilirler.

ÖZET

TABLO VE ŞEKİLLER

Bu çalışmada insan

yaklaşıkıyla

Tablo 1 İnsan Genomunda DNA Tipleri

Şekil 1 Saç kökünden izole edilen DNA örneklerinin agaroz gel elektroforezi

Şekil 2 PCR için $MgCl_2$ derişimi optimizasyonu

Şekil 3 Farklı bireylere ait DNA parmak izleri

Şekil 4 PCR için kullanılan primerlerin karşılaştırması

Şekil 5 Kemik iliği örneklerinden DNA parmakizi çalışması

Şekil 6 Saç kökü ve kan hücreleri DNA parmakizleri

Şekil 7 Kemik iliği transplantasyonu sonrası alıcı ve verici DNA parmakizleri

ÖZET

Bu çalışmada insan DNA parmakizi yöntemi DAF (DNA Amplification Fingerprinting) yaklaşımıyla geliştirilerek kemik iliği transplantasyonlarında kullanılabilir hale getirilmiştir. İncelemeye alınan 85 adet DNA örneği değişik dokulardan (kemik iliği, kan, saç kökü) saflaştırılmış ve sekiz nükleotitlik bir primer kullanarak PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Çoğaltım ürünleri agaroz gel elektroforezi ile incelenmiş ve bunların arasında aynı bireyin farklı dokularından çoğaltılan DNA çoğaltım ürünlerin aynı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, 81 bireye özgü DNA çoğaltım ürünleri elde edilmiştir.

Kemik iliği transplantasyon işlemi için alıcı ve verici çiftlerinden DNA çoğaltım ürünleri elde edilmiş ve vericinin ve transplantasyon sonrası alıcının aynı DNA çoğaltım ürünlerine sahip olduğu bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar bu tekniğin kemik iliği transplantasyonlarında transplante edilen iliğin etki oranının saptanması yönünde rahatlıkla kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

SUMMARY

In this work human DNA fingerprinting techniques was developed with DAF(DNA Amplification Fingerprinting) approach and used in bone marrow transplantations.

85 DNA samples were purified from different tissues (bone marrow, blood, hair..) and submitted to PCR by using an eight nucleotide primer. PCR products were controlled by agarose gel electrophoresis and it was seen that the electrophoretic patterns of the PCR products obtained from different tissues of the some individual were identical.

For the bone marrow transplantations DNA amplification products were obtained from donors and recievers and it was detected that the electrophoretic patterns of the DNA samples of the donor and post transplantation reciever were identical.

The results have shown that the developed method could be used in the control of bone marrow transplantations.

GİRİŞ

Genotipik farklılıkların temelini genetik değişiklikler ya da genetik olmayan (çevresel) değişiklikler oluşturur. Bireylerin genomlarındaki nükleotit dizilimlerindeki daimi olan farklılıklardan dolayı oluşan çeşitlilik genetik varyasyon olarak adlandırılır. DNA'daki tüm değişiklikler zararlı olmamakla birlikte genetik hastalıklar şeklinde kendilerini gösterebilirler.

Gen ile protein arasındaki ilişki DNA üzerinde bulunan gen bölgelerindeki baz dizilişlerinin o gen tarafından şifrelenen protein amino asit dizisini belirlemesi şeklindedir. Bir nükleotit değişikliği ve mutasyon o proteinin yapısının değişmesi şeklinde de sonuçlanabilir. DNA'da oluşan bazı değişiklikler ya polipeptidi oluşturan amina asit dizisini değiştirmeyecek ya da polipeptid zincirinin önemli olmayan bir bölgesinde oluşacak şekilde olursa bu değişikliğin sonucu fenotipik olarak gözlenmeyecektir. Birçok protein normal olarak aynı lokustaki genlerle oluşturabilirler. Fakat genetik ve yapısal olarak iki ya da daha çok seçenekli fenotipe sahip olurlar. Böyle durumlar polimorfizm olarak bilinir.

Her yeni zigotun ana babasında bulunmayan 3 ya da daha çok yeni baz çifti

kompozisyonuna sahip olduğu düşünölmektedir. Bu varyasyonların çoğu kodlayan dizilerde değil, kodlama yapmayan dizilerde bulunurlar. Evrim süresince nükleotit değişimleri yüksek derecede genetik çeşitliliğe ve bireye özgülüğe yol açmıştır.

DNA'nın Olması

Aynı cinsiyete sahip normal insanların karyotipleri oldukça benzerdir. Bununla birlikte kromozom morfolojisinde ve boyanmasında meydana gelen değişiklikler vardır ki bunlar heteromorfizm olarak adlandırılırlar ve bir kromozom boyunca belirli bir bölgede yer alan DNA dizilerinin tipindeki veya miktarındaki değişiklikleri yansıtır.

Genetik koddaki dejenerasyon nedeniyle (wobble) bir polipeptiddeki yapısal değişme görölmeyebilir. Bu mutasyonların yaklaşık %25'i aynı amino asidi kodlar. Bu tip mutasyonlara da Silent (sessiz) mutasyonlar adı verilir. Diğer mutasyonlar amino asid dizisini ve üç boyutlu yapıyı değiştirerek proteinde, yapı ve fonksiyon değişikliğine neden olurlar ve bu deşişimler nadir olarak fenotipik etki gösterirler. İlk protein farklılıkları genetik olarak kanda bulunan antijenlerde belirlenmiş ve kan grubu antijenleri olarak adlandırılmışlardır.

Bir popülasyondaki farklı bireyler arasında dikkate değer genomik DNA çeşitliliğinin tespiti Southern blot tekniği kullanılarak yapılabilmektedir. İncelenmek istenen DNA örneği kesim enzimleri ile muamele edildiği zaman çeşitli büyüklükteki kesim parçalarına ayrılır. Kesim enzimleri DNA üzerinde bulunan genellikle palindromik yapıda olan hedef

bölgelerini tanır ve bu kesim bölgelerinden DNA'yı keserler. DNA'nın bu kesim bölgelerinde oluşan mutasyonlar nedeniyle kesim bölgelerinin yok olması veya oluşması farklı büyüklükteki kesim parçalarının ortaya çıkmasını sağlar. İnsan genomundaki DNA'nın organizasyonu oldukça komplekstir. Genomdaki DNA'nın %10'undan daha azı genetik kod içerirler. Genomun 3/4'ü tek kopya DNA adı verilen ve haploid genom başına sadece bir kere kopyalanmış DNA dizilerinden oluşur. Genomun geri kalan kısmı tekrarlamalı DNA dizilerinin çeşitli sınıflarından ve genomda nükleotit dizisi ya tamamen yada bazı varyasyonlarla tekrar eden DNA dizilerinden oluşur (Tablo 1)

Tablo 1. İnsan Genomunda DNA Tipleri

DNA Tipi	Genom Oranı	Özellikler
Tek kopya DNA	~ 75%	Genomda bulunan genlerin birçoğunu içerir.
Dağılmış Tekrarlanan DNA	~ 15%	Genler ve diğer kopya genler arasında serpiştirilmiş haldedir. Genom boyunca yerleşmiş iki büyük gen ailesi (Alu ve L1)
Uydu DNA	~ 10%	Sık tekrarlanan diziler birçok büyük aile özel bölgelerde (Centomer ve telomer) yüksek oranda bulunur.

Jeffrey ve arkadaşları 1985 yılında yaptıkları bir araştırmada miyoglobin geninin birinci

intronunda 33 bç lik tekrar dizilerine raslamışlar ve bu dizilerin birçok bölgenin tespitine izin verecek şekilde genom boyunca dağıldığını göstermişlerdir (1).

Lokuslarda

İnsan DNA'sının basit tekrarlamalı bölgeleri "minisatellitleri" 10-15 baz çiftlik genel bir çekirdek (core) diziyi paylaşırlar (23-45). Ard arda tekrarlamalı core diziyi kapsayan bir hibridizasyon probu insan bağlantı analizlerinde genetik marker olarak kullanılmaktadır.

1985 yılında Jeffrey ve arkadaşları core dizinin farklı sayıda tekrarlarından oluşmuş proplar kullanılarak bireye özgü DNA parmak izlerini çıkartmışlardır (6).

İle basit DNA

Yaban tip M13 bakteriyofaj vektörünün protein III geninde yer alan 15 baz çiftlik bir dizinin de Hae III enzimi ile kesilmiş insan ve maymun DNA'sında DNA parmak izinin çıkartılmasını sağladığı bulunmuştur (7-8). Tekrar parçalarının klonlanması (9,10,11) ve üretiminin teknik problemlerle karşılaşması sebebiyle DNA parmak izinin çıkartılmasında sentetik oligonükleotit proplar kullanılmaya başlanmıştır. (12,12,14,15). GA^cTA dizisi gibi basit dörtlü bir dizinin iki ya da üç kez tekrarına dayalı oligonükleotit proplar bunlardan bazılarıdır (16). Son yıllarda PCR teknolojisinin hızla gelişmesi DNA parmak izine yeni bir bakış açısı getirmiştir. Bu teknik sayesinde incelenmek istenen nükleik asit (DNA ya da RNA) dizilerinin in vitro enzimatik sentezi ile milyonlarca kopyasının çıkartılması çok önemli ölçüde kolaylaşmıştır (5).

meydana gelmiş problemlere

Tanımlanmış bölgede (loci) çok değişken (hypervariable) bölgelerin amplifikasyonları için de PCR işleminden yararlanılmıştır (5,17). Bu minisatellit DNA bölgeleri çeşitli lokuslarda ard arda tekrarlanmış 15-30 nükleotit motiflerinden oluşmuştur. Kısa tekrarlardaki basit dizi motifleri sadece 2-10 nükleotit uzunluğundadır ve uzun çok değişken bölgeleri oluşturacak şekilde ard arda sıralanmıştır. Bu yapı PCR'a dayalı DNA Polimorfizmleri tespit etmede yardımcı olur. Benzer olarak da özgün primerlerin karışımları da kullanılarak insan genomik DNA'sından çok değişken mini satellitlerin amplifikasyonları sağlanmış ve PCR ürünlerinin kesim enzimleri ile muamele edilmesi ile basit DNA parmak izlerine ulaşılmıştır (18). 1990 yılında Williams ve arkadaşları bir hedef DNA dizi bilgisine sahip olmadan seçilmiş herhangi bir tek primer kullanarak DNA polimorfizmini oluşturmuşlardır (19). Bu yöntemle *Staphylococcus*'un ve *Mus musculus*'un soyları arasında türe özgü genomik parmak izlerinin çıkartılması sağlanmıştır (20-22). 5-10 nükleotit gibi çok kısa oligonükleotit primerlerinin kullanılması ile de DNA parmak izinin çıkartılması mümkün olmuştur (23-24).

DNA parmak içi tekniği, kimlik tespitinde (1,25,19), akrabalıkların tayininde, insan genom analizlerinde, bağlantı haritasının çıkartılmasında ve hastalık bölgelerinin yerleşimini belirlemek için kullanılmaktadır. DNA parmakizi çok değişken minisatellitlerden (21,6) veya bireye ait çok değişken bölgelere özgü klonlardan (2,32,58) meydana gelmiş problemlara ihtiyaç duymaktadır. Bir bölgedeki minisatellitlerin bu bölgelere

özgü primerler kullanılarak çoğaltılması (6,26,27,28) ve bu çoğaltılmış minisatellit allelerin tekrar dizilerinin haritalanması bireye özgü parmak izlerinin meydana getirilmesinde kullanılmaktadır (27). Bazı basit tekrar dizileri ökaryotik ve prokaryotik organizmaların DNA uzunluk polimorfizmlerinin tespitinde kullanılmaktadır (28). Bu çalışmaların hepsinde polimorfizmlerin tespiti için birçok deneysel uygulamaya ve DNA dizisi hakkında ön bilgiye ihtiyaç vardır.

Bu araştırma DNA parmak içi tekniğini insan sağlığına yönelik alanda geliştirmeyi ve değerlendirmeyi amaçlamıştır. Kemik iliği transplantasyonu yapılmış bireylerde transplante edilmiş kemik iliği hücrelerinin ne oranda etkin oldukları seri ve güvenilir şekilde saptayacak yöntemi geliştirmek ve hayata geçirmek projenin başlıca hedefidir.

YÖNTEMLER VE GELİŞME

Kan Örneklerinden DNA Hazırlanması

Kan ve Kemik İliğinden DNA Hazırlanması (13)

1. 10 ml kan 3-4 damla 0.5 mM EDTA çözeltisi ile karıştırılarak alındı.
2. Kan 2500 g'de +4° C'de 15 dakika santrifüjlendi ve üst sıvı atıldı.
3. Santrifüj sonrası elde edilen çökelti 3 kez 1xRetikulosit tuz çözeltisi ile yıkandı.
Her defasında retikulosit tuz çözeltisine alınan hücre çökeltisi +4° C'de 15 dakika süreyle 2500 g'da santrifüjlendi.
4. Temiz 50 ml'lik santrifüj tüpü içerisine aktarılan son çökelti üzerine 30 ml soğuk çözücü (çözeltisi) eklenerek 15 dak buz içerisinde bekletildi.
5. Tüp 2500 g'da 15 dakika santrifüjlendi ve üst sıvı atıldı. Bu aşamada tüp çökeltide yitirmeksizin başaşağı edilerek bir filtre kağıdı üzerinde 15 dakika bekletildi.
6. Bu çökelti üzerine 10 ml steril 1 x STE çözeltisi eklenerek karıştırıldı.

7. Tüp 2500 g'da 15 dakika santrifüjlenerek üst sıvı atıldı.

8. Nükleer pellet üzerinde 4.5 ml 1 x STE çözeltisine ml'de 100 mg Proteinaz-K ve %1.0 olacak şekilde SDS eklenerek karıştırıldı.

9. Tüp oda ısısında gece boyu 37°C to 2-4 saat bekletildi.

10. Tüp üzerine eşit miktarda doymuş fenol eklenerek karıştırıldı. Bu karışım 5000 g'de 10 dakika santrifüjlendi ve üst faz temiz bir santrifüj tüpüne aktarıldı.

11. Sü üzerine eşit miktarda fenol kloroform/isoamil alkol (25/24/1) eklenerek karıştırıldı. Bu karışım 5000 g'da 10 dakika santrifüjlenerek üstfaz (su fazı) alındı.

12. Alınan su fazı üzerine hacminin 1/10'u arasında 3 M Sodyum Asetat (pH:5.0) ve 20 kat hacmine dek saf etanol eklendi. Bu işlem bir beher içerisinde yapıldı ve DNA çökünceye dek beklendi. Pastör pipet yardımı ile alınan DNA bir eppendorf mikrosantrifüj tüpü içerisine konuldu.

13. Eppendorf tüpü içerisinde bulunan DNA üzerine soğuk %70'lik etanol eklenerek karıştırıldı. DNA 12.000 rpm'de 20 santrifüj edilerek yıkandı.

14. Yıkanan DNA liyofilizatöre alınarak kurutuldu ve steril saf su kullanılarak çözüldü.

Saç Kökünden DNA Elde Edilmesi

1. Saç kökleri 1.5 ml mikrosantrifüj tüpleri içinde 37° C'de 0.01 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA, 0.1 M EDTA, 0.1 M NaCl (pH:8.0) %2 SDS, 20 mg/ml'de proteinaz K ve 0.039 M DTT ilave edilerek gece boyu inkubasyonda bırakıldı.

2. Aynı hacimde fenol ilave edilerek karıştırıldı. Bu karışım 12.000-rpm'de 4 santrifüj edilerek üst faz temiz bir eppendorf tüpe aktarıldı.

3. Üst faz üzerine kloroform aynı miktarda ilave edilip karıştırıldı.

4. Oda sıcaklığında 12000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilerek üst faz temiz bir eppendorf tüpe aktarıldı.

5. Aynı hacimde doymuş fenolle muamele edilip karıştırıldı.

6. Oda sıcaklığında 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi üst faz alınıp temiz bir tüpe aktarıldı.
7. Temiz tüpe alınan üst faz üzerine aynı hacimde kloroform ilave edilip karıştırıldı.
8. Oda sıcaklığında 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Üst faz temiz bir tüpe aktarıldı.
9. Alınan su fazı üzerine hacminin 1/10'u kadar 3 M Sodyum Asetat (pH:5.0) ve 25 hacim saf etanol eklendi.
10. DNA pelleti elde edilmesi için 12000 rpm'de 20 santrifüj edildi.
11. Elde edilen pellet 70%lik etanol ile yıkandı. 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
12. Çökelti liyofilizatöre konularak kurutuldu.
13. Kurutulan çökelti steril dH₂O kullanılarak çözüldü.

14. Elde edilen DNA örnekleri %0.7'lik Agaroz Gel Elektroforezi kullanılarak kontrol edildi.

15. Elde edilen DNA derişimini hesaplayabilmek için az miktarda DNA çözeltisi alınarak steril distile su ile seyreltildi ve 260 nm'deki optik yoğunluk değeri okundu.

$$\text{DNA derişimi } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{OD.260}) \times S \times F/1000$$

$$S = \text{Seyreltme Faktörü}$$

$$F = \text{Çift iplikli DNA için 50}$$

$$\text{Tek iplikli DNA ve RNA için 40}$$

$$\text{DNA VERİMİ} = \text{OD 260/OD 280}$$

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

2 dakika olarak program

1. Her reaksiyon tüpü içerisine steril saf su, tampon 10xMgCl₂, dNTP karışımı, primer ve DNA konuldu. Reaksiyon 50 µl'de gerçekleştirildi. Karışım aşağıdaki gibidir:

Steril saf su	32 µl
Tampon 10x	5 µl
MgCl ₂	5 µl
dNTP karışım	4 µl
Primer (25 µM)	2 µl
DNA (0.1 µg/µl)	1 µl
Taq Polimeraz (1 U)	1 µl

Çalışmada kullanılan

2. Reaksiyon bileşenleri steril temiz bir Eppendorf tüp içerisine koyulduktan sonra reaksiyon karışımı üzerine yüzeyi kapatacak şekilde bir damla mineral yağı konuldu.

Fakültesi

Çalışma

3. Eppendorf tüpü santrifüjlendi ve tüp ısısal döngü aletine yerleştirilerek çoğaltım işlemine başlandı.

4. Çoğaltım işleminden bir d; 94° C'de 1 dakika, 36° C'de 1 dakika, 72° C'de 2 dakika olarak programlandı ve reaksiyon 40 dde sonlandırıldı.
5. Dler tamamlandığında Eppendorf p 10 dakika süre ile 72° C'de bekletildi.
6. Tp oda ısısına getirildikten sonra çoğaltım işlemi ürünleri %1.4'lk agaroz gel elektroforezi ile kontrol edildi.
7. Sonuç alındıktan sonra çoğaltım rnleri -20° C'de saklandı.

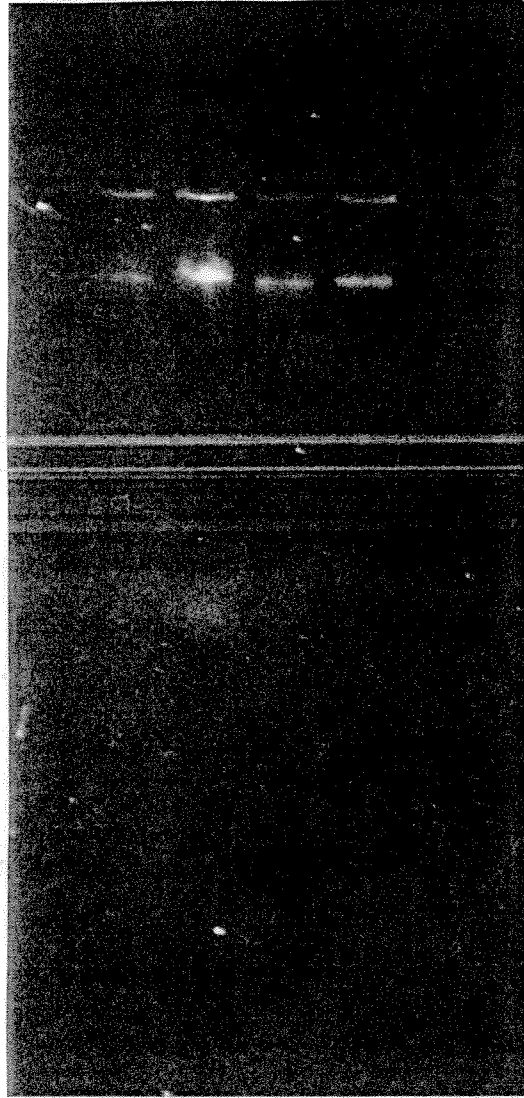
Örneklerin Sağlanması

Çalışmada kullanılan 95 DNA rneği çeşitli kaynaklardan sağlanmıştır. Bu örneklerden 75'i sağlıklı farklı bireylerden EDTA'lı tüplere alınan 10 ml'lik kan örneklerinden; 4 kemik iliği Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi (TÜTF) Pediatri Bölümünden EDTA'lı tüplere alınan 1 ml'lik kemik iliği örneklerinden; 7 adedi Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi (MTF) Hematoloji Bölümünden sağlanan kemik iliği DNA'sı; 9 tanesi de farklı bireylere ait sa köklerinden (14x) elde edilmiştir.

Örneklerden DNA Eldesi

Çalışmada kullanılan DNA örneklerinin eldesi Gereç ve Yöntemler bölümünde belirtildiği gibi yapıldı. DNA elde edildikten sonra derişimi ölçölüp -20 lik derin dondurucuda saklandı. Toplam 45 DNA örneğinden 4 tanesi kandan izole edilemezken 6 DNA örneği de saklama koşulları esnasında meydana gelen DNase bulaşımı sonucunda kaybedildi.

Elde edilen DNA örnekleri % 0.7 lik Agaroz gel elektroforezi kullanılarak incelendi. İzole edilen DNA miktarları ise, 10 ml kan örneğinden yaklaşık olarak $\sim 120 \mu\text{g}$ kemik iliğinden $\sim 14 \mu\text{g}$, 14 adet saç telinden $\sim 2 \mu\text{g}$ şeklindedir. DNA verimi ise 1.8-2.0 olarak bulundu.



Şekil 1) Sağ kökünden izole edilen DNA örneklerinin Agaroz gel elektroforezi ile incelenmesi.

Çalışmada Kullanılan Primerler

Çalışmada kullanılan primerler TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'nde sentezlenmiştir.

Çalışmada kullanılan primer dizileri aşağıdaki gibidir.

TUB-127...5'CGCGCCGG-3'

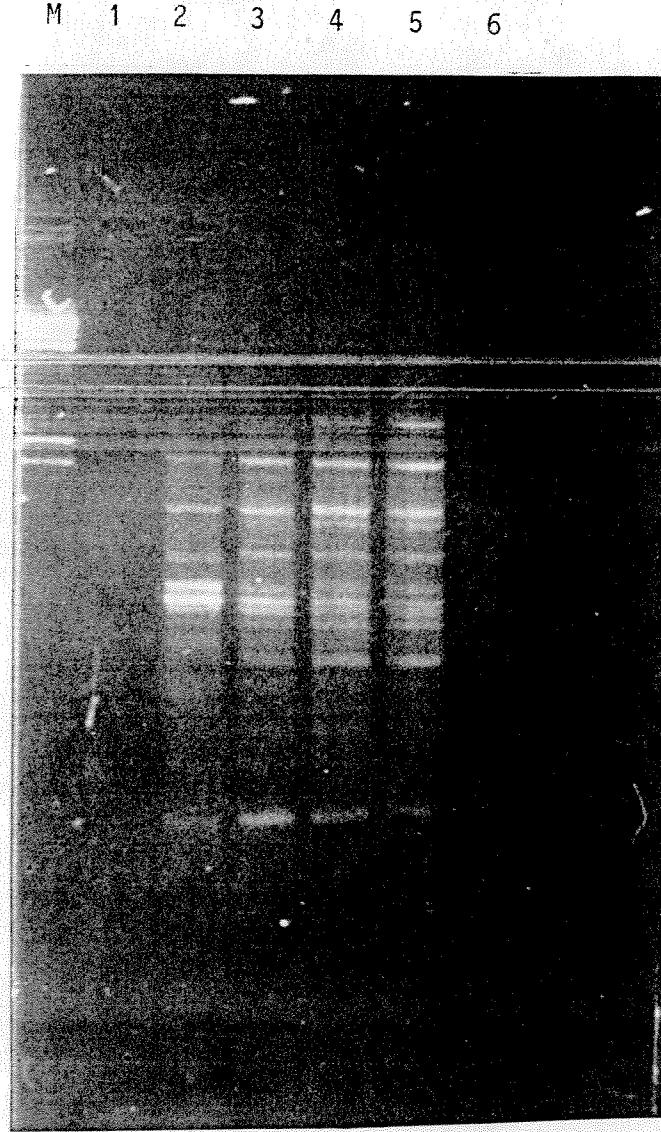
TUB-135...5'CGCGCCGC-3'

TUB-136...5'CGCGCCGT-3'

TUB-137...5'CGCGCCTT-3'

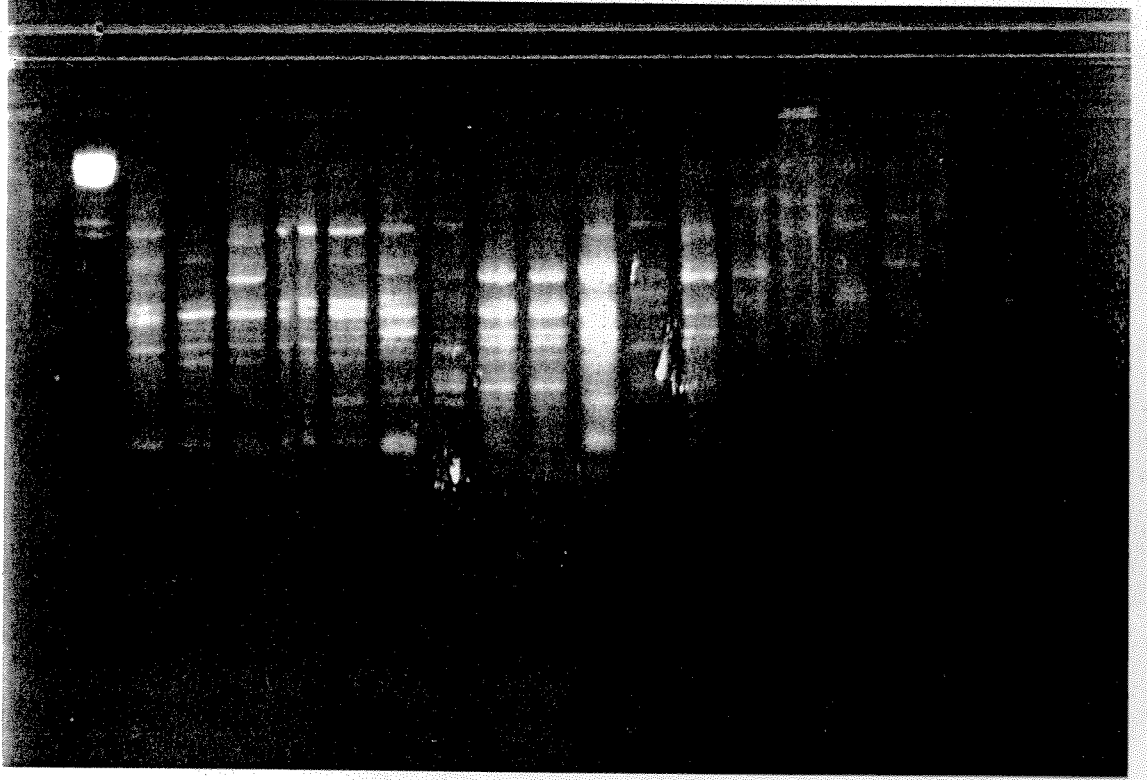
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Kullanılarak DNA Parmak İzinin Çıkartılması

PCR yöntemi kullanılarak DNA parmak izinin çıkartılmasında dört farklı primerden yararlanıldı. Çoğaltım işlemi ısısal döngü aletinde aletinde gerçekleştirildi. Reaksiyonlar için uygun $MgCl_2$ derişimini bulmak üzere yapılan optimizasyon çalışmalarında en uygun derişiminin $3.0 \mu M$ olduğu bulundu (Şekil 2). Çoğaltım işlemi bitiminde sonuçlar 50 ul'lik reaksiyon hacminden 6 ul alınıp %1.4 agaroz gel elektroforezinde incelendi (Şekil 3,4,5,6,7).

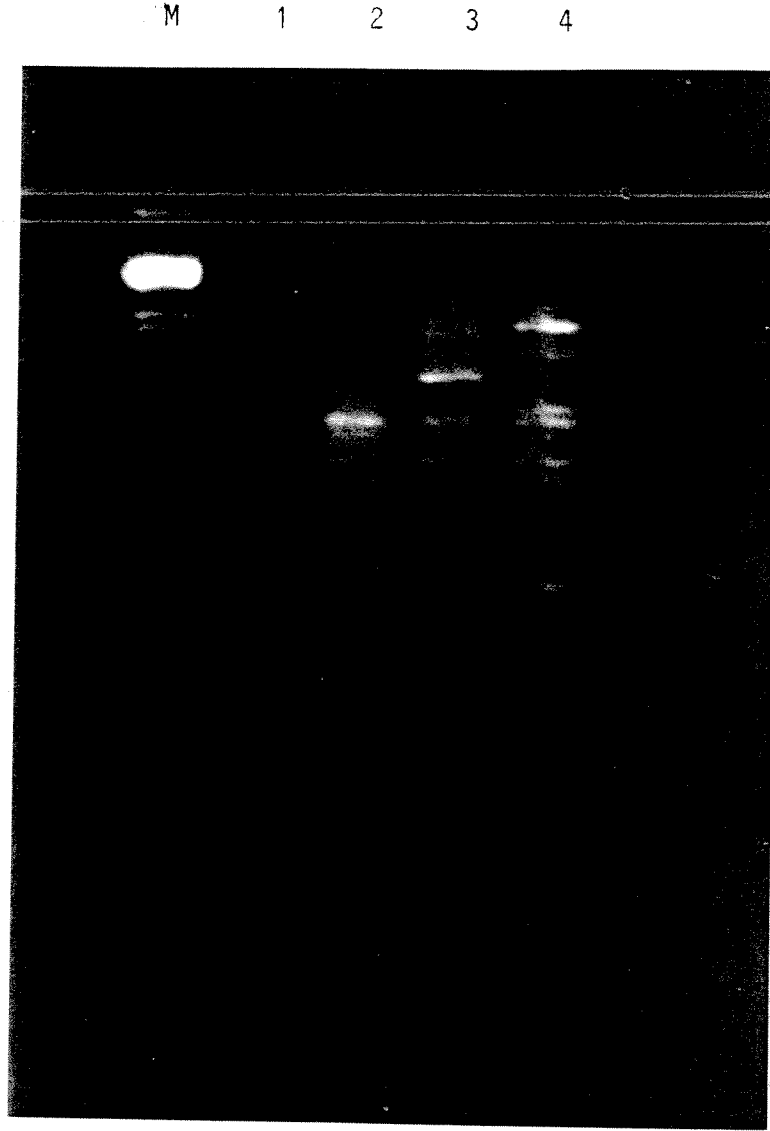


Şekil 2) Polimeraz Zincir Reaksiyonu için $MgCl_2$ derişiminin uygunlaştırılması (m lamda DNA Hind III kesimi 1. 15 mM $MgCl_2$; 2. 20 mM $MgCl_2$; 3. 25 m $MgCl_2$; 4. 30 mM $MgCl_2$; 5. 35 mM $MgCl_2$; 6. 40 mM $MgCl_2$).

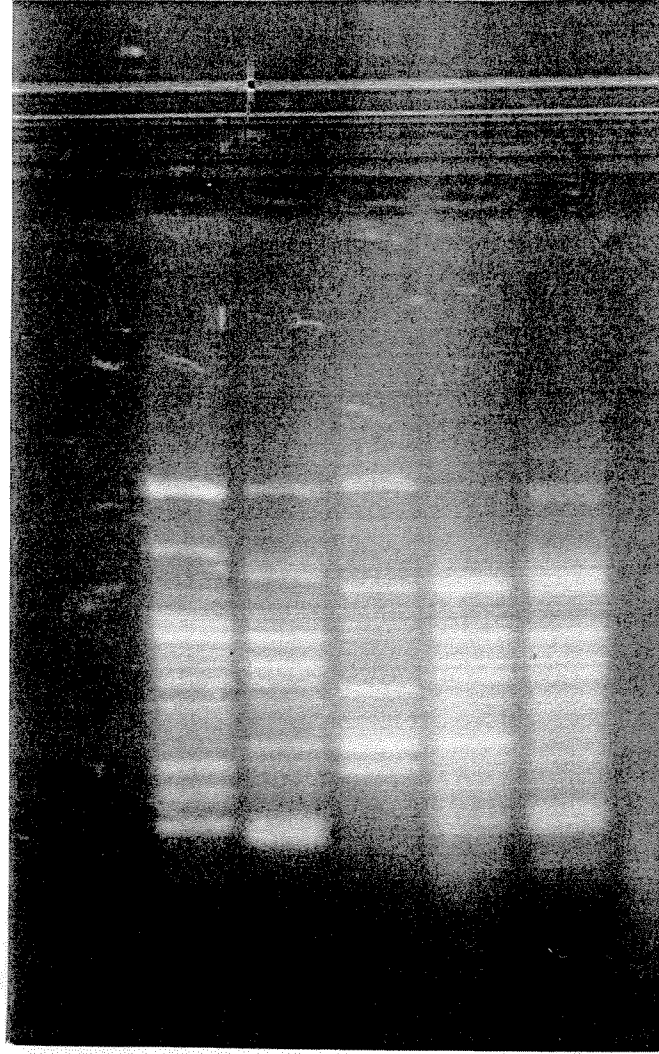
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13-14 15 16 17 18



Şekil 3) Farklı bireylere ait DNA çoğaltım parmak izlerinin agaroz gel elektroforezi ile incelenmesi (m lamda DNA Hind III kesimi; her sütun farklı bireylere aittir. Yalnız 8-9 aynı bireye aittir).

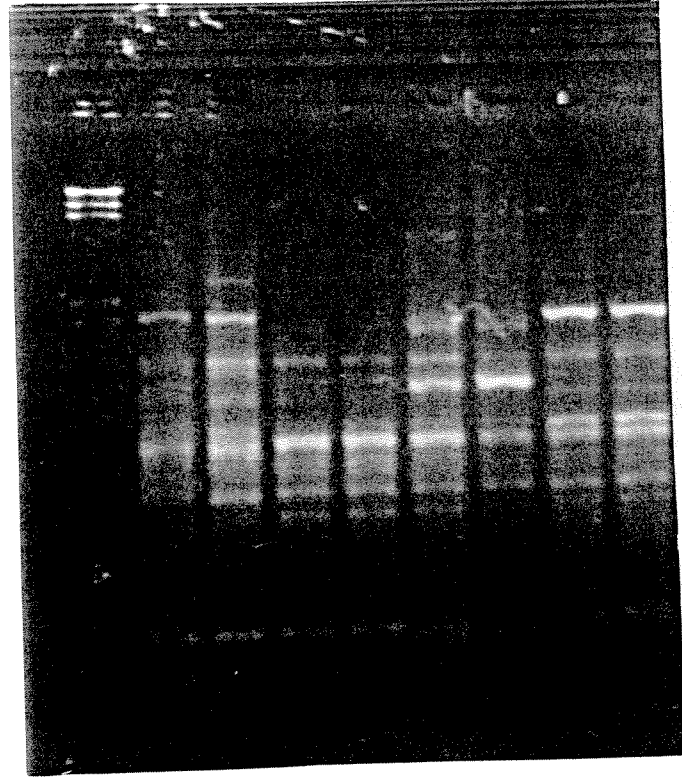


Şekil 4) Farklı primerler kullanılarak elde edilen aynı bireye ait DNA parmak izlerinin karşılaştırılması (m lamda DNA Hind III kesimi; TUB-135; 2. TUB-136; 3. TUB-137; 4. TUB127).

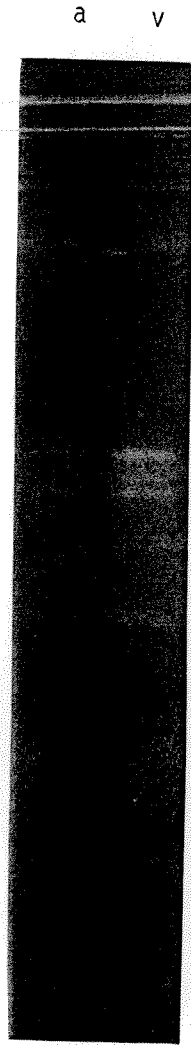


Şekil 5) Kemik iliği DNA parmak izlerinin agaroz gel elektroforeziyle incelenmesi.

M 1a 1b 2a 2b 3a 3b 4a 4b



Şekil 6) Dört ayrı bireye ait saç ve kan DNA çoğaltım parmak izleri (a: Saç kökü DNA
sı, b: Kan DNA sı, m lamda DNA Hind III kesimi)



Şekil 7) Kemik iliği transplantasyonu sonrası alıcı (a) ve verici (v) DNA çoğaltım parmak izi.

SONUÇ

1984 yılında Jeffreys ve arkadaşları, insan myoglobin genine ait bir intronda 33 bç'lik tekrarlayan minisatellit yapısının var olduğunu ortaya koymuşlardır (29). Daha sonraki yıllarda yapılan katkıların ışığı altında bu tür tekrarlayan dizilerin insan genomunda yüksek oranda bulunduğu ve polimorfizm gösterdiği belirlenmiştir (16,25). Başlangıçta gen içi bölgeler olan intronların işlevlerinin aydınlatılmasına yönelik olarak düşünülen, planlanan ve uygulanan bu çalışmalar daha sonra tanıya yönelmiş ve ortaya konulan polimorfik özelliklere sahip tekrarlayan dizilerin daha geniş kapsamda incelenmesi gündeme gelmiştir. Genomdaki bu tür tekrarlayan dizilere ait temel özelliğin, belirli bir çekirdek dizinin varlığından kaynaklandığı anlaşılmıştır (12,2,1,27,30).

Bu proje Jeffreys'in bu çalışmaların insan sağlığına yönelik olarak kemik iliği transplantasyonlarında sonuçların seri ve doğru şekilde kontrolü yolunda değerlendirilebileceği düşüncesinden yola çıkılarak hazırlanmıştır. Bu nedenle başlangıçta DNA parmak izlerinin çıkartılması için adı geçen araştırmacının yaptığı gibi restriksiyon enzimleri (Hind III, Sau 3A), radyoaktif (^{32}P) işaretli uzun oligonükleotitler [(5'ACGGTACACT3') 15 gibi] kullanılan Southern blot yöntemi denenmiştir.

Genomdaki tekrarlayan diziler, temelde RFLP ve PCR yöntemlerine dayalı değişik yaklaşımlar ile incelenebilmektedir (31,32,24,33,26,34,14,35). Ancak tüm bu yöntemlerde çalışmaların yapılabilmesi için çekirdek diziler ile ilgili bazı karakteristik bilgilerin bulunması gerekmektedir. Diğer taraftan, konu teknik açıdan incelendiğinde, radyoaktif olarak işaretlenen problarla yapılan çalışmalarda, maddenin yarı ömrü ve radyoaktif kirlilik gibi çeşitli risk etmenleri bulunmakta, dolayısıyla da radyoaktif olmayan yöntemlere oranla daha yoğun bir alt yapının bulunması gerekliliğini doğurmaktadır.

Herhangi bir ön bilgiye sahip olunmadan seçilen tek primerin kullanılmasıyla gerçekleşen polimeraz zincir reaksiyonu (DAF-DNA Amplification Fingerprinting-DNA çoğaltım parmak izi) tekrar dizilerine dayalı polimorfizmlere kısa sürede ulaşılabilmeyi sağlamış ve bu tür değişik yöntemlerle incelenen tekrarlayan dizilerin bireye özgü karakter ortaya koyabilecekleri düşünülmüştür (36,37,38,20).

DAF yönteminin ilk uygulayıcılarından Caetano ve arkadaşları "CGCGCCGG" dizisini primer olarak kullanmışlar ve 2.5 kb' den küçük ortalama 60 değişik farklı çoğaltım ürünü gözlemlemişlerdir (23). Bu tez çalışmasında, DAF yönteminden yararlanılmış ve yukarıda belirtilen primer dizisi çekirdek (core) dizi olarak kullanılmıştır.

Bu bilgiler ışığında yukarıda sözü edilen Souther blot tekniğinin pahalılığı, uzun zaman

içinde gerçekleştirilebilmesi ve işlem sayısına bağlı olarak risk parametrelerinin çokluğu gözönüne alınarak ve en önemlisi özgün bir araştırma yapmak amacıyla ilk gelişme raporunda da değinildiği gibi DAF yöntemi benimsenmiştir.

DNA çoğaltım parmakıçi yönteminde kullanılan primer dizilerinin 3' ucunda bulunan nükleotitlerin, çoğaltım ürünlerinin oluşumuna katkıda bulunduğu doğrultusunda (39,40,41) elde edilen verilerden yola çıkılarak 4 değişik primer hazırlanmıştır. Bu primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda birbirlerinden farklı görüntüler (pattern) elde edilmiştir (Şekil 4). Bu primer grubunun oluşturduğu görüntüler birbirleriyle karşılaştırıldığında, yapılan nükleotit değişikliklerinin çoğaltım ürünlerinin oluşumuna etkisi Caetona ve arkadaşlarının bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre TUB136 numaralı primer dizisi en belirgin görüntüye sahip bulunmaktadır. Bu inceleme sonunda bireylerde 2.5 kbç'den daha küçük ortalama 25 değişik farklı çoğaltım ürünü gözlemlenmiştir.

Çalışmalarımızda da görüldüğü gibi kemik iliği transplantasyonlarında alınan hücre örneklerinden (alıcıdan transplantasyon öncesi ve sonrası, ve vericiden alınan çekirdekli kan hücreleri) DNA izolasyonu ve saklanmasıyla güçlükle karşılaşabilmektedir. Bu güçlüğü aşmak amacıyla alınması her zaman mümkün ve kolay olan saç kökünün

kullanılması yolunda çalışmalar yapılmış ve 10-15 saç kökünden yeterli miktarda DNA elde etme yöntemi oturtulmuştur.

Saç, kan ve kemik iliği gibi odaklardan elde edilen 79 bireye ait DNA örneklerinin yukarıda söz edilen primer kullanılarak çoğaltılması sonucunda, herbiri DNA örneğinde 3 kbç'nin altında farklı büyüklükte bantlar elde edilmiştir (Şekil 3). Bu DNA'lerden 4 bireye ait saç kökü ve kana ait olanlarında, aynı nitelikte DNA çoğaltım parmak izleri gözlenmiştir (Şekil 6). Bu bulguya dayanarak, farklı bireylerde elde edilen DNA çoğaltım parmak izinin kişiye özgü olduğu anlaşılmıştır. Kemik iliği transplantasyonu geçirmiş bir bireyden alınan kemik iliği örneğinin incelenmesi sonucunda, vericiden ve alıcıdan alınan DNA örneklerinde aynı DNA çoğaltım bantları elde edilmesi (Şekil 7) sonucunda bu yöntemin kemik iliği transplantasyonunun izlenmesinde faydalı olabileceğini göstermiştir.

Proje çalışmasında az sayıda kemik iliği transplantasyonuna bağlı örnek bulunması proje öncesinde biriktirilmiş beş transplantasyona ait örneklerin saklama sürecinde bozulmuş olmalarından kaynaklanmaktadır. Çalışmalarda kullanılan oligonükleotit dizilerinin tarafımızdan düşünülmüş ve üretilmiş olması ve bilinebildiği kararıyla bu özelliği yönünden yurdumuzda ilk oluşturması proje çalışanlarına gurur kaynağı olmuştur.

Ayrıca bu yöntemi Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Kemik İliği Transplantasyonu çalışmalarında da rutin olarak kullanılmaya başlanması proje sahipleri için ikinci bir onur

vesilesi oluşturmuştur.

Projeye destekleri dolayısıyla TÜBİTAK Tıp Araştırma Grubu yelerine ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi ğretim yeleri Prof.Dr.Tevfik Akoğlu ve Prof.Dr.Mahmut Bayık'a teşekkürü borę biliyoruz.

KAYNAKÇA

- 1.Jeffreys,A.J., Wilson,V., Thein,S.L."Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA" Nature; 314:67-73 (1985).
2. Bell,G.T., Selby,M.J., Rutter,W.;"The Highly Polimorphic Region near the Human Insuline Gene is Composed of Simple Tandemly Repeating Sequences"; Nature; 295:31-35 (1982).
3. Ferrie, R., Smith,H., Downes,E.A."Repeat Unit Multipriming and Hybridization ^ a Novel Method for the Production of DNA Fingerprints Using Minisatellite probes" Nuc.Acid.Res; 19(9):2505 (1991).
4. Gill,P., Jeffreys,A.J., Werrett,D.J."Forensic application of DNA fingerprints" Nature; 328:577-579 (1990)
5. Graul,A.L.,"Autamated Gene Amplification Based on PCR Technique" Dn and P;

- 2(2):94-98 (1989).
6. Jeffreys,A.J., Wilson,V., Thein,S.L., "Individual-specific 'fingerprints' of human DNA" Nature; 316:76-79 (1985).
 7. Ely,J., Alford,P., Ferrel,R. "DNA Fingerprinting and the Genetic Management of a Captive Chimpanzee Population (Pan Tragdytetes)" Amer.Jour.Primat; 24:39-54 (1991).
 8. Vassrat,G., Georges,M., Monsieur,R., "A Sequence in M13 Phages Detects Hypervariable Minisatellites in Human and Animal DNA " Science; 235:683-684 (1987).
 9. Armour,J.A.L., Vergnaud,G., Crosser,M., Jeffreys,A.J.; "Isolation of Human minisatellite Loci Detected by Synthetic Tandem Repeat Probes Direct Comparasion with Cloned DNA Fingerprinting Probs"; Human Molecular Genetics; (5); 319-323 (1992).
 10. Paabo,S., "Ancient DNA:Extraction,Characterization, Molecular Cloning and Enzymatic Amplification "Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.; 86:1939-1943 (1989).
 11. Sambrook,J., Maniatis,T., Fritsch,E.F., "Molecular Cloning" 2nd edition,Cold Spring Harbor Lab.; New York (1989).
 12. Armour,J.A.L., Wong,Z., Wilson,V., Jeffreys,A.; "Sequences Flanking the Repeat Arrays of Minisatellites:Association with Tandem and Dispersed Repeat Elements"; Nuc.Ac.Res.;17(13);(1989).

13. Pena,S., Mecedo,A. "DNA Bioprints Simple Nonisotopic DNA Fingerprints with Biotinlated probes" Electrophoresis; 12:146-152 (1991).
14. Ruano,G., Pagliaro,E.M., Schwartz,E. "Heat-Shocked PCR:An Efficient Method for DNA Amplifications to Forensic Analysis" Bio Techniques; 13(2):266-281 (1992).
15. Weising,K., Kaemmer,D. "DNA Fingerprinting of *Ascochyta rabiei*, with Synthetic Oligodeoxynucleotides" Curr.Genet.; 19:483-289 (1991).
16. Sher,A. "DNA Fingerprinting by Oligonucleotid Probes Specific for simple Repeats" Hum.Gen.; 74:239-243 (1986).
17. Gyllenster,U.B., "PCR and DNA Sequencing", BioTechniques; 7(7):700-709 (1989)
18. Pakkala,S. "DNA Fingerprinting in the Detection of Residual Disease in Acute Leukemia; 5(5):437-440 (1991).
19. Willard,T., "Genetics in Medicine" Fifth Edition W.B.Sounders Company Philadelphia 1991.
20. Welsh,J., Mc.Clelland,M.; "Fingerprinting genomes using PCR with Arbitrary Primers" Nucl.Acids.Res.; 18:7213-7218 (1990).
21. Welsh,J., Mc.Clelland,M. "Genomic Fingerprinting Using Arbitrarily Primed PCR and a Matrix of Pairwise Combinations of Primers" Nuc.Ac.Res.; 19(29) 5275-5279 (1991).

22. Welsh,J., Mc.Clelland,M. "Polimorphisms Generated by Arbitrarily Primed PCR in the Raice application to Strain Identification and Genetic Mapping Nuc.Ac.Res. 19(2) 303-306 (1991).
23. Caetano,A., Bassam,B.J., Gresshoff,P.M."DNA Amplification Fingerprinting Using by Short Arbitrary Oligonucleotide Primers; Bio/Technology; 9:553-557 (1991).
24. Charlier,J.P., Laurent,A.M., Carter,D.A., Bellis,M."3'Alu PCR:a Simple and Rapi^t Metod to Isolate Human Polimorphic Markers"Nuc.Ac.Res.;20(6):1992).
25. Nakamura,Y., Leppert,M., O'Connel,P.,"Variable Number of Tandem repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping" Science; 235:1616-1622 (1987).
26. Jeffreys,A.J., Wilson,V., Neumann,R."Amplification of Human Minisatellites by the polymerase chain reaction:Towards DNA Finger_printing of Single Cell" Nuc.Acid.Res.;16(23):10953-10971 (1988).
27. Jeffreys,A.J., Neumann,R., Wilson,V.,"Repeat Unit Sequence Variation in Minisatellites:a novel Source of DNA Polimorfizm for Studying Variation and Mutation by Single Molecule Analysis" Cell; 60:473-485 (1990).
28. Tauts,D., "Hypervariable of Simple Sequence and General Source for Polimorphic DNA Markers" Nuc.Ac.Res. 17(4):2450 (1990).
- 29.Jeffreys,A.J., Wilson,V., Thein,S.L."DNA Fingerprints" and Segration Analysis of Multiple Markers in Human m.;Jour.Hum.Genet.;39:11-29 (1984)

30. Jeffreys,A.J., Turner,M., Devenham,P., "The Efficiency of Multilocus DNA Fingerprint Probs for Individualization and Establishment of Family Relationships, Determined from Expensive Casework" *Am.Jour.Hum.Genet*; 48:824-840 (1991).
31. Bej,A.K., Mahbubani,M.H.,Atlas,R.;"Amplification of Nucleic Acids by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Other Methods and Their Applications" *Crit. Rev.in: Bioch.and Mol.Biol.*; 26(314);301-334 (1991).
32. Boestein P.R.,"Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using RFLP"; *Am.Jour.Hum.Genet*;32;314-315 (1980).
33. Arlich,H.A., Gelfand,D., Sninsky,J.J."Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction" *Science*; 252:1643-1656 (1991).
34. Landegren,U., Kaiser,R., Caskey,C.T.,"DNA Diagnostics-Molecular Techniques and Automation" *Science*: 242:229-237 (1988).
- 35.Vuario,A., Sajantila,A."Amplification of the Hypervariable Region Close to the apolipoprotein B gene:Application to Forensic Problems" *Bio.Biophy.Res.Comm.*; 17(2) 616-620 (1990).
36. Matera,A.G., Ward,D.C.,"Oligonucleotid Probes for the Analysis of Specific Repetitive DNA Sequences by Fluorescence in situ Hybridization " *Hum.Molec.Genet.*; 1(7):535-539 (1992).

37. Muralidharan, K., Wakeland, E.K., "Concentration of Primer and Template Qualitatively Affects Products in Random Amplified Polymorphic DNA PCR" *Bio Techniques*; 14(3) (1993).
38. Scott, M.P., Haymes, M.K. "Paratype analysis using RAPD PCR" *Nuc. Ac. Res.*; 20(20):5493 (1992).
39. Caetano A.G., Bassam, B.J., Gresshoff, D.M. "Primer-Template Interactions During DNA Amplification Fingerprinting with Single Arbitrary Oligonucleotides" *Mol. Gen. Genet.*; 235:157-165 (1992).
40. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R. "DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are useful as genetic Markers" *Nuc. Ac. Res.*; 18(22) 6531-6535 (1990).
41. Wu, D., Ugazzoli, L., Pal, B. "Effect of Temperature and Oligonucleotide Primer Length on the Polymerase Chain Reaction" *DNA and Cell Biology*; 10(3):233-238 (1991).