

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Prof. Dr. Faruk AŞICIOĞLU

36-INDELPLEX PANELİNİN TÜRLER ARASINDA ÖZGÜLLÜĞÜNÜN
BELİRLENMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOG MELİS İŞİK
İSTANBUL, 2022

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Prof. Dr. Faruk AŞICIOĞLU

36-INDELPLEX PANELİNİN TÜRLER ARASINDA ÖZGÜLLÜĞÜNÜN
BELİRLENMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOG MELİS İŞİK

İSTANBUL, 2022

Bu tez T.C. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 35882

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi süresince değerli deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan, kıymetli zamanını benden esirgemeyen sevgili danışmanım, sayın hocam ***Prof. Dr. Faruk Aşıcioğlu'na,***

Tez çalışmam süresince yol göstericiliği ile sorunların çözümünde her daim yanımda olan kıymetli hocam ***Doç. Dr. Gönül Filoğlu Tüfek'e,***

Bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan değerli hocam ***Doç. Dr. Lora Koenhemi'si'ye,***

Süreç boyunca desteğini eksik etmeyen güler yüzlü hocam ***Arş. Gör. Ayşegül Şen Yılmaz'a,***

Laboratuvarda yardımlarını benden esirgemeyen meslektaşlarım ***S. Zülal Şimşek, Hande Ertürk ve Sena Er'e,***

Tez süresince beraber çalıştığım, yüksek lisans eğitiminin bana kazandırdığı değerli arkadaşlarım- meslektaşlarım ***İpek Gürel, Aleyna İlhan ve Özgür Dayanır'a,***

Verdikleri destek ve moral ile sevgilerini her daim hissettiğim değerli dostlarım ***Onur Özgür, Yağmur Çoruh, Aygün Nişancı, Kaan Akel, N. Ceren Aktaş ve İzel Eskiciođlu'na,***

Son olarak, sonsuz sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim, bugünlere gelmemi sağlayan, beni yetiştiren canım ***Aileme; Anneme, Babama ve Erkek Kardeşime*** en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Melis Işık

Tablolar ve Grafikler Dizini

Tablo I: 36 InDel lokusu (84)	28
Tablo II: InDel PCR bileşenlerinin optimum değerleri	30
Tablo III: Optimum PCR koşulları	31
Tablo IV: Elektroforez için gerekli olan bileşenler	31
Tablo V: Elektroforez koşulları	32
Tablo VI: Kan örneklerine ait DNA miktarları	33
Tablo VII: 57 Hayvan Örneğine Ait InDel Lokus Sonuçları	36

Şekiller Dizini

Şekil 1: Çift sarmallı DNA'nın gösterimi (17)	8
Şekil 2: Adli genetik analizlerine ait zaman çizelgesi	9
Şekil 3: İnsersiyon ve delesyon polimorfizminin şematize gösterimi	17
Şekil 4: İnsersiyon oluşumu	19
Şekil 5: Delesyon oluşumu	20
Şekil 6: Negatif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü	38
Şekil 7: Pozitif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü	38
Şekil 8: At örneklerine ait elektroforegram görüntüsü	39
Şekil 9: İnek örneğine ait elektroforegram görüntüsü	39
Şekil 10: Kedi örneklerine ait elektroforegram görüntüsü	40
Şekil 11: Köpek örneklerine ait elektroforegram görüntüsü	40
Şekil 12: Koyun örneklerine ait elektroforegram görüntüsü	41
Şekil 13: Oğlak örneğine ait elektroforegram görüntüsü	41
Şekil 14: Martı örneklerine ait elektroforegram görüntüsü	42
Şekil 15: Şahin örneklerine ait elektroforegram görüntüsü	42
Şekil 16: Tavuk örneklerine ait elektroforegram görüntüsü	43

Kısaltmalar Dizini

A	Adenin
Alu	Arthrobacter luteus
AMG	Amelogenin
Ark	Arkadaşları
BL Buffer	Lizis tamponu (Lysis buffer)
C	Sitozin
CODIS	Kombine DNA indeks sistemi (Combined DNA index system)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dsDNA	Çift zincirli DNA (Double stranded DNA)
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FBI	Federal araştırma bürosu (Federal bureau of investigation)
G	Guanin
HBC Buffer	Yüksek tuzlu yıkama tamponu (High salt wash buffer)
HLA	İnsan lökosit antijeni (Human leukocyte antigen)
HLA-DQA1	Majör histo-uyumluluk kompleksi, sınıf II, DQ alfa 1
InDel	İnsersiyon ve delesyon polimorfizmi
LINE	Uzun serpiştirilmiş nükleer element (Long interspersed nuclear element)
mtDNA	Mitokondriyal DNA

PBS	Fosfat tamponlu salin (Phosphate buffered saline)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
RFLP	Sınırlayıcı fragman uzunluğu polimorfizmi (Restriction fragment length polymorphism)
RNA	Ribonükleik asit
RFU	Rölatif floresan ünitesi
Rpm	Dakikada atılan tur (rounds per mniute)
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism)
STR	Kısa tekrar dizileri (Short tandem repeat)
T	Timin
U	Urasil
VNTR	Değişken sayıda ardışık tekrarlar (Variable number tandem repeat)
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre

İçindekiler

Tablolar ve Grafikler Dizini.....	i
Şekiller Dizini	ii
Kısaltmalar Dizini	iii
Özet	1
Abstract.....	3
1. Giriş ve Amaç.....	5
2. Genel Bilgiler	7
2.1. Adli Biyoloji	7
2.2. Adli Bilimlerde DNA Analizinin Temelleri ve Gelişimi	9
2.3. Mutasyon	13
2.3.1. Kromozom Anomalileri	13
2.3.1.1. Sayısal Kromozom Anomalileri	13
2.3.1.2 Yapısal Kromozom Anomalileri	14
2.4. Polimorfizm	15
2.4.1. Gen Polimorfizmi	15
2.5. InDel (İnseriyon ve Delesyon)	16
2.5.1. İnseriyon	17
2.5.2. Delesyon.....	19

2.5.3. InDel Polimorfizmi ve Adli Genetikte Kullanımı	20
2.6. Validasyon ve Tür Özgüllüğü.....	21
3. Gereç ve Yöntem.....	23
3.1. Deneyde Kullanılan Gereçler.....	24
3.1.1. Ekipman	24
3.1.2. Ticari kitler.....	24
3.1.3. Ticari kit haricinde kullanılan malzemeler	24
3.1.4. Kapiler elektroforez için kullanılan malzemeler	25
3.2. Deney Aşaması	25
3.2.1. Etik kurul izni ve örneklerin toplanması.....	25
3.2.2. DNA izolasyonu ve miktar tayini.....	26
3.2.2.1. <i>E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek) ile kan örneklerinden DNA</i> <i>izolasyonu.....</i>	<i>26</i>
3.2.2.2. <i>Quant-it™ dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen) ile miktar tayini.....</i>	<i>27</i>
3.2.3. PCR.....	28
3.2.3.1. <i>PCR bileşenlerinin hazırlanması</i>	<i>30</i>
3.2.3.2. <i>PCR koşulları.....</i>	<i>30</i>
3.2.4. PCR ürünlerinin Genetik Analizör cihazı ile analizi	31
3.2.4.1. <i>Örneklerin hazırlanması.....</i>	<i>31</i>
3.2.4.2. <i>Örneklerin elektroforezi</i>	<i>32</i>

3.2.5. Verilerin analizi ve sonuçların değerlendirilmesi.....	32
4. Bulgular	33
4.1. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu ve DNA Miktarının Belirlenmesi	33
4.2. Elektroforez Aşaması	34
5. Tartışma ve Sonuç	44
6. Kaynakça	48
Ekler.....	58
Özgeçmiş	59

Özet

Biyolojik delillerin bulunduğu birçok adli vakada, DNA düzeyinde kimliklendirme yapılarak faillere ulaşılabilmektedir. Moleküler genetik alanında yapılan yenilikler arasında bulunan InDel'ler, insan genomundaki bazların insersiyonuna (eklenmesine) ve delesyonuna (çıkarılmasına) dayanan ve STR/SNP gibi sistemlere alternatif olarak kullanılmaya başlanmış bir polimorfizm çeşididir.

Bu çalışmada cinsiyet belirteci olan Amelogenin (AMG-XY), otozomal kromozomlar üzerinde bulunan 35 InDel (rs34660708, rs34495360, rs2308135, rs2307521, rs2308112, rs2308163, rs1610919, rs2308137, rs16646, rs144389514, rs56168866, rs16671, rs33972805, rs25549, rs16722, rs2067304, rs140861207, rs1160981, rs4646006, rs6480, rs28369942, rs2307838, rs3062629, rs10590424, rs16458, rs10623496, rs1610937, rs16363, rs2067147, rs1160965, rs2307656, rs2308101, rs2308072, rs2067191) lokusu ve Y kromozomu üzerinde bulunan (rs2032678) 1 InDel lokusundan oluşan 36-InDelplex panelinin hayvan türleri arasında özgüllüğünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

DNA analizi için adli olaylarda karşılaşılma olasılığı yüksek hayvanları yansıtacak şekilde, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veterinerlik Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hayvan Hastanesinden, tanı/tedavi amacı ile başvurmuş, veteriner hekim tarafından alınmış 57 hayvana ait kan örnekleri ilgili hastane laboratuvarından toplandı. DNA izolasyonu E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit protokolüne göre gerçekleştirildi. 36 InDel lokusu çoğaltıldı. PCR ürünleri, Applied Biosystems™ 3500 Genetik Analizörde yürütüldü ve GeneMapper v.5.0 yazılım programında analiz edildi. Elde edilen sonuçların ayırım gücü ve özgünlük değerleri Microsoft® Excel programı ile değerlendirildi.

Bu çalışma bulgularına göre ID16 (rs16646) lokusu deneylerde kullanılmış bütün kedi ve köpek örneklerinde yüksek RFU seviyeleri ile pik gösterdi. ID14 (rs144389514) lokusu deneylerde kullanılmış 10 kedi örneğinde yüksek RFU seviyeleri ile pik gösterdi. ID28 (rs2067147) lokusu deneylerde kullanılmış 1 inek örneğinde yüksek RFU seviyesi ile pik göstermiştir.

Çalışmada temel alınan 36-InDelpex panelinde yer alan InDel lokusları dışında yer almakla birlikte inek, koyun, oğlak ve köpek örneklerinde farklı lokus aralıklarında yüksek RFU seviyeleri gösteren pikler görülmüştür.

rs34660708 (ID26), rs34495360 (ID31), rs2308135 (ID23), rs2307521 (ID3), rs2308112 (ID22), rs2308163 (ID27), rs1610919 (ID25), rs2308137 (ID15), rs56168866 (ID21), rs16671 (ID32), rs33972805 (ID24), rs25549 (ID30), rs16722 (ID29), rs2067304 (ID9), rs140861207 (ID5), rs1160981 (ID12), rs4646006 (ID1), rs6480 (ID34), rs28369942 (ID4), rs2307838 (ID2), rs3062629 (ID18), rs10590424 (ID11), rs16458 (ID17), rs10623496 (ID20), rs1610937 (ID10), rs16363 (ID35), rs1160965 (ID7), rs2307656 (ID8), rs2308101 (ID33), rs2308072 (ID19), rs2067191 (ID13), rs2032678 (ID36) ve AMG-XY (ID37) lokuslarında değerlendirilmeye dahil edilebilecek pik gözlemlenmemiştir.

Sonuç olarak, geliştirilen 36-InDelpex paneli çalışmada yer alan hayvan türlerinde ID16, ID14 ve ID28 lokusları dışında etkileşim göstermemiş olup, panelin yüksek oranda insan türü özgüllüğü gösterdiği görülmüştür. Bu çalışmada insan DNA'sı ile yakınlık gösteren primatlar çalışılmamış olup primatların, geliştirilen kitin kullanılacağı olay yerinin bulunduğu coğrafyaya uygun olacak türler ve araştırmamızda yer almayan farklı türlerle çalışma yapılması ile kitin özgüllüğü hakkında kesinlik gösterebilecek sonuçlar elde edilebilecektir.

Anahtar Kelimeler: Adli genetik, InDel polimorfizmi, Tür özgüllüğü, DNA genotipleme

Abstract

In many forensic cases where there is biological evidence, the perpetrators can be reached by identification at the DNA level. InDels, which are among the innovations made in the field of molecular genetics, is a type of polymorphism based on the insertion (addition) and deletion (removal) of bases in the human genome and started to be used as an alternative to systems such as STR / SNP.

In this study, it was aimed to determine the specificity of the 36-InDelplex panel, which consists of the sex marker Amelogenin (AMG-XY), 35 InDel (rs34660708, rs34495360, rs2308135, rs2307521, rs2308112, rs2308163, rs1610919, rs2308137, rs16646, rs144389514, rs56168866, rs16671, rs33972805, rs25549, rs16722, rs2067304, rs140861207, rs1160981, rs4646006, rs6480, rs28369942, rs2307838, rs3062629, rs10590424, rs16458, rs10623496, rs1610937, rs16363, rs2067147, rs1160965, rs2307656, rs2308101, rs2308072, rs2067191) loci on autosomal chromosomes, and 1 InDel locus on the Y chromosome (rs2032678) among animal species.

For DNA analysis, blood samples belonging to 57 animals were collected by a veterinarian, applied to Istanbul University-Cerrahpaşa Faculty of Veterinary Medicine Research and Application Animal Hospital for diagnosis/treatment, and collected from the relevant hospital laboratory reflecting animals that are likely to be encountered in forensic events. DNA isolation E.Z.N.A. ® Tissue DNA Kit was performed according to the protocol. 36 InDel loci were replicated. PCR products were run on the Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer and analyzed in the GeneMapper v.5.0 software program. The discrimination and originality values of the obtained results were evaluated with the Microsoft® Excel program.

According to the findings of this study, the ID16 (rs16646) locus peaked with high RFU levels in all cat and dog samples used in the experiments. The ID14 (rs144389514) locus peaked with high RFU levels in 10 cat samples used in the experiments. The ID28 (rs2067147) locus showed a peak with a high RFU level in 1 cow sample used in the experiments.

In addition to the InDel loci in the 36-InDelplex panel based on the study, peaks showing high RFU levels were observed in different loci ranges in cow, sheep, kid(goat), and dog samples.

No peaks that could be included in the assessment were observed at the rs34660708 (ID26), rs34495360 (ID31), rs2308135 (ID23), rs2307521 (ID3), rs2308112 (ID22), rs2308163 (ID27), rs1610919 (ID25), rs2308137 (ID15), rs56168866 (ID21), rs16671 (ID32), rs33972805 (ID24), rs25549 (ID30), rs16722 (ID29), rs2067304 (ID9), rs140861207 (ID5), rs1160981 (ID12), rs4646006 (ID1), rs6480 (ID34), rs28369942 (ID4), rs2307838 (ID2), rs3062629 (ID18), rs10590424 (ID11), rs16458 (ID17), rs10623496 (ID20), rs1610937 (ID10), rs16363 (ID35), rs1160965 (ID7), rs2307656 (ID8), rs2308101 (ID33), rs2308072 (ID19), rs2067191 (ID13), rs2032678 (ID36) and AMG-XY (ID37) loci.

As a result, the developed 36-InDelplex panel did not show any interaction other than the ID16, ID14, and ID28 loci in the animal species included in the study, and it was seen that the panel had a high human species specificity. In this study, primates that show affinity with human DNA were not studied, and it will be possible to obtain results that can show certainty about the specificity of the kit by working with the species that will be suitable for the geography of the crime scene where the developed kit will be used, and by working with different species that are not included in our research.

Keywords: Forensic genetics, InDel polymorphism, Species specificity, DNA genotyping

1. Giriş ve Amaç

Adli genetik alanında, bireylerin kimliklerinin belirlenmesi ve babalık tayini sorunları temel olarak DNA genetik belirteçlerinin (markırlarının) genotiplendirilmesi ile çözülmektedir. Kısa tandem tekrarları (STR'ler), yüksek polimorfizmlerine ve farklı ulusların mevcut alel frekansı verilerine bağlı olarak en yaygın kullanılan genetik belirteçler haline gelmiştir (1).

DNA profili oluşturma, 21 yıl önce tesadüfen ortaya çıkmasından bu yana çok yol kat etmiş ve dünya çapında milyonlarca insanın hayatına doğrudan dokunarak; bireyleri, toplumu ve hukuku derinden etkilemiştir (2). Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) kısa bir ampikon, düşük mutasyon oranı ve insan genomunda STR'lerin dezavantajlarını tamamlayan yüksek yoğunlukta özelliklere sahiptirler (3). STR'lere ve SNP'lere ek olarak, insersiyon ve delesyon polimorfizmleri (InDel), diğer genetik belirteçlerle kombine edilmesinin olası avantajları nedeniyle giderek daha fazla araştırılmaktadır (4).

İnsersiyon / delesyon polimorfizmleri (InDel'ler), genomdaki bir veya daha fazla nükleotidin eklenmesi veya çıkarılması ile üretilen uzunluk polimorfizmleridir (5). InDel belirteçleri, SNP'lerden sonra tüm insan genomunda ikinci en yaygın DNA polimorfizmi türüdür. InDel'lerin basitleştirilmiş analiz süreci, SNP'lere kıyasla prosedürün yürütülmesini kolaylaştırır (4). Genel olarak hem STR'lerin hem de SNP'lerin özelliklerini birleştirerek, iki yöntem arasındaki boşluğu doldurur ve STR'nin basitliğini kaybetmeden azaltılmış ampikon boyutunu kullanmanın başka bir yolunu oluşturur (5). Bu nedenle InDel, adli tıp uygulamalarındaki zorlu vakalarda alternatif bir belirteç sistemi olarak etkili olabilir (4).

Olay yerinden gelen az miktarda ve çevresel koşullar nedeniyle degrede (bozulmuş) olmuş biyolojik örneklerde STR ile çoğu zaman kimliklendirme mümkün olmamaktadır (6). InDel'ler keşfedilip haritalandığından bu yana, kullanılarak multipleks amplifikasyon sistemleri oluşturmak

için birçok çalışma bildirilmiştir. Yayınlanan araştırmalara göre, InDel'ler kişisel tanımlama (kimliklendirme), babalık testi, biyocoğrafik ataların çıkarılması ve ölüm sonrası materyal, insan tümör dokusu, iskelet/kemik kalıntıları ve parafine gömülü dokular gibi spesifik materyallerin genotiplendirilmesi için kullanılmıştır (5). InDel'ler, nispeten uygun ve ucuz bir teknik olan PCR ürünlerinin geleneksel kapiler elektroforezi ile doğrudan tespit edilebilir. InDel belirteçlerinin yukarıda bahsedilen güçlü yönleri nedeniyle, diğer genetik belirteçlerin yanı sıra STR'lerin ve SNP'lerin adli uygulamalarını tamamlayabilen genetik varyasyon çalışması için umut verici bir genetik belirteç olarak kabul edilebilirler (7). Adli genetikte InDel çalışmalarının ortaya çıkmasıyla birlikte birçok araştırmacı, farklı kromozomal konumları kapsayan bu umut verici genetik belirteç daha fazla odaklanmıştır (8-10).

Adli vakalarda olay yerinde insana ait olmayan türlerin DNA'sına da rastlanabilmekte, bu nedenle üretilmek istenen panellerin bu gibi durumlarda insana özgü çalışılabilirliği test edilmektedir (11).

Bu tez çalışmasında Filoğlu ve ark. tarafından geliştirilen, Türkiye popülasyonu için yüksek polimorfizm gösteren böylelikle adli kimliklendirmede kullanılabilen, otozomal kromozomlar üzerinde bulunan 35 InDel (rs34660708, rs34495360, rs2308135, rs2307521, rs2308112, rs2308163, rs1610919, rs2308137, rs16646, rs144389514, rs56168866, rs16671, rs33972805, rs25549, rs16722, rs2067304, rs140861207, rs1160981, rs4646006, rs6480, rs28369942, rs2307838, rs3062629, rs10590424, rs16458, rs10623496, rs1610937, rs16363, rs2067147, rs1160965, rs2307656, rs2308101, rs2308072, rs2067191) lokusu, cinsiyet belirteci olan Amelogenin (AMG-XY) ve Y kromozomu üzerinde bulunan (rs2032678) InDel lokusundan oluşan 36-InDelplex panelinin insana özgüllüğünün tespit edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla adli vakaların gerçekleştiği olay yerlerinde sıklıkla karşılaşma olasılığı bulunan çeşitli hayvan türleri çalışılarak geliştirilmiş olan panelin insana özgün olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Genel Bilgiler

2.1. Adli Biyoloji

Adli biyoloji, şüpheli veya mağdur, bir veya daha fazla kişiyi bir yer, bir nesne (veya nesnelere topluluğu), başka bir kurban veya şüpheli ile ilişkilendirmek için biyoloji biliminin uygulanmasıdır (12). Bu disiplin hem ceza hem de hukuk davalarında ileri araştırmalar için kullanılabilir. Kanıtları toplarken, işlerken ve analiz ederken sürekli akılda tutulması gereken en önemli faktörlerden ikisi, özellikle çoğu biyolojik kanıtın doğası göz önüne alındığında, gözetim zincirini korumak ve kontaminasyonu önlemektir (13).

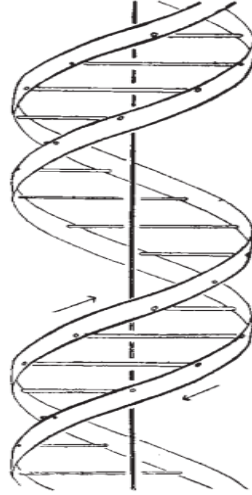
Adli bilimler çok disiplinli bir alan olup adli biyoloji, adli antropoloji, adli entomoloji, adli odontoloji, adli psikoloji, adli toksikoloji ve daha birçok adli disiplinden birisidir ve bu disiplinler arasında önemli bir yer işgal eder. "Adli biyoloji" daha genel bir terim olmakla birlikte günümüzde sıklıkla tek başına ya da adli genetik terimi kullanılarak, genellikle DNA analizi yöntemi ile biyolojik kanıtların tanımlanmasını ifade eder.

DNA profili, suçluların profillerini DNA delilleriyle karşılaştırarak suça dahil olma olasılıklarını değerlendiren, suç soruşturmalarında kullanılan adli bir tekniktir (14). Ayrıca ebeveynlik testlerinde, göçebelik durumun tespiti ve tıbbi araştırmalarda da kullanılır. DNA profili ayrıca zooloji, botanik ve tarımdaki hayvan ve bitki popülasyonlarının incelenmesinde de kullanılmıştır (15).

2.1.1. DNA (Deoksiribonükleik asit)

Deoksiribonükleik asit, bilinen tüm organizmaların ve birçok virüsün gelişme, işlev, büyüme ve üreme faaliyetleri için genetik talimatlar taşıyan çift sarmal zincirden oluşan bir moleküldür. Proteinler, lipidler ve kompleks karbonhidratların (polisakkaritler) yanı sıra nükleik asitler (DNA

ve RNA-ribonükleik asit), bilinen tüm yaşam formları için gerekli olan dört ana makromolekülden biridir. DNA ve RNA arasındaki en büyük fark şekerdir; DNA'daki 2-deoksiriboz, RNA'da şeker alternatif pentoz ribozu ile değiştirilir (16).



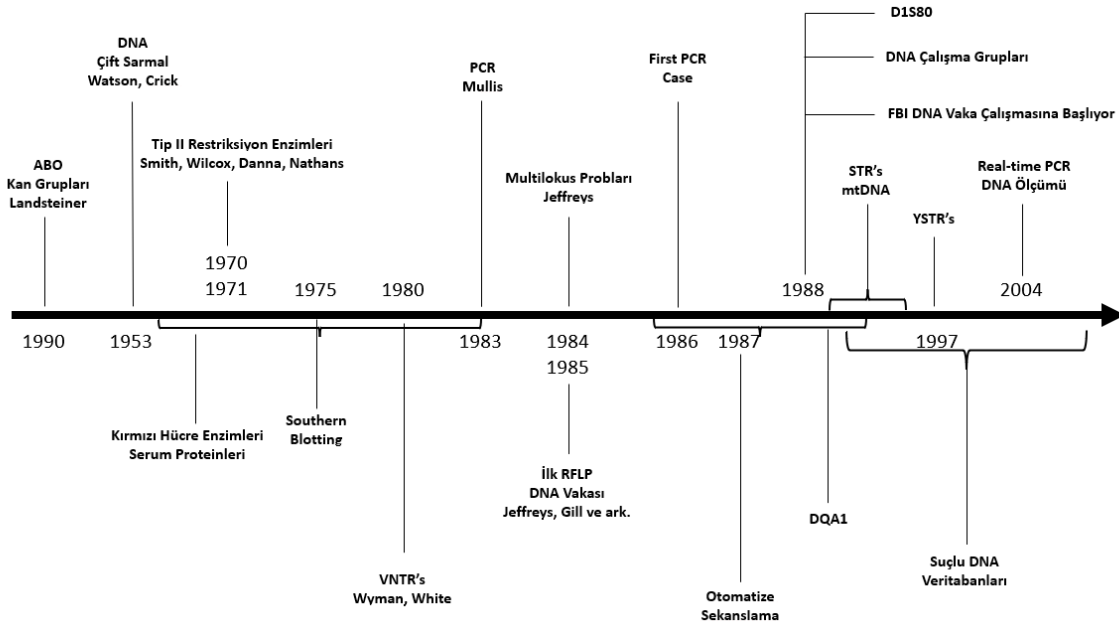
Şekil 1: Çift sarmallı DNA'nın gösterimi (17)

DNA tek bir zincir olarak değil, birbirine hidrojen bağlarıyla bağlanan iki sarmal zincirden oluşur (16,17). Her iki zincir de aynı eksen etrafında sarılır. Bu iki uzun iplik çift sarmal şeklinde birbirinin etrafında dolanır. DNA çift sarmalı temelde iki kuvvet tarafından stabilize edilir; bunlar nükleotidler arasındaki hidrojen bağları ve aromatik nükleobazlar arasındaki baz istifleme etkileşimleridir (18). DNA'da bulunan dört baz; adenin (A), sitozin (C), guanin (G) ve timindir (T). Bu dört baz, tam nükleotidi oluşturmak için şeker-fosfata bağlanır. Adenin ile timin, guanin ile sitozin eşleşerek A-T ve G-C baz çiftlerini oluşturur (16,18).

DNA zincirinin omurgası, değişken fosfat ve şeker gruplarından oluşur. DNA'daki şeker, bir pentoz (beş karbonlu) şeker olan 2-deoksiribozdur. Şekerler, bitişik şeker halkalarının üçüncü ve beşinci karbon atomları arasında fosfodiester bağları oluşturan fosfat gruplarıyla bağlanır. Bunlar 3'-uç (üç üssü) ve 5'-uç (beş üssü) karbonlar olarak bilinir; ana sembol, bu karbon atomlarını,

deoksiribozun bir glikosidik bağ oluşturduğu bazınkilerden ayırmak için kullanılır. Bu nedenle, herhangi bir DNA ipliği genellikle bir ribozun 5 ' karbonuna (5 ' fosforil) bağlı fosfat grubunun olduğu bir uca ve 3 ' karbonuna (3 ' hidroksil) bağlı serbest hidroksil grubunun bulunduğu başka bir uca sahiptir. Şeker-fosfat omurgası boyunca 3 ' ve 5 ' karbonlarının oryantasyonu, her bir DNA ipliğine yönlülük (polarite) verir. Bir nükleik asit çift sarmalında, bir zincirdeki nükleotidlerin yönü diğer zincirdeki nükleotidlerin yönünün tersidir, yani antiparaleldirler (19).

2.2. Adli Bilimlerde DNA Analizinin Temelleri ve Gelişimi



Şekil 2: Adli genetik analizlerine ait zaman çizelgesi

Tarihsel olarak, adli kimlik doğrulaması ABO kan grubu ve alt grupları sisteminin analizi ile başlamıştır. Daha sonra, kimlik tespiti için yeni belirteçler serum proteinlerinin ve kırmızı kan hücresi enzimlerinin varyasyonlarına dayanmıştır; bu süreçte son olarak insan lökosit antijen sistemi (HLA) kullanılmıştır (21). Birleşik Krallık'taki Leicester Üniversitesi'nde profesör ve genetikçi olan Sir Alec Jeffreys'in keşfi ise DNA tabanlı kimlik testine öncülük etmiştir (22).

Profesör Jeffreys, bireyler arasındaki genetik varyasyonları incelemekle ilgileniyordu ve insanlardaki genetik farklılıkları belirlemek için bazı çalışmalar yapmıştı. Ancak aradığı cevap, ilgilendiği ilk projede değil, bağımsız bir projede olan “İngiliz Antarktika Araştırması Merkezi’nde, fok etindeki miyogloblin geninin analizi” ile geldi. Jeffreys ve ark. , foklardaki miyogloblin genini insan muadili ile karşılaştırdıklarında, bazı kısa tekrar eden dizilerin foklar ve insanlar arasında homolog olduğunu buldular. Bu dizileri, minisatellitler adı verilen ardışık tekrarların yayınlanmış dizileriyle karşılaştırdıklarında aynı olduklarını buldular (23). Profesör Jeffreys, tekrar eden dizilerin "oldukça değişken, bilgilendirici genetik belirteçler" olabileceğini fark etti (22). Ekibi, kısa dizilerden oluşan, tekrar eden dizilere takılabilen ve nihayetinde her bireye özgü olan kalıpları ortaya çıkarabilen bir radyoaktif prob geliştirdi; DNA “parmak izi” (24).

Profesör Jeffreys, bir insan ailesinin DNA parmak izine; ayrıca bir ineğin, bir babunun, bir farenin ve bir tütün bitkisinin DNA parmak izlerine baktı. 15 ila 20 banttan oluşan DNA parçalarının modeli her biri için farklıydı. Bununla birlikte, insan ailesinin örüntüleri daha yakından incelendiğinde, anne ve babanın her birinin kendi örüntüsüne sahip olduğu ve çocuğun, babadan ve anneden birer alel miras almış bir bileşiğine sahip olduğu ortaya çıktı (25).

1985 baharında, Profesör Jeffreys ve ark. DNA parmak izi ile ilgili ilk makalelerini yayınladılar ve bunun adli bilimler ve babalık belirlemede faydasını gördüler. Gazeteler sonuçları yayınladı ve kısa bir süre sonra bir avukat testle ilgilenmeye başladı, temsil ettiği davalardan birinde testin uygulanabilirliğini gördü (26). 1986'nın sonunda, DNA profileme dünya çapında kullanılıyordu. DNA profili oluşturma, mikrosatellit olarak adlandırılan farklı tekrar eden dizilerin keşfine polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) eklenerek iyileştirilmiştir. PCR ile DNA amplifikasyonu duyarlılığı arttırmış, böylece arşivden ve kısmen bozulmuş örneklerden bile küçük miktarlarda DNA'nın analiz edilmesini mümkün kılmıştır(25).

DNA profili oluşturmak için kullanılan en eski yöntemler sınırlayıcı fragman uzunluğu polimorfizmi (RFLP) analizini içeriyordu. Tüm RFLP tabanlı yöntemler; kaynaklardan, laboratuvarlardan ve tekniklerden, genetik profilleri güvenilir bir şekilde karşılaştırmanın zorluğu nedeniyle engelleniyordu. İhtiyaç duyulan şey, ideal olarak tek bir çekirdekli hücreden ve ciddi şekilde bozulmuş DNA'dan bile yapılabilen bir DNA koduydu; bu kod, hızla üretilen, sayısal olarak şifrelenebilen, otomatik olarak karşılaştırılabilen ve mahkemede kolayca desteklenebilen bir koddu. RFLP analizlerine dayalı DNA parmak izi yöntemleri, genotiplemenin artan duyarlılığı, hızı ve doğruluğu nedeniyle 1990'ların başından itibaren yavaş yavaş PCR tabanlı yöntemler ile değiştirilmiştir. (27,28).

Değişken sayıda ardışık tekrarlar (VNTR) olarak da bilinen minisatellitler, birim uzunlukları 6 ila 100 baz arasında değişebilen tekrar eden dizilerden oluşur. Bu birimler, her bir minisatellite iki ila birkaç yüz kez tekrarlanabilir. Binlerce farklı minisatellit genom boyunca dağılmıştır, ancak bunlar genellikle telomerin yakınında veya kromozomun sonunda kümelenmişlerdir (29-31).

Kısa tekrar dizileri (STR) olarak da bilinen mikrosatellitler, uzunlukları 2 ila 6 baz arasında değişebilen bir birimden oluşur. Bu birim, her mikrosatellit lokusunda 5 ila 100 kez tekrarlanabilir. Binlerce farklı mikrosatellit genom boyunca rastgele dağılmıştır, ancak belirli bir alanda yer almaz (32,33).

STR'lerin adli uygulamalar için ideal olduğu görülmüştür. STR, tek lokuslu RFLP yöntemlerinden daha duyarlıdır, alelik düşmeye VNTR sistemlerinden daha az eğilimlidir (34) ve HLA-DQA1 gibi diğer PCR tabanlı profilleme yöntemlerinden daha ayırt edicidir (35).

ABD'de 1994 tarihli DNA Tanımlama Yasası, Federal Araştırma Bürosu (FBI) 'na bir pilot projeyi, şiddet suçlarını soruşturmak için bir araç olarak ulusal bir DNA veri tabanı olan Kombine

DNA İndeks Sistemine (CODIS) genişletme yetkisi verdi. CODIS, yerel, eyalet ve ulusal düzeylerdeki suç laboratuvarlarının DNA profillerini elektronik olarak değiştirmek ve karşılaştırmak için DNA analizini bilgisayar teknolojisiyle birleştirdi (36). Veri tabanı iki indeksten oluşur; suç mahalinde toplanan delillerden DNA profillerini içeren Adli indeks ve cinsel suçlardan ve diğer şiddet suçlarından hüküm giymiş kişilerin profillerini içeren Suçlu indeksi. Sistem, 13 STR lokusunun amplifikasyonuna dayanmaktadır (37).

Soy belirteçlerinin adli genetikte belirli kullanımları vardır. Y kromozom analizi, bir kadın kurbandan fazla DNA ve bir erkek saldırgandan sadece küçük bir DNA miktar olduğunda çok faydalıdır. Tipik örnekler arasında boşalma olmadan cinsel saldırı, vazektomi yapılmış bir erkek tarafından cinsel saldırı, bir kurbanın tırnaklarının altındaki erkek DNA'sı, deri üzerindeki erkek “dokunma” DNA'sı ve kadın kurbanın kıyafetleri veya eşyaları sayılabilir. Mitokondriyal DNA (mtDNA), az miktardaki DNA örneklerinin, yani tanımlanamayan (tipik olarak iskeletleşmiş) kalıntılardan, köksüz kıl gövdelerinden veya yalnızca çok bozulmuş DNA'nın mevcut olduğu eski örneklerin analizleri için önemlidir (38).

Y kromozomu ve mtDNA'nın rekombinant olmayan kalıtımı, bireysel örnekler arasındaki bir eşleşmenin istatistiksel doğruluğunu zayıflatır, ancak yöntemi, örneğin kitlesel afet araştırmalarında (39) veya tarihi rekonstrüksiyonlarda babalık veya annelik ilişkisinin yeniden inşası için verimli hale getirebilmektedir (40).

Kimlik ve akrabalık testi için küçültülmüş boyutlu ampikonları kullanan X-STR multipleksleri de bozulmuş DNA'yı analiz etmek için etkili bir sistem olmuştur (41,42). X-STR polimorfizmleri, otozomal STR'lere ek olarak tüm adli tanımlama vakalarında analiz edilebilir ve bu teknik, özellikle biyolojik ebeveynlerin bilinmediği vakaların çözümünde yardımcı olabilir (43).

2.3. Mutasyon

Biyolojide mutasyon, bir organizmanın, virüsün veya ekstrakromozomal DNA'nın genomunun nükleotid dizisindeki bir değişikliktir. Mutasyonlar, DNA veya viral replikasyondan, mitoz / mayoz sırasındaki hatalardan veya DNA'daki diğer hasar türlerinden (ultraviyole radyasyona maruz kalmanın neden olduğu pirimidin dimerleri gibi) kaynaklanır ve bu daha sonra hataya meyilli onarıma (özellikle mikrohomojoloji aracılı uç birleştirme (44)), diğer onarım biçimleri sırasında bir hataya (45,46) veya çoğaltma sırasında bir hataya neden olabilir. Mutasyonlar, yer değiştirebilen genetik elementler nedeniyle DNA segmentlerinin insersiyonundan veya delesyonundan da kaynaklanabilmektedir (47,48).

2.3.1. Kromozom Anomalileri

Bir kromozom anormallik (kromozomal mutasyon/anomali), kromozomal DNA'nın eksik, ek veya düzensiz bir parçasıdır. Bunlar, atipik bir kromozom sayısına sahip sayısal anomaliler, bir veya daha fazla kromozomun değiştirildiği yapısal anomaliler şeklini alabilir. Hücre bölünmesi sürecinde bir hata meydana geldiğinde ortaya çıkar. Kromozomal anormallikler, genetik testler kullanılarak bir bireyin veya tüm kromozom setinin türe özgü bir karyotip ile karşılaştırılmasıyla saptanabilir veya doğrulanabilir (49).

2.3.1.1. Sayısal Kromozom Anomalileri

Anormal sayıda kromozom, anöploidi olarak bilinir ve bir kişi, çiftten bir kromozomu kaybettiğinde (monozomi) veya bir çiftte ikiden fazla kromozomuna sahip olduğunda (trizomi, tetrasomi vb.) oluşur. Anöploidi cinsiyet kromozomlarında veya otozomlarda ortaya çıkabilir (50).

İnsanlarda bir trizomi örneği, ekstra bir kromozom 21 kopyasının neden olduğu gelişimsel bozukluk olan Down sendromudur; bozukluk bu nedenle trizomi 21 olarak da adlandırılır (51).

İnsanlarda bir monozomi örneği, bireyin yalnızca bir cinsiyet kromozomu olan, bir X ile doğduğu Turner sendromudur (52).

2.3.1.2 Yapısal Kromozom Anomalileri

Kromozomların yapısı değişir ise farklı şekiller alabilirler;

- Delesyonlar: Kromozomun bir kısmı eksik veya çıkarılmıştır.
- Duplikasyonlar: Kromozomun bir kısmı kopyalanır ve ek genetik materyal oluşturulmuş olur.
- İnversiyonlar: Kromozomun bir kısmı kırılır, ters çevrilir ve yeniden bağlanır, bu nedenle genetik materyal tersine çevrilmiştir.
- İnsersiyonlar: Bir kromozomun bir kısmı normal konumundan çıkarılmış ve başka bir kromozoma yerleştirilmiştir.
- Translokasyonlar: Kromozomun bir kısmı başka bir kromozoma aktarılır. İki ana translokasyon türü vardır: a. Karşılıklı translokasyon: İki farklı kromozomun parçaları değiştirilir. b. Robertsonian translokasyonu: Tam bir kromozom, diğerine ortadan birleşir; insanlarda sadece 13, 14, 15, 21 ve 22 numaralı kromozomlarda bulunabilirler.
- Halkalar: Kromozomun bir kısmı kopar ve bir daire veya halka oluşturur. Bu, genetik materyal kaybı olsun veya olmasın gerçekleşebilmektedir.
- İzokromozom: Sentromer içeren bir kromozom segmentinin ayna görüntüsü kopyasından oluşur.

Kromozom dengesizliği sendromları, kromozom dengesizliği ve kırılması ile karakterize edilen bir grup bozukluktur. Genellikle belirli kanser türlerini geliştirme eğiliminde artışa yol açarlar (53).

2.4. Polimorfizm

Biyolojide polimorfizm, bir tür popülasyonunda alternatif fenotipler olarak da adlandırılan iki veya daha fazla, açıkça farklı morf veya formun ortaya çıkmasıdır. Bu şekilde sınıflandırılmak için morfların aynı zamanda aynı habitatı işgal etmesi ve bir rastgele çiftleşme popülasyonuna ait olması gerekmektedir (54).

Çok biçimlilik doğada yaygındır; biyoçeşitlilik, genetik çeşitlilik ve adaptasyon ile ilgilidir. Polimorfizm genellikle, farklı bir ortamda yaşayan bir popülasyonda çeşitli formları korumak için işlev görür. En yaygın örnek, birçok canlıda meydana gelen cinsel dimorfizmdir. Diğer örnekler; kelebeklerin mimetik formları (bkz. taklit), insan hemoglobini ve kan gruplarıdır (55).

2.4.1. Gen Polimorfizmi

Bir popülasyon içinde birden fazla alel bu genin yerini kapsıyorsa, bir gen polimorfik olarak tanımlanabilir. Belirli bir lokusta birden fazla alel bulunmasına ek olarak, her alel genellikle polimorfik olarak kabul edilir ve dikkate alınması için popülasyonun en az %1'inde mevcut olmalıdır (56).

Gen polimorfizmleri, genomun herhangi bir bölgesinde ortaya çıkabilir. Çoğu polimorfizm sessizdir, yani bir genin fonksiyonunu veya ifadesini değiştirmez (57).

Bazı polimorfizmler gözle görülebilirlerdir. Örneğin, köpekler E lokusu, E, E^m, E^g, E^h ve e olarak bilinen beş farklı alelden birine sahip olabilir. Bu alellerin çeşitli kombinasyonları, köpek kürklerinde görülen pigmentasyona ve desenlere katkıda bulunabilir (58).

Bazen kullanılan pratik bir kural, alel frekansı %1'den az olan genetik varyantları polimorfizmler yerine mutasyonlar olarak sınıflandırmaktır. Bununla birlikte, polimorfizmler

düşük alel frekansında ortaya çıkabileceğinden, bu, polimorfizmlerden yeni mutasyonları ayırt etmenin güvenilir bir yolu değildir (59).

Polimorfizmler laboratuvarında çeşitli yöntemler kullanılarak tanımlanabilirler. Birçok yöntem, bir genin dizisini amplifiye etmek için PCR kullanır. Amplifikasyondan sonra, dizideki polimorfizmler ve mutasyonlar doğrudan DNA dizilemesi ile veya varyasyonlar tek zincirli konformasyonel polimorfizm analizi gibi bir yöntemle tespit edildikten sonra tanımlanabilir (60).

Bir polimorfizm, herhangi bir dizi farkı olabilir. Bazı örnekler:

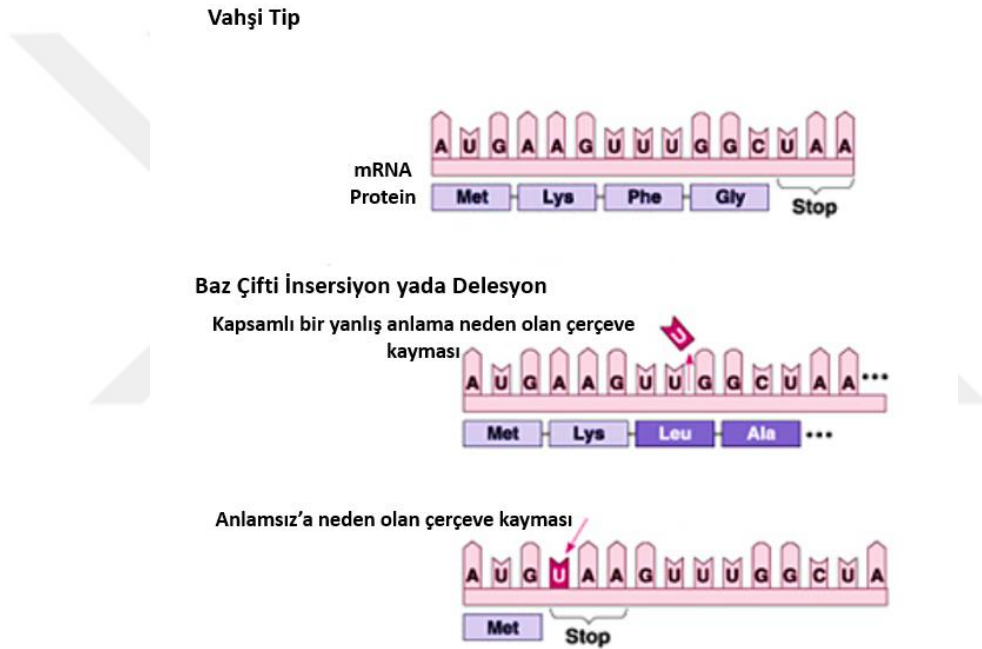
- Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), genomda belirli bir yerde meydana gelen tek nükleotid değişiklikleridir. Tek bir nükleotid polimorfizmi, genetik varyasyonun en yaygın şeklidir (61).
- Küçük ölçekli InDel'ler, DNA'daki bazların eklenmesi veya çıkarılmasından oluşur (62).
- Polimorfik tekrarlayan elemanlar. Aktif transpozon elemanları, kendilerini yeni konumlara yerleştirerek de polimorfizme neden olabilirler. Örneğin, Alu ve LINE1 ailelerinin tekrarlayan elemanları, insan genomunda polimorfizmlere neden olabilir (63).
- Mikrosatellitler, 2-6 baz çiftinden oluşan DNA dizilerinin tekrarlarıdır. Mikrosatellitler, özellikle aleller arasındaki ilişkiyi tanımlamak için moleküler belirteçler olarak yaygın kullanılmaktadır (33).

2.5. InDel (İnsersiyon ve Delesyon)

InDel, bir organizmanın genomuna bazların insersiyonu veya delesyonu için kullanılan moleküler biyolojik terimdir. Uzun yıllar birbirlerinden ayrılabilen ve birbirleriyle hiçbir şekilde ilişkili olmayabilen ekleme ve çıkarma olayları dahil olmak üzere 1 ila 10.000 baz çifti uzunluğuna sahip küçük genetik varyasyonlar arasında sınıflandırılırlar (62-64).

İnsersiyon veya delesyon olan InDel'ler, özellikle filogenetik çalışmalarda doğal popülasyonların genetik belirteçleri olarak kullanılabilir (65,66). Çoklu InDel'lere sahip genomik bölgelerin tür tanımlama prosedürleri için de kullanılabilceği gösterilmiştir (67,68).

Her kişide yaklaşık 192-280 çerçeve kaymalı (frameshift) InDel vardır (69). InDel'lerin, insanlardaki tüm dizi polimorfizmlerinin %16 ila %25'ini temsil etmesi muhtemeldir (62).



Şekil 3: İnsersiyon ve delesyon polimorfizminin şematize gösterimi

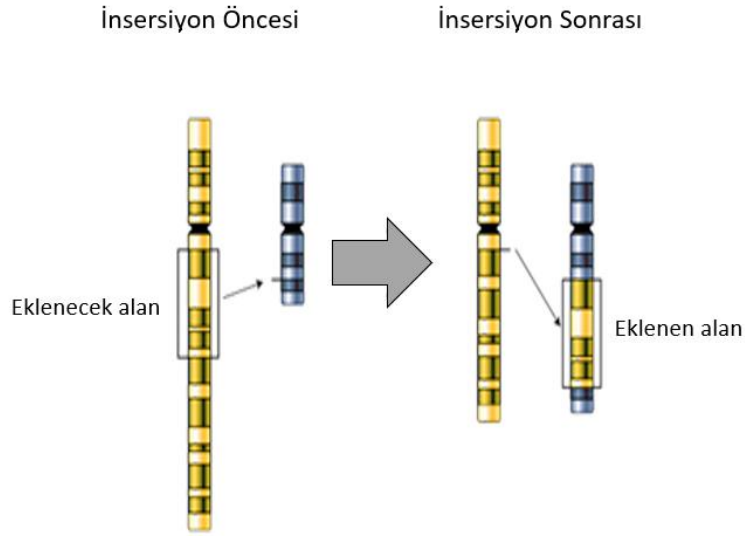
2.5.1. İnsersiyon

Genetikte insersiyon (ekleme mutasyonu olarak da adlandırılır), bir veya daha fazla nükleotid baz çiftinin bir DNA dizisine eklenmesidir. Bu, DNA polimerazın yer değiştirmesi nedeniyle mikrosatellit bölgelerinde meydana gelebilir. En küçük tekli baz ekleme mutasyonlarının mekanizmasının, DNA polimeraz aktif bölgesi içinde lokal olarak meydana gelebilen, şablon ve primer zincirler arasındaki baz çifti ayrımı ve bitişik olmayan baz istiflenmesi yoluyla olduğuna

inanılmaktadır. Bir kromozom düzeyinde insersiyon, daha büyük bir dizinin bir kromozoma eklenmesini ifade eder. Bu, mayoz bölünmesi sırasında eşitsiz geçiş nedeniyle olabilmektedir (71).

N bölgesi insersiyonu, terminal deoksinükleotidil transferaz ile rekombinasyon sırasında kodlanmamış nükleotitlerin eklenmesidir. P nükleotid insersiyonu, rekombinasyon gen bölümlerinin uçları tarafından kodlanan palindromik dizilerin eklenmesidir. Trinükleotid tekrarları, ekleme mutasyonları (72,73) ve bazen ayrı bir mutasyon sınıfı olarak sınıflandırılır (74).

İnsersiyon, bir genin amino asit kodlama bölgesi olan bir eksonda meydana gelirse tehlikeli olabilir. Bir genin normal okuma çerçevesinde (reading frame) bir değişiklik olan çerçeve kayması mutasyonu, eklenen nükleotitlerin sayısı üçe bölünemezse, yani kodon başına nükleotit sayısı ile sonuçlanır. Çerçeve kayması mutasyonları, mutasyondan sonra gelen gen tarafından kodlanan tüm amino asitleri değiştirecektir. Genellikle, eklemeler ve sonraki çerçeve kayması mutasyonu, genin aktif translasyonunun erken bir durdurma (stop) kodonuyla karşılaşmasına neden olur, bu da translasyonun sona ermesiyle ve kesilmiş bir proteinin üretimesine yol açar. Kesilmiş proteinler genellikle düzgün bir şekilde çalışmaz veya hiç çalışmaz ve muhtemelen insersiyonun meydana geldiği gene bağlı olarak birçok genetik bozukluğa neden olabilir. DNA dizileme hatalarını tespit etmek için yöntemler geliştirilmiştir. Çerçeve içi eklemeler, insersiyonun bir sonucu olarak okuma çerçevesi değişmediğinde meydana gelir; eklenen nükleotitlerin sayısı üçe bölünebilir. Okuma çerçevesi, insersiyondan sonra bozulmadan kalır ve eklenen nükleotitler bir durdurma kodonu için kodlamazsa çevirme muhtemelen tamamlanmaya çalışacaktır. Bununla birlikte, eklenen nükleotitler nedeniyle, bitmiş protein, eklemenin boyutuna bağlı olarak, proteinin işlevini etkileyebilecek çok sayıda yeni amino asit içerecektir (75).



Şekil 4: İnsersiyon oluşumu

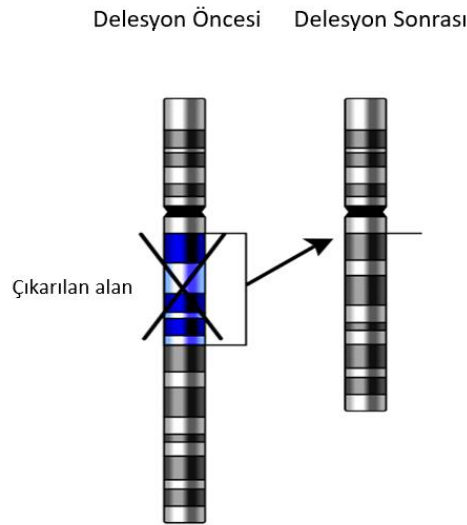
2.5.2. Delesyon

Genetikte, bir delesyon (gen eksikliği veya delesyon mutasyonu olarak da adlandırılır), DNA replikasyonu sırasında kromozomun bir kısmının veya bir DNA dizisinin dışarıda bırakıldığı mutasyondur. Tek bir bazdan bütün bir kromozom parçasına kadar herhangi bir sayıda nükleotid çıkarılabilir (70). En küçük tek baz delesyon mutasyonları, kalıp DNA'da tek bir bazın ters çevrilmesi ve ardından DNA polimeraz aktif bölgesi içinde kalıp DNA zinciri kayması ile meydana gelmektedir (71,76,77).

Delesyon türleri; a. Terminal delesyon, bir kromozomun sonuna doğru gerçekleşir, b. Interkalar / interstitial delesyon, bir kromozomun içinde gerçekleşir, c. Mikrodelesyon, nispeten az miktarda olan delesyonlardır. Mikrodelesyon genellikle fiziksel anormallikleri olan çocuklarda meydana gelir. Büyük delesyonlar, doğrudan kürtajla (düşük yapma) sonuçlanır. Küçük delesyonların ölümcül olma olasılığı daha düşüktür; büyük delesyonlar genellikle ölümcüldür, her zaman hangi genlerin kaybolduğuna bağlı farklılıklar vardır. Bazı orta büyüklükteki delesyonlar,

tanınabilir insan bozukluklarına yol açabilmektedir, örn. Williams sendromu. Eşit olarak üçe bölünemeyen birkaç çiftli çıkarılmalar, bir çerçeve kayması mutasyonu ile sonuçlanır ve delesyon işleminden sonra oluşan tüm kodonların yanlış okunmasına, ciddi şekilde değiştirilmesine ve muhtemelen işlevsel olmamasına neden olur. Buna karşılık, üçe bölünebilen bir delesyon işlemine çerçeve-içi (in-frame) delesyonu denilmektedir (76, 77).

Delesyonlar, bazı erkek kısırlığı vakaları, Duchenne kas distrofisi vakalarının üçte ikisi (70) ve kistik fibroz vakalarının üçte ikisi dahil olmak üzere bir dizi genetik bozukluktan sorumludur (78).



Şekil 5: Delesyon oluşumu

2.5.3. InDel Polimorfizmi ve Adli Genetikte Kullanımı

Son beş yılda InDel kimliklendirme uygulamaları adli genetik, popülasyon genetiği ve tıbbi genetik gibi birçok farklı alanda artış göstermiştir. Adli genetikte, InDel tekniği hem akrabalık analizinde hem de kimliklendirmede kullanılmaktadır (79).

Pena ve ark. tarafından yapılan bir çalışma, 40 InDel lokuslu bir panelin adli kimlik tespiti için mükemmel bir potansiyele sahip olduğunu kanıtladı. Ayrıntılı olarak, araştırma, daha karmaşık floresan tipleme için alternatif olarak kullanılabilir, gümüş boyalı poliakrilamid jeller üzerinde özenle seçilmiş 40 InDel'in kimliklendirilmesi için basit bir multipleks sistem kullanılarak gerçekleştirildi (80).

Ek olarak 2011 yılında yapılan bir araştırma, bazı adli olaylarda insan vücudunun tümör dokusu için tanımlamanın gerekli olabileceğini belirtmiştir. Aynı araştırma, InDel'lerin tanı amaçlı insan gastrointestinal tümör dokusunda uygulanmasına öncülük etmiştir (81).

InDel'ler babalık ve akrabalık ilişkileri analizinde de önemli bir rol oynar. Şu anda babalık ve akrabalık testlerinde kullanılan yöntemlere alternatif olarak, InDel'lerin mutasyon oranlarının düşük olması ve tüm adli laboratuvarlarda bulunan ekipmanlara yazılması daha kolay olması, testleri daha güvenilir ve daha kolay gerçekleştirmesini sağlıyor (9).

InDel'in bir başka ilginç uygulaması da popülasyon genetiği araştırmalarındadır (80). 2009'da başarılı bir çalışma, karışık popülasyonlarda bireysel ve küresel soy oranlarını tahmin etmek için etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir (82).

Bunun dışında InDel, bir bireyin gelecekteki sağlığını tahmin edebilir, genetik hastalıkların kaynağını belirleyebilir ve bireye kişiselleştirilmiş ilaç sağlamak için tıbbi genetiğe de uygulanabilir (63).

2.6. Validasyon ve Tür Özgüllüğü

Validasyon, adli vaka çalışması ve/veya veri tabanı analizi için etkinliğini ve güvenilirliğini belirlemek için bir prosedürün değerlendirildiği süreçtir. Adli DNA analizine yönelik

teknolojileri uygulamak veya değiştirmek için gereken iki tür validasyon vardır – gelişimsel (developmental) ve dahili (internal) (83).

- Gelişimsel (developmental) validasyon; adli tıp, veri tabanı veya vaka çalışması referans numunelerinde kullanım için yeni veya özgün bir DNA metodolojisinin test verilerinin alınması, koşullarının ve sınırlamalarının belirlenmesidir.
- Dahili (internal) validasyon; yerleşik yöntemlerin ve prosedürlerin laboratuvarında beklendiği gibi çalıştığını göstermek için laboratuvar içinde test verilerinin toplanmasıdır. Adli uygulamalar için bir prosedür kullanılmadan önce, laboratuvar iç doğrulama çalışmaları yapılmalıdır.

Gelişimsel validasyonun alt basamaklarından biri olan tür özgüllüğünde; hedeflenmeyen türlerden genetik bilgiyi saptama yeteneği (örneğin, bir insan tahlilinde mikrobiyal DNA'nın saptanması) belirlenmelidir. Hedeflenmemiş türlerden genetik bilginin tespiti, testin kullanımını geçersiz kılmayacak ancak testin sınırlarının tanımlanmasına yardımcı olabilecektir (83).

3. Gereç ve Yöntem

Bu tez çalışmasında Filoğlu ve ark. tarafından geliştirilen ve Türkiye popülasyonu için yüksek polimorfizm gösteren, adli kimliklendirmede kullanılabilir, cinsiyet belirteci olan Amelogenin (AMG-XY), otozomal kromozomlar üzerinde bulunan 35 InDel (rs34660708, rs34495360, rs2308135, rs2307521, rs2308112, rs2308163, rs1610919, rs2308137, rs16646, rs144389514, rs56168866, rs16671, rs33972805, rs25549, rs16722, rs2067304, rs140861207, rs1160981, rs4646006, rs6480, rs28369942, rs2307838, rs3062629, rs10590424, rs16458, rs10623496, rs1610937, rs16363, rs2067147, rs1160965, rs2307656, rs2308101, rs2308072, rs2067191) lokusu ve Y kromozomu üzerinde bulunan (rs2032678) 1 InDel lokusundan oluşan 36-InDelplex paneli, 57 hayvandan toplanmış kan örnekleri ile çalışıldı.

Çalışmada; 7 at, 1 inek, 18 kedi, 18 köpek, 4 koyun, 3 martı, 1 oğlak, 2 şahin ve 3 tavuk'a ait kan örnekleri kullanıldı. Kan örnekleri veteriner hekim tarafından 0,5 ml'lik EDTA'lı tüplere alınmıştır. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veterinerlik Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hayvan Hastanesine ait laboratuvarından teslim alınan örnekler, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü AR-GE Laboratuvarında -20°C'de muhafaza edildi. Örneklerin sırasıyla DNA izolasyonları, miktar tayinleri yapıldı. Sonrasında PCR için hazırlık yapıldı. PCR ürünleri Genetik Analizör cihazında elektroforezi gerçekleştirildi. Analiz için Gene Mapper v.5.0 yazılım programı kullanıldı. Elde edilen sonuçların özgünlük değerleri Microsoft® Excel programı ile değerlendirildi. Çalışma bitiminde kan örnekleri ve çalışmalar süresince kullanılmış olan tek kullanımlık eldiven, maske ve önlüklerin tıbbi atık olarak uygun şartlarda imha edilmesi sağlandı.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Genetik AR-GE Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Tez çalışması sırasında kullanılan ekipman, malzeme ve kitlerin listesi aşağıda verilmiştir.

3.1. Deneyde Kullanılan Gereçler

3.1.1. Ekipman

- Eppendorf / Brand otomatik pipetler (2.5 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)
- Vorteks (Weightlab Instruments)
- Kuru ısıtıcı blok (Bio TDB100-Biosan)
- Florometre (Qubit 4-Thermo Fisher)
- Mikrosantrifüj (Unicfuges-5)
- Termal döngü cihazı (SimpliAmp™ Thermal Cycler-Applied Biosystems™)
- Buzdolabı (Vestel)
- Derin dondurucu (Delta)
- Applied Biosystems™ 3500 Genetik Analizör

3.1.2. Ticari kitle

- E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek)
- Quant-it™ dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen)
- Qiagen Multiplex PCR Kit

3.1.3. Ticari kit haricinde kullanılan malzemeler

- PBS (Phosphate Buffered Saline) Tamponu
- Etil alkol (%96-100) (Tekkim)
- Zefiran (Dermosept)

3.1.4. Kapiler elektroforez için kullanılan malzemeler

- 10X EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) tamponu (Thermo Fisher Scientific)
- Hi-Di™ (Highly deionized) Formamide (Thermo Fisher Scientific)
- POP-7 Polimer (Performance Optimized Polymer 7) (Thermo Fisher Scientific)
- GeneScan™ LIZ 500 dye Size Standard (Thermo Fisher Scientific)

3.2. Deney Aşaması

Çalışma süreci belirtilen aşamalardan oluşmaktadır.

- Örneklerin toplanması
- DNA izolasyonu
- DNA miktar tayini
- PCR
- PCR ürünlerinin Applied Biosystems™ 3500 cihazı ile analizi
- Verilerin analizi ve sonuçların değerlendirilmesi

3.2.1. Etik kurul izni ve örneklerin toplanması

Bu çalışma 31.03.2021 tarihli ve 158755 sayılı karar ile İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından, etik kurul iznine gerek olmadığına dair karar verilmiştir (Ek-1). İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veterinerlik Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hayvan Hastanesinden alınmış 13.01.2021 tarihli ve 5057 sayılı izin belgesi ile, hastaneye tanı/tedavi amacı ile başvurmuş ve veteriner hekim tarafından alınmış, hastane laboratuvarı tarafından analiz edilmiş, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan, farklı hayvan türlerini temsil edecek 57 adet kan örneği toplanmıştır.

3.2.2. DNA izolasyonu ve miktar tayini

DNA izolasyonu için E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek) kullanıldı. Silika temelli olan bu yöntemde biyolojik materyaldeki DNA'nın spin kolona bağlanarak DNA dışındaki maddelerden uzaklaştırılma temeline dayanır. Hücresel kalıntılar ve kontaminantlar yıkama işlemi ile ortamdaki uzaklaştırılır. DNA molekülü, spin kolona bağlanmış halde iken elüsyon tamponu ile filtreden geri elde edilir.

Miktar tayini, Qubit 4 cihazında (Thermo Fisher) Quant-itTM dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen) kiti kullanıldı. Florometrik miktar tayini 260 nm dalga boyunda ölçüm yaparak yüksek hassasiyet ve doğrulukla DNA miktarı belirlenebilmektedir.

3.2.2.1. E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek) ile kan örneklerinden DNA izolasyonu

1. Isıtıcı bloğu 70° C' ye ayarlanır.
2. Kit oda ısısında (25° C) bulundurulur.
3. 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne 250 EDTA'lı kan eklenir. (Örnek 250 µL'den az ise, PBS ile tamamlanır. Pıhtılaşma var ise EDTA'da eklenir ve bekletilir.)
4. Tüpe 25 µL Proteinaz K eklenir.
5. 250 µL BL Buffer eklenir, 15 sn. vortekslenir.
6. 70° C' de 10 dk. inkübe edilir.
7. Üzerine 250 µL Etanol (%96-100) eklenir, 15 sn. vortekslenir.
8. HiBind[®] mini spin kolona mikrosantrifüj tüpündeki lizat aktarılır. (~700 µL)
9. 12.000 rpm' de 1 dk. santrifüj edilir.
10. Filtrat içeren tüp atılır. Yeni toplama tüpü eklenir.
11. Kolona 500 µL HBC Buffer eklenir.

12. 14.000 rpm' de 30 sn. santrifüj edilir. Altındaki filtrat dökülür, toplama tüpü kurulanıp tekrar kullanılır.
13. Kolona 700 µL DNA Wash Buffer eklenir.
14. 14.000 rpm' de 30 sn. santrifüj edilir. Altındaki filtrat dökülür, toplama tüpü kurulanıp tekrar kullanılır.
15. Kolona 700 µL DNA Wash Buffer eklenir.
16. 14.000 rpm' de 30 sn. santrifüj edilir. Altındaki filtrat dökülür, toplama tüpü kurulanıp tekrar kullanılır.
17. Kolon boş olarak, 14.000 rpm' de 2 dk. santrifüj edilir.
18. HiBind® mini spin kolonu, 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alınır.
19. 100 µL Elution Buffer eklenir. (Elution Buffer 70° C' de ısıtılmış olmalıdır, verimin arttırılması için.)
20. 2 dk. oda ısısında (25° C) bekletilir.
21. 14.000 rpm' de 1 dk. santrifüj edilir.
22. Spin kolon atılır, izolatlar parafilmlemlenir. Uzun süreli saklama için -20° C' ye kaldırılır.

3.2.2.2. *Quant-it™ dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen) ile miktar tayini*

1. Qubit® 4.0 cihazının kalibrasyonunu yapmak amacıyla 2 adet standart kullanılır.
2. Quant-it™ dsDNA HS Buffer çözeltisinden 199 µL alınarak 1 µL Quant-it™ Reagent eklenir.
3. Hazırlanan karışım çözeltisinden standartlar için 190 µL, S1(Standart 1) ve S2(Standart 2) çözeltilerinden 10 µL alınır.
4. Örneklerin analizi için karışım çözeltisinden 199 µL alınır ve üzerine 1 µL DNA örneği eklenir.

5. Karışım 2-3 saniye vortekslenir ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir.
6. İlk olarak Standart 1 ve Standart 2'nin ölçümü yapılarak cihazın kalibrasyonu yapılır.
7. Örnekler cihaza yerleştirilerek ölçüm yapılır.

3.2.3. PCR

Bu çalışmada 36-InDelplex paneline ait lokuslar çalışılmıştır (Tablo I) (84).

Tablo I: 36 InDel lokusu (84)

ID	GenBank Erişim	Kromozom	InDel Dizisi	Floresans Boya (elektroforezde görülen renkleri ile)
ID1	rs4646006	Kr: 1	insTGAG/TGCG	ATTO-550
ID2	rs2307838	Kr: 1	delTGAA	FAM
ID3	rs2307521	Kr: 1	insAG/CG	FAM
ID4	rs28369942	Kr: 2	insAAGTC	ATTO-550
ID5	rs140861207	Kr: 3	delAG	JOE
ID7	rs1160965	Kr: 5	delGT	ATTO-565
ID8	rs2307656	Kr: 5	delTAAGT	FAM
ID9	rs2067304	Kr: 5	delGA	FAM
ID10	rs1610937	Kr: 5	delAGGA	FAM
ID11	rs10590424	Kr: 5	delAATAA	JOE
ID12	rs1160981	Kr: 5	delCAG	ATTO-565
ID13	rs2067191	Kr: 5	insTAGA	ATTO-565
ID14	rs144389514	Kr: 6	delATCT	ATTO-550
ID15	rs2308137	Kr: 6	delGA	JOE
ID16	rs16646	Kr: 7	insTTTC	FAM

ID17	rs16458	Kr: 7	insTTCC	ATTO-550
ID18	rs3062629	Kr: 8	insTACAG/TAGAG	ATTO-565
ID19	rs2308072	Kr: 8	insAAGG	ATTO-550
ID20	rs10623496	Kr: 8	insGAAT	ATTO-565
ID21	rs56168866	Kr: 9	insAA/CA	ATTO-565
ID22	rs2308112	Kr: 9	delGGTGT	ATTO-550
ID23	rs2308135	Kr: 11	insTAA	ATTO-550
ID24	rs33972805	Kr: 11	insCT	JOE
ID25	rs1610919	Kr: 12	delAT	ATTO-565
ID26	rs34660708	Kr: 13	delTG	FAM
ID27	rs2308163	Kr: 14	insTGAT/TAAT	JOE
ID28	rs2067147	Kr: 14	delCAT	ATTO-550
ID29	rs16722	Kr: 17	insTTGT	ATTO-565
ID30	rs25549	Kr: 17	delCATT	ATTO-550
ID31	rs34495360	Kr: 20	insGACTT	JOE
ID32	rs16671	Kr: 20	insGG/GC	FAM
ID33	rs2308101	Kr: 20	delTA	JOE
ID34	rs6480	Kr: 22	insTG	JOE
ID35	rs16363	Kr: 22	insTGTTT	JOE
ID36	rs2032678	Kr: Y	delTTCTC	FAM
ID37	AMG-XY			FAM

3.2.3.1. PCR bileşenlerinin hazırlanması

Miktar tayini sonrası PCR hazırlığı için, örneklerin seyreltmeleri yapıldı. Her bir örnekten 3 ng DNA alındı, miktar tayininde ölçülen değerlere göre DNA eklenen tüplere distile su ile eklendi. Seyreltme hesaplamaları $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ ye göre yapıldı, DNA miktarı 20'den az olanlar 3 ng/ μ L DNA x 10 μ L su, 20'den fazla olanlar 3ng/ μ L DNA x 25 μ L su olacak şekilde seyreltildi. 36-InDelplex panelinde belirtilen lokusları çoğaltacak primerlerden oluşan bir primer karışımı hazırlandı. Her çalışmada negatif ve pozitif kontrol örnekleri kullanıldı. PCR sonrası kısa süre içinde kullanılacak ürünler +4° C'ye, uzun süreli saklanacak ürünler -20° C'ye kaldırıldı.

Tablo II: InDel PCR bileşenlerinin optimum değerleri

Kullanılan Malzemeler	Miktar (her bir örnek için)	Negatif Kontrol
Master Mix	4,2 μ L	4,2 μ L
Taq Polimeraz	0,5 μ L	0,5 μ L
Primer Mix	3 μ L	3 μ L
DNA	2 μ L	-
Su	1 μ L	1 μ L

3.2.3.2. PCR koşulları

Çalışma için SimpliAmp™ Thermal Cycler cihazı kullanıldı. Tablo III'de verilmiş olan döngü programı ile bu reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo III: Optimum PCR koşulları

İşlem	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	95°C	11 dakika	
Amplifikasyon	94°C	20 saniye	32 döngü
	62°C	3 dakika	
Uzama	60°C	1 saat	
Bekletme	4°C	∞	

3.2.4. PCR ürünlerinin Genetik Analizör cihazı ile analizi

PCR ürünlerinin analizi örneklerin hazırlanması ve elektroforezi aşamalarından oluşmaktadır. Elektroforez işlemi Applied Biosystems™ 3500 Genetik Analizör cihazında yapıldı.

3.2.4.1. Örneklerin hazırlanması

Analiz edilecek her bir örnek Tablo IV’de verilen bileşenler kullanılarak hazırlandı.

Tablo IV: Elektroforez için gerekli olan bileşenler

Bileşenler	Miktarları (µL) (her bir örnek için)
Hi-Di Formamide	9,5 µL
GS Liz 500	0,5 µL
PCR Ürünü	1 µL

3.2.4.2. Örneklerin elektroforezi

Örnekler POP-7 polimeri ile 36 cm kapiller kullanılarak, InDel primerlerine özel 5 boyalı matriks ve GS STR POP7 (1 ml) G-5 modülünde, Tablo V’da verilen parametrelere göre analiz edildi.

Tablo V: Elektroforez koşulları

Parametre	GS STR POP7 (1 ml) G-5 modül
Matriks	InDel matriksi
İnjesiyon zamanı	24 sn.
İnjesiyon voltajı	1.2 kV
Yürütme zamanı	30 dk.
Yürütme sıcaklığı	60° C

3.2.5. Verilerin analizi ve sonuçların değerlendirilmesi

Verilerin analizi GeneMapper v.5.0 (Thermo Fisher Scientific) programında yapıldı. Her örnek için kullanılan LIZ500 standardı ile kontrol edildi. InDel’lerin yerleri standart referans alınarak belirlendi. Sonuçlar Microsoft® Excel programında tablo haline getirildi. Sonuçlarda hayvan türleri arasındaki farklılıklar/benzerlikler, ayrıca insan örneklerinden özgüllüğü gözlemlendi.

4. Bulgular

4.1. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu ve DNA Miktarının Belirlenmesi

57 hayvandan (7 at, 1 inek, 18 kedi, 18 köpek, 4 koyun, 3 martı, 1 oğlak, 2 şahin ve 3 tavuk) alınan kan örneklerinin DNA izolasyonu yapılarak miktar tayini yapıldı. Tablo VI'de kan örneklerinin DNA miktarları verilmektedir.

Tablo VI: Kan örneklerine ait DNA miktarları

Örnek Sırası	Örnek Kodu	DNA Miktarı	Örnek Sırası	Örnek Kodu	DNA Miktarı
1	H-A-1	8,26 ng/μl	30	H-Kö-4	29,8 ng/μl
2	H-A-2	44,4 ng/μl	31	H-Kö-5	43,4 ng/μl
3	H-A-3	11,2 ng/μl	32	H-Kö-6	60,4 ng/μl
4	H-A-4	8,75 ng/μl	33	H-Kö-7	32,4 ng/μl
5	H-A-5	20,2 ng/μl	34	H-Kö-8	29,0 ng/μl
6	H-A-6	31,50 ng/μl	35	H-Kö-9	31,6 ng/μl
7	H-A-7	4,81 ng/μl	36	H-Kö-10	8,68 ng/μl
8	H-İ-1	30,8 ng/μl	37	H-Kö-11	33,8 ng/μl
9	H-Ke-1	106,0 ng/μl	38	H-Kö-12	58,0 ng/μl
10	H-Ke-2	4,74 ng/μl	39	H-Kö-13	28,2 ng/μl
11	H-Ke-3	6,18 ng/μl	40	H-Kö-14	2,10 ng/μl
12	H-Ke-4	45,8 ng/μl	41	H-Kö-15	45,4 ng/μl
13	H-Ke-5	12,5 ng/μl	42	H-Kö-16	21,8 ng/μl
14	H-Ke-6	58,4 ng/μl	43	H-Kö-17	32,0 ng/μl
15	H-Ke-7	78,2 ng/μl	44	H-Kö-18	54,8 ng/μl

16	H-Ke-8	30,2 ng/μl	45	H-Ky-1	4,34 ng/μl
17	H-Ke-9	55,8 ng/μl	46	H-Ky-2	0,842 ng/μl
18	H-Ke-10	23,8 ng/μl	47	H-Ky-3	17,4 ng/μl
19	H-Ke-11	69,4 ng/μl	48	H-Ky-4	10,8 ng/μl
20	H-Ke-12	13,9 ng/μl	49	H-M-1	31,8 ng/μl
21	H-Ke-13	46,8 ng/μl	50	H-M-2	94,6 ng/μl
22	H-Ke-14	38,0 ng/μl	51	H-M-3	95,6 ng/μl
23	H-Ke-15	12,0 ng/μl	52	H-O-1	17,6 ng/μl
24	H-Ke-16	6,84 ng/μl	53	H-Ş-1	13,8 ng/μl
25	H-Ke-17	20,8 ng/μl	54	H-Ş-2	38,2 ng/μl
26	H-Ke-18	48,2 ng/μl	55	H-T-1	19,9 ng/μl
27	H-Kö-1	35,0 ng/μl	56	H-T-2	35,8 ng/μl
28	H-Kö-2	52,6 ng/μl	57	H-T-3	23,8 ng/μl
29	H-Kö-3	29,0 ng/μl			

4.2. Elektroforez Aşaması

Applied Biosystems™ 3500 Genetik Analizör cihazında elektroforez yapıldıktan sonra GeneMapper v.5.0 programı ile 36 InDel lokusunun 57 hayvan örneğinde pik gösterme potansiyelleri gözlemlendi (Tablo VII). Çalışmada kontaminasyonu elimine etmek amacıyla negatif kontrol örneği (Şekil 6) ve çalışmanın doğruluğunu teyit etmek için profili bilinen pozitif kontrol örneği (Şekil 7) kullanıldı. Her bir hayvan türü örneğini temsil edecek elektroforegram görüntüleri Şekil 8-16 arasında verilmiştir.

Tablo VII’de görüldüğü üzere deneylerde kullanılmış bütün kedi ve köpek örneklerinde ID16 (rs16646) lokusunda pik görülmüş ve söz konusu piklerin yüksek RFU seviyelerinde (~4,956 RFU) oldukları gözlenmiştir. Bu piklerin varyant türü “in” dir. ID14 (rs144389514) lokusunda ise 10 kedi örneğinde yüksek RFU seviyeleri (~476 RFU) ile pik görülmüştür. Bunlardan 1 kedide varyant türü “indel”, 9 kedide ise varyant türü “del” olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca deneylerde kullanılmış 1 inek örneğinde ID28 (rs2067147) lokusunda yüksek RFU seviyesi (5810 RFU) ile pik görülmüştür. Bu pikin varyant türü “del” olarak gözlemlenmiştir.

Çalışmada temel alınan 36-InDelplex panelinde yer alan InDel lokusları dışında yer almakla birlikte inek, koyun ve oğlak örneklerinde yüksek RFU seviyesi (~4,404 RFU) ile ID16 - ID32 arasında, köpek örneklerinde yüksek RFU seviyesi ile ID26 – ID37 arasında (~1,653 RFU), ID28 – ID19 arasında (~9,141 RFU) ve ID20 – ID7 arasında (~1,902 RFU) pikler gözlemlenmiştir.

Diğer rs34660708 (ID26), rs34495360 (ID31), rs2308135 (ID23), rs2307521 (ID3), rs2308112 (ID22), rs2308163 (ID27), rs1610919 (ID25), rs2308137 (ID15), rs56168866 (ID21), rs16671 (ID32), rs33972805 (ID24), rs25549 (ID30), rs16722 (ID29), rs2067304 (ID9), rs140861207 (ID5), rs1160981 (ID12), rs4646006 (ID1), rs6480 (ID34), rs28369942 (ID4), rs2307838 (ID2), rs3062629 (ID18), rs10590424 (ID11), rs16458 (ID17), rs10623496 (ID20), rs1610937 (ID10), rs16363 (ID35), rs1160965 (ID7), rs2307656 (ID8), rs2308101 (ID33), rs2308072 (ID19), rs2067191 (ID13), rs2032678 (ID36) ve AMG-XY (ID37) lokuslarında değerlendirilmeye dahil edilebilecek pik gözlemlenmemiştir. Bu lokusların insan için yüksek özgülüğe sahip olduğu görülmüştür.

Tablo VII: 57 Hayvan Örneğine Ait InDel Lokus Sonuçları

Örnek Adı/ Lokus	ID26	ID3	ID16	ID32	ID9	ID36	ID2	ID37	ID10	ID8	ID31	ID27	ID15	ID24	ID5	ID34	ID11	ID35	ID33	ID23	ID22	ID14	ID30	ID1	ID4	ID17	ID28	ID19	ID25	ID21	ID29	ID12	ID18	ID20	ID7	ID13	
H-A-1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-A-2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-A-3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-A-4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-A-5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-A-6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-A-7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-I-1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	del	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-1	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	del	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KE-2	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	indel	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KE-3	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-4	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	del	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-5	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-6	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-7	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	del	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-8	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	del	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-9	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	del	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-10	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-11	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-12	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-13	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	del	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-14	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	del	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-15	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	del	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-16	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	del	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-17	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KE-18	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KÖ-1	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KÖ-2	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-KÖ-3	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

(elektroforezde görülen renkleri ile)

* ile işaretli alanlarda pik görülmemiştir.

“in” insersiyon, “del” delesyon.

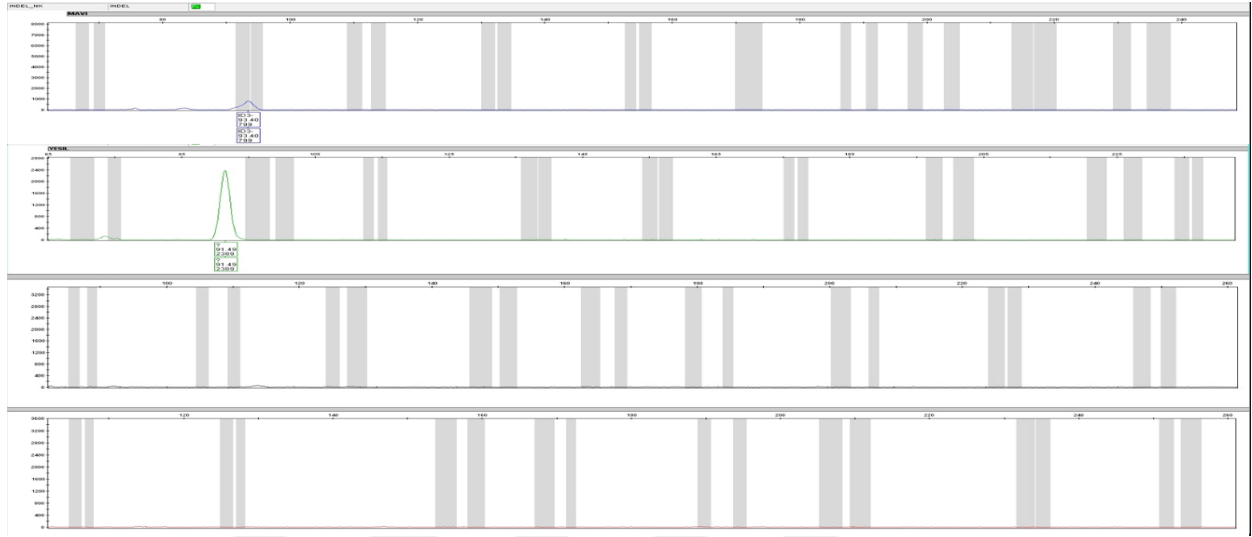
Tablo VIII: 57 Hayvan Örneğine Ait InDel Lokus Sonuçları (Devamı)

Örnek Adı/ Lokus	ID26	ID3	ID16	ID32	ID9	ID36	ID2	ID37	ID10	ID8	ID31	ID27	ID15	ID24	ID5	ID34	ID11	ID35	ID33	ID23	ID22	ID14	ID30	ID1	ID4	ID17	ID28	ID19	ID25	ID21	ID29	ID12	ID18	ID20	ID7	ID13		
H-KÖ-4	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KÖ-5	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KÖ-6	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KÖ-7	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KÖ-8	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KÖ-9	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KÖ-10	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KÖ-11	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KÖ-12	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KÖ-13	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KÖ-14	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KÖ-15	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KÖ-16	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KÖ-17	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KÖ-18	*	*	in	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KY-1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KY-2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KY-3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-KY-4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-M-1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-M-2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-M-3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-O-1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-Ş-1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-Ş-2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
H-T-1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-T-2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
H-T-3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

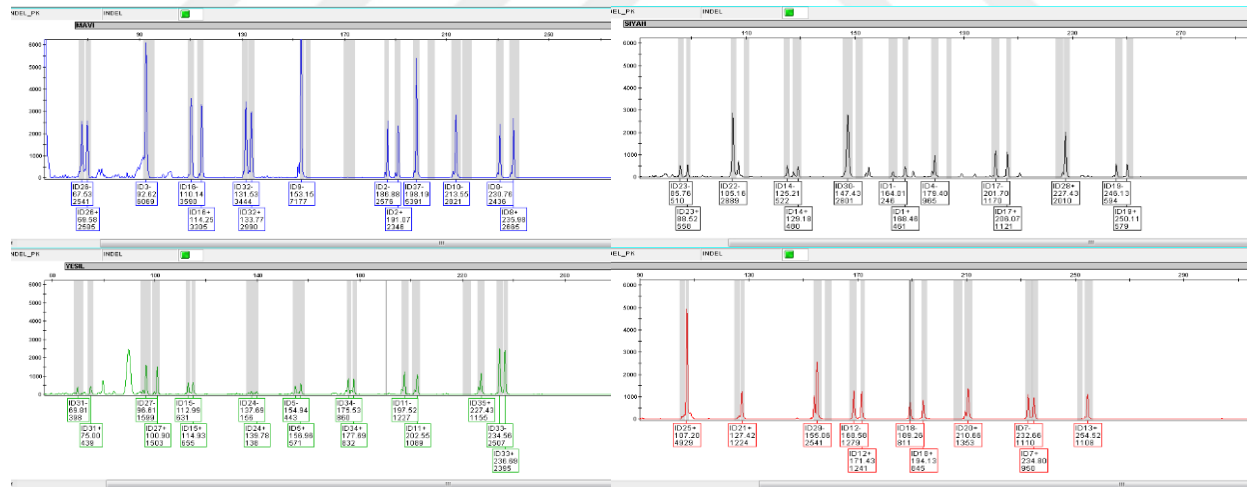
(elektroforezde görülen renkleri ile)

* ile işaretli alanlarda pik görülmemiştir.

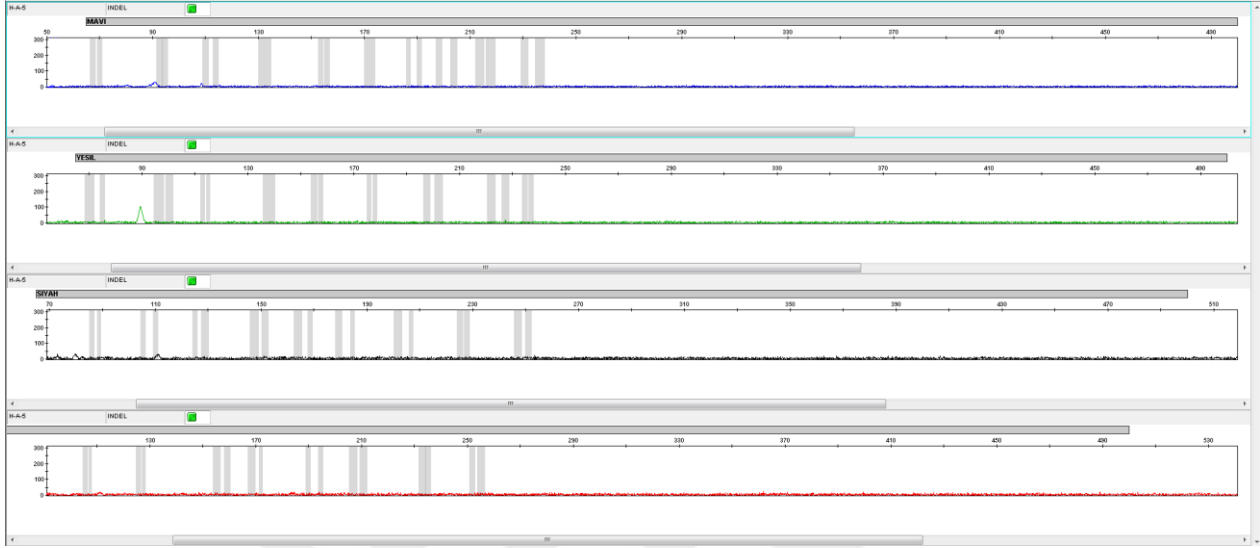
“in” insersiyon, “del” delesyon.



Şekil 6: Negatif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü



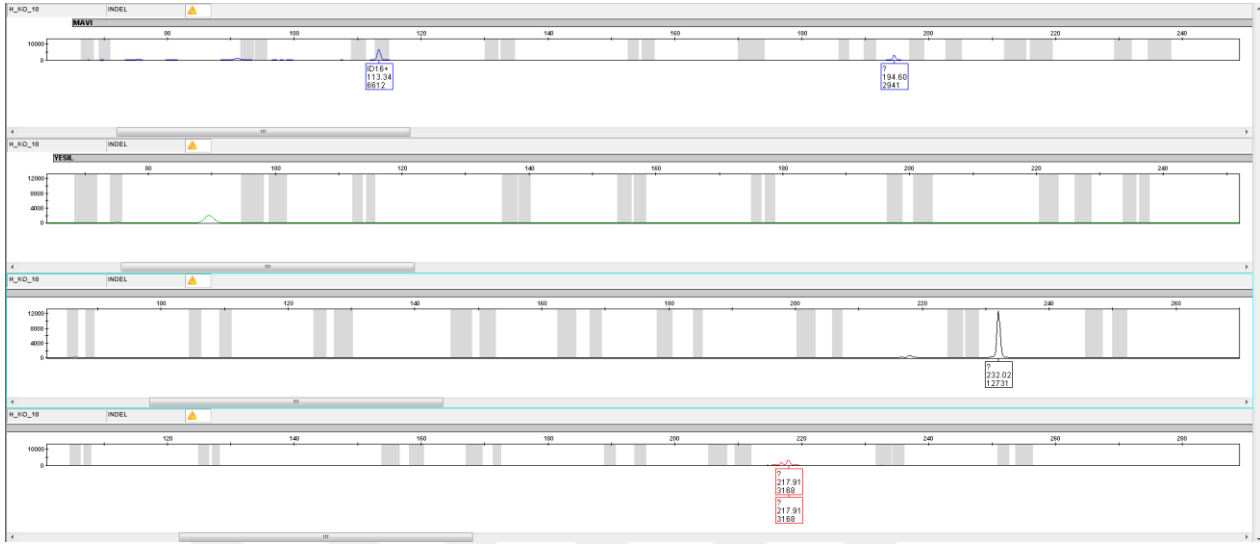
Şekil 7: Pozitif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü



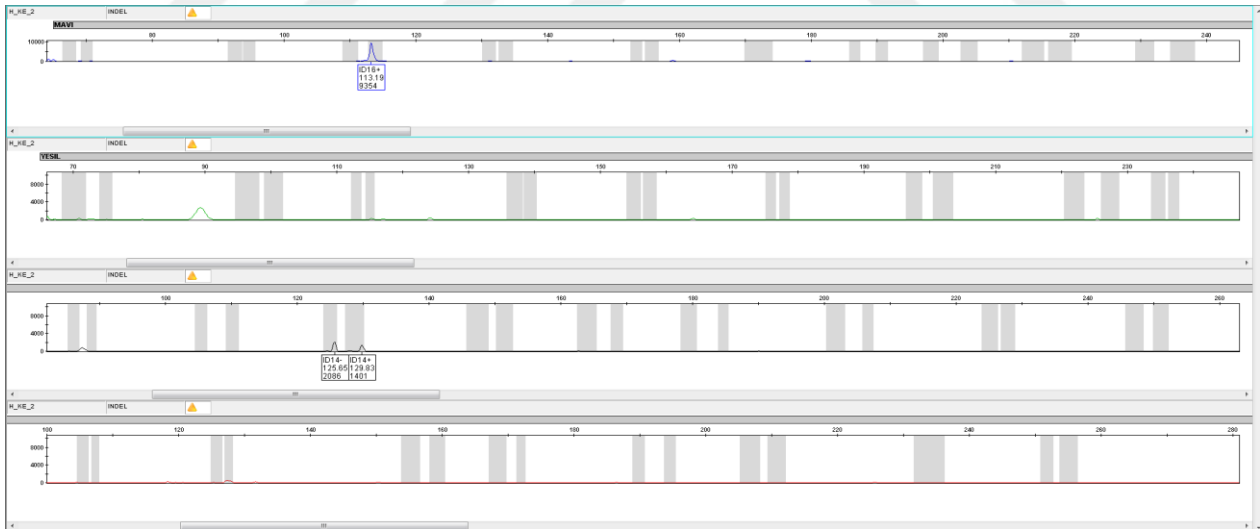
Şekil 8: At örneklerine ait elektroforegram görüntüsü



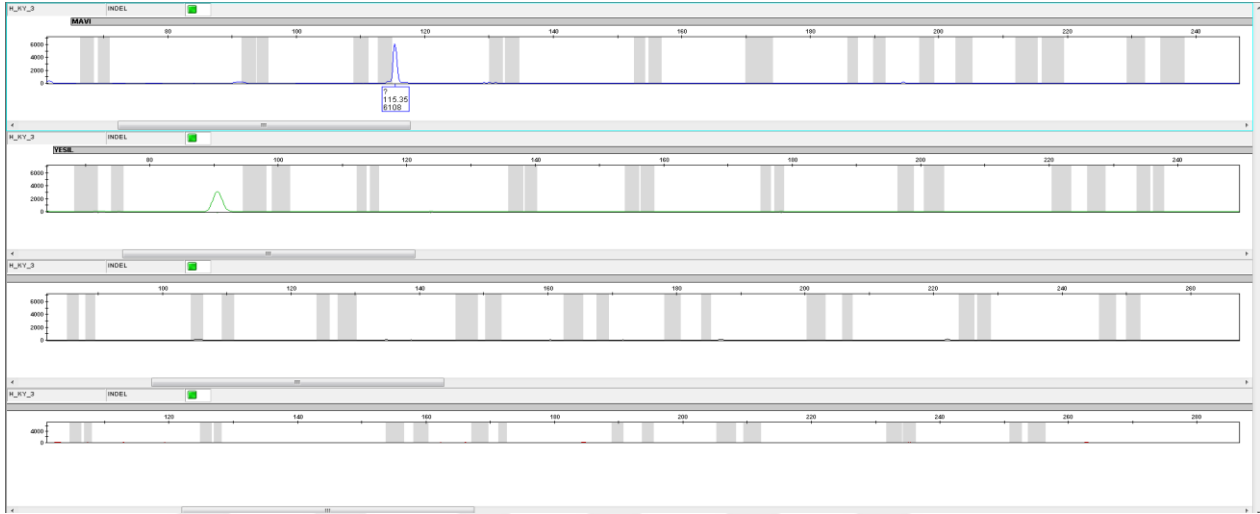
Şekil 9: İnek örneğine ait elektroforegram görüntüsü



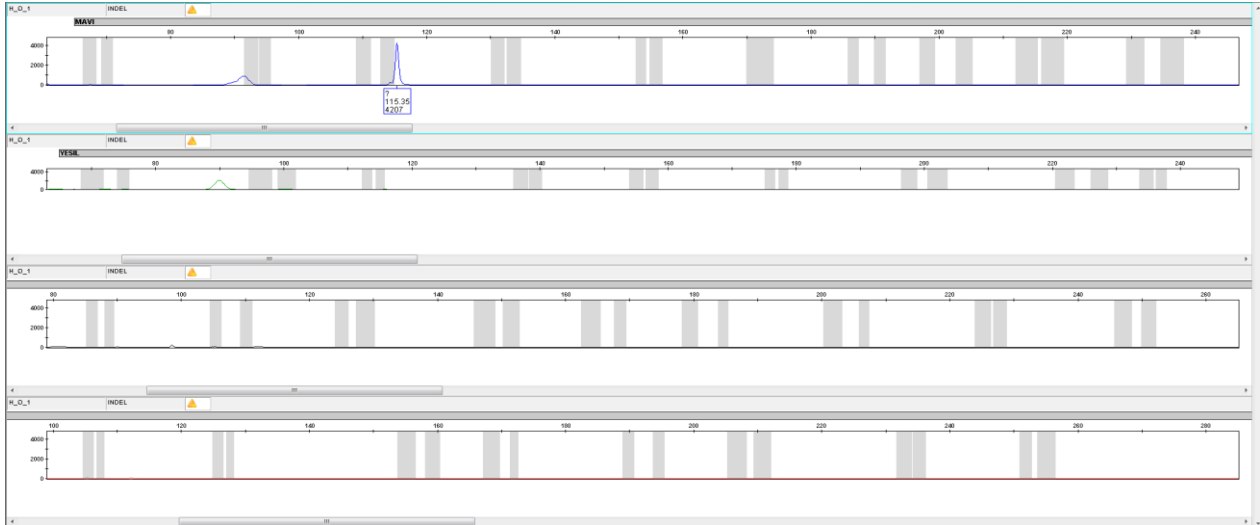
Şekil 10: Kedi örneklerine ait elektroforegram görüntüsü



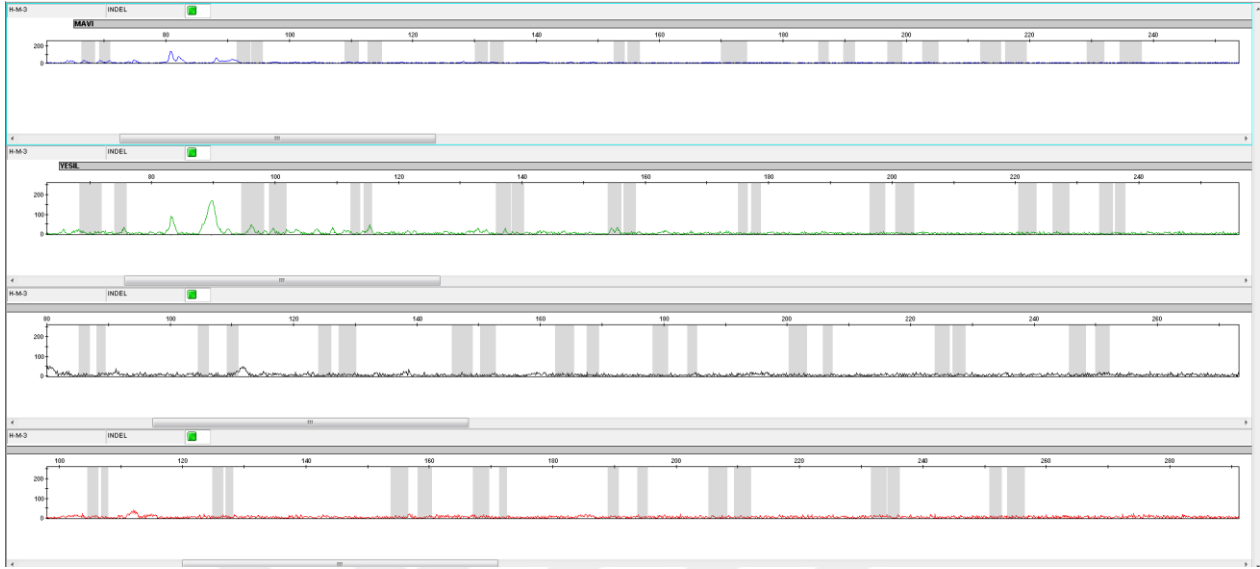
Şekil 11: Köpek örneklerine ait elektroforegram görüntüsü



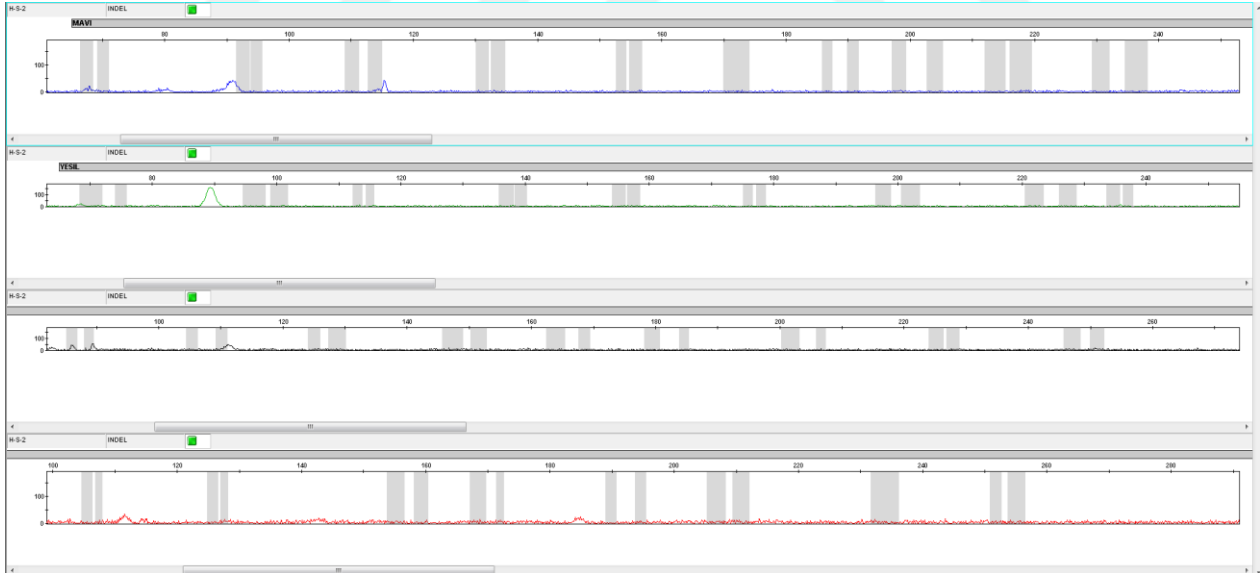
Şekil 12: Koyun örneklerine ait elektroforegram görüntüsü



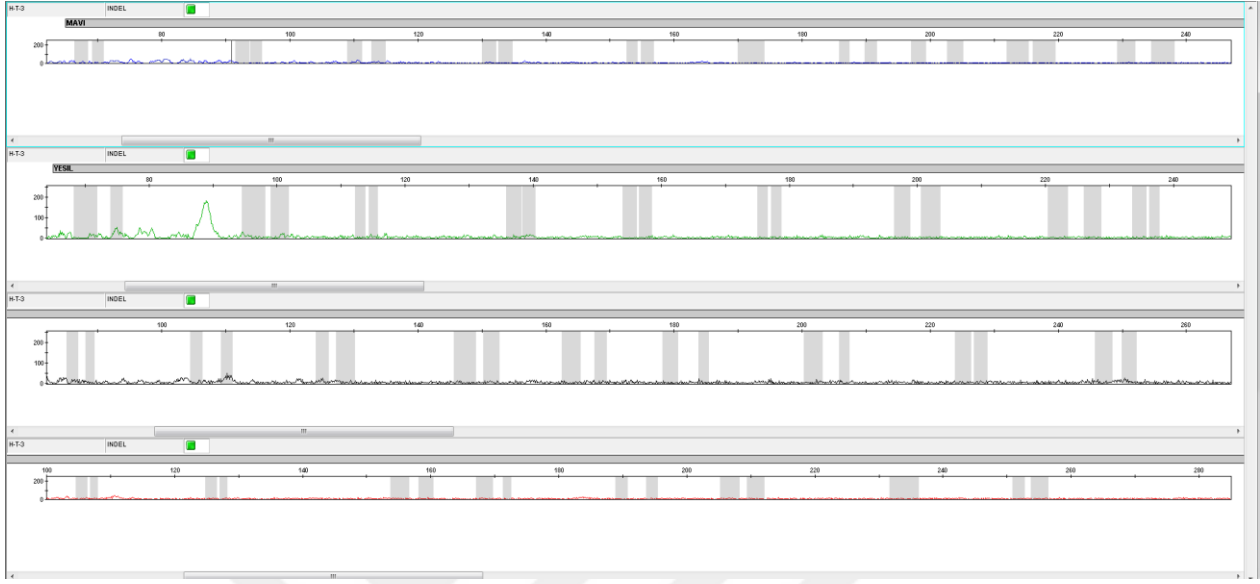
Şekil 13: Oğlak örneğine ait elektroforegram görüntüsü



Şekil 14: Martı örneklerine ait elektroforegram görüntüsü



Şekil 15: Şahin örneklerine ait elektroforegram görüntüsü



Şekil 16: Tavuk örneklerine ait elektroforegram görüntüsü

5. Tartışma ve Sonuç

Adli genetiğin çalışma alanı, bireylerin kimliklendirilmesi ve babalık tayini sorunları temel olarak DNA markırlarının genotiplendirilmesi ile çözümlenmektedir. SNP'lerden sonra tüm insan genomunda en yaygın ikinci DNA polimorfizmi türü InDel markırlarıdır. Genel olarak hem STR'lerin hem de SNP'lerin özelliklerini harmanlayarak ve STR'nin kullanım kolaylığını kaybetmeden azaltılmış amplicon boyutunu kullanmanın başka bir yolunu sunar. Bu nedenle adli tıp uygulamalarındaki zorlu vakalarda InDel'ler alternatif bir markır sistemi olarak kullanılabilir (1,4,5). Adli vakalarda insan dışı türlerin DNA'sı da olay yerinde bulunabilmekte, bu nedenle bu gibi durumlarda üretilecek panellerin insana özgü işlenebilirliği test edilmektedir (11).

Bu tez çalışmasında Filoğlu ve ark. tarafından geliştirilen, Türkiye popülasyonu için yüksek polimorfizm gösteren, böylelikle adli kimliklendirmede kullanılabilir otozomal kromozomlar üzerinde bulunan 35 InDel (rs34660708, rs34495360, rs2308135, rs2307521, rs2308112, rs2308163, rs1610919, rs2308137, rs16646, rs144389514, rs56168866, rs16671, rs33972805, rs25549, rs16722, rs2067304, rs140861207, rs1160981, rs4646006, rs6480, rs28369942, rs2307838, rs3062629, rs10590424, rs16458, rs10623496, rs1610937, rs16363, rs2067147, rs1160965, rs2307656, rs2308101, rs2308072, rs2067191) lokusu, cinsiyet belirteci olan Amelogenin (AMG-XY) ve Y kromozomu üzerinde bulunan (rs2032678) InDel lokusundan oluşan 36-InDelplex panelinin sadece insana özgü olup olmadığının tespit edilmesi adına, adli vakalarda olay yerinde sıklıkla karşılaşma olasılığı bulunabilecek 9 hayvan türü (at, inek, kedi, köpek, koyun, martı, oğlak, şahin, tavuk), toplam 57 örnek çalışıldı.

Geliştirilen kit ve paneller için validasyon çalışmaları yapılması gerekmektedir. Bunlar kullanılacak kitlerin ve panellerin güvenilebilirliği ve tekrar edilebilirliği için gerekli görülmektedir. Bu çalışmada, geliştirilen 36-InDelpex panelinin validasyon çalışmalarından birisi olan tür özgüllüğü Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (DNA Analiz Yöntemler Bilimsel Çalışma Grubu) standartlarının gereklilikleri doğrultusunda çalışılmıştır (83).

Çalışmanın ilk basamağında 57 hayvana ait kan örneğinden DNA izolasyonu yapılarak DNA miktar tayini yapıldı. Miktar tayini sonucunda örneklerden en çok 106,0 ng/μL ve en az 0,842 ng/μL konsantrasyonda DNA tespit edildi (Tablo VI). İkinci basamak olarak örnekler 3 ng/μL'ye seyreltildi. Daha sonra 36-InDelpex panelinin protokollerine uygun olarak primer karışımı hazırlanarak PCR yapıldı (Tablo I ve Tablo II). Tablo III'de belirtilen PCR koşulları sağlandı. PCR ürünlerinin analizi Applied Biosystems™ 3500 Genetik Analizör cihazında elektroforez yapıldı. Sonrasında GeneMapper v.5.0 programında genotipler gözlemlendi. Microsoft® Excel programı ile sonuçlar tablo haline getirildi.

Çalışmamızda; ID16 (rs16646) lokusu deneylerde kullanılmış bütün kedi ve köpek örneklerinde pik göstermiştir. Varyant türü “in” olarak gözlemlenmiştir. ID14 (rs144389514) lokusu deneylerde kullanılmış 10 kedi örneğinde pik göstermiştir. Bunlardan 1 kedide varyant türü “indel”, 9 kedide ise varyant türü “del” olarak gözlemlenmiştir. ID28 (rs2067147) lokusu deneylerde kullanılmış 1 inek örneğinde pik göstermiştir. Varyant türü “del” olarak gözlemlenmiştir.

Song ve ark. geliştirdikleri “20 multi-InDel multipleks sistemi” ‘nin insan olmayan türlerden DNA’yı tespit etme kabiliyetini doğrulamak için, ceza davalarında var olabilecek türler üzerinde kitlerini test ettiler. Tür özgüllüğünü değerlendirmek için köpek, kedi, tavuk, domuz, tavşan, sıçan ve ördek gibi hayvanları kullandılar. İnsan dışı DNA için floresan sinyali gözlemediler.

Sonuçları, sistemdeki tüm lokusların yüksek oranda insan türü özgüllüğüne sahip olduğunu gösterdi (11). Panelin içeriğinde bulunan rs56168866 (ID15) ve rs34660708 (ID26) lokusları 36-InDelplex panelimiz ile ortak olduğu görülmüştür. Her ikisi lokus, iki çalışmada da benzerlik göstermiş, çalışılan hayvan türlerinde pik görülmemiştir.

Jin ve ark. geliştirdikleri 43 InDel'den oluşan panelde, tür özgüllüğünü değerlendirmek için 30 insan olmayan DNA örneği kullandılar. DNA örnekleri ördek, köpek, domuz, koyun, sığır, Sprague-Dawley sıçanı, Kuming faresi, at ve güvercin türlerinden oluşmaktaydı. Sonuçlarında, bu yeni InDel panelinin insanlar ve diğer türler arasında hiçbir çapraz reaktivite gösteren pik'e rastlamadıklarını belirttiler (85). Panelin içeriğinde bulunan rs16646 (ID16) lokusu 36-InDelplex panelimiz ile ortak olduğu görülmüştür. ID16 lokusu yukarıda bahsi geçen çalışmada (85) pik göstermemişken, çalışmamızda kullanılmış kedi ve köpek örneklerinde pik gözlenmiştir.

Klein ve ark. Qiagen firmasına ait olan Investigator DIPplex® kiti ile tür özgüllüğü çalışması yapmış olup, 37 hayvan örneği çalışmışlardır. Analiz edilen türler geyik, köpek, at, kedi, inek, domuz, francois langur (maymun), kurt, ova gorili, ceibes macaque (maymun), püsküllü kulaklı marmoset (maymun), kahverengi başlı örümcek maymunu, bizon, kara elli örümcek maymunu, debrazza maymunu, halka kuyruklu lemur, küçük pençeli su samuru, martes zibellina (samur), bulutlu leopar, aslan, Sibiry kaplanı, Kuzey Amerika su samuru, Kanada geyiği ve pekari (domuz benzeri toynaklı memeli), dağ gelinciği, Hint bizonu, çöl faresi, baykuş maymunu ve pumadır. Çalışmaları sonucunda hiçbir hayvan örneğinden tam bir profil elde edemedikleri, bazı alellerin insan kanına özgü immünokromatografik cihazlarla da reaksiyona giren yüksek primatlarda gözlemlendiği belirtilmiştir (86). Panelin içeriğinde bulunan rs1610937 (ID10), rs2308163 (ID27), rs2308072 (ID19), rs28369942 (ID4) ve rs16363 (ID35) lokusları 36-InDelplex panelimiz ile ortak olduğu görülmüştür. Bu lokuslardan 3 tanesi (rs1610937 (ID10), rs2308072 (ID19) ve rs16363

(ID35)) çalışmada kullanılan primatlarda pik verdiği belirtilmiştir (86). Ortak kullanılmış olan diğer lokuslarda (rs2308163 (ID27) ve rs28369942 (ID4)) sonuçlar benzerlik göstermiş, çalışılan hayvan türlerinde pik görülmemiştir.

Sonuç olarak, geliştirilen 36-InDelpex paneli çalışmada yer alan hayvan türlerinde ID16, ID14 ve ID28 lokusları dışında pik göstermemiş olup, insan elektroforegram profiline benzer tam bir profil oluşmaması ile panelin yüksek oranda insan türü özgüllüğü gösterdiği görülmüştür. Örnek temin edilemediğinden insan DNA'sı ile yakınlık gösteren primatlarda çalışma yapılamaması tez çalışmasının kısıtlılığı olup, bu tür ile çalışmalar yapılması halinde daha kesinlik gösterebilecek sonuçlar elde edilebilecektir.

Çalışmamızda kullandığımız hayvan türlerine ek olarak, olay yerinde rastlanılabilecek hayvan türleri, o yerin coğrafyasına göre değişiklik gösterebileceğinden farklı türler çalışılmalıdır (20,85). Bu çalışma, Filoğlu ve ark. tarafından geliştirilmiş olan 36-InDelpex paneli için validasyon çalışması olup yeni çalışmalarla hayvan türü sayısının arttırılarak, geliştirilen panelin tür özgüllüğü desteklenmelidir.

6. Kaynakça

1. Thompson, R., Zoppis, S., & McCord, B. (2012). An overview of DNA typing methods for human identification: past, present, and future. In *DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics* (pp. 3-16). Humana Press.
2. Jeffreys AJ. Genetic fingerprinting. *Nat Med*. 2005 Oct;11(10):1035–9.
3. Kayser, M., & De Knijff, P. (2011). Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nature Reviews Genetics*, 12(3), 179-192.
4. Weber, J. L., David, D., Heil, J., Fan, Y., Zhao, C., & Marth, G. (2002). Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 71(4), 854-862.
5. Pereira, R., Phillips, C., Alves, C., Amorim, A., Carracedo, Á., & Gusmão, L. (2009). Insertion/deletion polymorphisms: a multiplex assay and forensic applications. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2(1), 513-515.
6. Rodriguez-Murillo, L., & Salem, R. M. (2013). Insertion/deletion polymorphism. *Encyclopedia of behavioral medicine*. New York: Springer, 1076-1076.
7. Tao, R., Zhang, J., Sheng, X., Zhang, J., Yang, Z., Chen, C., ... & Li, C. (2019). Development and validation of a multiplex insertion/deletion marker panel, SifaInDel 45plex system. *Forensic Science International: Genetics*, 41, 128-136.
8. Pereira, R., Pereira, V., Gomes, I., Tomas, C., Morling, N., Amorim, A., ... & Gusmão, L. (2012). A method for the analysis of 32 X chromosome insertion deletion polymorphisms in a single PCR. *International journal of legal medicine*, 126(1), 97-105.
9. Pimenta, J. R., & Pena, S. D. J. (2010). Efficient human paternity testing with a panel of 40 short insertion-deletion polymorphisms. *Genet Mol Res*, 9(1), 601-607.

10. Freitas, N. S., Resque, R. L., Ribeiro-Rodrigues, E. M., Guerreiro, J. F., Santos, N. P., Ribeiro-dos-Santos, Â., & Santos, S. (2010). X-linked insertion/deletion polymorphisms: forensic applications of a 33-markers panel. *International journal of legal medicine*, 124(6), 589-593.
11. Song, F., Luo, H. B., Li, J. N., & Hou, Y. P. (2015). Validation of a multiplex system with 20 multi-Indels for forensic purposes. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e48-e49.
12. Houck, M. M., & Siegel, J. A. (2009). *Fundamentals of forensic science*. Academic Press.
13. Fisher, B. A., & Fisher, D. R. (2012). *Techniques of crime scene investigation*. crc Press.
14. Murphy, E. (2018). Forensic DNA typing. *Annual Review of Criminology*, 1, 497-515.
15. Chambers, G. K., Curtis, C., Millar, C. D., Huynen, L., & Lambert, D. M. (2014). DNA fingerprinting in zoology: past, present, future. *Investigative Genetics*, 5(1), 1-11.
16. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*.
17. Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Jama*, 269(15), 1966-1967.
18. Yakovchuk, P., Protozanova, E., & Frank-Kamenetskii, M. D. (2006). Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic acids research*, 34(2), 564-574.
19. Ghosh, A., & Bansal, M. (2003). A glossary of DNA structures from A to Z. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 59(4), 620-626.
20. Budowle, B., & Van Daal, A. (2008). Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques*, 44(5), 603-610.

21. Weedn, V. W. (1996). Forensic DNA tests. *Clinics in laboratory medicine*, 16(1), 187-196.
22. Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 314(6006), 67-73.
23. Wyman, A. R., & White, R. (1980). A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(11), 6754-6758.
24. Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316(6023), 76-79.
25. Saad, R. (2005, April). Discovery, development, and current applications of DNA identity testing. In *Baylor University Medical Center Proceedings* (Vol. 18, No. 2, pp. 130-133). Taylor & Francis.
26. Gill, P., Jeffreys, A. J., & Werrett, D. J. (1985). Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*, 318(6046), 577-579.
27. Budowle, B., Giusti, A. M., Wayne, J. S., Baechtel, F. S., Fournery, R. M., Adams, D. E., ... & Monson, K. L. (1991). Fixed-bin analysis for statistical evaluation of continuous distributions of allelic data from VNTR loci, for use in forensic comparisons. *American journal of human genetics*, 48(5), 841.
28. Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A., & Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American journal of human genetics*, 49(4), 746.
29. Tautz, D. (1993). Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *DNA fingerprinting: State of the science*, 21-28.

30. Katti, M. V., Ranjekar, P. K., & Gupta, V. S. (2001). Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular biology and evolution*, 18(7), 1161-1167.
31. Bennett, P. (2000). Demystified...: Microsatellites. *Molecular Pathology*, 53(4), 177.
32. Weber, J. L. (1990). Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 1(2), 166-171.
33. Koreth, J., O'LEARY, J. J., & O'D. McGEE, J. A. M. E. S. (1996). Microsatellites and PCR genomic analysis. *The Journal of pathology*, 178(3), 239-248.
34. Budowle, B., Chakraborty, R., Giusti, A. M., Eisenberg, A. J., & Allen, R. C. (1991). Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *American journal of human genetics*, 48(1), 137.
35. Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1986). Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324(6093), 163-166.
36. McEwen, J. E. (1995). Forensic DNA data banking by state crime laboratories. *American journal of human genetics*, 56(6), 1487.
37. 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. *Journal of Forensic Science*, 46(3), 647-660.
38. Roewer L, Parson W. In: *Encyclopedia of Forensic Sciences*. 2. Siegel JA, Saukko PJ, editor. Amsterdam: Elsevier B.V; 2013. Internet accessible population databases: YHRD and EMPOP.

39. Calacal, G. C., Delfin, F. C., Tan, M. M. M., Roewer, L., Magtanong, D. L., Lara, M. C., & De Ungria, M. C. A. (2005). Identification of exhumed remains of fire tragedy victims using conventional methods and autosomal/Y-chromosomal short tandem repeat DNA profiling. *The American journal of forensic medicine and pathology*, 26(3), 285-291.
40. Roewer, L. (2013). DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *Investigative genetics*, 4(1), 1-10.
41. Asamura, H., Sakai, H., Kobayashi, K., Ota, M., & Fukushima, H. (2006). MiniX-STR multiplex system population study in Japan and application to degraded DNA analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 120(3), 174-181.
42. Diegoli, T. M., & Coble, M. D. (2011). Development and characterization of two mini-X chromosomal short tandem repeat multiplexes. *Forensic Science International: Genetics*, 5(5), 415-421.
43. Ascioglu, F., Akyuz, F., Ozdilli, K., Oguz, F., & Carin, M. (2011). X-Chromosomal short tandem repeat loci in the Turkish population. *African Journal of Biotechnology*, 10(21), 4334-4338.
44. Sharma, S., Javadekar, S. M., Pandey, M., Srivastava, M., Kumari, R., & Raghavan, S. C. (2015). Homology and enzymatic requirements of microhomology-dependent alternative end joining. *Cell death & disease*, 6(3), e1697-e1697.
45. Chen, J., Miller, B. F., & Furano, A. V. (2014). Repair of naturally occurring mismatches can induce mutations in flanking DNA. *Elife*, 3, e02001.
46. Rodgers, K., & McVey, M. (2016). Error-prone repair of DNA double-strand breaks. *Journal of cellular physiology*, 231(1), 15-24.

47. Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine*, 21(6), 167-223.
48. Burrus, V., & Waldor, M. K. (2004). Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Research in microbiology*, 155(5), 376-386.
49. Rieger, R., Michaelis, A., Green, M.M. (1968). Mutation. *A glossary of genetics and cytogenetics: Classical and molecular*. New York: Springer-Verlag.
50. Gardner, R. M., Sutherland, G. R., & Shaffer, L. G. (2011). *Chromosome abnormalities and genetic counseling* (No. 61). OUP USA.
51. Patterson, D. (2009). Molecular genetic analysis of Down syndrome. *Human genetics*, 126(1), 195-214.
52. <https://www.nichd.nih.gov/health/topics/turner> (Son Erişim Tarihi 10.03.2021)
53. <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/PolyMecaEng.html> (Son Erişim Tarihi 10.03.2021)
54. Ford, E. B. (1965). Genetic polymorphism. *Genetic polymorphism*.
55. Dobzhansky, T., & Dobzhansky, T. G. (1971). *Genetics of the evolutionary process* (Vol. 139). Columbia University Press.
56. <https://www.biologyonline.com/dictionary/genetic-polymorphism> (Son Erişim Tarihi 04.03.2021)
57. Chanock, S. (2007). Technologic issues in GWAS and follow-up studies.
58. <http://www.doggenetics.co.uk/masks.html> (Son Erişim Tarihi 04.03.2021)
59. Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C., & Ferlini, C. (2015). Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC medical genomics*, 8(1), 1-7.
60. <https://www.thoughtco.com/genetic-polymorphism-what-is-it-375594> (Son Erişim Tarihi 04.03.2021)

61. <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/genomicresearch/snp/> (Son Erişim Tarihi 04.03.2021)
62. Mills, R. E., Pittard, W. S., Mullaney, J. M., Farooq, U., Creasy, T. H., Mahurkar, A. A., ... & Devine, S. E. (2011). Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. *Genome research*, 21(6), 830-839.
63. Mullaney, J. M., Mills, R. E., Pittard, W. S., & Devine, S. E. (2010). Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Human molecular genetics*, 19(R2), R131-R136.
64. Mank, R., Wilson, M. D., Rubio, J. M., & Post, R. J. (2004). A molecular marker for the identification of *Simulium squamosum* (Diptera: Simuliidae). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 98(2), 197-208.
65. Väli, Ü., Brandström, M., Johansson, M., & Ellegren, H. (2008). Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC genetics*, 9(1), 1-8.
66. Erixon, P., & Oxelman, B. (2008). Whole-gene positive selection, elevated synonymous substitution rates, duplication, and indel evolution of the chloroplast *clpP1* gene. *Plos one*, 3(1), e1386.
67. Pereira, F., Carneiro, J., Matthiesen, R., van Asch, B., Pinto, N., Gusmao, L., & Amorim, A. (2010). Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic acids research*, 38(22), e203-e203.
68. Nakamura, H., Muro, T., Imamura, S., & Yuasa, I. (2009). Forensic species identification based on size variation of mitochondrial DNA hypervariable regions. *International journal of legal medicine*, 123(2), 177-184.

69. Consortium, G. P. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319), 1061-1073.
70. Lewis, R. (2004). *Human Genetics: Concepts and Applications* (6th ed.). McGraw Hill.
71. Banavali, N. K. (2013). Partial base flipping is sufficient for strand slippage near DNA duplex termini. *Journal of the American Chemical Society*, 135(22), 8274-8282.
72. https://web.archive.org/web/20090414180359/http://evolution.berkeley.edu/evosite/ev_o101/IIC3aTypes.shtml (Son Erişim Tarihi 04.03.2021)
73. Brown, Terence A. (2007). "16 Mutations and DNA Repair". *Genomes 3*. Garland Science. p. 510. ISBN 978-0-8153-4138-3.
74. Faraone, Stephen V., Tsuang, Ming T., Tsuang, Debby W. (1999). "5 Molecular Genetics and Mental Illness: The Search for Disease Mechanisms: Types of Mutations". *Genetics of Mental Disorders: A Guide for Students, Clinicians, and Researchers*. Guilford Press. p. 145.
75. Shmilovici, A., & Ben-Gal, I. (2007). Using a VOM model for reconstructing potential coding regions in EST sequences. *Computational Statistics*, 22(1), 49-69.
76. Banavali, N. K. (2013). Analyzing the relationship between single base flipping and strand slippage near DNA duplex termini. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(46), 14320-14328.
77. Manjari, S. R., Pata, J. D., & Banavali, N. K. (2014). Cytosine Unstacking and Strand Slippage at an Insertion–Deletion Mutation Sequence in an Overhang-Containing DNA Duplex. *Biochemistry*, 53(23), 3807-3816.
78. Kuma, V., Abbas, A. K., Fausto, N., & Mitchell, R. (2007). *Robbins Basic Pathology*, ; Saunders.

79. Murthy, V., Jia, L. F., Samuel, V. P., & Kademane, K. (2015). Forensic identification by using insertion-deletion polymorphisms. *International Journal of Human Genetics*, *15*(2), 55-59.
80. Pena, H. B., & Pena, S. D. (2012). Automated genotyping of a highly informative panel of 40 short insertion-deletion polymorphisms resolved in polyacrylamide gels for forensic identification and kinship analysis. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, *39*(3), 211-216.
81. Zhao, S., Zhang, S., Que, T., Zhao, Z., & Li, C. (2011). Application of insertion/deletion polymorphisms in human gastrointestinal tumour tissues for identification purpose. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, *3*(1), e297-e298.
82. Santos, N. P., Ribeiro-Rodrigues, E. M., Ribeiro-dos-Santos, Â. K., Pereira, R., Gusmão, L., Amorim, A., ... & Santos, S. E. (2010). Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48–insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Human mutation*, *31*(2), 184-190.
83. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. (2016). Validation guidelines for DNA analysis methods. *Forensic Science Communications*, *6*(3).
84. Duvenci A. İnsersiyon/delesyon (InDel) lokuslarına ait kimliklendirme panelinin geliştirilmesi ve validasyonu [PhD tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa / Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, 2020.
85. Jin, R., Cui, W., Fang, Y., Jin, X., Wang, H., Lan, Q., ... & Zhu, B. (2021). A novel panel of 43 insertion/deletion loci for human identifications of forensic degraded DNA samples: development and validation. *Frontiers in genetics*, *12*, 210.

86. Klein, R., Neumann, C., & Roy, R. (2015). Detection of insertion/deletion polymorphisms from challenged samples using the Investigator DIPplex® Kit. *Forensic Science International: Genetics*, 16, 29-37.



Ekler

EK-1 Etik Kurul Onay Formu



Özgeçmiş

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Melis IŞIK

Doğum Yeri ve Tarihi:

E-posta :

Eğitim Bilgileri

2019-2022: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Fen Bilimleri A.B.D. (Tezli Yüksek Lisans Programı)

2015-2019: Bahçeşehir Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (İngilizce-Lisans Programı)

2018 : BAU International Academy Of Rome (Bahar Dönemi- BAU Global Öğrencisi)

İş Tecrübesi

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, BAP 34891 Projesi, (Ağustos-Eylül) 2019, Bursiyer.

Biruni Laboratuvarları Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi, Moleküler Genetik ve Sitogenetik Laboratuvarı, (Temmuz-Ağustos) 2018, Stajyer.