T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman: Yard. Doç. Dr. Gönül Filoğlu

30 İNSERSİYON/DELESYON (INDEL) LOKUSUNUN TÜRKİYE'DEKİ POLİMORFİZMİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG ARZU DÜVENCİ

İSTANBUL, 2015

İstanbul, 26 Haziran 2015

İ.Ü. ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Lisansüstü Öğretim Yönetmenliğinin 36. maddesi uyarınca Enstitümüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nın yüksek lisans öğrencisi Arzu DÜVENCİ'nin

"30 İnsersiyon/Delesyon (INDEL) Lokusunun Türkiye'deki Polimorfizmi"

Adlı tezi jürimizce tetkik edilmiş ve kendisine tez savunması yaptırılmıştır.

Yukarıda adı geçen tezin ve tez savunmasının kabul edilmesine oy birliğiyle karar verilmiştir.

Prof. Dr. Münevver AÇIKKOL
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Salih CENGİZ
Üye

Doç. Dr. E. Hülya YÜKSELOĞLU
Üye

Yard. Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU
Danışman

Yard. Doç. Dr. Hüseyin ÇAKAN
Üye

Bu tez projesi, İ.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 33193

Sevgili Babam, İshak DÜVENCİ'nin değerli anısına ithaf ediyorum…

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin gerçekleşmesinde katkıda bulunan İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Faruk AŞICIOĞLU ve Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı değerli hocamız Prof. Dr. Münevver AÇIKKOL'a,

Çalışmam boyunca bilgi ve yorumlarıyla yol gösterici olan, her konuda anlayışını ve hoşgörüsünü esirgemeyen, emeğini ve vaktini benim için harcayan sevgili danışmanım Yard. Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU'na,

Bilimsel çalışmalarda yol gösteren değerli hocalarımız Prof. Dr. Salih Cengiz ve Doç. Dr. Emel Hülya YÜKSELOĞLU, Yard. Doç. Dr. Havva ALTUNÇUL ve Yard. Doç. Dr. Hüseyin ÇAKAN'a

Lisansüstü eğitimim süresince ilgisini, bilgisini ve sevgisini benden esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Zeynep TÜRKMEN ve Arş Gör. Dr. Selda MERCAN'a

Çalışmam boyunca desteğini her an hissettiğim Arş Gör. Dr. Özlem BÜLBÜL, Arş Gör. Burak Haşim GÜNGÖR ve Uzm. Biyolog Ömer KARATAŞ'a

Çalışmalarım süresince anlayış ve hoşgörüsü, içten tutum ve davranışları ile bilimsel ve manevi anlamda her an destek olan değerli arkadaşım Msc. Biyolog Fulya Eylem YEDİAY'a,

Laboratuar bilgisini ve yardımını esirgemeyen Gülten RAYİMOĞLU'na,

Yaşadığım zorluklar karşısında pozitif bakış açısıyla sorunları çözmemde yardımcı olan Adli Tıp Enstitüsü'nün idari personeline özellikle Elvan EMRAL UĞUR ve Yüksel GÜVEN'e

Çalışmalarım boyunca bana verdikleri moral ve destekleri için değerli arkadaşlarım İlksen TAVACI, Yasemin DEMİRBAŞ, Candar YILDIZ, Ayşe TORUN, Ayşe KAYA ve Dilara DEVRANOĞLU'na

Bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan tüm gönüllülere,

Çalışmalarım süresince hem akademik destek hem de moral veren, sevgi ve sabırla bana katlanan sevgili ev arkadaşım ve abim Dr. Abdullah DÜVENCİ'ye

Sonsuz sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim tüm aileme özellikle Canım Babam **İSHAK DÜVENCİ**'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Arzu DÜVENCİ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ii

ŞEKİLLER LİSTESİ v

TABLOLAR LİSTESİ vi

KISALTMALAR vii

1. GİRİŞ ve AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Adli Biyoloji 3

2.2. DNA (Deoksiribonükleikasit) 3

2.3. Gen Mutasyonu 4

2.3.1. Kromozom anomalileri 4

2.3.1.1. Sayısal kromozom anomalileri 4

2.3.1.2. Yapısal kromozom anomalileri 4

2.3.2. Gen anomalileri 7

2.3.2.1. Nokta mutasyonları (Substitüsyon) 7

2.3.2.2. Çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları 7

2.4. Gen Polimorfizmi 7

2.5. Adli Bilimlerde Genetik Polimorfizm 8

2.6. Adli Bilimlerde Kullanılan Genetik Polimorfizm Sistemleri 9

2.6.1. Kısa tekrar dizileri (STR) 12

2.6.1.1 STR'lerin adli bilimlerde kullanımı 15

2.6.2. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) 16

2.6.2.1 SNP'lerin adli bilimlerde kullanımı 18

2.7. INDEL (İnsersiyon/Delesyon) 19

2.7.1. İnsersiyon (Eklenme) 19

2.7.2. Delesyon (Çıkarma) 20

2.8. İnsersiyon/Delesyon (INDEL) Polimorfizmi 21

2.9. Investigator® DIPplex Kiti 23

2.10. Adli Genetikte Biyoistatistik Hesaplamalar 25

2.10.1. Alel frekansı ve Hardy-Weinberg dengesi 26

2.10.2. Adli istatistik parametreleri 27
2.10.3. Popülasyonlar arası farklılaşma (F_{ST} değerleri) 28
3. GEREÇ ve YÖNTEM 29
3.1. Deneyde Kullanılan Cihazlar 29
3.2. Deneyde Kullanılan Ticari Kitler 30
3.3. Kapiler Elektroforez Aşamasında Kullanılan Kimyasallar 30
3.4. Deneyde Kullanılan Kit Dışı Kimyasal Maddeler 30
3.5. Deneyde Kullanılan DNA Örnekleri 30
3.6. Deney Aşaması 31
3.6.1. DNA izolasyonu 32
3.6.2. DNA miktarlarının belirlenmesi 32
3.6.3. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) 33
3.6.3.1. PCR primerleri 33
3.6.3.2. PCR bileşenlerinin hazırlanması ve PCR aşaması 34
3.6.4. PCR ürünlerinin ABI PRISM® 3130 genetik analiz cihazında elektroforezi 35
3.6.4.1. PCR ürünlerinin elektroforeze hazırlanması 35
3.6.4.2. Elektroforetik analiz 36
3.6.5. Elektroforez sonrası verilerin analizi 37
3.7. Qiagen Investigator® DIPplex Kiti'nin Optimizasyon Çalışmaları 38
3.7.1. Optimum DNA miktar tayini 38
3.7.2. PCR toplam hacminin azaltılması 39
3.8. İstatiksel Analiz 39
4. BULGULAR 41
4.1. Optimizasyon Çalışmaları 41
4.2. Genotiplerin Belirlenmesi 44
4.3. İstatistiksel Bulgular 45
4.3.1. Alel frekanslarının belirlenmesi 45
4.3.2. Hardy-Weinberg dengesi 47
4.3.3. Adli İstatistik parametreleri 48
4.3.4. Popülasyonlar arası alel frekanslarının karşılaştırılması 48
4.3.5. Popülasyonlar arası lokus bazındaki farklılıklar 51
4.3.6. Popülasyonlar arası genetik uzaklık (F_{ST}) 54
4.3.7. Filogenetik ağaç çizimi 54

5. TARTIŞMA ve SONUÇ 56

6. ÖZET 60

7. İNGİLİZCE ÖZET 61

8. KAYNAKLAR 62

EKLER 70

ÖZGEÇMİŞ 79

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: İnversiyon oluşumu (15)..... 5
Şekil 2: Translokasyon oluşumu (18)..... 6
Şekil 3: Duplikasyon oluşumu (19)..... 6
Şekil 4: STR oluşumu (50)..... 13
Şekil 5: Basit STR (HumTHO1) (51)..... 13
Şekil 6: Bileşik STR (D21S11) (52)..... 14
Şekil 7: Karmaşık STR (SE33) (53)..... 14
Şekil 8: SNP oluşumu (66)..... 16
Şekil 9: İnsersiyon oluşum şekli (80)..... 20
Şekil 10: Delesyon oluşum şekli (83)..... 21
Şekil 11: Investigator® DIPplex Kit (92)..... 23
Şekil 12: DNA size standart (BTO) (76)..... 37
Şekil 13: *Investigator® DIPplex kitine ait alelik ladder (76)*..... 38
Şekil 14: Pozitif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü (tam reaksiyon)..... 42
Şekil 15: Pozitif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü (yarım reaksiyon)..... 42
Şekil 16: Pozitif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü (çeyrek reaksiyon)..... 43
Şekil 17: Negatif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü..... 43
Şekil 18: Kadın DNA'sına ait elektroforegram görüntüsü..... 44
Şekil 19: Erkek DNA'sına ait elektroforegram görüntüsü..... 45
Şekil 20: 30 INDEL lokusunun alel frekansı oranlarının grafiksel görünümü..... 47
Şekil 21: 30 INDEL lokusunun popülasyonlar arasındaki alel frekansları grafiği..... 49
Şekil 22: Komşu birleştirme ağaç yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı..... 55

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo I. Adli genetik alanındaki önemli gelişmelerin zaman çizelgesi (29) 9
Tablo II. 100 PCR reaksiyonu için kit içeriği (92) 23
Tablo III. Qiagen Investigator® DIPplex kitine ait lokusların floresan boyaları (92) 24
Tablo IV. 30 INDEL PCR primerleri (92) 24
Tablo V. Adli istatistik parametrelerin formülleri (97) 27
Tablo VI. Çalışmada kullanılan popülasyonlar 31
Tablo VII. PCR bileşenleri ve miktarları 34
Tablo VIII. PCR koşulları 35
Tablo IX. PCR ürünlerinin analiz için hazırlanması 35
Tablo X. Elektroforez koşulları 36
Tablo XI. Çalışılan PCR reaksiyon miktarları 39
Tablo XII. 30 INDEL lokusunun alel frekansları 46
Tablo XIII. Hardy-Weinberg denge tablosu 47
Tablo XIV. Adli istatistik analiz parametreleri 48
Tablo XV. Çeşitli popülasyonlara ait 30 INDEL lokusunun alel frekansları 41
Tablo XVI. Fisher's Exact Test Sonuç Tablosu (a) 43
Tablo XVII. Fisher's Exact Test Sonuç Tablosu (b) 43
Tablo XVIII. Fisher's Exact Test Sonuç Tablosu (c) 44
Tablo XIX. Fisher's Exact Test Sonuç Tablosu (d) 44
Tablo XX. 15 INDEL lokusunun popülasyonlar arası Fst değerleri 54

KISALTMALAR

A	Adenin
ABI	Applied Biosystems, Inc
AW1	Wash buffer 1 (Yıkama tamponu 1)
AW2	Wash buffer 2 (Yıkama tamponu 2)
bç	Baz çifti
BSA	Bovine Serum Albumin (Sığır serum albümin)
C	Cytosine **(**Sitozin**)**
CODIS	Combined DNA Index System (Birleşik DNA İndeks Sistem)
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (Ethylenediamine tetra-acetic acid)
FBI	Federal Bureau of Investigation (Fedaral Soruşturma Bürosu)
FSS	Forensic Science Service (Adli Bilimler Servisi)
Fst	Fixation Index **(**Popülasyonlar arası genetik uzaklık)
G	Guanin
He	Expected Heterocygosity (Beklenen heterozigotluk)
HLA	Human Leukocyte Antigens (İnsan lökosit antijeni)
HWD	Hardy-Weinberg Disequilibrium (Hardy-Weinberg Dengesi)
INDEL	İnsersiyon/Delesyon (Eklenme/Çıkarma)
kb	Kilobaz
$MgCl_2$	Magnezyum Klorür
mtDNA	Mitokondriyal DNA
µl	Microliter **(**Mikrolitre**)**
ng	Nanogram
nDNA	Çekirdek (nüklear) DNA'sı
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PD	Power of Discrimination (Ayrım Gücü)
PE	Power of Exclusion **(**Dışlama Gücü)
PIC	Polymorphism Information Content (Polimorfik Bilgi İçeriği)
Pm	Probability of Match **(**Eşleşme Olasılığı)

RFLP	Restriction Fragment Lenght Polymorphism (Sınırlayıcı parça uzunluğu polimorfizmi)
Rpm	Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Tek nükleotid polimorfizmi)
STR	Kısa tekrar dizileri (Short Tandem Repeat)
T	Timin
TBE	Tris + Borik asit + EDTA tamponu
Tm	The Melting Temperature **(**Primer bağlanma sıcaklığı)
TPI	Typical Paternity Index (Tipik Babalık İndeksi)
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats (Değişken sayıda ardışık tekrarlar)

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Gelişen DNA (Deoksiribonükleik Asit) teknolojileri ve uygulamaları ile kimliklendirmedeki birçok zorluk ortadan kalkmıştır. Böylece DNA analiz yöntemleri konvansiyonel analiz yöntemlerinin yerini almıştır (1).

DNA analizleri; ilk olarak RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism- Sınırlayıcı Parça Uzunluğu Polimorfizmi), VNTR (Variable Number of Tandem Repeats- Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Dizileri, Minisatellitler), STR (Short Tandem Repeat- Kısa Ardışık Tekrar Dizileri, Mikrosatellitler), MiniSTR, mtDNA (mitokondriyal DNA) çalışmaları ve SNP (Single Nucleotide Polymorphism- Tek Nükleotid Polimorfizmi) çalışmaları şeklinde gelişim göstermiş ve adli örneklerin analizi için en avantajlı hale getirilmiştir. Son zamanlarda yapılan insersiyon/delesyon polimorfizmi (INDEL) çalışmaları yaygın olarak tıpta kullanılmasının yanında adli genetik alanında da kullanılmaya başlamıştır.

Genetik kimliklendirmede büyük rol oynayacağı düşünülen İnsersiyon/delesyon polimorfizim çalışmalarının günümüzde DNA profillemesinde kullanılan SNP ve STR polimorfizmine alternatif oluşturması ön görülmektedir (2).

DNA üzerinde gerçekleşmiş olan insersiyonlar ve delesyonlar zamanla kişileri kalıtımsal olarak ayırdığı için genetik işaretler olarak kullanılabilirler (3). Nokta mutasyonları ve çerçeve kayması mutasyonları genetik çeşitliliği etkileyen kalıtımsal değişimlerdir. Nokta mutasyonunda sadece bir baz mutasyona uğrar ve Tek Nükleotid Polimorfizmini (SNP, Single Nüleotid Polymorfizm) oluşturur. Çerçeve kayması mutasyonu, bazların insersiyonu (eklenmesi) veya delesyonu (çıkması) şeklinde INDEL polimorfizmini oluştururlar (4).

INDEL'lerin, özellikle olay yerinden az miktarda veya bozunmuş olarak gelen biyolojik materyallerde hatta antropolojik ve arkeolojik araştırmalarda, STR lokusları ile tiplendirme yapılamadığı durumlarda ve SNP'ye göre daha kısa zamanda ve az maliyetle başarılı bir çoğalma yapılabilmesi gibi özellikleri açısından adli bilimlerde kullanımı zamanla artacaktır (3,5).

Adli bilimlerde bir genetik işaretin kullanılabilmesi için o genetik işaretle ilgili polimorfik özelliklerin (homozigotluk ve heterozigotluk durumu, alel frekansı v.b) toplumlara özgü belirlenmiş olması gerekir. Bu amaca yönelik olarak bu çalışmada, otozomal

kromozomlar üzerinde bulunan 30 INDELs (Amelogenin X, Amelogenin Y, 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) lokusunun Investigator® DIPplex Kit (Qiagen) kit kullanılarak, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik laboratuarında kitin optimizasyonunu sağlamak ve Türkiye'deki polimorfizmi belirleyerek bu lokusların adli laboratuvarlarda kullanımını sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Adli bilimler; çeşitli adli olayların bilimsel kanıtlara dayanarak çözümlenmesini amaçlar. Bunun için tıp, fen ve sosyal bilimler gibi alanlardan yararlanılır (6,7).

2.1. Adli Biyoloji

Adli biyoloji; adli bilimlerin bir alt dalı olup adalete yardımcı olmak amacıyla biyolojinin, mikrobiyoloji, entomoloji, patoloji, botanik, zooloji, moleküler biyoloji ve genetik gibi bilim dalları ile işbirliği içindeki uygulama alanıdır (8).

Günümüzde, adli biyolojinin en önemli uygulama alanlarından biri olan adli moleküler biyoloji ve genetik bilimi, DNA (Deoksiribonükleikasit) teknolojisinin de gelişmesiyle son 20 yıldır hızlı bir şekilde ilerleme kaydetmiştir (9). Bu bilim dalı olay yerinde bulunan biyolojik örneklerde; kan, idrar, semen, ter, gibi vücut sıvılarının yanı sıra saç, tırnak, diş, kemik gibi insana ait ölüm öncesi ya da sonrasındaki çeşitli dokularında, bitkilerde, hayvan dokularında, böceklerde, mantarlarda, diatomlarda ve bakterilerde yapılan genetik incelemeleri içerir (8).

Adli genetikten evrim çalışmaları, göç yollarının belirlenmesi, toplu felaketlerde kimliklendirme ve nesep tayini gibi birçok alanda yararlanılmaktadır. Ayrıca suç-suçlu-mağdur arasında bağlantı kurarak adalet sistemine hizmet etmektedir (10,11).

Kan grupları ile başlayan ve gelişen teknoloji ile günümüzde DNA molekülünün kullanımına olanak sağlayan sistemler adli olguların çözümünde kullanılan en güvenilir sistemlerdir.

2.2. DNA (Deoksiribonükleikasit)

Çekirdekli hücre içeren her biyolojik materyalde çok sayıda varyasyon içeren DNA molekülü bulunur. Bu molekül ilk olarak 1869 yılında Miescher tarafından hücre çekirdeğine özel bir madde olarak bulundu ve buna “Nüklein” adı verildi. 1924 yılında ise Feulgen ve Rossenbeck bu nükleinin tüm canlılarda bulunduğunu ispat etti. 1953 yılında Watson ve Crick DNA molekülünün kendine has özelliklere sahip çift sarmal bir yapı halinde bulunduğunu ispat ettiler. DNA, bireysel tüm genetik özelliklerin temel yapı taşı olan bir nükleik asittir ve nükleotid adı verilen alt birimlerden oluşmuştur (12).

İnsan genomu yaklaşık $3x10^9$ baz çiftinden oluşmaktadır ve genetik bilgiyi taşıyan yaklaşık 50,000 gen 46 kromozom içerisinde bulunmaktadır. İnsan DNA'sının yaklaşık %99.9'u iki insan arasında aynıdır ve insanlardaki genetik çeşitlilik DNA zincirindeki bu küçük farklardan kaynaklanmaktadır (13).

Bazı DNA sekanslarındaki farklar insan fenotipini etkilememekte bazıları ise direkt hastalığa neden olmaktadır. DNA'daki nükleotid değişiklikleri fenotipi etkiliyor ise mutasyon olarak adlandırılır ve kalıtsal hastalıkların gelişiminden sorumludurlar. Bu değişiklikler fenotipi etkilemiyor sadece genetik çeşitlilik sağlıyor ise polimorfizm olarak adlandırılmaktadır. Polimorfizmden dolayı DNA adli bilimler açısından çok güçlü bir delildir (12).

2.3. Gen Mutasyonu

DNA nükleotid dizinindeki değişiklikler mutasyon olarak tanımlanır. Mutasyonlar, toplumun %1'inden daha nadir görülen genetik değişikliklerdir. DNA sekanslarındaki gen mutasyonları tek nükleotid değişimlerinden binlerce baz çiftini etkileyecek değişimlere kadar uzanır. Genlerdeki nükleotid değişimleri gen ekspresyonunun tamamen kaybına veya tamamen normal fenotipik değişikliklere neden olabilir (13,14). Mutasyonlar kromozamal düzeyde veya gen düzeyinde olmak üzere iki şekilde meydana gelebilir.

2.3.1. Kromozom anomalileri

2.3.1.1. Sayısal kromozom anomalileri

Genellikle kromozom sayısında veya yapısında meydana gelen değişiklikler sonucu ortaya çıkar. Sayısal anomaliler; mayoz veya mitoz bölünme sırasında kardeş (homolog) kromozomların hatalı ayrılması ile kromozom sayılarının değişmesidir. Gamet hücrelerindeki değişimler sonraki nesillere aktarıldığı için, somatik hücrelerdeki değişimler ise kansere neden olabildiği için önemlidir (12).

2.3.1.2. Yapısal kromozom anomalileri

Kromozomların yapısında duplikasyon, delesyon, insersiyon, inversiyon veya translokasyon şeklinde oluşan yapısal değişikliklerdir (12).

a. İnsersiyon (Eklenme) ve Delesyonlar (Çıkarma)

Bir ya da birden fazla nükleotidin delesyon ya da insersiyonu ile karakterizedir. Delesyon, bir kromozomdan parça kopması ve bunun sonucu genetik madde kaybı olan bir mutasyon tipidir. Kopma kromozomun uç kısmında meydana gelirse terminal delesyon, kromozom içindeki bir bölgede oluşursa interkalar delesyon olarak adlandırılır (4). İnsersiyonda ise diziye katılan baz sayısı 3'ün katları şeklinde değilse amino asit dizisinin okunması sırasında kayma olur. Bu şekilde çerçeve kayması mutasyonları oluşur. Bundan sonraki diziler artık işlevsel bir gen ürününü kodlayamaz. Bu yüzden anlamsız mutasyondur (13).

b. İnversiyonlar

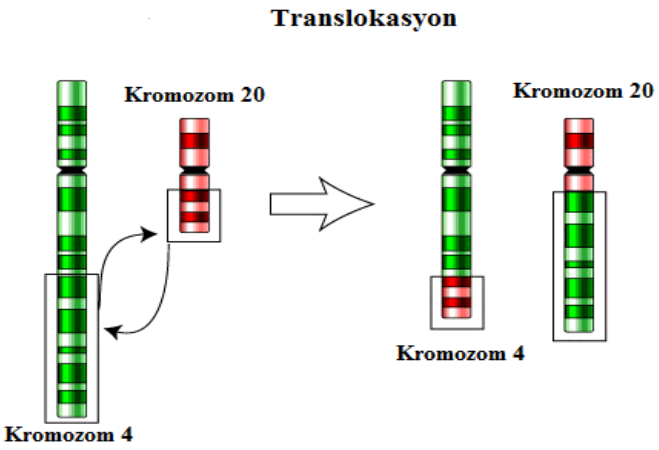
Bir kromozomun üzerindeki iki kırık arasındaki kromozom parçasının ters dönerek aynı yere bağlanmasıdır (12). Kromozomun sentromeri içermeyen bölgesinde inversiyon olabilir ve buna parasentrik inversiyon denir. Kromozomun sentromeri içeren bölgesi 1800 dönüş yaparak aynı bölgeye yeniden yerleşebilir ve bu duruma perisentrik inversiyon denir (4). İnversiyon oluşumu Şekil 1'de gösterilmektedir.

Şekil 1: İnversiyon oluşumu (15)

c. Translokasyonlar

Genellikle homolog olmayan kromozomlar arasında parça değişimi sonucu oluşan mutasyon tipidir (16,17). Kromozomlardan birinde tek noktada kopma olur ve kopan parça başka bir kromozomun ucuna eklenirse basit translokasyon, kromozomlardan birinde iki noktadan kopma ile ara bölgeden kopan parça başka bir kromozomun ara bölgesine eklenirse

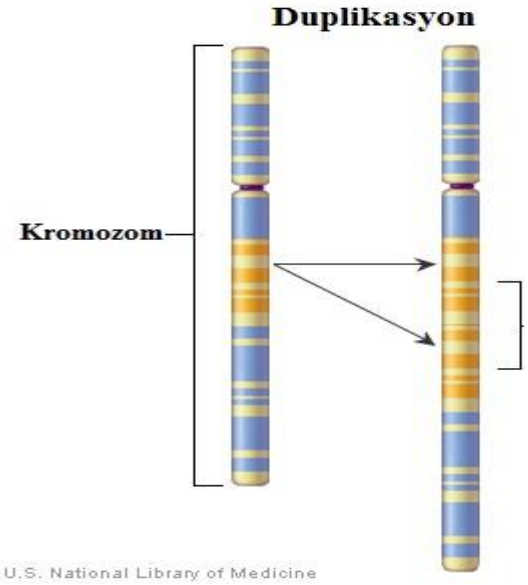
interkalar translokasyon, iki kromozom arasında karşılıklı parça değişiminin olduğu bir durumda ise karşılıklı translokasyon olur (4). Translokasyon oluşumu Şekil 2'de gösterilmektedir.



Şekil 2: Translokasyon oluşumu (18)

d. Duplikasyonlar

Eşit omayan "crossing-over" ile veya bir translokasyon veya inversiyon taşıyıcısında mayoz bölüne sırasında anormal segregasyon (açılma) ile oluşur (12). Genetik maddenin herhangi bir kısmının, genomda birden fazla sayıda buluması ile meydana gelen mutasyon tipidir (16,17). Duplikasyon oluşumu Şekil 3'te gösterilmektedir.



Şekil 3: Duplikasyon oluşumu (19)

2.3.2. Gen anomalileri

2.3.2.1. Nokta mutasyonları (Substitüsyon)

DNA dizisindeki tek nükleotid değişimi üçlü bazdaki (kodon) kodları değiştirerek, gen ürünündeki ilgili aminoasidin değişmesine yol açabilir (13).

Substitüsyonun (yer değiştirme) iki tipi ayırt edilmiştir: bir pürinin diğer bir pürin ile ya da bir pirimidinin diğer bir pirimidin ile yer değişimi (transisyon) ve bir pürinin bir pirimidinle değişmesi (transversiyon) ya da tam tersidir. (13).

2.3.2.2. Çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları

Protein kodlayan gen bölgesine, bir ya da daha fazla sayıda nükleotid eklenmesi veya çıkarılması sonucu meydana gelir. Bu değişiklik, okuma sırasında üçlü kodonların kaymasıyla sonuçlanır (12).

2.4. Gen Polimorfizmi

İnsan genomunda bulunan yaklaşık 3 milyar baz çifti, her biri farklı lokuslarda yer alan 50,000-100,000 geni kodlamaktadır. Bir genin özgün kromozom bölgesinde (lokus) veya DNA dizisinin birkaç alternatif formundan her birine ‘’alel’’ denir. İnsanlar her otozomal lokusunda biri anneden diğeri babadan gelen iki alel bulundurur. Bu şekilde polimorfizim gösteren bir gen için iki farklı alel taşıyabilirken, bir popülasyon aynı gen için çok sayıda alele sahip olabilmektedir (20).

Genomik DNA’nın farklı lokuslarındaki alellerde çok çeşitli varyasyonlar bulunmaktadır. Polimorfizmin ortaya çıkabilmesi için de baz çiftleri dizinindeki varyasyonların olması gerekir (21). Eğer bir varyasyon toplumun %1’inden ve daha fazla sayıda görülüyorsa ve bireyler arasında bir fiziksel farklılık, hastalıklara yatkınlık veya direnç açısından bir farklılık yaratıyorsa buna "genetik polimorfizm" denir (22). Genetik çeşitliliği ifade eden bu doğal farklılıklar kuşaktan kuşağa Mendel yasalarına göre aktarılırlar (23,24).

Polimorfizmler, DNA dizilimindeki farklılıkların bir sonucu olmasına karşın, aleller tarafından kodlanan proteinlerdeki değişkenlikler de incelenerek birçok polimorfik lokus ortaya çıkarılmıştır. İnsan ABO kan grupları, Rh faktörü ve majör doku uygunluk antijenleri birer polimorfizm örnekleridir (25).

Gen polimorfizmleri popülasyonda yaygın görülür, etnik ve coğrafik farklılıklar gösterirler. Bu yüzden polimorfizmler genetik araştırmalarda anahtar niteliğindeki elementler olduğundan biyolojide ve tıp alanında tiplendirme, teşhis etme ve tanımlama amacıyla değişik yöntemlerle değerlendirilmektedir. Bu durum adli amaçlı DNA analizlerinin temelini de oluşturmuştur. Bu durum adli amaçlı DNA analizlerinin temelini de oluşturmuştur (20,26).

2.5. Adli Bilimlerde Genetik Polimorfizm

Adli bilimlerde biyolojik incelemeler, çoğunlukla materyalin ne olduğu ve kaynağının kime ait olduğunu belirlemek için yapılır. Burada amaç bireyler arası genetik farklılıklardan yani genetik polimorfizimden yararlanarak kimliklendirme yapmaktır. Kimliklendirme çalışmalarında temel kural dışlama ve dahil etme prensibine dayanır. Dahil etme durumunda, ilgili biyolojik materyalin kişiye ait olduğunu söyleyebilmek için, istatiksel olarak ifade edilmesi gerekir. Bu hesaplamaların yapılabilmesi, çalışılan sistemlerin o popülasyondaki olası gen polimorfizminin bilinmesi ile mümkündür (9).

Polimorfizmler bir veya daha fazla bazın diziye eklenmesi (insersiyon), diziden baz çıkması (delesyon) veya bir bazın diğeri ile yer değiştirmesi (substitüsyon) ile oluşabilir. Bu tip polimorfizmlere INDEL polimorfizmi ve tek nükleotid polimorfizmi (SNP) adı verilir. İnsan genomunda en sık rastlanan polimorfizim tek nükleotid polimorfizmidir. SNP ve INDEL polimorfizmleri baz değişimlerine neden olur (12,27,28).

Baz değişimi sonucu oluşan yeni kodon eskisi ile aynı aminosidi kodluyorsa yani bir değişimin etkisi diğer bir değişimi ortadan kaldırıyorsa polimorfizm oluşur. Örneğin oluşan bir değişiklik sonucu proteine yanlış olarak giren amino asit, proteinin aktif bölgesinde değilse ve proteinin üç boyutlu yapısında farklılık oluşturup fonksiyonunu değiştirmiyorsa işte o zaman polimorfizm oluşur. Bu DNA bölgeleri bireyler arasında farklılık gösterir ve polimorfik bölgeler olarak adlandırılır. PCR-temelli moleküler işaretlerin kullanımı ve doğrudan sekans yöntemleri kullanılarak saptanan bu polimorfik bölgeler, adli bilimlerde kişilerin identifiksayonunda, filogenetik, taksonomik ve filocoğrafik çalışmalarda belirleyici olarak değerlendirilirler (28).

2.6. Adli Bilimlerde Kullanılan Genetik Polimorfizm Sistemleri

Genetik bilimindeki önemli gelişmeler adli bilimleri de etkilemiştir. Biyolojik materyallerden yapılan genetik kimliklendirmenin önemli gelişmeleri Tablo I'de tarih sırasına göre kısaca verilmiştir.

Tablo I. Adli genetik alanındaki önemli gelişmelerin zaman çizelgesi (29)

Yıl	Adli Bilimlerdeki Gelişmeler
1900	ABO Kan Grupları
1953	DNA Molekülünün Adli Bilimlerde Kullanımı
1953	Kırmızı Hücre Enzimleri Serum Proteinleri
1958	HLA (İnsan Lökosit Antijeni)
1970	Tip II Restriksiyon Enzimleri
1975	Southern Blotting
1980	VNTR (Değişken sayıda ardışık tekrarlar)
1983	PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
1985	Alec Jeffreys, ilk kez DNA profilini RFLP tekniği kullanarak VNTR'ları tanımladı.
1985	İngiltere'de bir cinayet olayı ilk kez DNA kullanılarak çözüldü.
1986	İlk PCR Vakası
1986	Edward Blake, PCR temelli DNA testini (HLA DQa) aynı şahsa ait farklı otopsi örneklerinde uyguladı.
1987	Kary Mullis, PCR tekniği geliştirdi.
1987	Otomatik Sekanslama
1988	FBI tarafından VNTR'lar rutinde kullanıldı.
1990	K. Kasai ve arkadaşları ilk STR'ı (D1S80) geliştirdiler.
1992	Kapiller Elektroforez'de ilk STR'lar tanımlandı.
1994	FSS (Forensic Science Service-İngiltere)'de Quadruplex denendi.
1995	İngiltere Ulusal DNA veri bankası oluşturuldu.
1996	İlk ticari STR kitleri yapıldı.
1998	Amerika Birleşik Devletleri'nde CODİS lokusları tanımlandı.
2000	STR analizleri rutin uygulamaya girdi.
2001	On altı lokusu içeren ticari PowerPlex 16 kiti satışa sunuldu

2002	Applied Biosystem, beş boyalı Identifiler kitini ve çok kapillerli AB-3100 genetik analizörünü tanıttı.
2004	Real Time PCR DNA miktarı
2004	Y kromozomuna özgü STR kitleri kullanılmaya başlandı.
2007	Olay yeri biyolojik lekelerden şüphelinin göz rengi, saç rengi ve tipi, yaşı, boyu gibi fiziksel özelliklerinin tespiti için SNP (Single Nucleotid Polymorphizm) çalışmaları hız kazandı.
2010	Yeni Avrupa Standardı STR lokusları oluşturuldu.

Biyolojik materyallerden adli amaçlı kimlik tespiti ilk olarak, kan gruplarının kişiden kişiye farklılık gösterdiği 1901 yılında Karl Landsteiner tarafından ABO kan grup tayini ile başlamış, serum proteinleri, eritrosit enzim sistemleri ve Dausset tarafından 1958'yılında beyaz kan hücreleri üzerinde bulunan, insanda yüksek polimorfizm özelliği gösteren HLA (insan lökosit antijeni) gibi konvansiyonel analiz yöntemleri ile devam etmiştir (30). HLA, son derece polimorfik olup şimdiye kadar 3.200'den fazla aleli tanımlanmıştır. Alellerin çok sayıda olması HLA sistemlerinin adli bilimler için ideal bir yöntem olmasını sağlamıştır. Bu yöntemler, proteinlerin elektroforetik ayrımına ve antijenlerin immünolojik reaksiyonlarına dayanmaktadır. Bu genetik işaretlerin ayrım gücünün düşük olması, bireyler arasında yeterli ayrımı sağlayamaması, çevresel koşullara dayanıksız olması, hem az miktardaki hem de her biyolojik materyalden sonuç alınamaması bu sistemlerin adli amaçlı kullanımını sınırlandırmıştır (31,32).

Polimorfik DNA genetik işaretlerinin kullanılmaya başlanması ile ilk olarak, RFLP (Sınırlı Parçacık Uzunluk Polimorfizmi) 1980'lerden 1990'ların ortasına kadar kullanılmıştır (33,34). Restriksiyon endonükleazları DNA'nın 4, 5 veya 6 bç uzunluğunda, bilinen nukleotit dizilerini tanıyıp, özel olarak bu noktalardan keser ve agaroz jel elektroforezi ile analizi yapılır (35). DNA parçacıklarının büyüklükleri genellikle nukleotit diziliminde polimorfizmler ile meydana gelen değişikliğe bağlı olarak varyasyon gösterir. RFLP tekniği ayırt etme gücü çok yüksek, son derece güvenilir ve etkin bir yöntem olmasına rağmen zahmetli olması, uzun sürmesi, radyoaktif madde ile temas gerektirmesi, yüksek kalitede ve degrade olmamış DNA'ya ihtiyaç duyması gibi birçok dezavantaja da sahiptir. (34). Söz edilen dezavantajlarından dolayı RFLP analizinin yerini Kary Mullis tarafından 1987 yılında geliştirilen DNA lokuslarının çoğaltılmasını sağlayan PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniği almıştır (36).

PCR yöntemi eser miktardaki DNA'nın hedef bölgesinin istenilen miktarda çoğaltılmasını sağlayan bir tekniktir (37). Adli olaylarda çeşitli delillerden elde edilen çok az miktarlardaki DNA'nın PCR tekniği ile çoğaltılabilmesi, delillerin değerlendirme oranını yükseltmiştir. Moleküler genetik alanında DNA teknolojileri ve PCR uygulamaları ile polimorfik özelliklerin analizindeki birçok zorluk ortadan kalkmıştır (38). Böylece DNA analiz yöntemleri konvansiyonel analiz yöntemlerinin yerini almıştır (1).

DNA analizleri; ilk olarak RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism-Sınırlayıcı Parça Uzunluğu Polimorfizmi), VNTR (Variable Number of Tandem Repeats-Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Dizileri, Minisatellitler), STR (Short Tandem Repeat- Kısa Ardışık Tekrar Dizileri, Mikrosatellitler), MiniSTR, mtDNA (mitokondriyal DNA) çalışmaları ve SNP (Single Nucleotide Polymorphism- Tek Nükleotid Polimorfizmi) çalışmaları şeklinde gelişim göstermiş ve adli örneklerin analizi için en avantajlı hale getirilmiştir. Son zamanlarda yapılan insersiyon/delesyon polimorfizmi (INDEL) çalışmaları yaygın olarak tıpta kullanılmasının yanında adli genetik alanında da kullanılmaya başlamıştır. Bu yöntemlerinde birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları vardır.

RAPD tekniği, DNA'nın rastgele seçilen 8-10 bp uzunluğundaki primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltılması sonucu bireyler arasındaki nükleotid dizisi farklılıklarının saptamasına dayalı yöntemdir. Uygulamanın kolay olması ve maliyetin düşük olması nedeniyle RAPD genetik işaretleri özellikle adli botanik çalışmalarında kullanılan yöntemlerden biridir. Bu genetik işaretlerin yüksek ayırma güçleri, tür içi çeşitliliğin saptanmasında büyük fayda sağlamaktadır (39).

AFLP tekniği, RAPD tekniği ile RFLP tekniğinin birleştirilmiş formu olup RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir. DNA'nın PCR'da çoğaltılması sonrasında sınırlama enzimleri tarafından kesilmesiyle oluşan DNA parçalarının denature poliakrilamid jel üzerinde gerek otoradyografik, gerekse floresan yöntemlerle görüntülenmesiyle geliştirilen genetik fingerprint tekniğidir. Sekans bilgisine ihtiyaç duymayan bu teknik, birbirine çok yakın genotipler arasındaki polimorfizmlerin saptanması için çok elverişlidir. AFLP-PCR, DNA'daki polimorfizmleri belirlemede duyarlı ve tekrarlanabilen bir yöntem olup popülasyon genetiğinde toplumlardaki küçük farklılıkların belirlenmesinde ve kimliklendirmede geniş ölçüde kullanılmaktaydı. Bu teknoloji, filogenetik çalışmalar ve DNA parmak izi çalışmalarında kullanılmıştır (40). Ancak poliakramid jel kullanımında ki uygulama zorlukları, uzun süren ve pahalı bir teknik olması bu yöntemin kullanımı da sınırlandırmıştır.

İnsan genomunun yaklaşık %3'ünü kaplayan ardışık tekrar dizileri, tekrar ünitelerinin sayısına ve tekrar dizisinin büyüklüğüne göre iki grupta sınıflandırılmıştır. Bu iki grup, minisatellitler (VNTR- Değişik Sayılarda Ardışık Tekrar Dizinleri) ve mikrosatellitlerdir (STR-Short Tandem Repeat) (41-43).

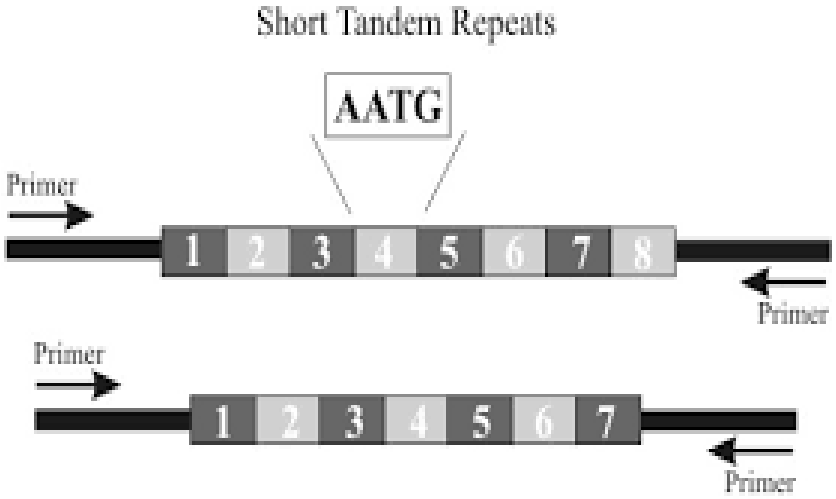
Alec Jeffreys ve arkadaşları tarafından ilk olarak 1985 yılında DNA üzerinde tekrar eden, VNTR olarak adlandırılan bazı bölgeler RFLP tekniği kullanılarak gösterilmiş ve bu bölgelerdeki tekrar sayısının da kişiden kişiye farklılık gösterdiği keşfedilmiştir. Böylelikle 'DNA parmak izi (DNA fingerprint)' tanımı ilk kez İngiliz genetikçi Alec Jeffreys tarafından yapılmıştır. Bugün bu tanım için 'DNA profili', 'Adli amaçlı DNA analizi' gibi tanımlamalarda tercih edilmektedir (29). Bu keşif sayesinde DNA ilk defa delil olarak mahkemelerde kabul edilmiştir (20).

VNTR'ler 6-100 bazlık DNA dizilerinin çoklu sıralı tekrarlarından oluşmuşlardır. VNTR bölgelerinin en önemli özelliği ardışık tekrar sayılarının ve tekrar birimlerindeki nükleotid dizilerinin değişiklik göstermesidir. Tekrar eden ünitelerin sayısı kişiler arasında büyük değişkenlik gösterir. VNTR'ler yüksek mutasyon hızına sahip, yüksek derecede polimorfik ve Mendel kalıtımı gösteren moleküler işaretlerdir (44,45). Bu lokuslar, çok sayıda farklı uzunlukta alele sahip olduklarından bireyleri birbirinden ayırt etme güçleri yüksektir. VNTR lokusları geçmişte adli örneklerin analizinde yaygın olarak kullanılmıştır (20). Adli amaçlı olarak kullanılan en yaygın VNTR lokusu D1S80'dir. Ancak VNTR'lerden DNA profili elde etmek için çok fazla emek, zaman, uzmanlık ve fazla miktarda DNA gerekmekteydi (41). Çok lokuslu VNTR'lerin analizinde de otomasyon sorunları ve özellikle karışım örneklerinin tiplenmesindeki gibi zorluklar nedeniyle yerini STR yöntemlerine bırakmıştır (46).

2.6.1. Kısa tekrar dizileri (STR)

Mikrosatellitler, kısa ardışık tekrarlar ya da basit dizi tekrarları olarak bilinirler. STR sistemleri VNTR'lerin alt biriidir. STR'ler 1990'ların başlarından itibaren kimliklendirme çalışmalarında kullanılmaya başlandı. STR'ler, genellikle 2-7 baz çifti uzunluktaki çekirdek ünitenin 5-30 kez ardışık tekrarından oluşan ve 100-400 bç uzunluğundaki DNA üniteleridir (47,48). Bu bölgeler insan genomunun her tarafına dağılmış olup, her 6-10 kb'de bir görülmektedir. İnsan genomunda yaklaşık olarak bir milyon STR lokusu bulunur ve kişiler arasında yüksek düzeyde polimorfizm gösterirler (49). STR'ler tekrar eden birimin uzunluğuna göre adlandırılırlar. Örneğin tekrar eden birim iki bazlık ise dinükleotid, üç bazlık ise

trinükleotid, dört bazlık ise tetranükleotid olarak adlandırılır. Genellikle 350 baz çiftinden uzun olmazlar. Adli DNA Analizlerinde kullanılan STR lokusları trinükleotid ve tetranükleotid dizileridir (12). STR'lerin VNTR ve RFLP'den farkı Şekil 4'te gösterilmektedir.

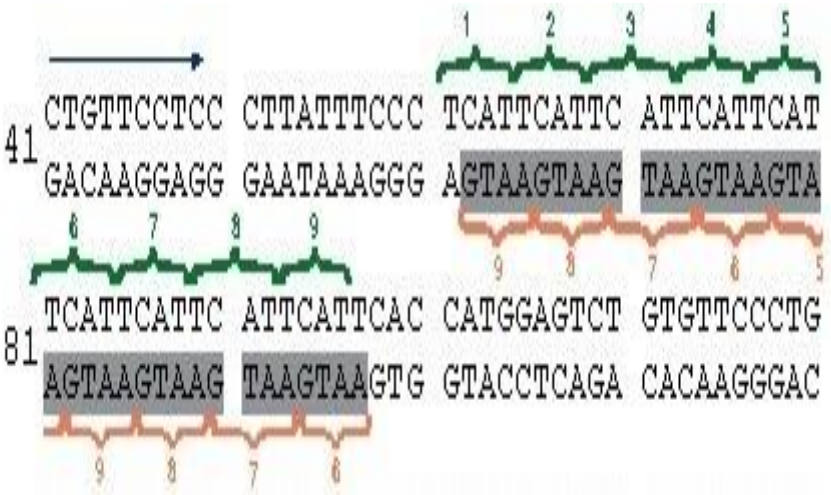


Şekil 4: STR oluşumu (50)

STR bölgeleri her zaman sadece tekrar ünitesinin belirli sayıda tekrarından oluşmayabilirler. Tekrar şekillerine göre STR'ler üç gruba ayrılırlar (12). Bunlar:

a. Basit STR'ler

Tekrar eden baz dizisinin sayısı ve sırası aynı olan STR lokuslarıdır. Ör: HumTH01 (Şekil 5)



Şekil 5: Basit STR (HumTHO1) (51)

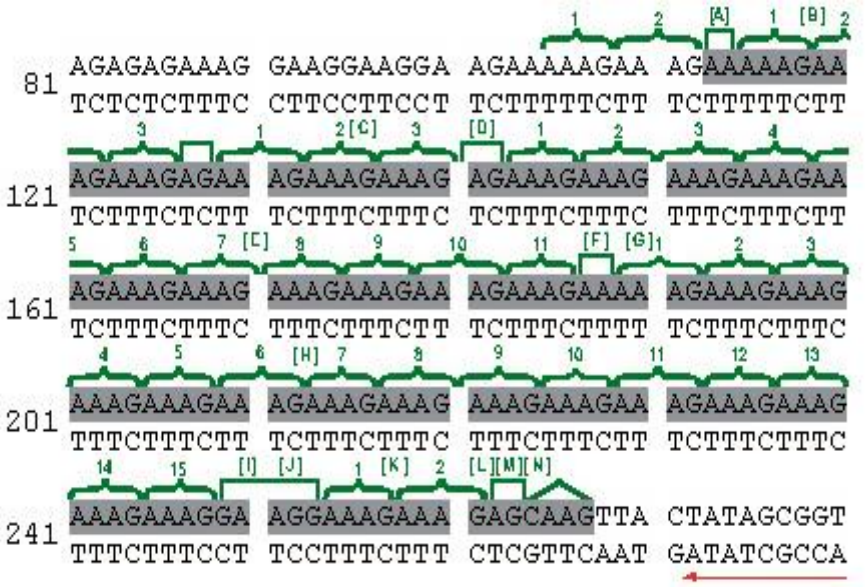
b. Bileşik STR'ler

İki ya da daha fazla sayıda tekrar ünitelerine sahip ve bu tekrar eden baz dizisinin sırası birbirinden farklı olan STR lokuslarıdır. Ör: D21S11 (Şekil 6)

Şekil 6: Bileşik STR (D21S11) (52)

c. Karmaşık STR'ler

Tekrar eden baz dizisi ve sayısı farklı olan birkaç tekrar ünitesine sahip lokuslardır. Üçüncü tip STR'ler alel adlandırmasında oluşan karışıklık sebebi ile genelde tercih edilmezler. Ör: SE33 (Şekil 7)



Şekil 7: Karmaşık STR (SE33) (53)

STR lokuslarında, tekrarlanan ünite sayısının ve baz çiftinin uzunluğundan kaynaklanan değişimlerin yanı sıra bazen aynı tekrar ünitelerinde nokta mutasyonları veya

insersiyon/delesyonlardan kaynaklanan baz dizisine ait farklılıklar da görülmektedir (54-56). Bu lokusların tekrarlanan ünite sayısının bireyden bireye farklı olmasından yararlanarak, adli amaçlı kimliklendirmede kullanılmaktadır.

2.6.1.1 STR'lerin adli bilimlerde kullanımı

STR'ler ilk kez 1991 yılında Edwards ve arkadaşları tarafından tanımlandıktan kısa süre sonra geniş kullanım alanı bulmuş ve birbiri ardına çok sayıda yeni STR lokusu tanımlanmıştır (47). VNTR lokuslarına göre ayrım güçlerinin düşük olması bir dezavantaj gibi görünüyor ise de genomda sayılarının fazla oluşu, yüksek oranda polimorfizim göstermeleri, analiz kolaylığı, düşük mutasyon oranı ve çok sayıda STR lokusunun multipleks olarak tek tüp içerisinde PCR ile kolayca çoğaltılabilmesi, floresans tespit sistemleri ile kapiler elektroforezde genotip tayini yapılabilmesi yani otomasyona uygunluğu STR'ların adli bilimlerde yaygın olarak kullanımını sağlamıştır (46,57).

STR lokuslarının yeni kullanılmaya başlandığı yıllarda her lokus tek tek çalışılmaktaydı, bu yöntem analiz maliyetini artırdığı ve uzun zaman aldığı için birden fazla lokusun aynı anda analizini sağlayacak kitler oluşturulmaya başlandı. Bu kitlerde kullanılan STR genetik işaretlerinin ayrım gücünün yüksek, mutasyon oranı düşük ve amplifikasyon hassasiyeti yüksektir. Pek çok ülkede STR bölgelerinin standardizasyonunu sağlamak için çalışmalar yapılmış ve ticari girişimler sonucu standart STR kitleri üretilmiştir. İlk ticari STR kit 1994 yılında Promega tarafından geliştirildi. Kit; CSF1PO, TPOX ve TH01 lokuslarını içermekteydi. CTT tripleks olarak adlandırılan bu bölgelerin aralarında akrabalık ilişkisi olmayan iki bireyde aynı genotipe rastlama olasılığı 1/500 idir. Daha sonra FSS- The Forensic Science Service tarafından geliştirilen dört lokusa (TH01, VWA, FES/FPS ve F13A1) sahip ilk nesil multipleksler (Quadruplex) yaklaşık 10 binde 1 karşılaşma olasılığına sahiptir (58,59).

Devam eden kapsamlı çalışmalar sonucu hem adli hem de genel popülasyon genetiği ile ilgili büyük veritabanları oluşturulmuştur. Bu veritabanlarının en önemlilerinden biri 1990 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde FBI tarafından kurulan CODIS (Combined DNA Index System) veri bankasıdır. Bu sistem olay yerinden alınan örneklerden elde edilen DNA profilinin sistemde kayıtlı profiller ile karşılaştırılarak şüpheliye ulaşmaya yardımcı olmaktadır. CODIS içinde FBI tarafından belirlenen 13 STR (CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11) lokusu yer almaktadır. Diğer bir önemli veritabanı ise; 1995'te İngiltere de Ulusal Veri Tabanı (The U.K. National

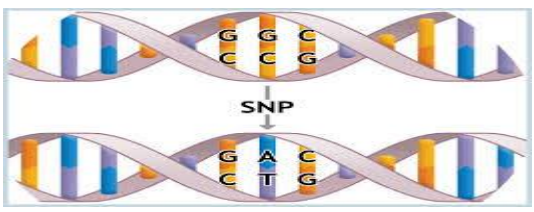
DNA Database-NDNAD) geliştirdiği 10 STR lokusu ve amelogenin içeren SGM (second-generation multiplex) Plus sistemin kullanıldığı veri tabanıdır (60).

Son yıllarda adli olgularda ve nesep tayininde kullanılan ayrım gücü daha yüksek kitler geliştirilmiştir. Bunlar, AmpF/STR Identifiler PCR Amplification (Life Technologies) ve PowerPlex (Promega) gibi kitlerdir. Ancak üretilen ve sıklıkla kullanılan bu STR kitleri ile örnekler degrade olduğunda genotip tayini yapılamamaktadır. Çünkü bazı STR lokusları (CSF1PO, D18S51, FGA ve D2S1138) uzun PCR ürünleri oluştururlar ve bu da genotiplemede sorunlara yol açmaktadır (61).

Bu sorunların çözümü için alternatif genetik işaretler geliştirilmiştir. Bunlardan biri mini-STR lokuslarıdır. Özellikle olay yerinden az ve degrade olarak gelen biyolojik delillerlerden STR lokusları ile tiplendirme yapılamadığı durumlar için geliştirilmiştir (61,62) . Ancak bu kitler de sadece 4-6 mini-STR'yi hedefledikleri için ayırım güçleri önemli derecede azdır. Mini-STR kiti ile yapılan PCR analizinde primerler hedef diziyi sekteye uğratacak şekilde diziye bağlanarak tamamlanmamış PCR ürünleri oluşturabilirler (63). Sözü geçen alternatif yöntemlere rağmen ileri düzeydeki degrade örneklerde yine de sorun yaşanabilmektedir. Bu nedenle son yıllarda özellikle degrede ve daha kısa PCR ürünlerinde sonuç veren SNP (tek nokta polimorfizmi), diğer genetik işaretlere göre daha güçlü bir alternatif olmuştur (64,65).

2.6.2. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP)

SNP, herhangi bir organizmanın genomunda tek bir nükleotid değiştiğinde veya insersiyon ya da delesyon oluştuğunda ortaya çıkan DNA dizi varyasyonlarıdır. SNP'lerdeki bu tek nükleotid değişimi transisyonlar ve transversiyonlar sonucu oluşmaktadır. Transisyonlar bir pürin bazın (A,G) diğer bir pürin bazına veya bir pirimidin bazın (C,T) diğer pirimidin bazına değişmesidir. Transversiyonlar ise bir pürin bazının bir pirimidin bazına veya pirimidinin purine değişimidir. Değişimlerin %25'ni Guanin-Adenin ve Sitozin -Timin transisyonları oluşturmaktadır (63). SNP oluşumu Şekil 8'de gösterilmektedir.



Şekil 8: SNP oluşumu (66)

SNP'ler bialelik, trialelik ve tetraaleliktir. Ancak insanlarda -tri ve -tetra alelik hemen hemen yoktur, daha çok bialellik şeklindedir (27). Tek nükleotid değişiminin bir popülasyondaki sıklığı %1 'den büyükse bu değişim SNP, %1'den küçük ise mutasyon olarak adlandırılmaktadır. Tüm insan genomunun yaklaşık 3.2 milyon baz ve her 100-300 bazda açığa çıkan, genomun hem kodlama yapan hem de yapmayan bölgelerinde görülen SNP'lerin yaklaşık 10 milyon olduğu düşünüldüğünde, iki genom arasında SNP' lerden dolayı yaklaşık 1 milyon farklılık olacağı ve dolayısıyla insan genetik varyasyonunun % 85'inin SNP'ler nedeniyle oluştuğu görülmektedir (67). Bu yüzden SNP'ler en sık rastlanan ve en fazla bulunan polimorfizim tipidir.

SNP'ler nesilden nesile çok fazla değişmediklerinden evrimsel açıdan da kararlıdırlar. Bu nedenle popülasyon çalışmalarında SNP genetik işaretleri kullanılmaktadır. Adli genetikte babalık ve kimliklendirme testlerinde, biyocoğrafik soy tayininde ve fenotip belirteçleri olarak kullanılmaktadırlar. SNP verilerilerinin uygulandığı diğer alanlar; Tanı ve risk profillemesinde, aday gen tayini ve haritalamada, polimorfizm tayininde, epidemiyolojik araştırmalarda, farmakogenetik çalışmalarda, çevresel uyaranlar, ksenobiotikler ve diyete yanıt araştırmalarında kullanılmaktadır. Bu alanlardaki çalışmalar uluslararası kuruluşların kurulmasını ve projelerin başlamasını sağlamıştır (68).

İnsan genomunun haritalanması ile birlikte, insanlar arasındaki % 0.1 lik fark belirlenmiş ve SNP polimorfizmlerini gösteren bir haplotip haritası da geliştirilmiştir. "HapMap" adı verilen bu harita insanın genetik yapısındaki farklılıkları ortaya koymayı amaçlamaktadır. Elde edilen veriler SNP'lerle bağlantılı pek çok hastalığı ortaya çıkaracak böylece bu hastalıkların erken teşhis ve tedavisine olanak sağlanacaktır. Ayrıca bu verilerden de yararlanarak hangi varyasyonun hangi bölgede ya da hangi ırkta daha fazla görüldüğü gibi bilgilere de ulaşılabilir (69).

Günümüzde insan SNP'lerini kapsamlı araştırmalarla çalışan "The Single Nucleotide Polymorphism Database" (dbSNP) adlı veri tabanı bulunmaktadır. Bu veri tabanı insan dâhil olmak üzere pek çok türün (yaklaşık 55 tür) genomik DNA'larındaki SNP'lerini tüm detaylarıyla (deney, keşif aşamaları, PCR koşulları vb.) içeren bir arşivdir. Ayrıca bu arşivde sadece SNP'ler değil aynı zamanda ardışık kısa tekrar eden diziler (STR'ler), delesyon, insersiyon polimorfizmleri ve multinükleotid polimorfizmleri de yer almaktadır (69).

2.6.2.1 SNP'lerin adli bilimlerde kullanımı

Son yıllarda adli bilimlerde SNP'lerin kullanım alanı gün geçtikçe daha çok artmaktadır. Bunun nedeni sahip oldukları bir takım özellikleridir. Bunlardan birincisi yüksek derecede bozulmuş materyallerde başarılı sonuçların alınmasıdır. SNP'lerin PCR ürünlerinin büyüklükleri 100 bç'den küçüktür. SNP'ler tek bir pozisyonda bulundukları için PCR'la çoğaltılmaları sırasında tamamlanmamış uzama ürünleri oluşmaz. Bu nedenle degrade örneklerde SNP analizleri tercih edilir (64,65,70) .

SNP' lerin ikinci özelliği ise, düşük mutasyon oranlarına sahip olmalarıdır. Bu yüzden nesep tayinlerinde daha güvenli kullanılabilmektedir. Örneğin klasik bir 13 CODIS STR lokusunun çalışıldığı babalık davasında, herhangi bir lokusta baba ve oğlunun paylaştıkları aleller uyumsuzsa bu durum o kişinin baba olmadığını gösterir. Ancak küçük bir olasılık da olsa STR'lerin yüksek mutasyon oranı sonucunda böyle bir durum meydana gelmiş olabilir (63). Babalık araştırmalarında baba ve çocuk arasındaki tek lokustaki uyuşmazlık görülme oranı olgularda yaklaşık olarak % 3,9 iken 52 SNP incelendiğinde ise baba ve çocuk arasında bir genetik uyuşmalık görülme olasılığı % 0,0006'dır (63,71).

SNP'lerin üçüncü özelliği ise, artefakt yani istenmeyen piklerin oluşmamasıdır. STR tiplemesinde, karışık ve tek kaynaklı örneklerin ayrımında stutter artefaktı DNA tiplemesi yapılırken yanılgıya sebep olabilir (72) .

Çok sayıda SNP lokusunun sadece bir analizle belirlenmesini sağlayan teknolojiler SNP'lerin uygulanmasını kolaylaştırmaktadırlar. SNP analizleri özellikle otomatize sistemlerde kullanılabilmektedir. Bu da zaman ve maliyet açısından kazanç sağlamaktadır (73).

SNP' lerin bütün bu avantajlarına rağmen bazı dezavantajları da söz konusudur. Bir SNP lokusunun bir STR lokusuna göre ayrım gücü daha düşüktür. Çünkü bir SNP lokusu iki alel içerirken bir STR lokusu 8-15 farklı alel içerebilir. Ortalama 5 SNP'nin sağladığı ayırım gücü 1 STR lokusuna eş değerdir. Bu nedenle yüksek ayrım gücüne ulaşabilmek için fazla miktarda SNP lokusuna ihtiyaç vardır (74).

İkinci dezavantajı ise bir ya da daha fazla kişinin DNA'sının bulunduğu karışım örneklerinde SNP ile kimliklendirme yapmak oldukça zordur (32). Üçüncü dezavantajı, şu ana kadar çeşitli ulusal adli DNA veri bankalarında olay yerlerinden elde edilmiş binlerce biyolojik

delile ait DNA profilleri ve tutuklanan suçluların profilleri STR lokusları ile oluşturulmuşur (63). SNP ve INDEL gibi yeni yöntemlerin kullanımına geçildiği takdirde bu profillerin tümünün yeniden çalışılması gerekecektir.

Genetik varyasyonları belirlemek için yapılan çalışmalar daha çok SNPler üzerinde yoğunlaşmış olsa da INDEL gibi alternatif genetik varyasyonlar üzerine de çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Yine de gelişen ve kendini sürekli yenileyen teknoloji ile bugün kullanılan STR ve SNP'ye alternatif İNDEL lokuslarının da kullanılacağı düşünülmektedir.

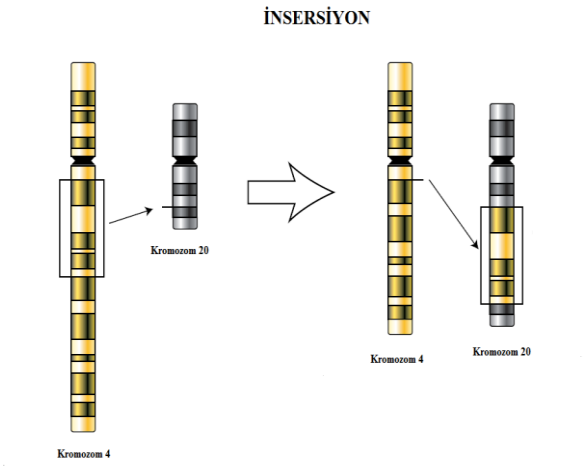
2.7. INDEL (İnsersiyon/Delesyon)

İnsersiyon/delesyon veya yaygın olarak INDEL adı verilen genetik varyasyonlar, DNA'da dizisine nükleotid dizisinin eklenmesi ya da çıkması şeklinde oluşur. Baz dizisinin eksilmiş olduğu versiyonuna delesyon, baz eklenmesi sonucu oluşan formuna ise insersiyon adı verilmektedir (75). DNA'da meydana gelen İnsersiyon/delesyonlar sonucu mutasyonlar ve polimorfizmler oluşur. DNA'daki nükleotid değişiklikleri fenotipi etkiliyor ise mutasyon olarak adlandırılır ve kalıtsal hastalıkların oluşumundan sorumludurlar. Bu değişiklikler fenotipi etkilemiyor sadece genetik çeşitlilik sağlıyor ise polimorfizm olarak adlandırılmaktadır (12). Polimorfizm ardışık mutasyonlar sonucunda meydana gelir. Polimorfizm sonucu meydana gelen farklılıklar kuşaktan kuşağa Mendel yasalarına göre aktarılırlar. Polimorfik bir sistemin adli bilimlerde identifikasyon amaçlı kullanılabilmesi için o sistemin popülasyonda en az %1 sıklıkta görülmesi gereklidir. %1 sıklıktan daha az görülen genetik değişiklikler mutasyon olarak kabul edilir (23).

2.7.1. İnsersiyon (Eklenme)

İnsersiyon genetikte bir DNA dizisine bir veya daha çok baz çiftinin eklenmesidir. İnsersiyonların bir genin protein kodlayan bölgesinde meydana gelmesi hastalıklara neden olabilir. Eğer eklenen nükleotidlerin sayısı 3 ten fazla ya da az ise (bir kodondaki nükleotit sayısı) genin normal okuma çerçevesinde bir değişim (çerçeve kayma mutasyonu) meydana gelir. Çerçeve kayması mutasyonları, mutasyonu izleyen genin kodladığı tüm aminoasitlerin değişmesine neden olur. Bunun sonucunda oluşan proteinler genelde bozuk ya da işlevsizdirler. İnsersiyonun olduğu gene bağlı olarak çeşitli genetik bozukluklar meydana gelir. Eğer eklenen nükleotit saysı üçün katları şeklindeyse insersiyon sonucu okuma zinciri değişmezse çerçeve içi insersiyon meydana gelmiş olur. Bu durumda protein yapısı bozulmaz Ancak, insersiyonun

büyüklüğüne bağlı olarak üretilen proteinin işlevini değiştirebilecek yeni amino asitler eklenmiş olabilir. Kromozom seviyesinde insersiyon terimi ise, kromozoma uzun bir dizinin eklenmesi anlamında kullanılır. Kromozomun bir bölümünün veya tamamının insersiyona uğraması çeşitli öldürücü genetik hastalıklara neden olabilir (76-79). İnsersiyonun oluşumunu Şekil 9'da gösterilmektedir.

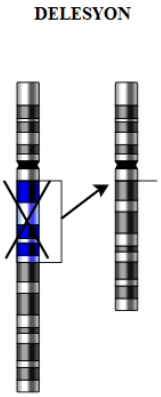


Şekil 9: İnsersiyon oluşum şekli (80)

2.7.2. Delesyon (Çıkarma)

Delesyonlar, bir kromozomun bir parçasının kopup, kaybolmasıyla meydana gelen kromozom anomalilerdendir. Mayoz bölünme sırasında dengesiz krossing over olmasının bir sonucu olarak da delesyon meydana gelebilir. Delesyon çerçeve kayma mutasyonu oluşturabilir (81). Kopan parçadaki genler kaybolur yani eksilir. Bunun sonucunda kopan parça başka bir kromozoma bağlanmaz, sentromerleri olmadığı için de hücre bölünmesine katılamaz. Sitoplazma içerisinde kalan kromzom parçası enzimlerin etkisiyle kendini oluşturan ana birimlere kadar parçalanır ve kaybolur. Hücre diploid ise, kaybolan genlerin allelleri kardeş kromozom üzerinde bulunacağından öldürücü olmaz fakat gen dengesinin ve fenotipin değişmesine sebep olur. Eğer gen parçaları büyükse gen dengesi bozulur ve ciddi genetik hastalıklara neden olur (81,82). Delesyon oluşumu Şekil 10'da gösterilmektedir.

Delesyon sonucu oluşan genetik hastalıkların en yaygın olanı, 5. kromozomun kısa kolunda meydana gelen ve 50,000 canlı doğumda bir görülen "kedi çığlığı sendromu" olarak da bilinen Cri du Chat sendromudur. Kedi çığlığına benzer ağlama, bazı mental gerilikler ve kısa hayat olarak etkisini gösterir (81).



Şekil 10: Delesyon oluşum şekli (83)

INDEL'ler genel anlamda iki şekilde sınıflandırılırlar.

a. Küçük INDEL'ler:

Küçük INDEL'ler sadece birkaç bç'lik uzunluktaki dizinlerdir. HGMD (İnsan Gen Mutasyon Veri Tabanı/ Human Gene Mutation Database)'de hastalıkların %24'ünü mutasyon oluşturur, küçük INDEL'ler daha çok hastalıklarla ilgili varyasyonları oluşturur. Bunun nedeni, genin kodlama bölgesinde INDEL dizinin okumada bozulmaya neden olması ve protein dizisinin değişmesine yol açasıdır (84).

b. Büyük INDEL'ler:

Büyük INDEL'ler birkaç kilobaz (kb) uzunluğu aşan dizinlerdir. Bu tip varyasyonlar genomda sanılanın aksine sıklıkla görülmektedir (85). Adli kimliklendirmede kullanılan ve SNP polimorfizmi kadar olmasa da genom içinde 1000'den fazla bilinen INDEL'ler bu varyasyonlardan oluşmaktadır (86). Ayrıca mutasyona bağlı hastalıkların %5'i İnsan Gen Mutasyon Veri tabanında (Human Gene Mutation Database, HGMD) büyük indeller veya yapısal varyasyonlar olarak raporlanmıştır (87).

2.8. İnsersiyon/Delesyon (INDEL) Polimorfizmi

İnsan DNA'sındaki polimorfizmin büyük çoğunluğunu oluşturan nükleotid değişimi (SNPler) ve bir veya daha fazla nükleotidin insersiyonu ve delesyonuna dayalı polimorfizmler olarak iki gruba ayırmak mümkündür (88).

Bunlar nokta mutasyonları ve çerçeve kayması mutasyonları şeklinde oluşan kalıtımsal değişimler meydana getirirler. Nokta mutasyonunda sadece bir baz mutasyona uğrar ve Tek Nükleotid Polimorfizmini (SNP, Single Nüleotid Polymorfizm) oluştururlar. Çerçeve kayması mutasyonu, baz dizisinin insersiyonu (eklenmesi) veya delesyonu (çıkması) şeklindedir. INDEL' ler STR'lerde tekrarlanan ünite sayısının ve baz çiftinin uzunluğundan kaynaklanan değişimlerin yanı sıra bazen aynı tekrar ünitelerinde nokta mutasyonları veya insersiyon/delesyonlardan kaynaklanan baz dizisi farklılıklarına da neden olur (55,54).

Tüm insan genomunun yaklaşık 3.2 milyon baz olduğu ve tahminlere göre yaklaşık 2700 bazda bir ortaya çıkan, hem kodlama yapan hem de yapmayan bölgelerinde yaklaşık 1 milyon SNP olduğu düşünülmektedir. Mills ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları çalışmayla insan indel varyasyon haritasını çıkararak 7.2 kb'da bir görüldüğünü genomda en sık rastlanan ikinci polimorfizim şekli olduğunu bildirilmişlerdir (89). Bu da bilinen 15 milyon genetik varvasyonun 3 milyonunun INDEL'lerin oluşturduğunu gösterir. İndellerin %36'sı promoter bölgede, intronlarda ve eksonlarında yerleşmiştir (89, 90).

Genetik varyasyonları belirlemek için yapılan çalışmalar daha çok SNP'ler üzerinde yoğunlaşmış olsa da son yıllarda INDEL polimorfizmi üzerinde de çalışmalar yapılmaktadır . Özelliklede Marshfield Tıp Araştırma Vakfında, James Weber ve arkadaşlarının insan genomu üzerinde 2000'in üzerinde dialelik insersiyon/delesyonu karakterize etmesiyle, dialelik indellerin insan polimorfizminin %8'ini oluşturdoğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda toplamda %71 INDEL 'in aleller arasında 2, 3, veya 4 nükleotid uzunluk farkı varken sadece %4'ünde 16 nükleotid uzunluk farkı çıkmıştır (88).

SNP haritalarına INDEL'lerin eklenmesi genom genetik haritaların çözünürlüğünün artırılmasına ve hastalığa neden olan lokuslardaki yerinin bulunmasına yardımcı olabilir. Bu da insan kimlik tespiti dahil olmak üzere, gelecekte genetik çalışmalarda INDEL'lerin yaygın bir şekilde kullanılacağını gösterir (91). İNDEL'lerin heterozigotluk oranının yüksek olması, dışlama ve ayrım gücünün yüksek olması ayrıca bozunmuş ve eser miktardaki örneklerde başarılı tiplendirme yapılabilmesinden dolayı yeni nesil genetik varyasyonlar olan INDEL'ler üzerine daha birçok çalışma yapılacağı düşünülmektedir. İnsersiyon-delesyon polimorfizim çalışmaları; günümüzde adli kimliklendirmede DNA profillemesinde kullanılan SNP ve STR polimorfizmine alternatif oluşturacağı düşünülmektedir (91).

2.9. Investigator® DIPplex Kiti

Investigator® DIPplex Kiti 30 INDEL lokusu ile amelogenin lokusunu tek PCR reaksiyonunda çoğaltabilmektedir. Investigator® DIPplex Kiti Şekil 11'de, kit içeriği ise Tablo II'de gösterilmektedir. Özellikle degrade örneklerin kimliklendirmesi ve antropolojik çalışmalar için önerilmektedir (92).

Şekil 11: Investigator® DIPplex Kit (92)

Tablo II. 100 PCR reaksiyonu için kit içeriği (92)

PCR Bileşeni	Miktar
Reaksiyon Mix A*	500 µl
Primer Mix DIPplex karışımı	500 µl
Multi Taq2 DNA Polimeraz	150 U
Nuclease-free water (Distile su)	2 x 1.9 ml
Kontrol DNA (9948 kodlu pozitif kontrol DNA)	200 µl

*Reaksiyon Mix: dNTP, $MgCl_2$ ve BSA içermektedir.

Investigator® DIPplex Kit el kitabında, PCR reaksiyonunda optimum sonuç elde etmek için 0.2-0.5 ng/µl miktarda DNA kullanılması önerilmektedir. Kitte kullanılan primerler, Matriks Standart BT5 ve dört floresans boya içeren (6-FAM, BTG, BTY, BTR) size standart BTO farklı floresan boyalar ile işaretlenmiştir (Tablo III) (92).

Tablo III. Qiagen Investigator® DIPplex kitine ait lokusların floresan boyaları (92)

Floresans Boya	**Sinyal Rengi**	**Qiagen Investigator® DIPplex Kit Lokusları**
6-FAM	Mavi	Amelogenin X/Y, HLD77, HLD45, HLD131, HLD70, HLD6, HLD111, HLD58, HLD56
BTG	Yeşil	HLD118, HLD92, HLD93, HLD99, HLD88, HLD101, HLD67
BTY	Siyah/Sarı	HLD83, HLD114, HLD48, HLD124, HLD122, HLD125, HLD64, HLD81
BTR	Kırmızı	HLD136, HLD133, HLD97, HLD40, HLD128, HLD39, HLD84

Kitte 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 kodlu primerler mix halinde bulunmaktadır (Tablo IV) (92).

Tablo IV. 30 INDEL PCR primerleri (92)

PCR primerleri	**Kromozom Lokasyonu**	**GenBank erişim/ID**	**Motif (+DIP)**	**+/-**
Amelogenin X	Xp22.1-22.3	M55418		**X**
Amelogenin Y	Yp11.2	M55419		**Y**
HLD77	7q31.1	rs1611048	TAAG	+
HLD45	2q31.1	rs2307959	CACG	-
HLD131	7q36.2	rs1611001	TGGGCTTATT	+
HLD70	6q16.1	rs2307652	AGCA	-
HLD6	16q13	rs1610905	GCAGGACTGGGCACC	-
HLD111	17p11.2	rs1305047	CACA	-
HLD58	5q14.1	rs1610937	AGGA	+

HLD56	4q25	rs2308292	TAAGT	+
HLD118	20p11.1	rs16438	CCCCA	-
HLD92	11q22.2	rs17174476	GTTT	-
HLD93	12q22	rs2307570	ACTTT	-
HLD99	14q23.1	rs2308163	TGAT	-
HLD88	9q22.32	rs8190570	CCACAAAGA	+
HLD101	15q26.1	rs2307433	GTAG	-
HLD67	5q33.2	rs1305056	CTACTGAC	-
HLD83	8p22	rs2308072	AAGG	-
HLD114	17p13.3	rs2307581	TCCTATTCTACTCTGAAT	-
HLD48	2q11.2	rs28369942	GACTT	-
HLD124	22q12.3	rs6481	GTGGA	-
HLD122	21q22.11	rs8178524	GAAGTCTGAGG	-
HLD125	22q11.23	rs16388	ATTGCC	-
HLD64	5q12.3	rs1610935	GACAAA	+
HLD81	7q21.3	rs17879936	GTAAGCATTGT	-
HLD136	22q13.1	rs16363	TGTTT	-
HLD133	3p22.1	rs2067235	CAACCTGGATT	
HLD97	13q12.3	rs17238892	AGAGAAAGCTGAAG	-
HLD40	1p32.3	rs2307956	GGGACAGGTGGCCACTAGGAGA	+
HLD128	1q31.3	rs2307924	ATTAAATA	-
HLD39	1p22.1	rs17878444	CCTAAACAAAAATGGGAT	-
HLD84	8q24.12	rs3081400	CTTTC	-

2.10. Adli Genetikte Biyoistatistik Hesaplamalar

Biyoistatistik, biyolojik araştırmalarda nedensellik varsayımlarının geçerliliğini, araştırma yöntem bilimi ilkeleri çerçevesinde ve istatistik biliminin olanaklarından yararlanarak değerlendirmeyi sağlayan bilim dalıdır (93). Genetik çeşitliliği sağlayan süreçte genom büyüklüğü ve DNA dizisinde meydana gelen değişiklikler olduğu için popülasyon genetiği analizlerinde matematiksel ve istatistiksel metotlar kullanılarak genetiksel değişimin sayısal hesaplanması gerekmektedir (94).

Moleküler biyoloji ve genetik alanında kaydedilen hızlı gelişmeler ve elde edilen bu verileri etkili bir şekilde kullanabilmek ve anlayabilmek adına bilgisayar yardımı alarak uygun istatistiksel metotlarla analiz edilmesi için yeni bir disiplin doğmuştur. Biyoinformatik olarak adlandırılan bu disiplin bilgi teknolojilerinin yardımıyla biyolojik verilerin analiz edilmesini sağlayan uygulamaları kapsar (94).

2.10.1. Alel frekansı ve Hardy-Weinberg dengesi

Adli istatistikte popülasyon incelemeleri yapılırken lokusların alel frekansları, beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerleri ve Hardy-Weinberg (HWD) dengesi araştırılmalıdır. Alel sıklıkları popülasyonlar arasında farklılık gösterir. Bu farklılık birbirine yakın olan popülasyonlarda uzak olanlara oranla daha azdır (95). Alel frekanslarının hesaplanması için toplumu temsil eden ve birbiri ile akrabalık ilişkisi bulunmayan rastgele seçilmiş en az 100 bireyin DNA tiplemesi yapılır. Örneklerin lokus başına beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerleri ve Hardy-Weinberg dengesi aşağıdaki formüllere göre manuel olarak hesaplanabilir ya da çeşitli biyoinformatik uygulamalar ile hesaplanabilir.

Hardy-Weinberg dengesine göre; popülasyonlarda bir karakterden sorumlu alellerin toplamı popülasyon içindeki o genin tamamına yani %100'üne eşittir ve bir karakterden sorumlu alellerin toplamı 1'e eşittir. p dominant karakteri, q resesif karekteri temsil eder ve (p+q)=1'dir. Bireylerin genotip p ve q alellerini taşıyan sperm ile yumurtanın döllenmesi sonucu oluşur. Bu nedenle p2+2pq+q2=1 olur(96).

A alellinin görülme frekansı (p) = f(AA) + ½ f(Aa)

B alellinin görülme frekansı (q) = f(BB) + ½ f(Bb)

AA beklenen heterozigotluk değeri (He) = p2 X N

BB beklenen heterozigotluk değeri (He) ve q 2 X N

AB beklenen heterozigotluk değeri (He)= 2pq X N

P değerinin anlamlılığının değerlendirilmesinde;

P≤0.05 ise, sapma önemlidir ve popülasyonda denge yoktur.

P≥0.05 ise, sapma istatistiksel olarak anlamlı değildir ve popülasyon dengededir.

Bu yasa toplumların dengede kalabilmesi için gerekli koşulları belirler. Bu yasaya göre; popülasyonların yeteri kadar büyük, evlenmelerin rast gele olduğu, doğal seçilim, göç, mutasyon gibi evrimsel etkilerin mevcut olmadığı durumda alel ve genotip frekansları nesiller boyu değişmez ve popülasyon dengede kalır. Ancak toplumda bulunan zararlı ya da yararlı resesif bir gen için hem homozigot hem de heterozigot kişiler bulunur. Eğer toplumdaki kişiler rastgele değil de örneğin homozigot homozigotlarla, heterozigotlar heterezigotlarla evlenecek olursa homozigotların sayısı artacak ve Hardy-Weinberg denkliği bozulacaktır (97). Bu dengeyi gösteren p değeri, sadece bir popülasyon için bakılabileceği gibi popülasyonlar arası karşılaştırmada da kullanılır.

2.10.2. Adli istatistik parametreleri

Adli istatistikte DNA molekülünün tamamının baz dizini incelenip sadece belirli lokusların özellikleri karşılaştırıldığında, rastlantısal benzerliğin istatistiksel olarak hesaplanmasını gerekir. Bu lokusların PD (power of discrimination/ayrım gücü), PM (probability of match/ eşleşme olasılığı), PIC (polymorphism information content/polimorfik bilgi içeriği), PE (power of exclusion /dışlama gücü), TPI (typical paternity ındex /tipik babalık indeksi) hesaplanarak her bir lokusun olgu çözümündeki gücü belirlenir. Bu hesaplamalar için aşağıdaki formüller (Tablo V) ve Promega Powerstats Excel gibi uygulamalar kullanılabilir.

Tablo V. Adli istatistik parametrelerin formülleri (97)

Adli İstatistik Parametresi	Formül
Ayrım Gücü	$PD = 1 - \sum_{i=a}^{n} G_i^2$
Eşleşme Olasılığı	$PM = \sum_{i=a}^{n} G_i^2$
Polimorfik Bilgi İçeriği	$PIC = 1 - \sum_{i=a}^{n} \sum_{j\geq i}^{n} P_{ij}^2 - \left(\left(\sum_{i=a}^{n} \sum_{j\geq i}^{n} P_{ij}^2 \right)^2 + \sum_{i=a}^{n} \sum_{j\geq i}^{n} P_{ij}^4 \right)$
Dışlama Gücü	PE=h2(1-2*h*H2)
Tipik Babalık İndeksi	TPI=(H+h)/2H

H=Homozigotluk, h=heterizigotluk, Gi= genotip kombinasyonlarının frekansı, Pi= alel kombinasyonlarının frekansı

2.10.3. Popülasyonlar arası farklılaşma (F_{ST} değerleri)

Popülasyon genetiği alanının temel konularından biri de toplumlar arası farklılaşmadır. FIT, FIS, FST gibi fiksasyon indeksleri hesaplanarak toplumlar arasındaki genetik farklılaşma ölçülebilmektedir. Bu indeksler Wright tarafından 1965'te geliştirilmiştir (98). F istatistiği genetik varyasyonu; tüm popülasyonlar ve bireyler bazında inceler. Bu değerler beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerlerine göre belirlenir (99). Fst alt popülasyondan rastgele seçilen iki gametin kolerasyonunun sıfıra yaklaşım durumudur. Fst değeri 0 ile 1 arasında değer alır. Alt popülasyonlar birbirinden farklılaşmış ve aralarında gen akımı yoksa Fst değeri 1'e yakın olur.

Eğer FST değeri;

0.00 - 0.05 arasında bir değer ise küçük bir genetik farklılaşma;

0.05 - 0.15 arasında bir değerse orta düzeyde farklılaşma;

0.15 - 0.25 arasında bir değerse büyük bir genetik farklılaşma

0.25'ten büyük değerler ise çok büyük bir genetik farklılaşmanın olduğu söylenebilir (99).

F_{ST} formulü aşağıdaki gibidir:

$$FST = \frac{HT - HS}{H_T}$$

F_{ST} = Popülasyonlar arası standardize varyans, H_S= Alt popülasyonlarda beklenen heterozigotluk ortalaması, H_T=Toplam popülasyonlardaki heterozigotluk ortalaması (99).

Tüm örnek popülasyonlarının popülasyonlar arası farklılaşmanın (F_{ST}) hesaplanması Arlequin v.3.5.1.2 programı ile yapıldı. Bulunan FST değerleri ile Mega 5.1 programında "komşu birleştirme" yöntemi kullanılarak filogenetik ağaç çizildi.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan Türkiye'nin tüm bölgelerini yansıtacak şekilde çalışmaya rıza gösteren sağlıklı 250 kişiden (aydınlatılmış onam formu: Ek 1) alınan kan örnekleri kullanıldı.

Yapılan çalışmada Investigator® DIPplex Kit (Qiagen) kullanılarak otozomal kromozomlar üzerinde bulunan 30 INDELs (Amelogenin X, Amelogenin Y ve 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) lokusu çalışılarak tiplendirildi. Çalışmanın tüm aşamaları İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü öğrenci laboratuarında gerçekleştirildi. Çalışma sırasında kontaminasyon riskini önlemek için gerekli tüm önlemler alındı ve çalışmanın her aşamasında tek kullanımlık eldiven, bone ve maske kullanıldı.

250 kişide 30 indel lokusunun profilleri çıkarıldıktan sonra elde edilen verilerle istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Bunun için Arlequin v.3.5.1.2, MEGA 5.20 yazılım programları, GENETİX v.4.05.2 dosya formatı çevirici program ve diğer istatistiksel hesaplamalar için Promega PowerStats excel dosyası kullanıldı.

3.1. Deneyde Kullanılan Cihazlar

- Derin Dondurucu (Arçelik 2031D)
- Buzdolabı (Sharp SJ-PT69R)
- Otomatik Pipet (2,5 µl) (20 µl) (100 µl) (1000µl) (Eppendorf)
- Vorteks (Nüve Mixer Uzusio VTX-3000L)
- Mikro santrifüj (ALC PK 121C)
- Termomikser (Wealtec corp)
- Etüv (Nüve en-SCO)
- Agaroz jel elektroforez sistemi (Bio rad. Power Pac 3000)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Biometra/Biodoc Analyze)
- Florometre cihazı (Invitrogen/Fluorometer Qubit)
- Isı Döngü Cihazı (GeneAmp PCR System 9700) (Life Technologies)
- Bilgisayar kontrollü genetik analizör 3130 (ABI PRISM®3130) (Life Technologies)

3.2. Deneyde Kullanılan Ticari Kitler

- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)
- Quant-iT^{TM} HS dsDNA HS Assay (Invitrogen)
- Investigator® DIPplex Kit (Qiagen)

3.3.Kapiler Elektroforez Aşamasında Kullanılan Kimyasallar

- Hi-Di Formamid (Life Technologies)
- DNA Size Standard 550 / BTO (Life Technologies)
- Alelik Ladder DIPplex (Investigator® DIPplex Kit-Qiagen)
- Matriks Standard (BT5) (6-FAM, BTG, BTY, BTR, BTO) (Life Technologies)
- Polimer (Pop-4, Performance Optimized Polymer)
- 10X EDTA tamponu (Life Technologies)

3.4. Deneyde Kullanılan Kit Dışı Kimyasal Maddeler

- Etanol (%96'lık)
- TBE çözeltisi (Tris-Borik asit-EDTA)
- Loading Dye (6X Takara)
- Agaroz (PeqGold)
- Etidyum Bromür (EtBr)

3.5.Deneyde Kullanılan DNA Örnekleri

Bu çalışmada aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan Türkiye'nin tüm bölgelerini yansıtacak şekilde sağlıklı İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü öğrencileri ve çalışanları (90), İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü'ne babalık tayini için başvurmuş (35) ve enstitü dışı gönüllülerden alınan kan örneklerinden (125) bilimsel çalışmalarda kullanılmasına rıza gösterip onam veren toplamda 250 kişinin DNA'sı üzerinde çalışılmıştır. (aydınlatılmış onam formu: Ek 1) alınan örnekler kullanıldı. Bu çalışma İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulunca uygun görüldü (Ek 2). Kan örnekleri İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarları'nda EDTA'lı tüplerde kontamine olmayacak koşullarda -20 derecede saklandı. Ayrıca uluslararası makalelerden ve 1000 Genome INDELs verilerinin bulunduğu Ensemble (www.ensemble.org) (75) veri bankasından alınan popülasyon verileri

referans örnekler olarak istatistiksel hesaplamalarda kullanıldı. Çalışmada kullanılan tüm örnekler, kaynakları ve sayıları Tablo VI'da listenmiştir.

Tablo VI. Çalışmada kullanılan popülasyonlar

Popülasyon Adı	Örnek Sayısı	Örnek Kaynağı
Türkiye	250	Türk toplumu
Güney Kore (Asya)	373	Web online*
Tayvan (Asya)	126	Web online*
Kuzey Doğu İtalya (Avrupa)	200	Web online*
Polonya (Avrupa)	122	Web online*
Finlandiya (Avrupa)	151	Web online*
Somali (Afrika)	175	Web online*
Avrupa (15 lokus için)	503	Ensemble**
Amerika (15 lokus için)	347	Ensemble**
Güney Asya (15 lokus için)	489	Ensemble**
Doğu Asya (15 lokus için)	504	Ensemble**
Afrika (15 lokus için)	661	Ensemble**

*http:// scholar.google.com.tr/ sayfasından taranarak 30 INDELs polimorfizmi üzerinde popülasyon çalışması yapılan makalelerden alınan referans örnekler kullanıldı.

** http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index sayfası taranarak 30 INDELs içerisinden bulunan 15 lokusa ait alınan referans örnekler kullanıldı.

3.6. Deney Aşaması

Araştırmanın laboratuar aşaması beş bölümden oluşmaktadır.

- DNA izolasyonu
- DNA miktarlarının belirlenmesi
- PCR
- PCR Ürünlerinin ABI PRISM® 3130 Genetik Analiz Cihazında Elektroforezi
- Elektroforez sonrası verilerin analizi

3.6.1. DNA izolasyonu

İncelenmek üzere toplanan kan örneklerinden, DNA izolasyonu silika temelli QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) ticari kiti kullanılarak yapıldı. Bu çalışmada izole edilen DNA çift ipliklidir. İzolasyon aşağıdaki basamaklar izlenerek yapıldı.

1. 200 µl'lik EDTA'lı kan 1,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
2. Üzerine 20 µl Proteinaz K ve 200 µl AL tamponundan eklenerek 15 saniye karıştırıldı (vortekslendi).
3. 56 ˚C'de 10 dakika inkübe edidi.
4. Tüp duvarındaki karışımın aşağı inmesi için, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. 200 µl %96-100'lük etanol eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Vorteksden sonra tekrar 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. QIAamp® mini spin kolonu 2ml toplama tüpüne yerleştirildi ve 5. adımda elde edilen karışım, 2 ml'lik toplama tüpünün içinde bulunan QIAamp® mini kolona aktarıldı ve tüpün kapağı kapatılarak 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtratı içeren tüp atıldı.
7. QIAamp® mini kolon, 2 ml' lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 500 µl AW1 eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtratı içeren tüp atıldı.
8. QIAamp® mini kolon, 2 ml' lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 500 µl AW2 eklendi ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Filtratı içeren tüp atıldı.
9. Kolon membranının kuruması için, QIAamp® mini kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek 14000 rpm'de 1 dakika boş olarak santrifüj edildi.
10. QIAamp® mini spin kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. 200 µl AE tamponu eklendi. Oda ısısında 3 dakika inkübe edildi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Elde edilen DNA özütleri kısa süreli kullanım için +4 ºC' ye, uzun süreli saklamak için -20ºC' ye kaldırıldı.

3.6.2. DNA miktarlarının belirlenmesi

DNA izolasyonu yapılmış olan örneklerin DNA miktarları florometrik yöntem ile belirlendi. Elde edilen izolatların DNA miktarı Quant-iT dsDNA HS (High Sensetive) Assay kit (invitrogen) kullanılarak Qubit® fluorometer cihazı ile ölçüldü. DNA miktarları 260 nm dalga boyunda aşağıdaki adımlar izlenerek ölçüldü.

1. Ölçülecek örnek sayısı ve cihazın kalibrasyonu için gerekli 2 adet standart ile birlikte toplam sayı belirlenerek, 0.5 ml'lik steril tüpler hazırlandı.
2. Her bir örnek için 199 µl Quant-iT™ dsDNA HS Buffer ve 1 µl Quant-iT™ dsDNA HS Reagent karışımı hazırlandı.
3. Cihazın kalibrasyonu için her ölçümde Standart 1 ve Standart 2 olmak üzere kontroller kullanıldı. Her bir standart için Buffer-reagent (200 µl) karışımdan cihaza özgü tüpe 190 µl alındı, üzerine 10 µl standart eklendi.
4. Örnekler için ise Buffer-reagent (200 µl) karışımdan cihaza özgü tüpe 199 µl alındı, üzerine 1µl standart eklendi. Tüpler birkaç saniye vortekslendi.
5. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. Öncelikli olarak Standart 1 ve Standart 2 sırası ile okutularak Qubit™ fluorometer cihazında DNA konsantrasyonları belirlenerek aletin kalibrasyonu sağlandı.
7. Örnekler sırasıyla cihaza yerleştirildi, karışım içindeki ölçümü yapıldı.
8. DNA miktarları cihazda otomatik olarak hesaplandı ve miktarları not edildi.

Miktar ölçümü yapılan örnekler PCR için distile su ile 0.1-1 ng/µl DNA konsantrasyon aralığında olacak şekilde sulandırıldı.

3.6.3. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu)

Çalışmada Investigator® DIPplex Kit (Qiagen) kullanıldı. Bu kit -20ºC de muhafaza edilmiştir.

3.6.3.1. PCR primerleri

Bu çalışmada Investigator® DIPplex Kit'in içeriğinde yer alan Qiagen firması tarafından hazırlanmış mix halinde bulunan 30 INDEL (Amelogenin X, Amelogenin Y ve 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) primeri kullanıldı. Primer karışmı kontaminasyon riskine karşı tüplere bölünerek -20˚C'de saklandı.

DNA ürünlerinin belirli miktarlarda çoğaltılması hedeflenerek çalışılacak en uygun DNA miktarı bulundu ve çalışmaya belirlenen DNA miktarı ile devam edildi.

3.6.3.2. PCR bileşenlerinin hazırlanması ve PCR aşaması

İzole edilen DNA örneklerinde Qiagen Investigator® DIPplex Kiti kullanılarak 30 INDEL lokusunun multipleks (çoklu) amplifikasyonu yapıldı.

Bu kitin içeriğinde bulunan ve PCR'da kullanılacak olan Reaksiyon Mix A, Primer mix, Multi Taq2 DNA Polymerase, Nuclease-free water ve Template DNA bulunmaktadır.

Kit çalışma öncesinde -20 ºC'den çıkartıldı ve PCR karışımı hazırlanana kadar buzda bekletildi. Söz konusu PCR bileşenleri bir örnek için aşağıda Tablo VII'de belirtilmiş olan miktarlarda karıştırıldı. DNA örnekleri 0.1-1 ng aralığında olacak şekilde sulandırılarak PCR karışımına eklendi. PCR karışımının bulunduğu ependorf tüplerde baloncuk olmamasına dikkat edildi.

Tablo VII. PCR bileşenleri ve miktarları

PCR Bileşenleri	**Hacim/ Reaksiyon (µl)**
Reaction Mix A*	5.0 µl
Primer Mix	5.0 µl
Multi Taq2 DNA Polymerase	0.6 µl
Nuclease-free water	9.4 µl
Template DNA	5 µl
Toplam hacim	**25 µl**

PCR aşamasında kontaminasyonu kontrol etmek amacıyla her çoğaltmada negatif kontrol, yöntemin verimli çalıştığını belirlemek için pozitif kontrol kullanıldı. PCR, Gene Amp 9700 (Life Technologies) cihazında yapıldı. PCR cihazında sıcaklık, döngü sayısı ve süreleri Tablo VIII'de belirtilen şekilde ayarlandı. PCR sonrası tüplerin ağızları parafilmle sıkıca kapatıldı. Işıktan korumak amacıyla da alüminyum folyo ile sarıldı. 24 saat içinde elektroforeze yüklenecek örnekler +4ºC' ye, 24 saatten daha uzun süre sonra yüklenecek örnekler -20 ºC' ye kaldırıldı.

Tablo VIII. PCR koşulları

Sıcaklık Değeri	Bekleme Süresi	Döngü Sayısı	Uygulanan İşlem
94° C	4 dk.	1	Başlangıç denatürasyonu
94° C	30 sn.	30	Denatürasyon
61° C	120 sn.		Primer Bağlanması
72° C	75 sn.		Zincir Uzaması
68° C	60 dk.	1	Son uzama
10° C	∞		Bekletme

3.6.4. PCR ürünlerinin ABI PRISM® 3130 genetik analiz cihazında elektroforezi

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Adli Moleküler Genetik Laboratuarında bulunan 4 kapillerli ABI PRISM® 3130 Genetik Analizör (Life Technologies) kapiler elektroforez cihazı kullanıldı. Bu aşama, PCR ürünlerinin elektroforeze hazırlanması ve elektroforetik analiz olmak üzere iki temel adımdan oluşmaktadır.

3.6.4.1. PCR ürünlerinin elektroforeze hazırlanması

PCR ürünleri ABI PRISM® 3130 Genetik Analizör cihazına yüklenmeden önce elektroforez işlemi için hazırlandı. Bunun için analizi yapılacak örnekler aşağıdaki Tablo IX'da belirtilmiş olan ve kit protokolüne uygun şekilde karışım hazırlanır.

Tablo IX. PCR ürünlerinin analiz için hazırlanması

İçerik	Hacim(1 örnek için)
Hi-Dİ Formamide	12µl
DNA Size Standard 550 (BTO)	0,3µl

Hi-Di Formamid ve DNA Size Standard 550 (BTO) kullanılmadan önce kısa süre santrifüjlendi. Her bir örnek için 12 µl Hi-Di formamid içine 0.3 µl DNA Size Standard 550 / BTO eklenerek karışım hazırlandı ve kısa vorteks yapıldı. Her bir yürütmede PCR ürünlerinin yanında alelik ladder, pozitif kontrol ve negatif kontrol örnekleri de hazırlandı.

Hazırlanan karışımın ve PCR ürününün plate kuyucuklarına yüklenmesi aşamasında her bir plate kuyucuğuna 12 µl olacak şekilde dağıtıldıktan sonra üzerine örnek başına 1 µl PCR ürünü eklendi. Alelik ladder için hazırlanan karışımdan 12 µl ve 1 µl alelik ladder eklendi. Cihazın enjeksiyon aşamasında hava çekmemesi için kuyucuklarda baloncuk kalmamasına dikkat edildi. Daha sonra hazırlanan örneklerin denatürasyonu yapıldı bunun için plate ABI 9700 termal ısı döngü cihazına (PCR) yerleştirildi. Karışım 95°C' de 5 dakika denatüre edildi ve bu işlemin ardından buzda 5 dakika bekletildi.

3.6.4.2. Elektroforetik analiz

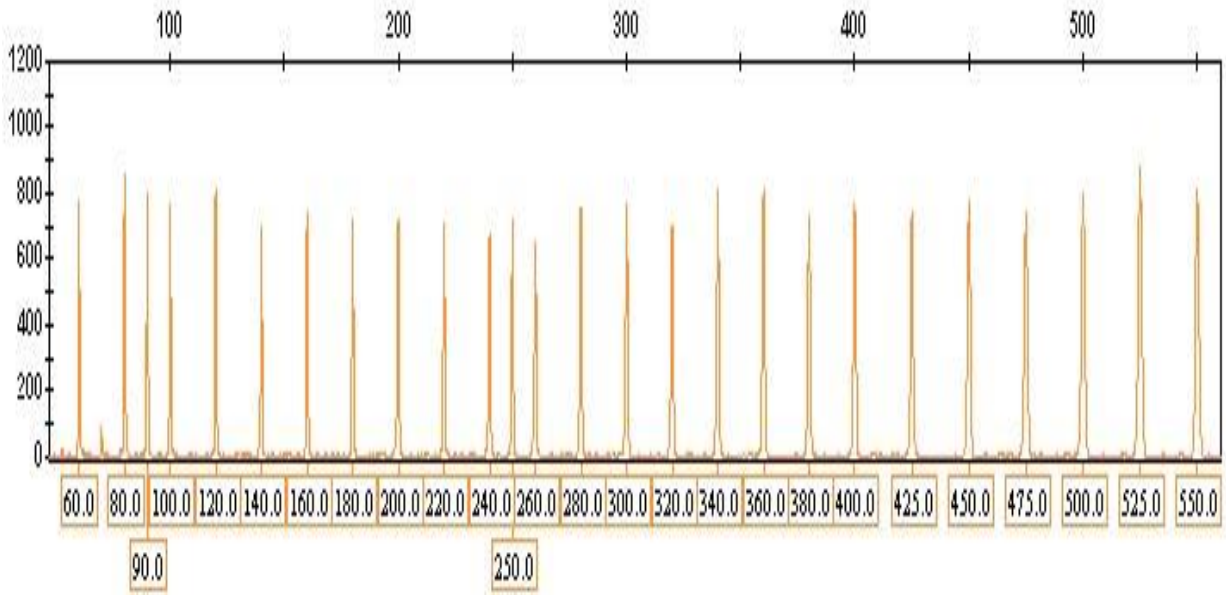
PCR ürünlerinin elektroforezi, ABI PRISM® 310 genetik analizör cihazında analiz edilebilmesi için cihaza Matriks Standart BT5 adı verilen ve beş floresans boya içeren (6-FAM, BTG, BTY, BTR, BTO) matriks standardı yüklendi. Mavi renk veren 6-FAM, amelogenin, HLD77, HLD45, HLD131, HLD70, HLD6, HLD111, HLD58 ve HLD56 lokuslarını, yeşil renk veren BTG ise HLD118, HLD92, HLD93, HLD99, HLD88, HLD101 ve HLD67 lokuslarını, Siyah ya da Sarı renk veren BTY ise HLD83, HLD114, HLD48, HLD124, HLD122, HLD125, HLD64 ve HLD81 lokuslarını, kırmızı renk veren BTR ise HLD136, HLD133, HLD97, HLD40, HLD128, HLD39 ve HLD84 lokuslarının görünürleştirilmesinde kullanıldı. Turuncu renk veren BTO ise internal size kontroldür. Daha sora ABI PRISM® 3130 cihazına yürütme için GS STR POP-4 (1ml) G5 modül parametreleri ayarlandı. Matriks olarak Set BT5 (Life Technologies) yüklendi. Örneklerin elektroforezi yürütme koşulları Qiagen Investigator® DIPplex kit protokolüne göre yapıldı (Tablo X).Uygun injeksiyon zamanı, yürütme voltajı, yürütme sıcaklığı ve yürütme zamanı kontrol edilerek ayarlandı. 36 cm kapillerde ve polimer POP4 (Life Technologies) kullanılarak yürütmeler DNA Size Standard 550 (BTO) (Internal Size Standard) (Life Technologies) ile elektroforez gerçekleştirildi.

Tablo X. Elektroforez koşulları

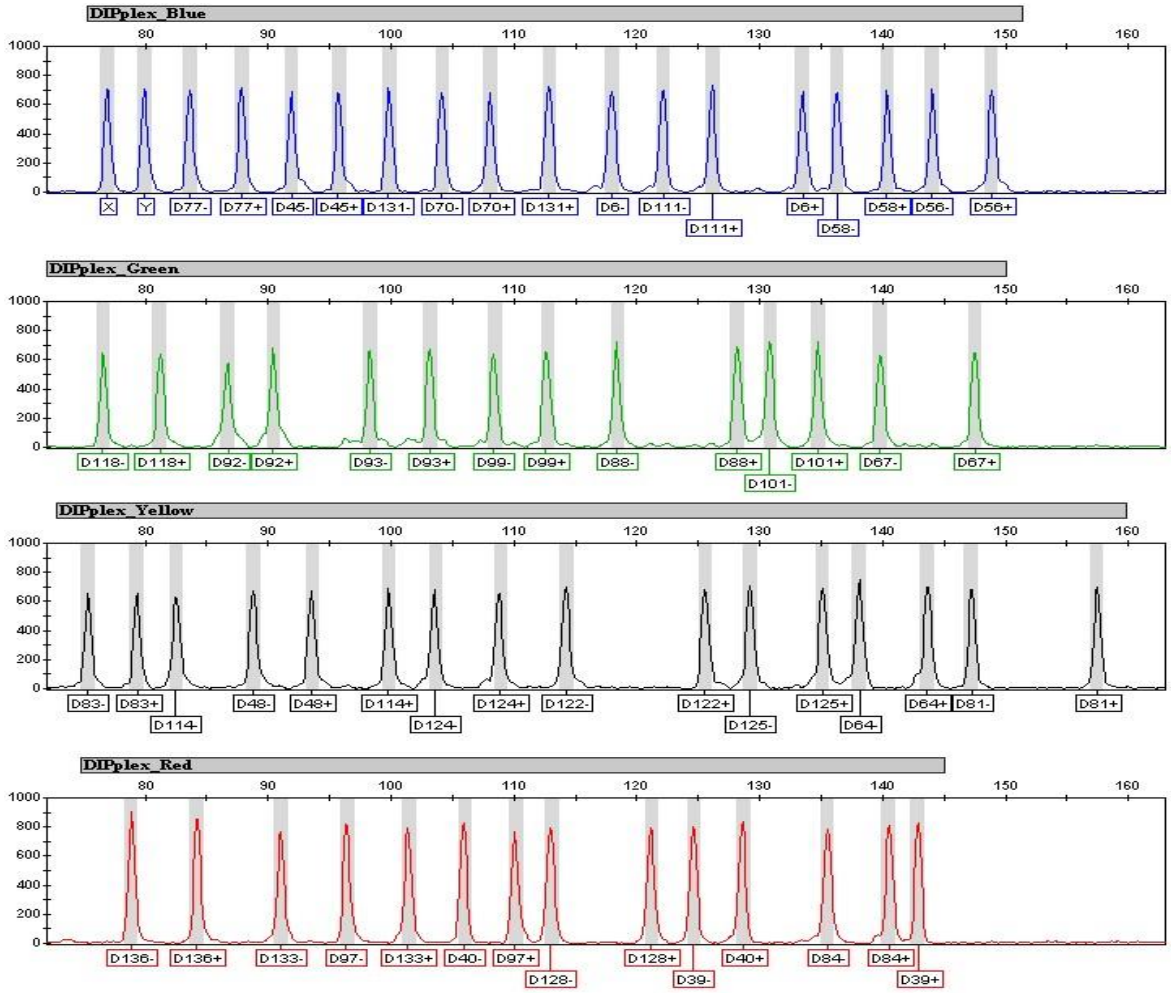
Parametre	GS STR POP-4 (1ml) G5 modül
Matriks	Matriks BT5
Injeksiyon zamanı	5 sn.
Yürütme voltajı	15 Kv
Yürütme zamanı	20 dak.
Yürütme sıcaklığı	60˚C
Şırınga pompalama süresi	150 sn.

3.6.5. Elektroforez sonrası verilerin analizi

ABI 3130'daki elektroforez sonrası örneklerden elde edilen ham verilerin görüntülenmesi, tiplenmesi ve sonuçların değerlendirilmesi Genemapper® IDX v.1 (Life Technologies) analiz programı kullanılarak yapıldı. İlk aşamada programda yeni bir proje oluşturuldu daha sonra bu projeye yapılan yürütmelerin verileri eklendi. GeneMapper programının doğru değerlendirme yapabilmesi için programa öncelikle cihazın otomatik tipleme yapması için gerekli olan panel ve bin setleri oluşturuldu. Örnekler bu parametrelerde analiz edildi. INDEL lokuslarının tespiti ve yürütme şartlarını kontrol etmek için Qiagen Investigator® DIPplex Kit'e ait alelik ladder ve turuncu renk veren DNA Size Standard 550 / BTO kullanıldı. DNA Size Standard 550 / BTO'ın uzunlukları 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550 baz uzunluğundadır. Bu standardın DNA parçalarının büyüklükleri Şekil 12'de gösterilmektedir. Her örnekte bu standart kontrol edildikten sonra analiz yapıldı. INDEL'lerin yerleri bu standarda göre belirlenerek referansla karşılaştırıldı. Kapiller elektroforezde yürütülen PCR ürünleri ve örnekler, alelik ladder ile üst üste çakıştırılarak değerlendirildi. Investigator® DIPplex Kitine ait alelik ladder Şekil 13'de gösterilmektedir. Bilinen alel boyutları ve INDEL noktalarındaki değişimleri gösteren farklı renklerdeki floresan boyalar dikkate alınarak elektroforegramdaki pikler değerlendirildi ve INDEL noktaları belirlendi.



Şekil 12: DNA size standart (BTO) (76)



Şekil 13: *Investigator® DIPplex kitine ait alelik ladder (76)*

3.7.Qiagen Investigator® DIPplex Kiti'nin Optimizasyon Çalışmaları

Qiagen Investigator® DIPplex kitinin çeyrek reaksiyonda çalışılabilmesi için miktarı bilinen, polimorfik, çalışılan lokusların hepsinde çeşitli sonuçlar verebilen, erkek bireye ait (9948 kodlu) pozitif kontrol DNA örneği (0.10 ng/µl) kullanılarak laboratuvarda optimizasyonu yapıldı.

3.7.1. Optimum DNA miktar tayini

QIAamp®DNA Mini Kit ile izole edilen DNA örnekleri (0.0025 ng/µl, 0.005 ng/µl, 0.015 ng/µl, 0.025 ng/µl, 0.05 ng/µl, 0.1 ng/µl, 0.25 ng/µl, 0.5 ng/µl, 1 ng/µl, 2 ng/µl) kullanılarak PCR için optimum DNA miktarı belirlenmeye çalışıldı. DNA miktarı 0.1-0.5 ng aralığında kullanıldığında beklenen noktalarda değerlendirilebilir pikler elde edildi.

3.7.2. PCR toplam hacminin azaltılması

PCR reaksiyon miktarları tam reaksiyondan, yarım reaksiyona ve çeyrek reaksiyona orantısal olarak azaltıldı ve optimum miktarlar belirlendi (Tablo XI).

Tablo XI. Çalışılan PCR reaksiyon miktarları

PCR Bileşeni	Tam reaksiyon	Yarım reaksiyon	Çeyrek reaksiyon
Distile Su	9,4 µl	4,7 µl	2,35 µl
Reaksiyon Miks A	5 µl	2,5 µl	1,25 µl
Primer Miks DIPplex	5 µl	2,5 µl	1,25 µl
MultiTaq2 DNA Polimeraz	0,6 µl	0,3 µl	0,15 µl
DNA örneği	5 µl	2,5 µl	1,25 µl
Toplam hacim	25 µl	12,5 µl	6,25 µl

Kitin optimizasyonu tamamlandıktan sonra 250 örneğin 30 indel lokusunun profilleri çeyrek reaksiyon ile belirlendi. Her PCR çalışmasında pozitif kontrol kullanılarak da çeyrek reaksiyonun güvenilir bir şekilde kullanılabilceği kontrol edildi.

3.8. İstatiksel Analiz

Tüm örneklerin 30 INDEL lokusu için genotip tiplendirilmesi yapıldıktan sonra değerlendirme için çeşitli istatistik programları kullanıldı.

Alel frekansı, beklenen (Ho) ve gözlenen (He) heterozigotluk değerleri, Hardy-Weinberg dengesi (p değeri) Arlequin v.3.5.1.2 yazılım programı kullanılarak hesaplandı.

Ayrım gücü (PD), eşleşme olasılığı (Pm), polimorfik bilgi içeriği (PIC), dışlama gücü (PE), tipik babalık indeksi (TPI) Promega PowerStats excel dosyası kullanılarak hesaplandı.

30 INDEL lokusu için, veri bankasından elde edilen çeşitli popülasyonlara ait alel frekansları ile Türkiye popülasyonu alel frekanslarını karşılaştırıp bir grafik üzerinde göstermek için excel dosyası kullanıldı.

Alel frekanslarından yararlanılarak popülasyonlar arası lokus bazındaki farklılığı gösteren Fisher's Exact Test Arlequin v.3.5.1.2 yazılım programı kullanılarak yapıldı.

Popülasyonlar arasındaki farklılaşma değerleri (Fst) Arlequin v.3.5.1.2 yazılım programı kullanılarak hesaplandı. Bulunan Fst değerleri kullanılarak popülasyonlar arasındaki genotip farklılığını gösteren ağaç MEGA 5.1 yazılım programı kullanılarak hesaplandı.

Yazılım programları için gerekli olan dosya formatlarının oluşturulması için GENETİX v.4.05.2 yazılım programı kullanıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, Investigator® DIPplex Kit (Qiagen) kullanılarak 30 INDEL lokusunun (Amelogenin X, Amelogenin Y ve 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) pozitif kontrol ile yapılan çalışmalar sonucu İstanbul Üniversitesi Adli Moleküler Genetik laboratuarındaki optimizasyonu sağlandı. Daha sonra bu 30 INDEL lokusunun Türkiye popülasyonundaki (250 kişide) genotipi belirlendi. Son aşamada ise elde edilen veriler ile istatistiksel analizler yapıldı.

İstatistiksel analizler için Arlequin v.3.5.1.2, Promega PowerStats excel dosyası, MEGA 5.1, GENETİX v.4.05.2 gibi yazılım programları kullanıldı.

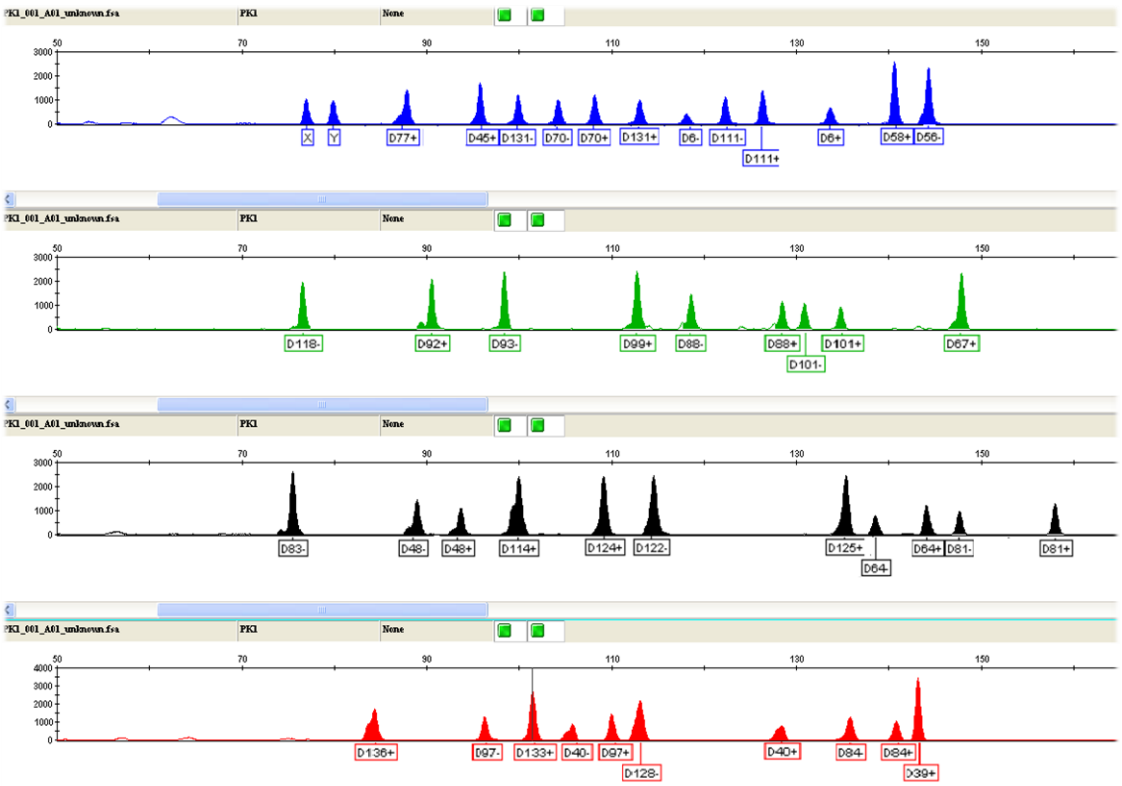
4.1.Optimizasyon Çalışmaları

Çalışmanın ilk aşamasında Qiagen Investigator® DIPplex kitinin İstanbul Üniversitesi Adli Moleküler Genetik Laboratuarında bulunan ABI PRISM® 3130 Genetik Analizör (Life Technologies) kapiler elektroforez cihazında optimizasyonunu yapabilmek için miktarı bilinen 9948 kodlu pozitif kontrol DNA örneği (0.1 µl) çalışıldı.

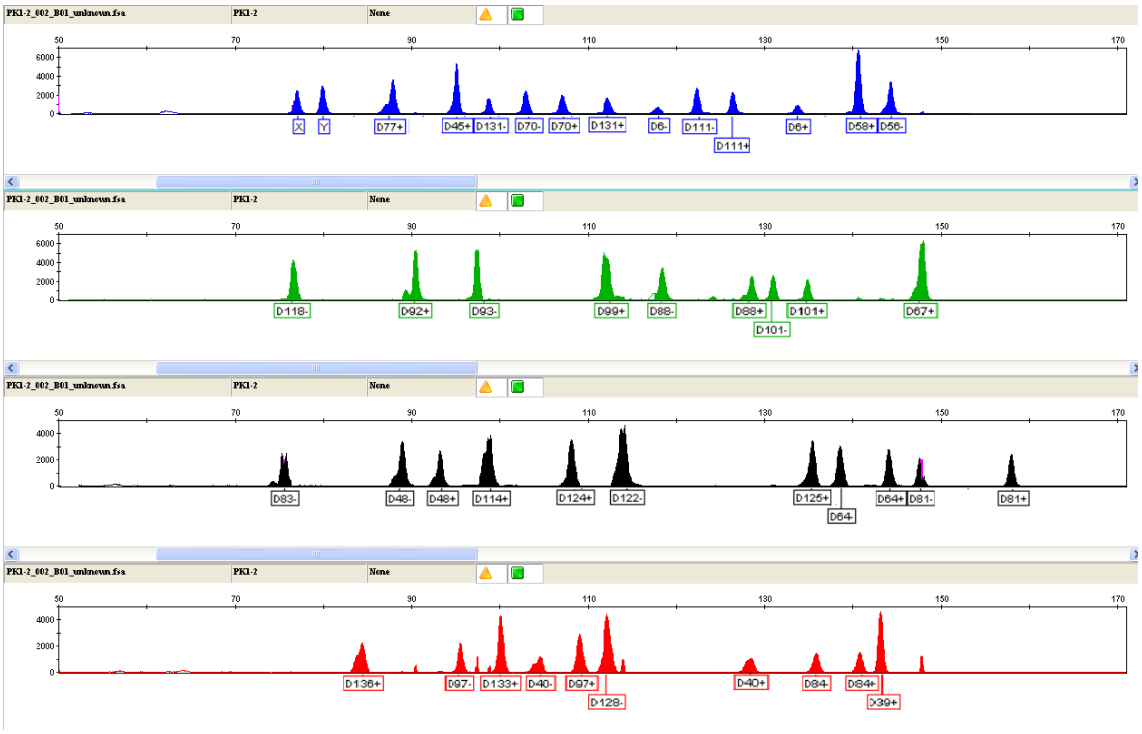
Kitin PCR reaksiyon bileşenleri tam reaksiyondan, yarım reaksiyona ve çeyrek reaksiyona kademeli olarak indirilerek çalışıldı (Tablo VII).

Her PCR çalışmasında pozitif kontrol kullanılarak çeyrek reaksiyonun güvenilir bir şekilde kullanılabilceği kontrol edildi. Bu yüzden çalışmaya çeyrek reaksiyonla devam edildi. Ayrıca çalışılan pozitif kontroller kitte verilen profillerle karşılaştırılarak doğrulandı. Analiz edilen pozitif kontrole ait piklerin tam reaksiyona ait görüntüleri Şekil 14'de, yarım reaksiyona ait görüntüleri Şekil 15'de, çeyrek reaksiyona ait görüntüleri Şekil 16'da gösterilmektedir.

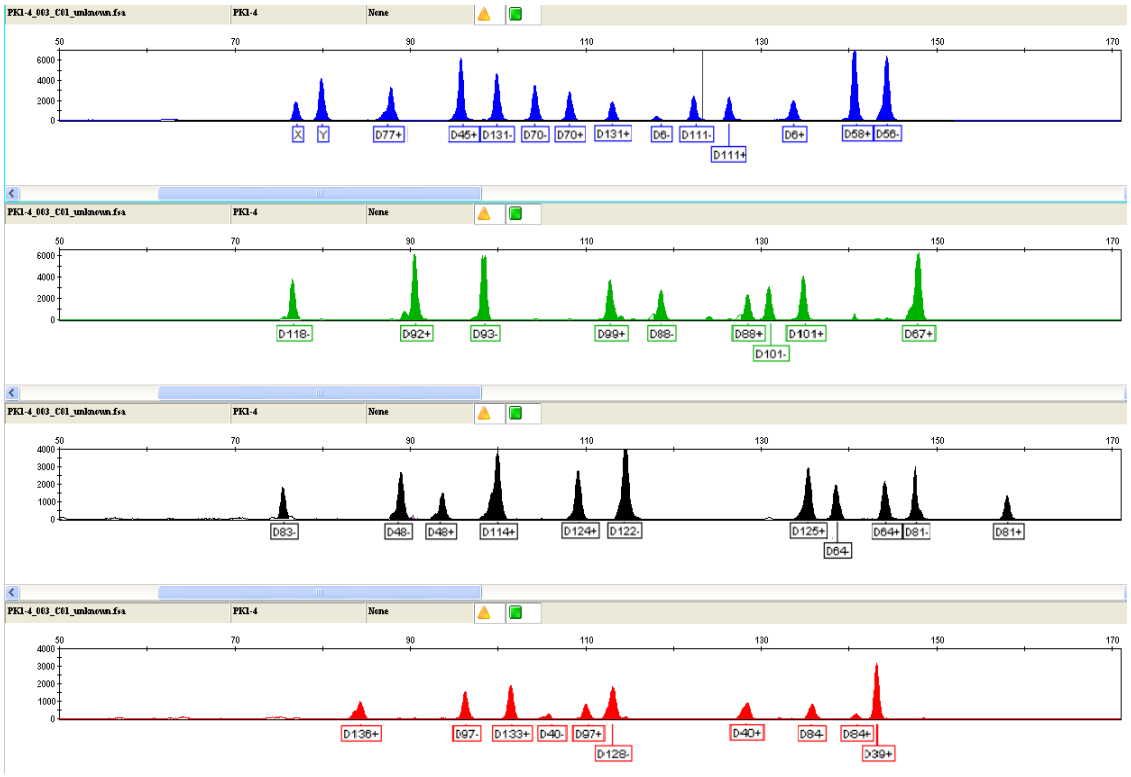
Optimizasyonu tamamlanan Qiagen Investigator® DIPplex kiti ile yapılan tüm çalışmalarda negatif kontrol kullanılarak kontaminasyon varlığı kontrol edildi. Kullanılan negatif kontrollerde herhangi çoğalma gözlenmedi. Negatif kontrole ait elektroforegram görüntüsü Şekil 17'de gösterilmektedir.



Şekil 14: Pozitif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü (tam reaksiyon)



Şekil 15: Pozitif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü (yarım reaksiyon)

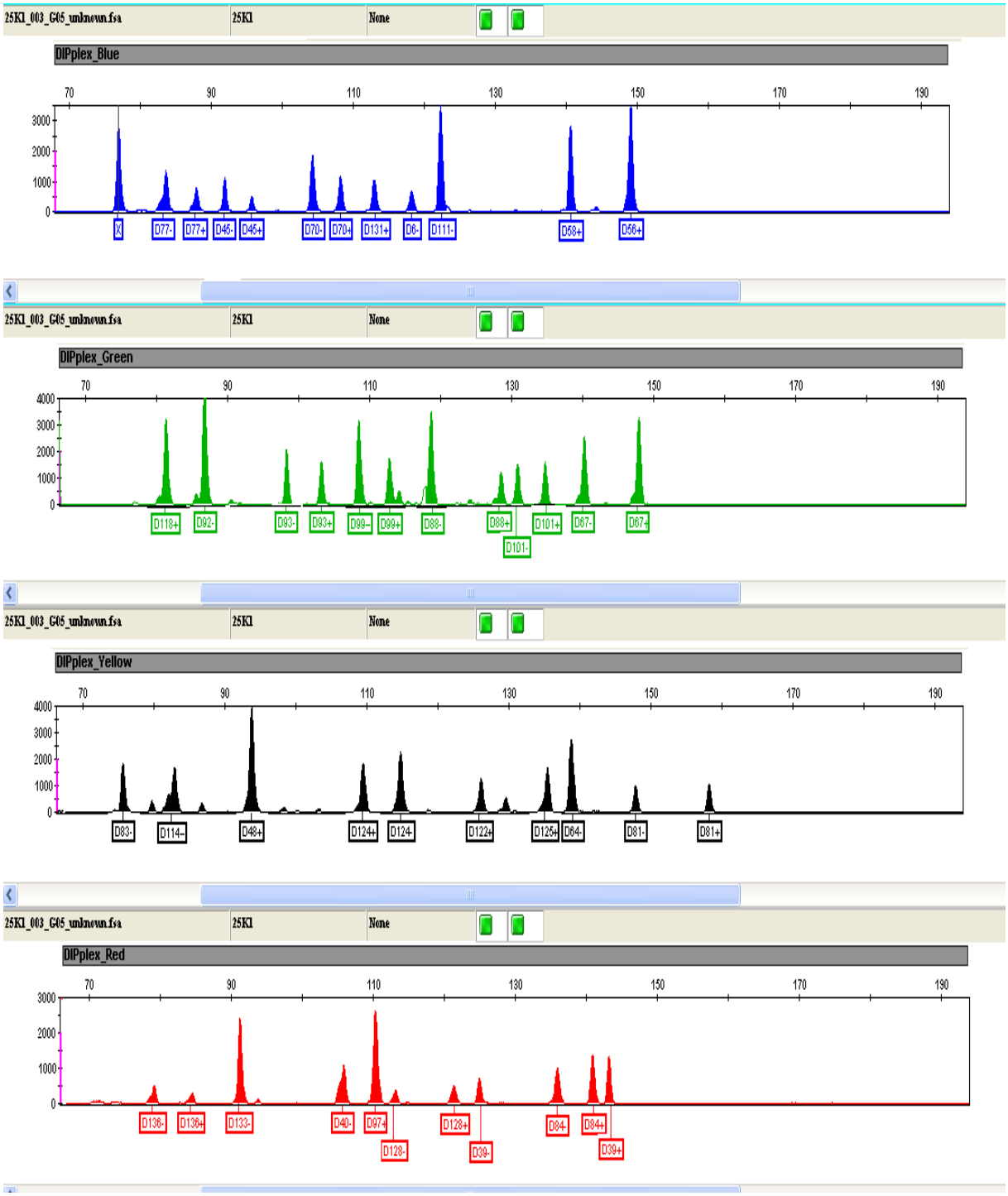


Şekil 16: Pozitif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü (çeyrek reaksiyon)

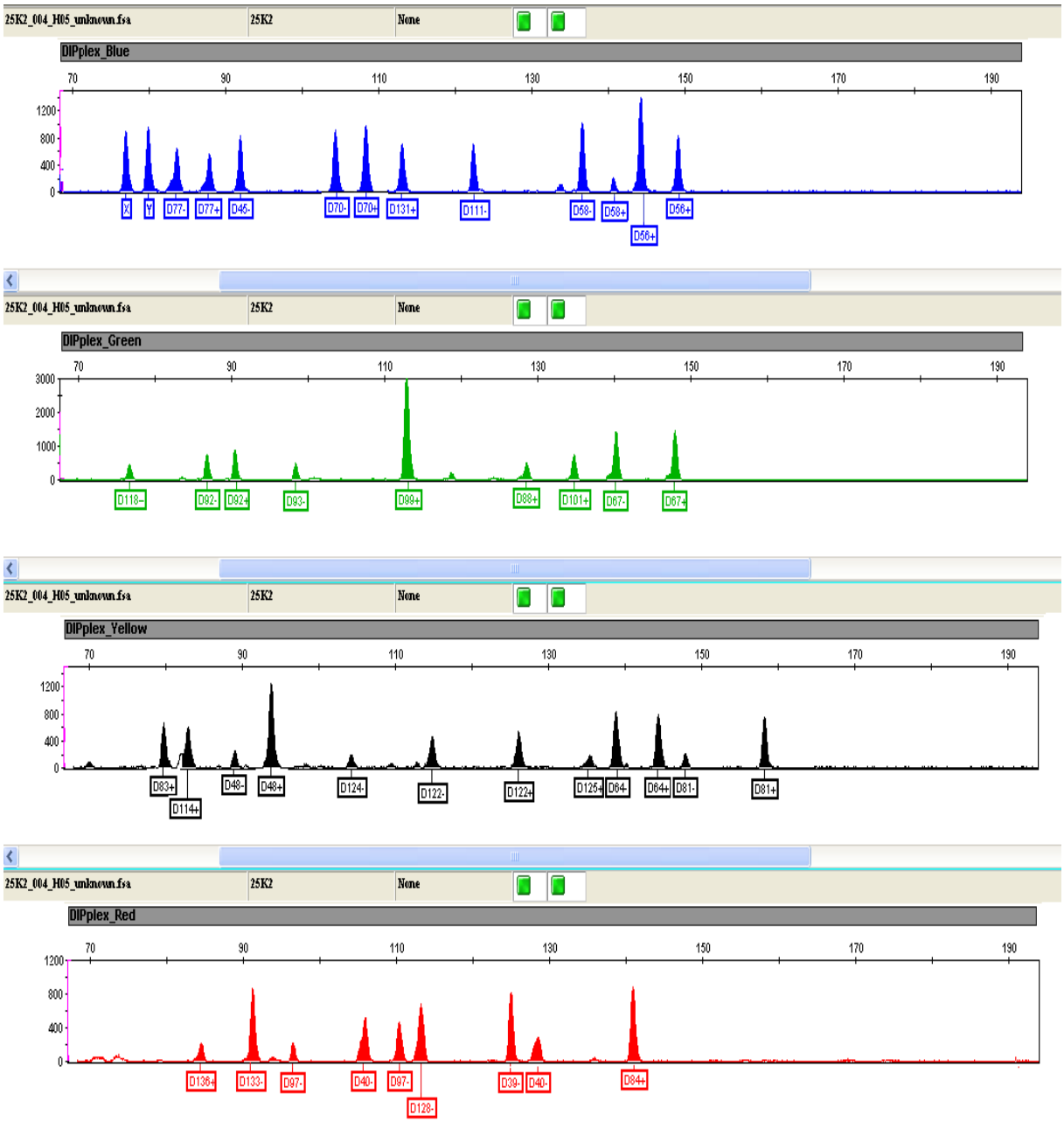
Şekil 17: Negatif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü

4.2. Genotiplerin Belirlenmesi

Otozomal 30 INDEL lokusunun 250 kişi üzerinde Genemapper® IDX v.1 (Life Technologies) analiz programı kullanılarak genotipi belirlendi. 250 kişiye ait 30 INDEL profili Ek 3'te gösterilmektedir. Kadına ait genotip elektroforegram görüntüsü Şekil 18'de ve erkeğe ait genotip elektroforegram görüntüsü Şekil 19'da gösterilmektedir.



Şekil 18: Kadın DNA'sına ait elektroforegram görüntüsü



Şekil 19: Erkek DNA'sına ait elektroforegram görüntüsü

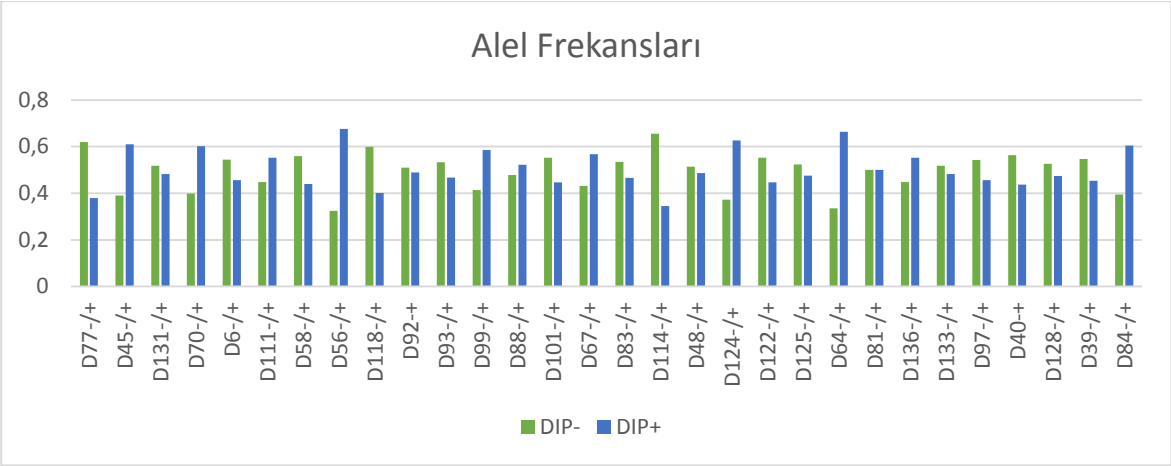
4.3. İstatistiksel Bulgular

4.3.1. Alel frekanslarının belirlenmesi

250 kişide 30 indel lokusunun alel sıklığı Arlequin v.3.5.1.2 yazılım programı kullanılarak yapıldı. Alel frekansları Tablo XII'de ve grafiksel görünümü Şekil 20'de verilmiştir.

Tablo XII. 30 INDEL lokusunun alel frekansları

Lokus	Motif (+DIP)	Frekans	Lokus	Motif (+DIP)	Frekans
D77-	-	0,620	D83-	-	0,534
D77+	TAAG	0,380	D83+	AAGG	0,466
D45-	-	0,390	D114-	-	0,655
D45+	CACG	0,610	D114+	TCCTATTCTACTCTGAAT	0,345
D131-	-	0,518	D48-	-	0,514
D131+	TGGGCTTATT	0,482	D48+	GACTT	0,486
D70-	-	0,398	D124-	-	0,373
D70+	AGCA	0,602	D124+	GTGGA	0,627
D6-	-	0,544	D122-	-	0,553
D6+	GCAGGACTGGGCACC	0,456	D122+	GAAGTCTGAGG	0,447
D111-	-	0,448	D125-	-	0,524
D111+	CACA	0,552	D125+	ATTGCC	0,476
D58-	-	0,560	D64-	-	0,336
D58+	AGGA	0,440	D64+	GACAAA	0,664
D56-	-	0,324	D81-	-	0,500
D56+	TAAGT	0,676	D81+	GTAAGCATTGT	0,500
D118-	-	0,599	D136-	-	0,448
D118+	CCCCA	0,401	D136+	TGTTT	0,552
D92-	-	0,510	D133-	-	0,518
D92+	GTTT	0,490	D133+	CAACCTGGATT	0,482
D93-	-	0,533	D97-	-	0,543
D93+	ACTTT	0,467	D97+	AGAGAAAGCTGAAG	0,457
D99-	-	0,414	D40-	-	0,563
D99+	TGAT	0,586	D40+	GGGACAGGTGGCCACTAGGAGA	0,437
D88-	-	0,478	D128-	-	0,526
D88+	CCACAAAGA	0,522	D128+	ATTAAATA	0,474
D101-	-	0,553	D39-	-	0,547
D101+	GTAG	0,447	D39+	CCTAAACAAAAATGGGAT	0,453
D67-	-	0,432	D84-	-	0,395
D67+	CTACTGAC	0,568	D84+	CTTTC	0,605



Şekil 20: 30 INDEL lokusunun alel frekansı oranlarının grafiksel görünümü

4.3.2. Hardy-Weinberg dengesi

Arlequin v.3.5.1.2 programında 30 INDELs lokusunun p-değerleri hesaplandı ve Hardy-Weinberg dengesine bakıldı. Bu değerler Tablo XIII'te gösterilmektedir. Analiz sonucu elde edilen p-değerlerinin anlamlılığını değerlendirebilmek için p= 0,05/30 şeklinde Bonferonni düzeltmesi uygulanarak anlamlılık düzeyi p> 0,001667 olarak alındı. Bonferonni düzeltmesinden sonra DIPplex genotip dağılımı istatistiksel olarak Hardy-Weinberg kuralına göre beklenenden farklı bir sapma göstermemiştir.

Tablo XIII. Hardy-Weinberg denge tablosu

Locus	Ho	He	P-değeri HWE	Locus	Ho	He	P-değeri HWE
D77-/+	0.45382	0.47192	0.59060	**D83-/+**	0.49799	0.49867	1.00000
D45-/+	0.47177	0.47637	0.89427	**D114-/+**	0.42339	0.45271	0.32697
D131-/+	0.45783	0.50035	0.20261	**D48-/+**	0.49799	0.50061	1.00000
D70-/+	0.44177	0.47999	0.23716	**D124-/+**	0.37751	0.46893	0.00248
D6-/+	0.45161	0.49707	0.15984	**D122-/+**	0.46122	0.49538	0.30421
D111-/+	0.45161	0.49550	0.19691	**D125-/+**	0.41129	0.49984	0.00766
D58-/+	0.41463	0.49357	0.01321	**D64-/+**	0.40984	0.44717	0.19818
D56-/+	0.40486	0.43886	0.24812	**D81-/+**	0.46559	0.50101	0.31029
D118-/+	0.45565	0.48145	0.43041	**D136-/+**	0.52419	0.49550	0.37244
D92-+	0.50403	0.50081	1.00000	**D133-/+**	0.52016	0.50035	0.61287
D93-/+	0.52846	0.49890	0.37316	**D97-/+**	0.42915	0.49739	0.04250
D99-/+	0.45783	0.48606	0.36520	**D40-+**	0.49393	0.49312	1.00000
D88-/+	0.46586	0.50003	0.30922	**D128-/+**	0.52823	0.49963	0.37310
D101-/+	0.47154	0.49542	0.51813	**D39-/+**	0.45344	0.49667	0.19768
D67-/+	0.47131	0.49186	0.51542	**D84-/+**	0.46091	0.47896	0.59406

4.3.3. Adli İstatistik parametreleri

Otozomal 30 INDEL lokusunun ayrım gücü (PD), eşleşme olasılığı (Pm), polimorfik bilgi içeriği (PIC), dışlama gücü (PE), tipik babalık indeksi (PI) gibi adli istatistik parametreleri Promega PowerStats excel dosyası kullanılarak hesaplandı. Bu istatistiksel parametreleri Tablo XIV'te görebiliriz.

Tablo XIV. Adli istatistik analiz parametreleri

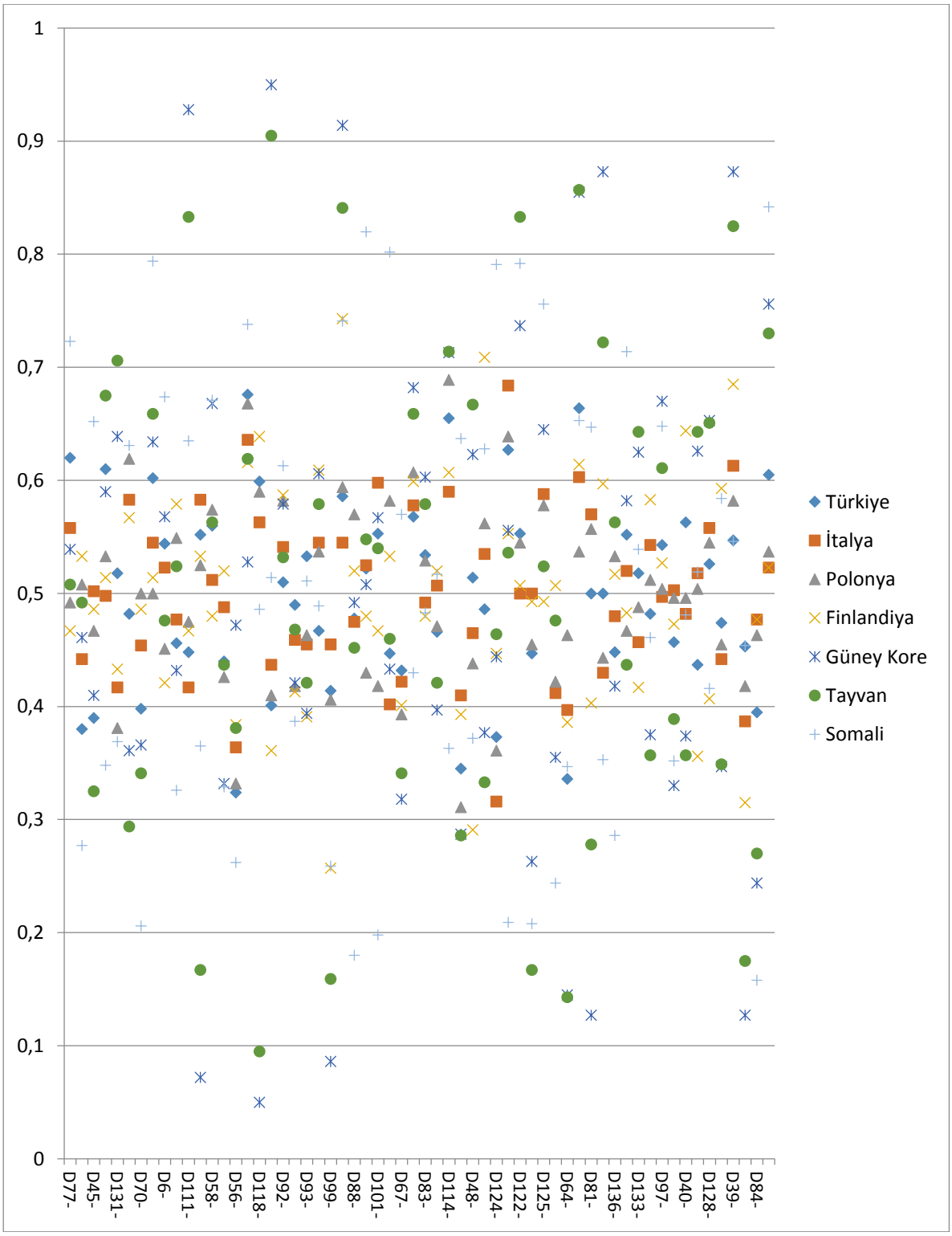
Locus	Pm	PD	PIC	PE	TIP	Locus	Pm	PD	PIC	PE	PI
D77-/+	0.394	0.606	0.35	0.139	0.89	**D83-/+**	0.365	0.635	0.37	0.170	0.96
D45-/+	0.361	0.639	0.37	0.139	0.89	**D114-/+**	0.378	0.622	0.35	0.099	0.80
D131-/+	0.379	0.621	0.37	0.184	0.99	**D48-/+**	0.366	0.634	0.37	0.160	0.94
D70-/+	0.386	0.614	0.37	0.177	0.98	**D124-/+**	0.373	0.627	0.36	0.107	0.82
D6-/+	0.345	0.655	0.37	0.120	0.85	**D122-/+**	0.370	0.630	0.37	0.160	0.94
D111-/+	0.372	0.628	0.37	0.173	0.97	**D125-/+**	0.350	0.650	0.37	0.177	0.84
D58-/+	0.348	0.652	0.37	0.106	0.82	**D64-/+**	0.391	0.609	0.34	0.073	0.74
D56-/+	0.366	0.634	0.36	0.095	0.79	**D81-/+**	0.368	0.632	0.37	0.173	0.97
D118-/+	0.378	0.622	0.36	0.154	0.92	**D136-/+**	0.372	0.628	0.36	0.133	0.88
D92-+	0.394	0.606	0.37	0.218	1.07	**D133-/+**	0.390	0.610	0.37	0.210	1.05
D93-/+	0.379	0.621	0.37	0.188	1.00	**D97-/+**	0.342	0.658	0.37	0.106	0.82
D99-/+	0.376	0.624	0.37	0.177	0.98	**D40-+**	0.382	0.618	0.37	0.199	1.03
D88-/+	0.347	0.653	0.37	0.133	0.88	**D128-/+**	0.401	0.599	0.37	0.230	1.10
D101-/+	0.358	0.642	0.37	0.141	0.89	**D39-/+**	0.345	0.655	0.37	0.114	0.83
D67-/+	0.385	0.615	0.36	0.153	0.92	**D84-/+**	0.389	0.611	0.36	0.170	0.96

* Eşleşme olasılığı (Pm), ayrım gücü (PD), polimorfik bilgi içeriği (PIC), dışlama gücü (PE), tipik babalık indeksi (TPI)

4.3.4. Popülasyonlar arası alel frekanslarının karşılaştırılması

Investigator® DIPplex Kit (Qiagen) ile çalışan popülasyonların (Kuzey Doğu İtalya (100), Polonya (101), Finlandiya (102), Güney Kore (103), Tayvan (101), Somali (102))

verilerinden elde edilen 30 INDELs lokusuna ait alel frekansları ile çalışma sonucunda elde edilen Türkiye popülasyonu alel frekanslarının karşılaştırılmak ve bir grafik üzerinde göstermek için excel dosyası kullanıldı. Karşılaştırılan popülasyonların alel frekansları Tablo XV'te ve grafiksel gösterimi Şekil 21'de verilmiştir.



Şekil 21: 30 INDEL lokusunun popülasyonlar arasındaki alel frekansları grafiği

Tablo XV. Çeşitli popülasyonlara ait 30 INDEL lokusunun alel frekansları

INDEL	Türkiye n:250	İtalya n: 200	Polonya n:122	Finlandiya n: 151	Güney Kore n:373	Tayvan n:180	Somali n:126	INDEL	Türkiye n:250	İtalya n:200	Polonya n:122	Finlandiya n:151	Güney Kore n:373	Tayvan n:180	Somali n:126
D77-	0,620	0,558	0,492	0,467	0,539	0,508	0,723	D83-	0,534	0,492	0,529	0,480	0,603	0,579	0,483
D77+	0,380	0,442	0,508	0,533	0,461	0,492	0,277	D83+	0,466	0,507	0,471	0,520	0,397	0,421	0,517
D45-	0,390	0,502	0,467	0,486	0,410	0,325	0,652	D114-	0,655	0,590	0,689	0,607	0,713	0,714	0,363
D45+	0,610	0,498	0,533	0,514	0,590	0,675	0,348	D114+	0,345	0,410	0,311	0,393	0,287	0,286	0,637
D131-	0,518	0,417	0,381	0,433	0,639	0,706	0,369	D48-	0,514	0,465	0,438	0,291	0,623	0,667	0,372
D131+	0,482	0,583	0,619	0,567	0,361	0,294	0,631	D48+	0,486	0,535	0,562	0,709	0,377	0,333	0,628
D70-	0,398	0,454	0,500	0,486	0,366	0,341	0,206	D124-	0,373	0,316	0,361	0,447	0,444	0,464	0,791
D70+	0,602	0,545	0,500	0,514	0,634	0,659	0,794	D124+	0,627	0,684	0,639	0,553	0,556	0,536	0,209
D6-	0,544	0,523	0,451	0,421	0,568	0,476	0,674	D122-	0,553	0,500	0,545	0,507	0,737	0,833	0,792
D6+	0,456	0,477	0,549	0,579	0,432	0,524	0,326	D122+	0,447	0,500	0,455	0,493	0,263	0,167	0,208
D111-	0,448	0,417	0,475	0,467	0,928	0,833	0,635	D125-	0,524	0,588	0,578	0,493	0,645	0,524	0,756
D111+	0,552	0,583	0,525	0,533	0,072	0,167	0,365	D125+	0,476	0,412	0,422	0,507	0,355	0,476	0,244
D58-	0,560	0,512	0,574	0,480	0,668	0,563	0,671	D64-	0,336	0,397	0,463	0,386	0,145	0,143	0,347
D58+	0,440	0,488	0,426	0,520	0,332	0,437	0,329	D64+	0,664	0,603	0,537	0,614	0,855	0,857	0,653
D56-	0,324	0,364	0,332	0,384	0,472	0,381	0,262	D81-	0,500	0,570	0,557	0,403	0,127	0,278	0,647
D56+	0,676	0,636	0,668	0,616	0,528	0,619	0,738	D81+	0,500	0,430	0,443	0,597	0,873	0,722	0,353
D118-	0,599	0,563	0,590	0,639	0,050	0,095	0,486	D136-	0,448	0,480	0,533	0,517	0,418	0,563	0,286
D118+	0,401	0,437	0,410	0,361	0,950	0,905	0,514	D136+	0,552	0,520	0,467	0,483	0,582	0,437	0,714
D92-	0,510	0,541	0,582	0,587	0,579	0,532	0,613	D133-	0,518	0,457	0,488	0,417	0,625	0,643	0,539
D92+	0,490	0,459	0,418	0,413	0,421	0,468	0,387	D133+	0,482	0,543	0,512	0,583	0,375	0,357	0,461
D93-	0,533	0,455	0,463	0,391	0,394	0,421	0,511	D97-	0,543	0,497	0,504	0,527	0,670	0,611	0,648
D93+	0,467	0,545	0,537	0,609	0,606	0,579	0,489	D97+	0,457	0,503	0,496	0,473	0,330	0,389	0,352
D99-	0,414	0,455	0,406	0,257	0,086	0,159	0,259	D40-	0,563	0,482	0,496	0,644	0,374	0,357	0,481
D99+	0,586	0,545	0,594	0,743	0,914	0,841	0,741	D40+	0,437	0,518	0,504	0,356	0,626	0,643	0,519
D88-	0,478	0,475	0,570	0,520	0,492	0,452	0,180	D128-	0,526	0,558	0,545	0,407	0,653	0,651	0,416
D88+	0,522	0,525	0,430	0,480	0,508	0,548	0,820	D128+	0,474	0,442	0,455	0,593	0,347	0,349	0,584
D101-	0,553	0,598	0,418	0,467	0,567	0,540	0,198	D39-	0,547	0,613	0,582	0,685	0,873	0,825	0,546
D101+	0,447	0,402	0,582	0,533	0,433	0,460	0,802	D39+	0,453	0,387	0,418	0,315	0,127	0,175	0,454
D67-	0,432	0,422	0,393	0,401	0,318	0,341	0,570	D84-	0,395	0,477	0,463	0,477	0,244	0,270	0,158
D67+	0,568	0,578	0,607	0,599	0,682	0,659	0,430	D84+	0,605	0,523	0,537	0,523	0,756	0,730	0,842

4.3.5. Popülasyonlar arası lokus bazındaki farklılıklar

30 INDEL lokusunun Türkiye popülasyonu ile diğer popülasyonların (Kuzey Doğu İtalya, Polonya, Finlandiya, Güney Kore, Tayvan, Somali) makalelerinden elde edilen alel frekanslarından yararlanılarak Arlequin v.3.5.1.2 yazılım programı kullanılarak Fisher's Exact Test ile popülasyonlar arası p-değeri bakımından lokus bazındaki farklılık belirlendi.

Analiz sonucu elde edilen p-değerlerinin anlamlılığını değerlendirebilmek için p= 0,05/7 şeklinde Bonferonni düzeltmesi yapıldı.

Bonferonni düzeltmesi sonucu elde ettiğimiz p değerlerinin anlamlılık düzeyi p<0,007142857 olarak alındı. Bu değerden küçük olan sonuçlar popülasyonlar arası lokuslardaki farklılığı göstermektedir. Bu farklılık Tablo XVI, Tablo XVII, Tablo XVIII ve Tablo XIX 'da gösterilmektedir.

Türk popülasyonu ile Güney Kore popülasyonu arasında 16 lokusta (D97, D40, D128, D39, D84, D122, D125, D64, D81, D118, D93, D99, D67, D131, D111, D56), Somali popülasyonuyla 14 lokusta (D136, D84, D114, D124, D122, D125, D81, D99, D88, D101, D45, D131, D70, D111), Tayvan popülasyonuyla 11 lokusta (D40, D128, D39, D48, D122, D64, D81, D118, D99, D131, D111), Finlandiya popülasyonuyla 4 lokusta (D48, D93, D99, D77), Polonya popülasyonuyla 1 lokusta (D131) farklılık bulunmuştur. İtalya popülasyonu ile herhangi bir farklılık bulunmamıştır.

Tablo XVI. Fisher's Exact Test Sonuç Tablosu (a)

Türkiye	D77-/+ P değerleri	D45-/+ P değerleri	D131-/+ P değerleri	D70-/+ P değerleri	D6-/+ P değerleri	D111-/+ P değerleri	D58-/+ P değerleri	D56-/+ P değerleri
Güney Kore	0.04703+-0.0064	0.68458+-0.0083	0.00391+-0.0009	0.43191+-0.0122	0.57242+-0.0120	0.00000+-0.0000	0.00756+-0.0020	0.00003+-0.0000
İtalya	0.19552+-0.0069	0.02259+-0.0042	0.02505+-0.0030	0.23850+-0.0076	0.69690+-0.0116	0.49585+-0.0061	0.30363+-0.0115	0.37781+-0.0132
Finlandiya	0.00409+-0.0014	0.06945+-0.0057	0.09161+-0.0052	0.12232+-0.0039	0.02117+-0.0035	0.67749+-0.0048	0.11986+-0.0052	0.22558+-0.0067
Somali	0.06149+-0.0032	0.00084+-0.0004	0.00457+-0.0013	0.00040+-0.0003	0.02135+-0.0029	0.00065+-0.0004	0.02970+-0.0022	0.23138+-0.0064
Tayvan	0.02587+-0.0034	0.18967+-0.0081	0.00010+-0.0001	0.21811+-0.0070	0.21123+-0.0079	0.00000+-0.0000	1.00000+-0.0000	0.22858+-0.0102
Polonya	0.02226+-0.0018	0.18708+-0.0097	0.00000+-0.0000	0.07087+-0.0042	0.11235+-0.0053	0.65847+-0.0042	0.81921+-0.0055	0.82059+-0.0043

Tablo XVII. Fisher's Exact Test Sonuç Tablosu (b)

Türkiye	D83-/+ P değerleri	D114-/+ P değerleri	D48-/+ P değerleri	D124-/+ P değerleri	D122-/+ P değerleri	D125-/+ P değerleri	D64-/+ P değerleri	D81-/+ P değerleri
Güney Kore	0.10058+-0.0073	0.13374+-0.0097	0.01234+-0.0020	0.07540+-0.0063	0.00000+-0.0000	0.00193+-0.0006	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
İtalya	0.38025+-0.0072	0.16774+-0.0093	0.28993+-0.0047	0.23548+-0.0122	0.29757+-0.0044	0.18655+-0.0109	0.19757+-0.0112	0.14470+-0.0092
Finlandiya	0.30341+-0.0090	0.38975+-0.0074	0.00000+-0.0000	0.17381+-0.0073	0.46033+-0.0076	0.53229+-0.0073	0.34826+-0.0083	0.06850+-0.0053
Somali	0.36552+-0.0091	0.00000+-0.0000	0.01027+-0.0016	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00011+-0.0001	0.81634+-0.0027	0.00476+-0.0008
Tayvan	0.37924+-0.0134	0.18841+-0.0114	0.00095+-0.0003	0.05515+-0.0050	0.00000+-0.0000	1.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000
Polonya	1.00000+-0.0000	0.55563+-0.0082	0.15136+-0.0074	0.90688+-0.0023	0.91192+-0.0019	0.30966+-0.0088	0.02596+-0.0028	0.30319+-0.0073

Tablo XVIII. Fisher's Exact Test Sonuç Tablosu (c)

Türkiye	D118-/+ P değerleri	D92-+ P değerleri	D93-/+ P değerleri	D99-/+ P değerleri	D88-/+ P değerleri	D101-/+ P değerleri	D67-/+ P değerleri
Güney Kore	0.00000+-0.0000	0.09951+-0.0071	0.00089+-0.0006	0.00000+-0.0000	0.68821+-0.0116	0.74247+-0.0060	0.00593+-0.0010
İtalya	0.50265+-0.0094	0.55845+-0.0069	0.09962+-0.0047	0.37617+-0.0076	1.00000+-0.0000	0.33089+-0.0119	0.85160+-0.0043
Finlandiya	0.51179+-0.0058	0.14697+-0.0038	0.00700+-0.0019	0.00234+-0.0012	0.41844+-0.0138	0.11702+-0.0048	0.61896+-0.0064
Somali	0.02812+-0.0024	0.07631+-0.0048	0.66139+-0.0045	0.00381+-0.0008	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.01018+-0.0016
Tayvan	0.00000+-0.0000	0.70298+-0.0082	0.03008+-0.0030	0.00000+-0.0000	0.62043+-0.0083	0.85227+-0.0042	0.05769+-0.0047
Polonya	0.91264+-0.0010	0.23444+-0.0071	0.23347+-0.0085	1.00000+-0.0000	0.07778+-0.0046	0.01968+-0.0017	0.49587+-0.0064

Tablo XIX. Fisher's Exact Test Sonuç Tablosu (d)

Türkiye	D136-/+ P değerleri	D133-/+ P değerleri	D97-/+ P değerleri	D40-+ P değerleri	D128-/+ P değerleri	D39-/+ P değerleri	D84-/+ P değerleri
Güney Kore	0.51593+-0.0124	0.00994+-0.0021	0.00180+-0.0005	0.00000+-0.0000	0.00079+-0.0004	0.00000+-0.0000	0.00023+0.0003
İtalya	0.49461+-0.0085	0.18178+-0.0078	0.34352+-0.0065	0.08725+-0.0062	0.51303+-0.0065	0.18900+-0.0069	0.10121+0.0061
Finlandiya	0.21403+-0.0098	0.04895+-0.0043	0.83432+-0.0050	0.13597+-0.0055	0.01825+-0.0016	0.00939+-0.0016	0.11162+0.0051
Somali	0.00176+-0.0006	0.74785+-0.0030	0.06603+-0.0046	0.15114+-0.0072	0.04057+-0.0055	1.00000+-0.0000	0.00002+0.0000
Tayvan	0.02245+-0.0029	0.00979+-0.0021	0.17910+-0.0087	0.00000+-0.0000	0.00891+-0.0017	0.00000+-0.0000	0.00798+0.0014
Polonya	0.15875+-0.0063	0.65723+-0.0088	0.44058+-0.0109	0.25848+-0.0043	0.83168+-0.0038	0.59411+-0.0068	0.25903+0.0078

4.3.6. Popülasyonlar arası genetik uzaklık (F_{ST})

1000 Genome INDELs verilerinin bulunduğu Ensemble (http://www.ensemble.org/) (104) veri bankasından söz konusu lokuslardan diğer popülasyonlara ait kitin 30 INDEL lokusuna ait 15 INDEL (HLD45, HLD131, HLD58, HLD99, HLD88, HLD101, HLD83, HLD114, HLD48, HLD81, HLD136, HLD133, HLD128, HLD39, HLD84) lokusunun genotip bilgilerine ulaşılmıştır.

Türkiye popülasyonu ile Avrupa, Amerika, Güney Asya, Doğu Asya, Afrika popülasyonlarına ait genotip veriler kullanılarak 15 INDEL lokusu için Arlequin ver 3.5.1.2 programı yardımıyla ortak Fst değerleri hesaplandı. Popülasyonlar arası farklılıkları gösteren Fst değerleri Tablo XX'de gösterilmiştir.

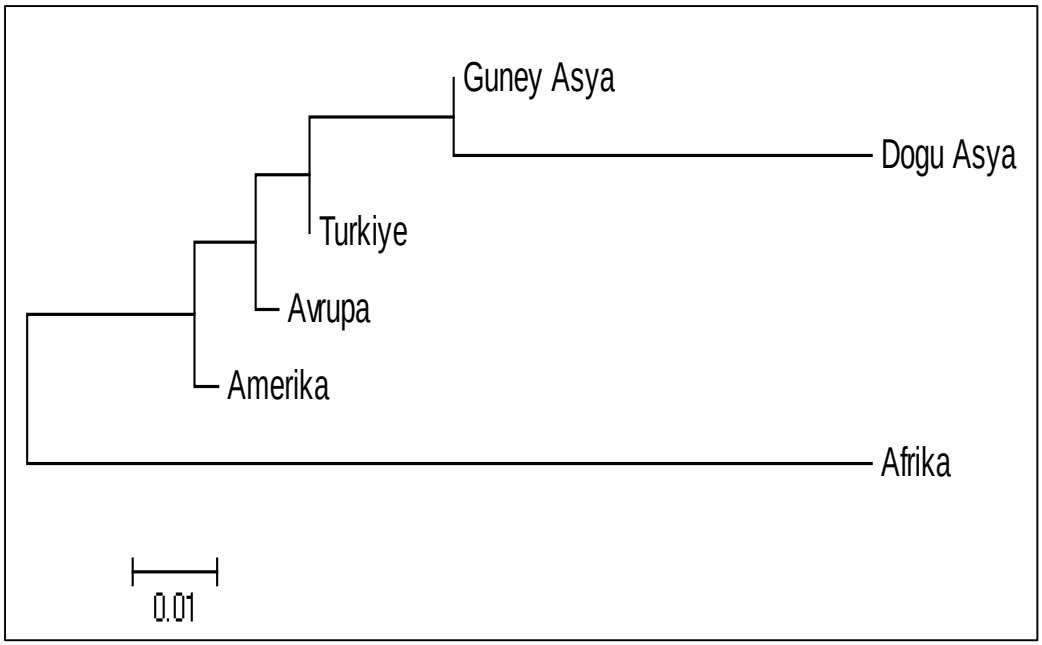
Tablo XX. 15 INDEL lokusunun popülasyonlar arası Fst değerleri

15 INDEL	**Türkiye n:250**	**Avrupa n:503**	**Amerika n:347**	**Güney Asya n: 489**	**Doğu Asya n:504**	**Afrika n:661**
Türkiye	0.00000					
Avrupa	0.00477	0.00000				
Amerika	0.01691	0.02120	0.00000			
Güney Asya	0.01603	0.03104	0.01724	0.00000		
Doğu Asya	0.05915	0.07094	0.07280	0.04564	0.00000	
Afrika	0.13247	0.12117	0.12255	0.14301	0.21764	0.00000

Fst değeri 0-0.05 küçük, 0.05-0.15 orta düzey, 0.15-0.25 büyük, 0.25'den büyük ise çok büyük bir genetik farklılaşma (99)

4.3.7. Filogenetik ağaç çizimi

Türkiye popülasyonuna ile Avrupa, Amerika, Güney Asya, Doğu Asya, Afrika popülasyonlarına ait genotip veriler kullanılarak 15 INDEL lokusu için bulunan Fst değerleri ile Mega 5.1 programında "komşu birleştirme" yöntemi kullanılarak filogenetik ağaç çizildi. Fst değerleri arasındaki farklılık ağaç üzerinde daha net bir şekilde gözlenmektedir. 15 INDEL lokusuna ait Fst değerleri ile çizilen popülasyonlar arası farklılığı gösteren ağaç Şekil 22'de gösterilmektedir. Filogenetik ağaçta Asya, Afrika, Amerika ve Avrupa popülasyonlarının dört farklı ana hatta bulunduğu görülmektedir.



Şekil 22: Komşu birleştirme ağaç yöntemi ile çizilen filogenetik ağacı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde STR sistemleri adli olgularda kimliklendirme amaçlı olarak rutinde en fazla kullanılan genetik işaretlerden olmasına rağmen ileri derecede bozulmuş örneklerde başarı oranı düşüktür. STR'lerin bu sınırlamalarını ortadan kaldırmaya yönelik adli kimliklendirmede STR sistemlerine alternatif olan yeni sistemler geliştirilmiştir (41, 105). Bu sistemlerden biri de SNP lokuslarıdır. Bu lokusların mutasyon oranının düşük olması, degrade örneklerde çalışılabilmesi ve multiplex olarak kolay amplifiye edilmesinden dolayı adli bilimlerde kullanılmaya başlanmıştır (63). Ancak SNP analizinin uzun sürmesi, primer dizaynı, multipleks oluşturulması ve optimizasyon gerektirmesi bu yöntemin dezavantajıdır (106). Son yıllarda Weber ve arkadaşlarının (88) insan genomu üzerinde 2000'in üzerinde INDEL lokusunu karakterize etmesiyle yine Mills ve arkadaşlarının (89) 2006 yılında yaptıkları çalışmayla insan genomunun her 1-10,000 bç'nde yaklaşık 2 milyon insersiyon/delesyon tanımlamasıyla INDEL araştırmaları artmıştır. Ayrıca INDEL analiz yöntemi diğer sistemlere göre daha kısa sürmesi degrade ve az miktarda ki örneklerde başarılı amplifikasyon olması bu lokuslarının adli alanda kullanımını sağlamıştır (108). İnsersiyon-delesyon polimorfizim çalışmaları; günümüzde adli bilimlerde hatta antropolojik ve arkeolojik araştırmalarda kullanılan SNP ve STR polimorfizmine alternatif oluşturacağı düşünülmektedir (2).

Bu çalışmanın amacı otozomal kromozomlar üzerinde yer alan 30 INDEL (Amelogenin X, Amelogenin Y ve 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) lokusunun optimizasyonunu sağlamak ve söz konusu lokusların Türkiye'deki polimorfizmini belirleyerek adli bilimlerde babalık, annelik, akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde ve kimlikendirmede kullanımını sağlamaktır.

Çalışmanın ilk aşamasında miktarı bilinen, polimorfik, çalışılan lokusların hepsinde çeşitli sonuçlar verebilen, erkek bireye ait pozitif kontrol DNA örneği (0.1 ng/µl) kullanılarak Investigator® DIPplex kitinin ABI PRISM® 3130 Genetik Analizör (Life Technologies) cihazında optimizasyonu yapıldı. Optimizasyon sonucunda farklı bir donanıma gerek duyulmadan rutin adli genetik laboratuarlarında bulunan PCR ve kapiler elektroforez cihazında uygulanabildiği görüldü. Optimum PCR ve elektroforez koşullarının belirlenmesi ile kit içeriğindeki kimyasalların kit protokolünden farklı miktarlarda da çalışabildiğini göstermek ve malzemeden tasarruf sağlamak için PCR reaksiyon bileşenleri tam reaksiyondan, yarım

reaksiyona ve çeyrek reaksiyona kademeli olarak indirildi. Çeyrek reaksiyonda bile çok başarılı sonuçlar elde edildiğinden çalışmaya çeyrek reaksiyon ile devam edildi. Her PCR çalışmasında pozitif kontrol kullanılarak çeyrek reaksiyonun güvenilir bir şekilde kullanılabileceği kontrol edildi. Elde edilen elektroforegramların, doğru ve güvenilir bir şekilde değerlendirilebildiği belirlendi. Aynı lokuslarda Hollard ve arkadaşlarının (107) ve de Wei ve arkadaşlarının (108) yarım ya da çeyrek reaksiyonla yapmış olduğu INDEL çalışmaları mevcut olup başarılı sonuçlar almışlardır. Ayrıca INDEL'lerin az miktardaki DNA ile hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi adli analizler için uygulanabilirliği açısından avantajlıdır.

Araştırmanın ikinci aşamasında otozomal 30 INDEL lokusunda 250 kişiye ait örneğin genotipi belirlendi (Ek 3). Kadına ait genotip elektroforegram görüntüsü Şekil 18'de ve erkeğe ait genotip elektroforegram görüntüsü Şekil 19'da gösterilmektedir.

Son aşamada ise genotiplerden elde edilen verilerle 30 indel lokusunun alel frekansı, beklenen ve gözlenen heterozigotluk değeri ve p değeri Arlequin v.3.5.1.2 yazılım programı kullanılarak hesaplandı. Alel frekansı sonuçlarına bakıldığında 0,324 ile en düşük frekans D56(-) lokusu için gözlenirken 0,676 ile en yüksek frekans D56(+) lokusu için gözlendi (Tablo XII, Şekil 20).

İncelediğimiz toplumun- örneklerin dengede olup olmadığını belirlemek üzere Arlequin v.3.5.1.2 yazılım programı kullanılarak p değerleri hesaplandı (Tablo XIII) ve Bonferroni düzeltmesi yapılarak anlamlılık düzeyi p> 0,001667 olarak alındı. DIPplex genotip dağılımı istatistiksel olarak Hardy-Weinberg kuralına göre beklenenden farklı bir sapma göstermemiştir. Bu da çalışılan popülasyonun dengede olduğunu göstermektedir.

Otozomal 30 INDEL için lokusların ayrı ayrı ayrım gücü (PD), eşleşme olasılığı (Pm), polimorfik bilgi içeriği (PIC), dışlama gücü (PE), babalık indeksi (PI) gibi adli istatistik parametreleri Promega PowerStats excel dosyası kullanılarak hesaplandı (Tablo XIV). Bu parametreler ayrı ayrı her lokus için ele alındığında aralarında denge olduğu ve kümulatif tüm lokuslar çalışıldığında hem kimliklendirmede hem de akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılabilecek oranda gerekli dışmlama gücüne, ayrımlama gücüne ulaşılabileceği saptanmıştır.

Türkiye popülasyonun 30 INDEL lokusuna ait alel frekanslarını Kuzey Doğu İtalya, Polonya, Finlandiya, Güney Kore, Tayvan, Somali popülasyonları ile (Tablo XV) karşılaştırıldı ve bir grafik üzerinde göstermek için excel dosyası kullanıldı (Şekil 21).

Popülasyonlar arasında lokus bazındaki farklılığı göstermek için Arlequin v.3.5.1.2 yazılım programında Fisher's Exact Test ile popülasyonlar arası p-değerleri bakımından farklılık hesaplandı. Bonferonni düzeltmesi yapılarak p değerlerinin anlamlılık düzeyi $p<0,007142857$ olarak alındı. Bu değerden küçük olan sonuçlar popülasyonlar arası lokuslardaki farklılığı göstermektedir. Bu farklılıklar Tablo XVI, Tablo XVII, Tablo XVIII ve Tablo XIX'de gösterilmektedir. İstatistiksel olarak Türk popülasyonu ile Güney Kore popülasyonu arasında 16 lokusta, Somali popülasyonu arasında 14 lokusta, Tayvan popülasyonu arasında 11 lokusta, Finlandiya popülasyonu arasında 4 lokusta, Polonya popülasyonu arasında 1 lokusta farklılık gözlenirken İtalya popülasyonu ile herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Buna göre Türkiye popülasyonu ile karşılaştırılan popülasyonların lokus bazındaki farklılığına bakarak İtalya popülasyonu ile genetik olarak daha yakın iken, Güney Kore ile genetik olarak daha uzak olduğunu söyleyebiliriz.

Popülasyonlar arası genetik uzaklığı Arlequin ver 3.5.1.2 yazılım programı ile hesaplamak için popülasyonların genotip verisine ihtiyaç duyulmaktatır. Ancak yukarıda karşılaştırılan popülasyonların sadece alel frekansları bulunup genotip verilerine ulaşılamadığı için veri bankalarında farklı popülasyonlara ait veriler tarandı. 1000 Genome INDELs verilerinin bulunduğu Ensemble (http://www.ensemble.org/) veri bankasından yararlanılarak söz konusu lokusların farklı popülasyonlarına ait 15 INDEL (HLD45, HLD131, HLD58, HLD99, HLD88, HLD101, HLD83, HLD114, HLD48, HLD81, HLD136, HLD133, HLD128, HLD39, HLD84) lokusunun genotip bilgilerine ulaşıldı. Veri bankalarında yapılan araştırma sonucunda diğer 15 INDEL (HLD77, HLD70, HLD6, HLD111, HLD56, HLD118, HLD92, HLD93, HLD67, HLD124, HLD122, HLD125, HLD64, HLD97, HLD40) lokusu için toplum çalışması olmadığı ya da veri bankalarına eklenmediği için Fst değerleri hesaplanamadı. Türkiye popülasyonu genotip verileri kullanılarak, genotip verilerine ulaşılabilen diğer popülasyonların 15 INDEL lokusu için Türkiye, Avrupa, Amerika, Güney Asya, Doğu Asya, Afrika popülasyonlarında Arlequin ver 3.5.1.2 programı yardımıyla Fst değerleri hesaplandı (Tablo XX). Buna göre; Türkiye popülasyonu ile Avrupa popülasyonu arasında 0,00477, Güney Asya popülasyonu ile 0.01603 ve Amerika popülasyonu ile 0.01691 Fst değeri ile küçük bir genetik farklılaşma olduğu görülürken, Türkiye popülasyonu ile Doğu Asya popülasyonu

arasında 0.05915 ve Afrika popülasyonu ile 0.13247 Fst değeri ile orta düzeyde bir genetik farklılaşma olduğu gözlendi.

Bulunan FST değerleri ile Mega 5.1 programında "komşu birleştirme" yöntemi kullanılarak filogenetik ağaç çizildi. Bu ağaç ile Fst değerleri arasındaki farklılık daha net bir şekilde gözlenmektedir. Filogenetik ağaçta Asya, Afrika, Amerika ve Avrupa popülasyonlarının dört farklı ana hatta bulunduğu görülmektedir (Şekil 22). Bu filogenetik ağaçta Türkiye popülasyonu Güney Asya ve Avrupa popülasyonlarına daha yakın konumda çıktığı görüldü.

Sonuç olarak Türkiye popülasyonu için yüksek polimorfizm gösteren 30 INDEL (Amelogenin X, Amelogenin Y ve 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) lokusunun adli bilimlerde kullanılabileceği belirlenmiş olup, alel frekansları, p değeri ve diğer adli istatistik parametreleri saptanarak adli olguların aydınlatılmasında söz konusu lokusların kullanılması için gerekli alt yapı oluşturulmuş oldu. Türkiye'de ilk defa bu çalışma ile insersiyon/delesyon polimorfizminin adli bilimlerde de kullanılabileceği gösterildi. Bu çalışmanın verileri Türk kriminal laboratuvarlarında babalık-akrabalık testlerinde ve degrade DNA örneklerinin analizinde de kullanılabilecektir. Ayrıca dünya toplumları arasında Türk toplumunun yeri belirlenmiştir. Bu çalışma bulguları ile Türk Toplumu'nun Avrupa Toplumu'na genetik olarak daha yakın olduğu gösterilmiştir. INDEL'lerin, özellikle olay yerinden az miktarda veya bozunmuş olarak gelen biyolojik materyallerde hatta antropolojik ve arkeolojik araştırmalarda, STR lokusları ile tiplendirme yapılamadığı durumlarda ve SNP'ye göre daha kısa zamanda ve az maliyetle başarılı bir çoğalma yapılabilmesi gibi özellikleri açısından adli bilimlerde kullanımı zamanla artacaktır. Yinede INDEL lokuslarının STR ya da SNP sistemlerine alternatif oluşturabilmesi için yaygın bir şekilde kullanılması, hem diğer somatik kromozomlar hem de cinsiyet kromozomları üzerindeki daha çok INDEL noktalarının araştırılması gerekir.

6. ÖZET

Moleküler genetik alanındaki gelişmeler, insanların DNA düzeyinde kimliklendirilerek karşılaştırılmasına ve adli olayların aydınlatılmasına olanak sağlamaktadır. İnsan genomunda bazların insersiyonuna (eklenmesine) veya delesyonuna (çıkmasına) dayanan insersiyon-delesyon polimorfizmi de günümüzde DNA kimliklendirilmesinde yaygın olarak kullanılan SNP ve STR tiplendirmelerine alternatif oluşturmaktadır. Bu çalışmada, Otozomal kromozomlar üzerinde bulunan 30 INDEL (Amelogenin X, Amelogenin Y ve 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) lokusunun Türkiye'deki polimorfizmi belirlenmesi amaçlanmıştır.

DNA analizi için Türkiye'nin tüm bölgelerini yansıtacak şekilde, aralarında akraba olmayan ve sağlıklı 250 gönüllüden kan örneği alındı. DNA izolasyonu, QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) kit protokolüne göre gerçekleştirildi. 30 INDEL lokusu Investigator® DIPplex kit prosedürüne göre çoğaltıldı. PCR ürünleri, ABI 3130 Genetik Analizörde (Life Technologies) yürütüldü ve GeneMapper IDX yazılım programında analiz edildi. 30 INDEL lokusunun adli ve popülasyon istatistik parametreleri Promega Powerstats excel dosyası ile hesaplandı. Alel frekansları, Hardy-Weinberg dengesi, popülasyonlar arası (Türkiye ile Güney Kore, İtalya, Finlandiya, Polonya, Somali ve Tayvan popülasyonları arasında) lokus bazındaki farklılığı ve Fst (Popülasyonlar Arası Genetik Uzaklık) test etmek için p değerleri Arlequin ver. 3.5. yazılım programı kullanılarak hesaplandı. Bonferonni düzeltmesinden sonra DIPplex genotip dağılımı istatistiksel olarak Hardy-Weinberg kuralına göre beklenenden farklı anlamlı bir sapma göstermemiştir. Fisher's exact test ile Türk popülasyonu ile Güney Kore popülasyonu arasında 16 lokusta, Somali popülasyonu arasında 14 lokusta, Tayvan popülasyonu arasında 11 lokusta, Finlandiya popülasyonu arasında 4 lokusta, Polonya popülasyonu arasında 1 lokusta istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. İtalya popülasyonu istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Bulunan F_{ST} değerleri ile Mega 5.1 programında "komşu birleştirme" yöntemi kullanılarak filogenetik ağaç çizildi.

Bu çalışma bulgularına göre Türk Toplumu'nun Avrupa Toplumu'na genetik olarak daha yakın olduğu söylenebilir. Bu çalışma verileri babalık- akrabalık testlerinde ve degrade DNA örneklerinin analizinde de yararlı olacaktır.

7. İNGİLİZCE ÖZET

Advancement in molecular genetics allows to compare a human level of DNA identification and clarify a criminal cases. Based on the insertion or deletion of bases in the human genome, insertion-deletion polymorphism, is an alternative for the widely used DNA identification method of SNP and STR typing. This study aimed to determine Turkish polymorphism on 30 INDEL locus on autosomal chromosomes (Amelogenin X Amelogenin Y and 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).

To reflect all regions of Turkey's DNA analysis, 250 blood samples from non-relative healthy volunteers were taken. DNA was extracted using QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) following manufacturer's recommendations. The 30 insertion-deletion loci and amelogenin were amplified according to Investigator® DIPplex kit manual (Qiagen). The PCR products were separated with ABI 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies) and analyzed with GeneMapper IDX software (Life Technologies). Forensic and population parameters of the 30 Indels were estimated with Promega PowerStats excelsheet, p-values of exact tests for Hardy–Weinberg equilibrium, exact test of population differentiation (Turkey between Korea, Italy, Finland, Poland, Somali and Taiwan populations) and Fst (Fixation Index) were calculated with Arlequin ver. 3.5. After Bonferonni correction the DIPplex genotype distributions showed no significant deviation from Hardy–Weinberg rule expectations. Exact test indicated that statistically significant differences were found between Turkish population and Korean population at 16 indel loci, Somalian population at 12 indel loci and Taiwanian population at 12 indel loci. There is no statistically significant observed between Turkish and Italian populations. To draw the phylogenetic tree for founded Fst value "neighboring merge" function is used in Mega 5.1 software program.

According to the findings of this study, Turkish society is genetically closer to the European community. The data set in this study will be useful in analyzing a paternity-kinship test and in a degraded DNA sample.

8. KAYNAKLAR

1. Schneider, P. M. (2007). "Scientific standards for studies in forensic genetics." *Forensic Science International* 165(2): 238-243.
2. Pereira R, Phillips C, Alves C, Amorim A, Carracedo A, Gusmão L. (2009) Insertion/deletion polymorphisms: a multiplex assay and forensic applications. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2(1): 513-515.
3. Butler JM, (2014) Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation, *Academic Press.*
4. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. (2009) Genetik Kavramlar (8. Baskı). Çev. Ed: Öner C, Sümer S, Öner R, Öğüş A, Açık L. Ankara: Palme Yayıncılık.
5. da Silva C, Matos S, Costa HA, dos Santos RM, Espinheira R, Santos J, Amorim A. (2013) Genetic portrait of south Portugal population with InDel markers. Forensic Science International: Genetics 7(4): e101-e103.
6. Bayer, M. (2006) Olay Yeri İnceleme Kriminal Laboratuvar Analizleri. Feryal Matbaacılık, Ankara.
7. Hancı İH. (2002) Adli tıp ve adli bilimler. Seçkin Yayıncılık, Ankara: 371-379.
8. Walsh SJ. (2007) Current and future trends in forensic molecular biology. Molecular Forensics, John Wiley & Sons, London: 1-20.
9. Karadayı B, Kolusayın Ö. (2011) Adli Biyoloji. Adli Tıp Ders Kitabı. İstanbul, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi: 477-489.
10. Butler JM ve Levin BC. (1998) Forensic applications of mitochondrial DNA. Trends in biotechnology 16(4): 158-162.
11. Quintáns B, Alvarez-Iglesias V, Salas A, Phillips C, Lareu MV, Carracedo A. (2004) Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. Forensic science international 140(2): 251-257.
12. Semizoğlu İ. (2013) Adli DNA Analizleri. Ankara, Adalet Yayınevi.
13. Akar N. (1995) Moleküler Patolojiye Giriş. AÜ Tıp Fak. Bilimsel Yayınlar Serisi No:5, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Ankara: 21–32.
14. Kayaalp SO. (2005) Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Hacettepe Taş Kitapçılık Limited Şti.

15. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Inversion.jpg#/media/File:Inversion. Erişim Tarihi: 12. 06. 2015
16. Brown TA. (1992). Genetics: a molecular approach (Second edition), Chapman & Hall.
17. Gardner EJ, Simmons MJ. ve Snustad DP. (1991) Principles of Genetics (8. Baskı). New York: John Wiley & Sons Inc.
18. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Translocation-4-20.png. Erişim Tarihi: 12. 06. 2015
19. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chromosome_duplication.jpg. Erişim Tarihi: 12. 06. 2015
20. Robertson J, Ross AM, Burgayne LA. (1990) DNA in Forensic Science: Theory. Techniques and Applications, London.
21. Alikaşifoğlu M. (2006) Genotipleme Çalışmalarında Kullanılan İleri Teknik Yöntemler. Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Genetik ABD., Türk Farmakoloji Derneği Eğitim Sempozyumu, 100.Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Van.
22. Dib C, Fauré S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Kazan J, Seboun E. (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. Nature 380(6570): 152-154.
23. Kantarcı S, Eraslan S. ve Laleli KY. (1999) Türk toplumunda sık görülen kalıtsal hastalıklarda PCR tekniğine dayalı DNA tanı yöntemlerinin geliştirilmesi ve servis olarak sunulması. Perinatoloji Dergisi 7(1): 15-22.
24. Serin A, Alper B. ve Dag H. (2002) Adli Amaçlı Kullanılan DNA Polimorfizmleri ve Tiplendirme Teknikleri. Adli Tıp Dergisi,16(2-4), 72-81.
25. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J. (1999) Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. Nature genetics 22(3): 231-238.
26. Mitchison NA. (2000) Polymorphism in regulatory gene sequences. Genome biology 2(1): comment2001.
27. Brookes AJ. (1999) The essence of SNPs. Gene 234(2): 177-186.
28. Purohit R. ve Venugopalan P. (2009) Polymorphism: an overview. Resonance 14(9): 882-893.
29. Aşıcıoğlu, F. ve G. Koyuncu (2011) Adli Biyoloji. Adli Bilimler, Adalet Yayınevi: 289-309.

30. Dausset J. (1958) Iso-leuco-anticorps. Acta haematologica 20(1-4): 156-166.
31. Geserick G. ve Wirth I. (2012) Genetic kinship investigation from blood groups to DNA markers. Transfusion Medicine and Hemotherapy 39(3): 163-175.
32. Budowle B. ve Van Daal A. (2008) Forensically relevant SNP classes. BioTechniques: The international journal of life science methods 44(5): 603.
33. Jackson DD, Abbey CS. ve Nugent D. (2006) DNA profiling of the D1S80 locus: a forensic analysis for the undergraduate biochemistry laboratory. Journal of chemical education 83(5): 774.
34. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American journal of human genetics 32(3): 314.
35. Besnard G. ve Bervillé A. (2002) On chloroplast DNA variations in the olive (Olea europaea L.) complex: comparison of RFLP and PCR polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics 104(6-7): 1157-1163.
36. Steffan R. ve Atlas R. (1991) Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. Annual Reviews in Microbiology 45(1): 137-161.
37. Erlich HA. (1989) PCR technology. principles and applications for DNA amplification, Stockton press.
38. Altunçul H. (2001), Kemik Dokudan DNA Çekitleme ve Tipleme Yöntemleri, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.
39. Gemas VJV, Almadanim MC, Tenreiro R, Martins A, Fevereiro P. (2004) Genetic diversity in the Olive tree (Olea europaea L. subsp. europaea) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution 51(5): 501-511.
40. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic acids research 23(21): 4407-4414.
41. Butler JM. (2005) Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers, Academic Press.
42. Hagelberg E, Gray IC. ve Jeffreys AJ. (1991) Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. Nature 352(6334): 427-429.
43. Tamaki K. ve Jeffreys AJ. (2005) Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. Legal Medicine 7(4): 244-250.

44. Jeffreys AJ. (1987) Highly Variable Minisatellites And DNA Fingerprints. Biochemical Society Transactions, 15: 309-317.
45. Connealy PM. (1994) Human Genetic Polymorphism. Genetic Stability and Recombinant Product Consistency Dev. Biol Stand. Basel, Karger. Edited By Brown F. Lubinieck A.S. Vol 83: 107-110.
46. Filoğlu G. (1999), 7 Tetramerik STR Lokusunun Kriminal İdentifikasyondaki Önemi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.
47. Edwards AL, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. American journal of human genetics 49(4): 746.
48. Rubinsztein DC, Amos W, Leggo J, Goodburn S, Jain S, Li, SH, Margolis RL, Ross CA, Ferguson Smith MA. (1995) Microsatellite evolution—evidence for directionality and variation in rate between species. Nature genetics 10(3): 337-343.
49. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W. (2001) International Human Genom Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409(6822): 860-921.
50. http://science.kennesaw.edu/~rrascati/forensicpolymorphs.html. Erişim Tarihi: 15. 06. 2015
51. http://www.cstl.nist.gov/strbase/images/th01.jpg. Erişim Tarihi: 08. 06. 2015
52. http://www.cstl.nist.gov/strbase/images/d21s11.jpg. Erişim Tarihi: 08. 06. 2015
53. http://www.cstl.nist.gov/strbase/images/se33.jpg. Erişim Tarihi: 08. 06. 2015
54. Möller A, Meyer e. ve Brinkmann B. (1994) Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11. International journal of legal medicine 106(6): 319-323.
55. Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P. (1994) Variation in short tandem repeat sequences—a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. International journal of legal medicine 107(1): 13-20.
56. Mayr W. (1995) DNA Recommendations-1994 Report Concerning Further Recommendations of the DNA Commission of the ISFH Regarding PCR-Based Polymorphisms in STR (Short Tandem Repeat) Systems. Vox Sanguinis 69(1): 70-71.
57. Weber JL. ve May PE. (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. American journal of human genetics 44(3): 388.

58. Butler JM, Coble MD. ve Vallone PM. (2007) STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. Forensic science, medicine, and pathology 3(3): 200-205.
59. Bianchi L. ve Liò P. (2007) Forensic DNA and bioinformatics. Briefings in bioinformatics 8(2): 117-128.
60. https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis. Erişim Tarihi: 19. 05. 2015
61. Butler JM, Shen Y. ve McCord BR. (2003) The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. Journal of forensic sciences 48(5): 1054-1064.
62. Gill P, Fereday L, Morling N, Scneider PM. (2006) The evolution of DNA databases—recommendations for new European STR loci. Forensic Science International 156(2): 242-244.
63. Børsting C, Sanchez JJ. ve Morling N. (2007) Application of SNPs in forensic casework. Molecular Forensics: 91.
64. Budowel B. ve Guerrieri R. (2004) An assessment of whether SNPs will replace STRs in national DNA databases- joint considerations of the DNA working group of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDAM) Sci Justice 44: 51-53.
65. Butler JM. (2001) Forensic DNA typing: biology & technology behind STR markers, Academic Press.
66. http://www.ibbl.lu/personalised-medicine/what-is-personalised-medicine/dna-genes-snps/. Erişim Tarihi: 14. 06. 2015
67. Goodwin W, Linacre A. ve Hadi S. (2007) An Introduction to Forensic Genetics, pp:12-13, 51-61, 115-121 John Wiley & Sons Ltd.
68. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL. (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature 409(6822): 928-933.
69. http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en. Erişim Tarihi: 19. 05. 2015
70. Bell PA, Chaturvedi S, Gelfand CA, Huang CY, Kochersperger M, Kopla R, Modica F, Pohl M, Varde S, Zhao R. (2002) SNPstream UHT: ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenomics and drug discovery. Biotechniques 32(Suppl 2): S70-S77.
71. Phillips C, Fang R, Ballard D, Fondevila M, Harrison C, Hyland F, Musgrave Brown E, Proff C, Ramos Luis E, Sobrino B. (2007) Evaluation of the Genplex SNP typing system

and a 49plex forensic marker panel. Forensic Science International: Genetics 1(2): 180-185.

72. Bulbul O, Phillips C, Argac D, Shahzad MS, Fondevilla M, Acar E, Aradas AF, Filoglu G, Altuncul H. (2009) Internal validation of 29 autosomal SNP multiplex using a ABI 310 genetic analyser. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2(1): 129-130.
73. Griffin TJ. ve Smith LM. (2000) Genetic identification by mass spectrometric analysis of single-nucleotide polymorphisms: ternary encoding of genotypes. Analytical chemistry 72(14): 3298-3302.
74. Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y, Budowle B. (1999) Electrophoresis, 20:1682- 1696.
75. Rodriguez Murillo L. ve Salem RM. (2013) Insertion/Deletion Polymorphism. Encyclopedia of Behavioral Medicine, Springer: 1076-1076.
76. Mechanisms: Genetic Variation: Types of Mutations. (2009) Evolution 101: Understanding Evolution For Teachers. University of California Museum of Paleontology. Understanding Evolution For Teachers Home. Retrieved on September 19.
77. Brown TA. (2007) 16 Mutations and DNA Repair. Genomes 3. Garland Science. p. 510. ISBN 978-0-8153-4138-3.
78. Faraone SV, Tsuang MT, Tsuang DW. (1999) 5 Molecular Genetics and Mental Illness: The Search for Disease Mechanisms: Types of Mutations. Genetics of Mental Disorders: A Guide for Students, Clinicians, and Researchers. Guilford Press. p. 145. ISBN 978-1-57230-479-6.
79. Shmilovici A. ve Ben Gal I. (2007) Using a VOM model for reconstructing potential coding regions in EST sequences. Computational Statistics 22(1): 49-69.
80. http://www.genome.gov/Pages/Hyperion//DIR/VIP/Glossary/Illustration/Pdf/insertion.pdf. Erişim Tarihi: 08. 06. 2015
81. Lewis R. (2004) Human Genetics: Concepts and Applications (6th ed.). McGraw Hill. ISBN 0072951745.
82. McLean CY, Reno PL, Pollen AA, Bassan AI, Capellini TD, Guenther C, Indjeian VB, Lim X, Menke DB, Schaar BT. (2011) Human-specific loss of regulatory DNA and the evolution of human-specific traits. Nature 471(7337): 216-219.
83. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Deletion.png. Erişim Tarihi: 08.09.2015

84. de Sanctis L, Corrias A, Romagnolo D, Di Palma T, Biava A, Borgarello G, Gianino P, Silvestro L, Zannini M, Dianzani I. (2004) Familial PAX8 small deletion (c. 989_992delACCC) associated with extreme phenotype variability. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 89(11): 5669-5674.
85. Eichler EE. (2006) Widening the spectrum of human genetic variation. Nature genetics 38(1): 9-11.
86. McCarroll SA, Hadnott TN, Parry GH, Sabeti PC, Zody MC, Barrett JC, Dallaire S, Gabriel SB, Lee C, Daly MJ. (2006) Common deletion polymorphisms in the human genome. Nature genetics 38(1): 86-92.
87. Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NST, Abeysinghe S, Krawczak M, Cooper DN. (2003) Human gene mutation database (HGMD®): 2003 update. Human mutation 21(6): 577-581.
88. Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. (2002) Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. The American Journal of Human Genetics 71(4): 854-862.
89. Mills RE, Pittard WS, Mullaney JM, Farooq U, Creasy TH, Mahurkar AA, Kemeza DM, Strassler DS, Ponting CP, Webber C. (2011) Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. Genome research 21(6): 830-839.
90. Consortium GP. (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. Nature 467(7319): 1061-1073.
91. Bhangale T. (2006) Small Insertion-deletion Polymorphisms in the Human Genome: Characterization and Automation of Detection by Resequencing, ProQuest.
92. Investigator® DIPplex Kit Handbook, (Qiagen).
93. Abhaya Indrayan (2012). Medical Biostatistics. CRC Press. ISBN 978-1-4398-8414-0.
94. Tübitak MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, (2003). Genetik Çalışmalarda Biyoinformatik Uygulamalar: Genom Veri Bankaları ve DNA Dizi Analizi Programları Uygulamalı Eğitim Kitabı. Gebze, Kocaeli.
95. Beardmore J. ve Abreu Grobois F. (1983) Taxonomy and evolution in the brine shrimp Artemia. Academic Press: London, UK.
96. Adam C. (2011) Essential mathematics and statistics for forensic science, John Wiley & Sons.
97. Promega Powerstat Excel File.
98. Wright S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution: 395-420.

99. Nei M. (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia university press.

100. Turrina S, Filippini G. ve De Leo D. (2011) Forensic evaluation of the Investigator DIPplex typing system. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 3(1): e331-e332.

101. Pepinski W, Abreu Glowacka M, Koralewska Kordel M, Michalak E, Kordel K, Niemcunowicz Janica A, Szeremeta M, Konarzewska M. (2013) Population genetics of 30 INDELs in populations of Poland and Taiwan. Molecular biology reports 40(7): 4333-4338.

102. Neuvonen AM, Palo JU, Hedman M, Sajantila A. (2012) Discrimination power of Investigator DIPplex loci in Finnish and Somali populations. Forensic Science International: Genetics 6(4): e99-e102.

103. Seong KM, Park, JH, Hyun YS, Kang PW, Choi DH, Han MS, Park KW, Chung KW. (2014) Population genetics of insertion–deletion polymorphisms in South Koreans using Investigator DIPplex kit. Forensic Science International: Genetics 8(1): 80-83.

104. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index. Erişim Tarihi: 05. 05. 2015

105. Manta F, Caiafa A, Pereira R, Silva D, Amorim A, Carvalho EF, Gusmão L. (2012) Indel markers: genetic diversity of 38 polymorphisms in Brazilian populations and application in a paternity investigation with post mortem material. Forensic Science International: Genetics 6(5): 658-661.

106. Sobrino B, Lareu M, Brion M, Carracedo A. (2004) SNP genotyping with single base extension-tag microarrays. International Congress Series, Elsevier.

107. Hollard C, Mendisco F, Keyser C, Crubézy E, Ludes B. (2011) First application of the Investigator DIPplex indels typing kit for the analysis of ancient DNA samples. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 3(1): e393-e394.

108. Wei YL, Qin CJ, Dong H, Jia J, Li CX. (2014) A validation study of a multiplex INDEL assay for forensic use in four Chinese populations. Forensic Science International: Genetics 9: e22-e25.

EKLER

Ek.1 Aydınlatılmış Onam Formu

"Bir yüksek lisans tezi çalışmasına 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 doktorlara veya araştırmacılara sorarak bilgi edininiz."

Çalışmanın Adı: 30 İnsersiyon/Delesyon (Indel) Lokusunun Türkiye'deki Polimorfizmi

Bu çalışma bir Yüksek Lisans Tez çalışmasıdır.

Adli Bilimlerde bir suçun aydınlatılması için genetik bilgiden yararlanılmaktadır. Gerek cinsel saldırı kurbanlarının ve zanlılarının gerekse doğal afetler sonucu yaşamlarını yitirmiş veya kayıp insanların kimliğinin belirlenmesi için DNA üzerinde yer alan genetik işaretlerin toplumda görülme sıklıklarının belirlenmesi gerekmektedir. Aynı zamanda akrabalık ilişkilerinin saptanmasında da (annelik veya babalık tayini gibi) içinde söz konusu genetik işaretler kullanılabilmektedir. Yukarıda bahsedilen olguların çözümünde bazı özel durumlarda rutinde kullanılan genetik işaretlerde sonuca ulaşmak mümkün olamamaktadır. Söz konusu olguların çözümünü sağlayacak alternatif bir yöntem otozomal kromozomlar üzerinde yer alan INDEL polimorfizmi (insersiyon/delesyon polimorfizmi) olarak adlandırılan genetik işaretler kullanılmaktadır. **Bu araştırmanın amacı otozomal kromozomlar üzerinde bulunan 30 INDEL lokusunun Türk toplumu için polimorfik olup olmadığını ve toplumdaki dağılım oranlarını belirlemektir.**

Araştırmanın deneysel kısımları; alınan kan örneğinden DNA izole edilecek, miktarı belirlenecek, PCR tekniği ile 30 INDEL lokusu çoğaltılacak ve PCR ürünlerinin elektroforezi ve analizi yapılacaktır ABI PRISM® 3130 Genetik Analizör (Life Technologies). Sonuçlar belirli yazılımlar kullanılarak, alel frekansları hesaplanacaktır. Son olarak tez yazım aşamasına geçilecektir.

Araştırmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına bağlıdır. Araştırmaya katıldıktan sonra araştırmanın her hangi bir aşamasında her hangi bir gerekçe göstermeksizin ayrılabilirsiniz. Bunun için herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmanız söz konusu değildir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde araştırma dışı bırakılacağınız

bildirilecektir. Araştırma ile ilgili sizden herhangi bir para talibinde bulunulmayacaktır ve her hangi bir ödeme yapılmayacaktır. Bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kurumundan (SGK) herhangi bir ücret alınmayacaktır.

İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Bakanlık ve diğer ilgili sağlık otoriteleri orijinal tıbbi kayıtlarınıza doğrudan erişimleri bulunabilecektir. Ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır. İlgili mevzuat gereğince kimliğinize ait kayıtlar gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanmayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır.

Araştırma hakkında, kendi haklarınız hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir bilgi temin edebilmeniz için araştırmacı Arzu Düvenci' ye ait günün 24 saatinde ulaşabileceğiniz telefon numarası 0506 901 99 00 'dır.

Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü; 250 kişidir. Gönüllülerden 2 ml EDTA'lı tüpe tam kan alınacaktır. Kan alma işleminin komplikasyonu ve riski yoktur. Yalnızca kan alma işlemi sırasında hafif bir acı hissedilebilir ve hafif bir kızarıklık olabilir.

Elde edilecek olan Biyolojik Materyal; Proje yürütücüsü tarafından tıbbi personel yönetiminde ve denetiminde gerekli örnekler alınacaktır Araştırma ile ilgili analizler İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü Moleküler Genetik Laboratuarında yapılacaktır. Toplanan örnekler yurt dışına analiz amacı ile gönderilmeyecektir.

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 ayrılabileceğimi veya kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından da araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

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

"30 İnsersiyon/Delesyon (Indel) Lokusunun Türkiye'deki Polimorfizmi" tez çalışması kapsamında alınan kanın (Gönüllü tarafından uygun olan şık işaretlenmelidir)

☐ *Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.*

☐ *İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.*

☐ *Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum."*

Gönüllünün Adı:	**Yetkin Araştırmacının Adı:** Arzu
Gönüllünün Soyadı:	**Yetkin Araştırmacının Soyadı:** Düvenci
Gönüllünün İmzası:	**Yetkin Araştırmacının İmzası:**
Tarih:	**Tarih:**
Tel:	**Tel:** 0506 901 99 00

Ek 2. Etik Kurul Onayı

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: A-15	Tarih:07 Mayıs 2013
	Yard.Doç.Dr. Gönül FİLOĞLU'nun danışmanlığında Yüksek Lisans Öğr. Arzu DÜVENCİ'nin sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof. Dr. Fatiş ALTINDAŞ	

ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	**Uzmanlık Alanı**	**Kurumu**	**Cinsiyet**	**İlişki ***	**Katılım ****	**İmza**
Prof. Dr. Fatiş ALTINDAŞ (başkan)	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Öner SÜZER (başkan yardımcısı)	Tıbbi Farmakoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR (raportör)	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mehmet Rıza ALTIPARMAK	İç Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mahmut Reha BAYAR	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Sebahattin SAİP	Nöroloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Fahri ERDOĞAN	Ortopedi ve Travmatoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mehmet Faik ÖZÇELİK	Genel Cerrahi	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Nuran Şenel BEŞE	Radyasyon Onkolojisi	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Suphi VEHİD	Halk Sağlığı	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Ertan YURDAKOŞ	Fizyoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Hatun Hanzade DOĞAN	Deontoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Muhlis Cem AR	İç Hastalıkları	İst. Eğitim ve Araştırma Hast.	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Avukat Ayfer DİKMEN	Ticaret ve Sağlık Hukuku	Serbest Hukuk Bürosu	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Zümrüt GAMLI	Emekli Öğretmen	Sivil Üye	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile İlişki ** :Toplantıda Bulunma

Ek 3. 250 Kişiye Ait 30 INDEL Profilleri

NO	XX/XY	D77-/+	D45-/+	D131-/+	D70-/+	D6-/+	D111-/+	D58-/+	D56-/+	D118-/+	D92-+	D93-/+	D99-/+	D88-/+	D101-/+	D67-/+	D83-/+	D114-/+	D48-/+	D124-/+	D122-/+	D125-/+	D64-/+	D81-/+	D136-/+	D133-/+	D97-/+	D40-+	D128-/+	D39-/+	D84-/+
1	XX	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+
2	XX	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-
3	XY	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-
4	XX	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+
5	XY	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+
6	XX	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+
7	XY	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+
8	XX	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+
9	XX	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+
10	XX	-/-	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+
11	XX	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+
12	XY	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+
13	XY	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-
14	XX	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+
15	XX	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	X	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-
16	XX	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-
17	XY	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+
18	XX	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+
19	XY	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+
20	XX	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+
21	XX	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+
22	XX	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-
23	XY	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+
24	XY	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	X	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+	X	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	X	-/-
25	XX	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+
26	XY	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+
27	XX	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+
28	XY	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-
29	XX	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
30	XX	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+
31	XX	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+
32	XY	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-
33	XY	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+
34	XX	-/-	--	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+
35	XX	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+
36	XY	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+
37	XY	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+
38	XX	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+
39	XY	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+
40	XX	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+
41	XY	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+
42	XY	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+
43	XY	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
44	XY	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+
45	XY	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
46	XX	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+
47	XX	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/-
48	XX	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+
49	XX	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+
50	XX	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+

NO	XX/XY	D77-/+	D45-/+	D131-/+	D70-/+	D6-/+	D111-/+	D58-/+	D56-/+	D118-/+	D92-+	D93-/+	D99-/+	D88-/+	D101-/+	D67-/+	D83-/+	D114-/+	D48-/+	D124-/+	D122-/+	D125-/+	D64-/+	D81-/+	D136-/+	D133-/+	D97-/+	D40-+	D128-/+	D39-/+	D84-/+
51	XX	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+
52	XX	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+
53	XX	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-
54	XX	+/+	+/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+
55	XX	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+
56	XX	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+
57	XX	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+
58	XX	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+
59	XX	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-
60	XX	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+
61	XX	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+
62	XX	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+
63	XY	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-
64	XX	+/+	+/+	-/+	-/+	X	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+
65	XX	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	X	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	X	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	X	X	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/-
66	XY	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+
67	XX	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+
68	XX	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
69	XY	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-
70	XY	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+
71	XY	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+
72	XY	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+
73	XX	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+
74	XY	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+
75	XY	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+
76	XY	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+
77	XY	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
78	XY	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	X
79	XY	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+
80	XY	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	X	X	-/+	-/+	-/-	-/-	X	-/-	X
81	XX	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-
82	XX	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	-/+
83	XY	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+
84	XY	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+
85	XX	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+
86	XX	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+
87	XX	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+
88	XX	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+
89	XY	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+
90	XY	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+
91	XY	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+
92	XX	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+
93	XY	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+
94	XX	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+
95	XX	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+
96	XX	-/-	-/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+
97	XY	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+
98	XY	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+
99	XX	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-
100	XY	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	-/-

NO	XX/XY	D77-/+	D45-/+	D131-/+	D70-/+	D6-/+	D111-/+	D58-/+	D56-/+	D118-/+	D92-+	D93-/+	D99-/+	D88-/+	D101-/+	D67-/+	D83-/+	D114-/+	D48-/+	D124-/+	D122-/+	D125-/+	D64-/+	D81-/+	D136-/+	D133-/+	D97-/+	D40-+	D128-/+	D39-/+	D84-/+
101	XX	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-
102	XX	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-
103	XX	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+
104	XY	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+
105	XX	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+
106	XX	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+
107	XX	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+
108	XY	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+
109	XX	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+
110	XY	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+
111	XY	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+
112	XX	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+
113	XY	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+
114	XX	-/-	+/+	+/+	-/-	X	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	X	-/+	-/-	-/+	+/+	X
115	XY	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-
116	XY	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+
117	XX	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	+/+
118	XX	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+
119	XY	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+
120	XX	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	X	-/-	X	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	X
121	XX	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+
122	XX	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+
123	XY	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+
124	XX	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+
125	XY	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+
126	XY	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+
127	XY	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+
128	XX	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-
129	XX	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+
130	XX	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+
131	XY	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+
132	XX	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+
133	XX	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+
134	XX	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+
135	XY	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+
136	XY	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-
137	XY	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-
138	XY	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-
139	XY	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-
140	XY	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+
141	XX	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+
142	XX	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+
143	XY	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+
144	XY	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
145	XX	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+
146	XY	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+
147	XY	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+
148	XY	+/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
149	XX	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-
150	XY	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+

NO	XX/XY	D77-/+	D45-/+	D131-/+	D70-/+	D6-/+	D111-/+	D58-/+	D56-/+	D118-/+	D92-+	D93-/+	D99-/+	D88-/+	D101-/+	D67-/+	D83-/+	D114-/+	D48-/+	D124-/+	D122-/+	D125-/+	D64-/+	D81-/+	D136-/+	D133-/+	D97-/+	D40-+	D128-/+	D39-/+	D84-/+
151	XY	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+
152	XY	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+
153	XY	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+
154	XY	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+
155	XY	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
156	XX	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
157	XX	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+
158	XX	-/-	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	X	-/-	-/-	X	+/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	X	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	X
159	XX	X	X	-/-	X	-/-	-/+	+/+	X	X	X	X	+/+	-/-	X	X	-/-	-/-	-/+	+/+	X	-/-	+/+	X	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	X	X
160	XY	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+
161	XY	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+
162	XX	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	X	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+
163	XY	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	X	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
164	XY	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+
165	XY	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	X	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	X	-/-	+/+	X	-/+	+/+	-/+	-/+	X	-/-	-/+	+/+
166	XX	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+
167	XY	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+
168	XX	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+
169	XY	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
170	XY	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+
171	XY	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+
172	XX	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+
173	XY	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+
174	XX	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+
175	XY	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+
176	XX	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+
177	XX	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	X	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	X	-/-	+/+	-/-	-/-	X	+/+	-/+	+/+
178	XY	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+
179	XY	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+
180	XY	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-
181	XY	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+
182	XY	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+
183	XY	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-
184	XY	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+
185	XY	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+
186	XX	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+
187	XY	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+
188	XY	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+
189	XX	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	X	-/-	-/+
190	XY	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	X	-/-	+/+	X	-/-	-/-	-/-	+/+
191	XY	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-
192	XY	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+
193	XY	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-
194	XX	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+
195	XX	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+
196	XX	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	X	-/-	-/+	-/-	-/+
197	XX	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	X	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	X	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	X
198	XY	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-
199	XY	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	X	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+
200	XY	-/-	+/+	X	+/+	+/+	+/+	X	+/+	X	X	X	X	X	-/-	X	X	X	-/+	+/+	X	+/+	X	+/+	+/+	-/-	X	+/+	+/+	X	-/+

NO	XX/XY	D77-/+	D45-/+	D131-/+	D70-/+	D6-/+	D111-/+	D58-/+	D56-/+	D118-/+	D92-+	D93-/+	D99-/+	D88-/+	D101-/+	D67-/+	D83-/+	D114-/+	D48-/+	D124-/+	D122-/+	D125-/+	D64-/+	D81-/+	D136-/+	D133-/+	D97-/+	D40-+	D128-/+	D39-/+	D84-/+
201	XY	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
202	XY	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+
203	XY	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+
204	XX	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+
205	XY	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
206	XY	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+
207	XX	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+
208	XY	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+
209	XY	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
210	XY	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
211	XX	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+
212	XX	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-
213	XY	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/-	X	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	X	-/-	-/+	-/+
214	XY	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+
215	XY	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+
216	XY	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+
217	XY	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+
218	XX	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+
219	XY	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+
220	XY	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+
221	XY	-/-	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+
222	XY	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+
223	XY	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-
224	XY	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+
225	XX	-/+	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+
226	XY	-/-	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	X	+/+	+/+	X	+/+	+/+	-/+	+/+	X	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-
227	XX	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+
228	XY	-/-	-/-	-/+	+/+	CA	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+
229	XX	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+
230	XX	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+
231	XY	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-
232	XY	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+
233	XX	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+
234	XX	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+
235	XX	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	X	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+
236	XX	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+
237	XX	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+
238	XY	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-
239	XY	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	+/+
240	XY	-/-	-/-	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+
241	XX	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-
242	XY	-/+	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/+	-/+	+/+	-/+	+/+
243	XX	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+
244	XY	-/+	+/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+	-/-	-/-	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-
245	XY	-/+	+/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	-/-	-/+	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/-	-/+
246	XY	-/+	-/+	-/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+
247	XY	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	X	-/+	X	+/+	-/-	-/-	-/+	+/+	-/-	X	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	X	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+
248	XX	-/-	-/-	-/-	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	-/+	-/-	+/+
249	XY	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	+/+	-/-	-/+	-/+	+/+	-/-	-/+	+/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+	-/+	-/+	-/+	+/+
250	XY	-/-	-/+	-/-	-/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	-/+	-/-	+/+	-/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/+

ÖZGEÇMİŞ

Ad- Soyad: Arzu DÜVENCİ
Doğum Tarihi: 17.06.1985
Doğum Yeri: İnegöl / BURSA
E-Posta: arz_u@hotmail.com

Egitim Bilgileri:

1999-2004 İnegöl Turgutalp Lisesi
2005- 2010 Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyet Fakültesi Biyoloji Bölümü
2011-2015 İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü (Yüksek Lisans)

Sertifika:

TS EN ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetimi Sistemleri Sertifika Eğitimi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 2008.
Diksiyon Semineri, Aktif Felsefe, Eskişehir, 2010.
Uygulamalı Biyoistatistik Eğitimi, Acıbadem Üniversitesi, 2015.

İş Tecrübeleri:

İnegöl Devlet Hastanesi Biyokimya, Mikrobiyoloji ve Patoloji Laboratuvarı, (Temmuz-Ağustus) 2009, Stajyer.

Türkiye'de Mitokondriyal DNA Polimorfizmi**,** Destekleyen kuruluş: T.C İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği, 2009 Proje No: 4415, yardımcı araştırmacı.

Akrep Venomlarından Elde Edilen Enzimlerin Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2009-2010, Bitirme Projesi.

İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, 2013-2014, Kısmi Zamanlı Öğrenci.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Posterler:

Havva Altuncul, Omer Karatas, **Arzu Duvenci**, Akın Katoglu, Ozlem Bulbul, Gonul Filoglu, Sequencing Analysis of Mitochondrial DNA Coding Region (8389 to 8865), WFF (World Forensic Festival), 12-13 October, Seul, South Korea 2014.

H. Altuncul, A. Katoglu, Y. Demirbas, O. Bulbul, I. Tavaci, **A. Duvenci**, O. Karatas, G. Rayimoglu, G. Filoglu , Mitochondrial DNA Population Data of HVI and HVII Sequences from Turkish Individuals , The 25th ISFG Congress Melbourne, Australia, September 2 – 6, 2013.

H. Altuncul, O. Bulbul, I. Tavaci, **A. Duvenci**, Y. Demirbas, A. Katoglu, M. Olcen, D. Argac, G. Filoglu, Development of a 9 Mitochondrial SNPs Multiplex for Turkish population The 25th ISFG Congress Melbourne, Australia, September 2 – 6, 2013.

H. Altuncul, I. Tavaci, **A. Duvenci**, O. Bulbul, G. Filoglu, G. Rayimoglu, Polymorphism of the 52 MtSNPs in Turkish Population, BAFS 9th Annual Meeting 12-15 June, Istanbul, Turkey 2013.

Ozlem Bulbul, **Arzu Duvenci**, Ilksen Tavacı, Yasemin Demirbaş, Omer Karatas, Fulya Eylem Yediay, Gonul Filoglu, Havva Altuncul, Optimisation of the 8 Mitochondrial SNPs Using Minisequencing Technique Institute of Forensic Sciences, The 22nd IALM Congress 5 - 8 July, Istanbul, Turkey 2012.

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Oral Sunumlar:

Arzu Duvenci, Havva Altuncul, Ozlem Bulbul, Ilksen Tavaci, Yasemin Demirbas, Gonul Filoglu, A New Multiplex MtSNPs Set for Turkish Population, WFF (World Forensic Festival), 12-13 October, Seul, South Korea 2014.

Arzu Duvenci, Gonul Filoglu, Ozlem Bulbul, Gulten Rayimoglu, Havva Altuncul, Genetic Polymorphisms of 30 INDEL Loci in Turkey, WFF (World Forensic Festival), 12-13 October, Seul, South Korea 2014.