

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

Danışman
Prof. Dr. Faruk Aşıcıoğlu

KANSERLİ DOKULARDA INDEL İNSTABİLİTESİ VE ADLİ BİLİMLER
AÇISINDAN ÖNEMİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOG İPEK GÜREL
İSTANBUL, 2022

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

Danışman
Prof. Dr. Faruk Aşıcıoğlu

KANSERLİ DOKULARDA INDEL İNSTABİLİTESİ VE ADLİ BİLİMLER
AÇISINDAN ÖNEMİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOG İPEK GÜREL
İSTANBUL, 2022

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

Proje No: 35728

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının her adımında bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen, sonsuz bilgi ve birikiminin yanı sıra güler yüzüyle bana katkıda bulunan çok saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Faruk AŞICIOĞLU' na,

Ayrıca çalışmamda her sorunumda bana yardım eden, kaynak ve yöntem açısından beni destekleyen ve bilgilendiren yol göstericim değerli hocalarım Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU TÜFEK'e ve Doç. Dr. Gökhan ERSOY'a,

Tez çalışmamı yaparken laboratuvarda bana her konuda destek olan, her sorumu sabırla cevaplayıp, bana birçok şey öğreten Zülal ŞİMŞEK'e,

Süreç boyunca desteğini eksik etmeyen, her daim bana yardımcı olan Arş. Gör. Ayşegül Şen Yılmaz'a ve Hande Ertürk'e

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca yanımda olan, kâh ağlayıp kâh güldüğümüz, her şeyi beraber daha kolay atlattığımız canım dostlarım Aleyna İLHAN, Melis IŞIK ve Özgür DAYANIR'a,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca sayesinde deney yaparken hem eğlendiğim hem öğrendiğim, sevgili laboratuvar partnerim Agata PODOLAŃCZUK'a,

Çalışmalarım süresince bana verdikleri destek, moral ve sevgi için biricik arkadaşlarım Gamze AKKOYUN ve Seda ÇELİK'e,

Bu uzun süreçte ve eğitim hayatımın her kademesinde beni daima destekleyen, hep yanımda olan, bana her zaman sevgilerini gösteren, beni bugünlere getiren annem, babam ve canım kardeşim İnci GÜREL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İpek GÜREL

İçindekiler

Tablolar Dizini.....	iv
Şekiller Dizini.....	v
Kısaltmalar Dizini	vi
Özet.....	1
Abstract.....	3
1. Giriş ve Amaç	5
2. Genel Bilgiler	7
2.1. Adli Genetik.....	7
2.2. DNA'nın Keşfi.....	8
2.2.1. Mutasyon.....	9
2.2.2. Polimorfizm	10
2.3. Adli Bilimlerde Kimliklendirme.....	11
2.4. Modern Genetik Belirteçler	13
2.4.1. Kısa tekrar dizileri(STR).....	14
2.4.2. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP)	20
2.4.3. InDel(İnseriyon-Delesyon) polimorfizmi	23
3. Gereç ve Yöntem	29
3.1. Deneyde Kullanılan Malzemeler	30
3.1.1. Cihazlar	30
3.1.2. Ticari kitler.....	30

3.1.3. Kimyasal Maddeler	30
3.2. Deneyde Kullanılan DNA Örnekleri	31
3.3. Deney Aşaması	32
3.3.1 Örneklerden kesit alınması.....	32
3.3.2. DNA izolasyonu.....	33
3.3.3. DNA miktar tayini.....	36
3.3.4. PCR	36
3.3.5. PCR ürünlerinin Applied Biosystems™ 3500 cihazı ile analizi	38
3.3.6. Verilerin analizi ve sonuçların değerlendirilmesi	40
4. Bulgular	40
4.1. Doku Örneklerinden DNA İzolasyonu ve DNA Miktarının Belirlenmesi	41
4.2. Genotiplerin Belirlenmesi.....	43
4.2.1. Meme dokusuna ait DNA'ların genotiplendirilmesi.....	44
4.2.2. Tiroit dokusuna DNA'ların genotiplendirilmesi	44
4.3. Kanserli ve Normal Dokuya Ait Profillerin Karşılaştırılması	44
5. Tartışma ve Sonuç	50
6. Kaynaklar	56
EK-1	63
EK-2	64
Özgeçmiş	71

Tablolar Dizini

Tablo I. Meme dokularına ait patolojik tanılar.....	31
Tablo II. PCR bileşenleri ve miktarları	37
Tablo III.PCR Koşulları	38
Tablo IV. Elektroforez bileşenleri ve miktarları.....	38
Tablo V. Elektroforez Koşulları	39
Tablo VI. Meme dokularına ait DNA miktarları.....	42
Tablo VII.Tiroit dokularına ait DNA miktarları.....	43
Tablo VIII. Meme dokusuna ait genotipler	45
Tablo IX. Tiroit dokusuna ait genotipler	46
Tablo X. Tümör tipine göre InDel lokuslarında bulunan mutasyon olaylarının sayısı 47	

Şekiller Dizini

Şekil 1:Adli genetiğin soruşturmadaki rolü(10)	7
Şekil 2:DNA sarmalı(21).....	9
Şekil 3: Mutasyon çeşitleri(29)	10
Şekil 4: Ailenin DNA parmak izleri(42)	13
Şekil 5:Basit STR(THO1)(10).....	14
Şekil 6: Bileşik STR(FGA)(10).....	15
Şekil 7: Karmaşık STR(D21S11)(10)	15
Şekil 8: Mikrosatelit instabilitesinin(MSI) oluşum mekanizması(58)	17
Şekil 9: Tamamen heterozigosite kaybının görünümü(62)	18
Şekil 10: Kısmi heterozigosite kaybının görünümü(62)	19
Şekil 11:SNP'nin oluşumu(70)	21
Şekil 12:İnsersiyonun oluşumu(81).....	23
Şekil 13:Delesyonun oluşumu(81)	23
Şekil 14:Çerçeve kayması mutasyonu(81)	25
Şekil 15: LIZ 500'ün elektroforegram görüntüsü	40
Şekil 16: Heterozigosite kaybı.....	48
Şekil 17: Kısmi heterozigosite kaybı.....	48
Şekil 18: InDel instabilitesi	49

Kısaltmalar Dizini

AIM: Soy bilgilendirici markırlar (Ancestry informative markers)

Bç: Baz çifti

CODIS: Kombine DNA İndeks Sistemi (Combined DNA Index Systems)

DNA: Deoksiribonükleik asit

FBI: Federal Araştırma Bürosu (Federal Bureau of Investigation)

HLA: İnsan lökosit antijenleri

InDel: İnsersiyon ve delesyon polimorfizmi

LOH: Heterozigosite kaybı

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphism)

MSI: Mikrosatelit instabilitesi

MSS: Mikrosatelit stabilitesi

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RFLP: Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi

STR: Kısa ardışık tekrar dizileri (short tandem repeats)

VNTR: Değişken sayıda ardışık tekrarlar (variable number tandem repeats)

Özet

Adli DNA profilleme çalışmaları için malign tümör örneklerinin kullanılabileceği durumlar söz konusu olabilmektedir. Örneğin kayıp kişi ya da felaket kurbanının kimliklendirilmesi durumunda, yaşam boyunca o kişilerden toplanan arşivlenmiş biyopsi örnekleri, ölen kişi ile doğrudan karşılaştırma yapılabilen tek biyolojik materyal olabilir.

Ayrıca babalık davalarında varsayılan babanın gaip olması, ölmüş olup mezarının bilinmemesi veya yurt dışında olması gibi herhangi bir gerekçe ile mezarının açılmaması ya da cesedin yakılmış olması gibi haller başka örnekler olarak verilebilir. Bu durumda varsayılan babaya ait arşivlenmiş doku örnekleri kullanılabilir. Ayrıca doktor tarafından kanser tanısının yanlış koyulup, organın çıkarıldığı vakalarda hekim hatası sorgulandığında parafin bloğun ameliyat edilen kişiye ait olup olmadığı incelenmektedir. STR'ler kimliklendirme amaçlı adli bilimler laboratuvarlarında tercih edilen ilk sistemlerdir. Ancak kanserli dokularda meydana gelen genetik instabiliteler STR polimorfizminin değişmesine sebep olarak hatalı sonuçların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Öte yandan STR ve SNP'lerin her ikisinin de tercih edilmelerini sağlayan özelliklerini bir arada taşıdığı için InDel'ler, adli bilimlerde genetik bir markır olarak büyük bir potansiyele sahiptir. STR instabilitesinin birçok farklı tümörde gözlenen çok yaygın bir olay olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür.

Ancak literatür incelendiğinde şimdiye kadar parafin blok hazırlanmış kanserli dokulardan InDel stabilitesinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu amaçla formalin ile fikse edilmiş parafinli meme ve tiroit örneklerinin hem kanserli doku hem de normal doku içeren kısmından DNA izolasyonu yapılmıştır. Örnekler miktar tayini yapıldıktan sonra Filoğlu tarafından geliştirilen 36-InDelpex panelin lokusları PCR işlemi ile çoğaltılmıştır. Genemapper® v.5.0 (Thermo Fisher Scientific) analiz programı kullanılarak PCR ürünlerinin

elektroforezi sonrası örneklerden elde edilen verilerin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi yapılmıştır. Meme dokularında 26 dokudan 5 örnek hariç hepsinde değişiklik görülmüştür. Örneklerin %80,8'inde mutasyonel değişiklik saptanmıştır. Tiroit dokularında ise 21 dokudan 5'i hariç diğer örnekler değişmeden kalmıştır. Dolayısı ile tiroit dokularının %76,2'si aynı kalmıştır. Her iki dokuda da en çok görülen değişiklik heterozigosite kaybı olmuştur. InDel'ler STR'lerden daha az mutasyon oranına sahip olmasına rağmen bu tez çalışmasında kanserli dokular ve normal dokuların profilleri arasında farklılıklar saptanmıştır. Bu durum elde edilen profil sonuçlarının yanlış yorumlanmasına yol açabileceğinden referans örnek olarak sadece tümörlü dokuların kullanıldığı vakalarda dikkatli olunması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: InDel, instabilite, kanserli doku, kimliklendirme, STR, adli genetik

Abstract

There may be cases where malignant tumor samples can be used for forensic DNA profiling studies. For example, if the missing person or disaster victim is identified, archived biopsy specimens collected from those individuals throughout life may be the only biological material that can be directly compared to the deceased. Cases such as the presumed father being absent in paternity cases, his deceased grave is unknown, or his grave cannot be opened due to any reason such as being abroad or the corpse being cremated can be given as other examples. In this case, archived tissue samples belonging to the assumed father can be used. In addition, in cases where the diagnosis of cancer is made incorrectly by the doctor and the organ is removed, when the physician's error is questioned, it is examined whether the paraffin block belongs to the person who was operated on. STRs are the first systems preferred in forensic science laboratories for identification purposes, However, genetic instability in cancerous tissues causes STR polymorphism to change, leading to erroneous results. On the other hand, InDels have great potential as a genetic marker in forensic science, as they have features that make both STR and SNPs preferable. It has been seen in studies that STR instability is a very common event observed in many different tumors, but when the literature was examined, there is no study was found that examined the stability of InDel in paraffinized cancerous tissues before. For this purpose, DNA isolation was made from both the cancerous tissue and normal tissue samples of formalin-fixed paraffinized breast and thyroid samples. After quantification of the samples, the loci of the 36-InDelplex panel developed by Filoğlu were amplified by PCR. Visualization and evaluation of the data obtained from the samples after electrophoresis of PCR products were performed using the Genemapper® v.5.0 (Thermo Fisher Scientific) analysis program. Changes were observed in all but 5 samples from 26 tissues in breast tissues. Mutational changes were detected in %80,8 of the samples. In thyroid tissues, except 5 out of 21 tissues remained unchanged. Therefore, %76,2 of the thyroid tissues remained the same. The

most common change in both tissues was loss of heterozygosity. Although InDels have a lower mutation rate than STRs, differences were found between the profiles of cancerous tissues and normal tissues in this thesis study. Since this may lead to misinterpretation of the profile results obtained, care should be taken in cases where only tumor tissues are used as reference samples.

Keywords: InDel, instability, cancerous tissue, identification, STR, forensic genetics



1. Giriş ve Amaç

İnsanlarda DNA polimorfizmlerinin analizi genetik araştırma ve tıbbi tanı için değerli bir araç olmakla birlikte klinik ve adli tıp laboratuvarlarında da rutin uygulama haline gelmiştir. DNA analizi hastalıkların tanısında, babalık, akrabalık testlerinde, insan kalıntılarının tanımlanmasında ve biyolojik örneklerin kaynağının belirlenmesi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kimlik tespitinde DNA analizi, yalnızca söz konusu örneklerle karşılaştırılacak bir referans örnek varsa yararlıdır. Açık bir referansın olmadığı durumlarda, alternatif bir kaynak bulmak gereklidir. Referans numunenin doğruluğu şüpheli olduğunda veya malign tümör gibi olası genetik değişkenliğe sahip dokulardan numune alınması durumunda bazı zorluklar ortaya çıkabilmektedir. Çünkü malign tümörlerin bilinen özelliklerinden biri DNA molekülünde kalıcı değişikliklere sahip olmasıdır ve bu hücrelerden elde edilen DNA'da mikrosatellit instabilitesi veya heterozigosite kaybı gibi anormaller görülmektedir(1).

Adli bilimler laboratuvarlarında kimliklendirme amaçlı analizlerde tercih edilen ilk sistemler olan kısa tandem tekrarları (STR'ler) görünür özellikler veya patolojilerle bağlantılı olmamakla birlikte nispeten kararludur ve popülasyonda iyi dağılmış bir şekilde bulunmaktadır(1). Ayrıca yüksek heterozigosite gösteren STR'ler multialeliktir ve analizleri kolaydır(2). Klinik doku örnekleri adli vakalarda sık kullanılmamakla birlikte zaman zaman kimliği belirlenememiş bedenlerin tanımlanmasında veya babalık testlerinde rol oynayabilmekte, aynı zamanda patolojik örneklerdeki karışıklıkların ve kontaminasyondan kaynaklanan sorunların çözümünde yardımcı olabilmektedirler. Patoloji kliniklerinin arşivlerinde analizi tamamlanan patolojik preparatlara ait örnekler dikkatli bir şekilde saklanmakta ve bu örnekler adli STR testleri için önemli bir potansiyel kaynak oluşturmaktadır(1). Ancak kanserli dokularda meydana gelen genetik instabiliteler STR polimorfizminin değişmesine sebep olduğu için hatalı sonuçların ortaya çıkmasına yol açmaktadır(3). STR'lerin yanı sıra genomda fazla miktarda bulunmaları ve analizlerinin

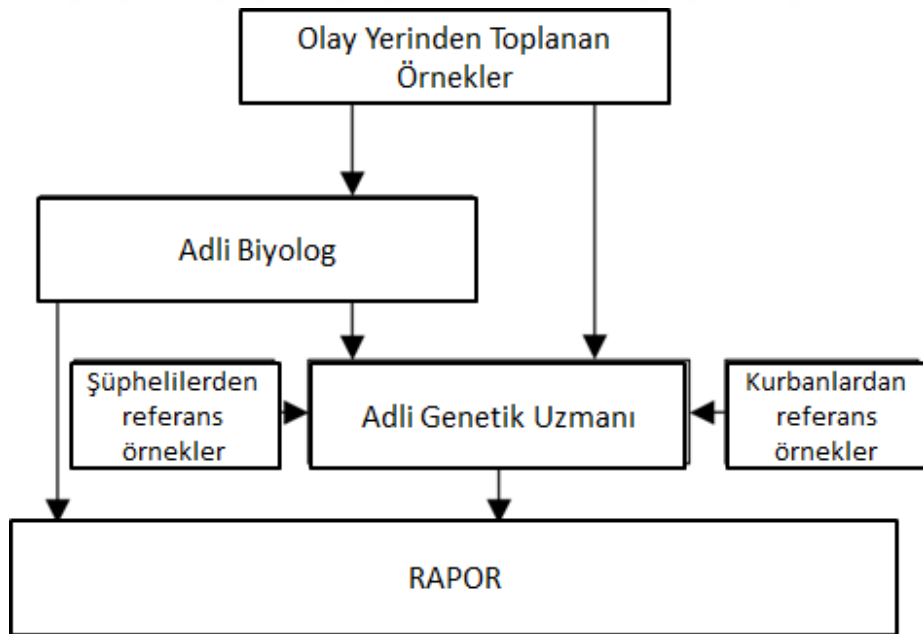
kolaylığı gibi nedenlerle, InDel'lerin adli bilimlerde potansiyel bir genetik belirteç olabileceği belirtilmiştir(4). InDel'ler küçük ampikon boyutuna sahip olduğu için degrede örneklerde başarılı sonuç vermektedir ve STR'lere göre daha az mutasyon oranına sahiptir(5,6). Ayrıca InDel'ler mikrovaryant ürünler içermedikleri için karışım(mixture) örneklerinde kullanılabilir ve biyocoğrafik soy analizi gibi popülasyon genetiği çalışmaları için de uygun olmaktadır(7). Tüm bu özellikler InDel'leri STR'lere göre daha avantajlı konuma getirmektedir.

Bu tez çalışması ile kimliklendirmede kullanılmak amacı ile Filoğlu ve arkadaşları tarafından geliştirilen, Türkiye popülasyonu için yüksek polimorfizm gösteren, 36 InDel lokusunun kanserli dokularda incelenmesi amaçlanmaktadır. Böylece STR'lerde gözlenen instabilitenin InDel'lerde de görülüp görülmediği saptanmış olacaktır. Bu amaçla kanserli doku ve çevresinde bulunan normal dokuların genotiplendirilmesi yapılarak elde edilecek profillerin istatistiksel değerlendirmelerle karşılaştırılması yapılması planlanmaktadır.

2. Genel Bilgiler

2.1. Adli Genetik

Adli genetik, adli tıp ve kriminalistik arasındaki ilişkiden meydana gelmektedir. Bu alan diğer alanlara benzer şekilde uzun vadede yavaş bir şekilde gelişerek ortaya çıkmıştır ve bağımsız bir alana dönüşmüştür(8,9). Adli genetikçilerin çalışmaları, çalıştıkları ülke ve laboratuvara göre değişiklik göstermekle birlikte, suç mahallinden elde edilen materyalin analizini, ebeveynlik testlerini ve insan kalıntılarının tanımlanması içermektedir. Adli laboratuvarlar olay yerinden elde edilen delilleri, referans örnek olarak da şüpheli ve kurbanlardan alınan örnekleri incelemektedir. Adli genetiğin soruşturmadaki rolü olay yerinden alınan örneklerin şüphelilerle karşılaştırılması ve mahkemede sunulacak ya da soruşturma yapanları bilgilendirebilecek bir rapor oluşturmaktır(Şekil 1)(10).



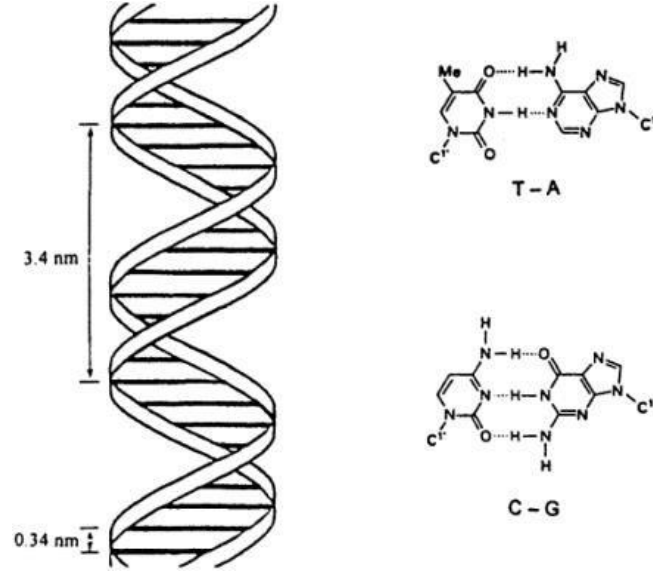
Şekil 1:Adli genetiğin soruşturmadaki rolü(10)

2.1.1. Adli genetiğin tarihsel gelişimi

1900 yılında Landsteiner'ın ABO kan grup sistemini keşfedip, bireylerin kan gruplarına göre gruplandırılabilirliğini bulması ile adli genetik bir alan olarak bilim dünyasına katılmıştır(11). 1910 yılında Locard değişim prensibini ortaya koyarak her temasın bir iz bırakacağını söylemiştir ve modern adli bilimlerin başlangıcını sağlamıştır(12). 1931 yılına gelindiğinde ABO kan gruplarından absorbsiyon-inhibisyon testi ile kimliklendirme adli bilimler laboratuvarlarında standart haline gelmiştir(10). Sonrasında ise moleküler biyolojideki gelişmelerle birlikte biyolojik kanıtların analizinde tamamen farklı bir dönem başlamıştır. Genetik polimorfizmlerin DNA seviyesinde tespit edilebilmesi ile bireyler arasındaki nükleotid farklılıklarının DNA kodlama yöntemi ile ortaya çıkarılması mümkün olmuştur(13).

2.2. DNA'nın Keşfi

DNA ilk olarak 1869 yılında İsviçreli fizyolojik kimyager Friedrich Miescher tarafından beyaz kan hücrelerindeki protein izole edilmeye çalışırken bulunmuş ve nüklein adı verilmiştir(14).1910 yılına gelindiğinde Hunt Morgan kalıtım çalışmak için meyve sineklerini kullanmıştır ve genlerin kromozomlar üzerinde olduğunu bulmuştur(15).Griffith'in bakterileri kullanarak yaptığı transformasyon deneylerinden sonra Avery ve arkadaşları da aynı tarz deneyler yaparak DNA'nın genetik materyal olduğunu göstermiştir(16). E. coli bakterisini enfekte eden T2 bakteriyofajı ile çalışan Hershey ve Chase DNA'nın kalıtsal materyal olduğunu kesin olarak kanıtlamıştır(17). 1950 yılında Chargaff DNA'nın içeriğinin her canlıda farklılık gösterdiğini ve adenin sayısının timin sayısına, guanin sayısının ise sitozin sayısına eşit olduğunu bulmuştur(18). Daha sonra 1952 yılında Rosalind Franklin DNA'nın 3 boyutlu yapısını X-ray kristalografi ile görüntülemiştir(19).1953 yılında ise Watson ve Crick DNA'nın çift sarmal yapısını keşfederek bilim dünyasına büyük bir katkı sağlamıştır(Şekil 2)(20).

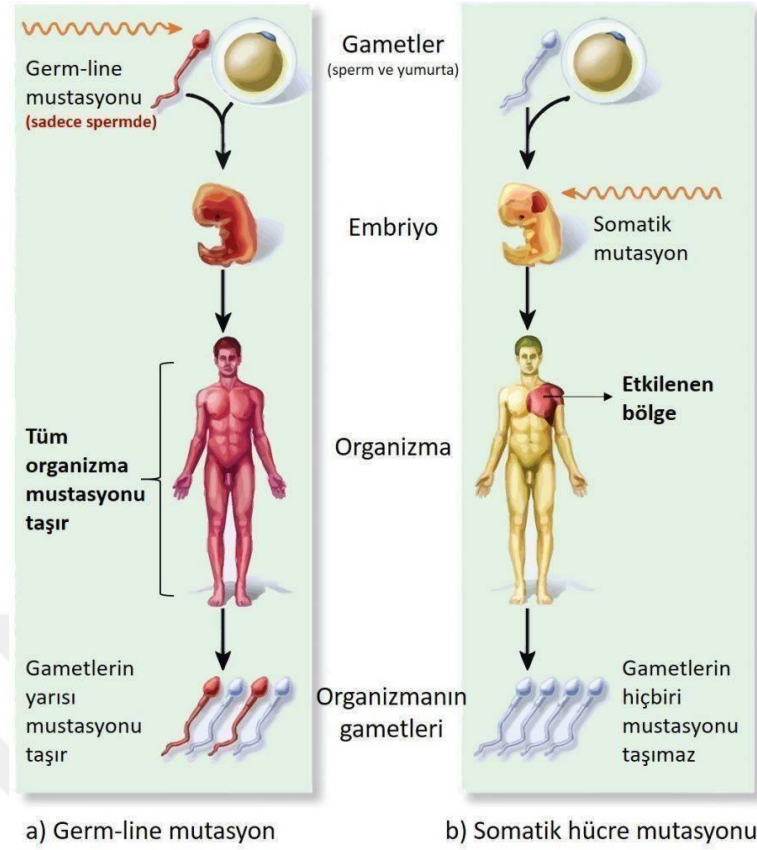


Şekil 2:DNA sarmalı(21)

1980'lerden itibaren insan genomu ayrıntılı bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır. İnsan genom projesi ile birlikte insan genomunun yaklaşık 3 milyar baz çiftinden oluştuğu bulunmuştur. Ayrıca 23 kromozomluk 2 set halinde paketlenmiş DNA'dan oluşan genom 20-25 bin protein kodlayan gen içermektedir. Aynı zamanda insanların genomlarının %99.9'u aynıdır(22–25). Adli olgularda tüm genomun çalışılması mümkün olmadığı için farklılık yaratan kısımdaki polimorfik bölgelerle çalışılmaktadır(26).

2.2.1. Mutasyon

Nükleotid sekansında meydana gelen ve çoğunlukla hastalığa sebep olan değişikliklere mutasyon denmektedir(27). Mutasyonlar, germ hattı mutasyonu ile ebeveynlerden geçebildiği gibi somatik mutasyonlar ile bireyin yaşamı boyunca da edinilebilmektedir(Şekil 3). Mutasyonlar genellikle onarılmamış DNA hasarından, replikasyon hatalarından veya hareket edebilen genetik unsurlardan kaynaklanmaktadır(28).



Şekil 3: Mutasyon çeşitleri(29)

2.2.2. Polimorfizm

Polimorfizm ise popülasyonda %1 veya daha yüksek frekansta görülmekle beraber doğal olarak meydana gelmektedir ve etkisiz ya da faydalı olmaktadır. Polimorfizmler, mutasyonlara benzer şekilde DNA dizininde bir ya da daha fazla nükleotidin değişmesi ile oluşmaktadır(28). Ayrıca genomun hem kodlayan hem de kodlamayan bölgelerinde görülmekte ve nesilden nesile Mendel kanunlarına göre aktarılmaktadırlar(30). Polimorfizmler iki gruba ayrılmaktadır(31):

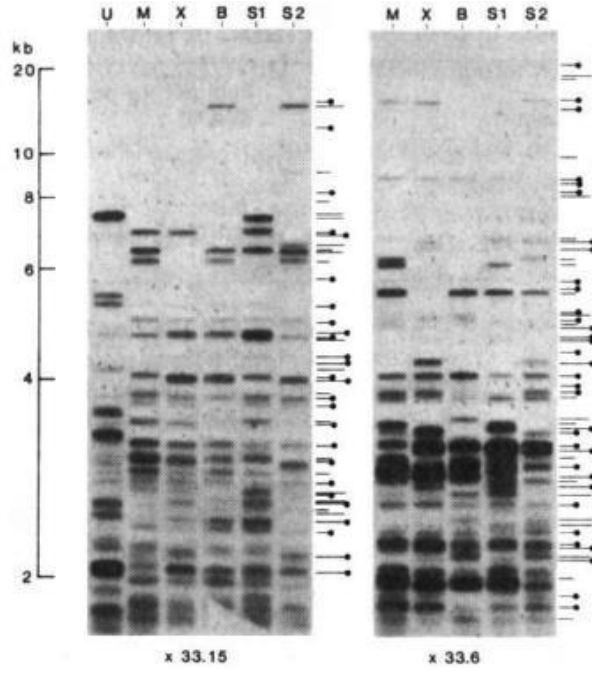
- Dizi polimorfizmleri: Tek nükleotid polimorfizmi(SNP) ve insersiyon-delesyon polimorfizmi(InDel)
- Uzunluk polimorfizmleri: Mikrosatelit(STR) ve minisatelit(VNTR)

2.3. Adli Bilimlerde Kimliklendirme

DNA profillemesi adli bilim uzmanları tarafından sıklıkla kullanılmaktadır ve kimliklendirme için iyi bir araçtır. Şiddet suçları, terör, cinayet, tecavüz ve hırsızlık olaylarında failin kimliklendirilmesi ya da ebeveynlik testleri ve kayıp kişilerden kalanların kimliklendirilmesi gibi vakalarda kullanılmaktadır(32–34). Bir kişinin kan, saç, tükürük, kemik ve semen gibi biyolojik materyallerin analizi ile kimliklendirilmesi adli bilimler literatüründe 1904 yılından beri yer almaktadır(13). Genetik belirteçlerin adli amaçlarla kullanımı 1900 yılında Landsteiner tarafından bulunan ABO kan gruplamasının uygulanmasıyla başlamıştır ve bu belirteçler seroloji tabanlı kimliklendirmede bir başlangıç sağlamıştır(11). Daha sonra 1958 yılında Dausset lökositler üzerinde bulunan genetik polimorfizm içeren HLA adı verilen belirteci bulmuştur(35,36). Ayrıca kimliklendirme amaçlı protein belirteçleri olarak insan kırmızı kan hücreleri ve kan serumunda bulunan, kişiler arasında amino asit dizisi farklılığı gösteren izoenzimler de kullanılmıştır(37). Ancak proteine dayalı belirteçlerin, ayırım güçlerinin düşük olması, çoğu dokuda yeterli düzeyde bulunmaması ve çevresel koşullara maruz kalmış biyolojik örneklerde stabil olmamasından dolayı kullanımı sınırlı kalmıştır(38). DNA'nın kimliklendirme amaçlı kullanımında ilk adım değişken lokusların bulunmasıyla olmuştur. İlk olarak Wyman ve White restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri veya RFLP olarak adlandırılan değişken uzunlukta restriksiyon parçaları ile karakterize edilen polimorfik DNA lokuslarının genetik belirteç olarak kullanılabileceğini belirtmiştir(39). Daha sonra Botstein ve arkadaşları bireyler arasındaki genetik farklılıkları göstermek amacıyla insan genomundaki genlerin haritalanmasında RFLP kullanmıştır(40). Ancak bugün DNA parmak izi ya da DNA profillemesi olarak bilinen tekniği ilk bulan Sir Alec Jeffreys ve arkadaşlarıdır. VNTR'ler, bir popülasyonun üyelerini ayırt etmek için kullanılabilen genomda tanımlanmış bir konumda bir dizi tekrarlayan diziden oluşan DNA'nın yüksek düzeyde polimorfizm içeren bölgeleridir(41). 6 ile 100 bp arasında değişen bir tekrar dizisine sahip olan VNTR'ler bazı

alellerde binlerce kez temsil edilmektedir ve tekrar sayısındaki değişim, boyutları 500 bç ile 30 kb arasında değişen aleller oluşturmaktadır(10).

Jeffreys tarafından VNTR'leri incelemek için kullanılan teknik RFLP'dir. RFLP analizinde, izole edilmiş DNA 4–6 bç sekans motiflerine dayalı olarak tanımlanan yerlerde daha küçük parçalara spesifik restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmektedir. Parçalar, jel elektroforezi kullanılarak boyutlarına göre ayrıldıktan sonra DNA, Southern blot tekniği ile bir naylon membrana aktarılmaktadır. İlgilenilen VNTR sekansını hedefleyen bir radyoaktif prob, tespit için naylon membrana eklenen tek iplikli DNA'ya (ssDNA) hibridize edildikten sonra X ışınına maruz bırakılmakta ve DNA parmak izi oluşmaktadır(41). DNA parmak izinin kullanıldığı ilk vaka İngiltere'de doğup anne ve babası ayrıldıktan sonra 4 yaşında babasının yanına Gana'ya göç eden ve 15 yaşında İngiltere'ye annesi ve kardeşlerinin yanına dönmek isteyen Andrew Sarbah'ın vakasıdır. İngiltere'ye girmesi için annesi olduğunu söylediği kişinin teyzesi değil annesi olduğunu kanıtlaması gerekmektedir. Bunun için de Jeffreys ve arkadaşları çocuğun(X), annesinin(M), erkek kardeşinin(B) ve kız kardeşlerinin(S1,S2) VNTR profilini çıkarıp durumu çözerek Sarbah'ın İngiltere'de kalmasını sağlamıştır(42,43)(Şekil 4).



Şekil 4: Ailenin DNA parmak izleri(42)

DNA profillemesinin kullanıldığı ilk cinayet vakası ise Collin Pitchfork'un 15 yaşında iki kıza tecavüz edip öldürdüğü vakadır. İki cinayetin de aynı kişi tarafından işlendiği olay yerlerindeki spermden elde edilen DNA örneklerinin karşılaştırılması sonucu anlaşılmıştır. Daha sonra olay yerinden elde edilen DNA örneği ve cinayetlerin işlendiği alanlarda ikamet eden erkeklerden alınan kan örneklerinden çıkarılan DNA profilleri karşılaştırılarak fail bulunmuştur(43).

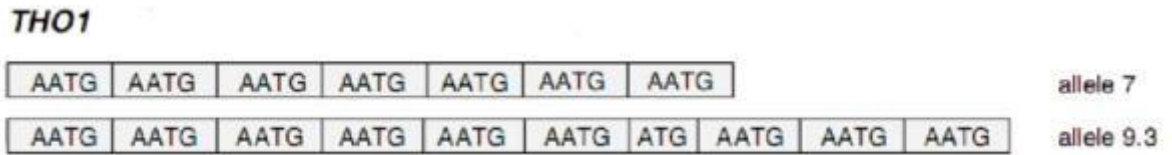
2.4.Modern Genetik Belirteçler

VNTR'lerin kullanımı, analizi için fazla miktarda yüksek molekül ağırlıklı DNA'ya ihtiyaç duyulması ve profillerinin yorumlanmasının zor olması nedeniyle kısıtlı kalmıştır. 1990'ların ortalarından itibaren de yerlerini STR'lere bırakmışlardır(10,32,44). DNA profillemesinde sonraki büyük adım Mullis ve arkadaşları tarafından PCR'ın bulunması olmuştur. Bu buluş adli bilimlerde büyük bir ilerlemeye yol açmış olup DNA'nın belirli bir kısmının çok fazla kopyasının in vitro olarak üretimini sağlamaktadır (45).

2.4.1. Kısa tekrar dizileri(STR)

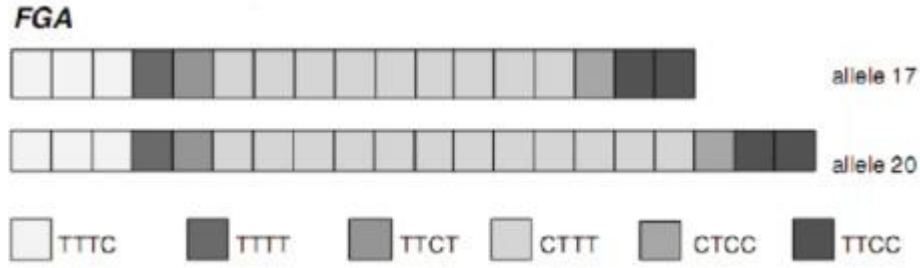
2-7 bç uzunluğunda ardışık tekrarlı diziler içeren STR'ler genoma yayılmış bir şekilde bulunmakta olup insan genomunda her 6-10 kilobazda bir görülmektedir. Yaklaşık olarak 1 milyon STR lokusu olduğu belirtilmiştir. Trimerik ve tetramerik STR'ler ise genomda her 20 kilobazda bir görülmektedir. STR'ler bulundurdıkları tekrarların içeriği ve sayıları bakımından birbirinden çok farklıdırlar (24,46–48). Fazla derecede polimorfizm içermelerinden dolayı STR'lerin ayırım güçleri yüksektir. STR lokusları, kimliklendirme amaçlı adli bilimlerde laboratuvarlarında tercih edilen ilk metot olmasının yanı sıra genetik bağlantı(kromozom haritalandırması) ve hastalık teşhislerinde de kullanılmaktadır(32,49). STR'ler her zaman homojen bir tekrar ünitesinin belirli sayıda tekrarından oluşmaz. Bu yüzden STR lokusları ihtiva ettikleri tekrar ünitelerinin içeriğine göre 3'e ayrılmıştır(48):

- Basit STR'ler: İçerdikleri tekrar ünitelerinin baz dizilerinin sıralanışı ve sayısı aynıdır.
Örn: THO1(tyrosine hydroxylase 1)(Şekil 5)



Şekil 5:Basit STR(THO1)(10)

- Bileşik STR'ler: İki ya da daha fazla tekrar ünitesi içermekle beraber bu tekrar ünitelerinin baz dizilimi farklılık gösterir. Örn: FGA(Fibrinogen alpha chain)(Şekil 6)



Şekil 6: Bileşik STR(FGA)(10)

- Karmaşık STR'ler: İçerdikleri tekrar ünitelerinin baz dizilerinin sıralanışı ve sayısı birbirinden farklıdır. Örn: D21S11(Şekil 7)



Şekil 7: Karmaşık STR(D21S11)(10)

Tetramerik ve pentamerik STR'ler adli bilimlerde en sık kullanılan lokuslardır ve PCR reaksiyonu ile kolay bir şekilde kodlanabilirler(50). STR'ler 500-2500 pg gibi az miktarda DNA ile başarılı sonuçlar verebilmektedirler. (49). Ancak bazı olay yerlerinden 100 pg'dan daha az DNA elde edilebilmektedir. Böyle durumlarda yapılan PCR işlemi sonucunda alel drop-out(alel düşmesi ;alel kaybı), peak dengesizliği ya da stutter oluşumu görülmektedir(10). Ayrıca karışım örneklerinde de stutter oluşumundan dolayı asıl alelden daha kısa olan yanlış alel oluşumu görülmektedir(32). Degrede örnekler için kullanıldığında da büyük ampikon boyundan(150-450 bp) dolayı yanlış profiller ortaya çıkabilmektedir(51). Yüksek mutasyon oranından dolayı da akrabalık analizinde hatalı sonuçlara yol açabilmektedir (52).

2.4.1.1. STR kitleri

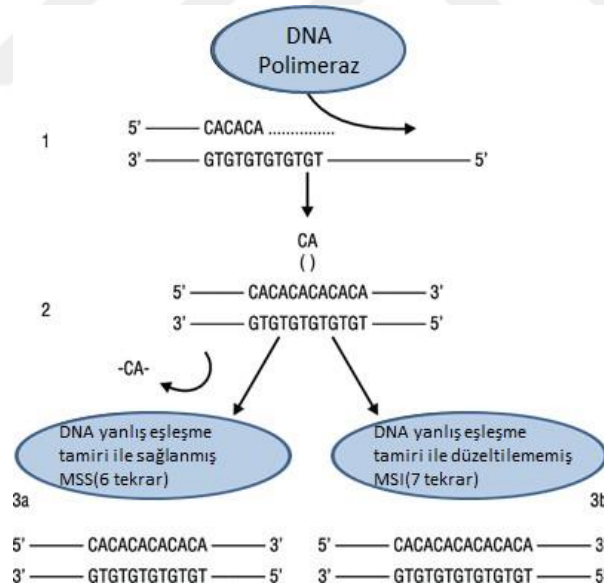
1997 yılında FBI, CODIS(Birleşik DNA İndeks Sistemi) olarak bilinen ulusal bir DNA veri tabanında kullanılmak üzere 13 STR lokusu belirlemiştir. Bunlar CSF1PO, D21S11, FGA, D18S51,TH01, D16S539, TPOX, D13S317, vWA, D8S1179, D3S1358, D7S820 ve D5S818 lokuslarıdır. Ayrıca benzer lokuslar Avrupa ve dünyanın diğer bazı yerlerinde de seçilmiştir. 2011 yılına gelindiğinde FBI, DNA veri tabanında bulunan profillerin sayısı arttıkça beklenmedik eşleşme olasılığını azaltmak, uluslararası uyumluluğu arttırmak ve kayıp şahıs vakalarında ayırım gücünü arttırmak amacıyla kullanılan STR lokus sayısını arttırmıştır. Ayrıca cinsiyet belirleyici belirteç olan ve X-Y kromozomunun her ikisinde de bulunan amelogenin lokusu da veri tabanına eklenmiştir. Adli bilim uzmanları genellikle kendi STR assaylerini kullanmak yerine kalite kontrolü yapılmış ticari kitleri kullanmayı tercih etmektedirler. Örnek olarak Promega, Life Technologies/Applied Biosystems ve Qiagen tarafından çıkarılan kitler verilebilir(32,53,54).

2.4.1.2. Kanserli dokularda STR instabilitesi

Adli DNA profillemesi için seçilen STR'ler özellikle hastalık belirteçleri ile ilgili olmayan DNA bölümünden seçilmektedir. Bunun sebebi DNA analizi için toplanan örneklerin, araştırmacıya test edilen bireyin sağlığı hakkında kişisel bilgiler vermesi durumunda ortaya çıkabilecek etik sorunlardır. Ancak adli DNA profillemeye çalışmaları için malign tümör örneklerinin kullanılabileceği bazı durumlar vardır. Örneğin kayıp kişi ya da felaket kurbanlarının kimliklendirilmesi durumunda, yaşam boyunca o kişilerden toplanan arşivlenmiş biyopsi örnekleri, ölen kişi ile doğrudan karşılaştırma yapılabilen tek biyolojik materyal olabilir. Ayrıca babalık davalarında varsayılan babanın gaip olması, ölmüş olup mezarının bilinmemesi veya yurt dışında olması gibi herhangi bir gerekçe ile mezarının açılmaması ya da cesedin yakılmış olması gibi haller başka örnekler olarak verilebilir. Bu durumda varsayılan

babaya ait arşivlenmiş doku örnekleri kullanılabilir. Bunların dışında doktor tarafından kanser tanısının yanlış koyulup, organın çıkarıldığı vakalarda hekim hatası sorgulandığında parafin bloğun ameliyat edilen kişiye ait olup olmadığı incelenmektedir(3,55).

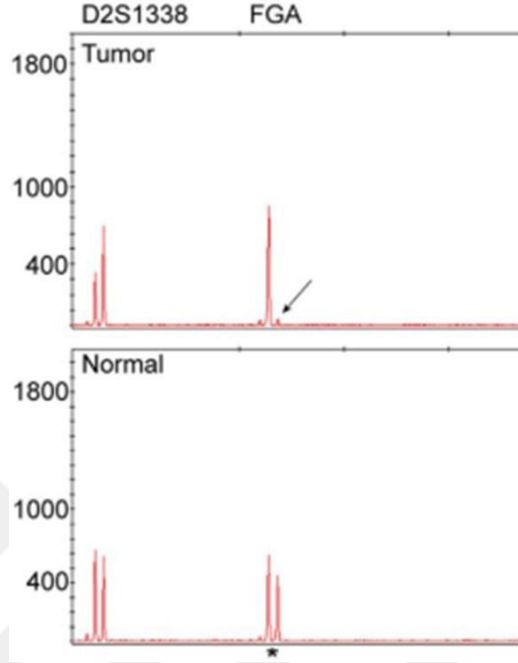
Tümör DNA'sının yalnızca tanımlanmış genlerde değil, aynı zamanda tekrarlayan DNA dizilerinde de genetik değişiklikler barındırdığı bilinmektedir. Örneğin birçok tümörde genetik instabilite olarak heterozigotluk kaybı (LOH) ve mikrosatelit instabilitesi (MSI) görülmektedir(3). STR'ler genomun kodlamayan bölgelerinde yayılmış olup diğer genomik bölgelere göre daha fazla mutasyon oranı içermektedir. Bunun sebebi DNA replikasyonu ve tamiri sırasında DNA polimerazın kayarak STR'lerdeki tekrarların silinmesine ya da eklenmesine sebep olmasıdır. Bu değişim mikrosatelit instabilitesi(MSI) olarak tanımlanmaktadır(56,57)(Şekil 8).



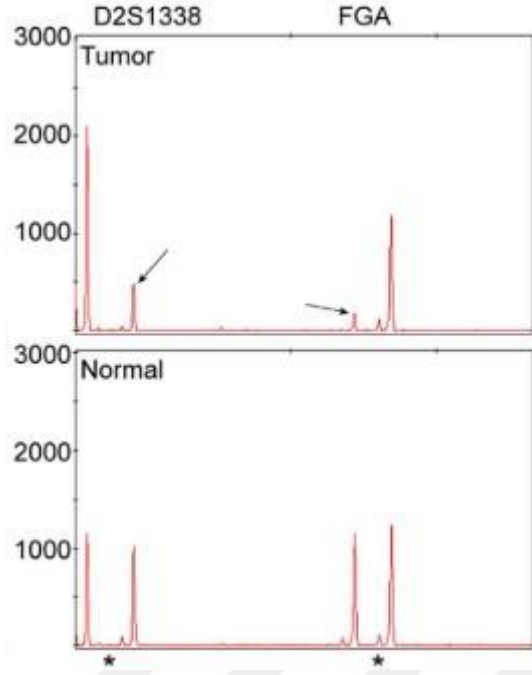
Şekil 8: Mikrosatelit instabilitesinin(MSI) oluşum mekanizması(58)

Heterozigosite kaybı(LOH) ise bir alelin mutasyonunu takiben kalan alelin de delesyonu ile karakterizedir(59). Ayrıca heterozigosite kaybı pik yoğunluğunun miktarına göre de farklılık göstermektedir. Tamamen heterozigosite kaybı(cLOH)(Şekil 9) olarak değerlendirilmesi için

pik yoğunluğunun 0.5 ten düşük 2 den yüksek olması gerekirken, kısmi heterozigosite kaybı(pLOH)(Şekil 10) ise bir allelin pik boyutunun %50 den fazla azalması durumunda ortaya çıkmaktadır(60,61).



Şekil 9: Tamamen heterozigosite kaybının görünümü(62)



Şekil 10: Kısmi heterozigosite kaybının görünümü(62)

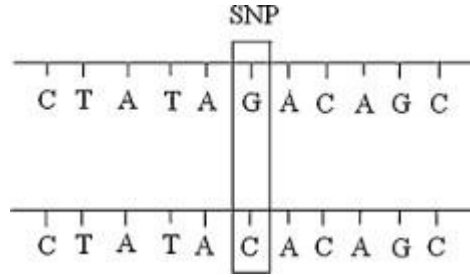
Bu genetik instabiliteler STR polimorfizminin değişmesine sebep olarak bireylerin adli kimliklendirmesinde ve ebeveynlik testlerinde hatalı sonuçlara yol açabileceğinden, sadece kanserli dokuların kullanıldığı vakalarda sonuçlar konusunda dikkatli olunmalıdır(63). Örneğin Vauhkonen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada adli bilimlerde sıklıkla kullanılan tetramerik STR'lerin gastrointestinal kanserde uygulanabilirliğini göstermek amacıyla 41 kanserli doku incelendi. Sonucunda örneklerin hepsinde heterozigosite kaybı görülürken, yalnızca %32'sinin mikrosatelit stabilitesine sahip olduğu görüldü(64). Peleso ve arkadaşları ise akciğer kanserine sahip 24 kişiden aldıkları dokularla beraber normal dokularla çalışmışlardır. 24 örnekten 20'sinde en az bir STR'de alel drop-out görülmekle beraber tüm örneklerin STR lokuslarında alelik dengesizlik görülmüştür. Ayrıca örneklerin küçük bir kısmı ise heterozigosite kaybı göstermiştir(59). Zhang ve arkadaşları, 75 akciğer kanserli dokuyla çalışarak çeşitli STR belirteçlerinin güvenilirliğini test etmişlerdir. 75 dokudan, 24'ü en az bir STR lokusunda genetik değişiklik göstermiştir. STR varyasyonunun en sık karşılaşılan çeşidi ise heterozigositenin kısmen kaybı olmuştur(62).

Cecardi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, adli bilimler alanında kullanılan STR'lerin kanserli dokular üzerindeki uygulanabilirliğini değerlendirmek amacıyla AmpFISTR Tanımlayıcı Kitinin 15 STR lokasyonu için kontrol örneklerine paralel olarak 48 gastrointestinal karsinom, 13 ürogenital ve 7 oral karsinom taramıştır. Toplamda 37 kanser dokusu normal dokularla karşılaştırıldığında alelik değişikliklik göstermiştir(29'u gastrointestinal, 4'ü ürogenital,4'ü oral tümör)(65). Pelotti ve arkadaşları(2007) 15 STR lokus için alelik değişikliklerin insidansının ve adli uygulamalarda kanserli dokuların uygunluğunun değerlendirilmesi amacıyla 56 sporadik gastrointestinal karsinom taramıştır. Kanserli dokuların %66'sının normal dokularla karşılaştırıldığında alelik değişikliklere sahip oldukları görülmüştür(66).

Sonuç olarak, genetik instabilitenin birçok farklı tümörde gözlenen çok yaygın bir olay olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Özellikle de normal doku içeren başka referans örnekleri mevcut olmadığında, doku biyopsileri gibi klinik örneklerden elde edilen DNA ile kimliklendirme sonuçlarının değerlendirilmesinde çok dikkatli olunmalıdır(67).

2.4.2. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP)

SNP'ler organizmaların genomunda tek bir nükleotidin farklılık göstermesi ile oluşmaktadır (Şekil 11). İnsan genomunda yaklaşık olarak 10-11 milyon SNP vardır ve en sık karşılaşılan polimorfizm çeşididir. Her 1000 baz çiftinde ortalama bir SNP bulunmaktadır. Buna göre genomdaki varyasyonun %85'ini SNP'ler oluşturmaktadır(10,68,69) .



Şekil 11:SNP'nin oluşumu(70)

SNP'ler genomda bialelik, trialelik ve tetraalelik olarak bulunabilirler ama çoğu bialelik olmakla beraber mutasyon seviyeleri de oldukça düşüktür. Bialelik olmalarından dolayı profil sonuçları ile elde edilen veride azalma olacağından STR'ler ile aynı ayırım gücünü yakalayabilmesi için 15 STR lokusuna karşılık 50-80 SNP lokusu kullanılması gerekmektedir(38,71). SNP'lerin en çok görülen çeşidi(üçte ikisi) pirimidin(C,T) ve pürin(A,G) bazlarının transisyonu ile kendi aralarında yer değiştirmesi sonucu oluşurken, geri kalanlar birbiri ile eşit düzeyde olacak şekilde bunlar insersiyon, delesyon ve transversiyon sonucunda oluşmaktadır(72).

Adli analizler için kullanılan SNP'ler 4 gruba ayrılmıştır(38):

- Kimliklendirmede kullanılan SNP'ler: Yüksek heterozigosite ve düşük akraba evliliği katsayısı(F_{st}) gerekmektedir.
- Akrabalık belirteci SNP'ler: Akrabalık analizi yoluyla kayıp kişileri tanımlamak için haplotip belirteçleri olarak işlev gören sıkıca bağlı SNP'ler
- Soy bilgilendirici SNP'ler: Düşük heterozigosite ve yüksek F_{st} değeri gerekmektedir.
- Fenotip belirteci SNP'ler

Son on yılda SNP'ler etnik köken, fenotip özellikleri ve moleküler patoloji gibi konulardaki genetik araştırmalarda kullanıldığından bu açıdan da adli bilimlerde ilgi görmüştür. Ayrıca bazı laboratuvarlarda rutin vaka incelemelerinde, kimliklendirme ve akrabalık

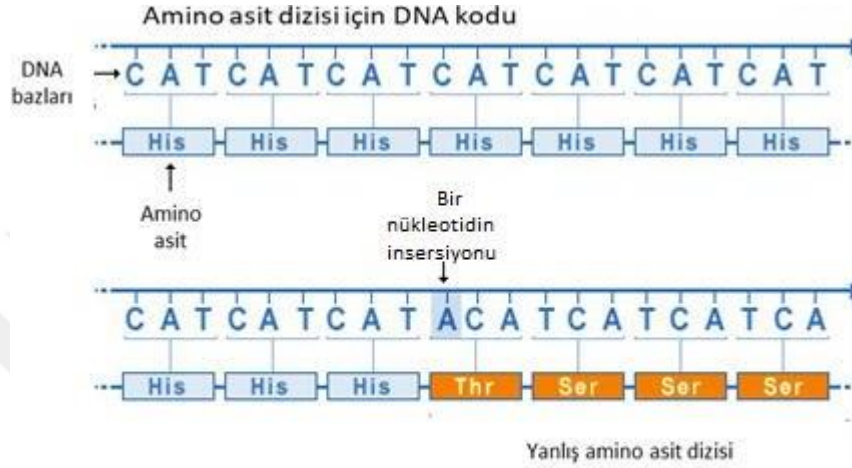
testlerinde STR'lere ilaveten çalışılan tamamlayıcı belirteçler olarak kullanılmaktadır(70,73,74).SNP'ler bazı durumlarda STR'lere nazaran daha avantajlı olabilmektedir. Örneğın toplu felaketlerde ya da kayıp kişi vakalarında elde edilen DNA çok az miktarda ya da degrede ise SNP'ler daha kısa amplikon boyuna sahip olduğundan daha başarılı sonuçlar verecektir(71,75). Ayrıca az miktarda örnek ile çalışıldığında SNP varyasyonları, STR'lerin aksine tekrarlı dizinler içermedikleri için STR'lerin yorumlanmasında zorluk çıkaran stutter oluşumu görülmez(76).

STR'ler, neredeyse tüm akrabalık vakalarını, iddia edilen ilişkiyi destekleyen veya dışlayan son derece yüksek olasılıklarla çözmektedir, ancak belirli durumlarda istatistiksel gleri azalabilmektedir. Bu tür durumlar şunları içermektedir: gerçek babanın birinci derece akrabasını bilmeden test etme (bir erkek kardeş veya baba gibi), STR'lerin diğer belirteçlere kıyasla nispeten yüksek mutasyonel kararsızlığı nedeniyle oluşan belirsiz genotipler ve diğer akrabaların çoğunun veya tamamının test için uygun olmadığı durumlarda ilişki analizleri. Bu durumların üstesinde gelmek için mevcut olarak kullanılan STR lokuslarına yenileri eklenebilir ya da ek olarak SNP'ler de kullanılabilir(77–79).

SNP'lerin dünya çapında ilk tercih edilen belirteç olabilmesi mevcut olan tüm ulusal adli DNA veri tabanlarının STR'lere dayalı olmasından dolayı zordur. Rutin adli vaka çalışması için SNP'ye dayalı kimliklendirme yapılabilmesi, pek çok ülke için, adli DNA veri tabanlarının oluşturulmasında en baştan başlamayı gerektirecektir. Bununla birlikte, DNA örneklerini saklayan ve henüz adli DNA veri tabanı oluşurmaya başlamamış lkeler, SNP kullanımını düşünebilirler(76).

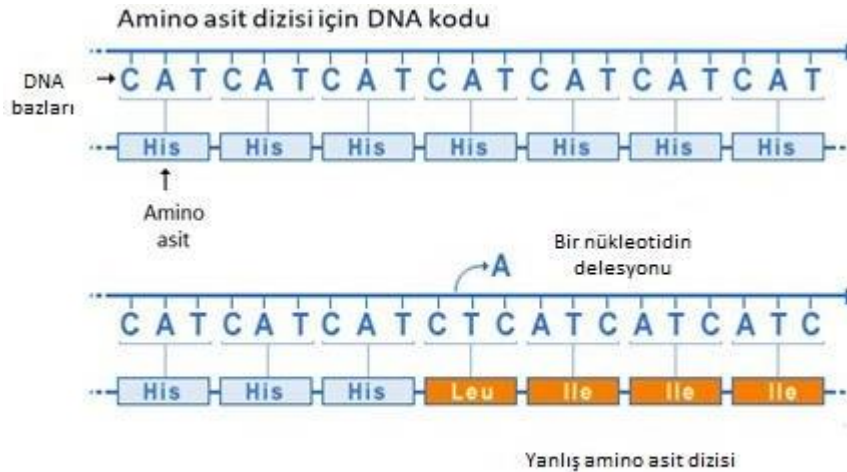
2.4.3. InDel (İnseriyon-Delesyon) polimorfizmi

InDel'ler, insan genomunda bir veya daha fazla nükleotidin eklenmesi ya da silinmesi ile meydana gelen polimorfizmlerdir(80). DNA dizinine nükleotid eklenmesi insersiyon(Şekil 12) iken silinmesi ise delesyon olarak adlandırılmaktadır(Şekil 13).



U.S. National Library of Medicine

Şekil 12:İnseriyonun oluşumu(81)



U.S. National Library of Medicine

Şekil 13:Delesyonun oluşumu(81)

2002 yılında insanlarda bulunan 2000 bi-alelik InDel ilk defa Weber ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. InDel'lerin çeşitli uzunluklarda olduğu ve insanlarda en sık rastlanan polimorfizm SNP'ler olmasına rağmen InDel'lerin de onlardan sonra genomda en sık görülen polimorfizmler olduğu ortaya çıkmıştır. Bu çalışmaya göre InDel'ler genomda görülen polimorfizmlerin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Ayrıca genomda fazla miktarda bulunması ve analizinin kolaylığı gibi nedenlerle, InDel'lerin adli bilimlerde potansiyel bir genetik belirteç olabileceği belirtilmiştir (4). Mills ve arkadaşları 415.000'den daha fazla InDel polimorfizmi içeren ilk InDel varyasyon haritasını oluşturmuştur. Bu haritadaki InDel'lerin boyları 1bç ve 9989 bç arasında değişmekte olup hemen hemen eşit şekilde insersiyon ve delesyondan meydana gelmektedir. Bu çalışmaya göre genomda ortalama olarak 7.2 kilobazda bir InDel'in olduğu bulunarak InDel'lerin genoma yayılmış bir şekilde olduğu belirtilmiştir(82). Ayrıca InDel'ler yapılarına göre 5 sınıfa ayrılmıştır:

- Tek baz çiftinin insersiyon veya delesyonları,
- Monomerik baz çifti genişlemeleri,
- 2–15 baz çiftinin genişlemeleri,
- Transpozon insersiyonları
- 2-9998 baz çifti uzunluğunda rastgele DNA dizisi içeren InDel'ler(82).

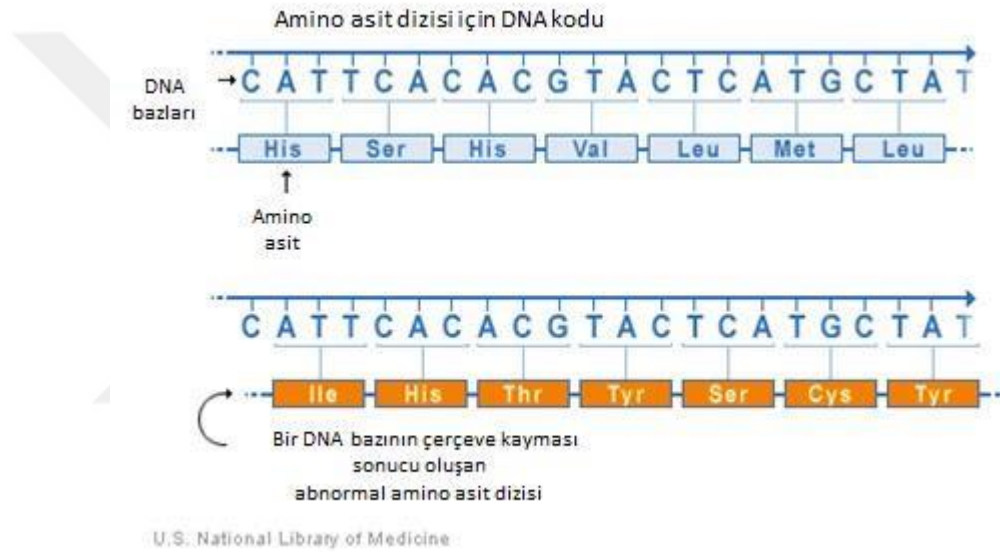
InDel'ler boylarına göre ise şu şekilde sınıflandırılabilirler:

- 1-543 nükleotid arasında uzunluğa sahip olan küçük InDel'ler
- 50 nükleotide kadar uzunluğa sahip olanlar mikroInDel'ler
- Genellikle tümörlerde görülen 10.000 nükleotitten fazla uzunluğa sahip olan yapısal varyasyonlar(83)

InDel'ler genomda fenotipik değişikliğe sebep olmaktadır. Yapılan bir çalışmada 800.000 küçük InDel'in genlerin kodlayan ekson bölgesinde yer aldığı görülmüştür ve bu

InDel'lerin gen fonksiyonunu değiştirmesi beklenmektedir. Ayrıca 39.000'den fazla InDel'in de genlerin promotor bölgesinde olduğu belirtilmiştir(84). Böylelikle InDel'ler birçok hastalığa ereve kayması mutasyonuna sebep olarak yol açarken, büyük InDel'ler genleri direkt bozmakta ya da kesme ve bağlanma noktalarında değişiklik yaratmaktadır(85).

ereve kayması mutasyonu şu şekilde gerçekleşmektedir; eklenen ya da silinen nükleotid n katından farklı ise bu, genin okuma çerçevesinde değişiklik meydana getirerek aminoasit dizisinin ya da durdurma kodonunun da değişmesine yol açmaktadır(86)(şekil 14).



şekil 14:ereve kayması mutasyonu(81)

Stenson ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Mendeliyen hastalıkların %24'ünün InDel'ler tarafından oluşturulduğu belirtilmiştir(87). rnek olarak CTFR geninin kodlama bölgesindeki 3 nükleotidin kaybı sonucu proteinin fonksiyonunun bozulması ile meydana gelen kistik fibrozis ve 3 nükleotid tekrarının eklenmesiyle ortaya çıkan kırılğan X sendromu verilebilir(83,88).

Ayrıca InDel'ler STR'lere kıyasla çok daha düşük mutasyon oranları içermekle birlikte, daha kısa amplikon boyuna (60-200 b) sahiptir. Bu da değrede örneklerde InDel'lerin

kullanılmasını mümkün kılmaktadır(6). Yapılan çalışmalarda AIM-SNP'lere(soy bilgilendirici markır) ek olarak InDel'lerin de iskelet kalıntılarından genotiplendirmede başarılı olduğu görülmüştür(89). InDel'ler STR'lere benzer uzunluk polimorfizmleri göstermelerinden dolayı PCR işlemini takiben kapiler elektroforez gibi mevcut adli DNA test platformları kullanılarak tespit edilebilmektedir(5). Aynı zamanda InDel'ler mikrovaryant ürünler içermedikleri için karışım(mixture) örneklerinde kullanılabilmektedir ve biyocoğrafik soy analizi gibi popülasyon genetiği çalışmaları için de uygun olmaktadır(7).Örneğin Xie ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 30 InDel lokusu kullanılarak Çinli Xinjiang Hui grubu ve diğer 25 grup arasındaki genetik farklılıklar ve ilişkiler araştırılmış olup bu grubun diğer çoğu gruba yakın bir ilişkisi olduğu bulunmuştur(5). Ayrıca Türkiye'de InDel'ler kullanılarak yapılan bir çalışmada Türk popülasyonunun Avrupa popülasyonuna genetik olarak daha yakın olduğu belirtilmiştir(90).

2.4.3.1. InDel kitleri

Boya ile etiketlenmiş PCR ürünleri kullanan 2 tane çoklu dialelik InDel amplifikasyon sistemi geliştirilmiştir. Bunlardan biri Qiagen tarafından geliştirilen ve ticari bir kit olan 30 InDel'den oluşan DIPplex kittir. Diğeri ise Pereira ve arkadaşları tarafından kişi identifikasyonu için geliştirilen 38plex InDel setidir (80,91). DIPplex kitinde yer alan InDel lokusları şu şekildedir: HLD77, HLD45, HLD131, HLD70, HLD6, HLD111, HLD58, HLD56, HLD118, HLD92, HLD93, HLD99, HLD88, HLD101, HLD67, HLD83, HLD114, HLD48, HLD124, HLD122 HLD125, HLD64, HLD81, HLD136, HLD133, HLD97, HLD40, HLD128, HLD39, HLD84 ve Amelogenin. DIPplex kitinin özellikle felaket kurbanlarının kimliklendirilmesinde degrede örneklerde başarılı olduğu belirtilmiştir(91) Düvenci ve arkadaşları tarafından Türk popülasyonunda 30 InDel lokusunun adli parametrelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, DIPplex kitinin kişi kimliklendirmesinde kullanılabileceği ve ebeveynlik testinde de tamamlayıcı olarak kullanılabileceği

belirtilmiştir(90). Ancak bu kitlerdeki dialelik belirteçlerin düşük polimorfizm seviyeleri ebeveynlik testlerinde yalnızca destekleyici bir panel olarak kullanılmasına yol açarken, adli genetikçilerin de daha ideal belirteçler geliştirmelerine sebep olmuştur(91). Örneğin, Huang ve arkadaşları adli rutinlere daha uygun olabilecek, 20 birbirine sıkıca bağlı belirteç birleşimini (1 pozisyon multi-InDel olarak adlandırılan 2 ya da 3 InDel içermektedir) tanımlamış ve validasyon işlemini gerçekleştirmiştir. Bu multi-InDel sistemi diğer sistemlerle karşılaştırıldığında zaman ve masraf açısından daha avantajlı olmasının yanı sıra yüksek polimorfizm düzeyleri içermektedir ve kısa ampikon boylarından dolayı degrade örneklerde kullanılmak için uygundur(92). Zhao ve arkadaşları ise 22 birbirine bağlı ve tri-alelik olan InDel'i kullanarak 11 haplotip belirteci geliştirmiştir. Bu multi-alelik haplotip panelinin diğer geleneksel InDel test panellerine göre daha polimorfik olduğunu ve ebeveynlik, akrabalık testlerinde daha fazla ayırım gücüne sahip olduğunu belirtmişlerdir(93).

2.4.3.2. *Kanserli dokularda InDel instabilitesi*

Teknik olarak MSI yani mikrosatellit instabilitesi yalnızca STR'lerde görülebilmektedir ancak InDel'ler için de yeni bir alelin oluşması ya da bir alelin eklenmesi InDel instabilitesi sayılabilmektedir. MSI InDel'ler açısından değerlendirildiğinde normal dokudaki homozigotluğun (1,1) heterozigotluğa(1,2) dönüşmesi ya da farklı bir homozigotluğa(2,2) dönüşmesi olarak tanımlanmıştır(60).

LOH yani heterozigosite kaybı ise hem InDel hem de STR'ler için tümörlü dokudaki allelik delesyon olarak tanımlanmıştır(60).

Tozzo ve arkadaşları tarafından 2021 yılında yapılan çalışmada dondurulmuş şekilde bulunan 19 karaciğer kanseri dokusu, 18 gastrik kanser dokusu, 11 meme kanseri dokusu ve 27 kolorektal kanser dokusu kullanılmıştır. 66 örnekten 61'inin yani örneklerin %92,4 ünün InDel lokuslarında en azından bir mutasyona sahip olduğu görülmüştür. Mutasyonların çoğunluğu

(%79,4'ü) heterozigosite kaybı olmakla beraber bunun da %41,7'si kısmi heterozigosite kaybıdır. Örneklerin sadece %20,6'sında InDel instabilitesi görülmüştür(60).



3. Gereç ve Yöntem

Bu tez çalışmasında aralarında akrabalık bağı bulunmayan ve çalışmaya katılmaya rıza gösteren kişilere ait parafine gömülmüş 26 adet meme ve 22 adet tiroit kanserli doku kullanılmıştır.

Kanserli dokularda ve çevresinde bulunan normal dokularda otozomal kromozomlar üzerinde yer alan 34 InDel (rs34660708, rs34495360, rs2308135, rs2307789, 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) InDel lokusu ile amelogenin (AMG-XY) lokusu çalışılarak tiplendirme yapılmıştır. Bu InDel lokusları Filoğlu ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan 36-InDelpex panelinde yer almakta olup Türkiye popülasyonu için yüksek polimorfizm göstermektedir ve adli kimliklendirmede kullanılabilirliği gösterilmiştir (94).

48 kişiye ait, 36 InDel lokusunun profilleri çıkarıldıktan sonra elde edilen verilerle istatistiksel değerlendirmeler yapılarak InDel lokuslarının sağlıklı ve kanserli dokular arasında bir farklılık gösterip göstermediği incelenmiştir.

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

3.1. Deneyde Kullanılan Malzemeler

3.1.1. Cihazlar

- Buzdolabı (Vestel)
- Derin dondurucu (Delta)
- Kuru ısıtıcı blok (Bio TDB100-Biosan)
- Vorteks (Weightlab Instruments)
- Mikrosantrifüj (Unicfuges-5)
- Florometre (Qubit 4-Thermo Fisher)
- Otomatik Pipet (2,5 µl, 20 µl, 100 µl, 1000µl) (Eppendorf/ Research Plus)
- Isı döngü cihazı (SimpliAmp™ Thermal Cycler)
- Bilgisayar kontrollü genetik analizör 3500 (Applied Biosystems™)

3.1.2. Ticari kitler

- Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen)
- E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek)
- QIAGEN Multiplex PCR Kit

3.1.3. Kimyasal Maddeler

- Hi-Di™ (Highly deionized) Formamide (Thermo Fisher Scientific)
- POP-7 Polimer (Performance Optimized Polymer 4) (Thermo Fisher Scientific)
- GeneScan™ LIZ 500 Size Standard
- Xylenes ≥ 99%
- Etanol (%99'luk)
- 10X EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) tamponu (Thermo Fisher Scientific)

3.2. Deneyde Kullanılan DNA Örnekleri

Bu çalışmada İ.Ü-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji ABD'ından temin edilerek, tez çalışmasında kullanılması İ.Ü-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulunca 02.03.2021 tarihli ve 17853 sayılı etik kurul kararı (Ek-1) ile uygun görülen, parafin bloklara gömülü, 26 adet meme ve 22 adet tiroit kanser dokusu ve buna karşılık kanserli dokuların çevresinden elde edilen 26 adet meme ve 22 adet tiroit normal dokusu kullanılmıştır. Tiroit dokularının tümünün patolojik tanısı papiller tiroid karsinomudur. Tiroit dokusu kullanılan kişilerin yaşları 28-60 aralığında olup meme dokusu kullanılan kişilerin yaşları ise 28-77 aralığındadır. Meme dokularının patolojik tanılarına ait bilgiler Tablo I'de gösterilmiştir. Bilimsel çalışmalarda örneklerinin kullanılmasına rıza gösterip onam veren kişilerin örnekleri çalışmaya dâhil edilmiştir. (Ek-2: Bilgilendirilmiş Onam Formu)

Tablo I. Meme dokularına ait patolojik tanılar

Örnek Kodu	Patolojik Tanısı
T21-XX-140	Metaplastik Karsinom
T21-XX-141	Miks Tipte İnvaziv Karsinom (İnvaziv Lobüler Karsinom Ve İnvaziv Duktal Karsinom)
T21-XX-142	Miks Tipte İnvaziv Karsinom (İnvaziv Duktal Karsinom Ve İnvaziv Kolloidal Karsinom)
T21-XX-143	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-144	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-145	Miks Tipte İnvaziv Karsinom (İnvaziv Lobüler Karsinom Ve İnvaziv Duktal Karsinom)
T21-XX-146	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-147	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-148	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-149	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-150	Miks Tipte İnvaziv Karsinom (İnvaziv Duktal, İnvaziv Mikropapiller Ve İnvaziv Müsinöz Kolloidal Karsinom)
T21-XX-151	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-152	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-153	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-154	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-155	Miks Tipte İnvaziv Karsinom (İnvaziv Lobüler Karsinom Ve İnvaziv Duktal Karsinom)
T21-XX-156	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-157	İnvaziv Duktal Karsinom

T21-XX-158	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-159	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-160	Miks Tipte İnvaziv Karsinom (İnvaziv Lobüler Karsinom Ve İnvaziv Duktal Karsinom)
T21-XX-161	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-162	İnvaziv Duktal Karsinom
T21-XX-163	Multisentrik İnvaziv Lobüler Karsinom
T21-XX-230	Miks Tipte İnvaziv Karsinom (İnvaziv Kolloidal Karsinom Ve İnvaziv Duktal Karsinom)
T21-XX-231	İnvaziv Duktal Karsinom

3.3. Deney Aşaması

Süreç,

- Örneklerden kesit alınması
- DNA izolasyonu
- DNA miktar tayini
- PCR
- PCR ürünlerinin Applied Biosystems™ 3500 cihazı ile analizi
- Verilerin analizi ve sonuçların değerlendirilmesi

basamaklarından oluşmaktadır.

3.3.1 Örneklerden kesit alınması

İlk olarak parafin bloklara gömülmüş tümörlü dokulardan mikrotom cihazı kullanılarak 2 µm kalınlığında kesit alınarak lama koyuldu ve hematoksilin ile boyandı. Daha sonra lamalar mikroskop altında uzman patolog tarafından incelenerek kanserli olan kısımlar belirlendi. Aynı hastalara ait parafin bloklara gömülmüş çevre doku örnekleri de alındı. Hem kanserli hem de çevre dokuya ait parafinli bloklardan mikrotom cihazı ile 2 µm kalınlığında 10 adet kesit alınarak tüplere izolasyon aşamasında kullanılmak üzere yerleştirildi.

Örneklerin boyanması şu basamaklardan oluşmaktadır:

1. Tümörlü dokulardan alınan kesitler su banyosuna konulduktan sonra lamlara aktarıldı. Daha sonra lamlar etüvde 55 ° C'de 45 dk bekletildi.
2. Lam sepeti 3 defa art arda 5'er dk boyunca ksilen kabına daldırıldı. Aynı işlem alkol için de azalan miktarlar uygulanmak üzere (%95 ve %75'lik alkol ile) tekrarlandı.
3. Daha sonra distile su ile yıkanan lam sepetinin suyu iyice süzdürüldü ve hematoksilen boya kabına daldırılıp burada 1 dakika boyunca bekletildi. Lam sepeti, dokulara boyanın nüfuz edebilmesi için boya solüsyonuna daldırılıp çıkarıldı.
4. Akan su altında lam sepeti 2 dakika bekletilerek fazla boyanın gitmesi sağlandı.
5. Dokuların diferansiyon edilebilmesi için lam sepeti asit alkol solüsyonuna daldırılıp çıkarıldıktan sonra akan su altına sokularak diferansiyasyonun durması sağlandı.
6. Dokuların morlaşması için lam sepeti, dilüe amonyaklı suda bekletildi. Akan su altında doku rengi berrak mor renk kazanıncaya kadar bekletildi.
7. Lam sepeti berrak mor rengini aldıktan sonra eozin boyasına daldırıldı ve 1 dakika bekletildi. Süre bitiminde lamlar akan suda yıkandı. Böylece boyama işlemi bitmiş oldu.
8. Boyanan lamlar düşük konsantrasyonlu alkolden başlanarak dokular dehidre edilmesi sağlandı ve etüvde kurumaya bırakıldı.

Lamların mikroskop altında histolojik olarak incelenmesinden sonra kanserli olmayan ya da uygun olmayan bazı örneklemeler çıkarıldı.

3.3.2. DNA izolasyonu

48 dokunun hem kanserli doku içeren kısmından hem de normal doku içeren kısmından DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyonu için E.Z.N.A. ® Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek) kullanıldı. Bu yöntem silika temelli olup DNA'nın spin kolona bağlanması sonrasında yapılan yıkama işlemi ile ortamda bulunan DNA haricindeki istenmeyen komponentlerin ve

proteinlerin uzaklaştırılmasını temel almaktadır. Böylece spin kolona bağlanan DNA molekülü, elüsyon tamponu kullanılarak saf halde elde edilmektedir. Bu yöntemle PCR inhibitörlerinin bir kısmı da ortamda uzaklaştırılmaktadır, bu da PCR işlemi için DNA'nın daha yüksek kalitede ve miktarda olmasını sağlamaktadır.

Deparafinizasyon

DNA izolasyonunun deparafinizasyon işlemi adımı dokulardan parafini uzaklaştırmak için ksilen, ksileni uzaklaştırmak için ise alkol uygulanmaktadır.

1. 2 mL'lik nükleaz içermeyen tüpe dokudan alınan kesit koyuldu.
2. Parafinin uzaklaştırılması için 1 mL ksilen eklendi ve iyice karışması için vortekslendi.
3. 10 dakika boyunca maksimum hızda ($\geq 10.000 \times g$) santrifüjlendi ve dokunun çökmesi sağlandı.
4. Pelet bozulmadan tüpün üstünde oluşan süpernatant atıldı.
5. Ksileni uzaklaştırmak amacıyla tüpe 1 mL 100% etanol eklendi.
6. 5 dk boyunca en yüksek hızda santrifüjlendi.
7. Pelet bozulmadan etanol pipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
8. 5-7. adımlar tekrarlandı.
9. Doku peleti 37 ° C'de 15 dakika boyunca kurutuldu.

İzolasyon

10. Tüpe 200 µL TL Buffer eklendi.
11. Daha sonra 25 µL Proteinaz K Solüsyonu eklendi. İyice karışması için vortekslendi.
12. Isıtıcı blokta 1,5 saat boyunca 55 ° C'de inkübe edildi.
13. 90°C'de 45 dk boyunca inkübe edildi.
14. 5 dk boyunca en yüksek hızda santrifüjlendi.

15. Süpernatant steril 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Çözünmemiş peletleri transfer edilmedi.
16. Tüpe 220 µL BL Tamponu eklendi. Daha sonra iyice karıştırmak için vortekslendi.
17. 70°C’de 10 dk boyunca inkübe edildi.
18. 20 µL %100 etanol eklendi. İyice karıştırmak için vortekslendi.

DNA Bağlanması

19. HiBind® DNA Mini Kolonunu 2 mL’lik Toplama Tüpüne yerleştirildi.
20. Oluşmuş olabilecek çökeltiler dahil olmak üzere tüm numune HiBind® DNA Mini Kolonuna aktarıldı.
21. 1dk boyunca en yüksek hızda santrifüjlendi.
22. Filtrat atıldı ve toplama tüpü yeniden kullanıldı.

DNA Yıkaması

23. 500 µL HBC Tamponu eklendi.
24. 30 sn en yüksek hızda santrifüjlendi.
25. Filtrat ve toplama tüpü atıldı.
26. HiBind® DNA Mini Kolonu yeni bir 2 mL Toplama Tüpüne yerleştirildi.
27. 700 µL DNA Yıkama Tamponu eklendi.
28. Maksimum hızda 30 saniye santrifüjlendi.
29. Filtrat atıldı ve toplama tüpü yeniden kullanıldı.
30. İkinci bir DNA Yıkama Tamponu yıkama adımı için 27-29 Adımlarını tekrarlandı.
31. Kolonun kuruması ve eser miktardaki Etanolün giderilmesi için boş HiBind® DNA Mini Kolonu maksimum hızda 2 dakika santrifüjlendi.

DNA Elüsyonu

32. HiBind® DNA Mini Kolonu nükleaz içermeyen 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
33. 70 ° C'de ısıtılmış 60 µL Elüsyon Tamponu eklendi.
34. Oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi.
35. 1 dakika boyunca maksimum hızda santrifüjlendi.
36. İzole edilmiş DNA -20°C'de saklandı.

3.3.3. DNA miktar tayini

1. 2 adet standart Qubit® 4.0 cihazının kalibrasyonunu yapmak için kullanıldı.
2. Çalışma solüsyonunu hazırlamak amacıyla Quant-it™ dsDNA HS Buffer çözeltisinden 199 µL alınarak üzerine 1 µL Quant-it™ Reagent eklendi.
3. Hazırlanan karışım çözeltisinden standartlar için tüpe 190 µL konuldu ve üzerine S1(Standart 1) ve S2(Standart 2) çözeltilerinden 10 µL eklendi.
4. İzole edilen örneklerin miktar ölçümü için karışım çözeltisinden 199 µL alındı ve üzerine 1 µL DNA örneği eklendi.
5. Karışım 2-3 saniye vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
6. İlk olarak cihazın kalibre edilmesi için Standart 1 ve Standart 2'nin ölçümü yapıldı.
7. Daha sonra örnekler cihaza yerleştirilerek ölçüm yapıldı.

3.3.4. PCR

Bu çalışmada Filoğlu(2020) tarafından geliştirilen 36-InDelplex paneli kullanılmıştır(94).

3.3.4.1. PCR bileşenlerinin hazırlanması

İzole edilen toplamda 96 adet DNA örneğine ait 36 INDEL lokusunun multipleks (çoklu) amplifikasyonu QIAGEN Multiplex PCR Kiti kullanılarak yapıldı. PCR’da kullanılacak bileşenler tabloda verilen miktarlara göre hazırlandı (Tablo II). DNA örnekleri başlangıçta 1 ng olacak şekilde sulandırılması yapılarak PCR karışımına eklendi. Ancak sonuçlarda görülen piklerin yetersizliği nedeniyle ilk olarak miktar 2 ng sonrasında ise 3 ng olacak şekilde sulandırılarak kullanılmaya başlandı. Lokusların çoğu kayıp çıkan örneklerde miktar hiç seyreltilmeden direkt kullanıldı.

Kullanılan kit çalışmaya başlamadan önce -20 °C’den çıkartıldı ve PCR karışımının hazırlanması tamamlana kadar buzda bekletildi. PCR karışımı hazırlanırken kullanılan ependorf tüplerde baloncuk oluşmamasına dikkat edildi.

Tablo II. PCR bileşenleri ve miktarları

PCR Bileşenleri	Hacim/ Reaksiyon (µl) her örnek için	Negatif Kontrol
Master Mix	4,2 µl	4,2
Taq Polimeraz	0,5 µl	0,5
Primer Mix	3 µl	3
DNA	3 µl	-
Toplam Hacim	10,7 µl	7,7

3.3.4.2. PCR koşulları

Çalışmada SimpliAmp™ Thermal Cycler cihazı kullanıldı. Bu reaksiyon, Tablo III’te verilmiş olan PCR koşulları dikkate alınarak gerçekleştirildi. Oluşabilecek herhangi bir

kontaminasyonun varlığını saptamak amacıyla her PCR işleminde negatif kontrol ve pozitif kontrol eklenerek yöntemin verimli çalışıp çalışmadığına bakıldı. PCR işlemi sonrasında tüplerin ağzıları sıkı bir şekilde parafilmle kapatılarak 24 saatten fazla zaman sonra elektroforeze yükleneceği için -20 °C' ye kaldırıldı.

Tablo III. PCR Koşulları

Sıra	Aşama	Sıcaklık	Süre
1	Başlangıç denatürasyonu	95 °C	11 dk
2	Denatürasyon	94 °C	20 sn
3	Amplifikasyon		
		62 °C	3 dk
4	Uzama	60 °C	1 saat
5	Sonuç	4	∞

3.3.5. PCR ürünlerinin Applied Biosystems™ 3500 cihazı ile analizi

Bu aşama, PCR ürünlerinin elektroforeze hazırlanması ve elektroforeze yüklenmesi olmak üzere iki adımdan meydana gelmektedir. Bu çalışmada Genetiks Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi ve Laboratuvarlarında bulunan 8 kapilerli Applied Biosystems™ 3500 Genetik Analizör (Life Technologies) kapiler elektroforez cihazı kullanıldı.

3.3.5.1. PCR ürünlerinin elektroforeze hazırlanması

Örnekler Applied Biosystems™ 3500 Genetik Analizör cihazına yüklenmeden önce Tablo IV'teki karışım analizi yapılacak her bir örnek için hazırlandı.

Tablo IV. Elektroforez bileşenleri ve miktarları

Elektroforez Bileşenleri	Hacim/ Reaksiyon (µl) her örnek için
Hi-Di™ Formadide	9,5

GeneScan TM LIZ 500 Size Standard	0,5
PCR Ürünü	1
Toplam Hacim	11

İlk olarak Hi-DiTM Formadide ve GeneScan TM LIZ 500 Size Standard bu aşamada kullanılmadan önce kısa süre santrifüjlendi. Daha sonra her bir örnek için 9,5 µl Hi-DiTM Formadide ve 0.5 µl GeneScan TM LIZ 500 Size Standard içeren bir karışım hazırlanıp vortekslendi. Plate kuyucuklarına PCR ürününün ve hazırlanan karışımın yüklenmesi aşamasından önce PCR ürünleri kısa bir süre santrifüjlendi. Sonrasında 10 µl karışım ve örnek başına 1 µl PCR ürünü plate kuyucuğuna yüklendi.

3.3.5.2. PCR ürünlerinin elektroforeze yüklenmesi

Örnekler 36 cm kapillerle, POP-7 polimeri kullanarak GS STR POP7 (1 ml) G-5 modülünde; injeksiyon 1.2 kV ve 24 sn, 60°C’de 30 dakika yürütülmüştür (Tablo V). Cihazda uygun injeksiyon zamanı, injeksiyon voltajı, yürütme zamanı ve yürütme sıcaklığı kontrol edilerek ayarlandı.

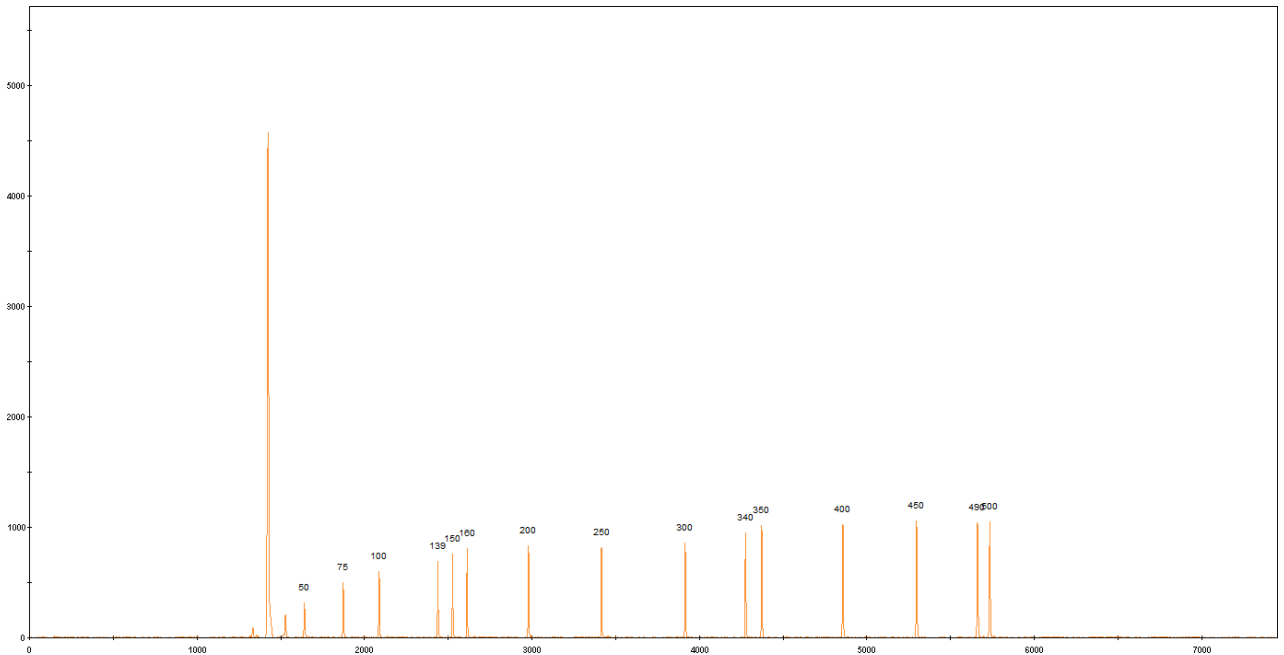
Tablo V. Elektroforez Koşulları

Parametre	GS STR POP-7(1 ml) G5 modül
Matriks	InDel primerlerine özel 5 boyalı matriks
Injeksiyon zamanı	24 sn
Injeksiyon voltajı	1.2 kV
Yürütme zamanı	30 dk
Yürütme sıcaklığı	60°C

3.3.6. Verilerin analizi ve sonuçların değerlendirilmesi

Applied Biosystems™ 3500 Genetik Analizör'deki elektroforez sonrası örneklerden elde edilen verilerin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi Genemapper® v.5.0 (Thermo Fisher Scientific) analiz programı kullanılarak yapıldı. Programda yapılan yürütmelerin verileri görüntülenmeden önce cihazın otomatik bir şekilde tiplendirme yapabilmesi için özel olarak panel ve bin setleri oluşturuldu. Daha sonra programda yeni bir proje oluşturulup, bu projeye yapılan yürütmelerin verileri aktarıldı. Örneklerin analizi bu parametreler ışığında yapıldı.

GeneScan™ LIZ 500 Size Standard (50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 495, 500) yürütme şartlarını kontrol etmek ve INDEL lokuslarının tespiti için kullanıldı. Bu standarda ait DNA fragmentlerinin uzunlukları Şekil 15'te gösterilmektedir. Her örnek için bu standartın yeri kontrol edildikten sonra InDel'lerin yerleri de standart referansla karşılaştırılarak belirlendi. Mavi, yeşil, siyah ve kırmızı renklere ait floresan boyaların alel boyutları göz önüne alınarak elektroforegramdaki pikler değerlendirildi ve insersiyon, delesyon ya da InDel olduğu belirlendi.



Şekil 15: LIZ 500'ün elektroforegram görüntüsü

4.Bulgular

Bu çalışmada Filoğlu ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan 36-InDelpex panelinde yer almakta olan 34 InDel (rs34660708, rs34495360, rs2308135, rs2307789, 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) InDel lokusu ile amelogenin (AMG-XY) lokusu kanserli dokularda ve çevresinde bulunan normal dokularda çalışılarak genotiplendirme yapılmıştır. Çalışmaya 22 tiroit kanseri hastası ve 26 meme kanseri hastası olmak üzere toplamda 48 kişi dâhil edilmiştir.

Genotiplendirme için Genemapper® v.5 (Thermo Fisher Scientific) analiz programı kullanılmıştır. Daha sonrasında kanserli ve normal dokulara ait profiller karşılaştırılmıştır.

4.1. Doku Örneklerinden DNA İzolasyonu ve DNA Miktarının Belirlenmesi

26 adet kanserli ve 26 adet normal meme dokusunun DNA izolasyonu yapıldı. Aynı şekilde 22 adet kanserli ve 22 adet normal tiroit dokusunun da DNA izolasyonu yapıldı. Daha sonraki aşamada izole edilen DNA'nın miktar tayini yapıldı. Meme dokusuna ait DNA miktarları Tablo VI'da, tiroit dokusuna ait DNA miktarları Tablo VII'de gösterilmiştir.

Tablo VI. Meme dokularına ait DNA miktarları

Örnek Kodu	Türü	Miktarı	Örnek Kodu	Türü	Miktarı
T21-XX-140	Kanserli	19,8 ng/μl	T21-XX-140N	Normal	31,4 ng/μl
T21-XX-141	Kanserli	0,54 ng/μl	T21-XX-141N	Normal	7,12 ng/μl
T21-XX-142	Kanserli	3,68 ng/μl	T21-XX-142N	Normal	14,6 ng/μl
T21-XX-143	Kanserli	46,6 ng/μl	T21-XX-143N	Normal	1,88 ng/μl
T21-XX-144	Kanserli	0,664 ng/μl	T21-XX-144N	Normal	5,74 ng/μl
T21-XX-145	Kanserli	1,09 ng/μl	T21-XX-145N	Normal	1,77 ng/μl
T21-XX-146	Kanserli	53,2 ng/μl	T21-XX-146N	Normal	26,2 ng/μl
T21-XX-147	Kanserli	35,4 ng/μl	T21-XX-147N	Normal	41 ng/μl
T21-XX-148	Kanserli	6,38 ng/μl	T21-XX-148N	Normal	12,7 ng/μl
T21-XX-149	Kanserli	3,42 ng/μl	T21-XX-149N	Normal	4,4 ng/μl
T21-XX-150	Kanserli	13,9 ng/μl	T21-XX-150N	Normal	44 ng/μl
T21-XX-151	Kanserli	38,6 ng/μl	T21-XX-151N	Normal	63,2 ng/μl
T21-XX-152	Kanserli	0,702 ng/μl	T21-XX-152N	Normal	6,8 ng/μl
T21-XX-153	Kanserli	10,1 ng/μl	T21-XX-153N	Normal	26,4 ng/μl
T21-XX-154	Kanserli	10,2 ng/μl	T21-XX-154N	Normal	11,2 ng/μl
T21-XX-155	Kanserli	22,2 ng/μl	T21-XX-155N	Normal	42,2 ng/μl
T21-XX-156	Kanserli	70,6 ng/μl	T21-XX-156N	Normal	9,12 ng/μl
T21-XX-157	Kanserli	18 ng/μl	T21-XX-157N	Normal	15,7 ng/μl
T21-XX-158	Kanserli	4,2 ng/μl	T21-XX-158N	Normal	14,4 ng/μl
T21-XX-159	Kanserli	3,14 ng/μl	T21-XX-159N	Normal	2,32 ng/μl
T21-XX-160	Kanserli	6,86 ng/μl	T21-XX-160N	Normal	0,5 ng/μl
T21-XX-161	Kanserli	12 ng/μl	T21-XX-161N	Normal	5,54 ng/μl
T21-XX-162	Kanserli	0,622 ng/μl	T21-XX-162N	Normal	1,44 ng/μl
T21-XX-163	Kanserli	2,84 ng/μl	T21-XX-163N	Normal	1,2 ng/μl
T21-XX-230	Kanserli	32,6 ng/μl	T21-XX-230N	Normal	9,2 ng/μl
T21-XX-231	Kanserli	86,2 ng/μl	T21-XX-231N	Normal	11,1 ng/μl

Tablo VII. Tiroit dokularına ait DNA miktarları

Örnek Kodu	Türü	Miktarı	Örnek Kodu	Türü	Miktarı
T21-XX-164	Kanserli	58,8 ng/μl	T21-XX-164N	Normal	23,8 ng/μl
T21-XY-165	Kanserli	16 ng/μl	T21-XX-165N	Normal	32 ng/μl
T21-XY-166	Kanserli	3,68 ng/μl	T21-XX-166N	Normal	14,1 ng/μl
T21-XX-167	Kanserli	21,8 ng/μl	T21-XX-167N	Normal	17,7 ng/μl
T21-XX-168	Kanserli	4,96 ng/μl	T21-XX-168N	Normal	2,54 ng/μl
T21-XY-169	Kanserli	10,6 ng/μl	T21-XX-169N	Normal	25,6 ng/μl
T21-XX-170	Kanserli	22 ng/μl	T21-XX-170N	Normal	20,8 ng/μl
T21-XX-172	Kanserli	3,48 ng/μl	T21-XX-172N	Normal	16,4 ng/μl
T21-XX-173	Kanserli	20,8 ng/μl	T21-XX-173N	Normal	9,7 ng/μl
T21-XY-174	Kanserli	20,6 ng/μl	T21-XX-174N	Normal	53,4 ng/μl
T21-XY-175	Kanserli	45,6 ng/μl	T21-XX-175N	Normal	33,6 ng/μl
T21-XY-176	Kanserli	14,3 ng/μl	T21-XX-176N	Normal	6,1 ng/μl
T21-XX-177	Kanserli	69 ng/μl	T21-XX-177N	Normal	15,4 ng/μl
T21-XX-178	Kanserli	52,3 ng/μl	T21-XX-178N	Normal	30,2 ng/μl
T21-XX-179	Kanserli	0,41 ng/μl	T21-XX-179N	Normal	5,8 ng/μl
T21-XX-180	Kanserli	13,8 ng/μl	T21-XX-180N	Normal	15,2 ng/μl
T21-XX-181	Kanserli	2,68 ng/μl	T21-XX-181N	Normal	6,28 ng/μl
T21-XY-203	Kanserli	60 ng/μl	T21-XX-203N	Normal	47,4 ng/μl
T21-XY-204	Kanserli	50,2 ng/μl	T21-XX-204N	Normal	57,4 ng/μl
T21-XX-205	Kanserli	93,8 ng/μl	T21-XX-205N	Normal	79,4 ng/μl
T21-XY-206	Kanserli	71,6 ng/μl	T21-XX-206N	Normal	37,2 ng/μl
T21-XY-207	Kanserli	79,7 ng/μl	T21-XX-207N	Normal	27,4 ng/μl

4.2. Genotiplerin Belirlenmesi

Parafin bloklara gömülmüş dokulardan DNA izolasyonu yapıldıktan sonra örneklerin miktarları belirlenmiş olup PCR işlemi 3 ng/μL DNA kullanılarak yapıldı. Ancak bazı

örneklerin profillerinin eksik çıkmasından dolayı DNA'ların miktarları seyreltilmeden direkt olarak kullanıldı. 48 kişiye ait DNA örneklerindeki 36 InDel lokusu Genemapper® IDX v.5 (Life Technologies) analiz programı kullanılarak çalışıldı ve genotipleri belirlendi

4.2.1. Meme dokusuna ait DNA'ların genotiplendirilmesi

Meme dokusuna ait kanserli ve normal kısımlardan elde edilen DNA örneklerinin genotipleri Tablo VIII' de gösterilmiştir.

4.2.2. Tiroit dokusuna DNA'ların genotiplendirilmesi

Tiroit dokusuna ait kanserli ve normal kısımlardan elde edilen DNA örneklerinin genotipleri Tablo IX' da gösterilmiştir.

4.3. Kanserli ve Normal Dokuya Ait Profillerin Karşılaştırılması

Her bir örneğe ait kanserli ve normal dokulardan elde edilen InDel profilleri karşılaştırılarak farklılıklar belirlenmiştir. Profillerdeki lokuslar incelenerek heterozigosite kaybı, kısmi heterozigosite kaybı ya da InDel instabilitesi varlığı sorgulanmıştır. Buna göre tümör tipine baz alınarak InDel lokuslarında bulunan mutasyon olayları ve sayısı gösterilmiştir (Tablo X). Şekil 16'da heterozigosite kaybına, Şekil 17'de kısmi heterozigosite kaybına ve Şekil 18'de ise InDel instabilitesine örnek verilmiştir.

Tablo VIII. Meme dokusuna ait genotipler

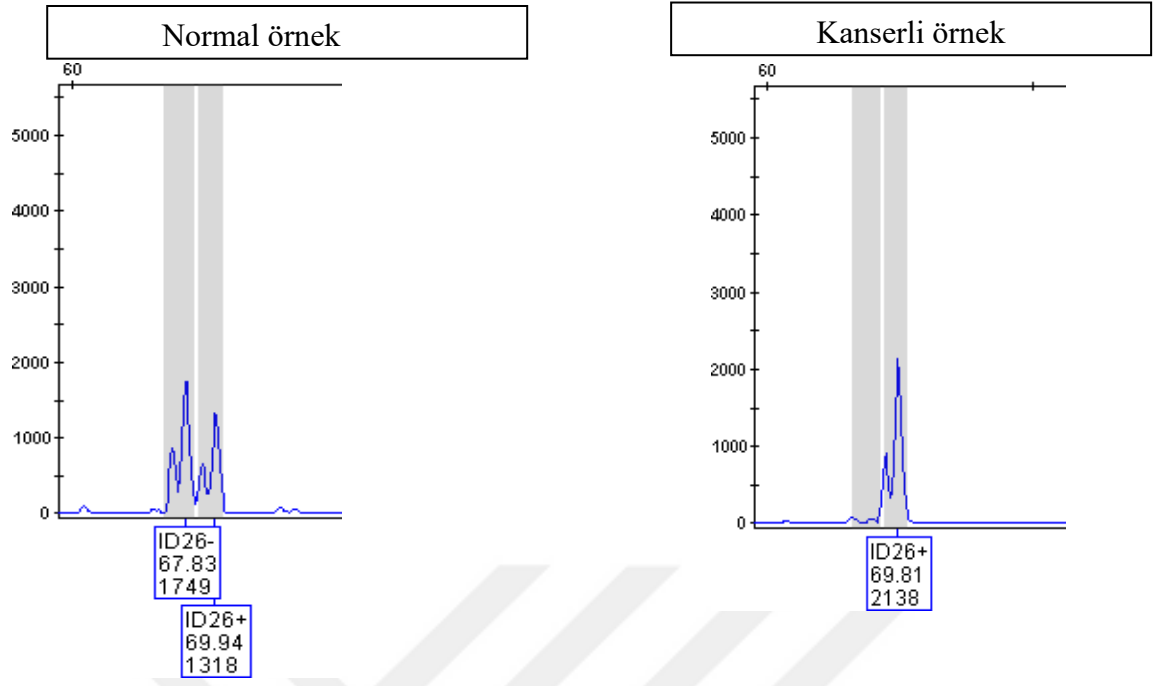
Örnek Adı/ Lokus	ID26	ID3	ID16	ID32	ID9	ID2	ID37	ID10	ID8	ID31	ID27	ID15	ID24	ID5	ID34	ID11	ID35	ID33	ID23	ID22	ID14	ID30	ID1	ID4	ID17	ID28	ID19	ID25	ID21	ID29	ID12	ID18	ID20	ID7	ID13	
T21-140	del	in-del	del	in	in	in-del	del	in	in	del	in-del	in	del	in	del	del	in-del	in	in-del	del	in-del	in-del			in			del	in-del	del	in	del	in-del	del		
T21-140N	del	in-del	del	in	in-del	in-del	del	in	in	del	in-del	in	in-del	in	del	del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del			in	in	in	del	in-del	del	in	in-del	del	in-del	del	
T21-141	del	in	in	del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	in	in-del	in	in	in	in	in	in-del	in-del	in	del	in	in				in-del	in	in	in	in-del	del			
T21-141N	del	in	in	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	in	in-del	del	in	in	del	in	in-del	in-del	in	del	in-del		del			in-del	in-del	in-del	in	in-del		in-del		
T21-142	in-del	in-del	in	in-del	in-del	del	del	in-del	in	del	del	in	in	del	in	del	del	del	del	del	del	in-del	in	in	del			in	in-del	del	in	del-in	del-in	del		
T21-142N	in-del	in-del	in	in-del	in-del	del	del	in-del	in	del	del	in	in	del	in	del	in-del	in-del	del	del-in	del-in	del-in	in	in	del	in-del			in	in-del	del	in	del-in	del-in	del	del
T21-143	in	in	in-del	del	in-del	in	del	del	in	in-del	in-del	in	del	del	in-del	in	del	in	in-del	in-del	in	in-del	del	in-del	in	in-del	del	del	in	in-del	in	in	del	in-del	del	
T21-143N	in	in-del	in-del	del	in-del	in	del	del	in	in-del	in-del	in	del	del	in-del	in	del	in	in-del	in-del	in	in-del	del	in-del	in	in-del	del	del	in	in-del	in		del	in-del	del	
T21-144	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	del	in-del	in-del	in-del	del	in	in	in-del		in	del	del	del	del	del	del	del	in	in-del	del	del	in	in-del	del	in	in-del	in	del	in-del
T21-144N	in-del	in-del	in-del	in-del	del		del			in-del	in-del	del	in-del	in	in-del		del	in	in-del		del	del						in-del	in	in-del	in					
T21-145	in-del	in-del	in-del	in	del	in	del	in-del	in-del	in-del	in	in-del	in	in-del	in	in	in	del	in-del	in-del	del	in-del	in	del				in-del	in-del	in	in					
T21-145N	del	del	in-del	in	del	in	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in	in	del	in-del	del	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	in		in-del	del	in-del	in	in-del	in	del		
T21-146	del	in-del	in-del	in	in	in-del	del	del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in	in	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del			del	del		in-del	in	del	del	del	del	in		
T21-146N	del	in-del	in-del	in	in	in-del	del	del	in	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in	in	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in		del	del	in-del	in-del	in	del	del	del	del	in		
T21-147	in-del	in	in	in	del	in-del	del	del	del	in	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	del	del	in-del	in-del	del	in	in-del	del	in	in-del	del	del	in-del	
T21-147N	in-del	in	in	in	in	in-del	del	del	del	in	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in	in-del	del	in	in-del	del	del	in-del	
T21-148	in	del	in	in	in	del	del	del	del	del	del	in-del	del	in-del	in-del	in	in-del	in	in-del	in-del	in-del	del	in	in	in-del	in	in-del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in	in	del	
T21-148N	in	del	in	in	in	del	del		del	del	del	in-del	del	in-del	in-del		in	in-del	in-del	in-del	del	del	in	in-del			in-del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in			
T21-149	in-del	del	in-del	in	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in-del	del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	del	in-del	del	in-del	in	in-del	in-del	in	in-del	del	in-del	in-del	in	del	
T21-149N	in-del	del	in-del	in	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in-del	del	in	in-del		in-del	in-del	in-del	del	del	in-del	del	in-del			in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del			
T21-150	del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in	in-del	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	del	in-del	in	in-del	in	in	in	del	del	del	in-del	in-del	in	in-del	in	
T21-150N	del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	del	in-del	in-del	in	in-del	in	in	del	del	del	del	in-del	in-del	in	in-del	
T21-151	in	in-del	del	in-del	in	in-del	del	in-del	in	in-del	in-del	in	del	in-del	in-del	in	del	del	in-del	in-del	del	in-del	in	in-del	del	in	in	in-del	in	in-del	in-del	in	del	in-del	in-del	
T21-151N	in	in-del	in-del	in-del	in	in-del	del	in-del	in	in-del	in-del	in	del	in-del	in-del	in	del	del	in-del	in-del	del	in-del	in	in-del	del	in	in	in-del	in	in-del	in	in-del	in-del	in	in-del	
T21-152	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	del	in	in-del	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	in	del	in	in-del	in-del	del	in-del	del	del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in	del	in-del	in-del			
T21-152N	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in	del	in	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in	in	del	in-del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in-del		
T21-153	in-del	in	del	in	in-del	del	del	in-del	in-del	del	in-del	in	del	del	in	in	in-del	del	in	in-del	in	in-del	in-del	in-del	del	in-del	del	in	in	del	del	del	in	del	in-del	
T21-153N	in-del	in	del	in	in-del	del	del	in-del	in-del	del	in-del	in	in-del	del	in	in	in-del	del	in	in-del	in	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in	in	del	del	del	in	del	in-del	
T21-154	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	del	del	del	in-del	in	in	del	del	in	del	del	del	in	in-del	in-del	in-del	in	in	in	in	del	in-del	in	in	del	del	in	del	del	
T21-154N	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	del	del	del	in-del	in	in	in-del	in-del	in	del	del	del	in	in-del	in-del	in-del	in	in-del	in	in-del	in-del	in-del	del	del	del	in	in-del	del	del	
T21-155	del	del	in	in-del	in-del	del	del	in-del	del	in-del	del	in	in-del	in-del	in	in	in-del	del	in	del	in	del	in-del	del	in	in	del	in	in-del	del	in	in	in-del	in	del	
T21-155N	del	del	in	in-del	in-del	del	del	in-del	del	in-del	in-del	in	in-del	in-del	in	in	in-del	del	in	del	in	del	in-del	del	in	in	del	in	in-del	del	in	in	in-del	in	del	
T21-156	in-del	del	del	in	in-del	in	del	in-del	del	del	in-del	in	del	del	in	del	in-del	in-del	del	in-del	del	in-del	in	del	in-del	in-del	del	del	in	del	in	in	in-del	in-del	in-del	
T21-156N	in-del	del	del	in	in-del	in	del	in-del	del	del	in-del	in	del	del	in	del	in-del	in-del	del	in-del	del	in-del	in	del	in-del	in-del	del	del	in	del	in	in	in-del	in-del	in-del	
T21-157	in-del	in-del	in-del	in	in	del	del	in	in	del	in	in	del	in-del	in	in-del	in	in-del	in-del	del	in-del	del	in-del	in-del		in-del		del		in-del	in-del	del	in-del	del	in-del	
T21-157N	in-del	in-del	in-del	in	in-del	del	del	in	in	del	in	in	del	in-del	in	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	
T21-158	in-del	del	del	in	del	del	del	del	del	in-del	in	in-del	del	del	in	in-del	del	in-del	del	in-del	del	in-del	in-del	in	del		in-del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del		
T21-158N	in-del	del	del	in	del	del	del	del	del	in-del	in	in-del	del	del	in	in-del	del	in-del	del	in-del	del	in-del	in-del	in	del	in-del	in-del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	
T21-159	in	del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in	in	in	in	in	in	in	in	in-del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in		in	in	in	in	in	in	in-del	in-del	
T21-159N	in-del	in-del	in-del	in	in-del	in-del	del	in	in-del	in-del	in	in-del	in	in	in	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del		in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	
T21-160	del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	del	del	in-del	del	in	in	in	del	in	in-del	in-del	in	del	del	del	del	in	in	in	in-del		in	in	in	in	in	in	in	in-del	
T21-160N	del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	del	del	in-del	del	in	in	in	del	in	in-del	in-del	in	del	del	del	del	in-del	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	
T21-161	in-del	del	del	in	in-del	in-del	del	in-del		in-del	in-del	in	in	del	in	in-del			del	in-del	in-del	in-del	in-del	del				in-del	in	in-del	in	in-del		in		
T21-161N	in-del	del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in	del	in-del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del				in-del	in	in-del	in	in-del	in	in	in	
T21-162	in-del	in-del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in	in	in-del	del	in	in-del	in	in-del	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	
T21-162N	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del				in-del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in				in-del	in	del	in	del	in			
T21-163	in-del	in-del	del	in	in-del	in-del	del	del	in-del	in	in-del	in	in	in-del	in-del	in-del			in	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del				del	del	in-del	in-del	del	in	del		
T21-163N	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	del	
T21-230	in	del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	
T21-230N	in	del	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	del	in	in	in	del	in-del	del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	del	in-del	in-del	in	del	in-del	in-del	
T21-231	del	in-del	del	in	del	del	del	in-del	in-del	del	in-del	in	in-del	in	del	in	in-del	del	in	del	in	in-del														

Tablo IX. Tiroit dokusuna ait genotipler

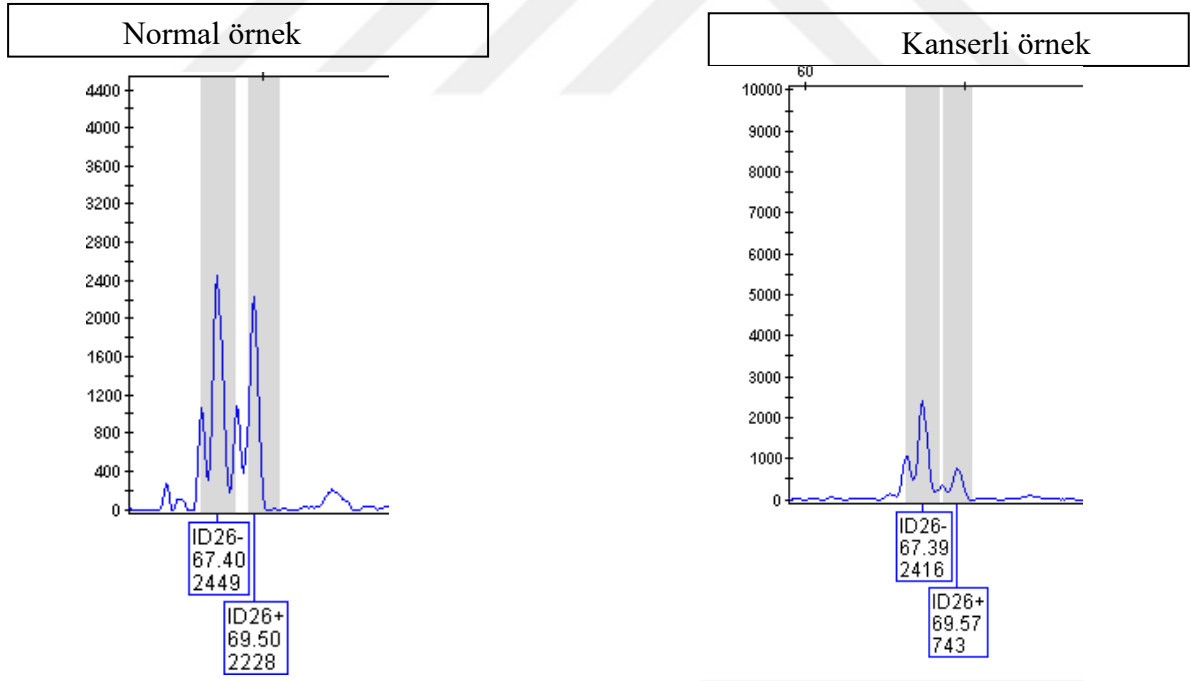
Oreder Adı/ Lokus	ID26	ID3	ID16	ID32	ID9	ID2	ID37	ID10	ID8	ID31	ID27	ID15	ID24	ID5	ID34	ID11	ID35	ID33	ID23	ID22	ID14	ID30	ID1	ID4	ID17	ID28	ID19	ID25	ID21	ID29	ID12	ID18	ID20	ID7	ID13		
T21-164	del	del	del-in	in	del	in	del	in-del	in-del	del	del-in	in	del	del	in-del	del	in	del	in-del	del	in-del	in-del	del	del	in-del	in	in	in-del	del	in-del	in	in	in-del		del		
T21-164N	del	del	in-del	in	del	in	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	del	del	in-del	del	in	del	in-del	del	in-del	in-del	del	del	in-del	in	in	in-del	del	in-del	in	in	in-del	in	del		
T21-165	in	in-del	in-del	del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in-del	del	in	in	in-del	in-del	del	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	del	del	del	del	in-del	in-del	in-del	in	del		
T21-165N	in	in-del	in-del	del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in-del	del	in	in		in-del	del	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del		del	del	del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	del		
T21-166	in	del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in-del	in	in	in-del	in	del	in	del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	del	in-del	del	del	in	in	del	in-del	del		
T21-166N	in	del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in-del	in	in	in-del	in	del	in	del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	del	in-del	del	del	in	in	del	in-del	del		
T21-167	del	in	del	del	in-del	del	in-del	in	in	del	in-del	in	in	in	in	in		in	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in	in-del	in-del	in	del	in-del	in	in-del	del			
T21-167N	del	in	del	del	in-del	del	in-del	in	in	del	in-del	in	in	in	in	in	in	del	in	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in	in-del	in-del	in	del	in-del	in	in-del	del			
T21-168	del	in-del	in-del	in	del	in-del	del	in-del	in	del	in-del	in	in-del	del	in-del	del	in	del	in	del	in-del	in-del	in	del	del	in		in-del	del	in-del	in	in	in	in			
T21-168N	del	in-del	in-del	in	del	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	in	in-del	del	in-del	del	in	del	in-del	del	in-del	in-del	in	del	del	in		in-del	del	in-del	in	in	in	in			
T21-169	in	del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in	in	in	in-del	in	del	in	del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	del	in-del	del	del	in	in	del	in-del	del		
T21-169N	in	del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in	in	in	in-del	in	del	in	del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	del	in-del	del	del	in	in	del	in-del	del		
T21-170	in	in	del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in	in-del	in	del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in	del	in-del	in-del	in	del	in	in-del	in-del	in	in	del	in-del	del	
T21-170N	in	in	del	in-del	del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in	in-del	in-del	in	del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in	del	in-del	in-del	del	in	in-del	in-del	in-del	in	in	in-del			
T21-172	in	in	in-del	in	del	in-del	del	del	in-del	del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in	in-del	in	in	in	del	in-del	in-del	in-del	del	in	in	in	in	in	in-del	in-del	in	in	in-del	in-del	
T21-172N	in	in	in-del	in	del	in-del	del	del	in-del	del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in	in-del	in	in	in	in-del	in-del	in	del	del	in	in	in	in	in	in	in-del	in	in	in-del	in-del	
T21-173	in	in-del	in-del	in-del	in-del	del	del	in	in-del	in	in-del	in	del		in-del		in	in-del	del	in-del	in-del	in	del		in		in-del		del	del	del	del		del			
T21-173N	in	in-del	in-del	in-del	in-del		del			in	in-del	in	del					in-del	del	in-del	del						in-del		del	del	del						
T21-174	in-del	in-del	in-del	in	del	del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in	in	in	in	in-del	del	del	in-del	in-del	in-del	in	in	in	in	in	in-del	del	del	in-del	del	in	
T21-174N	in-del	in-del	in-del	in	del	del	in-del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in	in	in	in	in-del	del	del	in-del	in-del	in-del	in-del		in	in	in	in	in	in	in	del		
T21-175	in-del	in	del	in-del	in	in	in-del	in	in	in-del	del	in-del	del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	del	in		in	in-del	in-del	in-del	in	del	in-del	del	in-del	in-del			
T21-175N	in-del	in	del	in-del	in	in	in-del	in	in	in-del	del	in-del	del	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	del	in		in			in-del	in	del	in-del	del	in-del	in-del			
T21-176	in-del	del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in	in	in-del	in	in	del	in	del	in	in	in	in-del	in-del	in	in-del	del	del	in-del	in	in-del	del	in	del	in	del	in	in	in-del	del	
T21-176N	in-del	del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in	in	in-del	in	in	del	del	del	in	in	in	in-del	in-del	in	in-del	del	del	in	in-del		del	in	del	in	del	in	in-del	in-del		
T21-177	in-del	in	in-del	in-del	del	del	del	in-del	del-in	del	del	in	in	in-del	del	in-del	del	in-del	del	del	del-in	del	del	in-del	in	in	in-del	del	in	in-del	in	in	in	in	in	in-del	
T21-177N	in-del	in	in-del	in-del	del	del	del	in-del	in-del	del	del	in	in	in-del	in-del	in-del	del	in-del	del	del	del	del	del	in-del	in	in	in-del	del	in	in	in	in	in	in	in	in-del	
T21-178	in	del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in	del	del	del	del	del	del	in-del	in	in-del	in	del	in	del	del	in	del	in	del	del	in	
T21-178N	in	del	del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	del	del	del	del	del	in-del	in	in-del	in	del	in	del	del	in	del	in	del	del	in	
T21-179	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	del	in	in-del	in-del	in	del	in	in-del	in-del	in	in-del	in	in-del	in-del	in-del	del	in-del	del	in			in-del	del	in-del	in-del	in	in		del		
T21-179N	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	del	in	in-del	in-del	in	del	in	in-del	in-del	in	in	in	in	in-del	in-del	del	in-del	del	in	del		del	del	del	in	in	in	in	in	del	
T21-180	del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in	del	del	in-del	del	in-del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in-del	del	del	in	in-del	in-del	del	in	del	in	del	in-del	in-del	in	in	
T21-180N	del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in	del	del	in-del	del	in	in	in-del	in	in	in	in-del	in-del	in	in	del	del	in	in	in	del	in	del	in	del	in-del	in-del	del	in	
T21-181	in-del	in	in-del	del	in-del	del	del	in	del	in-del	in	in-del	in	in	in	in		del	in-del	in-del	in-del	del			in		in-del	del	in	in	in	in	in	in	del		
T21-181N	in-del	in	in-del	del	in-del	del	del	in	del	in-del	in	in-del	in	in	in	in	in	in	in	in-del	in-del	del	in-del		in			del	in	in	in	in	in	in	del		
T21-232	in-del	in-del	del	in	del	in	in-del	in-del	in-del	in	in	in	in-del	in	in-del	in	in-del	in	del	in-del	in-del	in-del	in-del		in	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in	in	in	in	in	in	in-del
T21-232N	in-del	in-del	del	in	del	in	in-del	in-del	in-del	in	in	in	in-del	in	in-del	in	in	in	del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in
T21-233	in-del	in	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	del	in-del	in	in	in	in	in	in	del	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in	del	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in
T21-233N	in-del	in	in-del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	del	in-del	in	in	in	in	in	in	del	in-del	in-del	in-del	in		del	in-del	in-del	in-del	del	in	in	in	in	in	in	in	in
T21-234	in-del	del	in	in-del	in-del	del	in-del	del	in-del	del	in-del	del	in-del	del	del	in	in	in	in	in	in	in	in	del	del	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in
T21-234N	in-del	del	in	in-del	in-del	in-del	in-del	del	in-del	del	in-del	del	in-del	del	del	in	in	in	in	in	in	in	in	del	del	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in
T21-235	in-del	del	in-del	in-del	del	in-del	in-del	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in		del	del		in	in	in	in	in	in	in	in	in	in
T21-235N	in-del	in-del	in-del	in-del	in-del	in	del	del	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in		in	del	in	in	in	in	in	in	in	in
T21-236	in-del	in-del	in	in-del	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in
T21-236N	in-del	in-del	in	in-del	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in	in

Tablo X. Tümör tipine göre InDel lokuslarında bulunan mutasyon olaylarının sayısı

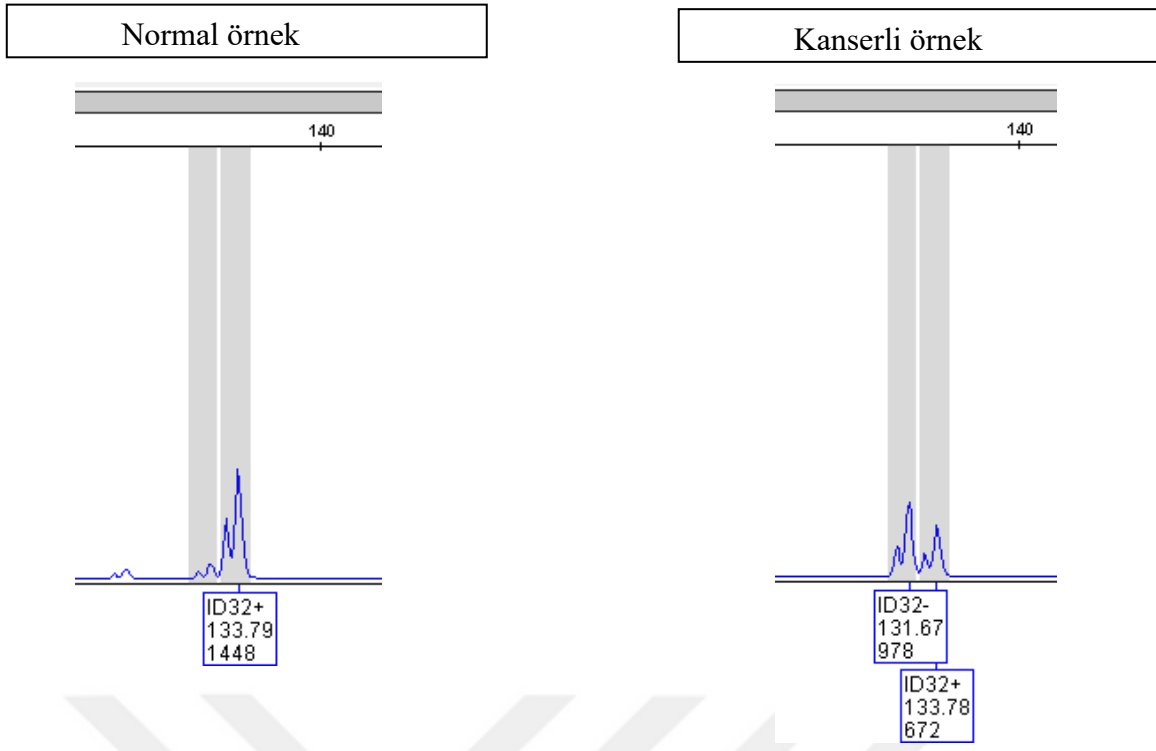
	Meme Kanseri			Tiroit Kanseri			Toplam
Lokus	pLOH	cLOH	IS	pLOH	cLOH	IS	
ID26	2	3	2				7
ID3		2	1				3
ID16	3	4				1	8
ID32	1	3	1				5
ID9	1	2	1				4
ID37		2					2
ID10		2	2				4
ID27	1	2					3
ID15		1					1
ID24	1	6	1	1			9
ID5	1		2			1	4
ID34		2		2	1		5
ID11		1					1
ID33		1					1
ID23		2			1		3
ID14					1	1	2
ID22		1	1				2
ID30		3					3
ID1		3				1	4
ID17			2				2
ID28		1					1
ID25	1	1					2
ID21		2	1				3
ID29		1					1
ID12			1				1
ID18		3					3
ID20		1					1
Toplam	11	49	15	3	3	4	85



Şekil 16: Heterozigosite kaybı



Şekil 17: Kısmi heterozigosite kaybı



Şekil 18: InDel instabilitesi

5. Tartışma ve Sonuç

DNA profillemesi adli bilim uzmanları tarafından sıklıkla kullanılmaktadır ve kimliklendirme için iyi bir araçtır. Genel olarak bir kişinin kan, saç, tükürük, kemik ve semen gibi biyolojik materyallerinin analizi ile kimliklendirilmesi yapılmaktadır(13). Kimliklendirme amaçlı arşivden tümörlü dokuların kullanılması ise vakada başka bir biyolojik materyal kaynağı olmaması durumunda tercih edilmektedir. Bunun sebebi tümörlü dokuların genel olarak mutasyonlara sahip olması ve bunun da genotip analizini etkileyebileceği ihtimalinin olmasıdır. Buna rağmen tümörlü dokuların kullanılmasının en avantajlı seçenek olabileceği bazı durumlar söz konusudur(61). Bu durumlara örnek olarak yapılan babalık testinde varsayılan babaya ait ulaşılabilen tek biyolojik materyal arşivlenmiş doku örneği olabilir. Başka bir örnek olarak ise doktor tarafından kanser tanısının yanlış koyulup, organın çıkarıldığı vakalarda hekim hatası sorgulandığında parafin bloğun ameliyat edilen kişiye ait olup olmadığının incelenmesi verilebilir. Ayrıca kayıp kişi ya da felaket kurbanlarının kimliklendirilmesinde, ölen kişiye ait olduğu düşünülen arşivlenmiş doku örnekleri karşılaştırma yapılabilen tek kaynak olabilir(3,55).

STR lokuslarının, kimliklendirme amaçlı adli bilimler laboratuvarlarında tercih edilen ilk metot olmasının sebebi genomda yaklaşık olarak 1 milyon STR lokusu olması ve içerdiği tekrarların sayısı ile içerik olarak birbirinden farklı olmasından dolayı fazla derecede polimorfizm göstererek ayırım güçlerinin yüksek olmasıdır(24,46–49). Ancak söz konusu kanserli dokular olduğunda meydana gelen genetik instabiliteler STR polimorfizminin değişmesine sebep olduğu için sonuçlar hatalı bir şekilde yorumlanabilmektedir(3). STR'lerin yanı sıra insan genomunda bulunan bir veya daha fazla nükleotidin eklenmesi ya da silinmesi ile meydana gelen polimorfizmler olan InDel'lerin adli bilimlerde potansiyel bir genetik belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir(4,80). Özellikle Weber ve arkadaşları tarafından İnsanlarda bulunan 2000 bi-alelik InDel'in 2002 yılında ilk defa tanımlanmış ve karakterize

edilmiş olması, sonrasında 2006 yılında Mills ve arkadaşlarının 415.000'den daha fazla InDel polimorfizmi içeren ilk InDel varyasyon haritasını oluşturmasıyla beraber InDel'lere olan ilgi artış göstermiştir(4,82). InDel'lerin genomda çok sık bulunması, küçük ampikon boyutuna sahip olduğu için degrede örneklerde başarılı sonuç vermesi, STR'lere göre daha az mutasyon oranına sahip olması ve STR'lerin analizi için kullanılan yöntemlerin InDel analizi için de kullanılabilmesi InDel'leri STR'lere göre daha avantajlı konuma getirmektedir(4-6).

Bu tez kapsamında meme ve tiroit dokuları kullanılarak 36-InDelplex panelinde yer almakta olan 34 InDel (rs34660708, rs34495360, rs2308135, rs2307789, 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) InDel lokusu ile amelogenin (AMG-XY) lokusunun profilleri çıkarılmıştır. İlk olarak parafinli dokulardan DNA izolasyonu yapılmış olup miktar tayininden sonra örneklerle PCR işlemi uygulanmıştır. PCR işlemi Tablo I ve Tablo II'de yer alan miktar ve koşullara göre yapılmıştır. Bulunan en yüksek miktara sahip örnek 93,8 ng/μL konsantrasyonundayken, en düşük miktara sahip örnek ise 0,41 ng/μL konsantrasyonundadır (Tablo V ve VI). Örnekler PCR işlemi için ilk olarak 1 ng/μL olacak şekilde seyreltilmiştir. Profillerin daha iyi ve tam çıkması açısından bu miktar ilk olarak 2 ng/μL daha sonra ise 3 ng/μL'ye yükseltilmiştir. Bazı örneklerin 3 ng/μL miktar ile dahi profilinde çok eksik lokusa sahip olmasından dolayı bu örnekler PCR işleminde seyreltilmeden direkt kullanılmış ve elektroforez sonrası iyi sonuçlar alınmıştır. PCR ürünlerinin Applied Biosystems™ 3500 Genetik Analizörde yürütülmesi yapıldıktan sonra Genemapper® v.5 (Thermo Fisher Scientific) programı ile verilerin analizi yapıp kanserli ve normal dokular arasındaki farklılıklar saptanmıştır.

Bu çalışmada kullanılan dokular arşivden çıkarılmış olup uzun yıllar saklanabilmesi açısından formalinde fikse edilip parafine gömülü şekilde korunmaktadır. Bu da dokulardaki DNA'nın degrede olmasına ve örneklerin profilinin eksik çıkabilmesine sebep olmaktadır. DNA'nın degrede olması, formalinde fikse edilmesiyle beraber fragmentasyona ve kimyasal modifikasyonlara uğramasından kaynaklanmaktadır(95). Örneğin, İngiltere'de yapılan 100.000 genom çalışmasında kullanılan parafin bloklardan elde edilen DNA'ların miktarının az olması ve degrede olmasından dolayı tüm genom sekanslamasından blokların %31'i çıkarılmıştır(96). Bu çalışmayla elde edilen profillerde de bazı lokuslara ait alellerin piklerinin boyutunun çok küçük çıkması doğru analiz yapabilme açısından zorluk oluşturmuştur.

Guyard ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise arşivden alınan aynı doku blokları 4-6 yıl sonra tekrar DNA izolasyonu işlemine tabi tutulmuş ve miktarları tayin edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre DNA miktarında %53 oranında azalma meydana geldiği görülmüştür(97). Bu tez çalışmasında da kullanılan bazı doku örnekleri 4 yıl öncesine ait olduğu için eksik profillerin sebeplerinden birinin bu olabileceği düşünülmüştür.

Aynı zamanda parafinli dokulardan DNA izolasyonu yönteminin seçiminin de DNA miktarını ve kalitesini etkilediği bilinmektedir. McDonough ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 9 DNA ekstraksiyon yöntemi kullanılmış olup her birinin sonucunda elde edilen DNA'lar miktar ve kalite olarak karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak DNA'ların miktar ve kalitesinde farklılıklar tespit edilmiştir(98). Frazer ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada izolasyon yönteminde kullanılan Proteinaz K miktarının DNA'nın miktarını etkileyeceği belirtilmiştir. Bu çalışmada kullanılan protokoldeki Proteinaz K miktarı 2 katına çıkarılarak (20 µl'den 40 µl'ye) DNA izolasyonu tekrar edilmiştir ve sonucunda Proteinaz K miktarının artmasının ürünün miktarını arttırdığı gösterilmiştir(99). Bu tez çalışmasında ise Proteinaz K 25 µl olarak kullanılmıştır. Bunun da bazı örneklerde DNA miktarlarının az çıkmasına bir etki oluşturduğu düşünülmektedir.

Çalışmada parafin bloklara gömülü dokuların kullanılmasının getirdiği bu dezavantajlardan dolayı bazı örneklerin PCR ve elektroforez işlemi değişiklikler yapılarak tekrarlanmıştır. Böylece elde edilen profillerdeki eksikliklerden ortadan kalkması amaçlanmıştır. İlk olarak seyreltme işleminde DNA miktarının fazla kullanılması yoluna gidilmiştir. Bunun bazı örneklerde başarısız sonuçlanmasıyla beraber DNA'nın çok fazla degrade olmasından dolayı DNA miktarları fazla olsa dahi iyi profiller elde edilemediği saptanmıştır. Bu yüzden de bu örnekler seyreltilmeden kullanılmış olup profiller daha az eksik lokusa sahip olacak şekilde elde edilmiştir.

Ayrıca genel olarak incelendiğinde normal meme dokusuna ait örneklerin profillerinde lokusların daha fazla eksik alele sahip olduğu görülmüştür. Bunun sebebinin memede, yapı itibariyle yağ dokusu yoğunluğunun fazla olması ve bunun da DNA verimi açısından kayıplar yaşanmasına yol açması olduğu bulunmuştur. Örneğin bu tez çalışmasına benzer olarak McDonough ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da normal meme dokularında ona karşılık gelen kanserli kısma göre daha az DNA olduğu saptanmıştır(98). Mee ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da normal meme dokusu yaklaşık olarak tamamen yağdan oluştuğu için kanserli meme dokusu ile karşılaştırıldığında daha az DNA, RNA ve protein miktarına sahip olduğu görülmüştür(100).

Bu tez çalışmasında kanserli ve normal dokular arasında farklılık olarak InDel instabilitesi ve heterozigosite kaybı varlığı sorgulanmıştır. InDel'ler için yeni bir alelin oluşması ya da bir alelin eklenmesi InDel instabilitesi sayılmaktadır. Heterozigosite kaybı ise tümörlü dokudaki allelik delesyon olarak tanımlanmıştır. Ayrıca heterozigosite kaybı pik yoğunluğunun miktarına göre de farklılık göstermektedir. Tamamen heterozigosite kaybı olarak değerlendirilmesi için pik yoğunluğunun 0.5 ten düşük 2 den yüksek olması gerekirken, kısmi heterozigosite kaybı ise bir alelin pik boyutunun %50 den fazla azalması durumunda ortaya çıkmaktadır(60).

Tablo IX' da görüldüğü üzere bu tez çalışmasının sonucunda meme dokularında toplam 936 lokusun 75'ünde değişiklik görülmüştür (%8). Bu değişikliklerin %65,3'ü heterozigosite kaybı, %20'si InDel instabilitesi ve %14,7'si kısmi heterozigosite kaybıdır. En çok değişen lokuslar ID26, ID16 ve ID24 lokuslarıdır. Bu lokusların kanserle ya da herhangi bir hastalıkla ilişkisi bulunamamıştır. 26 dokudan 5 örnek hariç hepsinde değişiklik görülmüştür. Örneklerin %80,8'inde mutasyonel değişiklik saptanmıştır.

Tiroit dokularında ise toplam 756 lokustan 10 lokusta değişiklik görülmüştür (%1,3). Bu değişikliklerin 3'ü heterozigosite kaybı, 3'ü kısmi heterozigosite kaybı ve 4'ü InDel instabilitesidir. 21 dokudan 5'i hariç diğer örnekler değişmeden kalmıştır. %76,2'si aynı kalmıştır.

Bireylere ait tiroit ve meme kanserlerinin evreleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Her iki kanser türü de metastaz yapmamış olup tiroit dokularının meme dokularına göre daha az değişiklik içermesinin sebebinin kanser türünün farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Şekil 17'de görüldüğü üzere bir alelin tamamen kaybı ile heterozigosite kaybı meydana gelmiştir. Örneklerde en çok görülen değişiklik budur. Şekil 18'de bir alelin pik boyutunun %50'den fazlasının kaybı ile ortaya çıkan kısmi heterozigosite kaybı görülmektedir. Şekil 19 ise yeni bir alelin eklenmesi sonucu oluşan InDel instabilitesine örnektir.

Tozzo ve arkadaşları tarafından 2021 yılında yapılan çalışmada dondurulmuş kanser dokuları kullanılırken bu tez çalışmasında başka birçok vaka çalışmalarında rastlandığı gibi kanserli dokuları saklama yöntemlerinden biri olan formalinde fikse edilmiş parafin bloklara gömülü dokular kullanılmıştır. Tozzo ve arkadaşlarının çalışmasında 66 örnekten 61'inin yani örneklerin %92,4' ünün InDel lokuslarında en azından bir mutasyona sahip olduğu görülmüştür(60). Yapılan bu tez çalışmasında ise toplamda 47 örnekten 26'sında (%55,3'ünde)

değişiklik görüldüğü saptanmıştır (Tiroit dokusuna ait kanserli ve normal örneklerden birinin, yapılan profillemeye sonrası aynı kişiye ait olmadığı anlaşılmış olup değerlendirmeye alınmamıştır). İki çalışmanın sonucu karşılaştırıldığında aradaki farklılığın seçilen kanser türlerinden, dokuların muhafaza edilme şeklinin farklılığından, kullanılan yöntemlerin ve seçilen InDel marker'larının farklılık göstermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak 36-InDelpex panelinde yer almakta olan 34 InDel (rs34660708, rs34495360, rs2308135, rs2307789, 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, Y kromozomu üzerinde bulunan (rs2032678) InDel lokusu ile amelogenin (AMG-XY) lokusunun kanserli ve normal dokularda profillerinin elde edilmesiyle karşılaştırmalar sonucu heterozigosite kaybı, kısmi heterozigosite kaybı ve InDel instabilitesi gibi mutasyonel olaylar saptanmıştır. Bu durum referans örnek olarak sadece tümörlü dokuların kullanıldığı vakalarda sonuçların yanlış yorumlanmasına yol açabileceğinden dikkatli olunmalıdır. InDel'ler STR'lerden daha az mutasyon oranına sahip olmasına rağmen bu tez çalışmasında kanserli dokular ve normal dokuların profilleri arasında farklılıklar saptanmıştır. Literatür incelendiğinde STR'lerde de benzer mutasyonel değişiklikler görülmüştür(59,62,64–66). Bu yüzden çalışmalarda STR'lerin yanı sıra InDel'lerin kullanılması durumunda da bu değişiklikler göz önünde bulundurularak bazı önlemler alınmalıdır ve mümkünse sonuçlar arşivden çıkarılmış parafinli dokuların yanı sıra farklı örnekler kullanılarak teyit edilmelidir.

6. Kaynaklar:

1. Budimlija Z, Lu C, Axler-DiPerte G, Seifarth J, Popiolek D, Fogt F, et al. Malignant tumors and forensics - Dilemmas and proposals. *Croat Med J*. 2009;50(3):218–27.
2. Väli U, Brandström M, Johansson M, Ellegren H. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genet*. 2008;9:8.
3. Poetsch M, Petersmann A, Woenckhaus C, Protzel C, Dittberner T, Lignitz E, et al. Evaluation of allelic alterations in short tandem repeats in different kinds of solid tumors — possible pitfalls in forensic casework. *Forensic Sci Int*. 2004;145:1–6.
4. Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 2002;71(4):854–62.
5. Xie T, Guo Y, Chen L, Fang Y, Tai Y, Zhou Y, et al. A set of autosomal multiple InDel markers for forensic application and population genetic analysis in the Chinese Xinjiang Hui group. *Forensic Sci Int Genet*. 2018;35(November 2017):1–8.
6. Fondevila M, Phillips C, Santos C, Pereira R, Gusmão L, Carracedo A, et al. Forensic performance of two insertion-deletion marker assays. *Int J Legal Med*. 2012;126(5):725–37.
7. Zhang W, Jin X, Wang Y, Kong T, Cui W, Chen C, et al. Genetic Polymorphisms and Forensic Efficiencies of a Set of Novel Autosomal InDel Markers in a Chinese Mongolian Group. *Biomed Res Int*. 2020;2020.
8. Arenas M, Pereira F, Oliveira M, Pinto N, Lopes AM, Gomes V, et al. Forensic genetics and genomics: Much more than just a human affair. *PLoS Genet*. 2017;13(9):1–28.
9. Li C. Forensic genetics. *Forensic Sci Res*. 2018;3(2):103–4.
10. Goodwin W, Linacre A, Hadi S. An introduction to Forensics genetics. Vol. 53, *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2007. 151 p.
11. Gaensleen RE. Sourcebook in Forensic Serology , Immunology , and Biochemistry. Washington:US Goverment Printing Office; 1984. 293–320 p.
12. Byard RW, James H, Berketa J, Heath K. Locard's Principle of Exchange, Dental Examination and Fragments of Skin. *J Chem Inf Model*. 2016;61(2):545–7.
13. Lee HC, Ladd C, Bourke MT, Pagliaro E, Tirmady F. DNA Typing in Forensic Science. Vol. 15, *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*. 1994. p. 269–82.
14. Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. 2005;278:274–88.
15. Morgan TH. Sex-limited inheritance in *Drosophila*. *Science* (80-). 1910;32:120–2.
16. Cobb M. Oswald Avery , DNA , and the transformation of biology. *Curr Biol*. 2005;24(2):R55–60.
17. Hershey AD, Chase M. Independent Functions Of Viral Protein And Nucleic Acid In Growth Of Bacteriophage. *J Gen Physiol*. 1952;36:39–56.

18. Chargaff E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia*. 1950;6(6):201–9.
19. Klug A. Rosalind Franklin and the discovery of the structure of DNA. *Nature*. 1968;219(5156):810–44.
20. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of Nucleic Acids. *Nature*. 1953;171(4356):737–8.
21. Brett AMO, Serrano SHP, Piedade AJP. Electrochemistry of DNA. *Compr Chem Kinet*. 1999;37:91–119.
22. Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, et al. The Diploid Genome Sequence of an Individual Human. *Plos Biol*. 2007;5(10).
23. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The Sequence of the Human Genome. 2001;291(February).
24. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860–921.
25. Gibbs RA, Belmont JW, Hardenbol P, Willis TD, Yu F, Yang Hu. The International HapMap Project. *Nature*. 2003;426:789–96.
26. Alakoç YD. Adli Bilimlerde DNA Analizleri. *Ankara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO Derg*. 2010;9(2):1–8.
27. Condit CM, Achter PJ, Lauer I, Sefcovic E. The Changing Meanings of □ Mutation : □ A Contextualized Study of Public Discourse. 2002;75(July 2001):69–75.
28. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “ mutation ” and “ polymorphism ” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics*. 2015;8(37):1–7.
29. Özdoğan M. Mutasyon Nedir ? Nasıl Kanserleşmeye Neden Olur ? [Internet]. 2020. Available from: <https://www.drozdogan.com/mutasyon-nedir-nasil-kanserlesmeye-neden-olur/>
30. Aksoy ZB, Soydemir E. Polimorfizm. *Güncel Gastroenteroloji*. 2017;21(1):9–13.
31. Serin A, Alper B, Dağ H. Adli Amaçlı Kullanılan DNA Polimorfizmleri ve Tiplendirme Teknikleri. *Adli Tıp Derg*. 2002;16(2–4):72–81.
32. Thompson R, Zoppis S, McCord B. An Overview of DNA Typing Methods for Human Identification: Past, Present, and Future. *DNA Electrophor Protoc Forensic Genet Methods Mol Biol*. 2012;830:XIII, 394.
33. Schneider PM. Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic Sci Int*. 2007;165(2–3):238–43.
34. Giardina E, Spinella A, Novelli G. Past, present and future of forensic DNA typing. *Futur Med*. 2011;6:257–70.
35. Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta haemat*. 1958;20:156–66.
36. Geserick G, Wirth I. Genetic Kinship Investigation from Blood Groups to. *Transfus Med*

- Hemotherapy. 2012;163–75.
37. Budowle B, Sundaram S, Wenk RE. Population Data On The Forensic Genetic Markers: Phosphoglucomutase-1, Esterase D, Erythrocyte Acid Phosphatase And Glyoxylase I. *Forensic Sci Int.* 1985;28:77–81.
 38. Budowle B, Van Daal A. Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques.* 2008;44(5):603–10.
 39. Wyman AR, Whitet RAY. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 1980;77(11):6754–8.
 40. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1980;32:314–31.
 41. Jeffreys A, Wilson V, Thein S. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature.* 1985;314(7):67–73.
 42. Jeffreys AJ, Brookfield JFY, Semenoff R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature.* 1985;317:818–9.
 43. Aronson JD. DNA fingerprinting on trial : the dramatic early history of a new forensic technique. *Endeavour.* 2005;29(3):126–31.
 44. Clayton TM, Whitaker JP, Maguire CN. Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Sci Int.* 1995;76:7–15.
 45. Mullis KB. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci Am.* 1990;(April).
 46. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet.* 1989;44(3):388–96.
 47. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics.* 1992;12(2):241–53.
 48. Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P. Variation in Short Tandem Repeat sequences -a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Legal Med.* 1994;107(1):13–20.
 49. Sprecher CJ, Puers C, Lins AM, Schumm JW. General approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci. *Biotechniques.* 1996;20(2):266–76.
 50. Tracey M. Short tandem repeat-based identification of individuals and parents. *Croatian Medical Journal.* 2001.
 51. Manta FSN, Pereira R, Caiafa A, Silva DA, Gusmão L, Carvalho EF. Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol.* 2013;
 52. Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, Hühne J, Rolf B. Mutation rate in human microsatellites: Influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum*

Genet. 1998;

53. Butler JM, Hill CR. Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis. *Forensic DNA Anal Curr Pract Emerg Technol.* 2013;(Ellegren 2004):181–98.
54. Budowle B, Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM. Population Data on the Thirteen CODIS Core Short Tandem Repeat Loci in African Americans, U.S. Caucasians, Hispanics, Bahamians, Jamaicans, and Trinidadians. *J Forensic Sci.* 1999;
55. Page K, Graham EAM. Cancer and forensic microsatellites. *Forensic Sci Med Pathol.* 2008;4:60–6.
56. Wright CM, Dent OF, Newland RC, Barker M, Chapuis PH, Bokey EL, et al. Low level microsatellite instability may be associated with reduced cancer specific survival in sporadic stage C colorectal carcinoma. *Gut.* 2005;54:103–8.
57. Fujimoto A, Fujita M, Hasegawa T, Wong JH, Maejima K, Oku-Sasaki A, et al. Comprehensive analysis of indels in whole-genome microsatellite regions and microsatellite instability across 21 cancer types. *Genome Res.* 2020;30(3):334–46.
58. Migdalska-Sęk M, Pastuszek-Lewandoska D, Brzezińska E. MSI and LOH in the development and prognosis of follicular cell-derived thyroid tumours. *Endokrynologia Polska.* 2012.
59. Peloso G, Grignani P, Rosso R, Previdere C. Forensic evaluation of tetranucleotide STR instability in lung cancer. *Int Congr Ser.* 2003;1239:719–21.
60. Tozzo P, Delicati A, Frigo AC, Caenazzo L. Comparison of the allelic alterations between indel and str markers in tumoral tissues used for forensic purposes. *Med.* 2021;57(3):1–13.
61. Ananian V, Tozzo P, Ponzano E, Nitti D, Rodriguez D, Caenazzo L. Tumoural specimens for forensic purposes: comparison of genetic alterations in frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. 2011;327–32.
62. Zhang P, Li Y, Zhu S, Ma R. Forensic evaluation of STR typing reliability in lung cancer. *Leg Med [Internet].* 2018;30(June 2017):38–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2017.11.004>
63. Filoglu G, Bulbul O. Evaluation of reliability on STR typing at leukemic patients used for forensic purposes Evaluation of reliability on STR typing at leukemic patients used for forensic purposes. *Mol Biol Rep.* 2014;41(March 2015):3961–72.
64. Vauhkonen H, Hedman M, Vauhkonen M, Kataja M, Sipponen P, Sajantila A. Evaluation of gastrointestinal cancer tissues as a source of genetic information for forensic investigations by using STRs. *Forensic Sci Int.* 2004;139:159–67.
65. Ceccardi S, Alu M. Evaluation of reliability of STR typing in different types of cancerous tissues used for identification purpose. *Int Congr Ser.* 2006;1288:672–5.
66. Pelotti S, Ceccardi S, Alù M, Lugaresi F, Trane R, Falconi M, et al. Cancerous Tissues in Forensic Genetic Analysis. *Genet Test.* 2007;11(4):1–4.

67. Much M, Buza N, Hui P. Tissue identity testing of cancer by short tandem repeat polymorphism : pitfalls of interpretation in the presence of. *Hum Pathol* [Internet]. 2014;45(3):549–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2013.10.022>
68. Nelson MR, Marnellos G, Kammerer S, Hoyal CR, Shi MM, Cantor CR, et al. Large-Scale Validation of Single Nucleotide Polymorphisms in Gene Regions. *Genome Res*. 2004;14:1664–8.
69. Wang DG, Wang DG, Fan J, Siao C, Berno A, Young P, et al. Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome Large-Scale Identification , Mapping , and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome Although individual SNPs are less informa -. *Science* (80-). 1998;280(1077):1077–10822.
70. Shastri BS. SNPs in disease gene mapping , medicinal drug development and evolution. *J Hum Genet*. 2007;52:871–80.
71. Pontes L, Sousa JC de, Medeiros R. SNPs and STRs in forensic medicine. A strategy for kinship evaluation. *Arch Forensic Med Criminol*. 2017;67(3):226–40.
72. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234(2):177–86.
73. Børsting C, Mikkelsen M, Morling N. Kinship Analysis with Diallelic SNPs – Experiences with the SNP for ID Multiplex in an ISO17025 Accredited. *Transfus Med Hemotherapy*. 2012;39:195–201.
74. Phillips C, Carracedo A, Pulker H. Finding genes that underlie physical traits of forensic interest using genetic tools. *Forensic Sci Int Genet*. 2007;1:100–4.
75. Watherston J, McNevin D, Gahan ME, Bruce D, Ward J. Current and emerging tools for the recovery of genetic information from post mortem samples: New directions for disaster victim identification. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2018;37(August):270–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.08.016>
76. Kayser M, De Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2011;12(3):179–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2952>
77. Phillips C, García-Magariños M, Salas A, Carracedo Á, Lareu MV. SNPs as supplements in simple kinship analysis or as core markers in distant pairwise relationship tests: When do SNPs add value or replace well-established and powerful STR tests? *Transfus Med Hemotherapy*. 2012;39(3):202–10.
78. Phillips C, Fondevila M, García-Magariños M, Rodriguez A, Salas A, Carracedo Á, et al. Resolving relationship tests that show ambiguous STR results using autosomal SNPs as supplementary markers. *Forensic Sci Int Genet*. 2008;
79. Børsting C, Morling N. Reinvestigations of six unusual paternity cases by typing of autosomal single-nucleotide polymorphisms. *Transfusion*. 2012;
80. Pereira R, Christopher P, Alves C, Amorim A, Carracedo A, Leonor G. A new multiplex for human identification using insertion / deletion polymorphisms. *Electrophoresis*. 2009;30:3682–90.
81. Mutations and disorders(2020).U.S. National Library of

Medicine. Alıntı: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/mutationsanddisorders/genemutation>.

82. Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, et al. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res.* 2006;16(9):1182–90.
83. Wajnberg G, Passetti F. Using high-throughput sequencing transcriptome data for INDEL detection: Challenges for cancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2016;11(3):257–68.
84. Mills RE, Pittard WS, Mullaney JM, Farooq U, Creasy TH, et al. Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. *Genome Res.* 2011;21(6):830–9.
85. Narzisi G, Schatz MC. The challenge of small-scale repeats for indel discovery. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3(JAN):1–5.
86. Scharplatz M, Puhon MA, Steurer J, Bachmann LM. What is the impact of the ACE gene insertion / deletion (I / D) polymorphism on the clinical effectiveness and adverse events of ACE inhibitors ? – Protocol of a systematic review. *BMC Medical Genet.* 2004;6:1–6.
87. Stenson PD, Mort M, Ball E V., Shaw K, Phillips AD, Cooper DN. The Human Gene Mutation Database: Building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Human Genetics.* 2014.
88. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. *Science* (80-). 1989;121(August):1073–80.
89. Romanini C, Romero M, Salado Puerto M, Catelli L, Phillips C, Pereira R, et al. Ancestry informative markers: Inference of ancestry in aged bone samples using an autosomal AIM-Indel multiplex. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;16:58–63.
90. Duvenci A, Bulbul O, Filoglu G. Evaluation of Population Data and Forensic Parameters of Turkish Population on 30 Autosomal Insertion and Deletion Polymorphisms 1. *Russ J Genet.* 2019;55(2):246–52.
91. Zhang H, He G, Guo J, Ren Z, Zhang H, Wang Q, et al. Genetic diversity, structure and forensic characteristics of Hmong–Mien-speaking Miao revealed by autosomal insertion/deletion markers. *Mol Genet Genomics.* 2019;294(6):1487–98.
92. Huang J, Luo H, Wei W, Hou Y. A novel method for the analysis of 20 multi-Indel polymorphisms and its forensic application. *Electrophoresis.* 2014;35(4):487–93.
93. Zhao X, Chen X, Zhao Y, Zhang S, Gao Z, Yang Y, et al. Construction and forensic genetic characterization of 11 autosomal haplotypes consisting of 22 tri-allelic indels. *Forensic Sci Int Genet.* 2018;34(January):71–80.
94. Duvenci A. İnsersiyon/Delesyon(InDel) lokuslarına ait kimliklendirme panelinin geliştirilmesi ve validasyonu. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü; 2020.

95. Gaffney EF, Riegman PH, Grizzle WE, Watson PH. Factors that drive the increasing use of FFPE tissue in basic and translational cancer research. *Biotech Histochem* [Internet]. 2018;93(5):373–86. Available from: <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1446101>
96. Robbe P, Popitsch N, Knight SJL, Antoniou P, Becq J, He M, et al. Clinical whole-genome sequencing from routine formalin-fixed, paraffin-embedded specimens: pilot study for the 100,000 Genomes Project. *Genet Med* [Internet]. 2018;20(10):1196–205. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2017.241>
97. Guyard A, Boyez A, Pujals A, Robe C, Tran Van Nhieu J, Allory Y, et al. DNA degrades during storage in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks. *Virchows Arch*. 2017;471(4):491–500.
98. McDonough SJ, Bhagwate A, Sun Z, Wang C, Zschunke M, Gorman JA, et al. Use of FFPE-Derived DNA in Next Generation Sequencing: DNA extraction methods. *bioRxiv*. 2019;1–15.
99. Frazer Z, Yoo C, Sroya M, Bellora C, DeWitt BL, Sanchez I, et al. Effect of Different Proteinase K Digest Protocols and Deparaffinization Methods on Yield and Integrity of DNA Extracted From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue. *J Histochem Cytochem*. 2020;68(3):171–84.
100. Mee BC, Carroll P, Donatello S, Connolly E, Griffin M, Dunne B, et al. Maintaining breast cancer specimen integrity and individual or simultaneous extraction of quality DNA, RNA, and proteins from allprotect-stabilized and nonstabilized tissue samples. *Biopreserv Biobank*. 2011;9(4):389–98.



EK-2 Asgari Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

"Bir araştırma çalışmaya katılmak için davet edilmiş bulunmaktasınız. Aşağıdaki bilgileri okuduktan sonra çalışmaya katılmak isterseniz, bu formu imzalayınız. Formu imzalamanız çalışmanın kapsamı ve riskleri hakkında bilgilendirildiğinizi ve kararınızı serbestçe verdiğinizi belirtmektedir. Bu onay formunun bir kopyası size verilecektir. Bu formda anlamadığınız ifadeler varsa çalışmadaki araştırmacılara sorarak bilgi edininiz."

1. Araştırmanın adı,

“Kanserli Dokularda InDel İnstabilitesi ve Adli Bilimler Açısından Önemi” adlı bu çalışma bir araştırma olup, akademik amaçla yapılmaktadır

2. Çalışmanın bir araştırma olduğu,

Bu çalışma bir araştırma olup, akademik amaçla yapılmaktadır.

3. Araştırmanın amacı,

Bu çalışma bir yüksek lisans tezidir.

Adli DNA profillemeye çalışmalarında sadece kanserli dokuların kullanıldığı durumlarda, STR’lerde görülen instabiliteler nedeniyle kimliklendirmede hatalı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, kanserli dokularda kimliklendirmede kullanılan 36 InDel lokusunun incelenmesi olup STR’lerde gözlenen instabilitenin InDel’lerde görülüp görülmediğinin anlaşılmasıdır.

4. Gönüllünün araştırmaya devam etmesi için öngörülen süre,

Gönüllünün kanserli doku örneği alındıktan sonra hiçbir sorumluluğu olmayacaktır. Gönüllünün kanserli doku örneği çalışma süresince (2 yıl) saklanacak ve çalışma sonuçlanınca imha edilecektir.

5. Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı,

Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı yaklaşık 50 kişi olacaktır

6. Araştırmada uygulanacak tedaviler,

Araştırmada gönüllülerden kanserli doku örneği almak dışında herhangi bir müdahale yapılmayacak veya tedavide bulunulmayacaktır. Araştırmanın deneysel aşaması şu şekildedir; gönüllülerden alınacak kanserli doku örneklerinden DNA izole edilecek, miktarı belirlenecek, PCR tekniği ile 36 INDEL lokusu çoğaltılacak ve elektroforez analizi yapılacaktır (ABI 310-3130 Genetic Analyzer, GeneMapper Software). Kontrol amaçlı dokuların kanserli olmayan kısmından alınan örneklerle aynı işlemler tekrarlanacaktır.

7. Varsa farklı tedaviler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığının bulunduğu,

Gönüllülere herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.

8. Araştırma sırasında uygulanacak olan invazif yöntemler dâhil olmak üzere izlenecek veya gönüllüye uygulanacak yöntemlerin tümü,

Gönüllülerden sadece kanserli doku örneği alınacaktır.

9. Araştırmanın deneysel kısımları,

Bu çalışmada, çalışmaya rıza gösteren gönüllülerden oluşan yaklaşık 50 kişiden alınan kanserli doku örnekleri kullanılacaktır. Araştırmanın laboratuvar aşamasında ise DNA analizi yöntemiyle, kanserli doku örneklerinden DNA profilleri elde edilecektir.

10. Gönüllünün maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacak ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar dahil olmak üzere),

Gönüllüden sadece kanserli doku örneği alınacaktır. Kanserli doku örneği alınmasının hiçbir riski yoktur.

11. Araştırmadan makul ölçüde beklenen yararlarla ilgili olarak gönüllü açısından hedeflenen herhangi bir klinik yarar olmadığına gönüllünün bu durum hakkında bilgilendirileceği,

Gönüllü açısından hedeflenen bölgeler ile ilgili herhangi bir klinik yarar yoktur.

12. Gönüllüye uygulanabilecek olan alternatif yöntemler veya tedavi şeması ve bunların olası yarar ve riskleri,

Gönüllüye herhangi bir girişim ya da tedavide bulunulmayacaktır.

13. İlgili mevzuat gereğince gerekiyorsa gönüllüye verilecek tazminat (sigorta) ve / veya sağlanacak tedaviler,

Gönüllülere yapılacak işlem sadece kanserli doku örneği almak olup bu işlem sırasında katılımcılarda doğabilecek hukuki ve mali riskleri proje yürütücüsü olarak tamamen üstlendiğimi bildiririm.

14. Varsa, gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler hakkındaki bilgiler,

Gönüllüler için herhangi bir ulaşım, yemek veya başka bir masraf ödenmeyecektir.

15. Gönüllülerin sorumlulukları,

Gönüllünün bu çalışmayla ilgili kanserli doku örneği vermekten başka hiçbir yükümlülüğü yoktur.

16. Gönüllünün araştırmaya katılımının isteğe bağlı olduğu ve gönüllünün istediği zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkını kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebileceği veya araştırmadan çekilebileceği,

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

17. Gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanamayacağı; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliğinin gizli kalacağı,

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

18. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, etik kurul, kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimlerinin bulunabileceği, ancak bu bilgilerin gizli tutulacağı, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla gönüllü veya kanuni temsilcisinin söz konusu erişime izin vermiş olacağı,

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

19. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya kanuni temsilcisinin zamanında bilgilendirileceği,

Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya yasal temsilcisinin zamanında bilgilendirileceğini taahhüt ederiz.

20. Gönüllünün; araştırma, kendi hakları veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler ile bu kişilere ait günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları,

Gönüllünün araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir bilgi edinebilmesi için proje yürütücüsü Faruk Aşıcıoğlu'na ait günün 24 saatinde ulaşabileceği telefon numarası 05325203489'dir.

21. Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler,

Gönüllünün kanserli doku örneğinden herhangi bir nedenle DNA elde edilememesi durumunda katılım sona erdirilir.

22. Çalışma sonrası araştırma ürünlerine erişim,

Araştırma sonrası elde edilecek ürünler tez çalışması ve bilimsel katkı için kullanılacak olup, başka hiçbir amaç için kullanılmayacaktır.

23. Gönüllülerden alınacak biyolojik materyallerin ne olduğu, hangi amaçla alındığı ve analizlerinin nerede yapılacağına dair bilgiler (analizlerin yurtdışında yapılması durumunda biyolojik materyallerin nereye gönderileceğinin açıklanması),

Gönüllülerden elde edilecek olan kanserli doku örneğinden 36 İnsersiyon/Delesyon (INDEL) lokusu tiplendirilerek kanserli dokudaki stabiliteleri belirlenecektir. Biyolojik

materyallerin analizleri yurtdışında yapılmayacak olup; çalışma, İ.Ü-C Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü laboratuvarlarında yapılacaktır.

24. “Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum” İfadesi gönüllünün kendi el yazısı ile yazılacaktır.

25. “Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum” İfadesi gönüllünün kendi el yazısı ile yazılacaktır.

26. Gönüllünün adı / soyadı / imzası / tarih,

27. Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının adı / soyadı / imzası / tarih,

28. Gerekiyorsa olur işlemine tanık olan kişinin adı / soyadı / imzası / tarih,

29. Gerekiyorsa anne ve baba veya kanuni temsilcinin adı / soyadı / imzası / tarih,

yer almalıdır.

30. Gönüllülerden elde edilen biyolojik materyaller üzerinde genetik araştırma yapılabilmesi için;

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

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

“Kanserli Dokularda InDel İnstabilitesi ve Adli Bilimler Açısından Önemi” adlı araştırma kapsamında alınan kanserli doku örneğinin (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 ve Soyadı:

Gönüllünün Doğum Tarihi:

Gönüllünün İmzası:

Tarih:

31. Ayrıca, BGOF, gönüllü veya kanuni temsilcisinin yasal haklarını ortadan kaldıracak bir hüküm veya ifade içeremez ayrıca araştırmacıyı, kurumu, destekleyici veya bunların temsilcilerini kendi ihmallerinden kaynaklanan herhangi bir yükümlülüğün kurtaracak hüküm veya ifade taşıyamaz.

Özgeçmiş

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: İpek GÜREL

Doğum Yeri ve Tarihi:

E-posta:

Eğitim Bilgileri

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

2015-2019: Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen ve Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (Lisans Programı)

İş Tecrübesi:

03.2022-Halen: Haliç Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Araştırma Görevlisi

Staj Bilgileri:

01.2019 – 02.2019: Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Biyoteknoloji ABD

06.2018 – 07.2018: İstanbul Üniversitesi, Klinik Onkoloji ABD