

DNA FINGERPRINTING

Aynı zamanda DNA Typing (tıplemesi) olarak da adlandırılan DNA fingerprinting DNA dizilerini izole etme ve görüntüleme metodudur. Teknik 1984'te İngiliz genetikçi Alec Jeffreys'in, minisatellitler olarak adlandırılan; genin fonksiyonuna etkisi olmayan fakat gen içinde ve bir DNA örneğindeki diğer genlerde tekrarlanan, belirli DNA dizilimlerinin varlığını fark etmesinden sonra geliştirilmiştir. Jeffreys aynı zamanda her organizmanın özgül minisatellit kalıpları olduğunu belirlemiştir, tek istisna tek bir zigottan oluşan çoklu bireylerdedir, ör: tek yumurta ikizleri.

Bir DNA fingerprinting prosedürü şunlardan oluşur: öncelikle DNA içeren hücre örneklerinin (ör.; deriden, kan veya saçtan) eldesi, DNA izolasyonu ve saflaştırılması. Daha sonra DNA, restriksiyon enzimleriyle zincirin özel noktalarından kesilir. Bu aşamda çeşitli uzunluklarda DNA fragmentleri oluşur ve bunlar elektroforez sisteminde uzunluklarına göre ayrılırlar; daha kısa fragmentler pozitif kutba daha çabuk hareket ederler.

Ayrışmış, çift zincirli DNA fragmentleri daha sonra bir blotlama tekniğine maruz bırakılır. Blotlamada DNA alkali uygulamasıyla tek zincirli hale getirilir ve bir naylon tabakaya transfer edilir. Radyoaktif problarla hibridize edilir ve problar minisatellitlere bağlanırlar, daha sonra otoradyografisi alınır. Radyoaktif problemlerin bağlandığı noktalarda koyu izler oluşur. Bu izlerin oluşturduğu sonuç kalıp analiz edilir.

Eğer fingerprinting için az miktarda DNA örneği mevcutsa, bir DNA segmentinin binlerce kopyasını üretebilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulanabilir. Yeterli miktarda DNA üretildiğinde, çeşitli biyomoleküler sekans analizi metotları kullanılarak DNA segmentindeki nükleotid çiftlerinin tam dizilimi belirlenebilir. Yeni otomatikleştirilmiş malzemeler sayesinde DNA sekans analizinin hızı büyük miktarda arttırılmıştır ve bu genetik hastalıklara yol açan gen segmentlerinin yerinin tam olarak belirlenmesi, insan genomunun haritalanması, kuraklığa dayanıklı bitkilerin mühendisliğinde ve genetik olarak müdahalede bulunulmuş bakterilerin biyolojik ilaçları üretmesi gibi birçok yeni pratik uygulamaların yapılabilmesini mümkün kılmıştır.

DNA fingerprinting asıl olarak genetik hastalıkların varlığını araştırmak için kullanılmıştır, kısa zaman sonra cinayet araştırmalarında ve adli tıpta kullanılır olmuştur. İlk DNA kanıtına dayana cinayetten mahkumiyet Amerika'da 1988 yılında olmuştur. Kriminal araştırmalarında, suç mahallinden toplanan delillerden elde edilen DNA parmak izi şüphelilerin

DNA parmak iziyle karşılaştırılır. DNA kanıtı şüpheliyi suçsuz çıkartabilir veya ilişkisi olduğunu gösterir.

Genellikle mahkemeler DNA testlerinin güvenilirliğini kabul etmiştir ve DNA test sonuçlarını kanıtlara dahil etmiştir. Fakat, DNA fingerprinting birkaç alanda tartışmalıdır: sonuçların doğruluğu, testin maliyeti ve tekniğin olası suiistimali.

DNA fingerprintingın doğruluğundan çeşitli sebeplerden dolayı şüphe edilmiştir. İlk olarak, tüm DNA zincirinden çok, DNA parçalarının parmak izi çıkartıldığından, bir DNA parmak izi özgül olamayabilir; DNA parmak izi test sonuçlarının özgül olduğunu gösteren, geniş-ölçekli bir araştırmada bildirilmemiştir. Ek olarak, DNA parmak izi analizleri genellikle özel laboratuvarlarda yapılmaktadır ve burada testin standart prosedürü takip edilmeyebilir ve kalite kontrolü yapılmıyor olabilir. Ayrıca, testin yorumunu bir insan yaptığından, olabilecek bir insan hatası yanlış sonuca yol açabilir. DNA parmak izi analizi pahalıdır. Kendi DNA eksperlerini sağlayamayan suçlular, kendilerini DNA kanıtlarına dayanarak verilen cezalar karşısında yeterince savunamayabilirler.

Amerika Birleşik Devletlerinde, Federal Bureau of Investigation (FBI) Ulusal DNA index Sistemi olarak adlandırılan ulusal genetik veritabanını oluşturmuştur. Veritabanı, mahkum edilmiş suçlular ve suç sahasında bulunan kanıtlardan elde edilmiş DNA'ları içerir. Bazı eksperler bu veritabanının AIDS gibi damgalayıcı hastalıkları taşıyan bireylerin belirlenmesi gibi izinsiz amaçlar için kullanılmasından korkmaktadır.

DNA FINGERPRINTING'İN KULLANIM ALANLARI

1- Kalıtsal Bozuklukların Tanısında:

DNA fingerprinting tüm dünyada, hastanelerde hem prenatal hem de yeni doğan bebeklerde kalıtsal bozuklukların tanısı için kullanılmaktadır. Bu bozukluklar cystic fibrosis, hemofili, Huntington's disease, ailesel Alzheimer, orak hücre anemisi, thalesemi ve diğer birçokları olabilir. Bu tip bozuklukların erken teşhisi tıbbi personelin ve ailenin çocuğun uygun tedavisi için kendilerini hazırlamalarını olası kılar. Bazı programlarda, genetik danışmanlar DNA fingerprinting bilgisini, ebeveyn adaylarını hastalıklı bir bebeğe sahip olma riskini anlamalarında kullanır. Diğer programlarda DNA fingerprint anne-baba adaylarının hasarlı hamileliklerin devamıyla ilgili karar vermelerinde kullanılır.

2- Kalıtsal Bozukluklar İçin Tedavi Yöntemleri Geliştirmekte:

Kromozom üzerindeki, kalıtsal hastalıkların yerini belirlemek için yapılan araştırma programları DNA parmak izlerinde bulunan bilgiye dayanmaktadır. Aynı belirli bozukluk geçmişine sahip olan akrabaların DNA parmak izlerini çalışarak veya hastalıklı veya sağlam olan geniş insan gruplarını karşılaştırarak, sözü edilen hastalıkla ortak olan DNA kalıplarını tanımlamak mümkündür. Bu çalışma, böyle hastalıkların belirlenmesi ve genetik bir tedavinin geliştirilebilmesindeki gerekli olan ilk adımdır.

3- Kriminal Tanımlama ve Adli Tıpta Biyolojik Kanıt Olarak:

FBI ve U.S. çevresindeki polis laboratuvarları DNA parmak izlerini şüphelilerle, biyolojik kanıtlar (kan ve semen, saç vs.) arasındaki bağlantıyı kurmada kullanılmaya başlamıştır. 1987'den beri yüzlerce dava DNA parmak izi kanıtının yardımıyla karara bağlanmıştır. Suç sahnesinde bırakılan kan, saç, deri hücreleri ve diğer genetik kanıtlardan izole edilen DNA, şüphelinin DNA'sıyla, VNTR kalıpları kullanılarak karşılaştırılabilir ve suçlu olup olmadığı belirlenebilir.

4- Analık ve Babalık Testlerinde:

Bir insanın VNTR'ları annesinden veya babasından kalıtıldığı için, VNTR kalıpları analığın veya balığın belirlenmesinde kullanılabilir. Bu uygulamalarda DNA parmak izleri eşi görülmemiş, neredeyse mükemmel doğruluk göstermiştir. Ebeveyn-çocuk VNTR kalıp analizleri standart babalık davalarını çözmekte, daha karmaşık yasal uyruk doğrulama vakalarında ve evlatlık, biyolojik anne-baba belirlenmesi olaylarında kullanılmaktadır.

5- Bireysel Tanımlama:

Bir bireyin her organ ve dokusu aynı DNA fingerprintine sahip olduğu için, U.S. askeri servisleri, hareket sırasında kaybolan insanların veya ölülerin tanımlanmasında gerekebileceği için tüm personelinden DNA parmak izi toplama programı başlatmıştır.

6- Bitki Varyetelerinin Patentini Almada:

DNA fingerprinting'in bir diğer kullanım alanı da sivil mahkemelerdeki mısır ve domates davalarında olmuştur. İnsanlar eski melezleme tekniklerini kullanarak, uzun süreli çabaları sonucunda yeni mısır ırkları geliştirmiş fakat bu bitkilerin kendilerine ait olduğunu ispatlayamadıkları için asla özelliklerini koruma hakkını veya patent korumasını alamamışlardı. Tüm çalışmalarını ırkı geliştirmek için harcıyorlar ve biri ırkı alıyor ve bunun

karşısında hiçbir şeyi kanıtlayamıyorlardı. Artık mısır bitkisinde DNA fingerprinting yapılabilmektedir ve birçok büyük tohum şirketleri rutin olarak kendi önemli varyeteleri için DNA fingerprint veritabanları oluşturmaktadır, böylece mahkemeye gidip, kendilerinin olduğunu ispatlayabilirler. Bu ekonomik bir koruma yaratmaktadır ve insanları bir şeyler geliştirmek için teşvik etmektedir.

DNA FINGERPRINTING İLE İLGİLİ PROBLEMLER

Bilim dünyasındaki hemen her şey gibi, DNA fingerprinting hakkında da hiçbir şey %100 kesin değildir. DNA parmak izi terimi bir bakıma yanlış bir adlandırmadır ve parmak izi gibi, VNTR kalıplarının verilen insan için kesinlikle özgül olduğu izlenimi yaratmaktadır. Gerçekte, Bir VNTR kalıbının tüm yapabileceği, VNTR kalıbının ait olduğu (çocuk, kriminal kanıt vs.) insanın, sözü edilen insan olma olasılığını göstermektedir. Bu olasılık 20 milyonda 1 olabilir ki, bu insanın DNA fingerprint ile makul bir uyum gösterdiğini belirtir ve yine bu olasılık 20'de 1 olabilir ki bu VNTR kalıbının sahibinin spesifik kimliği hakkında büyük miktarda şüphe bırakır.

1- Yüksek Olasılık Üretmek :

Bir DNA parmak izinin belirli bir insana ait olma olasılığının makul şekilde yüksek olması gerekmektedir- özellikle kriminal davalarda, ortaklık bir şüphelinin suçlu veya masum olduğunu belirleyecekken. Belirli nadir VNTR'ları veya VNTR kalıbını yaratmak için VNTR'ların kombinasyonlarını kullanmak iki DNA örneğinin gerçekten uyum veya bağlantı gösterme olasılığını artırır.

2- Olasılığı Belirlemede Problemler:

A- Populasyon Genetiği:

VNTR'lar genetik kalıtımın sonuçları olduğundan tüm insan populasyonlarında eşit olarak dağılmışlardır. Bu nedenle verilen bir VNTR sabit bir görülme olasılığına sahip olamaz, bireyin genetik zeminine bağlı olarak değişir. Olasılıklardaki farklılıklar ırk hatları boyunca kısmen görünürdür. Bazı VNTR'lar Hispaniklerde (İspanyollar) sıklıkla görünürken, Kafkaslarda veya Afro- Amerikanlar da çok nadir görünür. Şu anda, etnik gruplarda VNTR sıklık dağılımı hakkında, bu gruplardaki bireylerin kısmi olasılıklarını belirlemek için yeterli bilgi bulunmamaktadır, sayıları hızla artan ırklar arası bireylerin heterojenik genetik kompozisyonları, yeni bir takım sorular oluşturmaktadır. Populasyon genetiği olarak bilinen, bu alandaki ileriki araştırmalar, tartışma ile

çevrelenmiş ve engellenmektedir. Çünkü insanlar, ırksal hatlar boyunca genetik anomalilerle tanımlama fikri yakın geçmişteki insanları öjeni (insan ırkının soyaçekim yoluyla ıslahına çalışan bilimdalı) ve etnik saflaştırma hareketlerine tehlikeli bir şekilde yaklaştırmaktadır ve ırksal ayırım için bilimsel bir temel sağlayabileceği tartışılmaktadır.

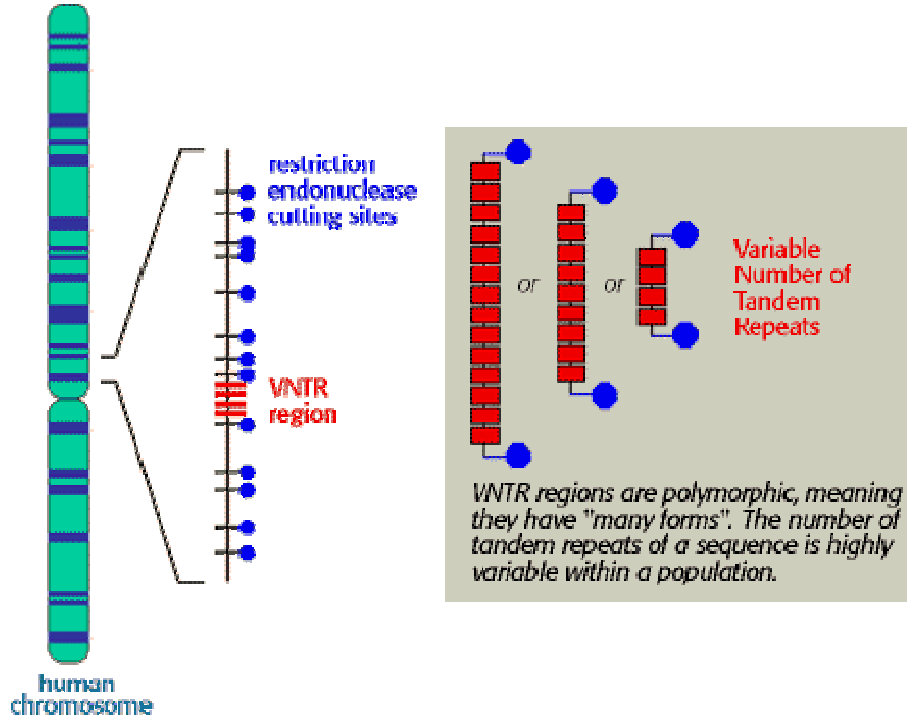
B- Teknik Zorluklar:

Hibridizasyon veya problama işlemindeki hatalar olasılığa dahil edilmelidir ve genellikle hata fikri basit olarak kabul edilemezdir. Çoğu insanın hemfikir olacağı gibi bir laboratuvar teknisyeninin deneyi doğru yürütmemesi yüzünden masum bir insanın hapse giderken, suçlu özgürce dolaşmamalı veya bir biyolojik annenin çocuğunun yasal velayet hakkını kaybetmemelidir. Elde edilebilen DNA örneği çok az olduğunda, bu önemli bir husustur. Çünkü hataya çok fazla yer yoktur, özellikle eğer DNA örneğinin analizi örneğin amplifikasyonunu içeriyorsa, çünkü eğer yanlış DNA (ör.; lab. teknisyeninin deri hücresi) amplifiye edilirse sonuçlar son derece zararlı olabilir. Şu ana kadar, hatayı en aza indirmek için DNA fingerprinting uyumlarının (match) belirlenmesi ve laboratuvar güvenliği ve doğruluğu için standartlar ne kesindir ne de dünya çapında bir sisteme göre düzenlenmiştir, bu da büyük miktarda halka itirazlarına yol açmaktadır.

VNTR'lar

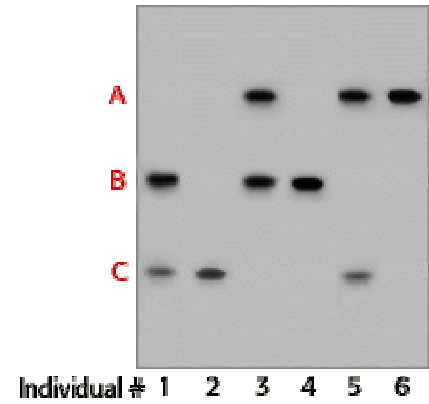
Her DNA zincirinin organizmanın gelişmesiyle ilgili genetik bilgiyi içeren parçaları (exonlar) ve görünüşte hiçbir genetik bilgiyi taşımayan parçaları (intronlar) vardır. Her ne kadar intronlar gereksiz gibi görünse de DNA'nın 3-boyutlu konformasyonunun oluşumunu ve henüz keşfedilmemiş özellikleri kontrol etmektedir. Bu gen olmayan DNA bölgelerinin tekrarlayan baz çifti dizilerini içerdikleri bulunmuştur. Bu diziler, Variable Number Tandem Repeats (VNTRs) değişken sayıda sıralı tekrarlar olarak adlandırılır ve 20'den 100'e kadar baz çifti içerebilirler.

VNTR'ları ayırt etmek için en sık kullanılan adli tıp metodu Southern Hibridizasyonudur. Eğer bir VNTR'ın iki yanından DNA, bir restriksiyon endonükleazla kesilirse, sonuç DNA fragmentlerin boyu değişiklik gösterebilir, RFLP yani restriksiyon fragment boy polimorfizmi ile sonuçlanır. Bu şematize olarak şekilde gösterilmektedir, kırmızı kutular tekrar birimlerini temsil ederken, mavi lolipoplarda bir restriksiyon endonükleazın kesim bölgelerini temsil etmektedir. Bu şekilde, VNTR lokusu için yalnızca üç farklı varyantlar (alleller) resmedilmiştir, fakat genellikle insan VNTR lokuslarında 50 veya daha fazla farklı allel bulunur.

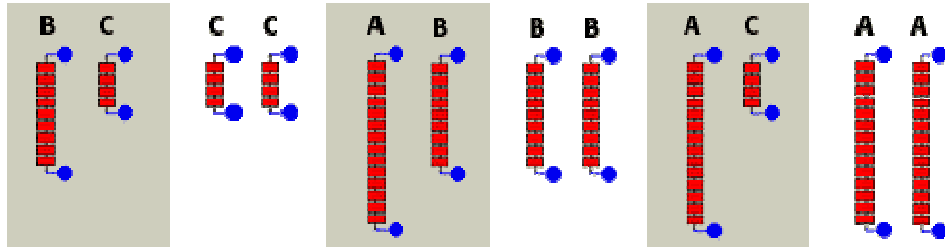


Bir VNTR lokusunun Southern Hibridizasyonu ile analizi çoğunlukla her ebeveynden kalıtılan bir bantı içeren iki-bant kalıbı şeklinde sonuçlanır. Eğer iki ebeveyninde bant boyutları aynı veya neredeyse aynıysa tek bir bant kalıbı oluşabilir. Basit bir örnekle gösterilecek olursa A, B ve C olarak isimlendirilen ve yukarıda şematize edilmiş üç farklı allel için, 6 özgül DNA profili olasıdır.

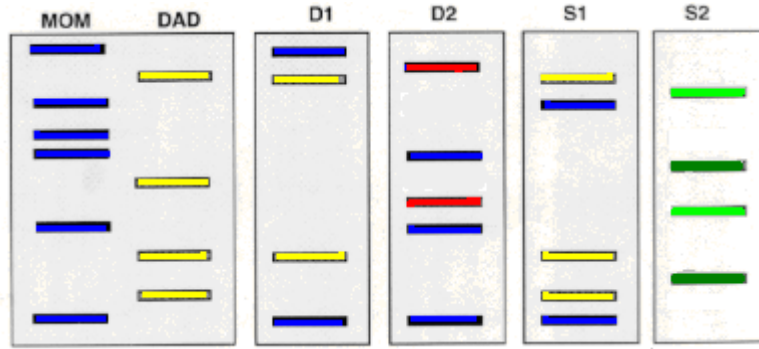
Olası genotipler aşağıdaki şekilde görüldüğü gibi AA, BB, AB, BC ve AC'dir. Bu genotiplerin herbiri sağdaki otoradyogramda gösterildiği gibi, Southern Hibridizasyonundan sonra farklı 1 veya 2 bant kalıbı şeklinde ayırt edilebilirler.



Three VNTR alleles (A, B, & C) in six individuals



Verilen bir insanın VNTR'ları onun anne-babası tarafından verilen genetik bilgiden gelmektedir, kişi annesinden veya babasından veya her ikisinin kombinasyonundan kalıtılan VNTR'lara sahip olabilir, fakat asla annesinde veya babasında olmayan bir VNTR'a sahip olamaz. Aşağıda gösterilen Mrs. Nguyen'in (mavi), Mr. Nguyen'in (sarı) ve onların dört çocuğunun VNTR kalıplarıdır. D1 (Nguyenlerin biyolojik kızları), D2 (Mr. Nguyen'in üvey kızı, Mrs. Nguyen ve önceki kocasının [kırmızı] çocuğu), S1 (Nguyenlerin biyolojik oğlu) ve S2 (Nguyenlerin evlat edindikleri oğlu, biyolojik olarak ilişkileri yok [anne babası koyu ve açık yeşil]).



VNTR kalıpları genetik olarak kalıtıldığı için, verilen bir insanın VNTR kalıbı daha fazla veya daha az özgül olabilir. Bir insanın VNTR kalıbının analiz etmek için daha çok VNTR problemleri kullanılırsa, daha özel ve bireyselleştirilmiş pattern veya DNA parmak izi elde edilir.

DNA fingerprinting'de çoğunlukla kullanılan üç tip DNA değişkenliği vardır: restriksiyon fragment boy polimorfizmi, VNTR'lar ve kısa sıralı tekrarlar (STRs). STR analizi DNA fingerprinting'in popüler bir metodudur. STR'lar aynı zamanda mikrosatellit tekrarları olarak bilinirler ve iki ila yedi baz diziliminin tekrarından oluşurlar. Örneğin, $[GT]_4$ tekrarı GTGTGTGT ve $[CAG]_6$ CAGCAGCAG... şeklindedir. İnsan genomu tüm kromozomlarda eşit dağılmış olan bu STR'lardan yüzlercesini, binlercesini içermektedir. Sonuç olarak, her çeşit tekrarların binlercesi vardır, bunlar binlerce $[GT]_n$, $[CAG]_n$, $[CTG]_n$, $[GATA]_n$,... vs.'dir. Sonuçta, açık anlamda DNA fingerprinting tekrarın her iki yanında bulunan özgül DNA dizilerine dayanmaktadır. Bu özgül flanking diziler aralarında kalan bölgenin amplifikasyonu için kullanılır.

Fingerprint tekniği proteinin peptid fragmentlerine enzimatik parçalanmasını içerir. Karışım daha sonra emici kağıt üzerine yerleştirilir ve net yüke göre göçün olduğu bir elektrik alanına maruz bırakılır. Kağıt daha sonra dik açıda çevrilir ve bir çözelti içine yerleştirilir. Kromatografik etki

peptidlerin ikinci yönde yürümesine neden olur. Sonuç peptid fragmentlerinin özel kalıplarda benekler veya “parmakizleri” şeklinde iki-boyutlu ayrışmasıdır.

1954 ve 1957 yılları arasında yürüttüğü çalışmasında Vernon Ingram, fingerprinting tekniğini kullanarak, Hbs’in beta zincirinde 6.pozisyonda (N-terminalinden) tek bir aminoasit değişimi olduğunu göstermiştir. Ingram’ın çalışması HbS ve HbA’nın sadece tek bir fragmentle birbirinden ayrıldığını ortaya çıkartmıştır. Sonraki analizler tek bir amino asit değişiminin olduğunu göstermiştir. Beta zincirinin altıncı pozisyonundaki valin glutamik asidin terini almıştır.