

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

Danışman: Yard. Doç. Dr. Gönül Filoğlu

**KARIŞMIŞ ÖRNEKLERDE STR ANALİZİNİN LR
(LIKELIHOOD RATIO) KULLANILARAK YORUMLANMASI**

DOKTORA TEZİ

TOLGA ZORLU

İstanbul 2015

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

Danışman: Yard. Doç. Dr. Gönül Filoğlu

**KARIŞMIŞ ÖRNEKLERDE STR ANALİZİNİN LR
(LIKELIHOOD RATIO) KULLANILARAK YORUMLANMASI**

DOKTORA TEZİ

TOLGA ZORLU

İstanbul 2015

Bu tez çalışması,

İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje No: 28881),

EUROFORGEN (European Forensic Genetics Network of Excellence- Avrupa Adli Genetik Mükemmeliyet Ağı) Kısa Süreli Eğitim Programı (2014),

tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin gerçekleşmesinde katkısı bulunan Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. İmdat Elmas'a,

Bilim yolunda ilerlememde hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Salih Cengiz'e,

Tezim süresince özverisi ve hoşgörüsünü esirgemeyen, yol gösterici olan, içten tutum ve davranışları ile destek ve katkılarından dolayı sevgili danışmanım Yard. Doç. Dr. Gönül Filoğlu'na,

Tezimin hazırlanması süresince değerli katkı, destek ve yardımlarından dolayı değerli hocalarım Yard. Doç. Dr. Havva Altunçul'a ve Doç. Dr. Hülya Yükseloğlu'na,

Doktora tezimin altyapısını oluşturan ve beni laboratuvarında eğiten, yol gösteren, maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nden Gülten Rayimoğlu'na, Santiago de Compostela Üniversitesi, Adli Genetik Bölümü'nden Prof. Dr. Angel Carracedo, Prof. Dr. Maria V. Lareu' ya ve Dr. Ana Mosquera'ya,

Tez çalışmamda her türlü yardım ve moral veren, sevgi ve sabırla bana katlanan çok sevgili arkadaşlarım Dr. Özlem Bülbül'e, Erhan Açar'a, Dr. Melek Özlem Kolusayın'a ve sevgili nişanlım Sebla Çeviköz'e,

Tez çalışmam boyunca manevi desteklerini esirgemeyen Adli Tıp Enstitüsü'nün idari personeline,

Bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan tüm gönüllülere,

Benim bugünlere gelmemi sağlayan aileme sonsuz desteklerinden dolayı ***teşekkürü bir borç bilirim.***

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Adli Bilimlerde Genetik İşaretlerin Gelişimi	3
2.2 Adli Amaçlı DNA Analizlerinde Kullanılan STR Lokusları	4
2.3 DNA Tipleme Metotlarının Karşılaştırılması.....	5
2.4 Kısa Tekrarlı DNA Dizilerinde Amplifikasyon Sırasında Meydana Gelen ve İstenmeyen Oluşumlar	6
2.4.1 Gölge ya da Kekeme Pik (Stutter) Ürünleri	7
2.4.2 Kalıp DNA'dan Kaynaklanmayan Nükleotidlerin Eklenmesi	8
2.4.3 Mikrovaryantlar ve Alelik Merdiven (Ladder) Dışı Pikler	9
2.4.4 Alel Düşmesi (Allelic Drop- Out) ve Boş (Null) Aleller	9
2.5 Adli DNA Analizlerinde Karşılaşılan Sorunlar.....	10
2.5.1 İleri Derecede Bozunmuş (Degrade) DNA Örnekleri	10
2.5.2 PCR İnhibisyonu.....	11
2.5.3 DNA İnhibisyonuna Yönelik Çözümler	12
2.5.4 Kontaminasyon Sorunları	13
2.6 Karışmış DNA Örnekleri.....	14
2.6.1 Karışım Örneklerinin Yorumlanmasında Polimorfik İşaretlerin Değeri	16
2.6.2 Karışım Örneğinde Bulunan Genotiplerin Ayırt Edilmesi	17
2.6.3 Karışmış DNA Örneklerinin Yorumlanması	18
2.6.3.1 Karışım Örneğinin Varlığının Belirlenmesi	19
2.6.3.2 Stutter (Gölge) Pikler	20
2.6.3.3 Özgün Olmayan Artefaktlar	20
2.6.3.4 Yazılımsal Sorunlar.....	20
2.6.3.5 Alel Pik Yüksekliklerinin Adlandırılması.....	21
2.6.3.6 Alellerin Kademeli Olarak Çoğaltılması.....	21
2.6.3.7 Primer Birleşme Bölgelerinde Oluşan Mutasyonların Etkileri	22
2.6.3.8 Potansiyel Katılımcı Sayısının Tahmin Edilmesi.....	22

2.6.3.9	Karışım Örneğinde Bulunan Katılımcıların Rölatif Oranlarının Tahmini	22
2.6.3.10	Tüm Olası Genotip Kombinasyonlarının Değerlendirilmesi	23
2.6.3.11	Referans Örneklerin Karşılaştırılması.....	25
2.6.4	Karışım Örneklerinin Yorumlanmasında Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	26
2.6.4.1	Karışmış DNA Örneklerinin Kalitatif Olarak Değerlendirilmesi	26
2.6.4.2	Eşleşme Olasılığı Tahmin Yöntemi	28
2.6.4.3	Dışlama Olasılığı Yöntemi.....	28
2.6.4.4	Olabilirlik Oranı (Likelihood Ratio)	30
2.6.5	Karışmış DNA Örneklerinin Yorumlanmasında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması.....	35
2.6.6	İddia ve Savunma Makamlarının İfade Hataları.....	36
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1	Yöntemlerin Uygulanması.....	38
3.2	ABI 3130 Genetik Analizör Cihazında AmpF ℓ STR® Identifiler kitinin Validasyon Çalışması	42
3.3	Karışmış DNA Örneklerinin Hazırlanması Ve Analizi.....	47
3.4	ENFSI Pilot Çalışması Ve İspanya Santiago De Compostela Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nden Temin Edilen Olgu Dosyaları.....	51
4.	BULGULAR	52
4.1	ABI 3130 Genetik Analizör Cihazında AmpF ℓ STR® Identifiler kitinin Validasyon Çalışması	52
4.2	Karışmış DNA Örneklerinin Hazırlanması Ve Analizi.....	58
4.3	ENFSI Bünyesinde Gerçekleşen Karışım Yorumlama Pilot Çalışması	88
4.4	İspanya Santiago De Compostela Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nden Temin Edilen Olgu Dosyaları.....	92
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	97
6.	ÖZET.....	108
7.	ABSTRACT	109
8.	KAYNAKLAR	110
9.	EKLER.....	122
10.	ÖZGEÇMİŞ	128

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. Son 15 yıl içerisinde kullanılan DNA tipleme sistemlerinin karşılaştırılması (Butler 2005, Kim ve ark. 2014).....	5
Şekil 2. Stutter ürünleri içeren STR lokusları (kırmızı oklar ile gösterilmiş) (Butler 2005).	7
Şekil 3. Degrade DNA'nın A) agaroz jel elektroforezi ve B) STR tiplemesi sonuçlarına etkisi (Butler 2005)	12
Şekil 4. Tek kaynaklı (a) ve karışım (b) örneklerine ait alel piklerinin gösterimi.	15
Şekil 5. İki katılımcılı bir karışım örneğinin herhangi bir lokustaki olası alel kombinasyonları (Gill ve ark. 2006).	17
Şekil 6. Karışım örneklerinin yorumlanmasında izlenecek adımlar (Clayton ve ark 1998, Gill ve ark 2006).	19
Şekil 7. D13S317 lokusundaki STR alellerini gösteren bir örnek (Butler ve ark. 2004).....	27
Şekil 8. Hardy-Weinberg ilkelerini gösteren çaprazlama (Punnett) karesi.	29
Şekil 9. Bir karışım örneğinde dışlama olasılığının hesaplanması.	30
Şekil 10. 1:1 oranına sahip karışmış DNA örneğinin elektroforegram görüntüsü.....	60
Şekil 11. 3:1 oranına sahip karışmış DNA örneğinin elektroforegram görüntüsü.....	63
Şekil 12. 5:1 oranına sahip karışmış DNA örneklerinin elektroforegram görüntüleri.....	67
Şekil 13. 10:1 oranına sahip karışmış DNA örneklerinin elektroforegram görüntüleri.....	71
Şekil 14. 1:10 oranına ait karışım örneğinde D13S1358 lokusunda görülen pikler.	78
Şekil 15. 1:10 oranına sahip karışmış DNA örneklerinin elektroforegram görüntüleri.....	75
Şekil 16. 20:1 oranına sahip karışmış DNA örneklerinin elektroforegram görüntüleri.....	81
Şekil 17. 1:20 oranına sahip karışmış DNA örneklerinin elektroforegram görüntüleri.....	84

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1. PCR aşamasında hedef DNA'nın çoğalamamasına neden olan ve sıklıkla karşılaşılan inhibitörler.	11
Tablo 2. AmpFISTR® Identifiler® PCR ticari amplifikasyon kitinde bulunan D21S11 ve TPOX lokuslarının olası alleleri ve kromozomal yerleşimleri (Life Technologies 1999).	16
Tablo 3. İki, üç, ve dört alelin olası ikili kombinasyonu (Evelt ve ark. 1990).	24
Tablo 4. İki kişinin oluşturduğu bir karışımında majör ve minör genotiplerin belirlenmesi.	25
Tablo 5. Evelt ve Weir tarafından belirlenen LR güç ölçeği.	32
Tablo 6. Çeşitli karışım senaryoları için LR formülleri.	35
Tablo 7. Karışım örneklerinin yorumlanmasında kullanılan istatistiksel yöntemler (Ladd et. al 2001).	36
Tablo 8. AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon kiti lokusları	40
Tablo 9. PCR bileşenlerinin reaksiyon başına kullanılan hacimleri.	41
Tablo 10. Amplifikasyon döngü parametreleri.	41
Tablo 11. ABI 3130 cihazında yapılan elektroforezin yürütme koşulları	42
Tablo 12. Validasyon parametreleri ve açıklamaları.	43
Tablo 13. Karışmış DNA örneklerinin oranları ve son konsantrasyonları	47
Tablo 14. Konsantrasyona bağlı elde edilen duyarlılık sonucu.	53
Tablo 15. Kardeş alel pik yükseklikleri oranı eşik değeri, kardeş alel pik yükseklikleri oranlarının ortalaması, standart sapmaları ve bu değerlere karşılık gelen DNA konsantrasyonları.	54
Tablo 16. Analistler tarafından yapılan çalışma sonuçları	55
Tablo 17. Tüm lokusların standart sapma değerlerinin ortalamaları.	56
Tablo 18. İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı'na 2012 yılında GEDNAP tarafından gönderilen örneklerden elde edilen genotipler ve GEDNAP tarafından açıklanan genotipler	57
Tablo 19. AmpFISTR® Identifiler kiti ile analiz edilen örneklerin genetik profilleri.	58
Tablo 20. Karışım örneklerinin oluşturulması.	59
Tablo 21. AMEL lokusunda gözlenen alellerin değerlendirilmesi.	61
Tablo 22. Katılımcı ve karışmış DNA örneklerine ait aleller.	61
Tablo 23. 1:1 oranına ait karışım örneklerinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	62
Tablo 24. AMEL, D8S1179, D21S11, TH01, D3S1358, D16S539, CSF1PO ve D18S51 lokuslarında olası majör ve minör katılımcıların değerlendirilmesi	64
Tablo 25. 1:3 ve 3:1 oranlarında katılımcı ve karışmış DNA örneklerine ait aleller.	65
Tablo 26. 1:3 ve 3:1 oranlarına ait karışım örneklerinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	66
Tablo 27. AMEL, D21S11, TH01, D3S1358, D16S539, CSF1PO ve D18S51 lokuslarında olası majör ve minör katılımcıların değerlendirilmesi.	68

Tablo 28. 1:5 ve 5:1 oranlarında katılımcı ve karışmış DNA örneklerine ait aleller.	69
Tablo 29. 1:5 ve 5:1 oranlarına ait karışım örneklerinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	70
Tablo 30. AMEL, TH01, D3S1358, D16S539, FGA CSF1PO ve D18S51 lokuslarında olası majör ve minör katılımcıların değerlendirilmesi.....	72
Tablo 31. 10:1 oranlarında katılımcı ve karışmış DNA örneklerine ait aleller.	73
Tablo 32. 10:1 oranına ait karışım örneklerinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	74
Tablo 33. AMEL, D21S11, TH01 ve D16S539 lokuslarında olası majör ve minör katılımcıların değerlendirilmesi	76
Tablo 34. 1:10 oranında A, B ve C tekrarına ait aleller.....	77
Tablo 35. 1:10 oranına ait karışım örneklerinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	78
Tablo 36. Karışmış DNA örneğinde katılımcıların ve alellerin belirlenmesi.....	80
Tablo 37. AMEL, TH01, D3S1358, D16S539, FGA ve D18S51 lokuslarında olası majör ve minör katılımcıların değerlendirilmesi.....	82
Tablo 38. 20:1 oranlarında katılımcı ve karışmış DNA örneklerine ait aleller.	83
Tablo 39. 20:1 oranına ait karışım örneklerinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	83
Tablo 40. AMEL, D21S11, CSF1PO ve D16S539 lokuslarında olası majör ve minör katılımcıların değerlendirilmesi	85
Tablo 41. 1:20 oranlarında katılımcı ve karışmış DNA örneklerine ait aleller.	86
Tablo 42. 1:20 oranına ait karışım örneklerinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	86
Tablo 43. 1:50 ve 50:1 oranındaki örneklerine ait aleller.....	87
Tablo 44. Oluşturulan tüm karışım oranlarında gözlenen alel düşmesi sayısı ve LR değeri	88
Tablo 45. Birinci olgunun şüpheli mağdur ve karışım örneğine ait aleller.	89
Tablo 46. İlk çalışmadaki Karışmış DNA örneğinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	90
Tablo 47. İkinci olgunun şüpheli mağdur ve karışım örneğine ait aleller.	91
Tablo 48. İlk çalışmadaki karışmış DNA örneğinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	92
Tablo 49. ESC 1 dosyasında şüpheli mağdur ve karışım örneğine ait profiller	93
Tablo 50. ESC 1 dosyasında karışmış DNA örneğinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	94
Tablo 51. ESC 2 dosyasında şüpheli, mağdur ve karışım örneğine ait aleller.	94
Tablo 52. ESC2 olgu dosyasında karışmış DNA örneğinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	95
Tablo 53. ESC2 olgu dosyasında şüpheli mağdur ve karışım örneğine ait aleller.	96
Tablo 54. ESC 2 dosyasında karışmış DNA örneğinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	96

Tablo 55. Aynı dosyada (A) görülen üç farklı profil, ortak paylaşılan aleller, mağdur ve şüpheli profilleri.....	126
Tablo 56. A dosyasına ait çeşitli profillerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi	127
Tablo 57. 1:1 ve 1:20 oranlarında A tekrarına ait LR değeri ve performans testi sonucu.....	104

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 1. Pik yükseklikleri değerlerine bağlı DNA konsantrasyonu grafiği.....	53
Grafik 2. Kardeş alel pik yükseklikleri oranına karşı pik yüksekliği.....	54
Grafik 3. Kardeş alel pik yükseklikleri oranına karşı DNA konsantrasyonu.....	55

FORMÜLLER DİZİNİ

Sayfa

Formül 1. Pik alanlarının oranının (ϕ değeri) hesaplanması (Gill ve ark. 2006).....	22
Formül 2. Karışım oranının matematiksel olarak ifade edilmesi (Bill ve ark. 2004).	23
Formül 3. Heterozigotluk dengesinin matematiksel formülü (Clayton ve ark. 2005).	23
Formül 4. Dışlama olasılığı (PE, Power of Exclusion) metodunun matematiksel ifadesi.	29

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	Mikrolitre
°C	Santigrat Derece
A	Adenin Bazı
bç	Baz Çifti
CPE	Dışlama Durumunun Birleşik Olasılığı
CPI	Dahil Etme Durumunun Kombine Olasılığı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E	Delil Profili
ENFSI	Avrupa Adli Bilimler Enstitüleri Ağı
FBI	Federal Soruşturma Bürosu
FSS	Adli Bilimler Servisi
G	Guanin Bazı
GEDNAP	Alman DNA Profillendirme Komisyonu
H _d	Savunma Hipotezi
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
H _p	İddia Hipotezi
ISFG	Uluslararası Adli Genetik Derneği
ISO	Uluslararası Standartlık Örgütü
kV	Kilovolt
LR	Olabilirlik Oranı
MLP	Çoklu lokus RFLP problemleri
mtDNA	Mitokondriyal DNA
ng	Nanogram
NGS	Yeni Nesil Sekanslama

NGMSE	AmpFLSTR® NGM SElect™ PCR Kit
P	Partner Profili
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Pr	Olasılık
RFLP	Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
rfu	Bağıl Flüoresan Unitesi
rpm	Dakikadaki devir
S	Şüpheli Profili
sn	Saniye
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
STR	Kısa Ardışık Tekrar Dizileri
T	Timin Bazı
U	Bilinmeyen Kişi Profili
V	Mağdur Profili
VNTR	Değişken Sayılarda Ardışık Tekrar Dizileri

1. GİRİŞ

Adli genetik bilim dalının görevi çeşitli suçlardan ve adli vakalardan elde edilen biyolojik materyalleri çalışarak olgunun aydınlatılmasına yardımcı olmaktır. Olay yerinde ele geçen fiziksel delillerin incelenmesi ve değerlendirilmesi adli olguların aydınlatılmasında önemli rol oynar. Olay yerinde deliller tek başlarına ya da karışmış bir şekilde bulunabilir. Fakat uygun bir örnekleme ve toplama ile bu örnekler başarılı bir şekilde incelenebilir. Olay yerinde olduğu gibi, laboratuvara getirilen biyolojik materyallerde de benzer bir duruma rastlanabilir.

Adli bilimler son 20- 25 yıl içerisinde giderek gelişmektedir. Bu gelişmeler ve yenilikler bize kolaylıklar sağladığı gibi yeni sorunları da beraberinde getirmektedir. Adli DNA analizleri adli bilimler alanında hızlı bir ilerleme kaydetmiştir. Adli delillerin değerlendirilmesi için birçok teknik geliştirilmiştir. Fakat sonuçların doğru değerlendirilmesi ve ifade edilmesi adli DNA analizlerinin en zorlu aşamasıdır. İki veya daha fazla kişinin karışımından oluşan delillerin yorumlanması her zaman sıkıntı verici olmuştur. Bu belirsizlik adli delillerin gücünü zayıflatmaktadır.

Karışım örneklerinde bazı faktörler DNA analizini daha da karmaşık hale getirebilir. Bunlar; katılımcı sayısının bilinmemesi sonucunda alel çakışmalarının olması, düşük kalitede veya bozunmuş örneklerde gözlenen stokastik dalgalanmalar, Taq polimeraz enziminin yarı kantitatif aktivitesi ve primer bölgelerinde mikrovaryantların oluşumu olarak sıralanabilir (Buckleton ve ark. 2005, Butler 2007, Chan 1992). Bu örneklerin yorumlanmasında hem analistin tecrübesi hem de matematiksel işlemler gerektirir (Gill ve ark. 1997, Gill ve ark. 2006).

Günümüzde karışım DNA analizlerinin yorumlanmasında karşılaşılan sorunların üstesinden gelebilmek için birçok araştırmacı bu konuyla ilgilenmektedir. Bu sorunların çözümüne yönelik olarak çeşitli ülkelerde adalet sistemlerinin işleyişinde istatistiksel temeller yer almaktadırlar. Karışık DNA örneklerinin yorumlanmasında kullanılan farklı yaklaşımlar mevcuttur. Bu yaklaşımlar; genotipler belirlendikten sonra eşleşme olasılığını tahmin etmek, dışlama olasılığını ve benzerlik olasılığını hesaplamak gibi işlemlerden oluşmaktadır (Edward ve ark. 1992). Son yıllarda çeşitli ülkelerdeki hukuk sistemleri bu istatistiksel hesaplama işlemlerinden faydalanmaktadırlar. Bunun için birçok yazılım programı geliştirilmiştir.

Bu tez çalışmasının başlıca amacı, karışmış DNA örneklerindeki katılımcı sayısının doğru bir şekilde yorumlanmasını sağlamaktır. Çalışmamızda DNA profillerinin yorumlanmasında çeşitli istatistiksel metotlar (olabilirlik oranı ve profil olasılığı) açıklanacak ve uygulanacaktır. Sonuçların güvenilirliğini negatif yönde etki eden artefakt ürünlerin (gölge pikler (stutter) ve DNA dan kaynaklanmayan nükleotid eklenmesi) etkileri incelenecektir. Bunun için Forensim® ve GeneMapper® yazılımları kullanılarak istenmeyen ürünlerin doğru sonuca etkilerini yorumlamak için, elektroforegramdaki piklerin ve tepe noktalarının oranlarının lokuslar arası değerleri araştırılacaktır.

Bu amaçla rızası alınmış kişilerden toplanan kan örneklerinden DNA izole edilip, çeşitli oranlarda karışım örnekleri oluşturulacaktır. Bu örnekler AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification (D8S1179, FGA, TPOX, TH01, vWA, D21S11, CSF1P0, D3S1358, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, D18S51, D5S818 ve AMELOGENİN lokusları) kiti ile çoğaltılacak ve elde edilen elektroforegramda, bu tür örnekler için bir analiz metodu geliştirilecektir. Bununla birlikte olgu dosyaları ve pilot çalışmalar ile LRMix™ uygulaması yapılacaktır.

Bu tez çalışması adli genetiğin en zorlu analizlerinden biri olan karışım örneklerinin yorumlanmasında yol gösterici olacaktır. Birçok ülkede uygulanan ve yaygınlaşan kriminal olguların sonuçlarının yorumlanmasında kullanılan istatistiksel yöntemlerin ülkemizde de uygulanabilmesi adına bir adım atılmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Adli Bilimlerde Genetik İşaretlerin Gelişimi

Doğadaki canlıların hemen hemen hepsinde genetik materyal Deoksiribonükleik asit (DNA)'dır. İnsan genomundaki genetik varyasyon kromozom anomalilerinden tek nükleotid değişimlerine kadar çok çeşitlidir. Son 10-15 yıl içerisinde, insan orijininin araştırılmasında, kişinin hastalıklara yatkınlıklarının belirlenmesinde ve ilaçlara verilen cevaplarda genetik belirleyicilerin rolleri hakkında sayısız deneyler yapılmıştır. Bu tür deneyler tıp bilimine katkı sağlamasının yanında, insanlar arasındaki genetik farklılıkların adli amaçlı olarak mahkemelerde kullanılması da mümkün hale gelmiştir (Giardina ve ark. 2011).

Adli genetik, DNA analizleri ile nesep davaları, toplu felaketler, suçlunun kimliklendirilmesi ve miras gibi davalarda adalet sistemine yardım etmeyi amaçlayan bir bilim dalıdır. Adli bilimler kapsamında adli genetik bilim dalı matematik, kimya ve benzeri fen bilimlerinin yardımı ile günümüz adalet sisteminin en önemli yardımcısı haline gelmiştir. Adli DNA örnekleri çoğunlukla DNA'nın kodlama yapmayan bölgelerindeki tekrarlayan DNA dizileri kullanılarak analiz edilir. Bu tekrarlayan DNA üniteleri kişiden kişiye farklılık gösterir ve bu farklılık istatistiksel bir hesaplamaadan sonra biyolojik delillerin ve/veya kişilerin kimliklendirilmesi gerçekleştirilir. Genomunun %99,9'inden fazlasının insan popülasyonlarında aynı olmasına rağmen, sekanstaki varyasyonlar olarak adlandırılan polimorfik işaretler kişilerin ilişkilendirilmesi veya ayrıştırılmasında kullanılabilir (Budowle ve ark. 2005, Alonso ve ark. 2005).

1980'lerin başında Sir Alec Jeffreys tarafından insanları ve biyolojik örnekleri kimliklendirmek amacı ile DNA parmak izi tekniğini geliştirmiştir. Bu teknik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesimine dayanmaktadır. Ancak bu tekniğin en önemli dezavantajı yüksek kalitede ve miktarda DNA materyaline ihtiyaç duymasıdır. Bu yüzden adli kimliklendirmede kısa süre kullanıldı. Adli bilimlerde DNA analiz yöntemlerinin tercih edilmesinin nedeni; DNA'nın yüksek miktarda varyasyona sahip olması (yaklaşık 3 milyar baz çiftine sahip, her biri farklı lokuslarda yer alan 25000-30000 genin kodlanması) her bireyde farklılık göstermesi, ortam koşullarından veya tıbbi müdahalelerden etkilenmemesi ve nesilden nesile aktarılması gibi nedenlerden dolayı tercih edilmektedir (Premalatha ve ark. 2014).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniğinin gelişimi ve kısa ardışık tekrar dizilerinin (STR) kullanılmaya başlanması ile birlikte eser miktardaki materyallerden bile çalışılmaya başlandı.

İnsan genomunda yaklaşık 3 milyar baz çifti, her biri farklı lokuslarda yer alan 25,000–30,000 geni kodlamaktadır. Protein kodlayan kısım tüm genomun yaklaşık %3'lük bölümünü oluşturmaktadır. Geri kalan kısımda protein kodlanmaz ve büyük çoğunluğu da tekrarlardan oluşur (James 2003). Genlerin çoğu “alel” olarak adlandırılan birkaç farklı formda bulunabilmektedir. Bir toplumun genetik yapısındaki varyasyonların (değişimlerin) varlığı “genetik polimorfizm” olarak adlandırılır (Acar 2009).

2.2 Adli Amaçlı DNA Analizlerinde Kullanılan STR Lokusları

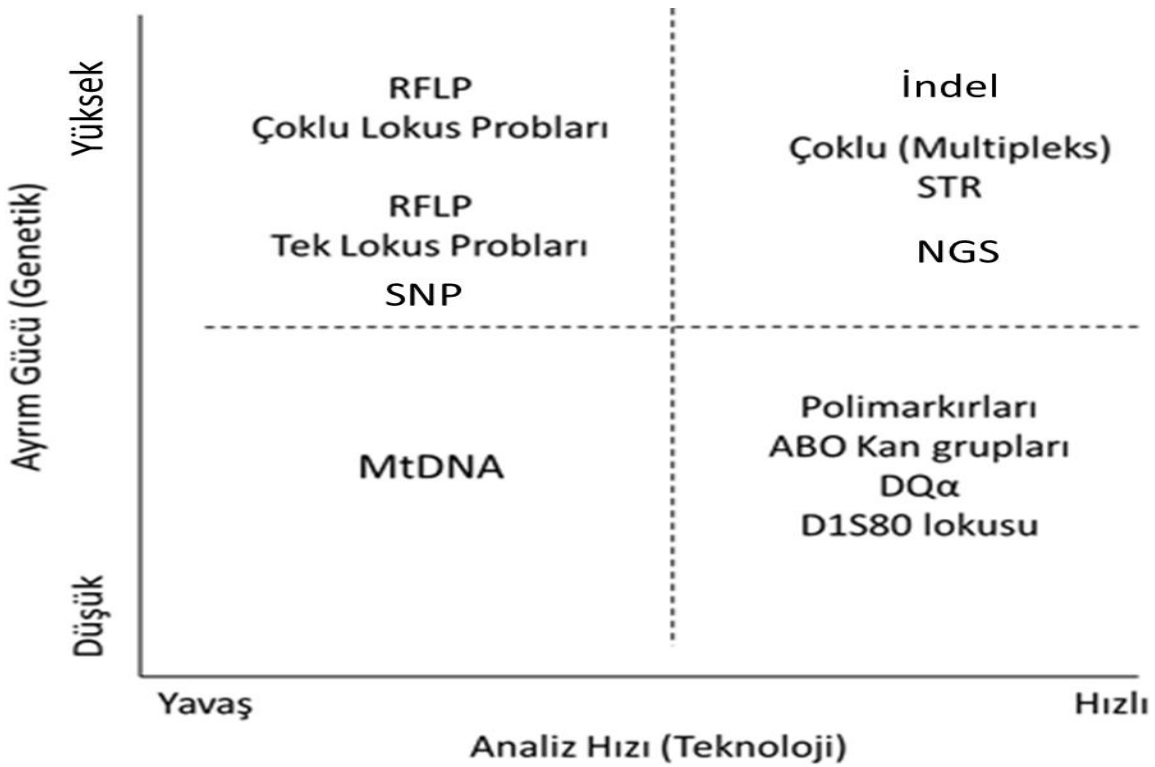
Kısa tekrar dizileri 2-6 baz uzunluğunda tekrarlayan polimorfik DNA dizileridir. Bu diziler, diziye özgü primerler kullanılarak PCR reaksiyonu ile çoğaltılır ve elektroforezde büyüklüklerine göre ayrılırlar. İnsan kimliklendirmesinde kullanılan STR yüksek değişkenlik göstermesi gerekir. Yapısal olmayan polimorfik bölgelerdeki aleller mutasyonları biriktirebilmeleri özelliklerinden yararlanarak evrilme hızının hesaplanması ile STR lokusları filogenetik çalışmalarda ve insan yayılım modellerinin oluşturulmasında bilgi kaynağı oluşturur (Filoğlu 1999).

STR lokuslarının bireyleri ayırt etme gücü, kromozomal yerleşimi, heterozigotluk oranının yüksek olması, düşük mutasyon oranına sahip olması, ileri derecede bozunmuş örneklerde bile sonuç vermesi, tetramerik olması, yapısı, diğer STR lokusları ile tek bir PCR ile çoğaltılabilmesi, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesinden dolayı adli amaçlarla rutinde tercih edilmektedir (Brinkmann 1992). 50-100 pikogram (pg) gibi az miktardaki DNA örneği ile STR analizi yapılabilir. Genellikle adli örnekler ileri düzeyde parçalanmış, moleküler yapısı bozulmuş ve DNA içeriği 100 nanogramdan (ng'dan) az olan biyolojik materyallerdir. Bu materyallerle yapılan çalışmalarda birçok yöntem (VNTR, RFLP gibi) sonuçsuz kalırken STR lokusları ile güvenilir sonuçlar alınabilmektedir (Alford ve ark. 1994, Schmitt ve ark. 1994). Günümüzde STR lokuslarının PCR tekniği ile çoğaltılmasına dayanan adli DNA analizleri kullanılmaktadır. Kullanılan polimorfik STR lokusları ticari markalar altında kit şeklinde temin edilebilmektedir (Budowle ve van Daal 2008).

2.3 DNA Tipleme Metotlarının Karşılaştırılması

Adli DNA analizinde kullanılan teknolojiler ve sistemler iki kişiyi birbirinden ayrılabilme yetenekleri ve sonuç elde etme hızlarına göre farklılar gösterir. Adli DNA analizinde hız önemlidir ve son yıllarda büyük gelişme kaydetmiştir. DNA analizleri daha önce 6-8 hafta sürerken şimdi birkaç saat içerisinde sonuç alınabilmektedir (Reeder 1999).

Kimliklendirmede tekli veya çoklu lokus RFLP problemleri ve PCR tabanlı deneyler gibi birçok sistem kullanılmıştır. Son yıllarda biyolojik örneklerin işleme hızı ve hassasiyetinde sayısız gelişmeler oldu. Günümüzde iyi korunmuş DNA içeren büyük miktardaki kan lekelerinin yerine küçük miktardaki örneklerden hatta bazı durumlarda tek hücreden bile DNA profilleri elde edilebilmektedir. Şekil 1. de son 15 yıl içerisinde kullanılan bu sistemlerin teknoloji ve ayırım gücü bakımından ayrımı görülmektedir.



Şekil 1. Son 15 yıl içerisinde kullanılan DNA tipleme sistemlerinin karşılaştırılması (Butler 2005, Kim ve ark. 2014).

ABO kan grubu belirlemesi çok hızlı bir yöntem olmasına rağmen kimliklendirmede yetersiz kalmaktadır. Bu sistemde A,B,O,AB olmak üzere 4 farklı kan grubu mevcuttur. Fakat bir popülasyondaki bireylerin %40'ı O profilini içermektedirler. Bundan dolayı bu sistem dışlama

durumunda yararlı iken dâhil etme durumunda çok etkili değildir. Öte yandan çoklu lokus RFLP problemleri (MLP) bireyler arasında yüksek varyasyon göstermesine rağmen DNA profilini elde etmek için uzun zaman ve iş yükü gerektiren bir sistemdir. Ayrıca MLP sisteminin adli davalarda sıklıkla karşılaşılan karışık DNA örneklerinin yorumlanmasına imkân vermediği için de araştırmacılar tek lokus problemlerine yönelmek durumunda kalmıştır. Buna ek olarak MLP teknoloji bakımından da zayıf kaldığından uzun süre kullanılmadı (Sparkes ve ark. 1996).

Adli DNA analizlerinde yüksek ayırım gücü, teknoloji ile uyumlu, hızlı analiz imkanı veren ve mikrosatellitler olarak bilinen kısa ardışık tekrar dizileri (STR) en iyi sonuç veren genetik işaretlerdir. Bu lokuslar kısa olduklarından dolayı aynı anda birçok lokusu çoğaltmak mümkündür. Aynı zamanda ileri derecede bozunmuş örneklerde ve karışım örneklerinde tiplendirme yapmak mümkündür (McDonald ve Lehman 2012).

Mitokondriyal DNA (MtDNA) ayırım gücü ve profil elde etme hızı düşük olmasına rağmen yüksek derecede bozunmuş örneklerin kimliklendirilmesinde ve maternal soyun belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

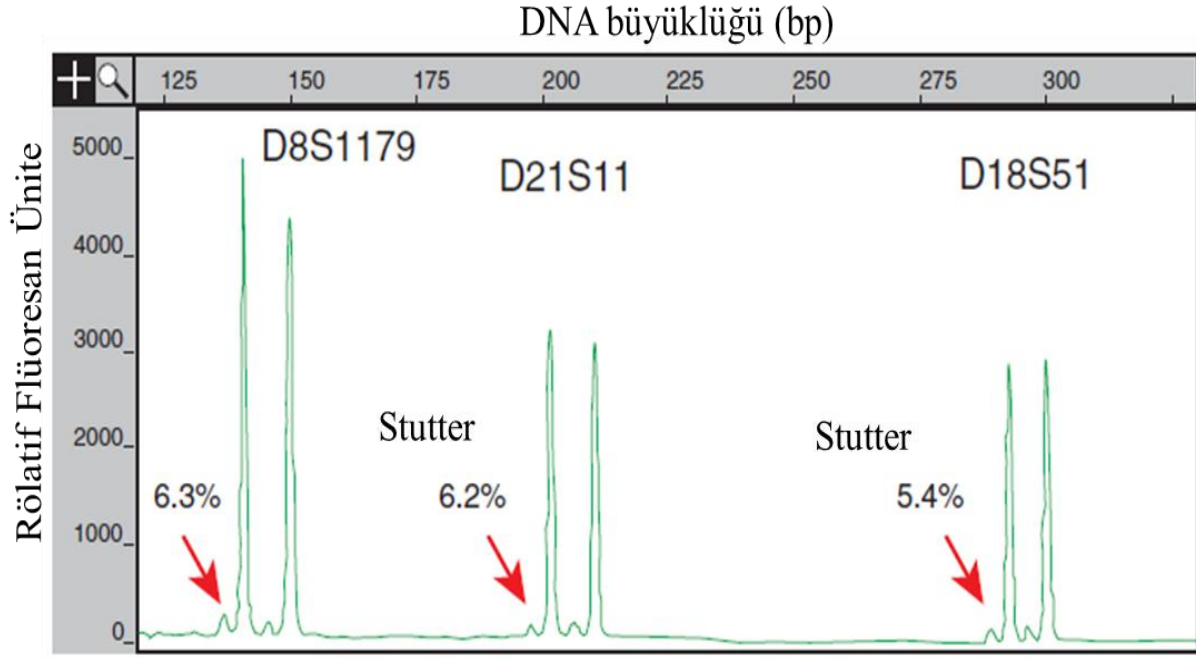
Son 20 yılda DNA tiplendirme teknolojisinde aşamalı bir şekilde gelişim gerçekleşmiştir. Önceki DNA teknolojileri yenileri ile yer değiştirirken, laboratuvarlar bu yeni teknolojileri uygulamakta zorluklarla karşılaşmış hatta bazı laboratuvarlar uygulamada çakışmalar yaşamıştır. Bu sorun validasyon ile giderilmiştir. Validasyon sonucu laboratuvarlar yeni teknolojileri kullanarak kaliteli ve tutarlı sonuçlar elde etmişlerdir (Van Oorschot ve ark. 2010).

2.4 Kısa Tekrarlı DNA Dizilerinde Amplifikasyon Sırasında Meydana Gelen ve İstenmeyen Oluşumlar

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılan STR dizilerinin amplifikasyonu sırasında bir dizi artefakt ürünler (gölge pikler (stutter) ve DNA dan kaynaklanmayan nükleotid eklenmesi) oluşarak alellerin tiplenmesi engellenmektedir. Ayrıca bunlarla birlikte mikrovaryant oluşumlar, üç alel içeren DNA lokusları, alel düşmesi (drop out) ve mutasyon gibi faktörler de STR tiplendirmesini negatif yönde etkiler.

2.4.1 Gölge ya da Kekeme Pik (Stutter) Ürünleri

Şekil 2. de STR elektroforegramında gerçek alel pik yüksekliklerinden daha küçük ve birkaç baz daha kısa ürünler görülmektedir. Bu stutter ürünler PCR sırasında DNA polimerazın STR lokuslarını kopyalanmasından kaynaklanmaktadır. Literatürde stutter ürünler; gölge bant veya DNA polimeraz kayması sonucu oluşan ürünler olarak da isimlendirilirler (Hauge and Litt 1993).



Şekil 2. Stutter ürünleri içeren STR lokusları (kırmızı oklar ile gösterilmiş) (Butler 2005).

Gölge pikler, STR lokuslarının keşfinden itibaren literatürde yer almıştır. Bu ürünlerin varlığını açıklayan birinci mekanizma kaymış zincirin hatalı onarım modelidir. Bu modelde, primer uzaması esnasında primer-kalıp DNA kompleksinin herhangi bir bölgesi eşleşmeden kalır. Kalıp DNA zincirinde veya primerde kalan bu eşleşmemiş bölge, bir tekrar uzunluğunda eşleşmemiş bölge olarak ortaya çıkar. Sonuç olarak eşleşmemiş tekrar bölgesi ana STR piklerinden bir tekrar ünitesi daha kısa olan bir alel şeklinde ortaya çıkar (Walsh ve ark. 1996).

Stutter ürünler özellikle iki veya daha fazla kişiden kaynaklanan DNA karışım örneğinde DNA profillerinin yorumlanmasını zorlaştırır. Bunun başlıca nedeni bu ürünlerin STR alel boyutları ile aynı büyüklükte olmaları ve komşu alelin kalıntı ürünü ya da bir minör katılımcıya (DNA karışım örneğinde en küçük pike sahip katılımcı) ait olup olmadığının belirlenememesi

yüzünden tiplendirme işlemi zorlaşmaktadır. Stutter ürün miktarı, daha kısa tekrar ünitesi içeren STR lokusları kullanarak, bir biri üzerine çakışmayan STR lokusları ve daha yüksek etkinlikte DNA polimeraz kullanılarak azaltılabilmektedir. Stutter ürün oluşumu ile ilgili bilgiler aşağıda listelenmiştir:

- İlgili ana alelin pozisyonundan bir tekrar ünitesi daha küçüktür veya nadiren bir tekrar ünitesi büyüktür.
- İlgili alel pik yüksekliğinin en fazla %15'i kadar büyüklükte olmalıdır.
- Stutter ürünün miktarı PCR koşulları ve kullanılan polimeraz enzimine göre değişir.
- Stutter ürün oluşumu tekrar üniteleri ile ters orantılıdır.
- Bir lokusta büyük alellerin oluşumuna bağlı olarak stutter miktarı artmaktadır (Bacher and Schumm 1998).

2.4.2 Kalıp DNA'dan Kaynaklanmayan Nükleotidlerin Eklenmesi

DNA polimeraz enzimleri özellikle PCR'da DNA'nın kopyalanması sırasında PCR ürünlerinin 3' ucuna kalıp bir ekstra nükleotid ekler. Kalıp dışından eklenen bu nükleotid genellikle Adenozin bazı olup bu olaya da "adenilasyon" denilmektedir. Bu ekleme işlemi, gerçek hedef diziden bir baz çifti daha uzun bir PCR ürünün oluşmasına neden olur.

Ekstra adenine sahip veya sahip olmayan ve bir kısmı adenilasyona uğramış PCR ürünlerinin analizinde ayırıcı sistemin çözünürlüğünün düşük olması durumunda alellerin doğru bir şekilde yorumlanması mümkün değildir. Piklerin keskinliği ve genotip yazılımı doğru aleli tespit etmesi için önemlidir.

PCR amplifikasyonu sırasında, çoğu STR -PCR programları DNA polimerazın çift zincirli PCR ürünlerinin tamamını adenile etmesi için fazladan bir son uzama basamağı içerirler. Örneğin Life Technologies tarafından üretilen AmpFISTR kitlerinin amplifikasyon parametreleri içerisinde 45 dakika 60°C süren bir son uzama basamağı içermektedir (Life Technologies 1999). Doğru bir genotiplemenin gerçekleşmesi için alelik ladder (merdiven) ve örneklerin aynı adenilasyon derecelerine sahip olmaları gerekmektedir.

2.4.3 Mikrovaryantlar ve Alelik Merdiven (Ladder) Dışı Pikler

STR alelleri arasındaki dizi varyasyonları insersiyon, delesyon ve nükleotid değişimi gibi mekanizmalarla oluşur. Bu mekanizmaların herhangi birine maruz kalmış alellere mikrovaryantlar denir. Mikrovaryantlar, alelik merdivenin dışında tespit edildiklerinden bu alellere alel dışı (off-ladder) denir (Crouse ve ark. 1999).

En sık rastlanan mikrovaryantlardan birisi de TH01 STR lokusunda bulunan 9.3 alelidir. 9.3 aleli tam tekrar (AATG) ve bir kısmi tekrar (ATG) içerir. 9.3 aleli 10 alelinden, yedinci tekrardaki tek adenin bazı delesyonundan dolayı farklılaşmıştır (Puers ve ark. 1993).

Şüpheli mikrovaryantlar, alelik ladder sınırları içerisinde olması ve diğer aleller dışında yer alması durumunda kolayca tespit edilebilir. Sorgulanan örnekte ve alelik merdivende bulunan bağıl büyüklük farkı, alelin gerçekten bir mikrovaryant olup olmadığını belirler (Gill ve ark. 1996).

2.4.4 Alel Düşmesi (Allelic Drop- Out) ve Boş (Null) Aleller

STR lokuslarını içeren DNA parçacıklarının çoğalması sırasında, alel düşmesi (drop-out) denilen olaya rastlamak mümkündür. Dizi polimorfizmleri, STR tekrar bölgelerinin içinde veya etrafında oluşabilir. Bu varyasyonlar primer bağlanma bölgelerinde de oluşabilirler (Hartzell ve ark 2003). Eğer primer bağlanma bölgesinde bir baz çifti değişimi söz konusu ise çoğalmada hatalara ve DNA kalıbında bulunan alellerin PCR ürününde tespit edilmemesine neden olur. Bu durumda DNA kalıbında bulunan bazı aleller primer bağlanma problemleri yüzünden elektroforegramda gözlenmez. Bu olaya kısaca boş (null) alel denir. STR tekrarlarının kararlılığından dolayı boş alel çok ender olarak gözlenir (Børsting ve ark. 2013).

Oluşan alel düşmesi ve null alel gibi durumların birkaç çözümü bulunmaktadır. Problemlili PCR primerinin tekrar tasarlanması ve mevcut primerin karışımından çıkarılması bu olayı çözebilir. Fakat bu çözüm yeni primer – kalıp DNA molekülü etkileşmesine yol açıp istenmeyen ürünlerin oluşmasına da neden olabilir. Bununla birlikte yeniden tasarlanan primer için yeni PCR koşulları oluşturulacağından bu işlem hem iş yükünü hem de zamanı arttıracaktır (Kline ve ark. 2011).

Diğer bir yaklaşım ise alel düşmesi gözlenen STR lokusunu multipleksten ayırmak olabilir. Bu yaklaşım, STR multipleksinin erken geliştirme aşamasında uygulanabilir. Eğer ticari bir

multipleks kit kullanılıyorsa bu durum olanaksızdır. Üçüncü ve en çok tercih edilen çözüm ise bilinen dizi polimorfizmi içeren fazladan primer kullanmaktır. Bu ekstra primerler problemlili primer birleşme bölgeleri içeren alelleri çoğaltmaya yarar. Son yaklaşım ise alel düşmesi gözlenen lokusları daha düşük primer birleşme sıcaklığında çoğaltmak ve primer birleşme özgünlüğünü azaltmaktır (Moretti ve ark 2001).

2.5 Adli DNA Analizlerinde Karşılaşılan Sorunlar

DNA laboratuvarları genellikle miktarı az ve bozunmuş örneklerle karşı karşıya kalmaktadırlar. Gelen biyolojik materyal olay yerinde saatler, günler, haftalar ve hatta yıllar boyunca zorlu çevre koşullarına maruz kalmış olabilir. Bunun en güzel örneği bir kaçırılma olayı olabilir. Eğer bu duruma ek olarak bir de cinayet varsa kayıp kişinin cesedine ulaşmak uzun zaman alabilir. Bu süre içinde biyolojik örnekler çeşitli mikro canlıların aktivitesine, nem ve sıcaklık gibi çevresel koşullara maruz kalır (Bright ve ark. 2010). Bu tür örneklerde yeterli miktarda ve kalitede örnek bulunmamasından dolayı doğru analiz yapmak son derece kritiktir (Butler ve ark . 2003).

2.5.1 İleri Derecede Bozunmuş (Degrade) DNA Örnekleri

Çevresel koşullara uzun süre maruz kalmış DNA molekülü küçük parçalara ayrılır. DNA bozunmasına en çok su ve nükleaz enzimi neden olur. RFLP gibi eski yöntemlerde degrade DNA örnekleri ile çalışmak çok zorlayıcı hatta imkânsızdı. VNTR (değişken sayıda rastgele eden DNA dizileri) alellerini elde etmek için (20000 baz çifti uzunluğunda) yüksek miktarda DNA molekülüne (yaklaşık 100 ng) sahip örneklerle çalışılabilirdi (Coble ve Butler 2005).

Multipleks STR sistemleri gibi modern PCR metotları ile nano miktarlardaki DNA örneğinin analiz edilebildiği için çok güçlü sistemlerdir. RFLP sistemlerine kıyasla 1ng örnekten bile tam ve başarılı DNA profilleri elde edilebilir. DNA analizinin doğru ve başarılı yapılabilmesi için DNA miktarının çok önemli olmasının yanında kontaminasyondan kaçınmakta önemlidir. Fakat bu durum biyolojik kanıtı toplayan kişiye bağlıdır. Toplayan kişi kontaminasyondan kaçınmalı ve delil teslim zinciri prosedürüne uygun çalışmalıdır. Kontaminasyondan dolayı DNA molekülleri daha küçük parçalara ayrılacağından PCR başarısı da buna bağlı olarak düşecektir (Chung ve ark 2004).

2.5.2 PCR İnhibisyonu

DNA örneklerinin çoğalmasını etkileyen diğer bir önemli faktör ise olay yerinden gelen örneklerin kendi içlerinde muhafaza ettikleri inhibitörlerdir. İnhibitörler; DNA ekstraksiyonu için gerekli olan hücre lizisini, nükleik asitin bozunmasını ve hedef DNA molekülünün çoğalmasını sağlayan polimeraz aktivitesini inhibe ederek DNA analizini engellemektedir (Wilson 1997). Dış ortamda gerçekleşen olaylarda kan ve semen gibi vücut sıvıları toprak, kum, ağaç, yaprak vb. materyallerin üzerinde bulunabilirler. Söz konusu materyaller suçlunun DNA molekülü ile reaksiyona girerek amplifikasyon sırasında inhibisyona neden olurlar. Deri, ahşap gibi iç mekan yüzeyleri DNA polimeraz moleküllerini inhibe edebilirler. Yine tekstil boyaları gibi maddeler iyice uzaklaştırılamaması durumunda örnek hazırlanması aşamasında DNA molekülü üzerinde kalabilir ve PCR amplifikasyonunun engellenmesine neden olurlar (Radstrom ve ark 2004).

Hematin içeren DNA örneklerinin amplifikasyonunda da STR lokuslarında alel kaybı ve lokusların çoğalmamasına neden olabilir. PCR aşamasını engelleyen bazı inhibitörler Tablo 1.de gösterilmiştir. PCR inhibitörlerini içeren örneklerin amplifikasyonu degrade DNA profillerine benzer şekilde kısmi profillemeye neden olabilirler. Sonuç olarak DNA analizi sonrasında oluşan kısmi profiller ya yeterli miktarda başlangıç materyali içermeyen degrade DNA molekülüne ya da polimeraz aktivitesini düşüren PCR inhibitörü içeren örneklere bağlı olarak gelişir (Eckhart ve ark. 2000, Butler 2005, Mahony ve ark. 1998).

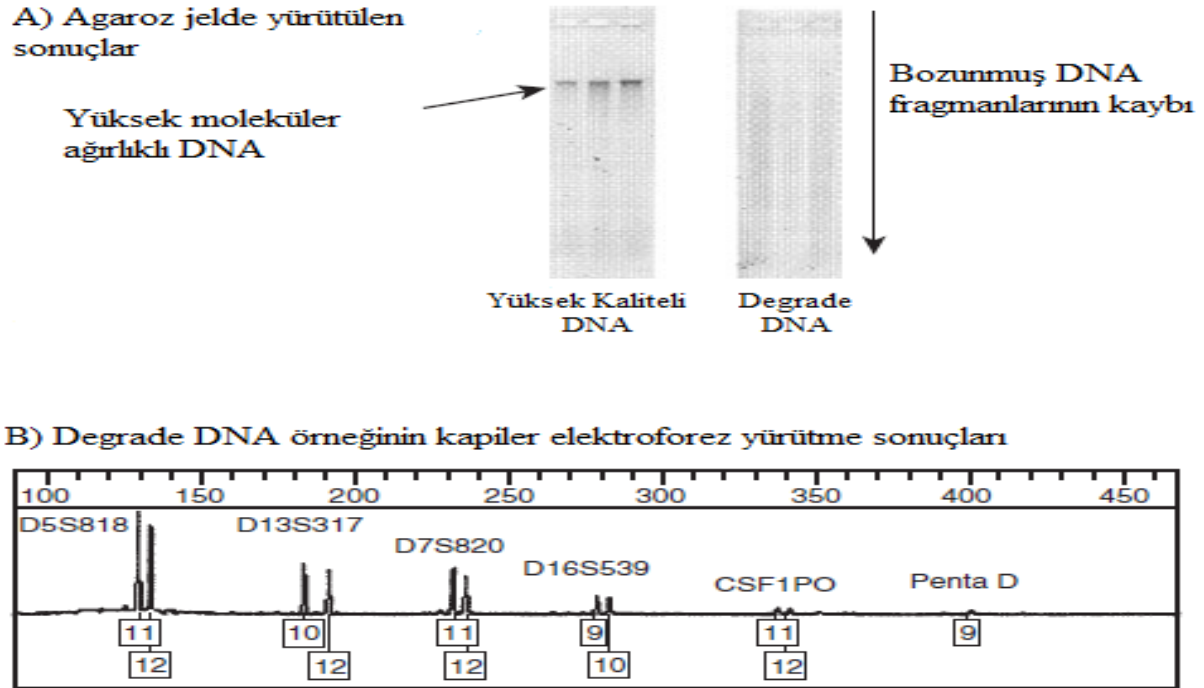
Tablo 1. PCR aşamasında hedef DNA'nın çoğalamamasına neden olan ve sıklıkla karşılaşılan inhibitörler. .

Kan	Heme (Hematin)
Doku ve Saç	Melanin
Dışkı	Polisakkarit ve Safra Tuzları
Toprak	Humik bileşikler
İdrar	Üre
Kot Pantolon (denim)	Tekstil boyaları

2.5.3 DNA İnhibisyonuna Yönelik Çözümler

PCR inhibisyonunun giderilmesi için alternatif üç çözüm önerilmiştir. Birincisi; inhibitör içeren DNA örneğinin seyreltilmesidir. Seyreltmede inhibitörün konsantrasyonu da azalacağından DNA'nın tekrar çoğaltılması mümkündür. İkinci çözüm; DNA polimeraz enziminin artırılmasıdır. DNA polimeraz enzimi miktarı arttıkça, inhibe edici özellikli moleküller ile reaksiyon oranı artacaktır ve arta kalan DNA polimeraz hedef bölgeyi çoğaltacaktır. Son çözüm ise ortama sıgır serum albümini (BSA), sodyum hidroksit ve betain gibi ara maddelerin eklenmesidir. Yine polimerazın aktif merkezlerine etki eden bazı demir içeren bileşiklerin ortama eklenmesi de DNA polimerazın aktivitesini artırır (Al-Soud ve Radstrom 2001, Bourke ve ark 1999, Comey ve ark. 1994).

STR lokuslarının PCR ürünleri küçük boyutlarda olduğundan amplifikasyonda STR primerlerinin hedef DNA bölgesine bağlanma oranı da yüksek olacaktır. STR markırları kullanarak alel düşmesinin (allele drop-out) önüne geçilebilir. Lokus büyüklüğü ile degrade DNA örneklerinin çoğaltılması ters orantılıdır (Şekil 3.) (Schneider ve ark. 2004).



Şekil 3. Degradé DNA'nın A) agaroz jel elektroforezi ve B) STR tiplemesi sonuçlarına etkisi (Butler 2005)

Şekil 3. de görüldüğü gibi degrade DNA molekülleri küçük parçalara ayrıldığından jel elektroforezinde DNA fragmanlarının kaybı yaşanırken, STR tiplmesinde kapiler elektroforezde sadece belli bir seviyede sinyal kaybı yaşanmaktadır. Bu sinyal kaybı DNA tiplmesine engel bir durum teşkil etmemektedir. Sonuç olarak degrade DNA örneklerinin multipleks STR sistemleri ile analizi RFLP yönteminden daha hassas olup VNTR sistemindeki alel düşmesi gibi olaylara daha az eğilimli ve HLA-DQ gibi diğer PCR tabanlı sistemlere göre ayırım gücü daha yüksek yöntemdir (Moretti 2001, Butler 2001).

2.5.4 Kontaminasyon Sorunları

Eğer uygun prosedürler mevcut değilse, PCR hassasiyeti ve küçük miktarlarda DNA örneklerinin çoğaltılması önemli bir probleme dönüşebilir. Valide laboratuvar protokolleri oluşturularak, kontaminasyonun önüne geçilmesi mümkündür. Kontaminasyon durumu sonuçlara dahil etme ve dışlama olarak yansıyacağından adalet sistemine direk olarak etki eder (Lygo ve ark. 1994).

Kontaminasyon, DNA molekülünün kazara transferi olarak tanımlanabilir. Kontaminasyondan üç kaynak sorumlu olarak gösterilebilir; örneğin çevreden gelen bir DNA ile kontaminasyonu, örnek hazırlama esnasında başka bir DNA molekülünün bulaşması ve önceki PCR reaksiyonundan kalan çoğaltılmış DNA molekülünün örneğe bulaşması şeklinde ortaya çıkar. Çevresel kontaminasyon, olay yerinden örnek toplanması sırasında ortaya çıkar ve delili toplayan kişilerin dikkat göstermesi gereken bir durumdur. Bunun engellenmesi için “substrat kontrol” denilen bir yöntem uygulanabilir. Bu kontrol mekanizması toplanan örneklerin yakınında kontrol numunelerinin toplanması ile gerçekleşir. İki örneğin birbirine bulaşması sorunu, uygun laboratuvar protokolleri ve ayrılmış çalışma alanları oluşturularak engellenebilir (Gill 1997).

Laboratuvardan kaynaklanan kontaminasyonların engellenmesi için hem PCR ’de hem de DNA izolasyonunda “ negatif kontrol” kullanılmalıdır. Negatif kontrol, adli delilin tiplenmesi işlemine paralel olarak yürütülen boş örnektir. Normal protokolden tek farkı, kalıp DNA molekülü yerine distile su kullanılmasıdır. Eğer negatif kontrolde PCR ürünü oluşumu gözlenirse, işleme müdahale edilebilir ve kontaminasyonun önüne geçilir (Budowle ve ark. 2009).

Laboratuvar çalışanlarının genotipleri çıkarılmalı ve herhangi bir kontaminasyon durumunda karşılaştırma yapmak üzere bir veri tabanı oluşturulmalıdır. Laboratuvarda çalışılan örneklerin

DNA profilinin doğruluğunu ve ilgili laboratuvar personeli ile eşleşip eşleşmediği kontrol edilmelidir. Diğer bir kontaminasyon çeşidi ise İngiltere Adli Bilimler Servisi'nin (FSS) bildirdiği ve PCR tüpleri, pipet uçları gibi ekipmanlarda üretimden kaynaklanan sporadik kontaminasyondur. FSS üç yıllık periyod içerisinde 1000 vaka içerisinde 11 adet sporadik kontaminasyon durumu bildirmiştir. Bu kontamine profiller kalite kontrol prosedürleri ve negatif kontroller kullanarak belirlenmiştir (Howitt et al 2003).

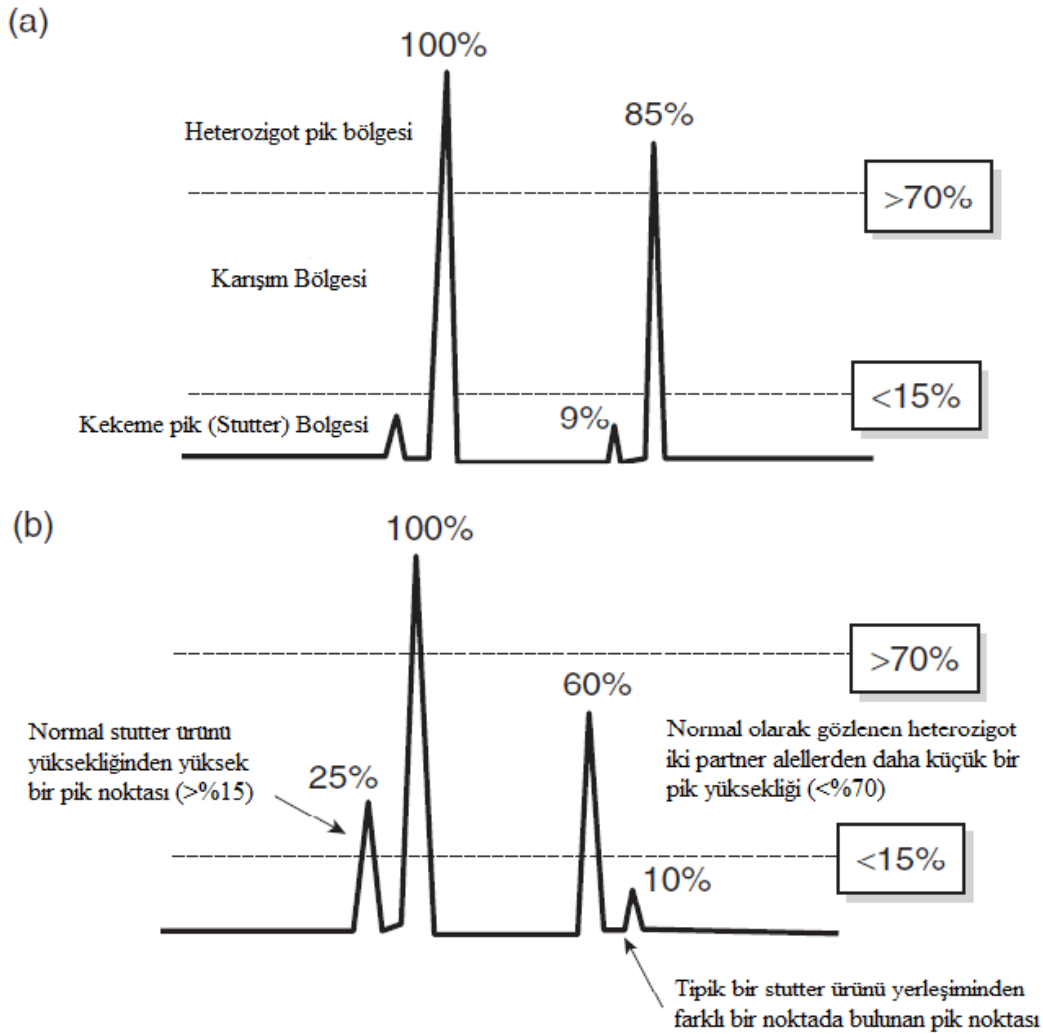
Negatif kontroller kullanmak, çalışan personelin genotip veri tabanlarını oluşturmak, üretici/distribütör firma ile haberleşmek, DNA analizi sırasında otomasyon sistemleri kullanmak, valide (geçerli) prosedürler kullanmak ve örnek toplayan ekiplerin daha dikkatli tutumu ile oluşabilecek tüm kontaminasyonlardan kaçınmak mümkündür.

2.6 Karışmış DNA Örnekleri

Test edilen örnekte iki veya daha fazla kişinin genetik profili bulunuyorsa bu örneğe karışım (karışmış DNA) örneği denir. Karışım örneklerini yorumlamak için tecrübe ve bir eğitim gereklidir. Karışım örneği, içerdiği DNA miktarına göre majör ve minör katılımcılardan oluşur. Majör katılımcının DNA miktarı daha yüksek olduğundan dolayı bu katılımcıya ait alel pik yükseklikleri daha büyüktür. Minör katılımcı ise DNA miktarı daha az olduğundan gözlenen alel pik yüksekliği daha düşüktür. Günümüzde kullanılan STR flüoresan teknolojisi karışım örneklerinin minör katılımcısının belirlenmesinde RFLP sistemlerine oranla çok daha hassastır (Evet ve ark. 1990). Birden fazla kişiye ait vücut sıvıları ve doku içeren bir lekeden DNA izole edildiğinde karışık bir DNA profili ile karşılaşılır. Bu durumda bir kişinin profiline ek olarak başka profillerde aynı analizde gözlenebilir.

Flüoresan özellikli tarayıcılar ve ABI 310, 3130 veya 3100 vb. kapiler elektroforezler kullanarak bir elektroforegramdaki STR alellerinin rölatif pik yükseklikleri veya alanlarının ölçülmesi mümkündür. Söz konusu kantitatif bilgiler kullanılarak bir karışım örneğindeki katılımcı sayısı belirlenebilmektedir. Alel pik bilgilerini karşılaştırırken pik alanı ve şekil varyasyonları yerine pik yüksekliklerinin kullanılması daha geçerli bir yöntemdir. Pik yükseklikleri çoğu adli genetik laboratuvarlarında karışım örneklerinin yorumlanması işleminde başarı ile kullanılmaktadır. Şekil 4. te STR profilinde tipik tek kaynaklı bir örneğin, bir karışım örneğinden kolaylıkla nasıl ayırt edildiği görülmektedir (Gill ve ark. 1998a).

Heterozigot örneklerdeki STR alel pikleri genellikle komşu pozisyondaki (4 baz çifti kısa (n-4)) alel büyüklüğünün %15'inden daha küçük gölge (stutter) ürünler oluştururlar. Buna ek olarak, pik yüksekliği oranı; düşük flüoresan üniteye sahip alel pik yüksekliğinin büyük flüoresan üniteye sahip alel pik yüksekliğine bölünerek bulunur. Tek kaynaklı bir STR lokusunda heterozigot iki ortak alel arasındaki pik yüksekliği oranı yaklaşık olarak %70 düzeylerindedir. Böylece belirli bir lokustaki bir alele ait pik yüksekliği %15 ve %70 alanları arasında bir yüksekliğe denk geliyorsa, bu durumda iki veya daha fazla katılımcının bulunduğu bir karışım örneğinden bahsetmek mümkündür. Birden fazla lokusta gözlenen üç veya daha fazla alel, yine bir karışım örneği olasılığının güçlü bir göstergesidir (Life Technologies 1998).



Şekil 4. Tek kaynaklı (a) ve karışım (b) örneklerine ait alel piklerinin gösterimi.

2.6.1 Karışım Örneklerinin Yorumlanmasında Polimorfik İşaretlerin Değeri

Karışmış bir DNA örneğinin belirlenebilmesi daha fazla lokus ve heterozigot oluşma oranı yüksek genetik işaret kullanımına bağlı olarak gelişmektedir. Birden çok DNA kaynağı içeren tek bir örneğin analizi her bir kaynaktan gelen DNA miktarına, genotiplerin özgün kombinasyonuna ve çoğaltılan DNA miktarına bağlıdır (Evelt ve ark 1990).

Yüksek polimorfizm içeren ve fazla alele sahip olan STR lokusları karışım örneklerindeki katılımcılar arasındaki farkları tespit etme kabiliyeti de yüksektir. Örnek olarak Tablo 2. de gösterilen iki lokustan TPOX'in 8 aleli bulunurken D21S11'in ise 24 olası aleli bulunduğundan karışım örneklerinin yorumlanmasında D21S11 daha yüksek ayırım gücüne sahiptir (Butler 2005).

Tablo 2. AmpFI STR® Identifiler® PCR ticari amplifikasyon kitinde bulunan D21S11 ve TPOX lokuslarının olası alleleri ve kromozomal yerleşimleri (Life Technologies 1999).

Lokus	AmpFI STR® Identifiler® ticari kitinde bulunan alleler	Kromozomal Yerleşim
D21S11	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	21q11.2-q21
TPOX	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	2p23-2per

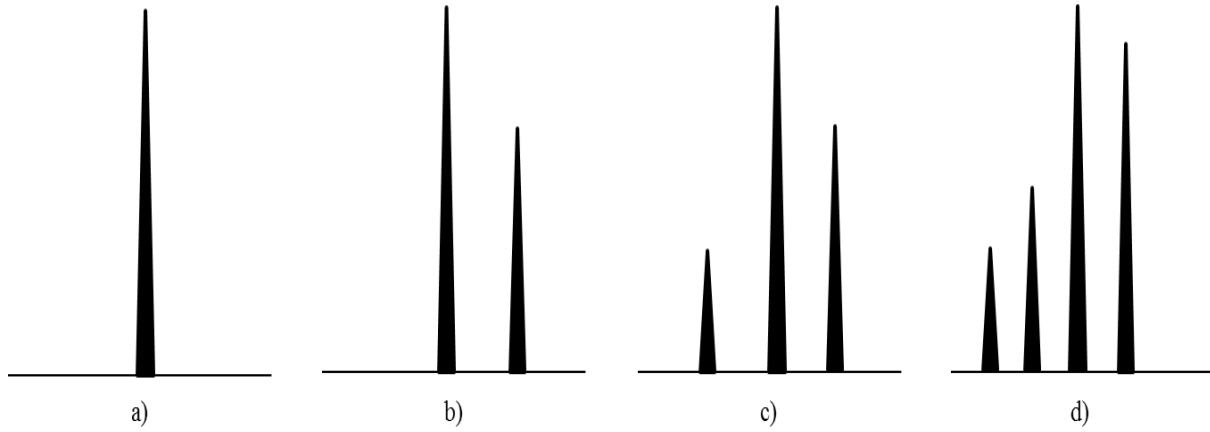
Karışımındaki her bir bileşenin miktarı, o örnekteki tüm katılımcılar arasındaki farkın gözlemlenmesinde önemli bir fark yaratmaktadır. Örneğin, eğer iki DNA kaynağının miktarları eşit oranlarda ise heterozigot lokuslardaki alelleri tespit etmek daha kolaydır. Bir karışım örneğinde minör katılımcıların karışımın %5 i veya 1:20 oranında olması durumunda tespit edilmesi genel olarak mümkün değildir. Yine AmpFI STR® Identifiler® ticari amplifikasyon kiti kullanım kılavuzuna göre DNA analizinde güvenilir bir genotip elde etmek için minör komponentin 35 pg düzeylerinde olması gerektiği bildirilmektedir (Cotton 2000).

2.6.2 Karışım Örneğinde Bulunan Genotiplerin Ayırt Edilmesi

Karışım örneğinin varlığını tespit etmek için çeşitli ipuçları mevcuttur. Aşağıdaki sorulara verilen cevaplar söz konusu profilin bir karışım olup olmadığını belirleyebilir:

- Analiz sonucu herhangi bir lokusta valide edilmiş alel büyüklüğü aralığında iki ve/veya daha fazla lokus gözleniyor mu?
- Herhangibi bir lokusta iki heterozigot alel arasında pik dengesizliği söz konusu mu?
- Normal pikin komşu pozisyonunda (%15- %20 den büyük) gölge (stutter) pik var mı ?
- Değişik aleller arasında sinyal yoğunluğu farklılığı mevcut mudur?

Eğer yukarıdaki dört sorudan herhangi birine verilen yanıt evet ise söz konusu profil muhtemel bir karışım örneğine ait olduğu söylenebilir. Genellikle karışım örneği herhangi bir lokusta üç ve daha fazla alelin varlığında tespit edilebilir. Aşağıdaki listede iki kişinin katılımı ile oluşan karışım örneklerinde tek bir lokusa ait tüm olasılıklar gösterilmektedir (Butler 2005).



Şekil 5. İki katılımcılı bir karışım örneğinin herhangi bir lokustaki olası alel kombinasyonları (Gill ve ark. 2006).

a) Bir pik:

- Homozigot + homozigot, 1 adet çakışan alel (genotipler eş)

b) İki pik:

- Heterozigot + heterozigot, 2 çakışan alel (genotipler eş)
- Heterozigot + homozigot, 1 adet çakışan alel
- Homozigot + homozigot, çakışan alel yok (genotipler benzersiz)

c) Üç pik:

- Heterozigot + heterozigot, 1 adet çakışan alel
- Heterozigot + homozigot, çakışan alel yok (genotipler benzersiz)

d) Dört pik:

- Heterozigot + heterozigot, çakışan alel yok. (genotipler benzersiz)

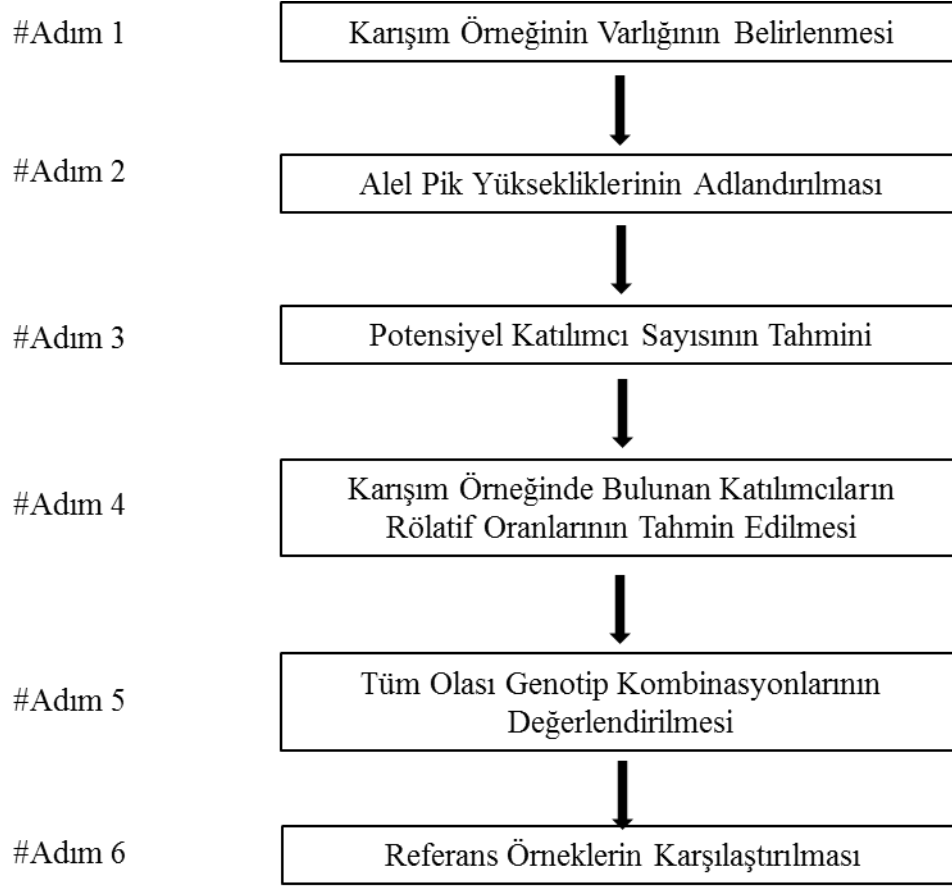
İki katılımcının olduğu bir karışım örneğinde bir veya daha fazla alel çakışıp maskelenebilir. Bu durum karışımı oluşturan kişilerin ayrımını önemli derecede zorlaştırır. Örneğin iki birey FGA lokusunda 23-24 ve 24-24 genotiplerine sahipse, karışımın oranı 1:1 iken, 23 ve 24. pik alellerinin oranı 1:3 şeklinde gözlemlenebilir. Bu durumda kişilerin profilleri önceden bilinmiyorsa, oranı düşük olan alel yüksek olan alelin büyük bir stutter ürünü gibi gözükebilir. Bu durumda diğer lokuslarda paylaşılmayan alellerin durumuna bakıp katılımcı oranı belirlenip karışım örneği tekrar değerlendirilebilir (SWGDAM 2000).

Bir multipleksin her lokusunda alel çakışma oluşumunu gözlemlemek amacı ile, Gill ve arkadaşları beyaz ırka ait yüz yirmi bin kişiden oluşan bir karışım çalışması yapmışlardır. Altı bölgeden oluşan bu multiplekste, karışımların büyük bir çoğunda 15-22 adet pik rastlanmıştır. İki heterozigot bireyin oluşturduğu ve aleller arasında çakışma bulunmayan bir karışım altı bölgede en fazla 24 pik gözlenlenmiştir. Sonuç olarak birbiriyle akrabalık ilişkisi bulunmayan bireylerin oluşturduğu karışım örnekleri birden fazla lokustaki üç veya daha fazla alelin tespiti ile ayırt edilebilmektedir. 212000 ikili karşılaştırmada, altı bölgeli multipleksin içerisinde sadece dört tane karışım örneğinin her lokusunda bir veya iki alele rastlanmıştır (Gill ve ark. 1997).

2.6.3 Karışmış DNA Örneklerinin Yorumlanması

Karışım örnekleri adli uygulamalarda sıklıkla karşılaşılan iki veya daha fazla kişinin oluşturduğu biyolojik örneklerdir (Perlin 2010). Adli lekelerin analizi araştırmacıyı kaçınılmaz bir şekilde farklı bireylerin vücut sıvılarının ve sekresyonlarının karıştığı DNA karışımlarına doğru yönlendirecektir. Benzeri karışımların tanınması, çözülmesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi adli vakaların hayati ve tamamlayıcı parçaları olarak değerlendirilirler. Karışık DNA örneklerinin tiplendirilmesinde MtDNA, Y kromozomu ve otozomal DNA kullanılabilir. uzmanlar düzenli bir eğitim ve test programı ardından karışmış DNA örneklerinin analizini gerçekleştirmek üzere görev alabilmektedir (Buckleton ve ark. 2005)

İlk olarak Clayton ve arkadaşları tarafından tanımlanan ve Uluslararası Adli Genetik Topluluğunun (ISFG- International Society of Forensic Genetics) DNA komisyonu tarafından da kabul edilen DNA karışımlarının yorumlanmasına ait altı basamak Şekil 6. da gösterilmiştir. Karışım örneklerinin yorumlanmasını anlamak için karışım olmayan bir örneğin oluşumunu bilmek çok önemlidir. Karışık DNA profillerini biyolojik artefaktlar ve teknolojik temeller göz önünde bulundurularak yorumlanması gerekir (Clayton ve ark. 1998, Gill ve ark. 2006).



Şekil 6. Karışım örneklerinin yorumlanmasında izlenecek adımlar (Clayton ve ark 1998, Gill ve ark 2006).

2.6.3.1 Karışım Örneğinin Varlığının Belirlenmesi

Karışım örneklerinin yorumlanmasının ilk basamağı karışım örneğinin varlığının belirlenmesidir. İki'den fazla alelik pikin gözlemlendiği durumlarda karışımdan söz edilebilir. Fazladan pikler diğer katılımcılar dışında; gölge piklerden veya somatik/genetik

polimorfizmlerden de kaynaklanabilir. Paylaşılan alellerde maskeleye olayı sonucunda bir alelde asimetri oluşabilir ve bu da dengesiz bir profile yol açabilir (Andrade ve ark. 2006).

2.6.3.2 Stutter (Gölge) Pikler

Artefaktlar; gölge pik ürünleri, boş aleller, kromozomal anomalileri veya beşli kromozomal bölgelerin duplikasyonu gibi olaylardan kaynaklanabilir. Stutter piklerin alel tahmini ve karışım örneklerinin yorumlanması en büyük sorununu teşkil etmektedirler. Alelik ürünler olarak ortaya çıkan ve ilgili alelden bir tekrar ünitesi daha kısa (ya da nadiren uzun) pozisyonda bulunan stutter piklerin dışlanması her zaman mümkün değildir. Stutter piklerin belirlenmesi için kabul edilen genel prensipler bazı durumlarda kullanışlı olup bu piklerin gerçek piklerden ayrılmasını mümkün kılar. Bu prensipler:

- Gölge pik ürünleri, ilgili alelin büyüklüğünün en fazla %15'i büyüklüğündedirler.
- Gölge pik ürünleri, ilgili alelden bir tekrar ünitesi daha kısa pozisyonunda bulunurlar (Krenke ve ark 2002).

2.6.3.3 Özgün Olmayan Artefaktlar

Özgün olmayan artefaktlar, multipleks sistemlerde primerlerin özgün olmayan birleşiminden dolayı oluşurlar. Lokus sayısı arttıkça ortamda daha fazla primer olacağından özgün olmayan eşleşmelerin olasılığı da artar. Yine degrade bir DNA örneğinde lokus sayısına bakılmaksızın bu ürünler oluşabilir. Ekstra DNA bantları translokasyon, mutasyon, trisomi gibi kişide bulunabilecek kromozomal anomalilerden de kaynaklanabilir. Bu gibi anomalilerde STR profilinde yalnızca bir ekstra pik görülür. Fakat hem olay yerinde hem de şüpheliden alınacak örneklerin profilleri aynı olacağından bu tür kromozom anomalileri çok fazla problem yaratmayabilir (Clayton ve ark. 2004).

2.6.3.4 Yazılımsal Sorunlar

Çoğaltılmış DNA molekülünü işaretlemek için kullanılan boyalar, değişik dalga boylarında ışığa yaparlar. Fakat boyaların emisyon spektrumunda üst üste binmeleri söz konusu olabilir. Örneğin mavi ile işaretli bir DNA düşük miktarda yeşil floresanın küçük bir kısmını emer. Matris yazılımının görevi floresan boyalar arasındaki üst üste binmeyi en az miktardaki boyadan

ana renkleri çıkararak matematiksel olarak engeller. Fakat fazladan çoğalmış bir örnek olduğunda matris fazladan doygunluğa ulaşacağından “pull-up” dediğimiz pikler oluşabilir ve bu pikler başka bir lokusta başka bir renkte normal bir pikmiş gibi gözükebilir. Multipleks sistemlerde bu pikler gerçek alellerden ayırt edilebilmelidir. Bu ayrım, pik pozisyonu ve morfolojinin iyi bilinmesi veya pull-up görülen bölgenin yeniden çalışılması ile gerçekleştirilebilir (Mueller ve ark. 2000).

2.6.3.5 Alel Pik Yüksekliklerinin Adlandırılması

İkinci basamakta alel pik yüksekliklerinin adlandırılması basamağıdır. Burada iki koşul söz konusudur:

- Kontrol olarak kullanılan alelik ladder’da bulunan aleller $\pm 0,5$ baz çifti aralığında olması gerekir.
- Her alel için gözlenen pik kayması alelik ladderda sabit olmak zorundadır.

Çok yakın akrabaların olduğu veya tam profil elde edilemeyen davalarda; karışık bir örnek bulunmasına rağmen ekstra pikler bulunmayabilir. Ekstra pik görülmemesine rağmen karışık STR profilinin varlığı heterozigot lokusların alel pik alanları arasındaki asimetriden dolayı bu durum anlaşılabilir. Bu asimetriye birkaç faktör neden olabilir (Gill ve ark 1998b).

2.6.3.6 Alellerin Kademeli Olarak Çoğaltılması

Herhangi bir varyasyon, iki alel arasındaki çoğalma verimliliğinde farklara yol açabilir. Örneğin, az miktardaki DNA söz konusu olduğunda PCR’nin erken döngülerinde bir alelin seçici olarak amplifikasyonu olabilir. Bunu önlemek için başlangıç DNA materyalini artırmak gerekir. Genel olarak düşük molekül ağırlığına sahip alel yüksek moleküler ağırlığa sahip alele göre daha etkin bir şekilde amplifiye olur. Fakat STR lokusları sınırlı büyüklüklere sahiptir (100-350 bp), PCR aşamasında heterozigot lokusta bulunan aleller birbirlerine eşit oranda amplifiye olurlar. Normal olarak düşük pik alanı yüksek pik alanından %60 daha küçüktür (Gill ve ark. 1997).

2.6.3.7 Primer Birleşme Bölgelerinde Oluşan Mutasyonların Etkileri

Primer birleşme bölgesinde olası bir mutasyon, PCR işleminde uzama aşamasının daha az etkin olmasına yol açabilir. Eğer kalıp DNA molekülünün primer birleşme bölgesinin 5' ucunda bir mutasyon söz konusu ise, uzama bloke olur ve alel null veya homozigotmuş gibi (yalancı homozigot) görünür. Eğer mutasyon primer birleşme bölgesinin başka bir yerinde meydana geldiyse, bu durumda primer birleşme sıcaklığı değişecek ve birleşme sıcaklığı etkilenecektir (Dakin ve Avise 2004).

Adli davalarda gözlenen pik alanlarındaki denge düzensizliğinin en yaygın nedeni seçici amplifikasyonun sonucundan çok paylaşılan alellerin varlığıdır. Gill ve arkadaşları her lokustaki pik alanlarının varyasyonunu ve oranını hesaplamak için bir formül tanımlamışlardır.

$$\phi \text{ değeri} = \frac{\text{Gözlenen en küçük pik alanı}}{\text{Gözlenen en büyük pik alanı}}$$

Formül 1. Pik alanlarının oranının (ϕ değeri) hesaplanması (Gill ve ark. 2006)

2.6.3.8 Potansiyel Katılımcı Sayısının Tahmin Edilmesi

Lokuslarda görülen ekstra alellerin sayısı ve onların birbirlerine oranları katılımcı kişi sayısının belirlenmesinde kullanılır. İki heterozigotun katılımcı olduğu karışımlarda bulunabilecek maksimum alel sayısı dördttür. Beş ve altı alel sayısı bize karışımında üç veya daha fazla kişinin olabileceğini gösterir. Bunun yanında olayın koşulları da kişi sayısını önemli bir şekilde etkilemektedir. Bu yüzden karışım örneğini değerlendirmeden önce mutlaka olayın geçmişi bilinmelidir (Schneider ve ark. 2004).

2.6.3.9 Karışım Örneğinde Bulunan Katılımcıların Rölatif Oranlarının Tahmini

Bu aşamada, karışımı oluşturan majör ve minör katılımcıların ayrımı mümkündür. DNA'nın karışık olduğu bir örnekte, her lokustaki katılımcıların oranı yaklaşık olarak sabit kaldığı düşünülür. Karışımın oranı (M_x) tahmini Formül 2. de gösterilmiştir. Örneğin 4 pik gözlenen bir DNA profilinde minör katılımcının a ve b alellerine, majör katılımcının ise c ve d alellerine sahip olduğunu varsayalım. Bu durumda karışımın oranı:

$$Mx = \frac{\phi a + \phi b}{\phi a + \phi b + \phi c + \phi d}$$

Formül 2. Karışım oranının matematiksel olarak ifade edilmesi. ϕ değeri ilgili pikin yüksekliğini temsil etmektedir (Bill ve ark. 2004).

Tüm lokuslar için tek bir karışım oranı hesaplamak için daha güvenilir metotlar geliştirilmiştir. Fakat deneysel olarak bu metotların karışım oranın tahmininde $\pm 0,35$ yanılma payı bulunmaktadır. Bu oran STR multiplekslerine, DNA miktarına ve PCR koşullarına göre değişiklik göstermektedir (Clayton ve ark. 2005).

Karışım oranının hesaplanmasında en önemli ikinci parametre ise heterozigotluk dengesidir (H_b). Bu denge Formül 3. teki gibi ifade edilmektedir.

$$Hb = \frac{Ha}{Hb}$$

Formül 3. Heterozigotluk dengesinin matematiksel formülü. H_a ilgili lokusta bulunan en küçük alel pik yüksekliğini temsil etmektedir (Clayton ve ark. 2005).

Heterozigotluk dengesi DNA miktarına göre değişmektedir. Validasyon protokolleri ile belirlenen bu denge miktarı 500 pg dan az DNA örnekleri için $H_b < 0,6$ 'dır. Heterozigot dengesi 0.6 değerinin altında olan örnekleri bu durumda değerlendirmek mümkün olmayacaktır. Özellikle bu çeşit düşük miktara sahip örneklerde hem alellerin orantısız olarak etkilenmesi hem de lokuslar arasında molekül ağırlığı farklılıklarından (örneğin FGA lokusu gibi) dolayı karışım oranını belirlemek imkansızdır (Clayton ve ark. 2005).

2.6.3.10 Tüm Olası Genotip Kombinasyonlarının Değerlendirilmesi

Tablo 3. te Evett ve arkadaşlarının kullandığı genotip kombinasyonların kullanılması önerilmektedir. Bu şekilde referans verilere bağlı kalmadan objektif bir şekilde karışım örnekleri yorumlanabilir. Analistler referans bilgiye bağlı kalmaksızın değişik yorumlama metotlarını kullanabilirler. Bu yaklaşım görsel olarak yapılabildiğinden, sayısal bir değerlendirme yapmadan da olası alellerin belirlenmesi mümkündür. Bu durumda eğer tam profil elde edilmişse ve karşılıklı değişimlere de izin verilmişse 4 alelli bir lokusta toplamda üç adet ikili kombinasyon, 3 alelli bir lokusta 6 tane ikili kombinasyona ve 2 alelli bir lokusta 3 tane olası kombinasyon bulunur (Evett ve ark. 1990).

Tablo 3. İki, üç, ve dört alelin olası ikili kombinasyonu (Evett ve ark. 1990).

4 alel (a,b,c,d)		3 alel (a,b,c)		2 alel (a,b)	
ab	cd	aa	bc	aa	ab
ac	bd	bb	ac	ab	ab
ad	bc	cc	ab	aa	bb
cb	ad	ab	ac	ab	bb
cd	ab	bc	ac	ab	aa
bd	ac	ab	bc	bb	aa
		bc	aa	bb	ab
		ac	bb		
		ab	cc		
		ac	ab		
		ac	bc		
		bc	ab		

Eğer pik alanlarından ve yaklaşık karışım oranından yola çıkarak kantitatif yaklaşım kullanırsa, bazı ikili eşleşmeler göz ardı edilmiş olabilir. Bu yaklaşımda, aranan kişinin majör katılımcı olduğu çok yüksek oranlı karışımlarda kullanılabilir. Çünkü katılımcının her lokustaki alel kombinasyonu birbirine yakın olacaktır ve bu durumda herhangi bir karışıklık yaşanmayacaktır. Eğer aranan profil minör katılımcı ise minör aleller maskeleneceğinden ayırım yapmak imkansız olacaktır. Bileşenlerin belirlenmesinde en önemli nokta karışımın düşük olduğu oranlardaki örneklerdir. Fakat araştırmacının hem deneyimi hem de bazı alel kombinasyonlarını göz ardı etmesi ile karışım örneğini başarılı bir şekilde yorumlayabilir (Evett ve ark. 1998).

Tüm olası ikili genotip kombinasyonları karşılaştırılıp tüm lokuslardaki karışım oranı ve heterozigotluk dengesi için en ideal değer belirlenmelidir. Bu kombinasyonların değerlendirilmesi Tablo 4. te detaylı bir şekilde gösterilmiştir. Görüldüğü gibi eğer minimum heterozigotluk dengesi değeri ($H_b=0.6$) ve beklenen karışım oranı $M_x=0,70\pm0,35$ olarak değerlendirilirse, en uygun ikili alel kombinasyonu majör olarak ab ve minör olarak cd alellerini içeren genotipler olduğu görülecektir.

Tablo 4. İki kişinin oluşturduğu bir karışımda majör ve minör genotiplerin belirlenmesi. Hesaplamalarda alel yükseklikleri $\phi_a= 1200$ rfu, $\phi_b= 1000$ rfu, $\phi_c= 400$ rfu ve $\phi_d=380$ rfu olarak kullanılmıştır.

Genotipler		M_x majör katılımcılar	Heterozigoti dengesi		Yorum
Minör	Majör		H_b majör	H_b minör	
ab	cd	0,7	0,9	0,9	M_x ve H_b uygun
ac	bd	0,53	0,3	0,3	H_b uygun değil
ad	bc	0,51	0,3	0,3	H_b uygun değil
cd	ab	0,30	0,9	0,9	M_x uygun değil
bd	ac	0,48	0,3	0,3	H_b uygun değil
bc	ad	0,49	0,3	0,3	H_b uygun değil

2.6.3.11 Referans Örneklerin Karşılaştırılması

Bu adımda karışım örneklerinin yorumlanmasında referans örneklerinin kullanımı söz konusudur. Bu ise karışım analizinde önemlidir ve objektif yorumlamayı sağlar (Torres ve ark. 2003). Eğer şüphelinin genotipi oluşturulan kombinasyonlarla eşleşirse, kişinin karışım örneğindeki varlığı gösterebilir. Olay yerinden gelen ve referans örneklere ait profiller karşılaştırıldığında raporlarda kullanılan ifadelerle dikkat etmek gerekir (Evelt ve ark. 2000). Örneğin, davacı tarafının kullanacağı ifade “olay yerinden elde edilen leke şüpheli ve mağdurun DNA’sını içermektedir” şeklinde olmalıdır. Buna karşın savunma makamının hipotezi ise “olay yerinden elde edilen leke mağdur ve bir başka kişinin DNA örneklerini içermektedir” şeklinde olması gerekmektedir.

DNA delilini yorumlarken her duruma uygun bir evrensel formül mevcut değildir. Bu durum gerçekten karışım örneklerinin yorumlanması ve raporlanmasında da geçerlidir. Farklı laboratuvarlar bu zorlu durumlara karşı farklı yaklaşımlar getirmiştir. Karışmış DNA örneklerinin yorumlanmasında önceki çalışmalar ışığında dört farklı istatistiksel değerlendirme geliştirilmiştir:

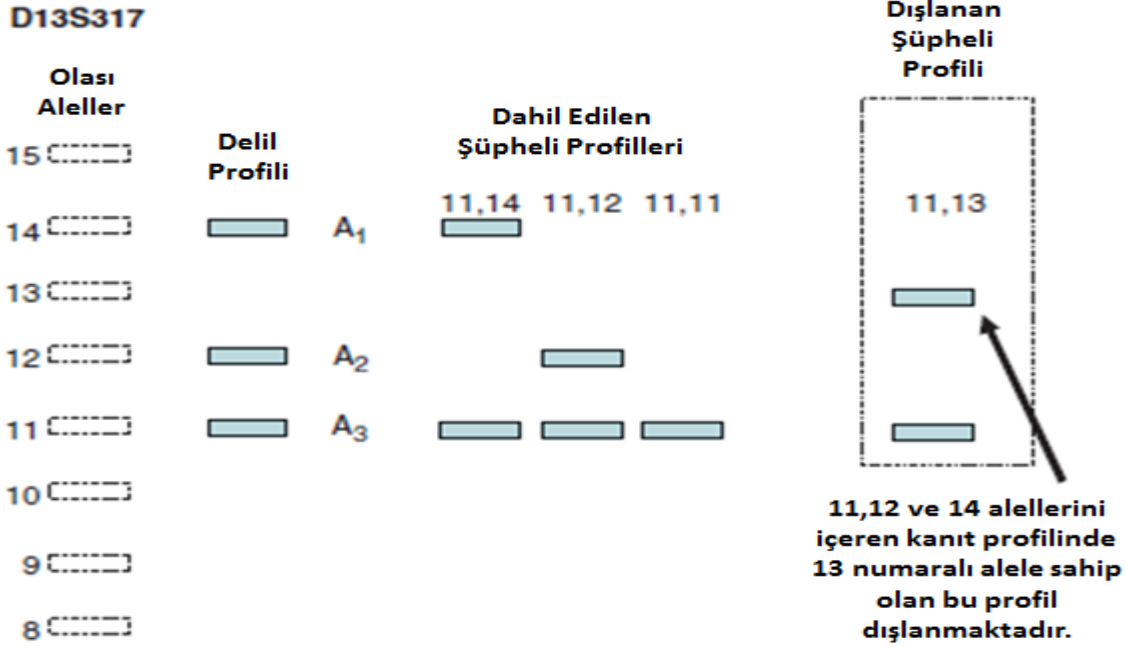
- Herhangi bir hesaplama yapmadan ve basit bir şekilde şüphelinin karışım profilinde bulunup/bulunmadığını veya katkısı olup/olmadığını belirten **kalitatif analiz metodu**,
- Katılımcıların olası genotiplerinin belirlenmesinden itibaren kullanılan **eşleşme olasılığı tahmin yöntemi**,
- **Dışlama olasılığı yöntemi**,
- **Olabilirlik oranı (LR)** hesaplamaları (Ladd ve ark. 2001, Perlin ve Szabady 2001, Weir 2003).

Çoğu adli laboratuvarlar karışım örneklerinin değerlendirmesinde istatistiksel metotlardan kaçınmaktadır. Bunun yerine elektroforegramda gözlenen piklerin görsel olarak değerlendirilmesi yönüne gitmektedir. Fakat gelişen teknoloji ve çeşitli yazılımlar günümüzde karışmış DNA örneklerinin yorumlanmasını daha başarılı hale getirmiştir.

2.6.4 Karışım Örneklerinin Yorumlanmasında Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

2.6.4.1 Karışmış DNA Örneklerinin Kalitatif Olarak Değerlendirilmesi

Karışmış DNA örneklerini değerlendirmek için kullanılan en tutucu (konservatif) metot kalitatif değerlendirme metodudur. Bu metodun en önemli dezavantajı olay yerinden elde edilen delilde şüphelinin dışlamamasıdır. Şekil 7. de görüldüğü gibi D13S317 lokusunda 11,14 veya 11,12 veya 11,11 genotiplerine sahip olan bütün şüpheli profilleri 11,12 ve 14 alellerini içeren delille bağlantıları varmış gibi görünmektedir (Butler ve ark. 2004). Diğer bir şüphelinin DNA profili karışım örneğinden farklı olarak 13 alellini içerdiğinden bu durumda bu kişinin dışlanması mümkündür. Ancak bu şekildeki dışlama/dahil etme değerlendirmesi DNA profillerindeki tüm lokuslara uygulanması gerekmektedir.



Şekil 7. D13S317 lokusundaki STR alellerini gösteren bir örnek. Olay yeri profili 11,12 ve 14 alellerini içermektedir (Butler ve ark. 2004).

Kalitatif değerlendirme kullanılarak bir rapor yazılmak istendiğinde “ şüpheli, ilgili DNA profilinin katılımcısı olarak dışlanamaz” gibi bir ifade kullanmak durumunda kalınır. Diğer bir ifadeyle “şüpheli genotipinde bulunan alellerin tamamı, karışmış DNA örneği profilinde tespit edilmiştir”. Bu sonuç ancak az sayıda genetik işaretler kullanılarak elde edilen profillerde dışlama/dahil etme durumunda kullanılabilir. Günümüzde polimorfik STR sistemleri kullanıldığından test edilen bölgelerin sayısı oldukça fazladır. Bu yüzden kalitatif değerlendirme sonsuz kombinasyonlara sahip olacağından sonuç vermekte yetersiz kalmaktadır (Shrestha ve ark. 2006).

Herhangi bir hesaplama yapmadan basit kalitatif değerlendirme yöntemi kullanılarak yapılan dışlama/dahil etme sonuçları mahkeme ve yargı sistemini tatmin etmeyecek düzeyde olmasa da bu yöntem yeterince tutucudur. Mahkemeler genellikle delile istatistiksel ağırlık vermek amacı ile sayısal bir ifadeye ihtiyaç duyarlar (National Research Council Committee on DNA Forensic Science 1996).

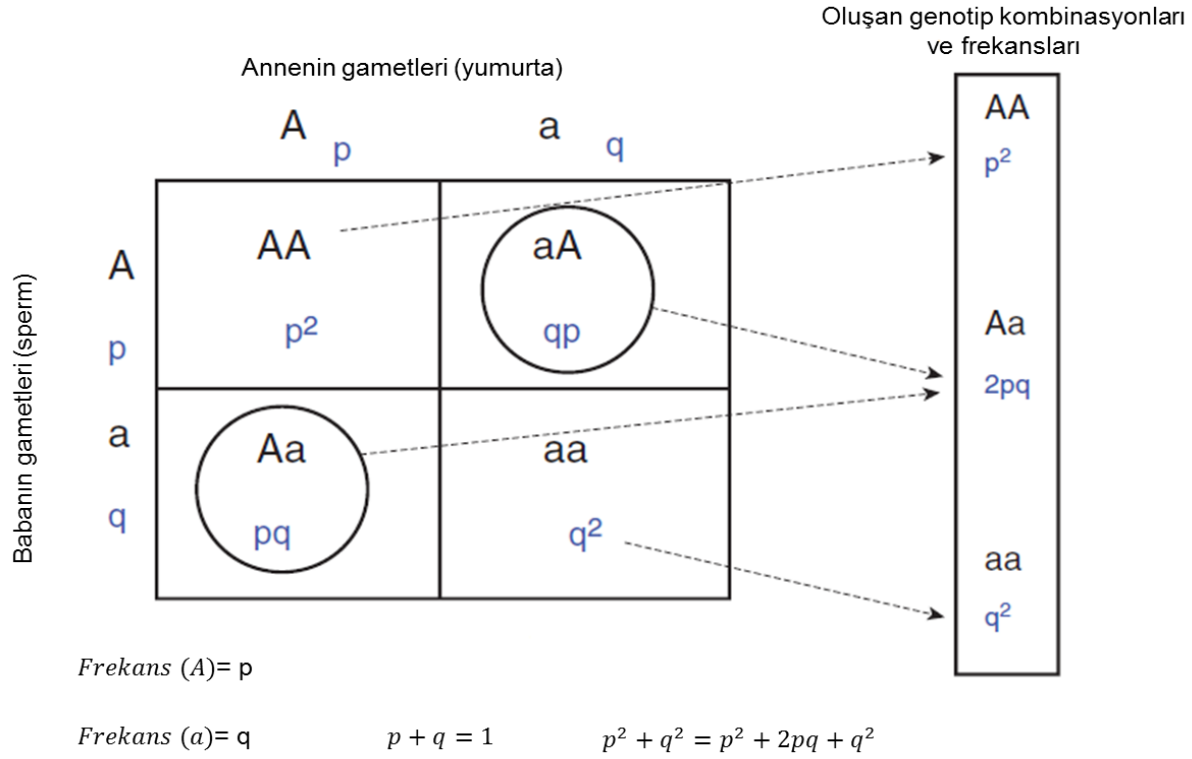
2.6.4.2 Eşleşme Olasılığı Tahmin Yöntemi

Bazı durumlarda katılımcı kişilerin alellerini, karışım örneğinden doğru bir şekilde ayırmak mümkündür. Tecavüz gibi vakalarda, mağdurun DNA profilini karışım örneği ile karşılaştırarak şüphelinin profilini elde etmek mümkündür. Elektroforegramda gözlenen sinyal yoğunluklarındaki farklar majör ve minör katılımcının ayırt edilmesinde yardımcı olmaktadır. İki katılımcının bariz bir şekilde ayrıldığı durumlarda karışım örneğini tek bir örnekmiş gibi analiz etmek mümkündür (Gill 2001).

Karışmış DNA örneğinde bulunan genotiplerin yorumlanması, tüm donörlerin katılım oranları eşit ve gerçek alellerin maskelendiği durumlarda majör katılımcının belirlenmesi mümkün olmayacağından dolayı zordur. Tüm alellerin tam olarak belirlenemediği durumlarda ve genellikle bozunmuş örneklerde gözlenen kısmi profillerden dolayı karışım örneklerinin yorumlanması eşleşme olasılığı metodu ile gerçekleştirmek mümkün değildir. Günümüz teknolojisi ile tüm katılımcıların alelleri doğru bir şekilde ayırlamadığından dışlama olasılığı ve olabilirlik oranı gibi yöntemlerin kullanımı analistleri daha doğru sonuçlara ulaştıracaktır (Budowle ve ark. 2009).

2.6.4.3 Dışlama Olasılığı Yöntemi

Kompleks karışmış DNA örnekleri dışlama kombine olasılığı metodu kullanılarak yorumlanabilirler. Dışlama olasılığı, rastgele bir kişinin gözlenen DNA karışım örneğinin katılımcısı olarak hangi oranda dışlandığını ifade eder. Alel sıklıkları açısından değerlendirildiğinde “rastgele bir birey hangi sıklıkla dışlanır?” sorusu ortaya çıkmaktadır. Bunu da Random Man Not Excluded metodu (RMNE) ile çözümlenir. Bu metot kullanılarak ilgili popülasyonun Hardy Weinberg dengesi temellerine dayalı test edilmektedir. Şekil 8. Hardy Weinberg ilkesinin temellerini göstermektedir (Mortera ve ark. 2003, Evett ve Weir 1998).



Şekil 8. Hardy-Weinberg ilkelerini gösteren çaprazlama (Punnett) karesi. A ve a alellerinin sıklıkları p ve q değerleridir.

Hardy-Weinberg ilkesi kısaca alel frekansları ile genotip frekanslarını ilişkilendirmeye yardım eder. Bu ilkelere göre nesilden nesile aktarılan genotip ve alel frekansları sabit kalmaktadır. Diğer bir çıkarım ise, eğer bir popülasyonda bir alele nadir olarak rastlanıyorsa, o alelin heterozigot olarak görülme sıklığı daha fazla olur (Butler 2005).

Eğer bir delil profili herhangi bir lokusta üç alele (A_1 , A_2 , A_3) sahip ise, bu durumda;

$$p = A_1 + A_2 + A_3$$

$$q = 1 - p$$

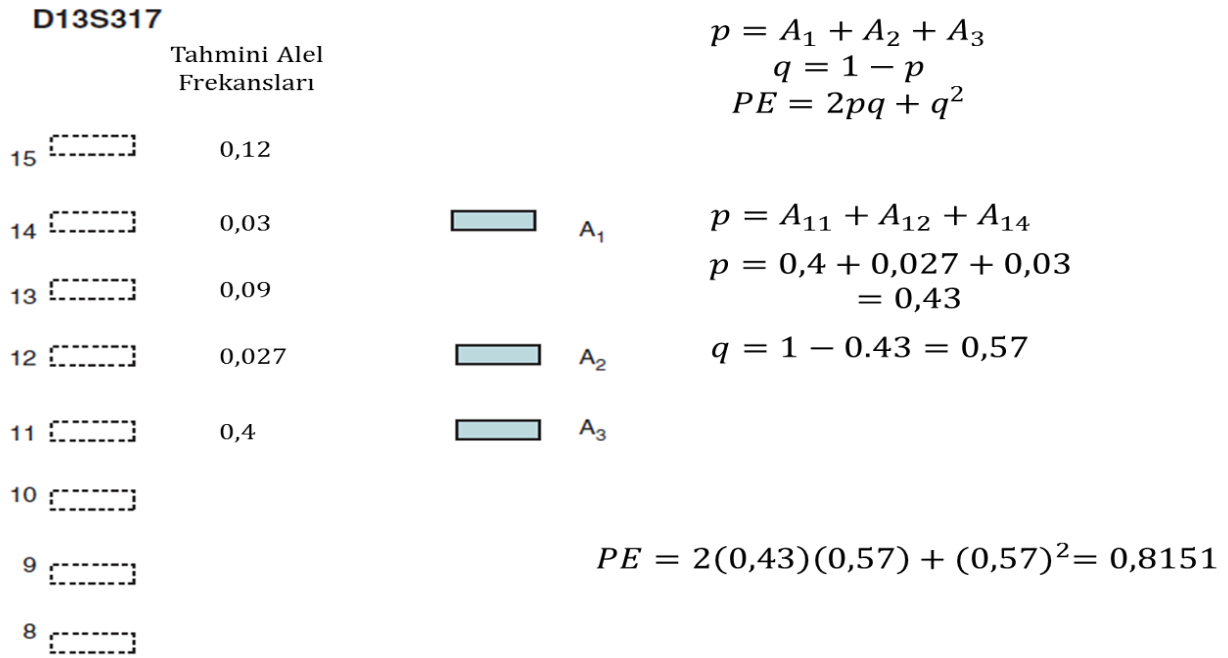
$$PE = 2pq + q^2$$

Formül 4. Dışlama olasılığı (PE, Power of Exclusion) metodunun matematiksel ifadesi. p ; bir lokusta bulunan alellerin ilgili toplumdaki frekanslarının toplamına eşittir.

Her lokus için dışlama olasılığı elde edildikten sonra tüm lokuslar için kombine dışlama olasılığı (CPE,) belirlenebilir;

$$Kombine\ PE\ (CPE) = 1 - (1 - PE_1) * (1 - PE_2) * \dots * (1 - PE_n)$$

Şekil 9.da kombine dışlama olasılığının belirlenmesinde, karışmış DNA (delil) profilinde bulunan 11, 12 ve 14 alelleri içermeyen genotiplerin frekanslarının hesaplamasını göstermektedir. CPE yaklaşımı karışımındaki katılımcıların genotiplerinin belirlenmesini etkileyen stutter, alel düşmesi vb. istenmeyen hatalardan kaçınır. Bu metot katılımcılar hakkında herhangi bir ön bilgi veya varsayımları dikkate almaksızın sonuç verebilmektedir. Bu durumda mağdurun veya şüphelinin DNA profili hakkında bir ön bilgiye ihtiyaç duymamaktadır (Evelt ve Weir 1998).



Şekil 9. Bir karışım örneğinde dışlama olasılığının hesaplanması.

Kombine dışlama olasılığı, olabilirlik oranı yöntemine göre daha az tutucu ve güçlü bir yöntem olmasa bile, bu metodun en önemli avantajı olay yerinden gelen DNA profiline katkıda bulunan kişilerin sayısını göz ardı etmesidir. Kısaca bu yöntemlerde olay yerinden elde edilen delilin profilinde gözlenmeyen diğer aleller de değerlendirilmektedir (Ladd ve ark. 2001).

2.6.4.4 Olabilirlik Oranı (Likelihood Ratio)

Çeşitli suçlarda genetik markırların kullanımı suçlunun kimliklendirmesinde ve yanlış bir şekilde suçlanan şüphelilerin aklanmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Ancak biyolojik örneklerden genetik profillere ulaşılması, özellikle de bu örneklerde birden fazla kişinin

materyalinin bulunması yorumlama işlemini daha da zorlaştırmaktadır. Bu gibi durumlarla özellikle tecavüz gibi suçlamalarda sıklıkla karşı karşıya kalınır (Kelly ve ark. 2012). Bu tür örneklerde mağdurun ve partnerinin (eşinin) örneği ile birlikte şüpheliye/şüphelilere ait materyalde aynı leke üzerinde görülebilir. Bu tür vakaların çözümünde olabilirlik oranından yararlanılabilir. Olabilirlik oranında (LR) iki alternatif hipotezin (H_p = iddia hipotezi (prosecution hypothesis) ve H_d =Savunma hipotezi (defence hypothesis) karşılaştırması yapılır. Bu oran; bir profilin iki alternatif hipotez altındaki olasılıklarının oranının karşılaştırılması sonucu ortaya çıkmıştır. Basit olarak;

H_p = şüpheli suçludur

H_d = şüpheli suçlu değildir, başka biri suçludur.

Şeklinde olduğu varsayılır.

Bu durum en basit olarak şu şekilde açıklanabilir: “ E profili nin H_p hipotezi ile açıklanması, H_d hipotezi ile açıklanmasından LR kere daha olasıdır.” Burada önemli olan kimlerin bu profile katılımcı olduğu yani profilde bulunan alellere ve hangi allelerin bilinmeyen katılımcılardan kaynaklanabileceğini belirlemektir. Matematiksel olarak;

$$LR = \frac{H_p}{H_d}$$

Şeklinde ifade edilir. İddia makamına göre şüpheli suçu işlemişse $H_p = 1$ (%100) olacaktır. Diğer taraftan savunma hipotezi ise bu suçu aynı genetik profile sahip başka birinin işlediğini savunacaktır. Eğer suçu işlediği düşünülen profil heterozigot ise olasılık bu durumda $2p_1p_2$, eğer profil homozigot ise p_1^2 şeklinde olacaktır. “p” bu toplumda gözlemlenen ilgili alellerin frekansını temsil etmektedir. Son aşamada olabilirlik oranını matematiksel olarak ifadesi;

$$LR = \frac{1}{2p_1p_2}$$

Şeklinde olacaktır. İlgili lokusun D13S317 ve alellerin de 11, 14 olduğu varsayılırsa, suçun X ülkesinde işlendiğini ve bu alellerin X toplumunda görülme sıklığının 0.34 ve 0.04 ise, olabilirlik oranı;

$$LR = \frac{1}{2p_{11}p_{14}} = \frac{1}{2(0,34)(0,04)} = 33,33$$

olarak hesaplanacaktır. Eğer LR değeri 1'den büyük ise bu durumda iddia hipotezinin (Hp) desteklenmesi söz konusudur. Öte yandan, LR değerinin 1'den küçük olduğu durumlarda savunma hipotezi (Hd) desteklenmektedir. Örnekte görüldüğü gibi LR değeri 1'den yüksektir. Bu durumda iddia makamının hipotezi, savunma hipotezinden 33,33 kez daha olasıdır. Olabilirlik oranının gücü değerlendirilirken Evett ve Weir tarafından belirlenen Tablo 5. teki ölçek kullanılabilir (Evett ve Weir, 1996).

Tablo 5. Evett ve Weir tarafından belirlenen LR güç ölçeği.

Olabilirlik Oranı	Delilin iddia hipotezini desteklemesi
1'den 10'a kadar	Sınırlı destek
10'dan 100'e kadar	Orta derecede destek
100'den 1000'e kadar	Güçlü destek
1000 ve üstü	Çok güçlü destek

Olabilirlik oranı (LR) yaklaşımı basit ürün kuralından örnekleme hatasının dahil edilmesine, alt popülasyon düzeltmelerinden basit hataların düzeltilmesine kadar çok çeşitli formülasyonları içeren bir yaklaşımdır. Diğer bir deyişle, LR dışlama olasılığı metodunun daha üstün versiyonudur. Bayes uygulamasında olduğu gibi, bu yaklaşımda da doğru hipotezlerin oluşturulması anahtar faktördür. Hipotezlerin olayın geçmişine ve mahkemenin isteğine göre kurulması gerekmektedir. Hem iddia hem de savunma makamı tarafından karar verilmesi gereken en önemli faktör kişilerin genetik materyalinin karışım örneğinde bulunup bulunmadığıdır (Weir ve ark. 1998).

Bir cinsel taciz olayının olduğunu varsayalım. Burada saldırıya uğrayan kadın saldırgana tırnakları ile zarar verdiğini söylediğini düşünürsek, alınan tırnak örneğinde mutlaka hem şüpheli hem de mağdura ait biyolojik örneklerden oluşan bir DNA karışım örneğinin var olduğunu

öngörebiliriz. Yapılan DNA tiplemesinde iki kişinin profilini gözlemlediğimizde oluşturabileceğimiz iki hipotez aşağıdaki gibi olacaktır:

Hp: Tırnak örneği hem mağdurun hem de şüphelinin DNA materyalini içerir.

Hd: Tırnak örneği mağdurun ve başka bir kişinin DNA materyalini içerir.

Mağdurun DNA materyalinin her iki hipotezde de bulunması, araştırmacının profilleri daha doğru ve adil olarak değerlendirmesine olanak verecektir. Bu durumda araştırmacı geriye kalan alellerin diğer kişiye ait olduğunu bilerek değerlendirmeye devam edecektir. Eğer delilde gözlenen alellere *E*, şüpheli ve mağdurun genotiplerine *G_s* ve *G_v* olarak adlandıırırsak, bu durumda;

$$LR = \frac{\Pr(E|Gv, Gs, Hp)}{\Pr(E|Gv, Gs, Hd)}$$

olacaktır. Eğer şüphelinin delilden bağımsız olduğunu düşünürsek bu formül;

$$LR = \frac{\Pr(E|Gv, Gs, Hp)}{\Pr(E|Gv, Hd)}$$

olarak değişecektir (Buckleton ve ark. 2005).

Örneğin delilimizde a,b,c,d diye dört tane alel olsun. Bu aleller de ab mağdura ait olan aleller ve cd ise şüpheliye ait olan aleller olarak düşündüğümüzde; iddia makamının hipotezi (*H_p*) bu durumda, profildeki katılımcıların mağdur ve şüpheliden oluştuğu yönünde olacaktır. Savunmanın hipotezi (*H_d*) ise; bu profildeki kişilerin mağdur ve başka bir bilinmeyen kişiye (katılımcıya) ait olacaktır.

Delilin *H_p* hipotezi altında matematiksel olarak açıklaması şu şekilde olacaktır:

$$Po = (\phi|abcd) = 1$$

Delil profili, P olasılığının altında ifade edilen 0 bu profilde bilinmeyen katılımcı sayısını ve ϕ ise bilinmeyen katılımcı tarafından boş bir alel setini ifade etmektedir. Burada aleller kesin olarak bilindiği için bu işlemin sonucu 1 dir.

H_d hipotezi altında açıklanan durum ise:

$$P1 = (cd|abcd)$$

olacaktır. Burada p olasılığının altında ifade edilen 1 bilinmeyen katılımcı sayısını ve cd alellerinin de bu bilinmeyen kişiye ait aleller olduğunu belirtmektedir. Sonuç olarak olabilirlik oranını (LR) hesaplamak için aşağıdaki denklemi kullanırız.

$$LR = \frac{Po = (\phi|abcd)}{P1 = (cd|abcd)}$$

Karışmış DNA örneklerinin yorumlanması olayın gerçekleştiği koşullara ve katılımcı sayısına dayanmaktadır. Adli uygulamalarda LR kullanımı Avrupa ülkelerinde daha yaygındır. Fakat ebeveynlik testlerinde tüm ülkeler LR yaklaşımını kullanmaktadır. LR metodu dışlama yaklaşımlarına göre genetik bilginin daha aktif kullanımını sağlamaktadır (Clayton ve ark. 1998, DAB 2000).

Eğer delil profili bir lokusta A₁,A₂,A₃ ve A₄ olmak üzere 4 alelden oluşuyorsa ve mağdur A₃ ve A₄ allerinde sahipse bu durumda şüphelinin A₁ ve A₂ alellerine sahip olacağı düşünülmektedir. İddia makamının hipotezi DNA kanıtının şüpheli ve mağdurun genetik materyalinden oluştuğu şeklinde olacaktır. Buna karşılık savunma ise DNA delilinin mağdur ve bilinmeyen bir kişinin genetik materyalinden kaynaklandığını savunacaktır. Bu durumda iddia makamının olasılık değeri bire eşit olacaktır çünkü onlar şüphelinin suçu %100 işlediğinden emindir. Savunmanın hipotezi buna bağlı olarak DNA delilinde bulunan aleller ve olası katılımcıların sayısı gibi çeşitli durumlardan dolayı değişebilmektedir. Sonuç olarak LR gözlenen karışımın ve STR alellerin kombinasyonunun bağlı şansını açıklayacaktır. Tablo 6. da çeşitli senaryolar için LR formülleri verilmiştir (NRC 1996).

Tablo 6. Çeşitli karışım senaryoları için LR formülleri. “A” alelleri, p ise ilgili alellerin frekanslarının temsil etmektedir.

Delil	Şüpheli	LR
A_1, A_2, A_3, A_4	A_1, A_2	$\frac{1}{12p_1p_2}$
A_1, A_2, A_3	A_2, A_3	$\frac{p_1+2p_2+2p_3}{12p_2p_3(p_1+p_2+p_3)}$
A_1, A_2, A_3	A_1	$\frac{1}{6p_1(p_1+p_2+p_3)}$
A_1, A_2	A_1, A_2	$\frac{(p_1+p_2)^2}{2p_1p_2(3p_1p_2+2p_1^2+2p_2^2)}$
A_1, A_2	A_1	$\frac{2p_1+p_2}{2p_1(3p_1p_2+2p_1^2+2p_2^2)}$

2.6.5 Karışmış DNA Örneklerinin Yorumlanmasında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

Ladd ve arkadaşlarının karışım analizinde kullandıkları yöntemler Tablo 7. de özetlenmiştir. Tablo 7. deki örneklerle ek olarak hesaplama gerektirmeyen kalitatif değerlendirme bu yaklaşımlar arasında en tutucu olanıdır. Tutucu olmak adli bilimlerin ve mahkeme sistemlerinin adil kararlar verebilmesi için önemlidir. Fakat Amerika ve Avrupa ülkelerinde yargı sistemi delilin eşleşme istatistiği üzerinden karar vermektedirler. Bu durumda kalitatif yaklaşımın kabul görmesi olanaksızdır (Goos ve ark. 2013, Ladd ve ark. 2001).

Geriye kalan yaklaşımları genotipe dayalı ve dışlamaya dayalı yöntemler olarak gruplamak mümkündür. Dışlamaya dayalı metotlar daha öncede bahsedildiği gibi katılımcıların genotipi bilinmesine gerek kalmadan delili değerlendirir. Fakat bu yöntemlerin en büyük dezavantajı stutter, alel düşmesi veya maskeleye gibi olayları değerlendirmede yetersiz kalmasıdır. Söz konusu profilde oluşan bu istenmeyen durumlar dışlamaya dayalı yaklaşımlar tarafından göz ardı edilmektedir. Öte yandan eşleşme olasılığına ve genotipe dayalı yöntem olan olabilirlik oranı delilin tüm ayrıntıları ile yorumlanmasını sağlamaktadır. Tutuculuk açısından delilin her ayrıntısını değerlendiren olabilirlik oranı metodu tüm istatistiki yöntemler arasında en tutucu olanıdır. Bu yaklaşımın en önemli dezavantajı ise mahkemede açıklamasının zor olmasıdır. Bir

çok durumda iddia ve savunma makamları tarafından yanlış olarak ifade edilmektedir (Ladd ve ark. 2000, Ladd ve ark. 2001, Bourke ve ark. 2001).

Tablo 7. Karışım örneklerinin yorumlanmasında kullanılan istatistiksel yöntemler (Ladd et. al 2001)

Karışım Örneklerinin Yorumlanması	
“Dışlamaya” Dayalı Yaklaşım	“Genotipin Ortaya Çıkarılmasına” Dayalı Yaklaşım
Random Man Not Excluded (RMNE) 1. Dışlama Durumunun Birleşik Olasılığı (CPE) 2. Dahil Etme Durumunun Kombine Olasılığı (CPI)	Rastgele Eşleşme Olasılığı 1. Olabilirlik Oranı (LR)

2.6.6 İddia ve Savunma Makamlarının İfade Hataları

Matematiksel olarak iddia makamı tarafından yapılan en büyük hata;

$$P(E|Hd) \neq P(Hd|E)$$

olarak ifade edilmesidir. Bu formülde anlatılmak istenen delile şüphelinin suçsuz olma olasılığı ile şüphelinin suçsuz olması durumunda delilin olasılığı ifadeleri birbirine eşit olmamasıdır. Olasılık metotlarında delil daima hipotezler altında incelendiğinden buradaki doğru ifade her zaman $P(Hd|E)$ olacaktır. Bu tür hatalar LR değerinin oldukça yüksek olduğu durumlarda göze çarpmaktadır. İfade etmede yapılacak en ufak hata bile kararın iddia makamı lehine verilmesine neden olacaktır.

Savunma makamının yaptığı hatalı ifade ise mahkemede karşılaşılan en sık ifadelerden biridir. Bu durum genellikle delilin iddia makamını desteklediği düşük LR değerlerinde ortaya çıkmaktadır. Burada savunma makamı potansiyel suçluların sayısını kullanarak şüphelinin suçlu olmadığını yanlış bir şekilde ifade etmektedir. Örneğin iki yüz bin nüfusa sahip X şehrinde

işlenen bir adli vakada, olay yerinde bulunan kan örneğinin toplumda %1 sıklıkla rastlandığını düşünelim. Bu durumda savunma makamı bu kan grubunu içeren yaklaşık 2000 kişi olduğunu ve hepsinin de potansiyel şüpheli olduğunu hatalı bir şekilde ifade edebilir (Adam 2010, Aitken ve Taroni 2004). Doğru ifade şeklinin belirlenmesi için aşağıda örnek iki hipotez verilmiştir.

- *Hp*: Karışım örneği hem mağdurun hem de şüphelinin DNA materyalini içerir.
- *Hd*: Karışım örneği mağdurun ve başka bir kişinin DNA materyalini içerir.

Örnek olarak verilen bu iki hipotez için en doğru ifade şu şekilde oluşmaktadır:

“Şüpheli profilinin delil profilinde bulunma olasılığı, aynı popülasyon içerisinde seçilen herhangi bir kişinin profilinin bulunmasından A sayısı kez daha fazladır.”

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarında geçerli kılınmış olan AmpFℓSTR® Identifiler kiti kullanılmıştır. Validasyon parametreleri yeniden çalışılarak geçerli kılınmıştır. Bu aşamadan sonra gönüllü bireylerden toplanan kan örneklerinden elde edilen DNA izolatlarından farklı oranlarda karışım örnekleri oluşturularak valide edilen AmpFℓSTR® Identifiler kiti ile çoğaltıldı. PCR ürünleri kapiller elektroforezde yürütüldü ve veriler Genemapper® IDX v.1 programı kullanılarak analiz edildi. Karışmış DNA örneklerinin yorumlanması İspanya Santiago de Compostela Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nde R-Forge® yazılım Forensim Paketindeki LRMix™ uygulaması gerçekleştirildi. Daha sonra Avrupa Adli Bilimler Enstitüleri Ağı (ENFSI) bünyesinde gerçekleşen karışmış DNA örneklerinin yorumlanmasında laboratuvarlar arası karşılaştırma pilot çalışmasına katılım gerçekleştirildi.

Tez çalışması üç aşamada gerçekleştirildi:

1. ABI 3130 Genetik Analizör Cihazında AmpFℓSTR® Identifiler kitinin Validasyon Çalışması
2. Karışmış DNA örneklerinin hazırlanması ve analizi
3. İspanya Santiago de Compostela Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nden temin edilen anonim karışmış örnek dosyalarının ve Avrupa Adli Bilimler Enstitüleri Ağı (ENFSI) bünyesinde gerçekleşen karışım yorumlama pilot çalışması

3.1 Yöntemlerin Uygulanması

Araştırmanın laboratuvar aşaması yedi bölümden oluşmaktadır.

- QIAamp® DNA mini kit yöntemi kullanılarak DNA izolasyonunun yapılması
- DNA miktarlarının belirlenmesi
- Kontrollü karışmış DNA örneklerinin oluşturulması
- Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile DNA'nın amplifikasyonu
- PCR ürünlerinin ABI3130 (Life Technologies) kapiler elektroforezi ile yürütülmesi
- Verilerin analizi ve sonuçların değerlendirilmesi

QIAamp® DNA Mini Kit yönteminin uygulanması

- Kan örnekleri EDTA içeren 10 ml 'lik vakumlu tüplere alındı.
- 1,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpüne 200 µl'lik EDTA'lı kan konuldu. 20 µl proteinaz K ve 200µl AL tamponu eklendi ve 15 saniye vortekslendi.
- 56°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- %96-100'lük etanolden 200 µl eklenerek 15 saniye vortekslendi.
- QIAamp® mini spin kolonu 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve 3. adımda elde edilen karışım kolona aktarıldı. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve filtratı içeren tüp atıldı.
- Kolona 500 µl AW1 eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtratı içeren tüp atıldı.
- Kolona 500 µl AW2 eklendi ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Filtratı içeren tüp atıldı.
- Kolon boş olarak 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- QIAamp® mini spin kolon, 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve 200 µl AE tamponu eklendi. Oda ısısında 1–2 dakika inkübe edildi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı (Qiagen manual 2005).

DNA Miktarlarının Belirlenmesi

DNA miktarları Qubit® Florometre (Invitrogen) cihazında, Quant-iT™ dsDNA HS (High Sensetive) kit kullanılarak belirlendi. Floresans teknolojisi kullanılarak yüksek doğruluk ve hassasiyet ile DNA miktarları 260 nm dalga boyunda, aşağıdaki adımlar izlenerek ölçüldü.

- Her bir örnek için 199 µl Quant-iT™ dsDNA HS Buffer ve 1 µl Quant-iT™ dsDNA HS Reagent karışımı hazırlandı.
- Cihazın kalibrasyonu için her ölçümde Standart 1 ve Standart 2 olmak üzere kontroller kullanıldı. Her bir standart için Buffer-reagent (200 µl) karışımdan cihaza özgü tüpe 190 µl alındı, üzerine 10 µl standart eklendi.
- Örnekler için ise Buffer-reagent (200 µl) karışımdan cihaza özgü tüpe 199 µl alındı, üzerine 1µl standart eklendi. Tüpler birkaç saniye vortekslendi.
- Oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Standart 1 ve Standart 2 sırası ile okutularak kalibrasyon yapıldı.

- Örnek cihaza yerleştirildi, karışım içindeki ölçümü yapıldı.
- DNA miktarları cihazda otomatik olarak hesaplandı.

Örneklerden elde edilen izolatlar, PCR reaksiyonları için 0,1-10 ng DNA miktar aralığı olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı. Örneklerin son konsantrasyonu 1ng/5µl olarak belirlendi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR için Life Technologies 9700 PCR cihazı (GeneAmp PCR System 9700, ABI) ve AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon kiti (Life Technologies) kullanıldı. PCR programı yaklaşık iki buçuk saat sürdü. PCR kiti içerdiği aleller ve lokuslar Tablo 8. de gösterilmiştir.

Tablo 8. AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon kiti lokusları

Lokus	Kromozomal Yerleşim	AmpFISTR® Identifiler® Allelik Merdivende Blunan Aleller	Boya Etiketi
D8S1179	8	8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM™
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	VIC®
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3	
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	NED™
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	
vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	PET®
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	

PCR Karışımının Hazırlanması

Her bir örnek 200 µl'lik PCR tüplerine hazırlanmıştır. Çalışmanın iç kontrolünü sağlamak için pozitif ve negatif örnekler kullanılmıştır. Hazırlanan PCR reaksiyon karışımı Tablo 9. da gösterilmiştir. Her reaksiyon kit kullanım talimatına göre ve yarım reaksiyon olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Life Technologies, 2012).

Tablo 9. PCR bileşenlerinin reaksiyon başına kullanılan hacimleri.

PCR bileşenleri	Reaksiyon başına kullanılan hacim
AmpFISTR® PCR Reaksiyon Karışımı	5,25µl/reaksiyon
AmpliTaQ Gold® DNA Polimeraz enzimi	0,25µl/reaksiyon
AmpFISTR® Identifiler® Primer Seti	2,25µl/reaksiyon
DNA izolatu (son konsantrasyon 1ng/5µl)	5µl

Amplifikasyon Döngüsü

Tablo 10. Amplifikasyon döngü parametreleri.

Başlangıç İnkübasyon Süresi	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Son Uzama	Sonlandırma
Bekletme	28 döngü			Bekletme	Bekletme
95°C	94°C	59°C	72°C	60°C	4°C
11 dakika	1 dakika	1dakika	1dakika	60 dakika	∞

PCR Ürünlerinin ABI 3130 (Life Technologies) Kapiler Elektroforezi İle Yürütülmesi

PCR ürünlerinin elektroforezi 4-kapillerli ABI 3130 cihazında yapıldı. Her reaksiyon için 8,7 µl Hi-Di Formamid (Life Technologies) ve 0,3 µl GeneScan™-500LIZ™ (internal size standart) karıştırılarak üzerine 1 µl PCR ürünü eklendi. Karışım Genetik Analizör cihazına yüklendi. Her yürütme öncesinde Data Collection Software (Life Technologies) kullanılarak örnek listeleri hazırlandı. Örneklerin elektroforez aşamasında yürütme koşulları AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon kit protokolüne göre yapıldı. Kit için önerilen GS STR POP4 (1 mL) G5 modülü kullanıldı. Genetik analizör cihazı için kullanılan yürütme koşulları Tablo 11. de verilmiştir.

Tablo 11. ABI 3130 cihazında yapılan elektroforezin yürütme koşulları

Yürütme öncesi voltaj	15 kV
Enjeksiyon voltajı	3 kV
Enjeksiyon süresi	5 sn
Yürütme voltajı	15 kV
Yürütme süresi	1500 sn
Yürütme sıcaklığı	60 °C

Örneklerin görüntülenmesi, tiplendirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi Genemapper® IDX v.1 analiz programı kullanılarak yapıldı.

3.2 ABI 3130 Genetik Analizör Cihazında AmpFISTR® Identifiler kitinin Validasyon Çalışması

Validasyon aşaması, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı DNA tiplendirme metotlarının geçerli kılınması prosedürü kullanılarak laboratuvar analistleri ile birlikte eş zamanlı olarak gerçekleştirildi. Geçerli kılma parametreleri, ABI 3130 Genetik Analizör cihazının performansının değerlendirilmesi için analiz eşik (LOD), dinamik alan (Lineer Çalışma Alanı), duyarlılık (LOQ), stokastik eşik, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarını kapsamaktadır. Bu parametrelerin değerlendirilebilmesi için DNA izolasyonu, miktar tayini, PCR ve DNA profillemesi yapıldı. Çalışılan parametrelerin kısaca açıklaması Tablo 12. de gösterilmektedir. Tüm parametrelerde uygulanan formüller İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı DNA Analizi Profillemesi Deney Metodunun Geçerli Kılma Talimatına göre yapılmıştır. (İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü 2011).

Tablo 12. Validasyon parametreleri ve açıklamaları

Geçerli Kılma	DNA analizinde kullanılan metotların hedeflenen gereksinimleri sağladığını objektif delillerle doğrulamaktır (ISO/IEC 17025).
Analiz Eşiği	DNA tiplendirmede kullanılan ABI 3130 Genetik Analizör cihazı için geçerli olan tespit limitidir.
Dinamik Alan	Genetik analizör cihazının tespit aralığını gösterir. Bu da cihazın tespit edebileceği en düşük ve en yüksek DNA miktarlarını içerir.
Duyarlılık	Deney sonuçlarının doğruluğunu ve güvenilirliğini garanti etmek için PCR (Polimerase Chain Reaction, Polimeraz zincir reaksiyonu)’ın en alt ve üst DNA miktar seviyelerinin tespit edilmesidir.
Stokastik Eşik	Aynı lokusta bulunan kardeş aleller arasında dengesizliklerin görülmeye başladığı pik yüksekliği ya da hedef DNA konsantrasyonudur.
Tekrarlanabilirlik	Örneklerin aynı cihaz kullanılarak belirli bir zaman aralığında veya farklı zamanlarda ve/veya aynı/ farklı kişi tarafından çalışılması sonucunda aynı genetik profilin elde edilmesidir.
Tekrar Üretilebilirlik	Örneklerin farklı laboratuvarlarda, aynı veya farklı metodlarla, farklı kişiler tarafından çalışılması sonucunda aynı genetik profilin elde edilmesidir.

Validasyon Aşamasında Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka
Otomatik Pipet (0-2.5, 0-20, 10-100, 100-1000 µl)	Eppendorf
Vorteks (Karıştırıcı)	Nejat Çoşkuner
Mikrosantrifüj	Heraus Biofuge
Termomikser (Isıtıcı, Karıştırıcı)	İncekaralar
Buzdolabı	Sharp
Derin Dondurucu	Arçelik
Isı Döngü Cihazı, (GeneAmp PCR System 9700)	Life Technologies
Kapiller Elektroforez (ABI Prism 3130 Genetic Analyzer)	Life Technologies
Florometre cihazı (Qubit)	Invitrogen

Validasyon Aşamasında Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Kimyasal veya Kitin adı	Markası
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
Qubit dsDNA DNA miktar tayin kiti	Invitrogen
AmpF ℓ STR® İdentifiler kiti	Life Technologies
AmpF ℓ STR® İdentifiler Ladder	Life Technologies
HiDi Formamid	Life Technologies
POP4	Life Technologies
EDTA 10X Buffer	Life Technologies
Liz 500 Size standart	Life Technologies

Validasyon Aşamasının Uygulanması

Deneyler için beş gönüllüden alınan kan örnekleri (E1, E2, E3, K1, K2), X1 kodlu pozitif kontrol örneği 9947A (Life Technologies) ve GEDNAP tarafından 2012 yılında İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarına çalışılmak üzere gönderilen örnekler kullanıldı. Kan örnekleri için QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) kullanıldı. Örneklerden DNA izolasyonu yapıldı. DNA miktarları için Quant-it dsDNA HS Assay (High Sensitive) Kit kullanıldı ve florometrik yöntemle DNA miktarı ölçüldü. AmpFℓSTR® Identifiler PCR Kiti kullanılarak ABI 9700 PCR cihazında amplifikasyon yapıldı. PCR ürünleri ABI 3130 Genetik Analizör cihazında yürütüldü ve Genemapper® IDX v.1 programında analiz edildi.

Analiz Eşik Çalışması

Analizde kullanılan genetik analizör cihazının analiz eşiğini belirlemek için, söz konusu cihazın kullanım ve yazılım talimatına uygun olarak yürütülüp analiz edilen 10 negatif kontrol örneğinde gözlenen en yüksek piklerin rfu (Rölatif Floresan Unit) değerleri kullanıldı. Yürütülen tüm örneklerden elde edilen en yüksek piklerin rfu değerlerinin ortalaması ve standart sapması hesaplandı.

$$\text{Analiz Eşiği} = *EBPYO + (3 \times **EBPYS)$$

*EBPYO: En büyük pik yükseklikleri ortalaması

**EBPYS: En büyük pik yükseklikleri standart sapması

Dinamik Alan

9947A pozitif kontrol örneği (X1) izolatından 9 adet dilüsyon (0,0125 ng/μl, 0.0025 ng/μl, 0.05 ng/μl, 0.125 ng/μl, 0.25 ng/μl, 0.5 ng/μl, 1 ng/μl, 2 ng/μl, 3 ng/μl) hazırlandı ve her dilüsyon için 5'er adet olmak üzere toplam 45 PCR, ABI 9700 PCR cihazında yapıldı. PCR ürünleri ABI 3130 genetik analizör cihazında yürütüldü. Elde edilen pik yüksekliklerinin ortalaması alındı. Daha sonra her bir konsantrasyon grubunda 5'er adet amplifiye örnek bulunduğundan her bir grubun ortalaması alındı ve her bir konsantrasyona karşı pik yüksekliği ortalamasını içeren grafik elde edildi.

Duyarlılık Çalışması (LOQ)

Dinamik alan çalışmasında kullanılan PCR ürünlerine ait yürütmeler en düşük konsantrasyondan yukarıya doğru incelendi ve tam profil elde edilen en düşük iki konsantrasyon için duyarlılık belirlendi. Bunun için her konsantrasyon grubunda yer alan 5'er adet örnekte tespit edilen her bir alelin pik yüksekliklerinin ortalaması ve standart sapması bulundu. Elde edilen ortalama ve standart sapma aşağıdaki formüle uygulanarak her bir alel için bir değer elde edildi.

Pik yükseklikleri ortalaması – (3x pik yükseklikleri standart sapması)

LOQ= 10X Standart Sapma

Stokastik Eşik Çalışması

Amplifiye edilip çoğaltılarak tiplendirilen örneklerde heterozigot lokuslar için alel pik yüksekliklerinin birbirine oranı bulundu. Bunun için küçük pik, büyük pik yüksekliğine bölündü ve 100 ile çarpıldı. Valide edilen kitin önerdiği ve duyarlılık sonucu elde edilen 0.05 ng/μl, 0.1 ng/μl, 0.25 ng/μl ve 0.5 ng/μl DNA konsantrasyonuna sahip örneklerin kardeş alel pik yükseklikleri oranlarının ortalaması ve standart sapması bulundu, ortalama standart sapmanın üç katı çıkarılarak pik yükseklikleri oranı için bir eşik değeri elde edildi.

Tekrarlanabilirlik, Kesinlik ve Tekrar Üretilirlik

Bu çalışma için iki analist tarafından daha önceden çalışılan 5 örnek ayrı ayrı zamanlarda tekrar çalışıldı ve elektroforegramlar karşılaştırılarak sonuçların uyumlu olup olmadığı belirlendi. Laboratuvarlar arası karşılaştırma için, İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı'na 2012 yılında GEDNAP tarafından gönderilen örneklere ait şahit numuneler kullanıldı. Elde edilen DNA profilleri hem daha önce aynı örneklerle laboratuvarda yapılan hem de GEDNAP tarafından örneklerin açıklanan genotipleri ile karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı.

Yukarıda gerçekleştirilen validasyon aşamasından sonra AmpFℓSTR® İdentifiler kit kullanılarak kontrollü olarak hazırlanan karışmış DNA örneklerinin tiplendirilmesi ve yorumlanması aşamasına geçildi.

3.3 Karışmış DNA Örneklerinin Hazırlanması Ve Analizi

Biyolojik materyal olarak; AmpF ℓ STR® Identifiler™ PCR kitine ait miktarı bilinen 9947A kodlu pozitif kontrol DNA örneği (0.10 ng/ μ l) ve çalışmaya katılmaya rıza gösteren beş kişinin içinden seçilen iki kişiye ait kan örnekleri kullanıldı. DNA izolasyonu ve PCR aşamalarında olası kontaminasyonu tespit etmek ve deney sırasında oluşabilecek hataları gözlemleyip kontrol altına alabilmek amacıyla negatif ve pozitif kontroller kullanılmıştır.

Kontrollü Karışmış DNA Örneklerinin Oluşturulması

Elde edilen DNA izolatları Tablo 13. te görüldüğü şekilde karıştırılarak iki kişiden (E1 kodlu bir erkek ve K1 kodlu bir kadın) oluşan DNA karışımı oluşturuldu. DNA karışım örnekleri konsantrasyonları oluşturulurken mevcut uluslararası literatür ve bu tez kapsamında yapılan validasyon sonucundan yararlanıldı.

Tablo 13. Karışmış DNA örneklerinin oranları ve son konsantrasyonları

Karışım Oranı (E1/K1)	Karışmış DNA Örneklerinin PCR Öncesi Oluşturulan Son Konsantrasyonu	Karışım Oranı (E1/K1)
1:1	1ng/5 μ l	1:1
1:3	1ng/5 μ l	3:1
1:5	1ng/5 μ l	5:1
1:10	1ng/5 μ l	10:1
1:20	1ng/5 μ l	20:1
1:50	1ng/5 μ l	50:1

AmpF ℓ STR® Identifiler™ PCR kiti kullanılarak 12 farklı oranda ve 1ng/5 μ l konsantrasyonunda oluşturulan karışmış DNA örneklerinin amplifikasyonu yapıldı ve ABI3130 (Life Technologies) genetik analizörde yürütüldü. Her konsantrasyondaki karışım örnekleri üçer

kez tekrar edilerek yeniden oluşturuldu ve analiz edildi. Profilleri Genemapper® IDX v.1 programında belirlenen karışım örneklerinin istatistiksel yorumlanması R-Forge yazılımı Forensim paketi LRMix uygulaması kullanılarak gerçekleştirildi. Hipotez oluşturulurken K1 katılımcısı mağdur ve E1 katılımcısı ise şüpheli olarak değerlendirildi.

Verilerin Analizi ve Sonuçların Değerlendirilmesi

STR analizi iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. İlk aşamada ABI 3130 cihazında yürütülen örneklerle Genemapper ID-Xv1. kullanılarak ön değerlendirme yapıldı. Bu ön değerlendirmede karışmış DNA örneklerinin alel isimlendirilmesi, katılımcılara ait alellerin belirlenmesi, gölge piklerin değerlendirilmesi ve katılımcıların karışım oranlarının tahmini yapıldı. Program tarafından otomatik olarak hesaplanan bu parametrelerden gölge pik ve katılımcı oranlarının tahminine ait örnek uygulaması bulgular kısmında 1:10'luk karışım oranında gösterilmiştir. Genemapper ID-X v1. yazılımı tarafından kullanılan söz konusu formüller aşağıda verilmektedir:

- Gölge piklerin yüzdesinin hesaplanması:

$$Gölge\ Pik\% = \frac{N - 4\ pik\ yüksekliği}{Alel\ pik\ yüksekliği} * 100$$

- Karışım oranının hesaplanması:

$$Mx = \frac{\varphi a + \varphi b}{\varphi a + \varphi b + \varphi c + \varphi d}$$

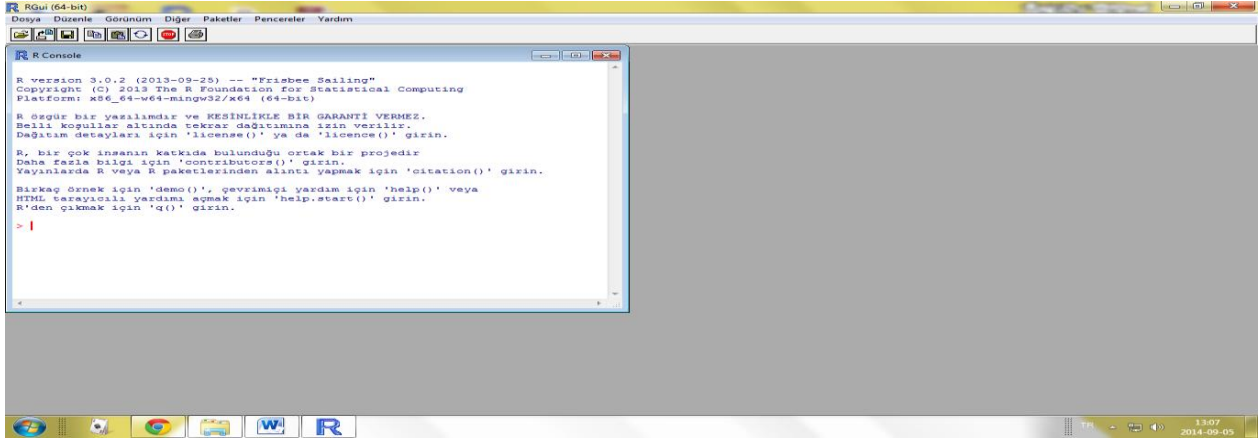
ve

$$Mx = \frac{\varphi a + \varphi b}{\varphi a + \varphi b + \varphi c}$$

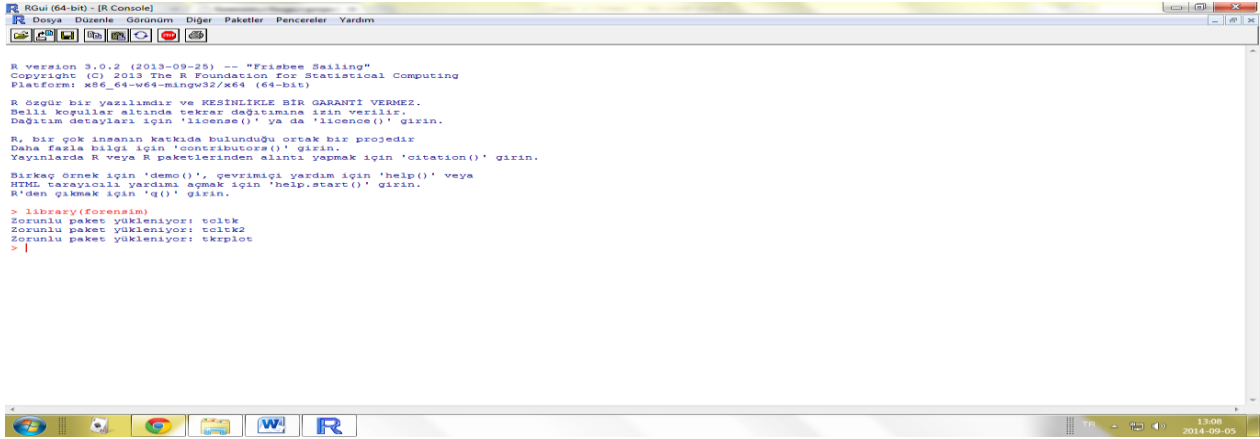
Formülde Mx ilgili lokustaki karışım oranının φa ve φb ilk katılımcıya ait a ve b alellerinin pik yüksekliğini, φc ve φd ise diğer katılımcıya ait c ve d alellerinin pik yüksekliklerini simgelemektedir.

İkinci aşamada tiplendirilen karışım örnekleri R-Forge yazılımı Forensim paketi LRMix uygulaması kullanılarak istatistiksel olarak yorumlandı. (Haned 2011). İstatistiksel analiz işlemi aşamalar şeklinde anlatılmıştır:

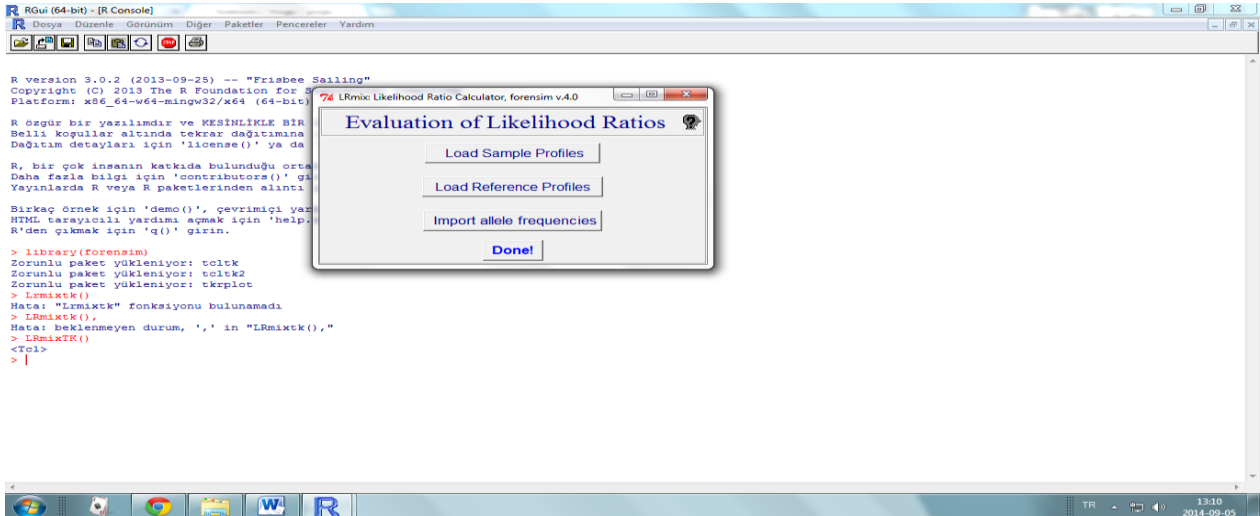
R Project yazılımını yüklü olduğu dizinden program çalıştırılır.



Daha sonra Forensim kitaplığını ">library(forensim)" komutu ile çalıştırılır.



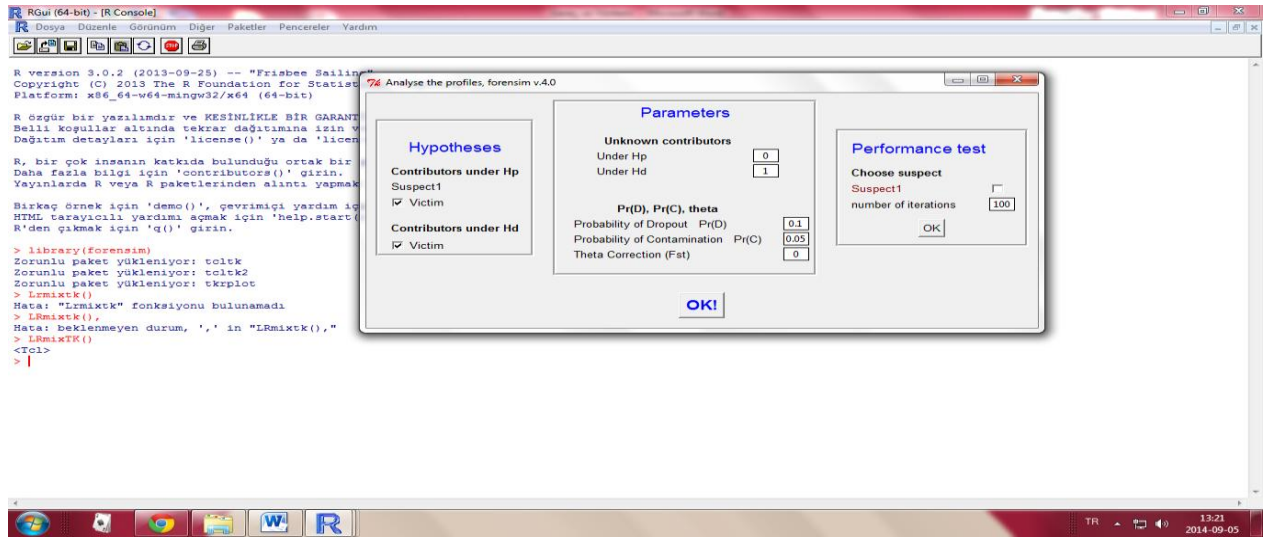
LRmix modülünü çalıştırmak için ">LRmixTK()" komutu kullanıldı.



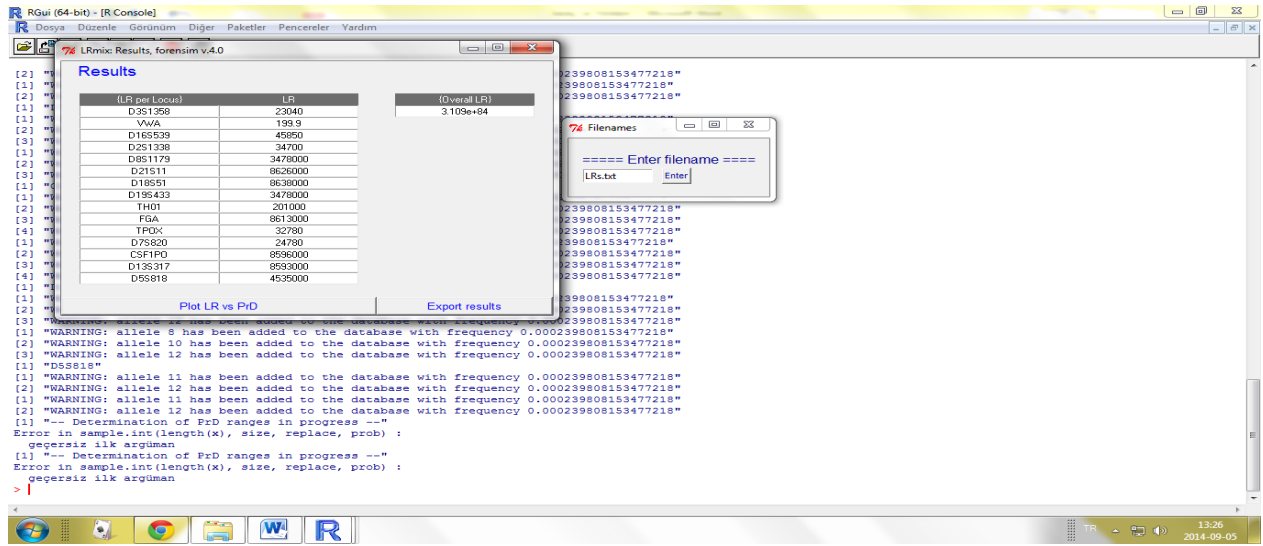
Bilgiler yazılımda yer alan aşağıdaki sekmelere yüklendi:

- “Load Sample profile” yazan sekmeye ilgili karışım örneği profilini,
- “Load Reference profile” yazan sekmeye karışımı oluşturan veya oluşturduğunu düşündüğümüz kişilerin profilleri
- “Import allele frequencies” yazan sekmeye ise ilgili toplumun alel frekansları yüklenir.

Daha sonra açılan sekmede “Hypotheses” kısmından ilgili hipotezi ve “Parameters” kısmından ise değiştirilmek istenen analiz parametreleri ayarlanır. İşlemlerin ardından “OK!” düğmesine tıklanır.



Çıkan “Results” sekmesinden sonuçlar, grafiklerle birlikte kombine ve her lokus için olabilirlik oranları görüntülenir. “Export Results” düğmesine basılarak sonuçların bir çıktısı alınır. “Plot PR vs LR” sekmesi tıklanarak olası alel düşme olasılığı hesaplanır ve sonuçlar değerlendirilerek en doğru olabilirlik oranı belirlenir.



Olabilirlik oranı değeri eğer yüksek basamaklı değerlerde ise sonuç üstel (eksponansiyel) şeklinde verilmektedir. Buradan eksponansiyel formu alınıp MS Office® programları kullanılarak normal basamaklı sayı formuna çevrilebilir.

3.4 ENFSI Pilot Çalışması Ve İspanya Santiago De Compostela Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nden Temin Edilen Olgu Dosyaları

Bu aşamada İspanya Santiago de Compostela Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nden temin edilen karışmış DNA profilleri içeren olgu dosyaları üzerinden ve ENFSI bünyesinde gerçekleşen pilot çalışmaya katılarak R-Forge yazılımı "Forensim" Paketi "LRmix" programı kullanılarak istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. İki adet anonim olgu dosyası, Santiago de Compostela Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsünden temin edilmiş olup, sonuçların kontrolü enstitü sorumluları tarafından gerçekleştirilmiştir. Aynı şekilde ENFSI den temin edilen verilerin analizi yine laboratuvarlar arası pilot çalışmayı düzenleyen kişiler tarafından kontrol edilmiştir. Her iki senaryo bir cinsel tecavüz olayı üzerine kurgulanmış olup, bireyler şüpheli ve mağdur olarak tanımlanmıştır. İlgili toplumun gen sıklıkları düzenleyici kurumlar tarafından temin edilmiştir. Yukarıda bahsedilen tüm olgular bulgular bölümünde ayrı başlıklar altında detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında ilk aşamada kullanılacak DNA tiplendirme yöntemi için validasyon çalışması yapılmıştır. Geçerli kılınan AmpF ℓ STR® Identifiler kiti ile gönüllü kişilerin ve karışım örneklerinin analizi yapıldı. ABI 3130 genetik analizörde değerlendirilen örnekler LRmix modülü kullanılarak istatistiksel değerlendirme yapıldı. Ayrıca ENSFI kapsamında gerçekleştirilen laboratuvarlar arası pilot çalışmaya ait iki adet olgu ve Santiago de Compostela Üniversitesi'nden temin edilen anonim iki olgu üzerinde LRmix modülü kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı.

4.1 ABI 3130 Genetik Analizör Cihazında AmpF ℓ STR® Identifiler kitinin Validasyon Çalışması

Gönüllü beş kişiden alınan kan örnekleri, bir pozitif kontrol örneği ve 2012 yılında GEDNAP tarafından İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarına gönderilen 3 örnek olmak üzere toplam 9 örnek ile validasyon çalışması gerçekleştirildi. Örneklerin DNA miktarları; birinci örneğin (K1 kodlu örnek) 19 ng/ μ l, ikinci örneğin (2 kodlu örnek) 46,5 ng/ μ l; üçüncü örneğin (E1 kodlu örnek) 15,6 ng/ μ l; dördüncü örneğin (E2 kodlu örnek) 23,6 ng/ μ l, beşinci örneğin (E3 kodlu örnek) 22,1 ng/ μ l ve altıncı örneğin ise (X1 kodlu Örnek) 4,8 ng/ μ l olarak belirlendi. GEDNAP örneklerinin DNA miktarları ise A kodlu örnekte 0.5 ng/ μ l, B örnekte 0.62 ng/ μ l ve C örnekte 0,45 ng/ μ l olarak belirlendi.

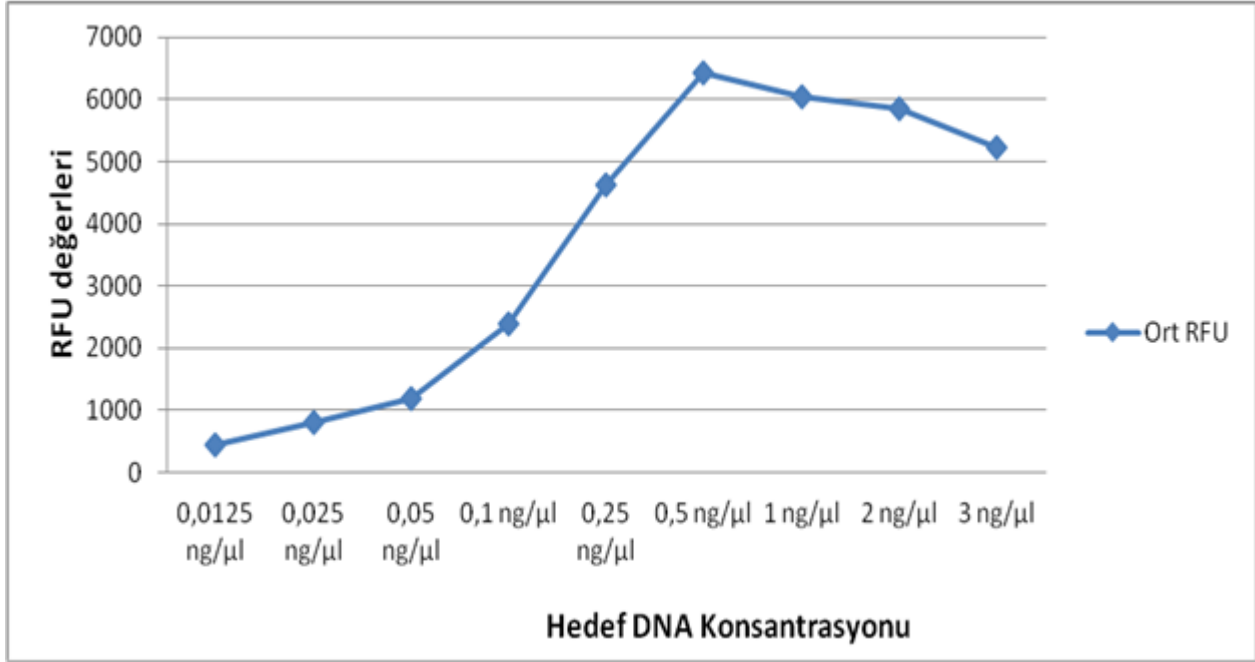
Analiz Eşik Çalışması

Yürütülen 10 negatif kontrol örneğinde gözlenen en yüksek piklerin rfu değerlerinin ortalaması ve standart sapması hesaplandı ve *Analiz Eşiği* = 72.75 rfu olarak belirlendi. Bu rfu değerinin üstündeki pikler gerçek alel olarak değerlendirildi.

Dinamik Alan

9947A pozitif kontrol örneğinin 9 farklı konsantrasyonuna (0.0125 ng/ μ l, 0.0025 ng/ μ l, 0.05 ng/ μ l, 0.125 ng/ μ l, 0.25 ng/ μ l, 0.5 ng/ μ l, 1 ng/ μ l, 2 ng/ μ l, 3 ng/ μ l) karşı pik yüksekliği ortalamasını içeren grafik elde edildi (Grafik 1).

Grafik 1. Pik yükseklikleri değerlerine bağlı DNA konsantrasyonu grafiği



Grafik 1. incelendiğinde ABI 3130 genetik analizörde yürütülen örnekler için 0,5 ng/μl konsantrasyonda lineeritenin durduğu görülmektedir. 1 ng/μl ve üzeri örneklerde fazla DNA konsantrasyonuna bağlı rfu değerlerinde düşme ve piklerde bozulmalar görülmektedir. PCR için gerekli hedef DNA konsantrasyonun 0.05-0.5 ng/μl aralığında olması gerektiği belirlendi.

Duyarlılık Çalışması (LOQ)

Dinamik alan çalışmasında kullanılan ve tam profil elde edilen en düşük iki konsantrasyon grubunda yer alan 5'er adet örnekte tespit edilen her bir alelin pik yüksekliklerinin ortalaması ve standart sapması hesaplanması sonucu elde edilen değerlerin de ortalaması alındı ve kullanılan genetik analizör cihazı için bulunan analiz eşiği değeri ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonuçları Tablo 14. te verilmiştir.

Tablo 14. Konsantrasyona bağlı elde edilen duyarlılık sonucu

DNA Konsantrasyonu	Elde Edilen (rfu Değeri)	Analiz Eşiği (rfu Değeri)	Duyarlılık Sonucu
0.025 ng/μl	45.44	72.75	
0.05 ng/μl	288.46	72.75	0,05 ng/μl

Sonuçlar tam ve güvenilir DNA profilinin 0,05 ng/μl konsantrasyon ile elde edildiğini göstermektedir. Bu konsantrasyon AmpF_{STR}® Identifiler kitin önerdiği konsantrasyon ile uyumludur. LOQ değeri 107.41 rfu olarak tespit edildi.

Stokastik Eşik Çalışması

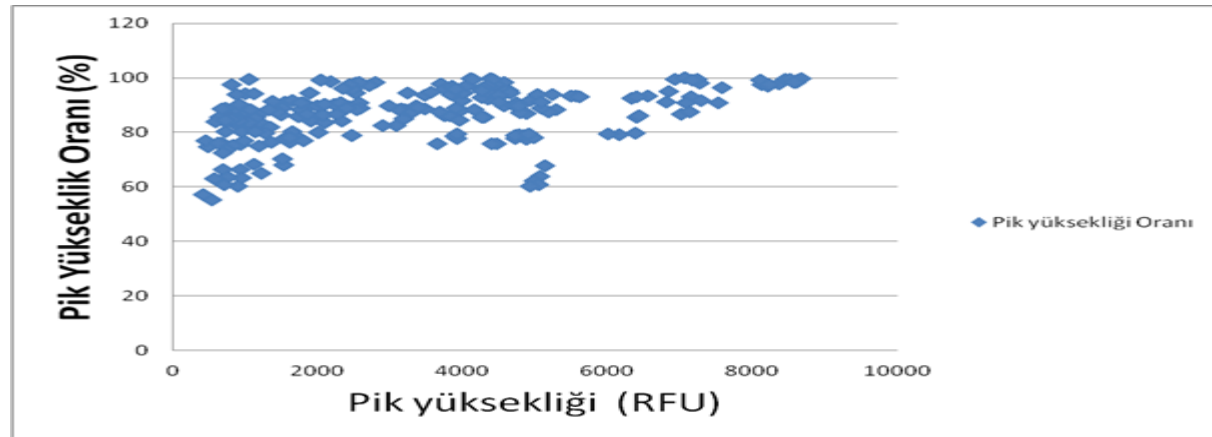
Amplifiye edilip çoğaltılarak tiplendirilen örneklerde heterozigot olan lokusların alel pik yüksekliklerinin birbirine oranı bulundu. Elde edilen kardeş alel pik yükseklikleri oranı eşik değerleri Tablo 15. te verilmiştir.

Tablo 15. Kardeş alel pik yükseklikleri oranı eşik değeri, kardeş alel pik yükseklikleri oranlarının ortalaması, standart sapmaları ve bu değerlere karşılık gelen DNA konsantrasyonları

Hedef DNA Konsantrasyonu	Kardeş Alel Pik Yükseklikleri Oranlarının Ortalaması	Standart Sapma	Kardeş Alel Pik Yüksekliği Oranı Eşik Değeri
0.5 ng/μl	89.333	±3.239	79.616
0.25 ng/μl	89.270	±2.358	82.197
0.1 ng/μl	86.755	±0.994	83.773
0.05 ng/μl	80.377	±1.184	76.826

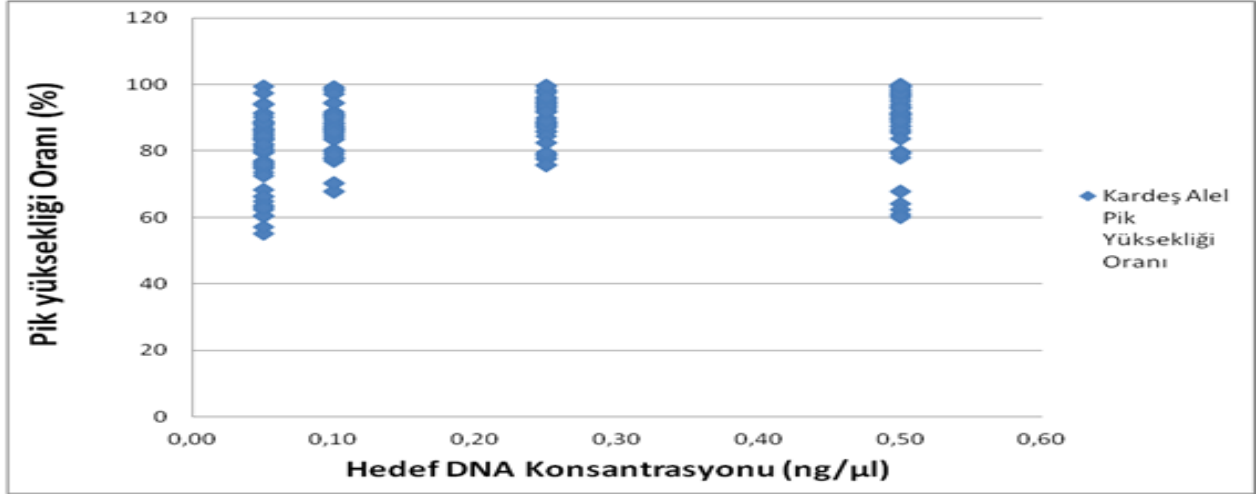
Daha sonra her bir örneğin her bir aleli için bulunan değerler ile bu değerlerin bulunmasında kullanılan küçük pik yükseklikleri kullanılarak Grafik 2. elde edildi.

Grafik 2. Kardeş alel pik yükseklikleri oranına karşı pik yüksekliği



Pik yüksekliği dengesizliğinin belirlenmesi amacıyla, konsantrasyona karşı kardeş alel pik yükseklikleri oranları kullanılarak yeni bir grafik (Grafik 3.) elde edildi.

Grafik 3. Kardeş alel pik yükseklikleri oranına karşı DNA konsantrasyonu



Tekrarlanabilirlik Kesinlik ve Tekrar Üretilebilirlik

Bu çalışma için iki analist tarafından daha önceden çalışılan beş örnek ve pozitif kontrol ayrı ayrı zamanlarda tekrar çalışıldı. Ayrıca laboratuvarlar arası karşılaştırma için, İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı'na 2012 yılında GEDNAP tarafından gönderilen örneklerle ait şahit numuneler kullanılarak. Toplamda 9 örnek için elde edilen elektroforegramlar karşılaştırılarak yapılan değerlendirmede sonuçların uyumlu olduğu belirlendi. Tablo 16' da iki analist tarafından yapılan çalışmaya ait sonuçlar görülmektedir.

Tablo 16. Analistler tarafından yapılan çalışma sonuçları

	Analist 1		Analist 2	
Örnek Adı	Birinci Çalışma	İkinci Çalışma	Birinci Çalışma	İkinci Çalışma
K1	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus
K2	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus
E1	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus
E2	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus
E3	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus
X1 Pozitif Kontrol	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus
GEDNAP A Kodlu Kişi	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus
GEDNAP B Kodlu Kişi	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus
GEDNAP C Kodlu Kişi	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus	16 Lokus

Kesinlik çalışması için çalışılan bütün örneklerin alel pik büyüklüğünün (size'larının) standart sapması hesaplandı. Yürütmeden elde edilen tüm lokuslar için standart sapma değerlerinin ortalaması alındı. Elde edilen standart sapma değerlerin ortalamaları Tablo 17. de gösterilmektedir.

Tablo 17. Tüm lokusların standart sapma değerlerinin ortalamaları.

Lokus	Standart Sapma Ortalaması
D8S1179	0.200
D2S1338	0.311
vWA	0.342
CSF1PO	0.143
TPOX	0.122
D5S818	0.148
D16S539	0.182
D7S820	0.295
D13S317	0.368
AMEL	0.222
D18S51	0.200
D3S1358	0.169
FGA	0.136
D19S433	0.315
D21S11	0.186
TH01	0.200
Toplam Ortalama	0.221

Tabloda görüldüğü gibi tüm lokusların standart sapma ortalamalarından elde edilen ortalama değer 0.221'dir.

Laboratuvarlar arası karşılaştırma için yapılan değerlendirmede tüm sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu belirlendi (Tablo 18).

Tablo 18. İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı'na 2012 yılında GEDNAP tarafından gönderilen örneklerden elde edilen genotipler ve GEDNAP tarafından açıklanan genotipler

LOKUS	ANALİST 1			ANALİST 2			GEDNAP'IN AÇIKLADIĞI SONUÇLAR		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
D8S1179	11-13	9-13	12-14	11-13	9-13	12-14	11-13	9-13	12-14
D21S11	29-31.2	28-28	27-28	29-31.2	28-28	27-28	29-31.2	28-28	27-28
D7S820	9-11	8-12	7-10	9-11	8-12	7-10	9-11	8-12	7-10
CSF1PO	10-10	12-12	10-10	10-10	12-12	10-10	10-10	12-12	10-10
D3S1358	15-17	15-16	16-17	15-17	15-16	16-17	15-17	15-16	16-17
THO1	8-8	6-6	7-8	8-8	6-6	7-8	8-8	6-6	7-8
D13S317	9-11	8-12	11-12	9-11	8-12	11-12	9-11	8-12	11-12
D16S539	9-13	11-13	11-12	9-13	11-13	11-12	9-13	11-13	11-12
D2S1338	17-19	18-21	18-20	17-19	18-21	18-20	17-19	18-21	18-20
D19S433	13-15	15-15	13-14	13-15	15-15	13-14	13-15	15-15	13-14
vWA	16-16	18-18	15-19	16-16	18-18	15-19	16-16	18-18	15-19
TPOX	8-11	10-11	8-11	8-11	10-11	8-11	8-11	10-11	8-11
D18S51	12-14	15-15	13-14	12-14	15-15	13-14	12-14	15-15	13-14
D5S818	10-13	9-12	9-12	10-13	9-12	9-12	10-13	9-12	9-12
FGA	21-21	21-23	22-23	21-21	21-23	22-23	21-21	21-23	22-23
AMEL	X-Y	X-X	X-X	X-Y	X-X	X-X	X-Y	X-X	X-X

4.2 Karışmış DNA Örneklerinin Hazırlanması Ve Analizi

Gönüllülerden toplanan beş örnek ve pozitif kontrol olarak kullanılan 9947A örneği validasyonu gerçekleşmiş yöntemle optimum koşullarda çalışıldı. Aynı örnekler İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, Adli Moleküler Genetik Laboratuvarında görevli analistler tarafından da çalışılarak profillerin doğruluğu teyit edildi. Tablo 20 de bu örneklerin profilleri gösterilmektedir.

Tablo 19. AmpF ℓ STR® Identifiler kiti ile analiz edilen örneklerin genetik profilleri.

	KİŞİLER					
LOKUSLAR	E1	E2	E3	K1	K2	9947A
D8S1179	11-13	14-15	11-12	13-15	12-13	13
D21S11	30-32.2	28-31.2	30-31.2	29-31.2	28-31	30
D7S820	8-10	8-10	10-11	10-12	8-9	10-11
CSF1PO	10-11	12	10-11	9-10	9-11	10-12
D3S1358	15-16	14-15	14-15	17-18	16-17	14-15
THO1	6-9.3	8-9.3	8-9	7-9	6-9.3	8-9.3
D13S317	10-12	9	9	12	12	11
D16S539	11	8-9	9-11	11	12-13	11-12
D2S1338	20	18-23	20-23	23-25	19-23	19-23
D19S433	14-14.2	14	14-15	14-15.2	13-14	14-15
vWA	20	17	20	17	17-18	17-18
TPOX	8-11	11	8	8-11	11	8
D18S51	13-14	10-14	13-14	12-17	13-15	15-19
D5S818	11	9-10	11-13	11-13	11	11
FGA	21-24	22-23	18-21	21	18-23	23-24
AMEL	X-Y	X-Y	X-Y	X	X	X

İki birey arasındaki genetik benzerlikler ve farklılıkların karışım analizinde daha iyi incelenebileceği düşünüldüğünden bu örnekler kullanıldı. Çeşitli literatür taramaları ve yapılan validasyon sonucunda son konsantrasyon 1ng/5 μ l (0.2ng/ μ l) olarak belirlenmiştir. Son karışım konsantrasyonları ve karışım oranları Tablo 20. de görülmektedir.

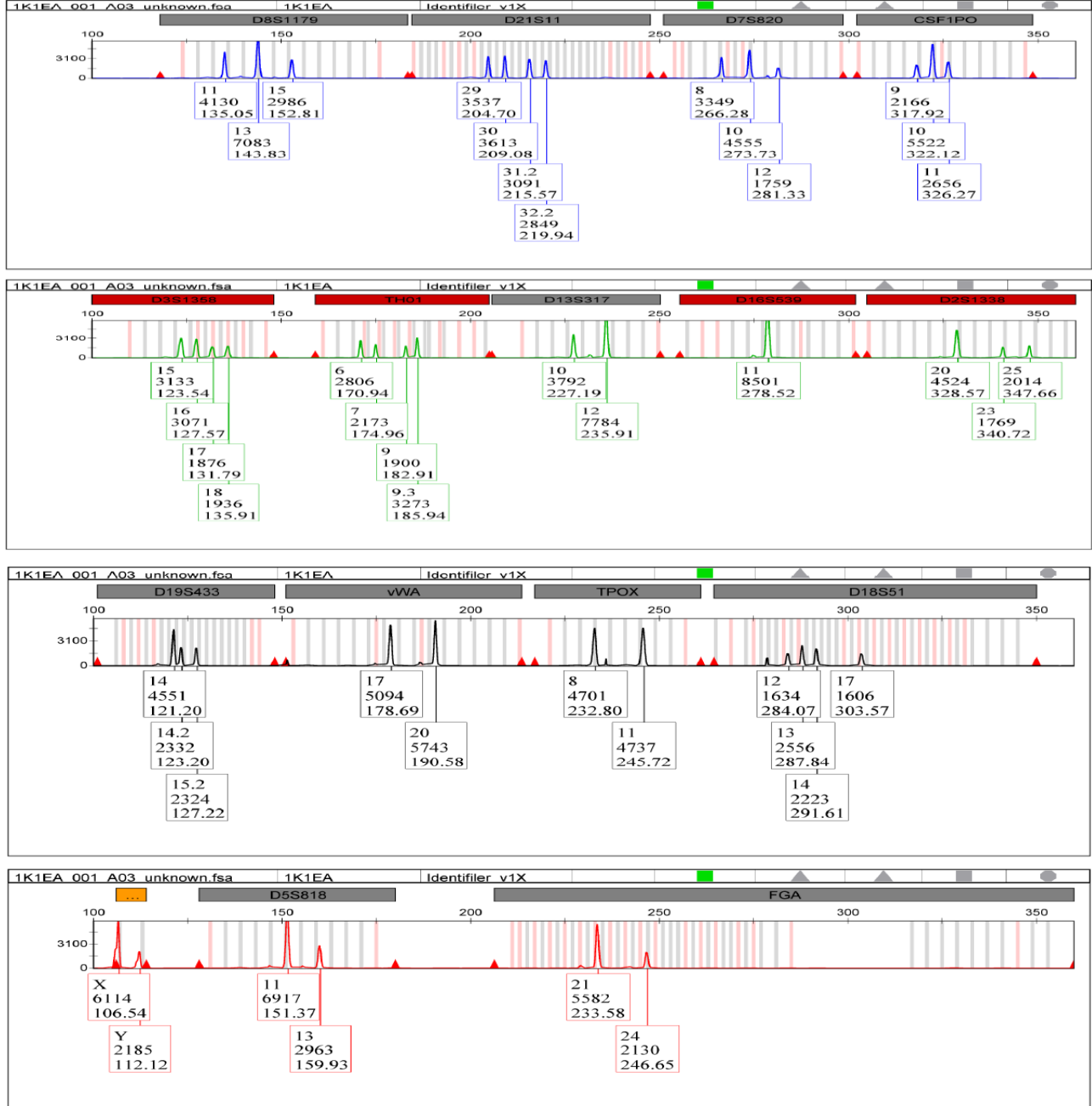
Tablo 20. Karışım örneklerinin oluşturulması

Karışım Oranı	Örneklerin Kodu	Karışmış DNA Örneğinin Son Konsantrasyonu	K1/E1 ve E1/K1 (ng/5µl)
1:1	1K1E	1ng/5µl	0.5/0.5
1:3	1K3E/1E3K	1ng/5µl	0.75/0.25
1:5	1K5E/1E5K	1ng/5µl	0.8/0.2
1:10	1K10E/1E10K	1ng/5µl	0.9/0.1
1:20	1K20E/1E20K	1ng/5µl	0.95/0.05
1:50	1K50E/1E50K	1ng/5µl	0.98/0.02

Analiz sonuçlarının değerlendirmesi sırasında validasyon parametreleri kullanılarak olası stutter (gölge) piklerin değerlendirilmesi yapıldı. Analiz eşiği daha önceden belirlendiği gibi 71.1 rfu olarak alındı. Bu değerin altındaki pikler gürültü olarak değerlendirilip dikkate alınmadı. İstatistiksel LRmix modülü kullanılırken hipotezler oluşturmak gerekir. Hipotez oluşturulurken K1 katılımcısı mağdur ve E1 katılımcısı ise şüpheli olarak değerlendirildi. Karışım örneklerinin değerlendirilmesi her konsantrasyon için ayrı ayrı değerlendirilecektir.

1:1 Oranına Sahip Karışmış DNA Örnekleri

Bu karışım oluşturulurken her iki katılımcıdan aynı oranda DNA miktarı kullanılmıştır. ABI 3130 genetik analizörü tarafından adlandırılan aleller Şekil 10. da görülmektedir. Karışım örnekleri yorumlanırken ilk aşamada E1 ve K1 katılımcı profillerine bakılmaksızın, elde edilen elektroforegramlara göre bir ön değerlendirilme yapıldı.



Şekil 10. 1:1 oranına sahip karışmış DNA örneğinin elektroforegram görüntüsü. Pikler altında belirtilen rakamlar sırası ile alel ismi, pik yüksekliği ve büyüklük (size) değerlerini göstermektedir.

Bu ön değerlendirmede adlandırılan aleller 1:1 oranında üçer tekrarda da aynı sonuçlar elde edildiğinden tek bir elektroforegram görüntüsü üzerinden yorumlama yapmak mümkündür. Genel olarak tüm lokuslar incelendiğinde tüm lokuslar içerisinde en fazla 4 alel gözleendiği için bu örneğin 2 kişinin katılımcı olduğı bir karışım olduğunu söylemek mümkündür. Genemapper® IDX v.1 yazılımı ile gerçekleştirilen profil analizinde AMEL lokuslarında karışım oranı 1:1 olarak belirlenebilirken, diğler lokuslarda minör ve majör katılımcıların oranı belirlenememiştir. Bunun nedeni paylaşılan alellerin varlığı ve bu paylaşılan alellerde katılımcıların oranlarının belirlenememesidir (Tablo 21).

Lokus	Gözlenen Aleller	Katılımcılara Ait Olduğu Düşünülen Genotipler		Tahmini Karışım Oranı
AMEL	X-Y	X-X	X-Y	~ 1:1

Tablo 22. Katılımcı ve karışmış DNA örneklerine ait aleller

Katılımcı 1(K1)	
Alel1	Alel2
X	X
29	31,2
17	18
11	11
9	10
21	21
8	11
7	9
17	17
13	15
12	17
11	13
10	12
12	12
14	15,2
23	25

Olası Alel Düşmesi	
--------------------	--

Profilleri Genemapper® IDX v.1 programında belirlenen karışım örneklerinin istatistiksel yorumlanması R-Forge yazılımı Forensim paketi LRmix uygulaması kullanılarak gerçekleştirildi.

Değerlendirilme yapılırken K1 örneği mağdur ve E1 örneği şüpheli olarak varsayıp hesaplama yapılmıştır. Her üç tekrarda da profiller aynı olmasına rağmen LRmix™ modülünün güvenilirliğinin ve tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesi amacı ile her bir tekrar ayrı ayrı hesaplandı. Her üç tekrarda da tam profil elde edildiğinden iddia (Hp) ve savunma (Hd) hipotezleri :

H_p = Delil profili mağdur ve şüpheliden oluşmaktadır ($E=V+S$).

H_d = Delil profili mağdur ve şüpheli dışında başka bir kişiden oluşmaktadır ($E=V+U$) olarak seçilmiştir.

Burada E harfi delil profilini, V harfi mağduru, S harfi şüpheliyi ve U harfi bilinmeyen kişiyi temsil etmektedir. Hipotez oluşturulduktan sonra olası alel düşmesi aralığı belirlenip en uygun alel düşme olasılığı seçildi. Profilimizde alel düşmesi görülmemesine rağmen en tutucu (konservatif) sonucu almak için en yüksek alel düşme olasılığı alınarak olabirlik oranı değerlendirildi. Son olarak performans testi gerçekleştirilip ilgili popülasyondan rastgele oluşturulan 100 kişinin şüpheli olma olasılığı logaritma 10 tabanında hesaplanıp performans aralığı oluşturuldu. Elde edilen LR değeri bu aralık dışında kalması şüphelinin o profile bulunma olasılığının gücünü göstermektedir. Tablo 23. de görüldüğü gibi performans testi aralığı dışındaki tüm değerler aynıdır. Performans testi sonuçlarının farklı olmasının sebebi ise her uygulamada programın ilgili toplumdan seçilen 100 bireyin her hesaplamada aynı profilleri oluşturmamasından kaynaklanmaktadır. Son durumda LR değeri, LRmix modülü tarafından 4,02E+16 olarak hesaplanmıştır. Bu durumda sonuç ifadesi her iki hipotez için şu şekildedir:

“Şüpheli profilinin delil profilinde bulunma olasılığı, aynı popülasyon içerisinde seçilen herhangi bir kişinin profilinin bulunmasından 40.200.000.000.000.000 kez daha fazladır.”

Tablo 23. 1:1 oranına ait karışım örneklerinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Örnek	Hp/Hd	Olası Alel Düşmesi Aralığı	Seçilen Alel Düşmesi Olasılığı	Son Olabirlik Oranı (LR)	Performans Testi Sonuçları
1:1A	V+S/V+U	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log_{10}^{-32}/^{-10}$
1:1B	V+S/V+U	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log_{10}^{-29}/^{-7}$
1:1C	V+S/V+U	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log_{10}^{-29}/^{-12}$

1:3 ve 3:1 Oranına Sahip Karışmış DNA Örnekleri

1:3 ve 3:1 oranını sağlayacak karışım örnekleri son DNA konsantrasyonları 0.25:0.75ng/5µl ve 0.75:0.25ng/5µl olacak şekilde oluşturuldu..Bu karışıma ait alektroforegram Şekil 11. de görülmektedir.



Şekil 11. 3:1 oranına sahip karışmış DNA örneğinin alektroforegram görüntüsü. Pikler altında belirtilen rakamlar sırası ile alel isimleri, pik yüksekliği ve büyüklük (size) değerlerini göstermektedir.

Bu ön değerlendirmede adlandırılan aleller hem 1:3 hem de 3:1 oranlarında üçer tekrarda da aynı sonuçlar elde edildiğinden tek bir alektroforegram görüntüsü üzerinden yorumlama yapıldı.

Tüm lokuslar incelendiğinde tüm lokuslarda en fazla 4 alel gözleendiği için bu örneğin 2 kişinin katılımcı olduğı bir karışım olduğunu söylemek mümkündür. Genemapper® IDX v.1 yazılımı ile gerçekleştirilen profil analizinde D8S1179, D21S11, TH01, D3S1358, D16S539, CSF1PO ve D18S51 lokuslarında karışım oranı 3:1 olarak belirlenebilirken, diğerk lokuslarda minör ve majör katılımcıların oranı yazılım tarafından belirlenememiştir. Bunun nedeni paylaşılan alellerin varlığı ve bu paylaşılan alellerde katılımcıların oranlarının belirlenememesidir (Tablo 24).

Tablo 24. AMEL, D8S1179, D21S11, TH01, D3S1358, D16S539, CSF1PO ve D18S51 lokuslarında olası majör ve minör katılımcıların değerdendirilmesi

Lokus	Gözlenen Aleller	Tahmin Edilen Majör Genotip	Tahmin Edilen Minör Genotip	Tahmini Karışım Oranı
AMEL	X-Y	X-X	X-Y	-
D21S11	29-30-31.2-32.2	29-31.2	30-32.2	~ 3:1
TH01	6-7-9-9.3	7-9	6-9.3	~ 3:1
D3S1358	15-16-17-18	17-18	15-16	~ 3:1
D18S51	12-13-14-17	12-17	13-14	~ 2:1
D16S539	11-11	11-11	11-11	-
CSF1PO	9-10-11	9-10	10-11	~ 3:1
D8S1179	11-13-15	11-13	13-15	~ 3:1

Genemapper® IDX v.1 yazılımı kullanılarak tahmin edilen alellerin doğruluğunu belirlemek için önceden tiplendirilmiş olan K1 ve E1 profilleriyle karşılaştırıldı. Majör ve minör alellerin Genemapper® IDX v.1 yazılımı ile doğru olarak belirlendiğı tespit edildi. 1:3 oranında E1 örneğı majör durumda iken 3:1 oranında K1 örneğı majör durumdadır. Bu oranlarda katılımcıların tüm alelleri başarı ile elde edilmiştir. Tablo 25. te de her üç tekrarın (A,B,C) hem katılımcıların hem de oluşturulan karışım örneklerine ait profillerin alelleri görölmektedir.

Tablo 25. 1:3 ve 3:1 oranlarında katılımcı ve karışmış DNA örneklerine ait aleller.

	1:3 Oranına Sahip Karışım Örneği (A,B,C)			
	Alel1	Alel2	Alel3	Alel4
AMEL	X	Y		
D21S11	29	30	31.2	32.2
D3S1358	15	16	17	18
D16S539	11			
CSF1PO	9	10	11	
FGA	21	24		
TPOX	8	11		
TH01	6	7	9	9.3
vWA	17	20		
D8S1179	11	13	15	
D18S51	12	13	14	17
D5S818	11	13		
D7S820	8	10	12	
D13S317		10	12	
D19S433	14	15.2	14.2	
D2S1338	20	23	25	

Paylaşılan Alel	10
-----------------	----

Alel eklenmesi	0
----------------	---

Mağdur	
Alel1	Alel2
X	X
29	31,2
17	18
11	11
9	10
21	21
8	11
7	9
17	17
13	15
12	17
11	13
10	12
12	12
14	15.2
23	25

Olası Alel düşmesi	0
--------------------	---

Şüpheli	
Alel1	Alel2
X	Y
30	32.2
15	16
11	11
10	11
21	24
8	11
6	9.3
20	20
11	13
13	14
11	11
8	10
10	12
14	14.2
20	20

Olası Alel Düşmesi	0
--------------------	---

	3:1 Oranına Sahip Karışım Örneği (A,B,C)			
	Alel1	Alel2	Alel3	Alel4
AMEL	X	Y		
D21S11	29	30	31.2	32.2
D3S1358	15	16	17	18
D16S539	11			
CSF1PO	9	10	11	
FGA	21	24		
TPOX	8	11		
TH01	6	7	9	9.3
vWA	17	20		
D8S1179	11	13	15	
D18S51	12	13	14	17
D5S818	11	13		
D7S820	8	10	12	
D13S317		10	12	
D19S433	14	15.2	14.2	
D2S1338	20	23	25	

Paylaşılan Alel	10
-----------------	----

Alel eklenmesi	0
----------------	---

Mağdur	
Alel1	Alel2
X	X
29	31,2
17	18
11	11
9	10
21	21
8	11
7	9
17	17
13	15
12	17
11	13
10	12
12	12
14	15.2
23	25

Olası Alel düşmesi	0
--------------------	---

Şüpheli	
Alel1	Alel2
X	Y
30	32.2
15	16
11	11
10	11
21	24
8	11
6	9.3
20	20
11	13
13	14
11	11
8	10
10	12
14	14.2
20	20

Olası Alel Düşmesi	0
--------------------	---

Profilleri Genemapper® IDX v.1 programında belirlenen karışım örneklerinin istatistiksel yorumlanması R-Forge yazılımı Forensim paketi LRmix uygulaması kullanılarak gerçekleştirildi. 3:1 ve 1:3 oranındaki karışım örneklerinde belirlenen aleller 1:1 oranındaki alellerden farklı olmadığından LRmix modülü ile yapılan istatistiksel hesaplamalar 1:1 ile aynı sonuçları vermiştir. Bununla birlikte oluşturulan savunma ve iddia hipotezleri tam profil elde edildiğinden birbirinin aynısı olarak oluşturulmuştur:

H_p = Delil profili mağdur ve şüpheliden oluşmaktadır ($E=V+S$)

H_d = Delil profili mağdur ve şüpheli dışında başka bir kişiden oluşmaktadır ($E=V+U$)

Son durumda LR değeri, LRmix modülü tarafından 4,02E+16 olarak hesaplanmıştır (Tablo 26). Bu durumda sonuç ifadesi her iki hipotez için şu şekildedir:

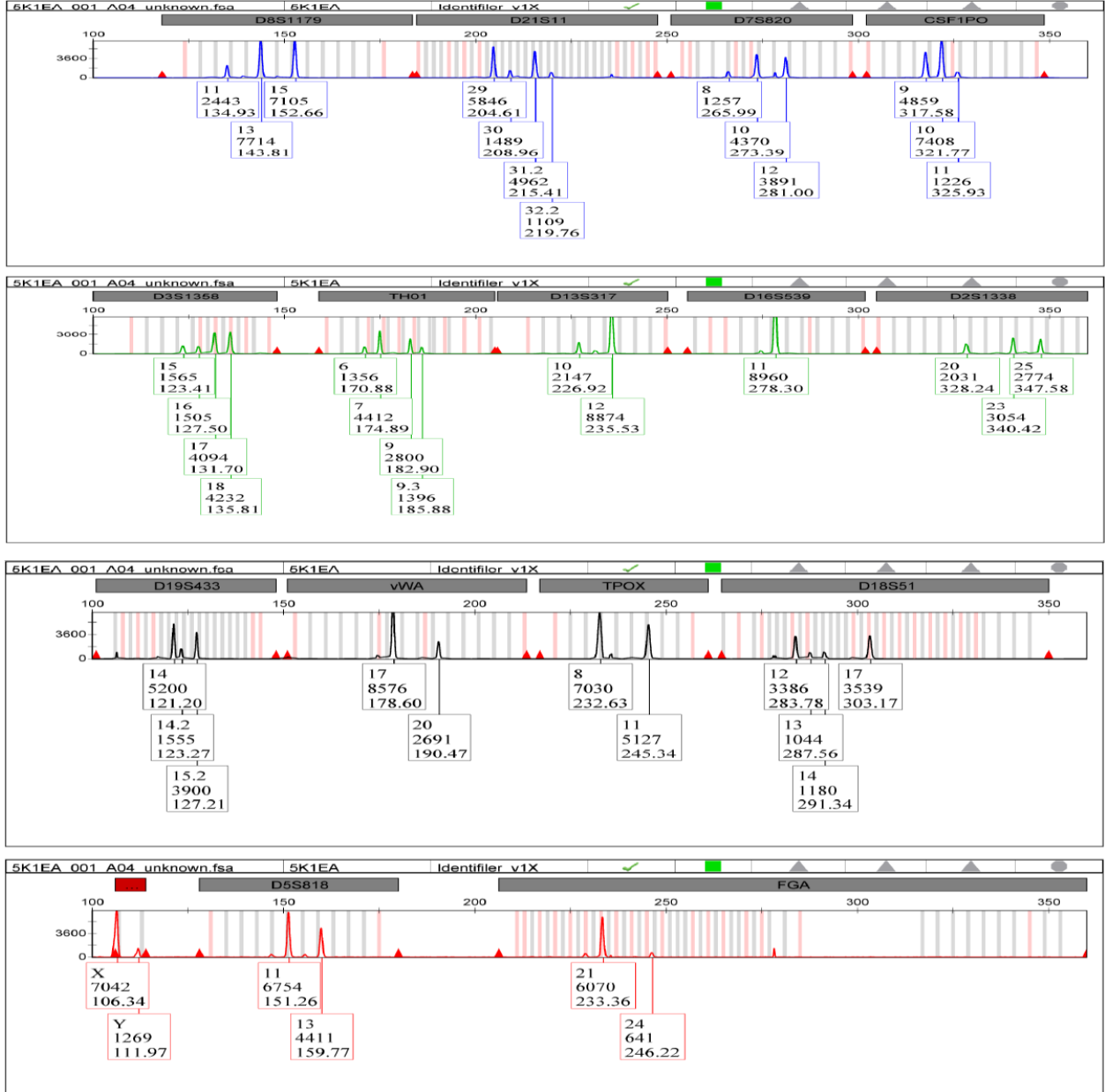
“Şüpheli profilinin delil profilinde bulunma olasılığı, aynı popülasyon içerisinde seçilen herhangi bir kişinin profilinin bulunmasından 40.200.000.000.000.000 kez daha fazladır.”

Tablo 26. 1:3 ve 3:1 oranlarına ait karışım örneklerinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Örnek	H_p/H_d	Olası Alel Düşmesi Aralığı	Seçilen Alel Düşmesi Olasılığı	Son Olabilirlik Oranı (LR)	Performans Testi Sonuçları
1:3A	$V+S/V+U$	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log_{10}^{-32/-10}$
1:3B	$V+S/V+U$	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log_{10}^{-29/-7}$
1:3C	$V+S/V+U$	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log_{10}^{-29/-12}$
3:1A	$V+S/V+U$	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log_{10}^{-29/-8}$
3:1B	$V+S/V+U$	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log_{10}^{-30/-8}$
3:1C	$V+S/V+U$	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log_{10}^{-27/-8}$

1:5 ve 5:1 Oranında Karışmış DNA Örnekleri

Karışmış DNA örneği oluşturulurken oranlar 0.2:0.8 ng/5µl ve 0.8:0.2 ng/5µl şeklinde seçildi. ABI 3130 genetik analizör cihazı Genemapper® IDX v.1 yazılımı tarafından adlandırılan aleller Şekil 12. de görülmektedir. Karışım örnekleri yorumlanırken elde edilen elektroforegramlara göre Genemapper® IDX v.1 yazılımı kullanılarak bir ön değerlendirilme yapıldı.



Şekil 12. 5:1 oranına sahip karışmış DNA örneklerinin elektroforegram görüntüleri. Pikler altında belirtilen rakamları sırası ile alel isimleri, pik yükseklikleri ve büyüklük (size) değerlerini göstermektedir.

Bu ön değerlendirmede adlandırılan aleller hem 1:5 hem de 5:1 oranlarında üçer tekrarda da aynı sonuçlar elde edildi. Bir çok lokusta en fazla 4 alel gözleendiği için bu örneğin 2 kişinin karışımından oluştuğu söylenebilir. Genemapper® IDX v.1 yazılımı ile gerçekleştirilen profil analizinde AMEL, D21S11, TH01, D3S1358, D16S539, CSF1PO ve D18S51 lokuslarında karışım oranı 3:1 olarak belirlenebilirken, diğer lokuslarda minör ve majör katılımcıların oranı belirlenememiştir. Bunun nedeni paylaşılan alellerin varlığı ve bu paylaşılan alellerde katılımcıların oranlarının belirlenememesidir (Tablo 27).

Tablo 27. AMEL, D21S11, TH01, D3S1358, D16S539, CSF1PO ve D18S51 lokuslarında olası majör ve minör katılımcıların değerlendirilmesi

Lokus	Gözlenen Aleller	Tahmin Edilen Majör ve Minör Genotipler		Tahmini Karışım Oranı
AMEL	X-Y	X-X	X-Y	-
D21S11	29-30-31.2-32.2	29-31.2	30-32.2	~ 4:1
TH01	6-7-9-9.3	7-9	6-9.3	~ 3:1
D3S1358	15-16-17-18	17-18	15-16	~ 3:1
D18S51	12-13-14-17	12-17	13-14	~ 3:1
D16S539	11-11	11-11	11-11	-
CSF1PO	9-10-11	9-10	10-11	~4:1

Genemapper® IDX v.1 yazılımı kullanılarak tahmin edilen alellerin doğruluğunu belirlemek için önceden tiplendirilmiş olan K1 ve E1 profilleriyle karşılaştırıldı. Majör ve minör alellerin Genemapper® IDX v.1 yazılımı ile doğru olarak belirlendiği tespit edildi. Tahmin edilen karışım oranı tüm lokuslarda yanlış olarak belirlenmiştir. 1:5 oranında E1 örneği majör durumda iken 5:1 oranında K1 örneği majör durumdadır. Bu oranda katılımcıların tüm alelleri başarı ile tiplendirildi. Tablo 28. de her üç tekrarda (A,B,C) hem katılımcıların hem de oluşturulan karışım örneklerine ait profillerin alelleri görölmektedir

Tablo 28. 1:5 ve 5:1 oranlarında katılımcı ve karışmış DNA örneklerine ait aleller.

	1:5 Oranına Sahip Karışım Örneği (A,B,C)			
	Alel1	Alel2	Alel3	Alel4
AMEL	X	Y		
D21S11	29	30	31.2	32.2
D3S1358	15	16	17	18
D16S539	11			
CSF1PO	9	10	11	
FGA	21	24		
TPOX	8	11		
TH01	6	7	9	9.3
vWA	17	20		
D8S1179	11	13	15	
D18S51	12	13	14	17
D5S818	11	13		
D7S820	8	10	12	
D13S317		10	12	
D19S433	14	15.2	14.2	
D2S1338	20	23	25	

Mağdur	
Alel1	Alel2
X	X
29	31,2
17	18
11	11
9	10
21	21
8	11
7	9
17	17
13	15
12	17
11	13
10	12
12	12
14	15.2
23	25

Şüpheli	
Alel1	Alel2
X	Y
30	32.2
15	16
11	11
10	11
21	24
8	11
6	9.3
20	20
11	13
13	14
11	11
8	10
10	12
14	14.2
20	20

Paylaşılan Alel	10
-----------------	----

Alel eklenmesi	0
----------------	---

Olası Alel düşmesi	0
--------------------	---

Olası Alel Düşmesi	0
--------------------	---

	5:1 Oranına Sahip Karışım Örneği (A,B,C)			
	Alel1	Alel2	Alel3	Alel4
AMEL	X	Y		
D21S11	29	30	31.2	32.2
D3S1358	15	16	17	18
D16S539	11			
CSF1PO	9	10	11	
FGA	21	24		
TPOX	8	11		
TH01	6	7	9	9.3
vWA	17	20		
D8S1179	11	13	15	
D18S51	12	13	14	17
D5S818	11	13		
D7S820	8	10	12	
D13S317		10	12	
D19S433	14	15.2	14.2	
D2S1338	20	23	25	

Mağdur	
Alel1	Alel2
X	X
29	31,2
17	18
11	11
9	10
21	21
8	11
7	9
17	17
13	15
12	17
11	13
10	12
12	12
14	15.2
23	25

Şüpheli	
Alel1	Alel2
X	Y
30	32.2
15	16
11	11
10	11
21	24
8	11
6	9.3
20	20
11	13
13	14
11	11
8	10
10	12
14	14.2
20	20

Paylaşılan Alel	10
-----------------	----

Alel eklenmesi	0
----------------	---

Olası Alel düşmesi	0
--------------------	---

Olası Alel Düşmesi	0
--------------------	---

Profilleri Genemapper® IDX v.1 programında belirlenen karışım örneklerinin istatistiksel yorumlanması R-Forge yazılımı Forensim paketi LRmix uygulaması kullanılarak gerçekleştirildi. 5:1 ve 1:5 oranındaki karışım örneklerinde belirlenen aleller daha önceki oranlarda (1:1, 1:3 ve 3:1) alellerden farklı olmadığından LRmix modülü ile yapılan istatistiksel hesaplamalar aynı sonuçları vermiştir. Bununla birlikte oluşturulan savunma ve iddia hipotezleri tüm aleller belirlendiğinden birbirinin aynısıdır.

H_p = Delil profili mağdur ve şüpheliden oluşmaktadır ($E=V+S$)

H_d = Delil profili mağdur ve şüpheli dışında başka bir kişiden oluşmaktadır ($E=V+U$)

Son durumda LR değeri, LRmix modülü tarafından 4,02E+16 olarak hesaplanmıştır (Tablo 29). Bu durumda sonuç ifadesi her iki hipotez için şu şekildedir:

“Şüpheli profilinin delil profilinde bulunma olasılığı, aynı popülasyon içerisinde seçilen herhangi bir kişinin profilinin bulunmasından 40.200.000.000.000 kez daha fazladır.”

Tablo 29. 1:5 ve 5:1 oranlarına ait karışım örneklerinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Örnek	Hp/Hd	Olası Alel Düşmesi Aralığı	Seçilen Alel Düşmesi Olasılığı	Son Olabilirlik Oranı (LR)	Performans Testi Sonuçları
1:5A	V+S/V+U	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log 10^{-31/-8}$
1:5B	V+S/V+U	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log 10^{-31/-6}$
1:5C	V+S/V+U	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log 10^{-32/-7}$
5:1A	V+S/V+U	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log 10^{-33/-9}$
5:1B	V+S/V+U	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log 10^{-30/-6}$
5:1C	V+S/V+U	0.01-0.16	0.16	4,02E+16	$\log 10^{-27/-9}$

10:1 Oranına sahip Karışmış DNA Örnekleri

1:10 ve 10:1 oranını sağlayacak karışım örnekleri son DNA konsantrasyonları 0.25:0.75ng/5µl ve 0.75:0.25ng/5µl olacak şekilde oluşturulmuştur. ABI 3130 genetik analizör cihazı Genemapper® IDX v.1 yazılımı tarafından adlandırılan aleller Şekil 13. te görülmektedir. Karışım örnekleri yorumlanırken ilk aşamada elde edilen elektroforegramlara göre Genemapper® IDX v.1 yazılımı kullanılarak bir ön değerlendirilme yapıldı.



Şekil 13. 10:1 oranına sahip karışmış DNA örneklerinin elektroforegram görüntüleri. Pikler altında belirtilen rakamları sırası ile alel isimleri, pik yükseklikleri ve büyüklük (size) değerlerini göstermektedir.

Bu ön değerlendirmede adlandırılan aleller 10:1 oranındaki üçer tekrarda da aynı sonuçlar elde edildiğinden tek bir elektroforegram görüntüsü üzerinden yorumlama yapmak mümkündür. Genel olarak tüm lokuslar incelendiğinde bir lokus içinde en fazla 4 alel gözleendiği için bu örneğin 2 kişinin karışımından olduğunu söylemek mümkündür. Genemapper® IDX v.1 yazılımı ile gerçekleştirilen profil analizinde AMEL, TH01, D3S1358, D16S539, FGA CSF1PO ve D18S51 lokuslarında karışım oranı 8:1 olarak belirlenebilirken, diğer lokuslarda minör ve majör katılımcıların oranı belirlenememiştir. Bunun nedeni paylaşılan alellerin varlığı ve bu paylaşılan alellerde katılımcıların oranlarının belirlenememesidir (Tablo 30).

Tablo 30. AMEL, TH01, D3S1358, D16S539, FGA CSF1PO ve D18S51 lokuslarında olası majör ve minör katılımcıların değerlendirilmesi

Lokus	Gözlenen Aleller	Tahmin Edilen Majör ve Minör Genotipler		Tahmini Karışım Oranı
AMEL	X-Y	X-X	X-Y	-
FGA	21	21-21	21-21	-
TH01	6-7-9-9.3	7-9	6-9.3	~ 8:1
D3S1358	15-16-17-18	17-18	15-16	~ 8:1
D18S51	12-13-14-17	12-17	13-14	~ 5:1
D16S539	11-11	11-11	11-11	-
CSF1PO	9-10-11	9-10	10-11	~8:1

Genemapper® IDX v.1 yazılımı kullanılarak tahmin edilen alellerin doğruluğunu belirlemek için önceden tiplendirilmiş olan K1 ve E1 profilleriyle karşılaştırıldı. Majör ve minör aleller Genemapper® IDX v.1 yazılımı ile FGA dışındaki tüm lokuslarda doğru olarak belirlenmesine rağmen karışım oranları tüm lokuslarda hatalı olarak belirlendi. 10:1 oranında K1 örneği majör durumdadır. Bu oranda majör katılımcının tüm alelleri gözlenirken, minör katılımcının D21S11 ve FGA lokuslarında sırasıyla 31.2 ve 24 alelleri olmak üzere iki adet alel düşmesi gözlenmiştir. Tablo 31. de her üç tekrarda (A,B,C) hem katılımcıların hem de oluşturulan karışım örneklerine ait profillerin alelleri görülmektedir.

Tablo 31. 10:1 oranlarında katılımcı ve karışmış DNA örneklerine ait aleller.

	10:1 Oranına Sahip Karışım Örneği (A,B,C)				Mağdur		Şüpheli1	
	Alel1	Alel2	Alel3	Alel4	Alel1	Alel2	Alel1	Alel2
AMEL	X	Y			X	X	X	Y
D21S11	29	30	31.2		29	31.2	30	32.2
D3S1358	15	16	17	18	17	18	15	16
D16S539	11				11	11	11	11
CSF1PO	9	10	11		9	10	10	11
FGA	21				21	21	21	24
TPOX	8	11			8	11	8	11
TH01	6	7	9	9.3	7	9	6	9.3
vWA	17	20			17	17	20	20
D8S1179	11	13	15		13	15	11	13
D18S51	12	13	14	17	12	17	13	14
D5S818	11	13			11	13	11	11
D7S820	8	10	12		10	12	8	10
D13S317		10	12		12	12	10	12
D19S433	14	15.2	14.2		14	15.2	14	14.2
D2S1338	20	23	25		23	25	20	20

Paylaşılan Alel	10	Alel eklenmesi	Olası Alel düşmesi	0	Olası Alel Düşmesi	2
-----------------	----	----------------	--------------------	---	--------------------	---

Profilleri Genemapper® IDX v.1 programında belirlenen karışım örneklerinin istatistiksel yorumlanması R-Forge yazılımı Forensim paketi LRmix uygulaması kullanılarak gerçekleştirildi. Her üç tekrarda profillerin aynı olmasına rağmen LRmix™ modülünün güvenilirliğinin ve tekrar edilebilirliğinin değerlendirilmesi amacı ile her tekrar ayrı ayrı hesaplandı. Son durumda iddia (Hp) ve savunma (Hd) hipotezleri:

H_p = Delil profili mağdur ve şüpheliden oluşmaktadır. ($E=V+S$)

H_d = Delil profili mağdur ve şüpheli dışında başka bir kişiden oluşmaktadır. ($E=V+U$)

olarak seçilmiştir. LR değeri, LRmix modülü tarafından 2.442E+11 olarak hesaplanmıştır (Tablo 32). Bu durumda sonuç ifadesi her iki hipotez için şu şekildedir:

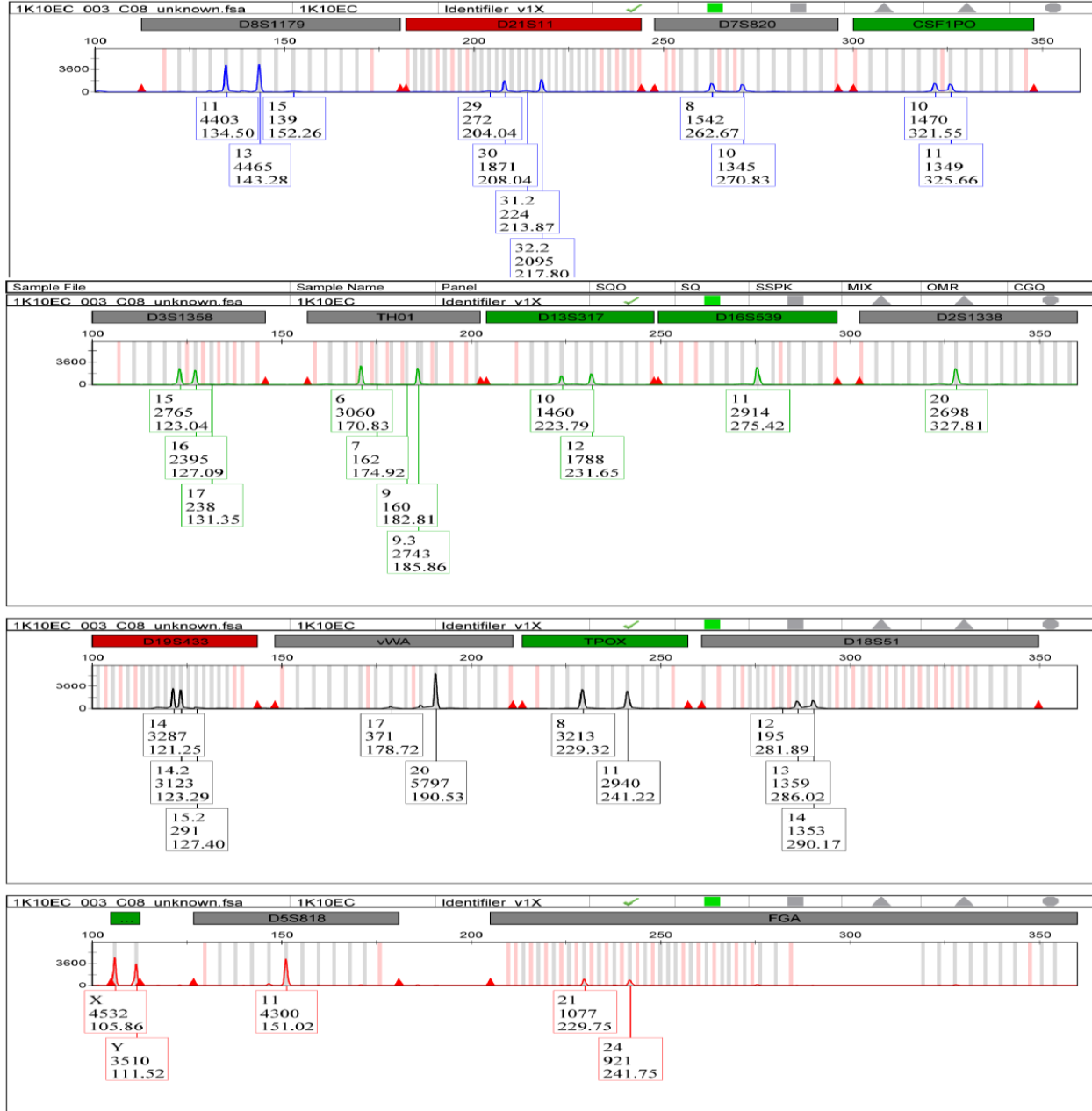
“Şüpheli profilinin delil profilinde bulunma olasılığı, aynı popülasyon içerisinde seçilen herhangi bir kişinin profilinin bulunmasından 244.200.000.000 kez daha fazladır.”

Tablo 32. 10:1 oranına ait karışım örneklerinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Örnek	Hp/Hd	Olası Alel Düşmesi Aralığı	Seçilen Alel Düşmesi Olasılığı	Son Olabilirlik Oranı (LR)	Performans Testi Sonuçları
10:1A	V+S/V+U	0.01-0.22	0.22	2.442E+11	$\log 10^{-28/-7}$
10:1B	V+S/V+U	0.01-0.22	0.22	2.442E+11	$\log 10^{-31/-6}$
10:1C	V+S/V+U	0.01-0.22	0.22	2.442E+11	$\log 10^{-28/-9}$

1:10 Oranına sahip Karışmış DNA Örnekleri

ABI 3130 genetik analizör cihazı tarafından 1:10 oranına sahip örneklerdeki adlandırılan aleller Şekil 15. te görülmektedir. Karışım örnekleri yorumlanırken ilk aşamada E1 ve K1 katılımcı profillerine bakılmaksızın, elde edilen elektroforegramlara göre Genemapper® IDX v.1 bir ön değerlendirilme yapıldı.



Şekil 14. 1:10 oranına sahip karışmış DNA örneklerinin elektroforegram görüntüleri. Pikler altında belirtilen rakamları sırası ile alel,yükseklik ve büyüklük değerlerini göstermektedir.

Bu ön değerlendirmede adlandırılan aleller 1:10 oranındaki üçer tekrarda da aynı sonuçlar elde edildiğinden tek bir elektroforegram görüntüsü üzerinden yorumlama yapmak mümkündür. Genel olarak tüm lokuslar incelendiğinde bir lokus içinde en fazla 4 alel gözleendiği için bu örneğin 2 kişinin katılımcı olduğu bir karışım olduğunu söylemek mümkündür. Genemapper® IDX v.1 yazılımı ile gerçekleştirilen profil analizinde AMEL, D21S11, TH01 ve D16S539 lokuslarında karışım oranı 1:10 olarak belirlenebilirken, diğerk lokuslarda minör ve majör katılımcıların oranı belirlenememiştir. Bunun nedeni paylaşılan alellerin varlığı ve bu paylaşılan alellerde katılımcıların oranlarının belirlenememesidir (Tablo 33).

Tablo 33. AMEL, D21S11, TH01 ve D16S539 lokuslarında olası majör ve minör katılımcıların değerlendirilmesi

Lokus	Gözlenen Aleller	Tahmin Edilen Majör ve Minör Genotipler		Tahmini Karışım Oranı
AMEL	X-Y	X-X	X-Y	-
TH01	6-7-9-9.3	7-9	6-9.3	~ 1:10
D21S11	29-30-31.2-32.2	29-31.2	30-32.2	~ 1:10
D16S539	11-11	11-11	11-11	-

Genemapper® IDX v.1 yazılımı kullanılarak tahmin edilen alellerin doğruluğunu belirlemek için önceden tiplendirilmiş olan K1 ve E1 profilleriyle karşılaştırıldı. Majör ve minör aleller Genemapper® IDX v.1 yazılımı ile dört lokusta doğru olarak belirlendi. Bununla birlikte tahmin edilen karışım oranı dört lokusta doğru olarak tahmin edilmiştir. 1:10 oranında E1 örneği majör durumdadır. Bu oranda majör katılımcının tüm alelleri gözlenirken, minör katılımcının D7S820, CSF1P0, D3S1358, D2S1338 ve D18S51 lokuslarında sırasıyla 12, 9, 18, 23-25 ve 17 alelleri olmak üzere altı adet alel düşmesi gözlenmiştir. Tablo 34. te her üç tekrarın da (A,B,C) hem katılımcıların hem de oluşturulan karışım örneklerine ait profillerin alelleri görölmektedir.

Tablo 34. 1:10 oranında A, B ve C tekrarına ait aleller.

	1:10 Oranına Sahip Karışım Örneği (A,B,C)				Mağdur		Şüpheli1	
	Alel1	Alel2	Alel3	Alel4	Alel1	Alel2	Alel1	Alel2
AMEL	X	Y			X	X	X	Y
D21S11	29	30	31.2	32.2	29	31.2	30	32.2
D3S1358	15	16	17		17	18	15	16
D16S539	11				11	11	11	11
CSF1PO		10	11		9	10	10	11
FGA	21	24			21	21	21	24
TPOX	8	11			8	11	8	11
TH01	6	7	9	9.3	7	9	6	9.3
vWA	17	20			17	17	20	20
D8S1179	11	13	15		13	15	11	13
D18S51	12	13	14		12	17	13	14
D5S818	11	13			11	13	11	11
D7S820	8	10			10	12	8	10
D13S317		10	12		12	12	10	12
D19S433	14	15.2	14.2		14	15.2	14	14.2
D2S1338	20				23	25	20	20

Paylaşılan Alel	10	Alel eklenmesi	Olası Alel düşmesi	6	Olası Alel Düşmesi	0
-----------------	----	----------------	--------------------	---	--------------------	---

Profilleri Genemapper® IDX v.1 programında belirlenen karışım örneklerinin istatistiksel yorumlanması R-Forge yazılımı Forensim paketi LRmix uygulaması kullanılarak gerçekleştirildi. Değerlendirilme yapılırken K1 örneği mağdur ve E1 örneği şüpheli olarak varsayıp hesaplama yapılmıştır. Her üç tekrarda profillerin aynı olmasına rağmen LRmix™ modülünün güvenilirliğinin ve tekrar edilebilirliğinin değerlendirilmesi amacı ile her tekrar ayrı ayrı hesaplandı. Son durumda iddia (Hp) ve savunma (Hd) hipotezleri :

H_p = Delil profili mağdur ve şüpheliden oluşmaktadır. ($E=V+S$)

H_d = Delil profili şüpheli ve bilinmeyen bir kişiden oluşmaktadır. ($E=S+U$)

olarak seçilmiştir. Tablo 35. te görüldüğü gibi performans testi aralığı dışındaki tüm değerler aynıdır. LR değeri, LRmix modülü tarafından 2.442E+11 olarak hesaplanmıştır (Tablo 35). Bu durumda sonuç ifadesi her iki hipotez için şu şekildedir:

“Mağdur profilinin delil profilinde bulunma olasılığı, aynı popülasyon içerisinde seçilen herhangi bir kişinin profilinin bulunmasından 9.670.000.000 kez daha fazladır.”

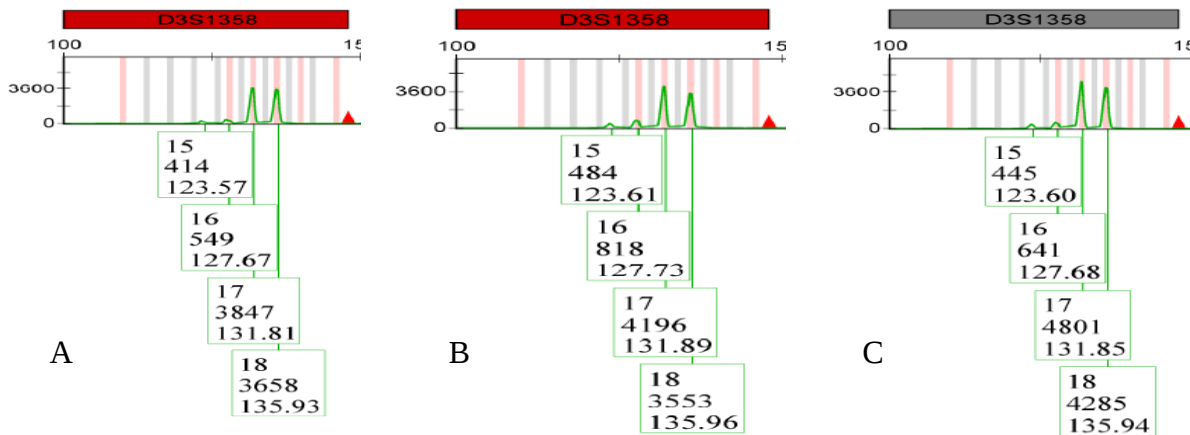
Tablo 35. 1:10 oranına ait karışım örneklerinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Örnek	Hp/Hd	Olası Alel Düşmesi Aralığı	Seçilen Alel Düşmesi Olasılığı	Son Olabilirlik Oranı (LR)	Performans Testi Sonuçları
1:10A	V+S/S+U	0.11-0.37	0.37	9,67E+10	$\log_{10}^{-21/-5}$
1:10B	V+S/S+U	0.11-0.37	0.37	9,67E+10	$\log_{10}^{-27/-8}$
1:10C	V+S/S+U	0.11-0.37	0.37	9,67E+10	$\log_{10}^{-22/-4}$

Genemapper IDX v1. yazılımı ile yapılan ön değerlendirme aşamasında katılımcı oranı, katılımcı profilleri ve gölge piklerin değerlendirilmesi gibi parametreler yazılım tarafından gerçekleştirilmektedir. Program tarafından otomatik olarak hesaplanan bu parametrelerden gölge pik ve katılımcı oranlarının tahminine ait örnek uygulaması bu karışım oranında gösterilmiştir.

1:10 oranına ait karışım örneklerinin her üç tekrarında da (A, B ve C) D3S1358 lokusunda olası gölge piklere rastlandı (Şekil 14). Gölge pik yüzdesinin hesaplanmasında Genemapper IDX v1. yazılımı aşağıdaki formülü kullanmaktadır.

$$\text{Gölge Pik\%} = \frac{N - 4 \text{ pik yüksekliği}}{\text{Alel pik yüksekliği}} * 100$$



Şekil 15. 1:10 oranına ait karışım örneğinde D13S1358 lokusunda görülen pikler.

Görüldüğü üzere her üç tekrarda da 16 numaralı alelde gölge pik pozisyonundadır. A ve C tekrarında 16 numaralı alel hem yerleşimine göre hem de % gölge pik formülüne göre gölge pik olarak değerlendirilmektedir.

$$Gölge\ PikA = \frac{549}{3847} * 100 = \%14$$

$$Gölge\ PikB = \frac{818}{4196} * 100 = \%20$$

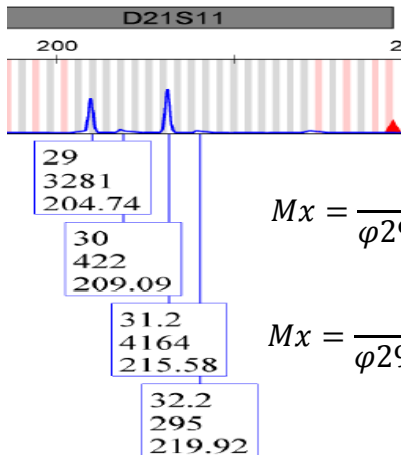
$$Gölge\ PikC = \frac{641}{4801} * 100 = \%13$$

Fakat gölge pik olarak değerlendirilen alel 16, alel 15 ile birlikte heterozigot bir görüntü vermektedir. Ayrıca minör katılımcı profiline bakıldığında 15-16 alellere sahip olduğu görülmektedir. Bu durumda 16 numaralı alellin gölge pik olarak değerlendirilmesi sakıncalıdır. Bununla birlikte B tekrarında bu piklerin % gölge pik oranını sağladığı görülmektedir. Yine 16 numaralı pik validasyon sonucu belirlediğimiz analiz eşik değeri (72.75 rfu) oranından yüksek olduğundan bu alel gerçek bir pik olarak değerlendirilir.

Katılımcılara ait profiller belirlenirken karışım oranından ve stokastik eşik değerinden yararlanmak mümkündür. Herhangi bir lokustaki karışım örneği oranını belirlemek için aşağıdaki formül kullanılmıştır (Clayton ve Triggs 2005);

$$Mx = \frac{\varphi a + \varphi b}{\varphi a + \varphi b + \varphi c + \varphi d}$$

Formülde Mx ilgili lokustaki karışım oranının φa ve φb ilk katılımcıya ait a ve b alellerinin pik yüksekliğini, φc ve φd ise diğer katılımcıya ait c ve d alellerinin pik yüksekliklerini simgelemektedir. Aşağıda 1:10 oranına ait örnek bir elektroforegram görüntüsü ve majör katılımcının karışım oranı (Mx) verilmiştir.



$$Mx = \frac{\varphi a + \varphi b}{\varphi a + \varphi b + \varphi c + \varphi d}$$

$$Mx = \frac{\varphi_{29} + \varphi_{31.2}}{\varphi_{29} + \varphi_{30} + \varphi_{31.2} + \varphi_{32.2}} = \frac{3281 + 4164}{3281 + 422 + 4164 + 295} = 0,91$$

$$Mx = \frac{\varphi_{30} + \varphi_{32.2}}{\varphi_{29} + \varphi_{30} + \varphi_{31.2} + \varphi_{32.2}} = \frac{422 + 295}{3281 + 422 + 4164 + 295} = 0,09$$

Görüldüğü üzere karışım örneğindeki oranlar ~1:10'a denk gelmektedir. Bu formül ile sadece karışım oranı değil aynı zamanda aleller arasındaki heterozigot dengesi belirlenerek majör ve minör katılımcıların doğruluğunu da ispatlamaktadır.

Karışım oranı ~1:10'e denk gelmektedir. Karışım örneğinin oranı beklendiği şekilde tespit edilmiştir.

Tablo 36. da örnek olarak 10:1 ve 1:10 oranlarına sahip karışım örneklerinin D21S11 lokusundaki tüm olası alel kombinasyonları, olası karışım oranları (Mx) ve heterozigot dengesi (Hb) değerleri verilmektedir.

Tablo 36. Karışmış DNA örneğinde katılımcıların ve alellerin belirlenmesi.

Genotipler		Mx (majör/minör katılımcı)	Heterozigot dengesi		Yorum
Majör	Minör		Hb majör	Hb minör	
29-31.2	30-32.2	10:1	0.8	0,7	Mx doğru, Hb doğru
29-30	31.2-32.2	0.8:1	0.12	0.07	Mx yanlış, Hb yanlış
29-32.2	30-31.2	0.8:1	0.09	0.1	Mx yanlış, Hb yanlış
30-32.2	29-31.2	1:10	0.7	0.8	Mx yanlış
31.2-32.2	29-30	1.23:1	0.07	0.12	Mx yanlış, Hb yanlış
30-31.2	29-32.2	1.27:1	0.1	0.09	Mx yanlış, Hb yanlış

Bu durumda ilgili katılımcılara ait aleller 30-32.2 ve 30-31.2 olarak belirlenir.

20:1 Oranın Sahip Karışmış DNA Örnekleri

Karışmış DNA örneği oluşturulurken oranlar 0.05:0.95 ng/5µl ve 0.95:0.05 ng/5µl şeklinde seçildi. ABI 3130 genetik analizörü tarafından 20:1 oranına sahip örneklerdeki adlandırılan aleller Şekil 16. da görülmektedir. Karışım örnekleri yorumlanırken ilk aşamada elde edilen elektroforegramlara göre Genemapper® IDX v.1 bir ön değerlendirilme yapıldı.



Şekil 16. 20:1 oranına sahip karışmış DNA örneklerinin elektroforegram görüntüleri. Pikler altında belirtilen rakamları sırası ile alel, yükseklik ve büyüklük değerlerini göstermektedir.

Bu ön değerlendirmede adlandırılan aleller 20:1 oranındaki üçer tekrarda da aynı sonuçlar elde edildiğinden tek bir elektroforegram görüntüsü üzerinden yorumlama yapmak mümkündür. Genel olarak tüm lokuslar incelendiğinde bir lokusta en fazla 4 alel gözleendiğinden bu örneğin 2 kişinin katılımcı olduğı bir karışım olduğunu söylemek mümkündür. Genemapper® IDX v.1 yazılımı ile gerçekleştirilen profil analizinde AMEL, TH01, D3S1358, D16S539, CSF1PO, FGA, vWA ve D18S51 lokuslarında karışım oranı farklı olarak belirlenebilirken, diğr lokuslarda minör ve majör katılımcıların oranı belirlenememiştir. Bunun nedeni paylaşılan alellerin varlığı ve bu paylaşılan alellerde katılımcıların oranlarının belirlenememesidir (Tablo 37).

Tablo 37. AMEL, TH01, D3S1358, D16S539, FGA ve D18S51 lokuslarında olası majör ve minör katılımcıların değrlendirilmesi

Lokus	Gözlenen Aleller	Tahmin Edilen Majör ve Minör Genotipler		Tahmini Karışım Oranı
AMEL	X-Y	X-X	X-Y	-
FGA	21-24	21-21	21-24	~20:1
TH01	6-7-9-9.3	7-9	6-9.3	~ 8:1
D3S1358	15-16-17-18	17-18	15-16	~ 8:1
D18S51	12-13-14-17	12-17	13-14	~ 10:1
D16S539	11-11	11-11	11-11	-
vWA	17-17	17-17	17-17	-

Genemapper® IDX v.1 yazılımı kullanılarak tahmin edilen alellerin doğruluğunu belirlemek için önceden tiplendirilmiş olan K1 ve E1 profilleriyle karşılaştırıldı. Majör ve minör aleller Genemapper® IDX v.1 yazılımı ile tahmin edilen karışım oranı FGA dışındaki tüm lokuslarda yanlış olarak belirlenmiştir. Karışımın gerçek oranı 20:1 olup K1 majör durumdadır. Bu oranda majör katılımcının tüm alelleri gözlenirken, minör katılımcının D7S820, vWA ve CSF1P0 lokuslarında sırasıyla 8, 11 ve 20 alelleri olmak üzere dört adet alel düşmesi düşmesi gözlenmiştir. Tablo 38. de her üç tekrarın da (A,B,C) hem katılımcıların hem de oluşturulan karışım örneklerine ait profillerin alelleri görölmektedir.

Tablo 38. 20:1 oranlarında katılımcı ve karışmış DNA örneklerine ait aleller.

	20:1 Oranına Sahip Karışım Örneği (A,B,C)				Mağdur		Şüpheli1	
	Alel1	Alel2	Alel3	Alel4	Alel1	Alel2	Alel1	Alel2
AMEL	X	Y			X	X	X	Y
D21S11	29	30	31.2	32.2	29	31.2	30	32.2
D3S1358	15	16	17	18	17	18	15	16
D16S539	11				11	11	11	11
CSF1PO	9	10			9	10	10	11
FGA	21	24			21	21	21	24
TPOX	8	11			8	11	8	11
TH01	6	7	9	9.3	7	9	6	9.3
vWA	17				17	17	20	20
D8S1179	11	13	15		13	15	11	13
D18S51	12	13	14	17	12	17	13	14
D5S818	11	13			11	13	11	11
D7S820		10	12		10	12	8	10
D13S317		10	12		12	12	10	12
D19S433	14	15.2	14.2		14	15.2	14	14.2
D2S1338	20				23	25	20	20

Paylaşılan Alel	10	Alel eklenmesi	Olası Alel düşmesi	0	Olası Alel Düşmesi	4
-----------------	----	----------------	--------------------	---	--------------------	---

Profilleri Genemapper® IDX v.1 programında belirlenen karışım örneklerinin istatistiksel yorumlanması R-Forge yazılımı Forensim paketi LRmix uygulaması kullanılarak gerçekleştirildi. Son durumda iddia (Hp) ve savunma (Hd) hipotezleri :

H_p = Delil profili mağdur ve şüpheliden oluşmaktadır. ($E=V+S$)

H_d = Delil profili mağdur ve şüpheli dışında başka bir kişiden oluşmaktadır. ($E=V+U$)

olarak seçilmiştir. LR değeri, LRmix modülü tarafından 1.514e+09 olarak hesaplanmıştır (Tablo 39). Bu durumda sonuç ifadesi her iki hipotez için şu şekildedir:

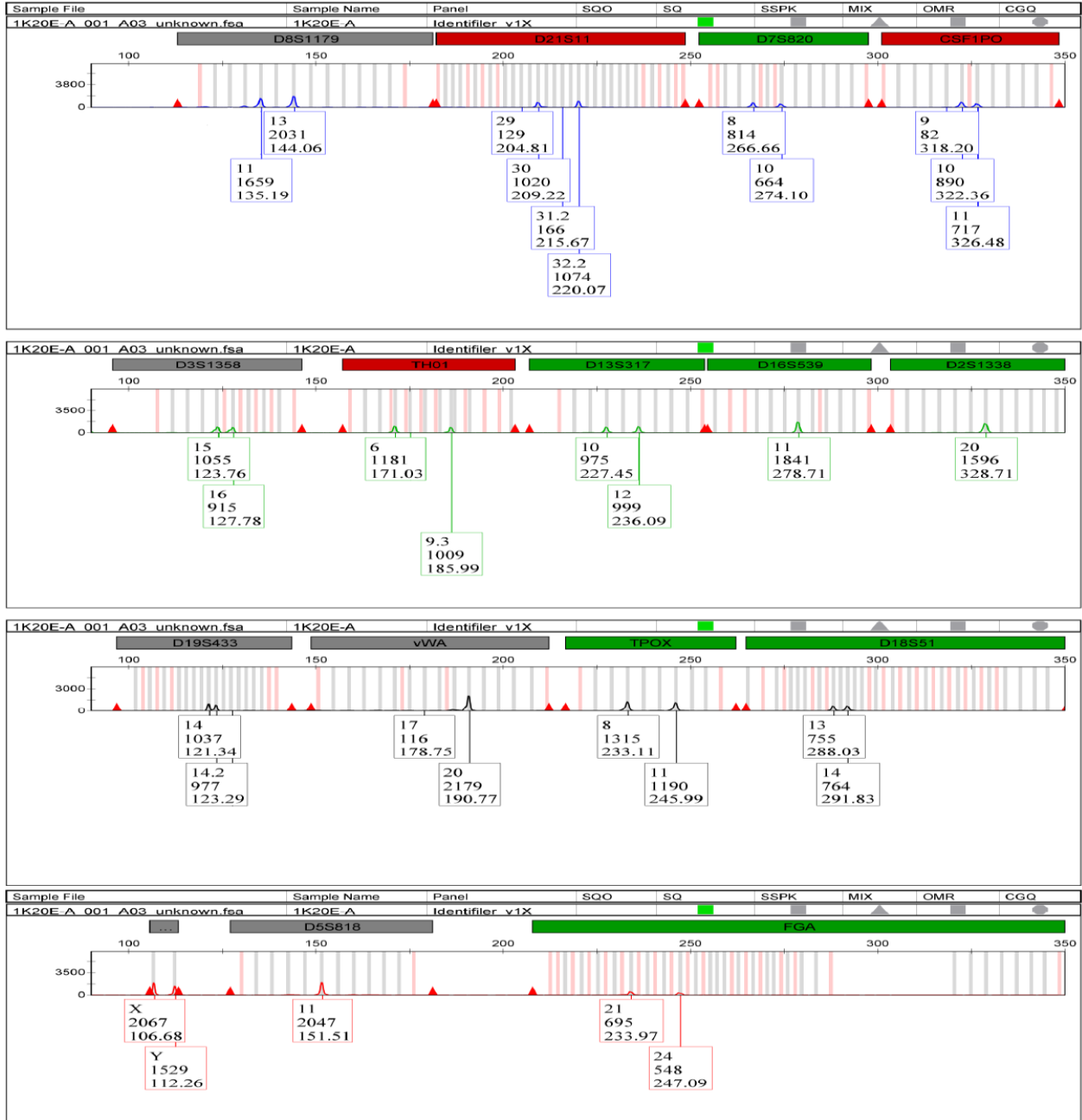
“Şüpheli profilinin delil profilinde bulunma olasılığı, aynı popülasyon içerisinde seçilen herhangi bir kişinin profilinin bulunmasından 1.514.000.000 kez daha fazladır.”

Tablo 39. 20:1 oranına ait karışım örneklerinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Örnek	Hp/Hd	Olası Alel Düşmesi Aralığı	Seçilen Alel Düşmesi Olasılığı	Son Olabilirlik Oranı (LR)	Performans Testi Sonuçları
20:1A	V+S/V+U	0.062-0.32	0.062	1.514e+09	$\log_{10}^{-28/-8}$
20:1B	V+S/V+U	0.062-0.32	0.062	1.514e+09	$\log_{10}^{-31/-8}$
20:1C	V+S/V+U	0.062-0.32	0.062	1.514e+09	$\log_{10}^{-29/-11}$

1:20 Oranın Sahip Karışmış DNA Örnekleri

ABI 3130 genetik analizörü tarafından 1:20 oranına sahip örneklerdeki adlandırılan aleller Şekil 17. de görülmektedir. Karışım örnekleri yorumlanırken ilk aşamada E1 ve K1 katılımcı profillerine bakılmaksızın, elde edilen elektroforegramlara göre Genemapper® IDX v.1 bir ön değerlendirilme yapıldı.



Şekil 17. 1:20 oranına sahip karışmış DNA örneklerinin elektroforegram görüntüleri. Pikler altında belirtilen rakamları sırası ile alel, yükseklik ve büyüklük (size) değerlerini göstermektedir.

Bu ön değerlendirmede adlandırılan aleller 1:20 oranındaki üçer tekrarda da aynı sonuçlar elde edildiğinden tek bir elektroforegram görüntüsü üzerinden yorumlama yapmak mümkündür. Genel olarak tüm lokuslar incelendiğinde bir lokusta en fazla 4 alel gözleendiği için bu örneğın 2 kişinin katılımcı olduğu bir karışım olduğunu söylemek mümkündür. Genemapper® IDX v.1 yazılımı ile gerçekleştirilen profil analizinde AMEL, D21S11, CSF1P0 ve D16S539 lokuslarında karışım oranı 1:10 olarak belirlenebilirken, diğler lokuslarda minör ve majör katılımcıların oranı belirlenememiştir. Bunun nedeni paylaşılan alellerin varlığı ve bu paylaşılan alellerde katılımcıların oranlarının belirlenememesidir (Tablo 40).

Tablo 40. AMEL, D21S11, CSF1P0 ve D16S539 lokuslarında olası majör ve minör katılımcıların değerlendirilmesi

Lokus	Gözlenen Aleller	Tahmin Edilen Majör ve Minör Genotipler		Tahmini Karışım Oranı
AMEL	X-Y	X-X	X-Y	-
D21S11	29-30-31.2-32.2	30-32.2	29-31.2	~10:1
CSF1P0	9-10-11	10-11	9-10	~ 10:1
D16S539	11-11	11-11	11-11	-

Genemapper® IDX v.1 yazılımı kullanılarak tahmin edilen alellerin doğruluğunu belirlemek için önceden tiplendirilmiş olan K1 ve E1 profilleriyle karşılaştırıldı. Majör ve minör aleller Genemapper® IDX v.1 yazılımı ile 4 lokusta doğru olarak tahmin edilmesine rağmen tüm lokuslarda belirlenen karışım oranı hatalıdır. Karışımın gerçek oranı 20:1 olup K1 majör durumdadır. Bu oranda majör katılımcının tüm alelleri gözlenirken, minör katılımcının minör katılımcının 7 tane lokusunda toplam 11 tane alel kaybı gözlenmiştir. Tablo 41. de her üç tekrarın (A,B,C) hem katılımcıların hem de oluşturulan karışım örneklerine ait profillerin alelleri görölmektedir.

Tablo 41. 1:20 oranlarında katılımcı ve karışmış DNA örneklerine ait aleller.

	1:20 Oranına Sahip Karışım Örneği (A,B,C)				Mağdur		Şüpheli1	
	Alel1	Alel2	Alel3	Alel4	Alel1	Alel2	Alel1	Alel2
AMEL	X	Y			X	X	X	Y
D21S11	29	30	31.2	32.2	29	31.2	30	32.2
D3S1358	15	16			17	18	15	16
D16S539	11				11	11	11	11
CSF1PO		10	11		9	10	10	11
FGA	21	24			21	21	21	24
TPOX	8	11			8	11	8	11
TH01	6			9.3	7	9	6	9.3
vWA	17	20			17	17	20	20
D8S1179	11	13	15		13	15	11	11
D18S51		13	14		12	17	13	14
D5S818	11				11	13	11	11
D7S820	8	10			10	12	8	10
D13S317		10	12		12	12	10	12
D19S433	14	15.2	14.2		14	15.2	14	14.2
D2S1338	20				23	25	20	20

Paylaşılan Alel

10

Alel eklenmesi

Olası Alel düşmesi

11

Olası Alel Düşmesi

0

Profilleri Genemapper® IDX v.1 programında belirlenen karışım örneklerinin istatistiksel yorumlanması R-Forge yazılımı Forensim paketi LRmix uygulaması kullanılarak gerçekleştirildi. Son durumda iddia (Hp) ve savunma (Hd) hipotezleri :

H_p = Delil profili mağdur ve şüpheliden oluşmaktadır. ($E=V+S$)

H_d = Delil profili mağdur ve şüpheli dışında başka bir kişiden oluşmaktadır. ($E=S+U$)

olarak seçilmiştir. LR değeri, LRmix modülü tarafından 0.004271 olarak hesaplanmıştır (Tablo 42). Bu durumda sonuç ifadesi her iki hipotez için şu şekildedir:

“Mağdur profilinin delil profilinde bulunma olasılığı, aynı popülasyon içerisinde seçilen herhangi bir kişinin profilinin bulunmasından 0,004271 kez daha fazladır.”

Tablo 42. 1:20 oranına ait karışım örneklerinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Örnek	Hp/Hd	Olası Alel Düşmesi Aralığı	Seçilen Alel Düşmesi Olasılığı	Son Olabilirlik Oranı (LR)	Performans Testi Sonuçları
1:20A	V+S/S+U	0.22-0.47	0.22	0.004271	$\log_{10}^{-18/-6}$
1:20B	V+S/S+U	0.22-0.47	0.22	0.004271	$\log_{10}^{-12/-8}$
1:20C	V+S/S+U	0.22-0.47	0.22	0.004271	$\log_{10}^{-12/-5}$

1:50 ve 50:1 Oranındaki Karışmış DNA Örnekleri

Karışmış DNA örneği oluşturulurken oranlar 0.02:0.98 ng/5µl ve 0.98:0.02 ng/5µl şeklinde seçildi. Tüm 6 tekrarda da minör katılımcıların tamamen kaybı yaşandığından dolayı 1:50 oranındaki üç örnekte sadece majör durumda şüpheli (E1) ve 50:1 oranındaki örneklerde ise sadece majör durumda olan mağdur (K1) profili elde edilmiştir. Bu durumda herhangi bir istatistiksel değerlendirme yapmak mümkün değildir. Tablo 43. te bu örneklerle ait aleller görülmektedir.

Tablo 43. 1:50 ve 50:1 oranındaki örneklerine ait aleller

DNA LOKUSLARI	1: 50 Oranındaki Karışmış DNA Örnekleri (Şüpheli Profili)			50: 1 Oranındaki Karışmış DNA Örnekleri (Mağdur Profili)		
	A	B	C	A	B	C
D8S1179	11-13	11-13	11-13	13-15	13-15	13-15
D21S11	29-31.2	29-31.2	29-31.2	29-31.2	29-31.2	29-31.2
D7S820	9-11	9-11	9-11	10-12	10-12	10-12
CSF1PO	10-10	10-10	10-10	9-10	9-10	9-10
D3S1358	15-17	15-17	15-17	17-18	17-18	17-18
THO1	8-8	8-8	8-8	7-9	7-9	7-9
D13S317	9-11	9-11	9-11	12	12	12
D16S539	9-13	9-13	9-13	11	11	11
D2S1338	17-19	17-19	17-19	23-25	23-25	23-25
D19S433	13-15	13-15	13-15	14-15.2	14-15.2	14-15.2
vWA	16-16	16-16	16-16	17	17	17
TPOX	8-11	8-11	8-11	8-11	8-11	8-11
D18S51	12-14	12-14	12-14	12-17	12-17	12-17
D5S818	10-13	10-13	10-13	11-13	11-13	11-13
FGA	21-21	21-21	21-21	21	21	21
AMEL	X-Y	X-Y	X-Y	X	X	X

Çalışmamızda oluşturulan karışmış DNA örneklerinden bazı oranlarda alel düşmesi gözlemlendi. Tablo 44. te tüm karışım örneklerinde gözlenen alel düşmesi sayılarını ve buna paralel olarak oluşan LR değerleri görülmektedir.

Tablo 44. Oluşturulan tüm karışım oranlarında gözlenen alel düşmesi sayısı ve LR değeri

Karışım Örneği Oranı	Gözlenen Alel Düşmesi	Olası Alel Düşmesi Aralığı	LR Değeri
1:1 (A,B,C)	Alel Düşmesi Yok	0.01-0.16	4,02E+16
1:3 (A,B,C)	Alel Düşmesi Yok	0.01-0.16	4,02E+16
3:1 (A,B,C)	Alel Düşmesi Yok	0.01-0.16	4,02E+16
1:5 (A,B,C)	Alel Düşmesi Yok	0.01-0.16	4,02E+16
5:1 (A,B,C)	Alel Düşmesi Yok	0.01-0.16	4,02E+16
1:10 (A,B,C)	6	0.11-0.37	9,67E+10
10:1 (A,B,C)	2	0.01-0.22	2.442E+11
1:20 (A,B,C)	11	0.22-0.47	0.004271
20:1 (A,B,C)	4	0.062-0.32	1.514e+09
1:50 (A,B,C)	Tüm minör katılımcı alelleri	-	-
50:1 (A,B,C)	Tüm minör katılımcı alelleri	-	-

4.3 ENFSI Bünyesinde Gerçekleşen Karışım Yorumlama Pilot Çalışması

ENFSI tarafından Prof. Dr. Gill önderliğinde yapılan çalışma, karışım örneklerinin Avrupa laboratuvarları tarafından değerlendirilme yöntemleri ve oluşabilecek olası sorunlara dikkat çekmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada olgu hikayelerini içeren iki dosya gönderilmiştir. Kullanılmış olan standardizasyon parametreleri aşağıdaki gibidir:

- Eğer değerlendirme yönteminizde alel düşmesi olasılığı kullanırsanız başlangıç değerini 0.05 olarak kullanın.
- Örnekleri analiz eden laboratuvar için analiz eşiği ve stokastik limit;
 - İdentifiler kiti için: LOD=100rfu; stokastik limit = 300rfu
 - NGMSE kiti için: LOD=50rfu; stokastik limit = 200rfu'dir.

Birinci olguda olay şu şekilde kısaca özetlenmektedir:

İspanya'nın Madrid şehrinde sokakta bir adam bıçaklanmıştır. Otopsi sırasında mağdurun tırnak altından biyolojik kalıntılar toplanmıştır. Bu örneğe yapılan DNA analizi sonucunda birden fazla kişinin profiline rastlanmıştır. Mahkeme sonuçları, incelemek üzere laboratuvarınıza gönderir ve bu örnekte şüphelinin varlığını tespit edip edemeyeceğiniz sorgulanmaktadır. Hem mağdur hem de şüpheliye ait profiller size mahkeme tarafından sağlanmıştır. Populasyon datası olarak Garcia ve ark. 2012 yılında gerçekleştirdiği çalışmayı kullanmanız istenmektedir. Tablo 45. te şüpheli mağdur ve karışım örneklerinin profilleri gösterilmektedir.

Tablo 45. Birinci olgunun şüpheli mağdur ve karışım örneğine ait aleller.

	Karışım Egzersizi 1				Mağdur		Şüpheli	
	Alel1	Alel2	Alel3	Alel4	Alel1	Alel2	Alel1	Alel2
AMEL	X	Y			X	Y	X	Y
D21S11	28	29	30	32.2	28	32.2	29	30
D3S1358	14	16	17	18	16	18	14	17
D16S539	8	11			8	11	11	11
CSF1PO	10	11	12		11	12	10	12
FGA	21	22			21	22	21	21
TPOX	8				8	8	8	12
TH01	6	7	9.3		7	9.3	6	9.3
vWA	15	17	18		15	17	17	18
D8S1179	9	13	14		13	14	9	13
D18S51	11	12	16	17	12	16	11	17
D5S818	10	11	12	13	11	12	10	13
D7S820	9	11			9	9	11	11
D13S317	9	10	11		9	9	10	11
D19S433	13	14	15		15	15	13	14
D2S1338	17	18	19	20	18	19	17	20

Paylaşılan Alel	7	Alel eklenmesi	0	Olası Alel düşmesi	0	Olası Alel Düşmesi	1
-----------------	---	----------------	---	--------------------	---	--------------------	---

Tablo 45. te görüldüğü üzere elde edilen delil profilinde mağdura ait tüm aleller ve şüpheliye ait bir alel (TPOX lokusu 12. alel) dışındaki tüm aleller tespit edilmiştir. Bu durumda iddia (H_p) ve savunma (H_d) hipotezleri mahkemenin isteği göz önünde bulundurularak aşağıdaki hipotezler oluşturulmuştur:

- H_p = Delil profili mağdur ve şüpheliden oluşmaktadır. ($E=V+S$)

H_d = Delil profili mağdur ve şüpheli dışında başka bir kişiden oluşmaktadır. ($E=V+U$)

Burada E harfi delil profilini, V harfi mağduru, S harfi şüpheliyi ve U harfi bilinmeyen kişiyi temsil etmektedir. Hipotez oluşturulduktan sonra olası alel düşmesi aralığı belirlenip en uygun

Tablo 47. İkinci olgunun şüpheli mağdur ve karışım örneğine ait aleller.

	Karışım Egzersizi 2				Mağdur		Şüpheli	
	Alel1	Alel2	Alel3	Alel4	Alel1	Alel2	Alel1	Alel2
D10S1248	14	15	16		14	16	14	15
VWA	15	16			15	16	16	16
D16S539	9	10	12		12	14	9	10
D2S1338	16	20			20	21	16	20
D8S1179	11	13	15		15	15	11	13
D21S11	31	31.2	33.2		31.2	33.2	31	31.2
D18S51	12	14			12	15	12	14
D22S1045	11	15	16		11	15	15	16
D19S433	14	16	16.2		16	16.2	14	16
TH01	9.3				9	9.3	9.3	9.3
FGA	20	21	22	23	22	23	20	21
D2S441	10	11	11.3	14	10	14	11	11.3
D3S1358	14	15	18		14	15	15	18
D1S1656	11	12	14	17.3	11	14	12	17.3
D12S391	17	19			20	23	17	19
SE33	24.2	25.2			17	28.2	24.2	25.2
AMEL	X	Y			X	X	X	Y

Paylaşılan Alel	9	Alel eklenmesi	0	Olası Alel düşmesi	8	Olası Alel Düşmesi	0
-----------------	---	----------------	---	--------------------	---	--------------------	---

Tablo 47. de görüldüğü üzere elde edilen olay yeri profilinde mağdura ait tüm aleller ve şüpheliye ait 8 alel dışındaki tüm aleller tespit edilmiştir. Bu durumda iddia (H_p) ve savunma (H_d) hipotezleri mahkemenin isteği göz önünde bulundurularak aşağıdaki hipotezler oluşturulmuştur:

- H_p = Delil profili mağdur ve şüpheliden oluşmaktadır. ($E=V+S$)
- H_d = Delil profili şüpheli ve mağdur dışında başka bir kişiden oluşmaktadır. ($E=S+U$)

Burada E harfi delil profilini, V harfi mağduru, S harfi şüpheliyi ve U harfi bilinmeyen kişiyi temsil etmektedir. Hipotez oluşturulduktan sonra olası alel düşmesi aralığı belirlenip en uygun alel düşme olasılığı ve buna karşılık gelen en tutucu olabilirlik oranı değeri seçilir. Bu durumda sonuç ifadesi her iki hipotez için şu şekildedir:

“Mağdur profilinin delil profilinde bulunma olasılığı, aynı popülasyon içerisinde seçilen herhangi bir kişinin profilinin bulunmasından 21100000 kez daha fazladır.”

Tablo 48. İlk çalışmadaki karışmış DNA örneğinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Örnek	Hp/Hd	Olası Alel Düşmesi Aralığı	Seçilen Alel Düşmesi Olasılığı	Son Olabilirlik Oranı (LR)	Performans Testi Sonuçları
Karışım Örneği	V+S/S+U	0.062-0.27	0.062	2,11E+07	$\log_{10}^{-35}/^{-10}$

4.4 İspanya Santiago De Compostela Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nden Temin Edilen Olgu Dosyaları

Karışım örneklerinin analizini rutin bir şekilde yapan Santiago De Compostela Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü'ne yapılan kısa süreli eğitim sırasında iki olgu dosyası (ESC 1 ve ESC 2 kodlu) incelenmiştir. Bu olgu dosyaları anonim olarak kullanıldığından elektroforegram görüntüleri sağlanamadı. Olgu dosyalarının profilleri kullanılarak ve referans populasyon datası (Amigo ve ark. 2009) sorumlu personel tarafından temin edilerek örneklerin istatistiksel değerlendirilmesi LRMix uygulaması kullanılarak yapıldı. Yapılan çalışmaların doğruluğu ilgili akademik personel tarafından önceden elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak teyit edildi.

İlk olgu dosyası İspanya' da gerçekleşen bir cinayet olayıdır. Bu olayda, genç bir kadın ölü bulunuyor. Olayın görüntü kayıtları ile şüpheliye 24 saat içerisinde ulaşıyor. Otopside kadının genital sürüntü örneği alınıyor. Mahkeme mağdurdan alınan biyolojik örnekleri, DNA analizi ve değerlendirmesi için Santiago De Compostela Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Adli Genetik laboratuvarına gönderiyor. Mahkeme mağdurdan alınan genital sürüntü örneğinde şüphelinin katılımcı olup olmadığını öğrenmek istiyor. Tablo 49. da şüpheli, mağdur ve delil profili gösterilmektedir.

	ESC 1			
	Alel1	Alel2	Alel3	Alel4
AMEL	X	Y		
D21S11	29	30,2	31	31,2
D3S1358	14	16	17	
D16S539	9	12	14	
CSF1PO	9	11	13	10
FGA	22	23	24	25
TPOX	8	11		
TH01	7	8	9	
vWA	17	18		
D8S1179	10	13	14	
D18S51	16	17	19	15
D5S818	11	12		
D7S820	9	10	8	
D13S317	8	10	12	
D19S433	12	13	14	
D2S1338	17	19	21	

Mağdur	
Alel1	Alel2
X	Y
31	31,2
16	17
9	12
9	13
22	23
8	8
7	8
17	18
13	14
17	19
11	12
9	10
12	12
13	14
19	21

Şüpheli	
Alel1	Alel2
X	Y
29	30,2
14	17
9	14
10	11
24	25
8	11
7	9
17	18
10	14
15	16
11	12
8	9
8	10
12	14
17	19

Paylaşılan Alel	12	Alel eklenmesi	0

Olası Alel düşmesi	0

Olası Alel Düşmesi	0

- H_p = Delil profili mağdur ve şüpheliden oluşmaktadır. ($E=V+S$)
- H_d = Delil profili mağdur ve şüpheli dışında başka bir kişiden oluşmaktadır. ($E=V+U$)

“Şüpheli profilinin delil profilinde bulunma olasılığı, aynı popülasyon içerisinde seçilen herhangi bir kişinin profilinin bulunmasından 8735000000000000 kez daha fazladır.”

Tablo 50. ESC 1 dosyasında karışmış DNA örneğinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Örnek	Hp/Hd	Olası Alel Düşmesi Aralığı	Seçilen Alel Düşmesi Olasılığı	Son Olabilirlik Oranı (LR)	Performans Testi Sonuçları
Karışım Örneği	V+S/V+U	0.062-0.22	0.022	8.735e+15	$\log_{10}^{-85}/^{-43}$

İkinci olgu dosyası, Santiago’ da birden fazla kişinin evli bir kadına cinsel tecavüz etmesi olayıdır. Kadın verdiği ifade de iki kişinin kendisine cinsel tecavüzde bulunduğunu iddia etmiştir. Beden muayenesinde mağdurdan genital sürüntü alınmıştır. Polis 48 saat içerisinde bir şüpheliye ulaşmıştır. Mahkeme mağdurdan genital sürüntü örneğini, şüphelinin ve mağdurun ağız içi sürüntü örneklerini Santiago De Compostela Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Adli Genetik laboratuvarına göndermiştir. Mahkeme bu olayın çoklu bir tecavüz olup olmadığını ve şüphelinin bu olaya karışıp karışmadığını sorgulamaktadır. Tablo 51. de şüpheli, mağdur ve delil profili gösterilmektedir. Tabloya göre şüpheli ve mağdur profillerinde bulunmayan 9 yeni alel eklenmesi ve 1 lokusta (THO1) ise 5 alel tespit edilmiştir. Tüm bu bulgular bize bu olaya karışan kişi sayısının 3 kişi olduğunu göstermektedir.

Tablo 51. ESC 2 dosyasında şüpheli, mağdur ve karışım örneğine ait aleller.

	ESC 2				
	Alel1	Alel2	Alel3	Alel4	Alel5
AMEL	X	Y			
D21S11	28	29	30		
D3S1358	16	17	18		
D16S539	8	11	13		
CSF1PO	9	11	12	13	
FGA	20	21	24		
TPOX	8	9	10	11	
TH01	6	7	9	9.3	10
vWA	14	16	17		
D8S1179	12	14	15	16	
D18S51	12	13	16		
D5S818	11	12	13		
D7S820	8	9	10	11	
D13S317	12	13	14		
D19S433	11	13	14	15	
D2S1338	17	18	23		

Mağdur	
Alel1	Alel2
X	Y
32.2	28
16	17
11	13
11	12
20	24
8	9
7	9.3
16	17
11	16
12	13
11	12
8	10
12	14
11	14
17	23

Şüpheli	
Alel1	Alel2
X	Y
28	30
17	16
8	11
9	11
21	24
8	11
6	10
17	17
14	15
13	16
13	13
10	11
12	14
13	15
18	23

Paylaşılan Alel	13
-----------------	----

Alel eklenmesi	9
----------------	---

Olası Alel düşmesi	2
--------------------	---

Olası Alel Düşmesi	0
--------------------	---

Profilleri Genemapper® IDX v.1 programında belirlenen karışım örneklerinin istatistiksel yorumlanması R-Forge yazılımı Forensim paketi LRmix uygulaması kullanılarak gerçekleştirildi. Bu durumda iddia (H_p) ve savunma(H_d) hipotezleri mahkemenin isteği göz önünde bulundurularak aşağıdaki hipotezler oluşturulmuştur:

- H_p = Delil profili mağdur, şüpheli ve bilinmeyen bir kişiden oluşmaktadır. ($E=V+S+U$)
- H_d = Delil profili mağdur ve şüpheli dışında başka iki kişiden oluşmaktadır. ($E=V+U+U$)

Burada E harfi delil profilini, V harfi mağduru, S harfi şüpheliyi ve U harfi bilinmeyen kişiyi temsil etmektedir. Burada iddia makamı ilk şüphelinin olaya karıştığını söylemektedir. Fakat ikinci şüphelinin profiline ulaşamadığından diğer şüpheli hakkında herhangi bir hipotez oluşturulamamıştır. Bu durumda sonuç ifadesi her iki hipotez için şu şekildedir:

“Mağdur, şüpheli ve bilinmeyen bir kişinin delil profilinde bulunma olasılığı, aynı popülasyon içerisinde seçilen herhangi iki kişinin profilinin bulunmasından 158000000 kez daha fazladır.”

Tablo 52. ESC2 olgu dosyasında karışmış DNA örneğinin yorumlanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Örnek	Hp/Hd	Olası Alel Düşmesi Aralığı	Seçilen Alel Düşmesi Olasılığı	Son Olabilirlik Oranı (LR)	Performans Testi Sonuçları
Karışım Örneği	V+S+U/V+U+U	0.062-0.32	0.062	1,58e+8	$\log 10^{-24}/^{-4}$

Yapılan değerlendirmeler sonucunda şüphelinin kesinlikle delil profilinde bulunduğu kanıtlanmıştır. Daha sonra mahkeme olayın çoklu bir tecavüz olduğundan emin olmak üzere kadının eşinden de biyolojik örnek alıp laboratuvara göndermiştir. Bunun üzerine eklenen 9 yeni alelin kadının eşine ait olduğu ortaya çıkmıştır. Mahkeme bunun üzerine yeniden istatistiksel değerlendirme istemiştir. Tablo 53. te şüpheli, mağdur, mağdur eşinin ve delil profilleri gösterilmektedir.

	ESC 2				
	Alel1	Alel2	Alel3	Alel4	Alel5
AMEL	X	Y			
D21S11	28	29	30		
D3S1358	16	17	18		
D16S539	8	11	13		
CSF1PO	9	11	12	13	
FGA	20	21	24		
TPOX	8	9	10	11	
TH01	6	7	9	9.3	10
vWA	14	16	17		
D8S1179	12	14	15	16	
D18S51	12	13	16		
D5S818	11	12	13		
D7S820	8	9	10	11	
D13S317	12	13	14		
D19S433	11	13	14	15	
D2S1338	17	18	23		

Mağdur	
Alel1	Alel2
X	Y
32.2	28
16	17
11	13
11	12
20	24
8	9
7	9.3
16	17
11	16
12	13
11	12
8	10
12	14
11	14
17	23

Şüpheli1	
Alel1	Alel2
X	Y
28	30
17	16
8	11
9	11
21	24
8	11
6	10
17	17
14	15
13	16
13	13
10	11
12	14
13	15
18	23

Eş	
Alel1	Alel2
X	Y
29	29
17	18
11	11
11	13
21	21
8	10
6	9
14	14
12	15
13	16
11	13
9	11
12	13
15	16
21	23

Paylaşılan Alel

13

Alel eklenmesi

0

Olası Alel düşmesi

2

Olası Alel Düşmesi

0

Olası Alel Düşmesi

2

- H_p = Delil profili mağdur, şüpheli ve mağdurun partnerinden oluşmaktadır. ($E=V+S+P$)
- H_d = Delil profili mağdur ve şüpheli dışında başka bir kişiden oluşmaktadır. ($E=V+S+U$)

şeklinde oluşmaktadır.

“Mağdur, şüpheli ve mağdurun partnerinin delil profilinde bulunma olasılığı, Mağdur, şüpheli ve aynı popülasyon içerisinden seçilen herhangi bir kişinin profilinin bulunmasından 76500000000000 kez daha fazladır.”

Örnek	Hp/Hd	Olası Alel Düşmesi Aralığı	Seçilen Alel Düşmesi Olasılığı	Son Olabilirlik Oranı (LR)	Performans Testi Sonuçları
Karışım Örneği	V+S+P/V+P+U	0.062-0.32	0.062	7,65e+12	$\log_{10}^{-12}/^{-5}$

96

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Olay yerinde ele geçen fiziksel delillerin incelenmesi ve değerlendirilmesi sonucunda olayın faili bulunur. Olay yerinden gelen deliller çoğunlukla birden fazla kişinin DNA'sını içeren karışım örneklerinden oluşur. Karışmış örneklerde birden fazla kişinin olaya karışmış olabileceği olasılığını düşündürür. Bu durumda katılımcıların profillerinin doğru bir şekilde analiz edilebilmesi ve katılımcıların olaya dahil olma olasılıklarının doğru bir şekilde tahmin edilebilmesi çok önemlidir. Söz konusu analizlerin doğru ve güvenilir bir şekilde uygulayabilmeleri için ilgili laboratuvarların uyguladıkları yöntemin geçerliliğini yapmaları gerekir. Adli genetik alanında DNA araştırmalarının başladığı 1980 yılından itibaren, adli laboratuvarlarda kullanılan metotların kalite güvencesi ve standardizasyonu adli DNA komisyonlarının en çok üzerinde durdukları konu haline gelmiştir. Adli laboratuvarlar, adli DNA analizinde kullanılan lokus seçiminden delilin istatistiksel değerinin hesaplanmasına kadar çeşitli talimatlar yayınlamışlardır (Morling ve ark. 2002). Bununla birlikte DNA incelemeleri yürüten adli ve kalibrasyon laboratuvarlarının uluslararası ISO17025 kalite standardına göre akredite olmaları gerektiğini savunmuşlardır. Bu durum adalet sisteminde DNA incelemelerinin güvenilirliğini artırsa da, gelişen teknoloji ile ortaya çıkan her yöntem veya uygulama için standardizasyon ve kalite güvencesini sağlamak adli laboratuvarların en büyük gereksinimi haline gelmiştir (Malkoc ve Neuteboom 2007). İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı akredite bir laboratuvar olup bu çalışmada kullanılan kitin validasyonu daha önce analistler tarafından yapılmıştır. Ancak bu tez çalışmasında söz konusu kiti karışmış örneklerde uygulayabilmesi için validasyon çalışması gerçekleştirildi. Karışmış örneklerin analizini yapacak olan laboratuvarların da mutlaka uyguladıkları yöntemin validasyonunu yapmaları önerilmektedir.

ABI 3130 Genetik Analizör Cihazında AmpF_LSTR® İdentifiler kitinin Validasyon Çalışması

Adli bilimler laboratuvarlarında yapılan testlerin güvenilirliği ve yorumlarının geçerliliği mahkemenin karar vermesinde etkilidir. Uygulanan testlerin geçerli kılınması adli laboratuvarların temel hedefidir. Analiz parametrelerinin belirlenmesi ile kesin, doğru ve güvenilir sonuçlara ulaşılabilir (Szibor ve ark. 2003). Analiz eşiği bu parametrelerin başında gelir. Analiz eşiği değeri, yöntemin en düşük tespit limitinin göstergesidir. Bu değer laboratuvardan laboratuvara değişen bir değerdir. Çalışmamızda analiz eşik değeri 72.75 rfu olarak belirlendi. Analiz eşik değeri daha önce İ.Ü Adli Tıp Enst. Adli Moleküler Genetik

Laboratuvarı'nda yapılan validasyon raporuna göre biraz daha yüksek çıkmıştır. Bunun nedeni lazer ömrü kısaldıkça cihazın analiz eşik değeri de yükselmektedir (Butler ve ark. 2004). Bu tez çalışmasının tamamlanmasından kısa bir süre sonra cihazın lazeri unitesi değiştirilmiştir.

Validasyonun diğer önemli parametrelerden biri olan dinamik alan, cihazın tespit edebileceği en düşük ve en yüksek DNA konsantrasyonlarını belirtmektedir. Çalışmamızda hedef DNA konsantrasyonu 0.05-0.5ng/μl olarak belirlendi. Karışım örneklerinin son konsantrasyonu 0.2 ng/μl olacak şekilde oluşturuldu.

Stokastik eşik değeri (H_b , heterozygosity balance) genel olarak $H_b = \phi_a / \phi_b$ ifade edilmektedir. Bu formülde ϕ_a aynı lokustaki heterozigot alellerden kısa olan alelin yüksekliğini, ϕ_b ise uzun olan alel yüksekliğini ifade etmektedir. Uluslararası Adli Genetik Komisyonu (ISFG-international Society of Forensic Genetics) bu değeri $H_b \geq 0.6$, Birleşik Krallık (UK DNA Technical Working Group) DNA çalışma grubu $H_b \geq 0.5$ ve Amerika Birleşik Devletleri DNA grubu (USA DNA Working Group) $0.6 \leq H_b \leq 1.66$ olarak kabul etmektedir (Gill ve ark. 2006, Gill ve ark. 2008, Bright ve ark. 2010). Çalışmamızda belirlenen stokastik eşik değeri aralığı 0.7- 0.9 değerleri arasındadır. Elde edilen değer aralığı, tüm çalışma gruplarının verdiği değer aralıkları içerisinde bulunmaktadır. Bu değer aralığının önemi, aynı lokusta bulunan heterozigot alellerin birbirlerine olan oranlarının bilinmesi durumunda bu heterozigot alellerin aynı yada farklı kaynaklardan gelip gelmediğini belirlemektir. Burada bahsedilen kaynaklar farklı bireylerde olacağı gibi gölge pikler, pull-up yapıları gibi istenmeyen ürünlerden de oluşabilmektedir.

Tekrarlanabilirlik ve kesinlik parametreleri birbirine paralel olarak çalışılmaktadır. Bu çalışmaların amacı ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını belirlemektir. Kesinlik, rölatif standart sapma hesaplandıktan sonra belirlenir (İnal ve Topkaya 2010). Elde edilen standart sapma değerinin 0.5'in altında olması beklenmektedir. Çalışmamızda iki analist tarafından yapılan tiplendirme sonuçları karşılaştırıldığında, çalışılan 9 örnekte de birbirine uyumluluk gözlemlendi. Kesinlik çalışması için çalışılan bütün örneklerin alel pik büyüklüğünün (size'larının) standart sapması hesaplandı. Yürütmeden elde edilen tüm lokuslar için standart sapma değerlerinin ortalaması alındı. Tüm lokusların standart sapma ortalamalarından elde edilen ortalama değer 0.221'dir. Bu değer 0.5' ten küçüktür. Elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde tekrarlanabilirlik ve kesinlik parametreleri gerçekleşmiştir.

Tekrar üretilebilirlik, laboratuvarlar arası sonuçların karşılaştırması şeklinde yapılmaktadır. Tekrar üretilebilirlik, aynı metot ve aynı örnekler kullanılarak farklı laboratuvarlarda, farklı ekipman ve farklı analistler tarafından aynı sonuçların elde edilmesidir (ISOEC 1994). Çalışmamızda GEDNAP tarafından 2012 yılında İ.Ü. Adli Tıp Ens. Adli Moleküler Genetik Laboratuvarına gönderilen ve profilleri önceden GEDNAP tarafından belirlenen örnekler kullanılmıştır. Bu durumda aynı örnekler, farklı ekipmanlar ve farklı analistler tarafından analiz edilip karşılaştırılmıştır. Aynı örnekler, farklı ekipmanlar ve farklı analistler tarafından analiz edilerek benzer sonuçlar elde edildiğinden tekrar üretilebilirlik gerçekleştirilmiş oldu.

Karışım Örneklerinde Ön Değerlendirilmenin Önemi

Analiz edilen delil profillerinin tarafsız bir şekilde yorumlanabilmesi için ön değerlendirme yapılması gereklidir. Ön değerlendirmenin amacı delil örneğinin karışım olup olmadığını, katılımcı sayısının, karışıma katılan profillerin ve oranlarının belirlenmesidir. Bu adım karışım örneklerinin yorumlanmasında ilk üç basamağı oluşturmaktadır (Gill ve ark. 2006). Laboratuvarında oluşturulan karışım örneklerine uygulanan ön değerlendirme sonuçlarına göre 1:50 ve 50:1 oranları dışındaki tüm oranlarda karışım örnekleri tespit edilmiştir. 1:50 ve 50:1 oranlarında minör katılımcıya ait konsantrasyonların validasyon aşamasında belirlenen dinamik alan aralığının dışındadır. Bu yüzden 1:50 ve 50:1 oranlarında minör katılımcılara ait aleller elde edilememiştir.

Karışım örneğindeki katılımcı sayısı belirlenirken tüm lokuslardaki alel sayısına bakılmalıdır. Tüm lokuslar incelendiğinde bir veya daha fazla lokusta en fazla dört alel bulunması durumunda karışımın iki kişinin profilinden oluştuğunu söylemek mümkündür. Bir veya daha fazla lokusta alel sayısının beş ve üstünde olması karışımında üç veya daha fazla kişinin varlığından bahsedilebilir. Katılımcı sayısı belirlenirken alel düşmesi ve gölge piklerin değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu tür istenmeyen ürünler katılımcı sayısının ve profillerinin belirlenmesinde önemli etkiye sahiptir (Clayton ve ark. 1998). Çalışmamızda iki katılımcı tarafından oluşturulan karışım örneklerinde bir veya daha fazla lokusta en fazla 4 alele rastlandı. Fakat ESC2 kodlu olgu dosyasında TH01 loksunda beş adet alel gözlemlendi. Bu durumda karışım örnek profilinin üç veya daha fazla kişiden oluşabileceği tahmini yapılabilir. ESC2 kodlu dosyanın sonuçlarına göre delil profilinde katılımcı sayısı üç olarak belirlenmiştir

Karışımındaki katılımcıların belirlenmesi için alel pik yükseklikleri ve heterozigotluk dengesi gibi parametrelerden yararlanılır. E1 ve K1 kodlu iki kişiden oluşturulan karışım örneklerinde kitin toplam STR lokusu olan 16 lokustan 6'sında heterozigotluk ve 10 lokusta ise paylaşılan alel gözlemlendi. Ortak (paylaşılan) alel içeren lokuslarda heterozigotluk varlığının belirlenmesi için karışım oranının bilinmesi gerekir. Ancak PCR sonrası bu dengenin kendini koruyup koruyamayacağı büyük bir soru işareti olup bu yüzden tüm lokuslardaki alel oranlarından söz etmek gerekir. Heterozigotluk dengesi çeşitli laboratuvar kaynaklı koşullardan ve sporadik kontaminasyonlardan kolayca etkilenebilmektedir (Manabe ve ark. 2013). Bu nedenle gerçekleştirilen tüm laboratuvar çalışmalarında negatif kontroller kullanılmıştır. Katılımcı profillerine ait alelleri ve katılımcı oranları belirlenirken GeneMapper v1. yazılımından yararlanılmıştır. Yazılım ortak alel içermeyen lokuslarda tahmini olarak katılımcı profillerine ait alelleri ve bu alellerin hangi oranda karıştığını belirlemek amacıyla istatistiksel kurallara dayalı tahminler yapmaktadır. Tüm oranlardaki karışım örneklerinin alel düşmesi bulunmayan ve ortak alel içermeyen lokuslarda tahmin edilen katılımcıya ait profiller doğru olarak belirlenmiştir. Belirlenen ortalama karışım oranlarında 1:1, 1:3 ve 3:1 oranları dışında diğerlerinde tahmini karışım oranları yanlış olarak belirlenmiştir. Bunun nedeni PCR'da katılımcı DNA konsantrasyonlarının sabit olarak kalmamasıdır. Bu durum, real-time (eş zamanlı) PCR kullanılarak giderilebilir. Real time PCR ile ilgili lokusların hangi miktarlarda çoğaldığı gözlemlenebilir (Alonso ve ark. 2014).

Karışım örneklerinin yorumlanmasında ön değerlendirme yapılması mahkemenin gönderdiği bilgiye göre değişmektedir. Santiago de Compostela Üniversitesi'nden temin edilen iki olgu dosyasında ve ENFSI bünyesinde gerçekleştirilen pilot çalışmalarda, mahkeme delil profili ile birlikte şüpheli ve mağdur profillerini de laboratuvarlara göndererek, şüphelinin bu olaya dahil olup olamayacağını olabirlik oranı kullanarak değerlendirilmesini istemektedir. Bu durumda ön değerlendirme yapılırken karışım oranının belirlenmesine gerek kalmamaktadır. Şüpheli ve mağdura ait profiller bilindiğinden alel düşmesi varlığı ve gönderilen profillerin doğruluğu kontrol edilerek istatistiksel analiz yapılır.

Karışım Örneklerinin Analizi ve Yorumlanması

Oluşturulan karışım örneklerinde 1:1, 1:3, 3:1, 1:5 ve 5:1 oranlarında alel düşmesi gözlenmedi. Bu oranlarda tam profil elde edildiğinden LRmix modülünde yapılan istatistiksel değerlendirmede oluşturulan hipotezler, belirlenen olası alel düşmesi aralığı ve hesaplanan LR değerleri birbirinin aynısıdır. LRmix modülü istatistiksel değerlendirme yaparken gözlenen aleller üzerine değerlendirme yapmaktadır.

1:10, 10:1, 1:20 ve 20:1 oranlarında sadece belirli lokuslarda sırasıyla 6, 2, 11 ve 4 alel düşmesi gözlenmiştir. Minör katılımcı profillerinin gözlenen bu alel düşmesi validasyonda belirlenen dinamik alan ile ilişkilidir. Dinamik alanda belirlenen 0.05-0.5ng/μl aralığı dışında olan oranlarda (1:10 oranındaki minör katılımcı DNA konsantrasyonu: 0.02ng/μl ve 1:20 oranındaki minör katılımcı DNA konsantrasyonu: 0.01ng/μl) minör katılımcılarda alel düşmesi gözlenmesi beklenen bir sonuçtur. Yapılan istatistiksel değerlendirmede daha çok alel düşmesi gerçekleşen düşük DNA konsantrasyonlarında, daha düşük LR değerleri elde edilmiştir. Farklı sayıda alel düşmesi görülen karışım oranlarında birbirinden farklı LR değerlerinin elde edilmesi de beklenen bir durumdur. Alel düşmesinin LR değerine etkisi daha sonraki başlıkta tartışılacaktır.

1:50 ve 50:1 oranlarında minör katılımcılara ait aleller tespit edilememiştir. Bu durumda karışım örneği yorumlamasından hatta herhangi bir karışım örneğinin varlığından söz etmek mümkün değildir. Bu orandaki karışım örneklerinde sadece majör profil elde edilir. Alel düşmesinin yaşanmasının sebebi minör katılımcının DNA konsantrasyonunun (0,004ng/μl) dinamik alan aralığı dışında kalmış olmasıdır.

Gölge Piklerin (Stutter) Değerlendirilmesi

Gölge pikler ilgili alelden 4 baz çifti küçük veya çok ender durumlarda büyük minör ürünlerdir. Normal bir alel pikinin yüksekliğinin %15inden kısa pikler şeklinde gözlenen gölge pikler DNA polimerazın kayması sonucunda oluşmaktadır (Walsh ve ark. 1996). Gölge ürünler hassasiyete bağlı olarak oluşma oranı %2 civarındadır. Teorik olarak gölge piklerin belirlenmesinde kullanılan formül doğru olsa da gözlenen alel büyüklüğü de gölge pik ürünlerinin doğru olarak değerlendirilmesinde önemli bir role sahiptir. Yinede gölge piklerin oluşum sıklığı düşük olduğundan aynı örneğin tekrar analiz edilmesi sonucunda bu ürünlerin

giderilmesi sağlanabilir (Leclair ve ark. 2004, Gill ve ark. 2006). Bir pikin gölge pik olup olmadığını değerlendirmek için çeşitli noktalara dikkat edilmelidir. Bu noktalar:

- % gölge pik oranının ($<15\%$) değerlendirilmesi
- Gölge pikin konumu (n-1 bç)
- Analiz eşik değerinin bilinmesi
- Tekrar analiz edilen aynı örneklerin tümünde bu piklerin gözlenmesi
- Komşu piklerin yüksekliği
- Karışmış DNA örneğinin varlığı ve oranı değerlendirmeye alınmalıdır.

Katılımcı Oranlarının ve Profillerinin Belirlenmesi

Çeşitli uluslararası gruplar tarafından geliştirilen talimatlarda karışım örneklerinin yorumlanabilmesi için en önemli adımlardan biri karışım oranlarının belirlenmesi gerekliliği bildirilmiştir. (Clayton ve Triggs 2005). Maskelenmiş piklerin bulunduğu lokuslarda karışım oranının belirlenmesi mümkün değildir. Paylaşılan alellin her iki katılımcıya ait pik yükseklikleri bilinmeden böyle bir değerlendirme yapmak mümkün değildir. Fakat daha sonraki yorumlama aşamalarında şüpheli ve mağdur profillerinin bilinmesi en adil ve tutucu değerlendirme yapılabilmesi için gereklidir. Heterozigotluk oranının değerlendirilmesi paylaşılan aleller ışığında olanaksızdır. Bu durumda karışmış DNA örneklerinin doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için şüpheli ve mağdur profillerinin bilinmesi gereklidir.

Alel Düşmesinin Olabilirlik Oranına Etkisi

DNA delili içeren suç dosyalarında, DNA miktarı olayın gelişimine göre değişiklik gösterebilir. Degrade olmuş ve/veya az miktarda DNA bulunan örneklerde bir veya birden fazla gerçek alellerde alel düşmesi olabilir. Bununla birlikte analizde yaşanan teknik aksaklıklar veya tiplendirme kitinin alel büyüklükleri gerçek alel sinyallerini gürültü düzeyine indirebilir. Bunun sonucunda gerçek alel gözlenmez ve alel düşmesi yaşanabilir (Nieuwerburgh ve ark. 2009, Tvedebrink ve ark. 2009). Bu istenmedik olayın önüne geçebilmek için belirli yöntemler izlenebilir. Bu yöntemler aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

- Amplifikasyon sırasında döngü sayısının artırılması sonucunda PCR ürünlerinin miktarı artacağından alel düşmesi engellenebilir.

- Elektroforez sırasında enjeksiyon süresinin artırılması ile alel düşmesi engellenebilir.
- DNA üzerinde daha az yer kaplayan dolayısıyla PCR ürünü (amplikon boyutu) küçük olan Mini-STR bölgeleri çalışılarak alel düşmesi engellenebilir.

Tez çalışmasının bulgular kısmındaki Tablo 43. de görüldüğü gibi alel düşmesi olabilirlik oranı değeri ile ters orantılıdır. Alel düşmesinin fazla olduğu karışım örneklerinde (1:20,1:10 gibi) LR değeri daha düşüktür. Alel düşmesi sayısının artması ile olası alel düşmesi aralığının değeri de doğru orantılı olarak yükselmektedir. Bunun nedeni LR değerinin ilgili toplumdaki alel sıklıklarına bağlı olmasıdır. Alel düşmesi gözlenen profillerde düşen alellerin toplumdaki sıklığı hesaba katılmayacağı için LR değeri düşmektedir.

Karışmış DNA Örneği Profillerinin Değerlendirilmesi

Karışım örneklerinin değerlendirilmesi için şüpheli, mağdur ve kanıt profillerinin bilinmesi gereklidir. Olay yerinden elde edilen materyallerden her zaman mükemmel profiller elde edilemeyebilir. Bu durumda çeşitli araştırmacılar ortak (consensus) profil yorumlanması yoluna yönelir (Haned 2010). Ortak profillerde görülen alellerin oluşturduğu genotiplerdir. Aynı ayrı tekrarların değerlendirilmesi yerine ortak bir profilin değerlendirilmesi istatistiksel model olarak esneklik sağlayacaktır (Pompanon ve ark. 2005, Buckleton ve Triggs 2005).

Öte yandan ortak profil oluşturmak bilgi kaybı ile sonuçlanabilir. Bilgi kaybının nasıl geliştiğini açıklamak için Ek 3. teki senaryo dosyasını ele alalım ve bu dosya A dosyası olsun; bu dosyada üç farklı delil profili bir mağdur ve bir şüpheli olsun (Ek. 3).

Tablo 55. Te (Ek. 3) görüldüğü üzere A delilinden farklı konsantrasyonlarda oluşturulmuş profillerde ortak ve farklı alellere rastlanmaktadır. Örneğin D8S1179 lokusunda A1 profilinde 12-14 alelleri gözlenirken diğer iki tekrarda da 13 alelline rastlanmıştır. Bununla birlikte D13 lokusunda A1 profilinde gözlenen 12 aleli gibi hem şüpheli hem de mağdurda rastlanmayan aleller gözlenmiştir. Burada istatistiksel değerlendirme yapılırken ortak profilin kullanılması önerilmesine rağmen her lokus için oluşturulacak ortak profil alel kaybına yol açacaktır. Bilgi kaybının LR değeri üzerine etkisi Tablo 56. da (Ek 3.) özetlenmiştir. Forensim paketine bağlı LRmix modülünün sağladığı avantajla, birden fazla delil profili aynı koşullarda

değerlendirilebilmektir. Böylece olası bilgi kaybı engellenebilir ve en doğru sonuçlara ulaşılabilir.

Tablo 56. da (Ek 3.) görüldüğü gibi en düşük LR değeri her üç profilin değerlendirildiği örnekten elde edilmiştir. Fakat ortak profilin değerlendirilmesi ile elde edilen LR değeri hipotez olarak bize tam tersini vermektedir. Burada birbirinden farklı 4 profil ve 5 farklı sonuç ile karşı karşıyayız. LR değerleri iki örnekte (A2 ve Ortak profil) bize iddia makamının haklı olduğunu diğer üç örnekte (A1, A3 ve A1+A2+A3) ise savunma tarafının lehine karar verilmesi gerektiğini söylemektedir. Fakat iddia makamının haklı olduğunu gösteren LR değerleri (21 ve 3.036) çok düşüktür ve iddia tarafı lehine karar vermek neredeyse olanaksızdır. Bu durumda yapılması gereken şey örneğin (delilin) tekrar PCR ile çoğaltılıp analiz edilmesidir. Aynı zamanda mahkemeden başka bir şüphelinin olup olmadığı sorgulanıp, varsa bu şüphelinin profilinin de sağlanması gerekir.

Karışım Örneklerinin Yorumlanmasında Performans Testinin Değerlendirilmesi

LRmixTM modülünün alel düşmesi aralığının hesaplanması, hipotez oluşturması ve LR değerinin hesaplanması dışında diğer bir önemli fonksiyonu ise performans testidir. Bu test katılımcıların yerine geçebilecek olan ve aynı popülasyonda bulunan bireylerin olabilirlik oranını log10 tabanında vermektedir. Diğer bir deyişle aynı popülasyonda bulunan rastgele 100 kişinin, karışımı oluşturan katılımcıların yerine geçme olasılığını göstermektedir. Rastgele bireyler oluşturulurken modülde ilgili popülasyon verisi kullanılır. Bu değerin, hipotez değerlendirmesi sonucu elde edilen değere uzak olması, elde edilen değer in güvenilirliğini göstermektedir. Tablo 57. de 1:1 ve 1:20 oranlarında A tekrarına ait LR değeri ve performans testi sonucu gösterilmektedir.

Tablo 55. 1:1 ve 1:20 oranlarında A tekrarına ait LR değeri ve performans testi sonucu.

Karışım Örneği Oranı	LR Değeri	Performans Testi
1:1 (A)	4,02E+16	$\log_{10}^{-32/-10}$
1:20 (A)	0.004271	$\log_{10}^{-18/-6}$

Tablo 57. de görüldüğü gibi her iki örnekte de LR değeri performans testi değerinden büyüktür. 1:1 oranındaki örnekte LR değeri ve performans değerinin arasındaki fark son derece yüksektir.

"Şüpheli profilinin delil profilinde bulunma olasılığı, aynı popülasyon içerisinde seçilen herhangi bir kişinin profilinin bulunmasından 4020000000000000 kez daha fazladır. Aynı toplum içerisinde rastgele seçilen 100 kişinin şüpheli profiline sahip olması 10^{-10} ve 10^{-32} kez daha az olasıdır."

Bu tez çalışmasında ENFSI bünyesinde gerçekleştirilen pilot çalışmada iki adet dosya doğru bir şekilde istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Hipotezler oluşturulurken şüpheli ve mağdur alelleri dikkate alınmıştır. İlk dosyada şüpheli profilinde bir adet alel düşmesi gözlenmiştir. Bu durumda savunma makamı hipotezi mağdur ve bilinmeyen bir kişinin varlığını sorgulamaktadır. Öte yandan ikinci dosyada elde edilen olay yeri profilinde mağdur profiline ait 8 adet alel düşmesi gözlenmektedir. Bu durumda savunma hipotezi, şüpheli ve bilinmeyen bir kişinin varlığını sorgulamaktadır. Gözlenen aleller hipotezlerin değişmesinde önemli bir rol oynamaktadır. LR yönteminin birden fazla hipotez kullanarak delil profilini değerlendirmesi bu yöntemin en önemli avantajıdır.

İspanya Santiago De Compostela Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nden temin edilen iki adet olgu dosyası karışım örneklerinin yorumlanmasında ve LR yönteminin uygulanmasında bize tecrübe kazandırmıştır. İlk olgu dosyasında (ESC 1) iki katılımcılı ikinci olgu (ESC 2) ise üç katılımcılı bir olgu dosyası olup istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. ESC 2 dosyasında diğer çalışmalardan farklı olarak dokuz adet alel eklenmesi gözlenmiştir. Alel eklenmesi ve alel düşmesi, delil profilindeki katılımcı sayısını belirlemek açısından önemlidir. ESC 2 dosyasında dokuz adet alel eklenmesi ve TH01 lokusunda 5 adet alel gözlenmesi bu dosyanın üç

katılımcıdan oluştuğunun en büyük göstergesidir. Bu dosyada iki kere istatistiksel değerlendirme yapılmıştır. bunun nedeni üçüncü katılımcının (partner) sonradan hesaba katılmasıdır. Her iki durum değerlendirildiğinde partnerin hesaba katıldığı yorumlanmada LR (7,65e+12) değeri daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni hipotezlerdeki bilinmeyen kişi sayısının azalmasına bağlıdır. İlk durumda savunma hipotezinde iki adet bilinmeyen kişi varken ikinci durumda bu sayı bire inmektedir. LRmix modülünde değerlendirme yapılırken katılımcıların bilinmesi veya doğru olarak belirlenmesi en adil ve tutucu istatistiksel değerlendirme yapmak için önemlidir.

Sonuç olarak olay yerinde ve olgu dosyalarında sıklıkla rastlanılan karışım örneklerinin yorumlanmasında her laboratuvarın uygulamış olduğu yöntemin analiz eşiği, dinamik alan, stokastik eşik gibi validasyon parametrelerini belirlemelidir. Bununla birlikte sonucu yanlış etkileyebilecek gölge pik, alel düşmesi ve pull-up gibi istenmeyen ürünlerin önüne geçmek için analizlerin tekrar edilmesi gerekir.

Karışım örneğindeki katılımcıların oranını belirlerken pik yükseklikleri oranlarından yararlanılır. Pik yükseklikleri katılımcıların DNA konsantrasyonuna bağlı olarak PCR’da değişmektedir. Bu durumun önüne geçmek için real time PCR kullanılarak her lokustaki katılımcılara ait DNA konsantrasyonları tespit edilebilir. Böylece karışım örneğindeki katılımcıların hangi profillere sahip olduğu ve karışımın hangi oranlardan oluştuğu en doğru şekilde belirlenir.

Katılımcı profilleri belirlendikten sonra delil profilinin istatistiksel değerlendirilmesi yapılır. İstatistiksel değerlendirme yaparken çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler arasında olabilirlik oranı (LR) Avrupa laboratuvarları tarafından kullanılan ve karışım örnekleri değerlendirilirken gözlenen gölge pikleri ve alel düşmesi gibi parametreleri dikkate alan tutucu bir yöntemdir. Bu yaklaşımın diğer istatistiksel yöntemlerden farkı delil profilinin hem mağdur hem de şüpheli tarafından değerlendirilmesidir.

LR yönteminin mahkemelerde kullanımı araştırmacıları ve adli yargıda yer alan görevlileri zorlayan bir durumdur. LR yönteminde kullanılan ifadeler son derece adil ve tutucudur. LR yöntemi ile değerlendirilen bir olgu dosyasının hakim, savcı, avukat gibi görevlilere doğru bir şekilde aktarılması için eğitim ve tecrübe gerekir. Bu yüzden hem araştırmacıların hem de adli yargıda görevli kişilerin basit istatistik temelleri ve terimleri hakkında eğitim almaları gerekir. LR

yöntemi anlaşıldığı takdirde karışmış DNA örneği içeren olgu dosyalarını yorumlamak daha kolay olacaktır. Gelişmiş dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de karışım örneklerinin benzer standartlarda yorumlanabilmesi için bir prosedür oluşturmak ve bu konu hakkında eğitimler vermek gereklidir.

Sonuç olarak:

- Bu tez çalışması ile ülkemizde ilk defa karışmış DNA örneklerinin istatistiksel metodlar kullanılarak yorumlaması gerçekleştirildi.
- Karışım örneklerinin doğru yorumlanabilmesi için laboratuvarların kullandıkları yöntemi valide etmeleri gerekmektedir.
- Karışmış DNA örneklerinin objektif yorumlanabilmesi ve delilin gücünü ortaya koymak amacıyla LR yöntemi kullanıldı.
- LR yöntemi ile değerlendirilmiş olan olgu dosyalarının hakim, savcı, avukat gibi adli yargıda bulunan görevlilere basit ve anlaşılır ifadeler kullanılarak aktarılması gerekir.
- Gelişmiş dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de karışım örneklerinin benzer standartlarda yorumlanabilmesi için bir prosedür oluşturmak ve konu hakkında eğitimler vermek gerekir.

6. ÖZET

Adli bilimlerde DNA kanıtının yorumlanması, analitik sürecin en önemli kısmıdır. İlgili delilin ve referans materyal karşılaştırılması tecrübe ve dikkat gerektiren bir aşamadır. Analistler zaman zaman karışık DNA örnekleri ile karşı karşıya gelebilirler. Delil niteliği taşıyan bu örnekler birden fazla kişinin DNA'sını içerebilir. Karışım örneklerinde bazı faktörler DNA analizini daha da karmaşık hale getirebilir. Bunlar; katılımcı sayısının bilinmemesi sonucunda alel çakışmalarının olması, düşük kalitede veya bozunmuş örneklerde gözlenen stokastik dalgalanmalar, Taq polimeraz enziminin yarı kantitatif aktivitesi ve primer bölgelerinde mikrovaryantların oluşumu olarak sıralanabilir. Ayrıca, DNA molekülünün yorumlanmasında ve davaların karar aşamasında gerekli olan istatistiksel değerlendirmeler de karşılaşılan diğer bir zorluktur. Karışık DNA örneklerinin yorumlanmasında kullanılan farklı yaklaşımlar mevcuttur. Son yıllarda çeşitli ülkelerdeki hukuk sistemleri bu istatistiksel hesaplama işlemlerinden faydalanmaktadır. Ülkemizde karışım DNA analizlerinde kullanılacak herhangi bir prosedür bulunmamaktadır. İlgili istatistiksel kavramları incelemek ve ülkemizde kriminal olgularda kullanmak büyük fayda sağlayacaktır. Bu tez çalışmasında ilk aşamada bir validasyon çalışması gerçekleştirilerek kullanılacak ticari kitin geçerli kılınması, laboratuvar parametrelerinin ve eşik değerlerinin belirlenmesi sağlanmıştır. Daha sonra belirlenen parametreler ile gönüllü bireylerde toplanan biyojik materyaller kullanılarak değişik oranlarda karışmış DNA örnekleri oluşturulmuştur. Karışım örnekleri valide edilen AmpF_{STR}® İdentifiler kiti ile çalışıldı ve veri analizleri Genemapper® IDX v.1 programı kullanılarak yapıldı. Karışmış DNA örneklerinin yorumlanması İspanya Santiago de Compostela Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nde LRmix™ uygulaması gerçekleştirildi. Daha sonra ENFSI bünyesinde gerçekleşen karışmış DNA örneklerinin yorumlanmasında laboratuvarlar arası karşılaştırma pilot çalışmasına katılım gerçekleştirildi. Oluşturulan karışım örnekleri, İspanya Santiago de Compostela Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nden elde edilen anonim karışmış örnek içeren olgu dosyaları ve ENFSİ bünyesindeki karışım örneği içeren pilot çalışma LRmix™ modülü kullanılarak doğru bir şekilde değerlendirilmiştir. Karışım örneklerinde ve olgu dosyalarında en sık karşılaşılan alelik olay alel düşmesi olarak belirlenmiştir. Son olarak olabilirlik oranı yaklaşımı ve LRmix™ uygulaması kullanılarak karışım örneklerinin hem gerçek olgu dosyalarında hem de kontrollü olarak oluşturulan örneklerde etkili bir şekilde karışmış örneklerde doğru bir DNA analizi yapılabildiği belirlenmiştir.

7. ABSTRACT

Interpretation of the DNA evidence is the most important part of the analytical process in forensic sciences. Comparison of the evidence and reference profiles requires both experience and caution. DNA analysts can generally encounter with mixed DNA samples. Related samples can include 2 or more individuals DNA profiles. Other factors can make DNA analysis more complex. These factors can arrange as; allele masking due to unknown number of contributors, stochastic fluctuations due to presence of samples with low quality or degraded, half quantitative activity of Taq polymerase enzyme on amplification and microvariant formation on primer binding sites. Besides statistical evaluation of DNA interpretation and court acceptance are also challenging situations for forensic analysts and researchers. Different approaches are available on mixture interpretation. These approaches are probability of inclusion of known genotypes, probability of exclusion and likelihood ratio. On last decade, most of the European countries and also in United States of America court systems benefit from these statistical approaches on forensic DNA analysis. There is no statistical procedure available on Turkey that can be used on court. Thus investigation of the statistical approaches and formation of appropriate procedures would contribute on both court system and forensic analyst in Turkey. In this study a brief validation process was performed in order to maintain commercial DNA typing kit, our laboratory parameters and thresholds. After the validation process mixed DNA samples were formed on different ratios from individuals with their informed consent. Mixed DNA samples were analyzed with AmpF ℓ STR® Identifiler kit (Life Technologies) and analyzed with Genemapper® IDX v.1 software (Life Technologies) on ABI 3130 genetic analyzer (Life Technologies). The statistical interpretation of mixtures was performed with LRmix™ module using likelihood ratio approach. Also different simulated cases from University of Santiago de Compostela Institute of Forensic Sciences and pilot inter-laboratory study for mixture interpretation were performed. Mixed DNA samples were successfully analyzed and interpreted. Also simulated cases from University of Santiago de Compostela Institute of Forensic Sciences and pilot inter-laboratory study for mixture interpretation were performed on LRmix™ module correctly. The most frequent allelic disorientation was determined as allele drop-outs on the different mixture ratios and simulated cases. Finally likelihood ratio and LRmix module was determined as a useful and successful application on both mixture samples that composed on controlled conditions and anonymous forensic cases with mixture profiles.

8. KAYNAKLAR

- Abu Al-Soud W., Rådström P. (2001) Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol.* 39(2): 485–493.
- Acar, E. (2009). X Kromozomuna Bağlı 8 STR Lokusunun Polimorfizmi ve Adli Bilimlerdeki Önemi , İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri A.B.D. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul. p.: 6-12.
- Adam, C. (2010). *Essential Mathematics and Statistics for Forensic Science*, 1st edition, pp.295-297, John Wiley & Sons Ltd, UK.
- Aitken, C., Taroni, F. (2004). *Statistics and the Evaluation of Evidence for Forensic Scientists*, 2nd edition, pp. 79-87, John Wiley & Sons Ltd, UK.
- Alaeddini R., Walsh S. J., Abbas A. (2010). Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA - A review. *Forensic Science International: Genetics* 4(3): 148–157.
- Alaeddini, R., Walsh, S. J., Abbas, A. (2010). Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA - A review. *Forensic Science International: Genetics.* 4(3):148–157.
- Alford, R.L, Hammond, H.A, Coto, I., Caskey, C.T. (1994). Rapid and efficient resolution of parantage by amplification of short tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 190-195.
- Alonso A., Martin P., Albarrán C., Garcia P., Fernandez de Simon L., Jesús Iturralde M., Fernández-Rodriguez A., Atienza I, Capilla .J, García-Hirschfeld J., Martinez P., Vallejo G., García O., García E., Real P., Alvarez D., León A., Sancho M. (2005). Challenges of DNA profiling in mass disaster investigations. *Croat. Med. J.*46(4): 540–548.
- Alonso, A., Martin, P., Albarrán, C. (2005). Challenges of DNA profiling in mass disaster investigations. *Croat. Med. J.* 46(4):540–548.
- Alonso, A., Martin, P., Albarran, C., Garcia, P., Garcia, O., de Simon, L.F., Garcia-Hirschfeld, J., Sancho, M., de la Rua, C., Fernandez-Piqueras, J. (2004). Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies, *Forensic Sci. Int.* 139: 141–149.

Andrade F.G., Bolea M., Martinez-Jarreta B., Sanchez D.(2006). DNA mixtures in forensic casework resolved with autosomic STRs. International Congress Series. 1288:580–582.

Life Technologies (1998) AmpFlSTR Profiler Plus PCR Amplification Kit Kullanım Kılavuzu. Foster City, California: Life Technologies.

Life Technologies (1999). AmpFlSTR® SGM Plus™ PCR Amplification Kit User's Manual, P/N 4309589. Foster City, California: Life Technologies.

Life Technologies (1999). Life Technologies® 3130/3130xL Genetic Analyzer Manual, P/N 4309589. Foster City, California: Life Technologies.

Bacher J. ve Schumm J.W. (1998). Development of highly polymorphic pentanucleotide tandem repeat loci with low stutter. Profiles in DNA, 2(2):3–6.

Bill M., Gill P., Curran J., Clayton T., Pinchin R., Healy M., Buckleton J.(2004). PENDULUM—a guideline based approach to the interpretation of STR mixtures, Forensic Sci. Int. 148 :181–189.

Børsting C., Mogensen H.S., Morling N. (2013). Forensic genetic SNP typing of low-template DNA and highly degraded DNA from crime case samples. Forensic Science International: Genetics. 7(3): 345–352.

Bourke M.T., Scherczinger C.A., Ladd C, Lee H.C. (1999). NaOH treatment to neutralize inhibitors of Taq polymerase. J Forensic Sci., 4:1046–1050.

Bourke, M.T., Ladd, C., Yang, N.C.S., McGilvray, M.K., Lee, H.C., Bieber, F.R. (2000). Sib pair identity at multiple STR loci: implications for interpretation of forensic DNA casework. Proceedings of the American Academy of Forensic Sciences 52nd Annual Meeting; Feb 21-26; Reno, Nevada, USA “içinde.

Bright J.A., Turkington J., Buckleton J. (2010). Examination of the variability in mixed DNA profile parameters for the Identifiler multiplex. Forensic Sci Int Genet. 4:111-114.

Bright, J.A., Turkington, J., Buckleton, J. (2010). Examination of the variability in mixed DNA profile parameters for the Identifiler multiplex. Forensic Sci Int Genet. 4:111–4.

Brinkmann, B. (1992). The use of STR's in stain analysis. In: Proceedings from the Third International Symposium on Human Identification. Promega Corporation, Madison, USA. 132: 357-73.

Buckleton J., Triggs C.M., Walsh S.J.(2005). Forensic DNA Evidence Interpretation, CRC Press, London, , pp. 226-284.

Buckleton, J., Triggs, C. (2006). Is the 2p rule always conservative?. Forensic Sci Int. 159(2-3):206-9.

Budowle B., Bieber F.R., Eisenberg A.J. (2005). Forensic aspects of mass disasters: strategic considerations for DNA-based human identification. Leg. Med., 7(4): 230–243.

Budowle B., Eisenberg A.J., van Daal A. (2009). Validity of Low Copy Number Typing and Applications to Forensic Science. Croat Med J. 50: 207-17.

Budowle B., van Daal A. (2008) Forensically relevant SNP classes. Biotechniques, 44(5) 603-610.

Budowle, B., Bieber, F.R., Eisenberg, A.J.(2005). Forensic aspects of mass disasters: strategic considerations for DNA-based human identification. Leg. Med. 7(4):230–243.

Budowle, B., Onorato, A.J., Callaghan, T.F., Della Manna, A., Gross, A.M., Guerrieri, R.A., Luttman, J.C., McClure, D.L.(2009). Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines for the assessment of mixed DNA profiles in forensic casework. J Forensic Sci. 54:810-821.

Bulbul, O., Fernandez-Formoso, L., Phillips, C., Altuncul, H., Filoglu G., Lareu, M.V., Carracedo, A. (2013). Allele frequencies of the five new European Standard Set (ESS) STRs and 15 established STRs in a Turkish population. Forensic Sci Int Genet. 9:e26.

Butler J.M. (2007). Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. Bio Techniques. 43(4): 2-4.

Butler J.M. (2005) Forensic DNA Typing. Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, 2nd edition, pp. 130-170, Burlington, MA, USA: Elsevier Academic Press.

Butler J.M., Shen Y., McCord B.R. (2003). The Development of Reduced Size STR Amplicons as Tools for Analysis of Degraded DNA. *J Forensic Sci.* 48(5):1054-1064.

Butler, J.M., Buel, E., Crivellente, F., McCord, B.R. (2004). Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis.* 25:1397–1412.

Chan L. (1992). Advances in molecular biology with applications in clinical medicine. *Klin Lab.* 38: 2-4.

Chung D.T., Drábek J., Opel K.L., Butler J.M., Mccord B.R.(2004). A study on the effects of degradation and template concentration on the amplification efficiency of the STR miniplex primer sets. *Journal of Forensic Sciences.* 49(4):733-740.

Clayton T.M. Whittaker J.P., Sparkes R., Gill P. (1998) Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling, *Forensic Sci. Int.* 91: 55-70.

Clayton T.M., Guest J.L., Urquhart A.J., Gill P.D.(2004). A genetic basis for anomalous band patterns encountered during DNA STR profiling. *J Forensic Sci.* 49(6):1207-14.

Clayton, T., Buckleton, J. (2005). Mixtures. *Forensic DNA Evidence Interpretation*, (Buckleton J., Triggs C., Walsh S.J. Eds.) CRC Press, pp.. 217–274, London, “içinde.

Coble M.D., Butler J.M. (2005). Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. *Journal of Forensic Sciences.* 50(1):43-53.

Comey C. T., Koons B.W., Presle K.W., Smerick J.B., Sobieralski C.A., Stanley D.M., Baechtel E. S. (1994). DNA Extraction Strategies for Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of Forensic Sciences*, 39(5):1254-1269.

Cotton, E.A., Allsop R.F., Guest J.L., Frazier R.R., Koumi P., Callow P., Seager A., Sparkes R.L. (2000) Validation of the ampflstr SGM® Plus™ System for Use in Forensic Casework. *Forensic Science International*, 112(2-3):151-161.

Crouse C.A., Rogers S., Amriott E., Gibson S., Masibay A. (1999). Analysis and interpretation of short tandem repeat microvariants and three-banded allele patterns using multiple allele detection systems. *J Forensic Sci*, 44(1):87–94.

Dakin E.E., Avise J.C.(2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* . 93 :504–509.

Dönbak, L. (2002). Kısa Ardarda Tekrar Eden DNA Dizilerinin Adli Amaçlı DNA Çalışmalarındaki Yeri. *T. Klin. Tıp Bilimleri*,22: 233-238.

Eckhart L., Bach J., Ban J., Tschachler E. (2000). Melanin Binds Reversibly to Thermostable DNA Polymerase and Inhibits Its Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271(3): 726-730(5).

Evet I.W., Buffery C., Willott G., Stoney D. (1990). A guide to interpreting single locus profiles of DNA mixtures in forensic cases, *J. Forensic Sci.* 31(1):41–47.

Evet I.W., Gill P.D., Lambert J.A. (1998). Taking account of peak areas when interpreting mixed DNA profiles. *J Forensic Sci.* 43(1):62–69.

Evet, I.W., Jackson, G., Lambert, J.A.(2000). More on the hierarchy of propositions: exploring the distinction between explanations and propositions, *Sci. Justice.* 40 :3–10.

Evet, I.W., Weir, B.S.(1998) *Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists*. MA: Sinauer Assoc., Sunderland.

Filoğlu, G. (1999). 7 Tetramerik STR Lokusunun Kriminal İdentifikasyondaki Önemi, İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri A.B.D. Doktora Tezi, İstanbul. p.: 3-38

García, O., Alonso, J., Cano, J.A., García, R., Luque, G.M., Martín, P., Martínez de Yuso, I., Maulini, S., Parra, D., Yurrebaso, I. (2012). Population genetic data and concordance study for the kits Identifiler, NGM, PowerPlex ESX 17 System and Investigator ESSplex in Spain. *Forensic Sci Int Genet.* 6(2):e78-9.

Giardina E., Spinella A., Novelli G. (2011). Past, present and future of forensic DNA typing. *Nanomedicine*, 6(2): 257–270.

Gill P. (1997). The utility of 'substrate controls' in relation to 'contamination'. *Forensic Sci. Int.*, 85: 105-111.

Gill P., Brenner C.H., Buckleton J.S., Carracedo A., Krawczak M., Mayr W.R., Morling N, Prinz M., Schneider P.M., Weir B.S. (2006). DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Sci Int*, 160: 90-101.

Gill P., Sparkes R., Kimpton C. (1997). Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system. *Forensic Sci Int*. 89(3):185-97.

Gill P., Sparkes R., Pinchin R., Clayton T., Whitaker J., Buckleton J. (1998) Interpreting simple STR mixtures using allele peak areas. *Forensic Sci.Int.* 91(1): 41-53.

Gill P., Urquhart A., Millican E. S., Oldroyd N. J., Watson S., Sparkes R., Kimpton C. P. (1996). Criminal intelligence databases and interpretation of STRs. *Advances in Forensic Haemogenetics*, 6:235-242.

Gill P.D., Brenner C.H., Buckleton J.S., Carracedo A., Krawczak M., Mayr W.R, Morling N., Prinz M., Schneider P.M., Weir B.S. (2006). DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Science International*, 160(2-3): 90–101.

Gill P.D., Sparkes R., Pinchin R., Clayton T., Whitaker J., Buckleton J. (1998). Interpreting simple STR mixtures using allele peak areas. *Forensic Science International*, 91(1): 41–53.

Gill, P.(2001). An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine*. 114(4-5): 204-210.

Gill, P., Brown, R.M., Fairley, M., Lee, L., Smyth, M., Simpson, (2008). National recommendations of the Technical UK DNA working group on mixture interpretation for the NDNAD and for court going purposes. *Forensic Sci Int Genet*. 2:76–82.

Goos, L.M., Silverman, I., Rose, D., Newman, J. (2013). The Influence of Probabilistic Statements on the Evaluation of the Significance of a DNA Match. *Canadian Society of Forensic Science Journal*. 35(2):77-90.

Haned, H. (2010). 'Evaluation de m'ethodes statistiques pour l'interpr'etation des m'elanges d'ADN en science forensique, L'Universit'e Claude Bernard Doktora Tezi, Lyon. p.: 108-120.

Hartzell B., Graham K., McCord B. (2003). Response of short tandem repeat systems to temperature and sizing methods. Forensic Sci Int. 5;133(3):228-34.

Hauge X.Y. ve Litt, M. (1993). A study of the origin of 'shadow bands' seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. Human Molecular Genetics, 2: 411–415.

Howitt T., Johnson P., Cotton L., Rowlands D., Sullivan K. (2003). 14th International Human Identification Sempozyumu Bildiri Kitapçığınan. Erişim: <http://promega.com/geneticidproc/ussymp14proc/oralpresentations/Howitt.pdf>.

ISO 5725-2.1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.

İnal, B.B., Topkaya Ç. (2010). Klinik Biyokirnya Laboratuvarınannda Akreditasyona Geçiş. İstanbul Tıp Dergisi. 2:74-76.

İstanbul Universitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilm Dalı. 2011. İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı DNA Analizi Profillemeye Deney Metodunun Geçerli Kılma Talimatı. İstanbul.

James H.S., Nordby J.J. (2003). Forensic Science: An Introduction to Scientific And Investigative Techniques, pp. 115-134, CRC Press Florida.

Kelly, H., Bright,J.A., Curran, J.M., Buckleton,J. (2012). Modelling heterozygote balance in forensic DNA profiles, Forensic Sci. Int. Genet. 6(6):729–734.

Kim, E.H., Jung, S.E., Shin, K.J., Yang, W.I., Yang, I.S. (2014). Sequence Generation and Genotyping of 15 Autosomal STR Markers Using Next Generation Sequencing. Korean J Leg Med. 38(2):48-58.

Kline M. C., Hill C.R., Decker A.E., Butler J.M. (2011). STR sequence analysis for characterizing normal, variant, and null alleles. *Forensic Science International: Genetics*. 5(4): 329–332.

Krenke B.E., Tereba A., Anderson S. J., Buel E., Culhane S., Finis C.J., Tomsey C.S., Zachetti J.M., Masibay A., Rabbach D.R., Amriott E.A., Sprecher C.J. (2002) Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system. *J. Forensic Sci.* 47(4): 773-785.

Ladd C., Lee H., Yang N., Bieber F. (2001). Interpretation of complex forensic DNA mixtures, *Croat. Med. J.* 43:244–246.

Ladd, C., Lee, H.C., Bieber, F.R. (2000). Probability of exclusion estimates in forensic analysis of complex DNA mixtures. *Proceedings of the American Academy of Forensic Sciences 52nd Annual Meeting; 2000 Feb 21-26; Reno, Nevada, USA*’ içinde.

Leclair, B., Fregeau, C.J., Bowen, K.L., Fourney, R.M. (2004). Systematic Analysis of Stutter Percentages and Allele Peak Height and Peak Area Ratios at Heterozygous STR Loci for Forensic Casework and Database Samples. *J Forensic Sci.* 49(5): 968-80.

Lygo, J.E., Johnson, P.E., Holdaway, D.J., Woodroffe, S., Whitaker, J.P., Clayton, T.M., Kimpton, C.P. and Gill, P. (1994). The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *International Journal of Legal Medicine*, 107: 77–89.

Mahony J., Chong S., Jang D., Luinstra K., Faught M., Dalby D., Sellors J., M. Chernesky. (1998). Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. *J. Clin. Microbiol.*, 36:3122-3126.

Malkoc, E., Neuteboom, W. (2007). The current status of forensic science laboratory accreditation in Europe. *Forensic Sci. Int.* 167:121–126.

Manabe, S., Mori, Y., Kawai, C. (2013). Mixture interpretation: Experimental and simulated reevaluation of qualitative analysis, *Leg. Med.* 15: 66-71.

Mcdonald J., Lehman C. (2012). Forensic DNA Analysis. *Clin Lab Sci.* 25(2):109-113.

- Moretti T.R., Baumstark A.L., Defenbaugh D.A., Keys K.M., Smerick J.B., Budowle B. (2001). Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J Forensic Sci.* 46(3):647–660.
- Morling, N., Allen, R.W., Carrecedo, A., Geada, H., Guidet, F., Hallenberg, C., Martin, W., Mayr, W.R., Olaisen, B., Pascali, V.L., Schneider, P.M. (2002). Paternity testing commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendation on genetic investigation in paternity cases. *Forensic Sci. Int.* 129:148–157.
- Mortera, J., Dawid, A.P., Lauritzen, S.L. (2003). Probabilistic expert systems for DNA mixture profiling. *Theoretical Population Biology* 63: 191–205.
- Mueller, O., Hahnenberger, K., Dittmann, M., Yee, H., Dubrow, R., Nagle, R. and Ilsley, D. (2000). A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis*, 21: 128–134.
- National Research Council Committee on DNA Forensic Science. (1996). *The Evaluation of Forensic DNA Evidence*. National Academy Press, pp 162-177, Washington, DC.
- Perlin M.W. (2010). Explaining the Likelihood Ratio in DNA Mixture Interpretation. 21th International Human Identification Sempozyumu Bildiri Kitapçığından.
- Perlin, M.W., Szabady, B. (2001). `Linear mixture analysis: a mathematical approach to resolving mixed DNA samples. *Journal of Forensic Sciences*, 46(6):1372-1378.
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., Taberlet, P. (2005). Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*. 6:847–859.
- Premalatha, B., Ramesh, V., Babu, S.K., Balamurali, P.D. (2014) Procedures to view aberrations-A travel from protein to gene: Literature review. *Indian J Dent Res.* 25:91-4.
- Puers C., Hammond H. A., Jin L., Caskey C. T., Schumm J. W. (1993). Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01[AATG]_n and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder. *Am. J. Hum. Genet*, 53(4): 953–958.

Rådström P., Knutsson R., Wolffs P., Lövenklev M., Löfström C. (2004). Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol.* 26:133-146.

Rådström, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lovenklev, M. and Lofstrom, C. (2004). Pre-PCR Processing. *Molecular Biotechnology.* 26(2): 133-146.

Reeder D.J. (1999). Impact of DNA Typing on Standards and Practice in the Forensic Community. *Arch Pathol Lab Med.* 123:1063–1065.

Schmitt C., Schmutzler, A., Prinz, M., Staak, M. (1994). High sensitive DNA typing approaches for the analysis of forensic evidence: comparison of nested variable number of tandem repeats (VNTR) amplification and a short tandem repeats (STR) polymorphisms. *Forensic Sci Int.*, 66: 129-41.

Schneider P.M., Bender K., Mayr W.R., Parson W., Hoste B., Decorte R., Cordonnier J., Vanek D., Morling N., Karjalainen M., Marie-Paule Carlotti C., Sabatier M., Hohoff C., Schmitter H., Pflug W., Wenzel R., Patzelt D., Lessig R., Dobrowolski P., O'Donnell G., Garafano L., Dobosz M., De Knijff P., Mevag B., Pawlowski R., Gusmão L., Conceicao Vide M., Alonso Alonso A., García Fernández O., Sanz Nicolás P., Kihlgreen A., Bär W., Meier V., Teyssier A., Coquoz R., Brandt C., Germann U., Gill P., Hallett J., Greenhalgh M. (2004). STR analysis of artificially degraded DNA-results of a collaborative European exercise. *Forensic Sci Int.*, 28;139(2-3):123-134.

Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) (2000) Short tandem repeat (STR) interpretation guidelines. *Forensic Science Communications* 2 (3); son erişim: 7/8/2014. www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-Communications/fsc/july2000/index.htm/strig.htm

Shrestha, S., Strathdee, S.A., Broman, K.W., Smith, M.W. (2006). Unknown biological mixtures evaluation using STR analytical quantification. *Electrophoresis* 27: 409-415.

Shutler G.G., Gagnon P., Verret G., Kalyn H., Korkosh S., Johnston E., Halverson J. (1999). Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human-canine stains from a five year old case. *J Forensic Sci*, 44(3):623–626.

Sparkes R., Kimpton C., Gilbard S., Carne P., Andersen J., Oldroyd N., Thomas D., Urquhard A., Gill P. (1996), The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework:(II) artefacts, casework studies, and success rates. *International Journal of Legal Medicine*, 109: 194-204.

Sparkes R., Kimpton C., Watson S., Oldroyd N., Clayton T., Barnett L., Arnold J., Thompson C., Hale R., Chapman J., Urquhard A., Gill P. (1996). The validation of a 7-loci multiplex STR test for use in forensic casework: mixtures, ageing, degradation and species studies. *International Journal of Legal Medicine*, 109: 186-194.

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. *International Journal of Legal Medicine*. 109:186-194.

Szibor, R., Edelmann, J., Hering, S., Plate, I., Wittig, H., Roewer, L., Wiegand, P., Cali, F., Romano, V., Michael M.(2003). Cell line DNA typing in forensic genetics—the necessity of reliable standards. *Forensic Science International*. 138 (1): 37 – 43.

Torres, Y., Flores, I., Prieto, V., Lopez-Soto, M., Farfan, M.J., Carracedo, A., Sanz, P. (2003) DNA mixtures in forensic casework: a 4-year retrospective study. *Forensic Sci. Int.* 134: 180-186.

Tvedebrink, T., Eriksen, P.S., Mogensen, H.S., Morling, N. (2009). Estimating the probability of allelic drop-out of STR alleles in forensic genetics. *Forensic Science International: Genetics*. 3(4) :222 – 226.

Van Nieuwerburgh, F., Goetghebeur, E., Vandewoestyne M., Deforce, D. (2009). Impact of allelic dropout on evidential value of forensic DNA profiles using RMNE. *Bioinformatics*. 25(2):225-229.

van Oorschot R.A.H., Ballantyne K.N., Mitchell R.J. (2010). Forensic trace DNA: a review. *Investigative Genetic*. 1:14.

Walsh, P.S., Fildes, N.J., Reynolds, R. (1996). Sequence Analysis and Characterization of Stutter Products at the Tetranucleotide Repeat Locus VWA. *Nucl. Acids Res.* 24(14): 2807-2812.

Weir, B.S. (2003) Forensics. Balding, Handbook of Statistical Genetics, (D. J., Bishop, M. and Cannings, C. eds) John Wiley & Sons. 2nd Edition. pp. 830–852, Hoboken, New Jersey,”içinde.

Weir, B.S., Triggs, C.M., Starling, L., Stowell, L.I., Walsh, K.A.J., Buckleton, J. (1997). Interpreting DNA mixtures. *J Forensic Sci.* 42(2):213-222.

Welch, L.A. , Gill, P., Phillips, C., Ansell, R., Morling, N., Parson,W., Palo, J.U., Bastisch, I. (2012). European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): Evaluation of new commercial STR multiplexes that include the European Standard Set (ESS) of markers. *Forensic Sci Int Genet.* 6(6):819-826.

Wilson, I.G. (1997). Inhibition And Facilitation Of Nucleic Acid Amplification. *Appl Environ Microbiol.* 63(10): 3741–3751.

9. EKLER

EK 1. Bilgilendirilmiş Olur Formu

Çalışmanın Adı: Karışmış Örneklerde STR Analizi ve Yorumlanması

Bu çalışma; Doktora Tez çalışmasıdır.

Araştırmanın amacı; Adli bilimlerde DNA kanıtının yorumlanması, analitik sürecin en önemli kısmıdır. İlgili delilin ve referans materyal karşılaştırılması tecrübe ve dikkat gerektiren bir aşamadır. Analistler zaman zaman karışık DNA örnekleri ile karşı karşıya gelebilirler. Delil niteliği taşıyan bu örnekler birden fazla kişinin DNA'sını içerebilir. Karışık DNA örneklerinin yorumlanmasında kullanılan farklı yaklaşımlar mevcuttur. Bu yaklaşımlar; genotipler belirlendikten sonra eşleşme olasılığını tahmin etmek, dışlama olasılığını ve benzerlik olasılığını hesaplamak gibi işlemlerden oluşmaktadır. Son yıllarda çeşitli ülkelerdeki hukuk sistemleri bu istatistiksel hesaplama işlemlerinden faydalanmaktadırlar. Bunun için birçok yazılım programı geliştirilmiştir. Bu çalışmadaki öncelikli amacımız karışım DNA örneklerinde kullanılan istatistiksel mekanizmaların anlaşılması ve bu kavramların adli bilimlere uygulanmasıdır. Böylece karışık örneklerdeki katılımcı sayısı belirlenebilecek ve STR analizi sırasında hangi verilerin göz ardı edilip edilmeyeceği belirlenecektir. Çalışmamızda kullanılacak olasılık yöntemleri sonucunda karışımında bulunan kişi sayısı ve materyallerin kime ait olduğu sorularına yanıt aranacaktır.

Gönüllüye yapılacak, araştırma için harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyecektir. Ayrıca kendisine hiç bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmanın deneysel kısımları; Tez çalışmasında, çalışmaya rıza gösteren yaklaşık 20 kişiden alınan kan ve tükürük örnekleri kullanılacaktır. Araştırmanın laboratuvar aşaması ise altı bölümden oluşmaktadır.; DNA izolasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılarak hedef bölgelerin çoğaltılması işlemi gerçekleştirilecektir, PCR ürünlerinin elektroforezi ve analizi yapılacaktır(ABI 310 Genetic Analyzer, GeneScan Software). Sonuçlar belirli yazılımlar kullanılarak, karışım örneklerindeki katılımcı sayısı ve bu katılımcıların STR analizine yaptıkları alel katkıları istatistiksel hesaplamalar kullanılarak belirlenecektir. Son olarak tez yazım aşamasına geçilecektir.

Gönüllünün araştırmaya katılımı isteğe bağlı olup, istediği zaman herhangi bir yaptırıma maruz kalmaksızın araştırmadan çekilebilecektir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcı araştırma dışı bırakılabilir.

İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Bakanlık ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimleri bulunabilecektir. Ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır

İlgili mevzuat gereğince gönüllünün kimliğini ait kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanamayacağı; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliği gizli kalacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verilmektedir.

Gönüllünün araştırma veya kendi hakları ile ilgili daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçeceği araştırmacı Tolga Zorlu' dur. Araştırmacıya günün 24 saatinde erişebilecek telefon numaraları; 0(541) 369 02 63, 0 (533) 868 14 30,dur.

Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı; Tez çalışmasında, çalışmaya rıza gösteren yaklaşık 20 kişiden alınan kan, tükürük ve saç örnekleri kullanılacaktır.

Gönüllülerden elde edilecek olan Biyolojik Materyal; Proje yürütücüsü tarafından gönüllülerden tıbbi personel yönetiminde ve denetiminde gerekli örnekler alınacaktır. Çalışma, İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü öğrenci laboratuvarında yapılacaktır.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen sorumlu araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

“Karışmış Örneklerde STR Analizi ve Yorumlanması” tez çalışması kapsamında alınan biyolojik örneğimin (kan veya tükürük);

(Gönüllü tarafından uygun olan şık işaretlenmelidir)

- ☐ Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.”

Gönüllünün Adı:

Yetkin Araştırmacının Adı: Tolga

Gönüllünün Soyadı:

Yetkin Araştırmacının Soyadı: Zorlu

Gönüllünün İmzası:

Yetkin Araştırmacının İmzası:

Tarih:

Tarih:

NOT:

1. BGOF, gönüllü ve/veya yasal temsilcisinin yasal haklarını ortadan kaldıracak bir hüküm veya ifade içeremez ayrıca araştırmacıyı, kurumu, destekleyici veya bunların

temsilcilerini kendi ihmallerinden kaynaklanan herhangi bir yükümlölükten kurtaracak hüküm veya ifade taşıyamaz.

2. Gönüllülerden elde edilen biyolojik materyaller üzerinde genetik araştırma yapılabilmesi için Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunda (BGOF):

- “[Çalışmanın Adı] çalışması kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (kan, tükürük ve saç);
- (Gönüllü tarafından uygun olan şık işaretlenmelidir)
- ☐ Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.”

şeklinde gönüllünün konu ile ilgili rızası, Etik Kurul onayı ve Sağlık Bakanlığı izni alınmak suretiyle yapılması gerekmektedir.

EK 2. Etik Kurul Kararı

 **T.C. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU 

Sayı : 83045809/ 5967
Konu:

İstanbul / /

12 Mart 2013

İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü
Müdürlüğüne

İLGİ: 19.02.2013 tarihli, 370 sayılı yazınıza:

Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Öğretim üyesi Yard.Doç.Dr.Gönül FİLOĞLU'nun danışmanlığında Doktora Öğrencisi Yüksek Biyolog Tolga ZORLU'nun yürütlüğünde "Karışmış Örneklerde STR Analizi ve Yorumlanması" başlıklı Doktora Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 05 Mart 2013 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bulgilerinizi,durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim.

Eki:
1 dosya

T.C. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
Adli Tıp Enstitüsü
GELEN EVRAK
Sayı : 2013/586
Tarih : 18-3-2013

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Not: Yanıtlarımızda yazımızın gün ve sayısını belirtilmesi rica olunur.
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa İSTANBUL
Telefon: 0 (212) 414 32 52 Dahili: 22300 Faks: 0(212) 632 00 40 e-posta:etik@istanbul.edu.tr.

MÜDÜR

EK 3. A Kodlu Senaryo Dosyası

Tablo 56. Aynı dosyada (A) görülen üç farklı profil, ortak paylaşılan aleller, mağdur ve şüpheli profilleri.

LOKUSLAR	A1	A2	A3	Ortak	Mağdur	Şüpheli
D8S1179	12-14	12-13-14	12-13-14	12-14	12-14	13-15
D21S11	29-32.2	29-32.2-35	29-30-32,2	29-32.2	29-29	30-32.2
D7S820	8-12-13	8-12-13	8-12-13	8-12-13	8-13	11-12
CSF1PO	10-11	10-11	10-11	10-11	10-11	10-11
D3S1358	15-16-17	15-16-17	15-16-17	15-16-17	15-17	16-16
THO1	6-8	6-8-9	6-8	6-8	6-6	8-9
D13S317	10-11-12	10-11	8-10-11	10-11	10-11	8-8
D16S539	10-12-13	10-12-13	10-12-13-14	10-12-13	10-13	11-12
D2S1338	17-24-25	24-25	17-24-25	24-25	24-25	17-24
D19S433	13-14-15	13-14	13-14	13-14	13-14	13-14
vWA	17	15-17	17	17	17-17	15-17
TPOX	8-11	8-11	8-11	8-11	8-11	8-8
D18S51	15-16	15-16	12-15-16	15-16	15-16	15-20
D5S818	10-12-13	12-13	12-13	12-13	12-13	10-12
FGA	19-20-25	19-20-25	19-20-25	19-20-25	19-20	24-25
AMEL	X-Y	X-Y	X-Y	X-Y	X-X	X-Y

EK 3. Devamı**Tablo 57.** A dosyasına ait çeşitli profillerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

Örnek	Hp/Hd	Olası Alel Düşmesi Aralığı	Seçilen Alel Düşmesi Olasılığı	Son Olabilirlik Oranı (LR)	Performans Testi Sonuçları
A1	V+S/V+U	0.062-0.37	0.062	3.18e-05	$\log 10^{-10}/^{-31}$
A2	V+S/V+U	0.16-0.32	0.16	21	$\log 10^{-4}/^{-25}$
A3	V+S/V+U	0.062-0.32	0.062	0.01945	$\log 10^{-11}/^{-38}$
A1+A2+A3	V+S/V+U	0.11-0.32	0.11	1.866e-06	$\log 10^{-37}/^{-80}$
Ortak Profil	V+S/V+U	0.22-0.47	0.22	3.036	$\log 10^{-5}/^{-19}$

10. ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Tolga Zorlu

Doğum Yeri : K.K.T.C.

E-Posta : tolgazorlu1@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Lise : 2000-2003 Türk Maarif Koleji, Lefkoşa

Lisans : 2003-2007 Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji, Bursa

Yüksek Lisans : 2008-2010 Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji, Bursa

Yabancı Dil : İngilizce

Eserler

Nasibov E, Bulbul O, Jabrayili G, Zorlu T, Shahzad MS, Cengiz S, Filoglu G, Altuncul H, Sadixov G. “Allele frequencies of 15 STR loci in Azerbaijan population.” Forensic Sci Int Genet. 2013 April; doi: 10.1016/j.fsigen.2013.03.004.

K. Teralı, T. Zorlu, O. Bulbul, C. Gurkan. Population Genetics of 17 Y-STR Markers in Turkish Cypriots from Cyprus Forensic Sci Int Genetics. January 2014. in press, available online doi:10.1016/j.fsigen.2014.01.003

Filoglu G., Bulbul O., Rayimoglu G., Yediay E., Zorlu T., Ongoren S., Altuncul H. (2014) Evaluation of reliability on STR typing at leukemic patients used for forensic purposes Molecular Biology Reports, Jun;41 (6): 3961-72.

Gündüz Sadixov, Özlem Bülbül, Elnur Nasibov, Gündüz Jabrayili, Tolga Zorlu, Havva Altunçul, Gönül Filoğlu, Müjgan Cengiz, Salih Cengiz (2012) 15 Somatik STR lokusunun Azerbaycan Toplumunda Gen Sıklığı, X Adli Bilimler Kongresi, İstanbul, Türkiye.

O. Bulbul , C Phillips, A. Freire Aradas , Y. Ruiz, T. Gross , T. Zorlu , G. Filoglu, H. Altuncul, Á. Carracedo, P.M. Schneider Testing 86 SNPs performance for the simultaneous prediction of biogeographic ancestry (BGA) and pigmentation type. 25th ISFG Congress, Melbourne, 2013.