

**T.C.**  
**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**  
**ADLI TIP ENSTİTÜSÜ**

**Danışman: Yard. Doç. Dr. Havva Altunçul**

**ESKİ VE BOZULMUŞ ÖRNEKLERDE MITOKONDRIYAL DNA**  
**DİZİNLENMESİ**

**FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Selçuk Erdem**

**Moleküler Biyolog**

**İstanbul- 2011**

Istanbul, 20 Temmuz 2011

**İ.Ü.ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA**

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 15.maddesi uyarınca Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nın yüksek lisans öğrencisi Selçuk ERDEM'in

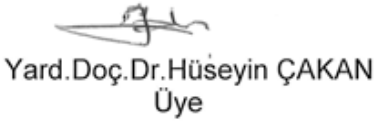
"Eski ve Bozulmuş Örneklerde Mitokondriyal DNA Dizinlemesi"

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. Salih CENGİZ  
Jüri Başkanı

  
Doç. Dr. Hakan BERMEK  
Üye

  
Yard. Doç. Dr. Hüseyin ÇAKAN  
Üye

  
Yard. Doç. Dr. Havva ALTUNÇUL  
Danışmanı

  
Yard. Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU  
Üye

## **TEŞEKKÜR**

*Yüksek lisans tezimin gerçekleşmesinde katkıda bulunan İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. İmdat ELMAS ve Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı değerli hocamız Prof. Dr. Salih CENGİZ' e, çalışmam boyunca bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan ve karşılaştığım problemlerin çözümünde deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Yard. Doç. Dr. Havva ALTUNÇUL'a, bilgi ve deneyimleriyle tezime katkıda bulunan Yard. Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU'na, güleryüzü ve desteği için Gülten RAYİMOĞLU'na, yardımlarından dolayı GENOMED A.Ş' den Tanju Basmacı'ya, çalışmam boyunca bana verdiği destek ve moral için sevgili arkadaşım Ayşegül Merve ÖLÇEN'e ve sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili aileme,*

*Teşekkür ederim...*

*Selçuk Erdem*

Bu tez çalışması 4418 proje numarasıyla İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

**KISALTMALAR:**

A	Adenin
Ark	Arkadaşları
ATP	Adenozin trifosfat
bç	Baz çifti
bkz	Bakınız
C	Sitozin
CCD	Charge coupled device
CE	Kapiler elektroforez
CSB	Conserved sequence box
D lopp	Displacement loop
ddNTP	Dideoksiribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTT	Dithiothreitol
ETS	Elektron taşıma sistemi
EXO 1	Exonuclease 1
Fam	Carboxyfluorescein
FP	Flavoprotein
G	Guanin
H zinciri	Ağır zincir

HV1	İleri değişken bölge 1
HV2	İleri değişken bölge 2
HV3	İleri değişken bölge 3
İns	İnsersiyon
JOE	Carboxy-4', 5'-dichloro-2', 7'-dimetoxyfluorescein
L zinciri	Hafif zincir
M	Molarite
mRNA	Messenger RNA
mtDNA	Mitokondriyal DNA
ng	Nanogram
nucDNA	Çekirdek DNA'sı
Oh	Ağır zincir replikasyon orijini
Ort	Ortalama
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
Ph	Ağır zincir promotör bölgesi
PPi	Pyrophosphate
RNA	Ribonükleik Asit
ROX	Carboxy-X-rhodamine
Rpm	Revolutions per minute

rRNA	Ribosomal RNA
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
ssDNA	Tek zincirli DNA (Single-Stranded DNA)
STR	Mikrosatelit (Short tandem repeat)
T	Timin
TAMRA	Carboxytetramethyl-rhodamine
TAS	Termination associated sequences
tRNA	Transfer RNA
VNTR	Minisatelit (Variable Number Tandem Repeat)

## İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR: .....	III
ŞEKİL LİSTESİ .....	IX
TABLO LİSTESİ .....	XI
1 GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Mitokondriyal DNA .....	2
2.2 Mitokondri DNA'sı transkripsiyon ve gen anlatımı.....	4
2.3 Mitokondri DNA'sının replikasyonu .....	4
2.3.1 Heteroplazmi .....	5
2.4 Kıl Örneklerinde DNA analizleri .....	6
2.4.1 Kıl Embriyolojisi.....	7
2.4.2 Kıl Histolojisi .....	8
2.5 Mitokondriyal DNA'nın adli bilimlerdeki önemi .....	11
2.6 MtDNA dizin analizi metodları.....	12
2.6.1 Sanger Yöntemi.....	12
A. Shotgun dizilemesi .....	13
B. Flüoresan boyaların kullanımı.....	14
C. Dizinleme reaksiyonu ürünlerinin elektroforetik analizi.....	15
2.6.2 Ekzonukleaz aktivitesi ile tek nükleotid dizinleme yöntemi.....	16



2.6.3	Maxam Gilbert yöntemi .....	17
2.6.4	Gelecek nesil (Next Generation) DNA dizinleme yöntemleri .....	18
A.	Pirosekanslama (Pyrosequencing).....	18
D.	Illumina Yöntemi .....	19
E.	Gelecek nesil Dizinleme yöntemlerinin adli bilimlerde kullanım alanları: .....	20
3	GEREÇ VE YÖNTEM .....	21
3.1	Çalışmanın Planı .....	21
3.2	Örneklerin Toplanması.....	22
3.3	DNA İzolasyonu.....	22
3.4	DNA İzolatlarındaki DNA Miktarının Belirlenmesi.....	22
3.5	Primerlerin Hazırlanması .....	22
3.6	dNTP karışımının hazırlanması.....	23
3.7	Taq DNA polimeraz, 10X PCR tamponu, MgCl <sub>2</sub> çözeltilerinin hazırlanması .....	23
3.8	1. PCR aşaması (HV1 ve HV2 bölgelerinin çoğaltılması).....	23
3.9	1. PCR ürünlerinin saflaştırılması .....	24
3.10	2. PCR aşaması (Dizilemeye yönelik PCR).....	25
3.11	2. PCR ürünlerinin saflaştırılması .....	27
3.12	Saflaştırılmış ikinci PCR ürünlerinin kurutulması .....	28
3.13	Elektroforez aşaması .....	28
3.13.1	Örneklerin elektroforeze hazırlanması .....	28

3.13.2	Elektroforez .....	28
3.14	Sonuçların incelenmesi .....	29
4	BULGULAR .....	30
5	TARTIŞMA .....	49
6	ÖZET.....	57
7	SUMMARY .....	58
8	KAYNAKLAR.....	59
	EKLER.....	68
	Ek 1 DNA izolasyon Prosedürleri.....	68
	Ek 2 Florometrik yöntem ile DNA miktarının tayini.....	74
	Ek 3 DyeEx 2.0 spin kit çalışma mekanizması .....	75
	Ek 4 Tekrarlanabilirlik çalışmasına ait elektroforegramlar.....	76
	Ek 5 Aydınlatılmış Onam Formu .....	80
	Ek 6 İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulu Onayı.....	82
	ÖZGEÇMİŞ .....	83

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Mitokondri organelinin yapısı.....	2
Şekil 2. Mitokondri DNA'sının genomik haritası.....	3
Şekil 3. Saç kökü yapısının oluşumu.....	8
Şekil 4. Saçın yapısı .....	9
Şekil 5. Bir dideoksinükleotidin yapısı .....	13
Şekil 6. Dye-labelled primer (üst) ve dye-labelled terminator (alt) kimyası reaksiyonları karşılaştırması.....	16
Şekil 7. Exonukleaz aktivitesi ile dizinleme yöntemi şematik anlatımı.....	17
Şekil 8. Pyrosequencing yönteminin ana prensibi.....	19
Şekil 9. BigDye Terminator pozitif kontrol reaksiyonu elektroforegramı.....	32
Şekil 10. BigDye Terminator negatif kontrol reaksiyonu elektroforegramı .....	33
Şekil 11. 0.5 ng kontrol DNA ile yapılan dizin analizine ait elektroforegram.....	34
Şekil 12. 0.25 ng kontrol DNA ile yapılan dizin analizine ait elektroforegram.....	35
Şekil 13. 0.1 ng kontrol DNA ile yapılan sonuç alınmamış elektroforegram .....	36
Şekil 14.0.05 ng kontrol DNA ile yapılan sonuç alınmamış elektroforegram.....	37
Şekil 15 Dye Ex 2.0 Spin Kit çalışma mekanizması temsili şeması* .....	75
Şekil 16 Dördüncü kişinin sigara izmariti örneğinin HV2 bölgesine ait dizinleme elektroforegramı .....	76
Şekil 17 Dördüncü kişinin sigara izmariti yedi ay sonra tekrar çalışıldığında alınan elektroforegram .....	77

Şekil 18 Dördüncü kişinin sigara izmariti yedi ay sonra farklı bir kişi tarafından tekrar çalışıldığında alınan elektroforegram..... 78

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Shotgun dizileme yöntemi * .....	13
Tablo 2. DNA dizilemesinde kullanılan bazı florofor grupların spektral özellikleri .....	14
Tablo 3. Primerlerin dizileri ve 50 M'lik stok çözeltiler hazırlamak için eklenen distile su miktarları .....	23
Tablo 4. PCR bileşenleri konsantrasyonları ve eklenen miktarlar .....	24
Tablo 5. Birinci PCR parametreleri.....	24
Tablo 6. Exo-Sap karışımının hazırlanması .....	25
Tablo 7. BigDye Terminator 3.1 kiti içeriği.....	25
Tablo 8. Big Dye kiti içeriğindeki ddNTP'lar ve işaretlemede kullanılan flüoresan boyalar..	26
Tablo 9. İkinci PCR karışım tablosu .....	26
Tablo 10. İkinci PCR koşulları * .....	27
Tablo 11. ABI 310 dizin analizi parametreleri.....	29
Tablo 12. Kişisel eşyalar üzerinden izole edilen DNA miktarları .....	30
Tablo 13. Saç ve tırnaklardan elde edilen DNA miktarları tablosu .....	31
Tablo 14. Çalışılan örnekler tablosu .....	38
Tablo 15. Birinci olguya ait örneklerin dizin analiz sonuçları .....	39
Tablo 16. İkinci olguya ait örneklerin dizin analiz sonuçları.....	40
Tablo 17. Üçüncü olguya ait örneklerin dizin analiz sonuçları.....	40
Tablo 18. Dördüncü olguya ait örneklerin dizin analiz sonuçları .....	41

Tablo 19. Beşinci olguya ait örneklerin dizin analizi sonuçları .....	42
Tablo 20. HV1 ve HV2 bölgeleri için saptanan sonuçlar. ....	43
Tablo 21. Tüm olgularda belirlenen polimorfik noktalar .....	46
Tablo 22. Referans diziden farklılık gösteren noktaların dağılımı.....	48
Tablo 23 Tekrarlanabilirlik çalışmasında incelenilen bölgelerin uzunlukları.....	79

# 1 GİRİŞ VE AMAÇ

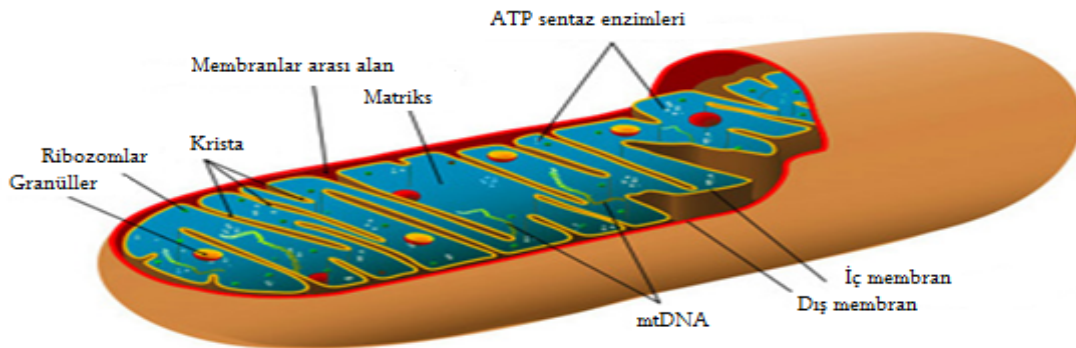
Adli bilimler olay yerinde başlar. Günümüzde, adli bilimlerde kullanılan gelişmiş teknolojiler sayesinde en karmaşık ve ardında iz bırakılmadığı düşünülen suçların bile çözülmesi mümkün hale gelmiştir. Deoksiribonükleik Asit (DNA) teknolojilerinin ve polimeraz zincir reaksiyonu uygulamalarının (Polymerase chain reaction, PCR) gelişmesi ile olay yerinden elde edilen son derece bozulmuş ve eser miktardaki biyolojik materyallerden analiz yapmak mümkün olmuştur. Adli DNA analiz yöntemlerinden önce biyolojik delillerin tanımlanması ve karşılaştırılması amacı ile kan grubu antijenleri, lökosit antijenleri, eritrosit enzimleri ve serum proteinleri gibi polimorfik sistemler kullanılmaktaydı. Ancak elde edilen delil niteliğindeki biyolojik materyalin glikoprotein veya protein yapıda olması, çok az miktarda ve bozulmuş olması nedeniyle analizini yapmak son derece güç olmaktadır. Moleküler DNA tekniklerinin gelişmesi, özellikle PCR'ın keşfiyle eser miktardaki biyolojik delillerin dahi yüksek güvenilirlikte analizi mümkün oldu. Tüm bu gelişmelere rağmen bazı durumlarda özellikle bozulmuş ve eser miktardaki biyolojik materyalden elde edilen çekirdek DNA'sından (nucDNA) başarılı bir profillemeye yapmak mümkün olmamaktadır. Çekirdek DNA'sının kullanılmadığı durumlarda, hücrenin DNA taşıyan bir diğer organeli olan mitokondriler içinde yer alan mitokondriyal DNA (mtDNA) kullanılmaktadır (Han ve ark. 2005). Mitokondriler hücre içinde çok sayıda buldukları için (~1000) nucDNA'ya oranla hasar görmemiş halde mtDNA elde edilme olasılığı oldukça yüksektir. Adli bilimlerde kimliklendirme çalışmalarında mtDNA'nın polimorfik bölgeleri kullanılmaktadır. En yaygın kullanım şekli kontrol bölgesinin (D loop) yüksek değişken bölgelerinin (HV1 ve HV2) dizin analizidir (Holland ve ark. 1999).

Bu tez çalışmasının amacı; saç, sigara izmariti, diş fırçası, tırnak gibi örneklerden DNA izolasyonu ve mitokondriyal DNA'nın ileri değişken (HV1 ve HV2) bölgelerinin dizin analizinin optimizasyonunun yapılmasıdır. Mitokondriyal DNA dizin analizi yönteminin optimizasyonu gerçekleştirildiğinde, mtDNA bilgisi, nükleer DNA ile çözülemeyen veya annenin olmadığı ancak anne tarafından soy bağının belirlenmesi gerektiğinde, çözüm için güvenilir bir yöntem olacaktır.

## 2 GENEL BİLGİLER

### 2.1 Mitokondriyal DNA

Mitokondri DNA'sı hücrelerde enerji üretiminden sorumlu bir organel olan mitokondrilerin içinde bulunur. Mitokondriler tüm ökaryot hücrelerde bulunan organellerdir. Oksidatif fosforilasyon işlemi ile hücrenin ihtiyaç duyduğu Adenozin trifosfat (ATP) moleküllerinin büyük bir kısmını üretirler. Mitokondriler bir iç, bir de dış membrandan oluşan çift membran sistemi ile çevrilidir (Şekil 1). Bu iki membranın arası periferal bölge olarak adlandırılır. İç zarın üzerinde ATP sentezinden sorumlu Elektron Taşıma Sistemi (ETS) proteinleri yer alır. Bu proteinler sırası ile Flavoprotein (FP), Sitokrom B, Koenzim Q, Sitokrom B2 ve Sitokrom A'dır (Sudbery ve ark. 2002). İç zar mitokondrinin içine doğru katlanmalar yapar ve bunlar Krista olarak adlandırılır. Kristalar mitokondri iç zarının yüzey alanını büyütürler. ATP sentezinden sorumlu ETS proteinleri iç zarın üzerlerinde buldukları için iç zarın alanı ile ATP sentezi oranı doğru orantılıdır. İç zarın içinde kalan alan matriks olarak adlandırılır (Cooper ve ark. 2004). Mitokondrilerin atalarının aerobik bakteriler olduğu düşünülmektedir. Ökaryot hücreler ile simbiyotik bir ilişki içine giren aerobik bakterilerin zamanla kendilerinden daha büyük olan bu hücrelerin içinde enerji üretiminden sorumlu bir organelle özgülleştiği düşünülmektedir. Bu hipotezi genom dizi analizleri de desteklemektedir. Yapılan araştırmalarda *Rickettsia prowazekii* adlı epidemik tifüs etmeni hücre içi bir parazit olan bakterinin DNA dizisi ile mtDNA dizisi arasında yüksek derecede benzerlik saptanmıştır. Bu nedenle mitokondrilerin *Rickettsia* bakterilerinin atalarından evrimleştiği düşünülmektedir (Andersson ve ark. 1998).

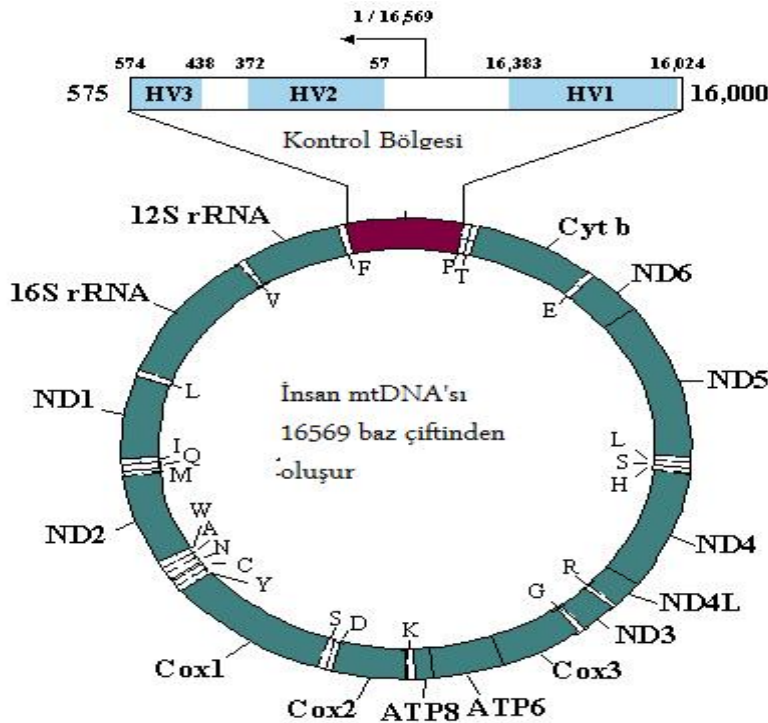


Şekil 1. Mitokondri organelinin yapısı

(<http://en.wikipedia.org/wiki/Mitochondrion>'den alıntıdır).



İnsan mitokondri DNA'sı (mtDNA) dairesel ve 16569 baz çifti uzunluğundadır (Şekil 2). Mitokondrilerin matriksinde yer alır. Kendini yarı saklı (semi konservatif) olarak eşler. mtDNA'nın büyüklüğü ve sayısı organizmadan organizmaya farklılık gösterir. Omurgalılarda mitokondri başına 5 ile 10 mtDNA molekülü bulunurken, bitkilerde bu sayı 20-40 kopyaya kadar çıkabilir. Yapısı çekirdek DNA'sına oranla basit olmakla birlikte 13 protein, 2 ribozomal RNA (rRNA) (12S ve 16S rRNA genleri) ve 22 transfer RNA (tRNA) olmak üzere 37 adet intronsuz gene sahiptir. mtDNA'da bulunan protein genleri mitokondride gerçekleşen solunum reaksiyonları için gerekli proteinleri kodlarlar. Ribozomal RNA ve transfer RNA genleri ise gen anlatımının gerçekleşmesi için gerekli olan rRNA ve tRNA moleküllerini kodlar. Bu genler Şekil 2'de gösterilmiştir. Mitokondrinin ihtiyaç duyduğu diğer bütün gen ürünleri ise nucDNA tarafından kodlanır ve sitoplazmadan mitokondri içine taşınır. Mitokondri DNA'sı genleri sıkışık bir şekilde aralarında gen dışı bölgeler olmayacak şekilde paketlenmiştir. Çift zincirli olan mtDNA molekülünün iki zincirinin baz içeriği birbirinden farklıdır. Ağır zincir H zinciri olarak adlandırılır ve guanin nükleotidleri bakımından zengindir. Hafif zincir ise L zinciri olarak adlandırılır ve sitozin nükleotidleri bakımından zengindir (Strachan ve ark. 2004).



**Şekil 2.** Mitokondri DNA'sının genomik haritası

([http://www.nfstc.org/pdi/Subject09/pdi\\_s09\\_m02\\_01\\_a.htm](http://www.nfstc.org/pdi/Subject09/pdi_s09_m02_01_a.htm)'den alıntıdır).

MtDNA baz dizisinde en yüksek polimorfizm, kodlama yapmayan kontrol bölgesi dizilerinde (1120 baz çifti boyunda) görülür (Bogehagen ve ark. 1974). Bu kontrol bölgesi 3 adet polimorfik yüksek değişken bölge içerir: HV1 (16024–16383), HV2 (73–354), HV3 (438–574) (Date Chong ve ark. 2004).

Mitokondri organellerinde gerçekleşen protein sentezi ve hücre solunumundan sorumlu bileşenler mtDNA ve nucDNA ürünlerinin karışımıdır. Başka bir deyişle mitokondri işlevlerini yerine getirmek ve mtDNA'sının replikasyon ve transkripsiyon işlemleri için nucDNA ürünlerine de ihtiyaç duyar. Organelde bulunan ribozomlar ise sitoplazmadaki ribozomlardan farklıdır.

## 2.2 Mitokondri DNA'sı transkripsiyon ve gen anlatımı

D-loop bölgesi her iki zincire ait promotör dizileri içerir. Ağır zincirin promotörü ( $P_H$ ) 392-445 baz çifti (bç) arasında yer almaktadır. Promotor bölgede üç tane değişmez baz dizileri olan Conserved Sequence Box (CSB) bulunmaktadır. Bu dizilerin yerleri; CSBI: 213-235, CSBII: 299-315, CSBIII: 346-363 baz çiftleri arasındadır. Mitokondri DNA'sının transkripsiyonu Displacement-loop (D-loop) bölgesindeki iki promotörden zıt yönlü olarak başlar. Transkripsiyon iki zincirde de eş zamanlı olarak gelişir ve iki zincirde tamamen transkripsiyona uğrar. Sentezlenen öncül RNA daha sonra kesilir ve olgun tRNA, Messenger RNA (mRNA) ve ribozomal RNA (rRNA) serbest kalır (Wallace ve ark. 1992). Mitokondri DNA'sında bazı kodonların kodladığı aminoasitler nucDNA ile farklılıklar gösterir. Normalde protein sentezini sonlandırıcı kodon olan UGA mtDNA tarafından yürütülen gen anlatımı aşamasında triptofan aminoasidini kodlar. Benzer şekilde normalde izolösin aminoasidini kodlayan AUA kodonu ise metionin şeklinde anlatılır. Sonlandırıcı kodonlar ise normalde arginin aminoasidi olarak anlatılan AGA ve AGG'dir. AUA ve AUU kodonları ise başlatıcı kodonlardır.

## 2.3 Mitokondri DNA'sının replikasyonu

MtDNA hücrenin nucDNA'sından bağımsız olarak kendini eşler. (Anderson ve ark, 1981). Mitokondriler, mtDNA'nın replikasyonundan sorumlu kendi DNA polimerazlarını (mtDNA polimeraz) içermektedir. Fakat MtDNA polimeraz nucDNA tarafından kodlanmaktadır. Her iki zincirin bir birinden ayrı replikasyon orijini vardır. Ağır zincirin replikasyon orijini D-loop kontrol bölgesinde yer alır. D-loop bölgesinde yer alan diğer

korunmuş dizi ise 16147-16172 baz çiftleri arasında yer alan Termination Associated Sequences adı verilen TAS kutusudur. (Watson ve ark. 1987).

Ağır zincirin replikasyon orijininin ( $O_H$ ) sentez başlar ve  $5' \rightarrow 3'$  saat yönünde ilerlerken H zinciri açılır. Yeni sentezlenen zincir L zincirin replikasyon orijinine geldiği anda ters yönde yeni L zincir sentezlenmeye başlar. Böylece iki zincirin replikasyonu birbirine ters yönde ilerler ve  $5' \rightarrow 3'$  yönünde devamlı sentez olduğu için Okazaki fragmentleri oluşmaz.  $O_H$ 'dan itibaren ilk sentezlenen ve TAS bölgesinde sonlanan 700 bç'lik bölgeye D-loop veya 7S bölgesi denir ve bu bölge kodlayıcı bölge değildir (Wallace ve ark. 1992). MtDNA replikasyonundaki hata oranı çekirdek DNA'sına oranla daha yüksektir ve bunun sonucu olarak hücrelerdeki ve dokulardaki mtDNA popülasyonlarında heteroplazmiye rastlanabilir (Kunkel ve ark. 1981).

### 2.3.1 Heteroplazmi

Heteroplazmiyi aynı bireyden kökenlenen örneklerde birden fazla mtDNA profilinin gözlemlenmesi olarak açıklayabiliriz. Heteroplazmi hücrelerin mtDNA'larında mutasyon meydana gelmesi ve bu mutasyonların sabitlenip yavru mitokondrilere de aktarılması sonucu oluşmaktadır (Bendall ve ark. 1996).

Mitokondri DNA'sının replikasyonundaki hata oranı çekirdek DNA'sına oranla daha yüksektir (Kunkel ve ark. 1981). MtDNA dizinlemelerinde heteroplazmiye rastlansa bile çoğu zaman nokta mutasyonları halinde görülen heteroplazmilerin oranı çok düşük olduğu için dizinleme elektroforegramlarındaki artefak piklerden ayırt etmek mümkün değildir (Holland ve ark. 1999). Literatüre geçen ilk heteroplazmi vakası, Rus çarı 2. Nikolas'ın iskelet kalıntılarının analizinden elde edilmiştir (İvanov ve ark. 1996, Gill ve ark. 1994).

MtDNA'da hem nokta hem de uzunluk heteroplazmisine rastlanır. MtDNA kontrol bölgesi heteroplazmisine ilk olarak 1994 yılında rastlanmıştır (Tully ve ark. 2000) ve bu heteroplazmi mtDNA'nın diğer bölümlerine göre daha düşük orandadır (Ivanov ve ark. 1996). HV1 ve HV2'nin polisitozin bölgesinde uzunluk heteroplazmisine sıklıkla rastlanır. Bunun HV1 bölgesinde oluşma mekanizması şöyledir; 16189 numaralı baz sıklıkla bir T nükleotididir ve bu T'nin iki tarafında da C tekrarları bulunur. 16189 numaralı bazda bir T-C nokta mutasyonu meydana geldiğinde bu bölgedeki poli-C dizileri birleşir ve kesintisiz bir C tekrarı olan bölge meydana gelir. mtDNA polimerazın yüksek hata payı da göz önüne alındığında bir

bireyin HV1 bölgesindeki C tekrarlarının kendi hücreleri içerisinde değişik sayılarda olacağı ve bir uzunluk heteroplasmisi göstermesi beklenir. Böyle bir uzunluk heteroplasmisi meydana geldiğinde mtDNA populasyonları poli-C bölgelerinin uzunlukları açısından farklılık gösterirler ve bu farklılık dizinleme verisinin kalitesini düşürür (Parson ve ark. 1998).

## 2.4 Kıl Örneklerinde DNA analizleri

Suç mahallerinde en sık rastlanılan biyolojik materyallerden biri de kıldır. Bunun nedeni ortalama bir insanın 5 milyon adet vücut kılı folikülüne sahip olması ve kılın kişilerin kontrolü dışında dökülmesidir. Adli amaçlı ilk kıl incelemeleri morfolojik farklılıkların mikroskopik incelemeler ile belirlenmesi şeklinde olmaktadır. Mikroskop altında karşılaştırılan kılların aynı kişiye mi ait yoksa farklı kişilerden mi kaynaklandığı sorularının cevabı aranmaktadır. Aynı kişiye ait olsalar bile farklı vücut bölgelerinden kökenlenen kılların aynı kişiye ait oldukları belirlenemeyebilir. Bu ise çalışmanın sonucunun güvenilirlik oranı oldukça düşürmektedir. İnceleme çok deneyimli uzmanlar tarafından yapıldığında dahi hatalı sonuçlar çıkmaktadır. Bu nedenle kesin yargıya varmak ve insandan kaynaklanan hataları sıfıra indirmek için DNA analizleri de uygulanmalıdır. DNA analizinden önce kılın mikroskopik incelemesi ile bir ön ayırım yapılması önerilir. Böylece hangi kılların kök dokusu taşıdığı ve DNA analizi için daha uygun oldukları belirlenir. Ayrıca söz konusu kılın zorla koparılıp koparılmadığı mikroskopik incelemeler sonrası aydınlatılan ve adli davalarda önem taşıyan ayrıntılardır.

Kıla hem nucDNA hem de mtDNA analiz metotlarından biri uygulanabilir. NucDNA analizlerinin ayırım gücü daha yüksek olduğundan öncelikle bu analizin yapılması eğer kıl nucDNA analizi yapmaya uygun değil ise mtDNA analizi uygulanması önerilmektedir (Linch ve ark. 1998). Genellikle köksüz kıllar nucDNA analizleri için uygun değildir. Saçın keratin demetleri arasında kalan ölü hücrelerdeki nucDNA molekülleri yüksek oranda degrade olmuştur ve DNA miktarı düşüktür. Hücrede tek bir çekirdeğe karşılık binlerce mitokondri bulunduğundan, kıl gövdesinden bozulmamış ve yeterli miktarda mtDNA elde etme olasılığı daha yüksektir. Kıla hangi analiz yönteminin uygulanacağına izolatlardaki DNA miktarı belirlenerek karar verilebilir (Walsh ve ark. 1992).

Eğer kıl delillerinde mtDNA analizleri yapılacaksa, kıl mtDNA'larında sıklıkla heteroplazmiye rastlandığı unutulmamalıdır (Linch ve ark. 2001). Heteroplazmiyi aynı bireyden kökenlenen örneklerde birden fazla mtDNA profilinin gözlemlenmesi olarak

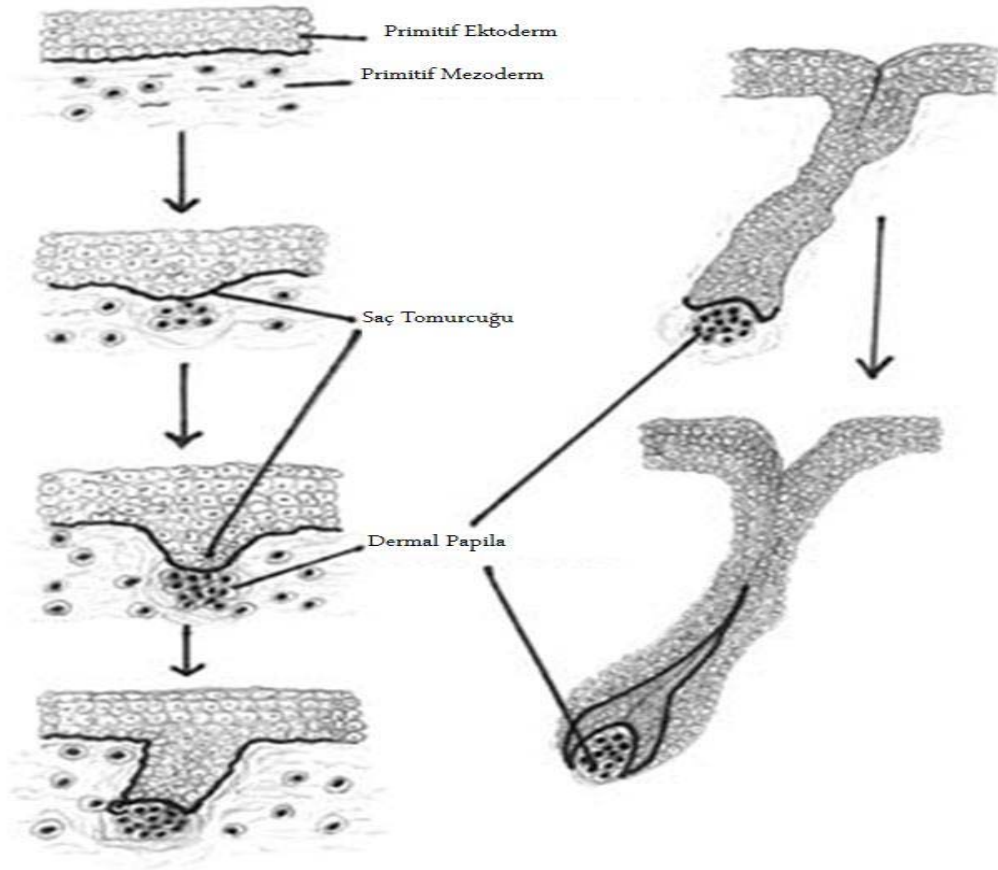
açıklayabiliriz. mtDNA'da kontrol bölgesi heteroplazmisi daha düşük seviyede rastlanır (Tully ve ark. 2000) ve ilk olarak literatüre 1994 yılında geçmiştir. (Gill ve ark. 1994)

Kıllarda ise neden daha sıklıkla heteroplazmi görüldüğünün nedeni şu şekilde açıklanır. Kıl yapısını, kıl proteinlerini sentezleyip daha sonra ölerək dehidre olan hücreler oluşturur. Bu gövde hücreleri, mitokondrilerinin bir kısmını anne hücrelerinden aldıkları gibi, bir diğer kısmını da endositoz ile yoğun mitokondri içeren melanosit hücrelerinin dalımsı uzantılarından alırlar. İki farklı hücre popülasyonundan kökenlenen kıl mitokondrilerinde dolayısı ile heteroplazmi görülme sıklığı daha fazladır (Mercer ve ark. 1956). Kıl yapısını bilmek, mitokondrilerin ve ölü hücrelerin kıl yapısına nasıl katıldığını bilmek, kıl yapıdaki delilleri incelememizde karşılaşıcağımız sorunları anlamamızı sağlar.

#### **2.4.1 Kıl Embriyolojisi**

Kılları üretmekten sorumlu olan hücreler insanlarda gebeliğin 9 ila 12. haftası arasında oluşmaya başlar. Kıllar için dolayısı ile çok hücreli primitif epitelyum dokuların ürettikleri epitelyum ürünler denilebilir (Linch ve ark. 2001). Primitif derinin tabanında toplanan hücreler bir saç tomurcuğu oluşturacak şekilde birleşirler ve derinin aşağı kısımlarına doğru gelişirler. (Şekil 3) Saç tomurcuğu aşağı doğru gelişirken dermal papilayı oluşturacak mesoderm kökenli hücreler ile buluşur. Dermal papila hücreleri için kıl büyümesinin kontrolünden sorumlu hücreler denilebilir. Bu hücrelerin ürettikleri büyüme faktörleri kılı oluşturacak yapıları üretmekten sorumlu saç matriksi hücrelerinin bölünmesini ve oluşmasını düzenlerler. Bir diğer önemli nokta ise dermal papila hücrelerinin saç yapısına doğrudan hücre halinde katılmamalarıdır.

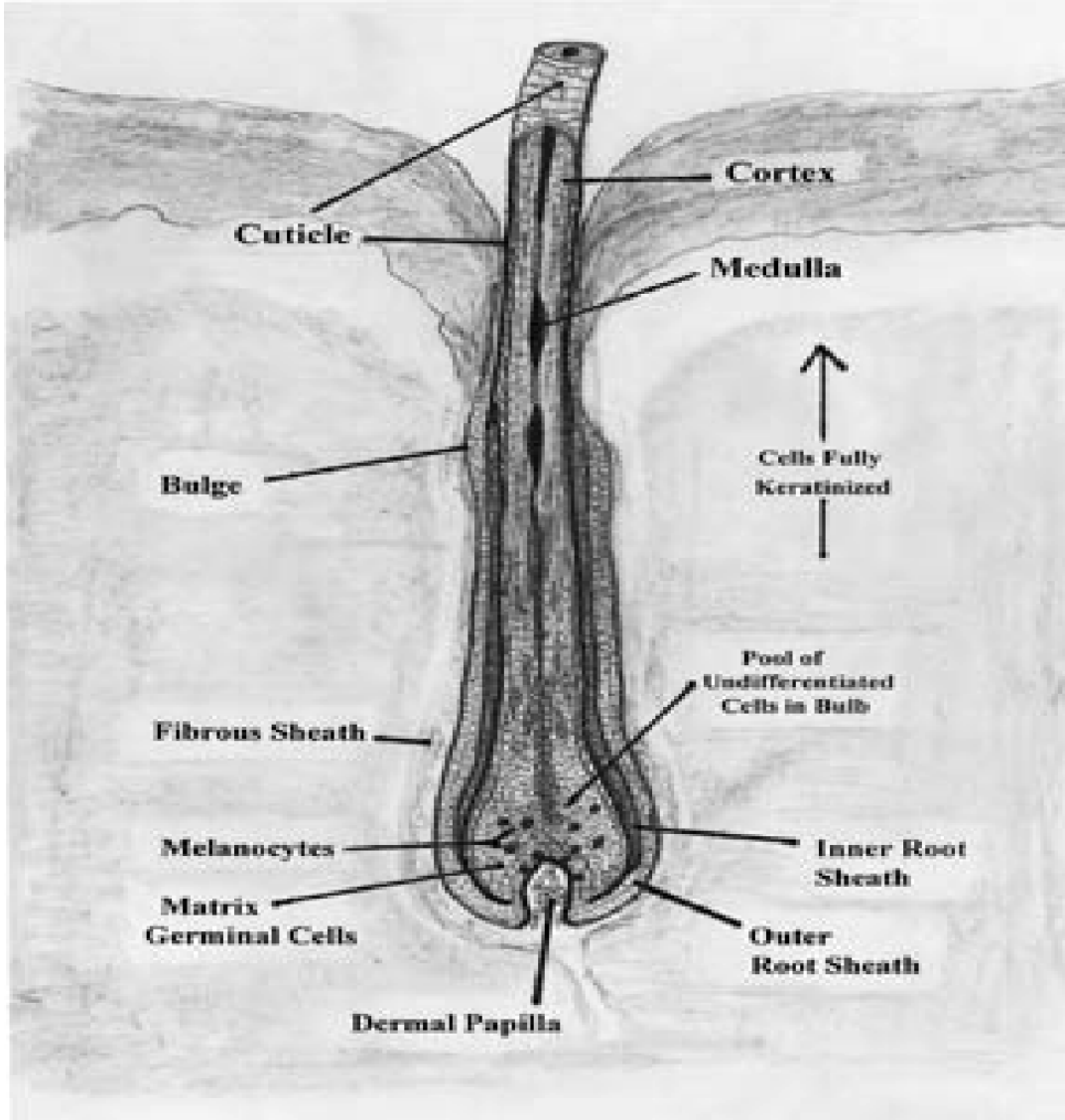
Gelişimini tamamlayan saç tomurcuğu dermal papila hücrelerinin etrafını bir kabuk gibi sarar. Bu yapıya saç kökü denir. Gebeliğin 16 ila 20. haftalarına kadar yeni saç kökleri üretilebilir (Olsen ve ark. 1994). Bu saç kökü yapısı ömür boyunca izole halde kalır. Kök sayısı sabit olmasına rağmen kıl sayısı değişken olabilir.



**Şekil 3.** Saç kökü yapısının oluşumu (Linch ve ark. 2001).

### 2.4.2 Kıl Histolojisi

Mesoderm kökenli dermal papila hücreleri, etraflarında bulunan ektodermik matriks hücrelerinin bölünmelerini kontrol ederler. Saç kökünde bulunan matriks hücreleri tarafından beslenir (Şekil 4). Bazı yazarlar tarafından saç kökü, içinde su kaynayan bir kazana benzetilmektedir. Bu modellemede kazanın altındaki alev suyun kaynamasını kontrol eden bir faktör olarak dermal papile hücrelerine, kaynayan sudaki kabarcıklar ise saç gövdesini oluşturan hücrelere benzetilmektedir. (Linch ve ark. 2001, Lyne ve ark. 1965).



**Şekil 4.** Saçın yapısı (Linch ve ark. 2001).

Kıl kökündeki hücreler 23-72 saatte bir bölünürler. Matriks hücrelerinin bölünmesi ile oluşan bu yavru saç gövdesi hücreleri matriks hücrelerinden ayrıldıkları gibi farklılaşmaya başlarlar. Bölünme yeteneklerini kaybederler. Bu yavru hücreler medula, kütikül ve korteks hücrelerine özelleşirler (Linch ve ark. 2001).

Saçın oluşumunda en büyük hacmi korteks hücreleri kaplar. Saç kökü hücrelerinin bölünmesi ve farklılaşması ile oluşan korteks hücreleri yoğun bir şekilde keratin proteini sentezine başlar, sitoplazmalarını tamamıyla keratinle doldurur ve çok sayıda mitokondri içerir (Toda ve ark. 1977). Bu esnada saç kökü hücrelerinin bölünmeye devam etmesiyle farklılaşan yeni korteks hücreleri eski hücreleri derinin dışına doğru iter. Nihayetinde korteks hücrelerinin hücre zarı parçalanır ve sitoplazmalarını kaybederek dehidre hale geçerler.

Parçalanmış korteks hücrelerinde bulunan keratin proteinleri sistein disülfid bağları ile bağlanarak keratin fibrillerini oluşturur. Hücre ve çekirdek zarları parçalanır çekirdek DNA'sı korunmasız kalır ve parçalanır. Ribozom ve mitokondri gibi organeller de parçalanmaya başlarlar (Linch ve ark. 2001). Buna rağmen hücre içersinde çok sayıda bulunan mitokondrilerden bazıları bütünlüklerini korur ve keratin fibrilleri arasında hücre kalıntıları olarak bulunur. Bu yüzden saç gövdesine çekirdek DNA'sı yerine mitokondriyal DNA analizi yapılmalıdır.

Saç kökünden kökenlenen bir diğer hücre grubu ise kütikül yani saçın etrafını çeviren zarı oluşturan hücrelerdir. Bu hücrelerde derinin dışına doğru hareketleri esnasında keratin sentezi yapar ve korteks hücreleri gibi parçalanıp sitoplazmalarını kaybeder. İki hücre grubu arasındaki fark kütikül hücrelerinin keratin fibrilleri yerine saçın etrafını saran keratinden oluşan pulumsu yapılar oluşturmalarıdır. Bu hücrelerin hücre kalıntılarında mitokondriler parçalanmamış halde elde edilebilir (Toda ve ark. 1975).

Saç kökü yapısında bulunan bir diğer hücre grubu ise melanositlerdir. Melanositler matriks hücrelerinin aksine çok yavaş bölünen, yüksek enerji ihtiyaçları olan ve yoğun miktarda mitokondri barındıran hücrelerdir. Melanositler sinir sistemini oluşturan dokulardan kökenlidirler ve embriyo gelişimi esnasında sinir sistemi dokusundan bir kısım hücre saç köklerine göç eder ve burada melanositleri oluşturur. Dermal papilanın üstünde bulunan melanositler matriks hücrelerinin aksine çok yavaş bölünür. Saç gövdesini oluşturacak gövde hücreleri deri dışına doğru hareket ederken melanositler sabit kalır.

Melanositler saç yapısına dermal papila hücrelerinde olduğu gibi doğrudan katılmaz. Bu hücreler gelişimleri esnasında mitokondri ve melanosomlarca zengin dallanma şeklinde yapılar oluşturur. Bu dallanmalar deri dışına doğru hareket etmekte olan matriks hücrelerinden kökenlenmiş kıl gövdesi hücreleri tarafından endositoz ile içlerine alınır (Mercer ve ark. 1956). Kıl gövdesi hücreleri yoğun protein sentezine başlayacakları için çok miktarda mitokondriye ihtiyaç duyar.

Melanositlerin dallanmalarında bulunan melanosomlar ise saç renginden sorumludur. Kıl gövdesi hücreleri endositoz ile içlerine aldıkları melanosomları kıl yapısına iletirler ve saç rengini oluştururlar.



- Dolayısı ile saç gövdesi hücrelerinde 2 adet mitokondri popülasyonu vardır:
- Kökenlendikleri matriks hücrelerinden aldıkları mitokondriler
- Endositoz ile içlerine aldıkları melanosit dallanmalarındaki mitokondriler
- Bu mitokondri karışımı saçta görülen heteroplazmi sıklığının sebebidir.

## 2.5 Mitokondriyal DNA'nın adli bilimlerdeki önemi

Mitokondriyal DNA analizlerinin adli davalardaki öneminin bir nedeni de anneden çocuklarına maternal olarak aktarılmasıdır. Maternal kalıtım göstermesi mtDNA'ya homozigot, hemizigot ve monoklonal özellik kazandırır. Rekombinasyona uğramayan mtDNA nesilden nesile değişmeden aktarılır. MtDNA'daki değişimlerin sebebi mutasyonlardır. Evrim çalışmalarında, göç yollarının belirlenmesinde mtDNA'daki ortak mutasyonların belirlenmesi ile ortak atalara ve göç yollarına ulaşılır.

Mitokondrilerin maternal kalıtım göstermelerinin nedeni ise embriyo oluşumu sırasında yumurtayla birleşen spermlerin baş kısmında yumurtaya oranla çok az sayıda mitokondri bulunmasıdır. Ayrıca bir çalışmada mitokondrilerden yoksun somatik hücre kültürlerine spermlere ait mitokondriler aktarıldığında, kültürdeki hücrelerin ancak %10-20 kadarının fonksiyonel sperm mitokondrilerini kazandığını ve yalnız  $1/10^5$  gibi ufak bir bölümünün 48 saat sonrasında yaşamlarını sürdürebildiği belirlenmiştir. Bunun aksine somatik hücre kültürlerine somatik hücrelerden gelen mitokondriler aktarıldığında aktarılan mitokondrilerin işlev kazandığı saptanmıştır. Bu deney sperm mitokondrilerini diğer hücreler içinde yok eden bir mekanizmanın var olabileceğini göstermektedir (Kingve ark. 1988).

Babadan gelen az miktardaki mtDNA'nın yok olma mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşmasa da, pratikte mtDNA maternal kalıtım gösterir denebilir. Adli analizlerde rastlanılan tek bir bireye ait mtDNA profillerinde gözüken karışımlar ise, sadece birkaç bazda farklılıktan ibaret olmaktadır. Bu farklılığın çok az sayıda bazda olması nedeniyle mutasyon kaynaklı olduğu ve mutasyona uğramış mitokondrilerin bölünerek çoğalıp heteroplazmik bir mitokondri havuzu oluşturduklarına inanılmaktadır (Holland ve Parson 1999). Günümüzde ise mtDNA'nın paternal kalıtım da gösterdiğine dair çalışmalar yapılsada bu konuda kesin bir bilgi kanıtlanmamıştır ( Bandelt ve ark. 2005, Gyllensten ve ark. 2005)

Hücre içinde her kromozomdan bir çift bulunurken, mtDNA molekülleri hücrede 1000 – 10000 kopya arası bulunur. Hücre içinde kopya sayısının fazla olması, adli davalarda

sıklıkla rastlanabilen eser miktarda, yüksek derecede degrade olmuş delillerden bütünlüklerini korumuş halde elde edilme olasılıklarını arttırır. DNA miktarının son derece az olduğu diş, kıl, saç gibi biyolojik örneklerde mtDNA analizlerine başvurulur (Lutz ve ark. 1996)

## 2.6 MtDNA dizin analizi metodları

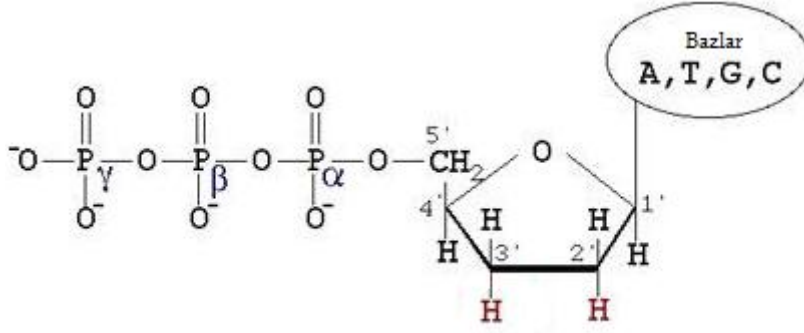
### 2.6.1 Sanger Yöntemi

İlk olarak Sanger tarafından 1977de geliştirilmiştir (Sanger ve ark. 1977). Bu yöntem hücrede gerçekleşen replikasyon olayının tüp içinde gerçekleştirilmesinden ibarettir. DNA sentezinde yeni eklenen deoksinükleotidin (dNTP) 5' fosfor atomu, zincirin ucundaki son nükleotidin 3'OH grubuna etki ederek fosfo-diester bağı oluşturur. Bu şekilde sentezlenen zincirde bir nükleotidlik uzama sağlanır. Eğer zincire dideoksinükleotit (ddNTP) eklenmiş ise zincir uzaması sonlanır. Bunun sebebi dideoksinükleotidin şeker halkasındaki 3' karbonunun hidroksil grubu taşınamamasıdır (Şekil 5). Dideoksinükleotit uzayan zincirin ucunda bulunduğu durumda 3' OH grubu taşımadığı için yeni eklenecek nükleotid ile zincir arasında fosfodiester bağı oluşamaz ve zincir uzaması o noktada durur. Sentezin durması yöntemin temelini oluşturur.

Bu yöntemde 4 tüp kullanılır. Her tüpe:

- Primer
- Kalıp DNA
- Klenow enzimi (E.coli DNA polimeraz 1'in proteaz subtilisin enzimi tarafından ayrılan ekzonükleaz aktivitesi olmayan parçası)
- Dört çeşit radyoaktif işaretli dNTP
- Bir çeşit ddNTP

İlave edilir. Ortama radyoaktif P32, S35 veya P33 eklenir. Bu şekilde DNA sentezi ddNTP ve dNTP'ler arasındaki rekabet sonucu belli bölgelerde erken sonuçlanır. Sonuçta çeşitli boyutlarda oligonükleotidler meydana gelir. 4 ayrı enzimatik reaksiyonda 4 ayrı ddNTP kullanılarak kalıp iplikteki her adenin (A), sitozin (C), guanin (G), timin (T) bulunduğu yerde farklı sonlanmalar olur. Oluşan farklı boylardaki DNA parçalarının aynı jelin 4 ayrı kuyucuğunda elektroforetik analizi sonucu dizinleme yapılır.



**Şekil 5.** Bir dideoksinükleotidin yapısı (<http://www.mun.ca/biology/scarr/Gr12-21.html>'den alıntıdır).

### A. Shotgun dizilemesi

Sanger yöntemi ile 1000 bazdan daha büyük DNA bölgelerinin dizinlenmesi sırasında sorun yaşanır. Bu nedenle dizinlenecek bölge rastgele küçük parçalara ayrılarak dizin analizi gerçekleştirilir. Daha sonra shotgun dizileme yöntemi kullanılarak orijinal dizi tespit edilir. Shotgun yönteminde uzun DNA molekülünün kesilmesi ile elde edilen DNA parçaları vektörlere yüklenip konak hücrelerde çoğaltılır. Konak hücrelerden plazmid DNA'sı izolasyonu yapılarak DNA parçaları elde edilir. Dizilenmesi yapılan DNA parçalarının dizileri bilgisayar programları yardımı ile üst üste çakıştırılır ve asıl büyük dizi tespit edilir. (Tablo 1)

**Tablo 1.** Shotgun dizileme yöntemi \*

Parça	Dizisi
<b>Orijinal DNA</b>	AGCATGCTGCAGTCATGCTTAGGCTA
<b>İlk Shotgun Parçası</b>	AGCATGCTGCAGTCATGCT <i>TAGGCTA</i>
<b>İkinci Shotgun Parçası</b>	<i>AGCATG</i> CTGCAGTCATGCTTAGGCTA
<b>Parçaların birleştirilmesi ile oluşturulan ana dizi</b>	AGCATGCTGCAGTCATGCTTAGGCTA

\* Oluşan iki shotgun parçasında eksik olan diziler italik yazılmıştır. Bu parçaların üst üste çakıştırılması ile orijinal diziye ulaşılır

### B. Flüoresan boyaların kullanımı

Sanger'in yöntemi hassas olmasına rağmen radyoaktif belirleme prensibine dayanmaktadır. Radyoaktif işaretler hem yöntemin hızını yavaşlatır, hem de uygulayıcının sağlığını riske eder. Radyoaktif işaret her reaksiyon için aynı olduğundan 4 farklı nükleotidi birbirinden ayırmak mümkün değildir. Bu nedenle reaksiyon 4 ayrı tüpte gerçekleştirilir. Bu problemler flüoresan teknolojisi ile aşılmıştır. Bu teknikte 4 farklı flüoresan boya ile işaretli dNTP'ler kullanılarak Sanger yönteminin tek bir reaksiyonda gerçekleşmesi sağlanır (Smith ve ark. 1985, Smith ve ark. 1986). Geliştirilen flüoresan boyalar ve spektral özellikleri Tablo 2 de gösterilmiştir. Günümüzde sıklıkla kullanılan diğer flüoresan boyalar ise carboxyfluorescein (FAM), carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimetoxyluorescein (JOE), carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA) ve carboxy-X-rhodamine (ROX) boyalarıdır (Swerdlow ve Gesteland 1990, Karger ve ark. 1991, Carson ve ark. 1993).

**Tablo 2.** DNA dizilemesinde kullanılan bazı florofor grupların spektral özellikleri

<b>Boya</b>	<b>Max Absorbsiyon (nm)</b>	<b>Max. Emisyon (nm)</b>	<b>Emisyon FWHM* (nm)</b>
<b>Fluorescein</b>	493	516	60
<b>4-Chloro-7-nitrobenzo-2-1-diazole (NBD)</b>	475	540	79
<b>Tetramethyl-rhodamine</b>	556	582	52
<b>Texas Red</b>	599	612	42

\*Bir sinyalin tepe noktasının yarı değerindeki genişliği

1985'de geliştirilen bu teknikle flüoresan boyalar primerlerin 5' uçlarına bağlanmışlardır. Her bir işaretli primer bir çeşit ddNTP ile birlikte kullanılır. Örneğin fluorescein işaretli primerin reaksiyonuna ddCTP'ler eklenirken Tetramethyl-rhodamine ile işaretli primerin reaksiyonuna ddATP'ler eklenir. Her dört ddNTP için reaksiyonlar farklı tüplerle yürütülür ve daha sonra reaksiyon ürünleri karıştırılarak elektroforetik ayırımları

esnasında jelde tek bir kuyucuğa yüklenirler. Flüoresan işaretler farklı renklerde ışımaya yaptıkları için 4 reaksiyonun ürününü tek bir kuyucukta birbirinden ayırmak artık mümkündür. Bu yöntem dye-labelled primer kimyası olarak adlandırılır.

Flüoresan işaretler daha sonra doğrudan ddNTP'lere bağlanarak kullanılmaya başlamışlardır. Bu yöntem ile flüoresan işaretli primerlerle yapılan dizinleme reaksiyonlarından farklı olarak reaksiyonlar tek bir tüpte gerçekleşir. Aynı reaksiyon ortamında bulunan ddCTP, ddATP, ddGTP ve ddTTP ile farklı sonuçları gösteren oligonükleotitleri flüoresan işaretleri ile birbirlerinden ayırmak ve dolayısı ile dizinlemek mümkündür. Bu yöntem ise dye-labelled terminator kimyası olarak adlandırılır. İki yöntemin şematik karşılaştırılması Şekil 6'da gösterilmiştir.

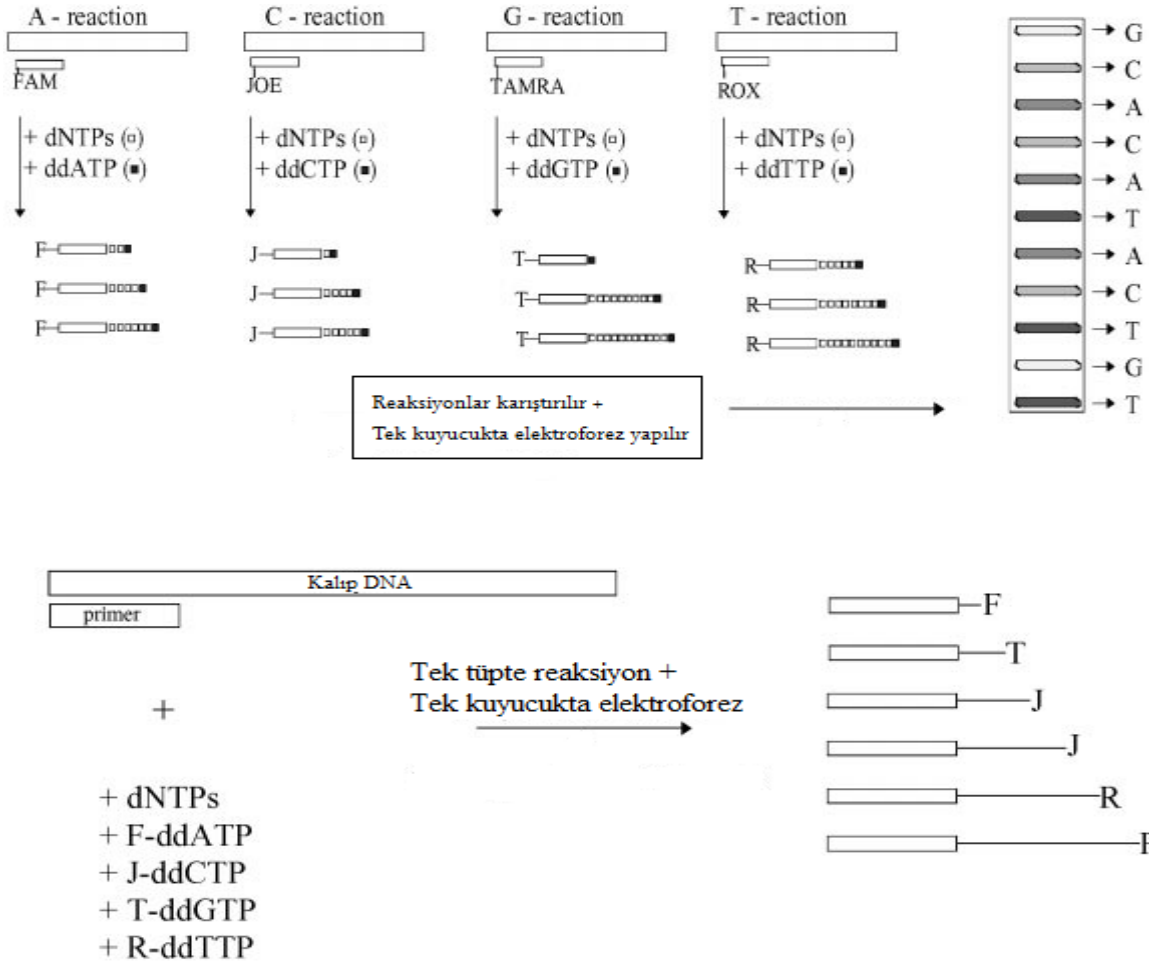
### ***C. Dizinleme reaksiyonu ürünlerinin elektroforetik analizi***

İşaretli dizinleme reaksiyonu ürünlerinin elektroforetik ayırımının poliakrilamid jel elektroforezi ile yapılması (PAGE), DNA dizinlemelerinin en zor kısmıdır. Jel hazırlama, örnekleri yükleme ve elektroforez sonrası jelle yapılan müdahalelerin her birinde sorun çıkma olasılığı yüksektir. Bu sorunların aşılması için daha ince jeller kullanılmaya başlanmış (Garoff ve ark. 1981) ve gradient jel sistemleri geliştirilmiştir (Biggin ve ark. 1983). Önemli ilerlemeler sağlansa da sadece dökme jeller kullanılarak DNA dizinlemesi yapmak insan genom projesi gibi kapsamlı çalışmalar için yeterli değildi. Bu sorunların aşılması ancak kapiler elektroforez teknolojilerinin gelişimi ile sağlanmıştır.

Kapiler elektroforez (CE) biyopolimerlerin analizi ve ayırımı için geliştirilmiş bir tekniktir (Jorgenson ve ark. 1983, Cohen ve ark. 1987) Bu teknik yaklaşık 100 µm çapındaki silika kapiler içinde biyopolimerlerin elektroforetik ayırımını temel alır. Elektroforezin gerçekleştiği kapilerlerin yüksek alan-hacim oranı elektroforez esnasında ortaya çıkacak ısıyı düşürür ve dökme jellere oranla daha yüksek elektrik alanların kullanılmasına olanak sağlar. Daha yüksek elektrik alanlar daha hızlı ayırım sağlar. Dolayısı ile CE dökme jellere oranla yaklaşık 10 kat daha hızlı bir elektroforetik ayırım sağlar.

DNA dizinleme reaksiyonları tek nükleotid farkını tespit edebilecek hassasiyette olmalıdır. Jel ile doldurulmuş kapilerlerde yapılan ilk DNA dizin analizi denemelerinde 330 bazlık bölgelerin dizin analizi başarı ile bir saat içinde yapılmıştır (Cohen ve ark. 1990). Tekrar kullanılabilen polimerlerin geliştirilmesi bir kapilerin yüzlerce kez kullanılmasını

mümkün kılmıştır. Her bir analiz de kapillerlerin taze polimerlerle doldurulması mümkündür (Salas-Solano ve ark. 1998)



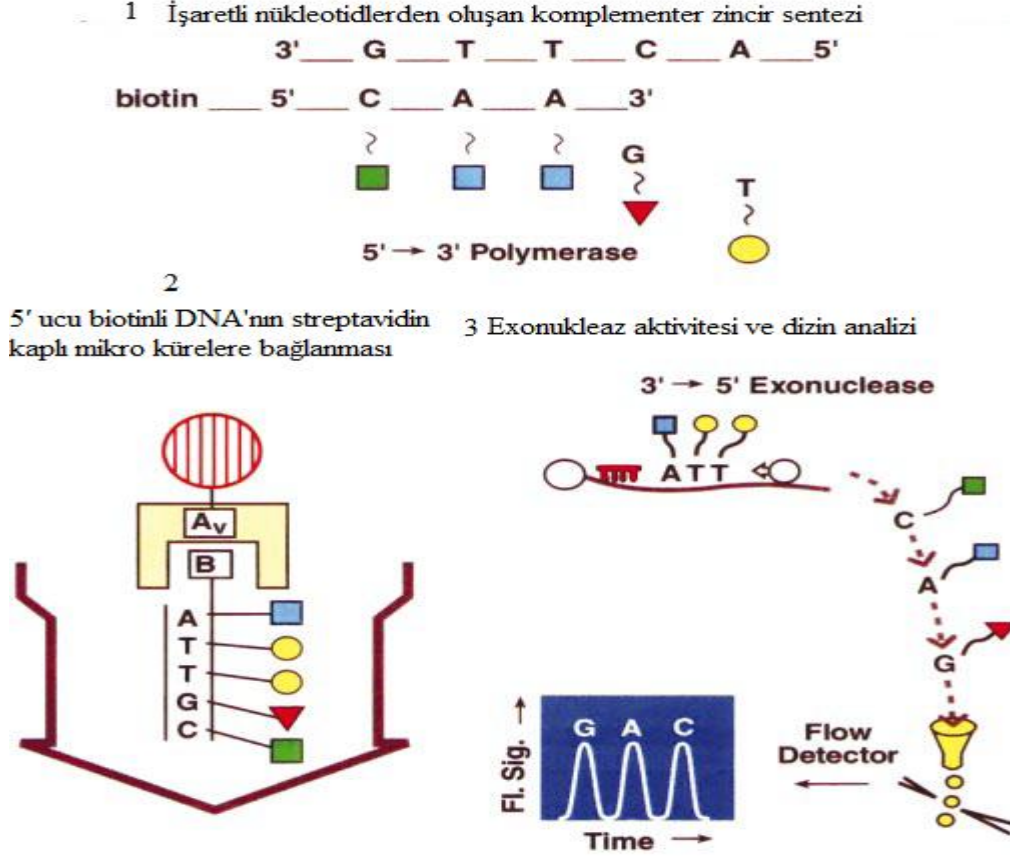
**Şekil 6.** Dye-labelled primer (üst) ve dye-labelled terminator (alt) kimyası reaksiyonları karşılaştırması (Salas-Solano ve ark. 1998).

### 2.6.2 Ekzonukleaz aktivitesi ile tek nükleotid dizinleme yöntemi

Lazer tabanlı 40 kilobaz (kb) ve daha uzun DNA parçalarını dizinlemek için geliştirilmiş bir tekniktir. Hızı ortalama 100-1000 baz/saniyedir (Lilian ve ark. 2002). Floresan işaretli nükleotidlerin akarak ilerleyen bir örnek üzerinde teker teker belirlenmesi prensibine dayanır (Shera ve ark.1990). Yöntem aşağıdaki adımlardan oluşmaktadır:

- Dizinlenmek istenen DNA parçasına komplementer işaretli nükleotidlerden oluşan bir zincir sentezi
- İşaretlenmiş 5' biotinli DNA'nın streptavidin kaplı mikro kürelere bağlanması
- Bağlanmış DNA'nın bir tampon ile birlikte akışa geçmesi

- İşaretli DNA'nın exonükleaz aktivitesi ile parçalanması
- İşaretli parçaların tespiti ve dizin analizi (Şekil 7).



**Şekil 7.** Exonukleaz aktivitesi ile dizinleme yöntemi şematik anlatımı (Lilian ve ark. 2002'den alıntıdır).

Yöntemin hızı exonukleaz, cofaktörler ve inhibitörlerin varlığına bağlıdır (Davis ve ark. 1991)

### 2.6.3 Maxam Gilbert yöntemi

Kimyasal parçalanmaya dayanan bir DNA dizinleme yöntemidir (Maxam ve Gilbert 1977). Sonu işaretlenmiş DNA parçalarındaki A T G ve C bazlarında rastgele kimyasal kesimler yapılması prensibine dayanır. Kimyasal kesim 3 adımdan oluşur:

- Baz modifikasyonu
- Modifiye bazın şeker omurgasından ayrılması
- Bazsız şekerin çıkarılması ve DNA'nın parçalanması

Kullanılan kalıp DNA tek veya çift zincirli olabilir. İlk olarak DNA parçaları DNA'yı belirli dizilerden kesen kesim enzimleri ile parçalanır. Daha sonra oluşturulan bu kalıp DNA moleküllerinin zincirlerinden birinin son bazı sonundan işaretlenir (işaretlenme genellikle  $^{32}\text{P}$  ile yapılır), ya da kalıp DNA'ların sonuna bir adet radyoaktif işaretli nükleotid rastgele eklenir (terminal deoksinükleotid transferaz enzimi aktivitesi ile) (Ornstein D. L. 1985). Ancak Radyoaktif işaretleme sırasında sağlığa zararı kimyasallar kullanılmaktadır. Bu sorunu aşmak için geliştirilen diğer bir teknikte baz dizisi bilinen, 21 nükleotid uzunluğundaki flüoresan işaretli bir oligonükleotid (M13 dizinleme primeri) kalıp DNA'nın sonuna eklenir. Burada kullanılan flüoresan boya bazların kimyasal olarak birbirinden ayrıldığı bir sonraki aşamaya dayanıklıdır (Ansorge ve ark, 1988). Başka bir radyoaktif olmayan ve kimyasal kesim reaksiyonlarına dayanıklı işaretleme yöntemi ise kalıp DNA zincirinin sonuna biotin ile işaretlenmiş bir diğer oligonükleotidin eklenmesidir (Richterich ve ark, 1989). Dizin analizi ise kimyasal kesim reaksiyonu ürünlerinin elektroforetik ayrımı ile yapılır. Biotin ile işaretlenmiş kalıp DNA'nın dizinlenmesinden sonra jelde görünür hale getirilmesi için streptavidine bağlı enzimatik renklendirme yöntemi kullanılır.

Yöntemin avantajları:

- Nadiren görülen bazlar belirlenebilir
- Hata payı daha az

Dezavantajları:

- 250 bazdan daha uzun bölgelerin dizinlenmesi problemlidir.

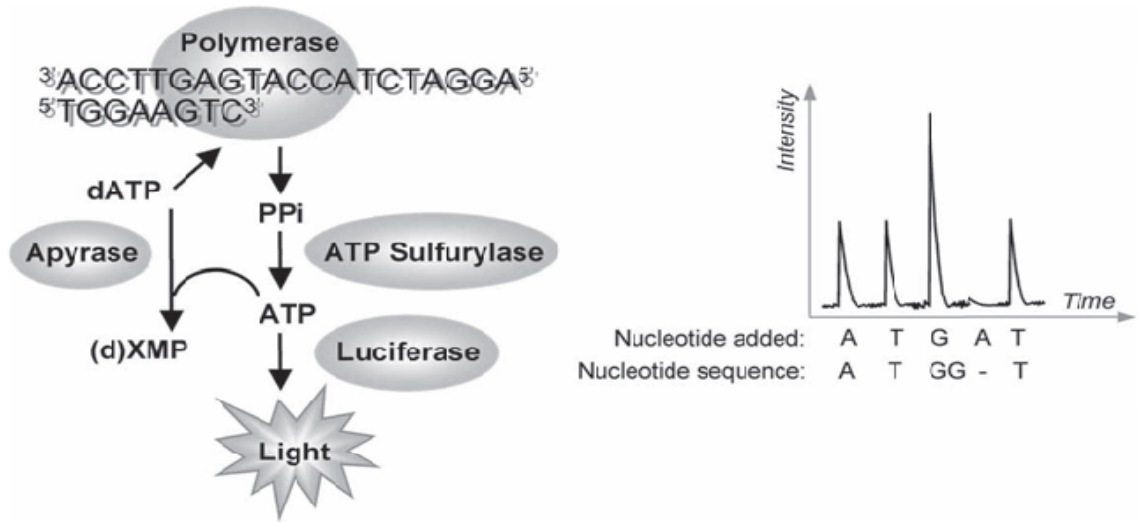
## 2.6.4 Gelecek nesil (Next Generation) DNA dizinleme yöntemleri

### A. Pirosekanslama (Pyrosequencing)

Pyrosequencing metodu, en basit anlatımla DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesan bir enzim aracılığıyla tespitidir (Şekil 8). Temel olarak dizileme reaksiyonu, dizilenecek DNA'nın tek sarmalı (ssDNA) üzerinde tamamlayıcı sarmalının (complementary DNA) sentezlenmesi şeklinde kendini gösterir. Dizileme primeriyle sabitlenen tek sarmallı kalıp DNA üzerine ardışık olarak akan A, C, G, T nükleotitlerinin kalıp DNA dizisinde tamamlayıcı noktalarını buldukları zaman ortamda bir ışık oluştururlar. Bu ışığı yaratan kemilüminesan sinyalin hangi nükleotitin bağlanması sırasında oluştuğu tespit edilir.



Sabitlenen ssDNA, DNA polimeraz, ATP sulfurylase, luciferase, apyrase, APS ve luciferin ile inkübe edilir. Nükleotit akışı sırasında tamamlayıcı nükleotitin gelmesi durumunda DNA polimeraz pyrophosphate (PPi) açığa çıkmasını sağlar. ATP sulfurylase enzimi bu PPi'yi kantitatif olarak ATP'ye dönüştürür. ATP luciferase enzimi aracılığıyla luciferinin oxyluciferin'e dönüşmesini sağlar. Oxyluciferin görülebilir bir ışık yaratır. Bu ışığın şiddeti ATP miktarıyla doğru orantılıdır ve bu sayede aynı dizi üzerindeki tek nükleotit tekrarları (homopolymer) tespit edilir. Ortaya çıkan bu ışık charge coupled device (CCD) kamera tarafından kaydedilir ve bilgisayar programı yardımıyla dizi verilerine dönüşür. Nükleotit akışı sırasında eşleşmeyen nükleotitler ve ortamdaki ATP apyrase tarafından parçalanır ve reaksiyon yeni bir tur nükleotit akışıyla devam eder (<http://www.istanbul.edu.tr/ngslab/tumGenome.php>).



**Şekil 8.** Pyrosequencing yönteminin ana prensibi

([http://www.springerimages.com/Images/MedicineAndPublicHealth/1-10.1385\\_1-59259-867-6\\_179-0](http://www.springerimages.com/Images/MedicineAndPublicHealth/1-10.1385_1-59259-867-6_179-0)'den alıntıdır).

#### **D. Illumina Yöntemi**

Illumina, Inc. Tarafından üretilmiş bir dizinleme sistemidir. Sistem sentez esnasında dizinleme prensibine dayanır. Önce kalıp DNA restriksiyon enzimleri tarafından rastgele halde parçalanır. Bu parçalar sistemin akış hücresine bağlanılır. Dizinleme esnasında 4 dNTP ve DNA polimeraz enzimi akış hücresinin kanallarına eklenir. Ayrıca bu yöntemde kullanılan dNTP'lerin 3'-OH grupları kimyasal olarak bloklanmıştır ve her dNTP' ayrı ayrı flüoresan

işaretlenmişlerdir. Kalıp DNA'ya her bir baz eklenmesi aşamasından sonra görüntüleme gerçekleşir. Bu aşamada reaksiyonun gerçekleştiği akış hücrelerinde kalıp DNA'ya hangi bazların eklendiği belirlenir. Daha sonraki aşamada kimyasal olarak dNTP'lerin 3'-OH uçlarını bloklayan gruplar uzaklaştırılır. Bu döngü kullanıcı tarafından belirlenen sayıda tekrarlanır. Her bir DNA parçası için 25-35 bazlık bölümler dizinlenir. Daha sonra akış hücresindeki bütün dizin analizi yapılan DNA parçaları sistemin algoritması tarafından shotgun dizinleme prensibi ile ard arda eklenilip dizin analizi yapılır (Mardis 2008).

#### ***E. Gelecek nesil Dizinleme yöntemlerinin adli bilimlerde kullanım alanları:***

Gelecek nesil dizinleme yöntemlerinden önce fosillerden ve faili meçhul cinayetlerde bulunan ceset kalıntılarında kimliklendirme, bulunan örneklerin yüksek derecede degrade olduklarından, bu tez çalışmasının da konu aldığı gibi sadece mtDNA' analizleriyle mümkün olmaktadır (Gilbert ve ark. 2007, Adcock ve ark. 2001, Krings ve ark. 1999, Rogaev ve ark. 2006, Lutz ve ark. 1996). Gelecek nesil dizinleme metodları ile yüksek derecede degrade olmuş örneklerin nucDNA'larını dizinlemek ilk defa mümkün olmuştur. Bir neanderthal fosili (Green ve ark. 2006), bir mamut fosili (Poinar ve ark. 2006) ve bir mağara ayısı fosili (Noonan ve ark. 2005) gelecek nesil DNA dizinleme sistemleri ile nucDNA'ları dizinlenmiştir. Yöntemlerin maddi açıdan yüksek maliyeti her adli olayda kullanımlarının önünde bir engel olarak dursa da, yeni nesil dizinleme sistemleri faili meçhul olayların aydınlatılmasına fayda sağlayacaklardır.

### 3 GEREÇ VE YÖNTEM

Eski ve Bozulmuş Örneklerde Mitokondriyal DNA Dizin Analizi adlı tez çalışmasının laboratuvar aşaması İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü öğrenci laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışma esnasında aşağıdaki aletlerden yararlandı:

- Derin Dondurucu
- Etüv
- ABI 310 Bilgisayar kontrollü genetik analizör
- Termomikser
- Mikro santrifüj
- Buzdolabı
- Geneamp 9700 PCR cihazı
- Florimetri
- Saf Su Cihazı
- Vorteks

#### 3.1 Çalışmanın Planı

Deneyler aşağıdaki belirtilen plana göre gerçekleştirildi.

- Örneklerin toplanması
- DNA izolasyonu
- DNA miktarının belirlenmesi
- PCR aşamasına hazırlık
  - Primerlerin hazırlanması
  - dNTP karışımının hazırlanması
  - Taq DNA polimeraz, 10X PCR tamponu ve MgCl<sub>2</sub> çözeltilerinin hazırlanması
- PCR aşaması
  - 1. PCR aşaması (HV1 ve HV2 bölgelerinin çoğaltılması)
  - 1. PCR ürünlerinin saflaştırılması
  - 2. PCR aşaması (Dizinlemeye yönelik PCR)
  - 2. PCR ürünlerinin saflaştırılması
  - Saflaştırılmış 2. PCR ürünlerinin kurutulması

- Elektroforez aşaması
  - Örneklerin elektroforeze hazırlanması
  - Elektroforez
- Analiz aşaması

### **3.2 Örneklerin Toplanması**

Tez çalışmasında kullanılacak saç, tırnak gibi dokular ve çeşitli örnekler onam formu (Ek 5.) doldurmuş İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü öğrencilerinden laboratuvar çalışmalarının başlamasından bir ay önce toplandı ve her örnek farklı bir plastik tüp içinde oda ısısında saklandı. Örneklerin birbirleriyle kontamine olmamasına özen gösterildi. Kanlar ise onam formu doldurmuş kişilerden alındı ve -20 °C’de saklandı.

### **3.3 DNA İzolasyonu**

İncelenecek eser miktarda DNA içeren örneklerden, DNA izolasyonu slika temelli QIAamp DNA Micro Kit ve iyon değişimi temelli İnvitrogen ChargeSwitch® ticari kitleri kullanılarak yapıldı. Kitlere ait prosedürler Ek 1’de verilmiştir. Kanlardan DNA izolasyonu ise silika temelli QIAamp DNA Mini Kit kullanılarak Ek 1’de gösterilen prosedür ile yapıldı.

### **3.4 DNA İzolatlarındaki DNA Miktarının Belirlenmesi**

İzolatlardaki DNA miktarı Adli Tıp Enstitüsü moleküler genetik laboratuvarlarında bulunan Qubit® fluorometer cihazı ile ölçüldü. Miktar tayininde kullanılan prosedür Ek 2’de verilmiştir. Kanlardan yapılan izolasyonlarda ise miktar ölçümünden sonra  $M1 \times V1 = M2 \times V2$  formülünden yararlanarak izolatlar 1ng/μl DNA konsantrasyonunda olacak biçimde distile su ile sulandırıldı.

### **3.5 Primerlerin Hazırlanması**

Liyofilize halde sentezlenmiş primerlerden stok çözelti hazırlandı. 50μM stok çözelti hazırlamak için kullanılan primerler, primer dizileri, primer miktarları ve eklenen steril distile su miktarları Tablo 3’te görülmektedir.

PCR aşamasında kullanılmak üzere hazırlanan primer ana stoklarından 10 µl çekilip 90 µl distile su ilave edilerek 5 µM'lık primer çözeltileri hazırlanmıştır. Stok çözeltiler ve 5 µM'lık primer çözeltileri -20 °C'de saklandı.

**Tablo 3.** Primerlerin dizileri ve 50 M'lik stok çözeltiler hazırlamak için eklenen distile su miktarları

	<b>Primerin adı</b>	<b>Primer Dizisi</b>	<b>Miktarı (nmol)</b>	<b>Eklenen H<sub>2</sub>O (µl)</b>
<b>HV2 bölgesi primerleri</b>	15-F	5'-CACCTATTAACCACTCACG-3'	10.8	216
	389-R	5'-CTGGTTAGGCTGGTGTAGG-3'	10.5	210
<b>HV1 bölgesi primerleri</b>	15997-F	5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3'	10.3	206
	16401-R	5'-TGATTTCACGGAGGATGGTG-3'	10	200

### 3.6 dNTP karışımının hazırlanması

Her biri 10 mM'lık paketler halinde satın alınan dATP, dCTP, dTTP, dGTP çözeltilerinden PCR aşamasında kullanılmak üzere 2.5 mM'lık bir dNTP karışımı hazırlanmıştır. Bunun için her bir dNTP tüpünden 5 µl çekilerek steril PCR tüpüne aktarıldı ve üzerine 60 µl steril distile su eklendi. Hazırlanan dNTP karışımı ve stok dNTP'ler -20 °C'de saklandı.

### 3.7 Taq DNA polimeraz, 10X PCR tamponu, MgCl<sub>2</sub> çözeltilerinin hazırlanması

Kontaminasyon riskini azaltmak için satın alınan Taq DNA polimeraz, 10X PCR tamponu ve MgCl<sub>2</sub>, PCR tüplerine bölündü ve özel saklama kaplarında -20 °C'de saklandı.

### 3.8 1. PCR aşaması (HV1 ve HV2 bölgelerinin çoğaltılması)

DNA konsantrasyonları belirlenen örnekler hazırlanan PCR bileşenleriyle beraber iki ayrı PCR karışımında çoğaltıldı. HV1 bölgesini çoğaltmak için 15997-F ve 16401-R primerleri PCR karışımına eklendi. HV2 bölgesinin çoğaltılması için 15-F ve 389-R primerleri PCR karışımına eklendi. Tablo 4 de PCR karışımı ile ilgili detaylar verilmiştir.

**Tablo 4.** PCR bileşenleri konsantrasyonları ve eklenen miktarlar

PCR bileşenleri	Eklenen hacimler (µl) /reaksiyon	Reaksiyonda ki son konsantrasyonları
<b>Taq polimeraz (5U/µl)</b>	0.75 µl	0.15 U/reaksiyon
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	1.50 µl	1.5 mM/reaksiyon
<b>10 X PCR tamponu</b>	2.50 µl	1 X/reaksiyon
<b>dNTP karışımı (2.5 mM)</b>	2.00 µl	0.2 mM/reaksiyon
<b>F primeri (5 µM)</b>	2.00 µl	0.4 µM/reaksiyon
<b>R primeri (5 µM)</b>	2.00 µl	0.4 µM/reaksiyon
<b>DNA</b>	(1 - 2 ng DNA içerecek hacimde)	1 - 2 ng/reaksiyon
<b>Distile su</b>	Toplam hacim 25µl ye tamamlandı	

PCR karışımları hazırlandıktan sonra PCR tüplerinin yüzeylerine yapışmış olabilecek damlaları tüpün dibine indirmek için kısa süre santrifüj yapıldı. Daha sonra tüpler Geneamp 9700 PCR cihazına yerleştirildi. Daha önceden hazırlanan PCR programı seçildi ve alet çalıştırıldı. Programa ait parametreler Tablo 5 de verilmiştir

**Tablo 5.** Birinci PCR parametreleri

Aşama	Sıcaklık	Zaman (saniye)	Döngü sayısı
<b>İlk denatürasyon</b>	94 °C	660	1
<b>Denatürasyon</b>	94 °C	20	32
<b>Bağlanma</b>	56 °C	10	
<b>Uzama</b>	72 °C	30	
<b>Bekletme</b>	4 °C	∞	

Pajnič Z. I.ve ark. 2004'ten alıntıdır.

### 3.9 1. PCR ürünlerinin saflaştırılması

Birinci PCR ürünlerinin saflaştırılması için Exonuclease 1 ve Shrimp Alkaline Phosphatase enzimleri ile inkübe edildi. Exonuclease 1 enzimi ortamdaki bağlanmamış primerlerin parçalanması için, Shrimp Alkaline Phosphatase enzimi de ortamdaki bağlanmamış dNTP'lerin parçalanması için kullanıldı. Öncelikle steril PCR tüplerine örneklerin kodları

yazıldı. Tüplere eklenen enzimlerin miktarları ve birinci PCR ürünlerinin miktarları Tablo 6’da verilmiştir

**Tablo 6.** Exo-Sap karışımının hazırlanması

Bileşenler	Eklenen hacimler (µl/reaksiyon)	
	Tam reaksiyon	¼ reaksiyon
PCR ürünü	15	3.75
Exonuclease 1 (5U/ µl)	1.40	0.35
Shrimp Alkaline Phosphatase (1U/ µl)	2.60	0.65

Hazırlanan karışımlar PCR cihazına yerleştirildi. Daha önceden kaydedilen Exo-Sap programı seçildi ve alet çalıştırıldı. 37°C’de 90 dakika boyunca bağlanmamış primer ve dNTP’ler parçalandı. 80°C’de 20 dakika boyunca enzimlerin inaktivasyonu sağlandı.

### 3.10 2. PCR aşaması (Dizilemeye yönelik PCR)

Saflaştırılmış birinci PCR ürünlerinin dizinlenmesi için BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit kullanıldı. Kitin işleyişi Sanger Zincir Sonlandırma “Chain Termination” prensibine dayanmaktadır ve içeriği Tablo 7’de verildi. Kitin içeriğinde bulunan ddNTPler’in hangi flüoresan boylarla işaretlendiği Tablo 8’de gösterildi.

**Tablo 7.** BigDye Terminator 3.1 kiti içeriği

BigDye Terminator 3.1 kiti elemanları	İçerikleri
Hazır reaksiyon karışımı	AmpliTaq DNA Polimeraz
	Farklı floresan boylarla işaretlenmiş ddNTPler
	İşaretlenmemiş dNTPler
	Reaksiyon tamponu
5 X Dizinleme tamponu	Kullanılan hazır reaksiyon karışımı miktarını azaltmak için kullanılan dizinleme tamponu
Kontrol DNA	pGEM®-3Zf(+) çift zincirli DNA
Kontrol primer karışımı	-21 M13 Kontrol Primer 3.2 µM

Kontaminasyon riskini azaltmak için hazır reaksiyon karışımı steril PCR tüplerine bölündü. Tüplerin etrafı ışık görmesini önlemek amacı ile alüminyum folyo ile sarıldı ve -20

°C’de saklandı. PCR bileşenleriyle birlikte 2. PCR karışımı buz üstünde hazırlandı. 5 X dizileme tamponu ise kullanılmadığı zamanlarda 4 °C’de tutuldu.

İkinci PCR reaksiyonunda tek HV1 bölgesi için 15997-F, HV2 bölgesi için 15-F primeri kullanıldı. İkinci PCR yöntemi için kitin prosedüründe üretici firma tarafından 3.2 pikomol primer eklenmesi önerilmiştir. Beş µM’lık primer stoklarımızın 1 µl’sinde 5 pikomol primer olduğu için, 0.64 µl primer eklenmesi ile 3.2 pikomol (pmol) primer miktarına ulaşılabileceği hesaplandı. İkinci PCR karışımları Tablo 9’da verildiği şekilde hazırlandı ve PCR tüplerinin yüzeylerine yapışmış olabilecek damlaları tüpün dibine indirmek için kısa süre santrifüj yapıldı. Tüpler PCR cihazına yerleştirildi ve Tablo 10’da verilen PCR koşullarında 2. PCR aşaması başlatıldı.

**Tablo 8.** Big Dye kiti içeriğindeki ddNTP’lar ve işaretlemede kullanılan flüoresan boyalar

Dideoksi bazlar	Flüoresan boya	Elektroforegram rengi
ddGTP	dR110	Siyah
ddATP	dR6G	Yeşil
ddCTP	dTAMRA	Mavi
ddTTP	dROX	Kırmızı

**Tablo 9.** İkinci PCR karışım tablosu

Bileşenler	Örnek (µl/reaksiyon)	Negatif Kontrol (µl/reaksiyon)	Pozitif Kontrol (µl/reaksiyon)
Bigdye Terminator 3.1 hazır reaksiyon karışımı	4	8	8
5 X dizileme tamponu	2	0	0
Dizileme primeri	0.64	0	0
Saflaştırılmış PCR ürünü	0.46	0	0
-M13 kontrol primeri	0	1	1
pGEM®-3Zf(+) çift zincirli Kontrol DNA DNA	0	0	1
Distile su	12.9	11	10



**Tablo 10.** İkinci PCR koşulları \*

Aşama	Sıcaklık	Zaman (saniye)	Döngü sayısı
Denatürasyon	96 °C	10	25
Bağlanma	50 °C	5	
Uzama	60 °C	240	
Bekletme	4 °C	∞	

\* BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol 2002

### 3.11 2. PCR ürünlerinin saflaştırılması

İkinci PCR ürünleri ortamda bulunan bağlanmamış flüoresan işaretli ddNTPlerin uzaklaştırılması için DyeEx 2.0 kiti ile saflaştırıldı. Kullanılan kitin işleyiş mekanizması Ek 3'tedir. Yöntem aşağıdaki adımlarda gerçekleştirildi:

- I. Kolonlar işlemde önce hafifçe vortekslenip içerikleri karıştırıldı.
- II. Kolonun kapağı gevşetildi.
- III. Kolonun altındaki kapak kırılarak açıldı.
- IV. Kolonlar kitin içeriğindeki toplama tüplerine yerleştirildi. Kolonların tüplere yerleştirilme konumları not alındı.
- V. Dört dakika 2830 rpm'de santrifüj yapıldı.
- VI. Kolonlar toplama tüplerinden alındı ve steril 1.5 ml'lik eppendorf tüplere yerleştirildi.
- VII. 20 µl 2. PCR ürünü dikkatlice jelin yüzeyine aktarıldı.
- VIII. Kolonlar 4. aşamadaki konumlarına göre tekrar santrifüje yerleştirildi
- IX. 2 dakika aynı hızda santrifüj yapıldı.
- X. Kolon uzaklaştırıldı.
- XI. Eppendorf tüplerin içine geçen saflaştırılmış PCR ürünleri 24 saatten uzun süre bekletilecekleri zaman alüminyum folyoyla sarılıp -20 °C'de saklandı.
- XII. Kısa süre içinde kullanılacak örnekler ise alüminyum folyoya sarıldı ve buz üstüne alındı.

### 3.12 Saflaştırılmış ikinci PCR ürünlerinin kurutulması

Elektroforetik dizin analizi için gerekli sinyal şiddetini sağlamak üzere DyeEx kolonlarından geçirilen PCR ürünleri aşağıda belirtilen şekilde kurutuldu (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol, 2002).

Kurutma işleminde Eppendorf Thermomixer® cihazı kullanıldı. Önceden 70 °C'ye ayarlanan cihaza saflaştırılmış PCR ürünlerini içeren tüpler kapakları açık olarak yerleştirildi. 20 dakika bekletilerek kurutma işlemi gerçekleştirildi.

### 3.13 Elektroforez aşaması

Elektroforez ve dizin analizi ABI Prism 310 Bilgisayar Kontrollü Genetik Analizör cihazında (Applied Biosystems) yapıldı.

#### 3.13.1 Örneklerin elektroforeze hazırlanması

Kurutulmuş ikinci PCR ürünlerinin bulunduğu ependorf tüplere 25 µl Hi-Di formamid eklendi. Kısa bir süre tüpler vortekslendi ve tüplerinin yüzeylerine yapışmış olabilecek damlaları tüpün dibine indirmek için kısa süre santrifüj yapıldı. Daha sonra 95°C'de 5 dakika denatürasyon yapıldı ve örnekler 0.5 ml'lik steril tüplere aktarıldı. Tüplerin üstleri septumla kapatıldı ve ABI 310 Genetik Analizör cihazına yüklenene kadar buzda bekletildi.

#### 3.13.2 Elektroforez

ABI 310 Genetik Analizör bilgisayarından veri toplama yazılımı (Data Collection Software) açıldı. Örneklerin genetik analizöre yüklenmeye hazırlanmasından önce, zaman tasarrufu sağlamak için, aletin bilgisayarında veri toplama yazılımında ki "Windows" menüsünden manual kontrol seçeneği seçilip açılan menüden "Temperature Set" seçildi ve 50 °C yazılarak execute komutu verildi. Böylece alet yürütme için gerekli olan 50 °C'ye doğru ısınmaya başladı.

Daha sonra veri toplama yazılımına sekans analizi parametreleri girildi. Matriks olarak daha önceden cihazda yüklü bulunan "sequencing matrix" seçildi. Tek tek örneklerin isimleri veri toplama yazılımına girildi. Cihazda yüklü olan polimerin tipine göre Pop 4 polimeri (Applied Biosystems) veya Pop 6 polimerine (Applied Biosystems) uygun "Run module", "Dye Set/Primer (Mobility) File" bölümleri dolduruldu. ABI 310 Genetik Analizör dizin

analizi parametreleri Tablo 11’de görülmektedir. Uygun parametreler ayarlandıktan sonra örnekler cihaza yüklendi ve elektroforez başlatıldı.

**Tablo 11.** ABI 310 dizin analizi parametreleri

<b>Parametre</b>	Pop 4 ile yapılan yürütme	Pop 6 ile yapılan yürütme
<b>Matriks</b>	Sequencing matrix	Sequencing matrix
<b>Run module</b>	P4RapidSeq (1 mL) E	Seq POP6 Rapid (1 mL) E
<b>Dye Set/Primer (Mobility) File</b>	DT310POP4{BDv3}v1.mob	DT310POP6{BDv3}v1.mob

### 3.14 Sonuçların incelenmesi

Ham verilerin analizi Sequencing Analysis (Applied Biosystems) ve SeqScape 3.7 programları (Applied Biosystems) kullanılarak yapıldı. Sequencing Analysis programı aracılığı ile yürütmelerin başarılı olup olmadığı belirlendi ve örneklerin dizileri saptandı. SeqScape 3.7 ve Sequencher 4.10.1 programları ile ise yürütmeler “Cambridge” referans dizisi ile (Andews ve ark. 1999) ile karşılaştırıldı ve polimorfik noktalar belirlendi.

## 4 BULGULAR

Tez çalışmasında aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 5 gönüllüden alınan 21 adet eser miktarda DNA içeren örnek ve 12 adet kan örneği incelendi. Çalışmanın aşamaları gereç ve yöntem bölümünde anlatıldığı gibi aşağıdaki sırada gerçekleştirildi:

- Örneklerin toplanması
- DNA izolasyonu
- DNA miktarının belirlenmesi
- 1. PCR aşaması
- 1. PCR ürünlerinin saflaştırılması
- 2. PCR aşaması
- 2. PCR ürünlerinin saflaştırılması
- Elektroforez aşaması

Çalışma esnasında kontaminasyon riskini önlemek için gerekli tüm önlemler alındı ve çalışmanın her aşamasında tek kullanımlık eldiven, bone ve maske kullanıldı. İzolasyonlar sonucu elde edilen DNA konsantrasyonları Tablo 12’de gösterilmiştir

**Tablo 12.** Kişisel eşyalar üzerinden izole edilen DNA miktarları

Kişisel eşyalar	Elde Edilen DNA Konsantrasyonları (ng/μl)
<b>Küpe (1.kişi)</b>	0,33
<b>Küpe (2.kişi)</b>	0,34
<b>Küpe (5.kişi)</b>	0.41
<b>Diş Fırçası (1.kişi)</b>	1,56
<b>Diş Fırçası (3.kişi)</b>	1.03
<b>Sigara İzmariti (4.kişi)</b>	0,42
<b>Sigara İzmariti (5.kişi)</b>	0,37
<b>Kulak Pamuğu (4.kişi)</b>	0,83
<b>Sakız (2.kişi)</b>	0.30
<b>Jilet (3.kişi)</b>	0.55
<b>Bardak kenarı (2.kişi)</b>	0.22

Saç ve tırnaktan DNA izolasyonu için iki farklı ticari kit kullanıldı ve izolasyon işleminde bazı modifikasyonlar yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 13’te görülmektedir.

**Tablo 13.** Saç ve tırnaklardan elde edilen DNA miktarları tablosu

	<b>Kullanılan miktarlar</b>	<b>1.Yöntem ile elde edilen DNA Konsantrasyonları (ng/μl) *</b>	<b>2. Yöntem ile elde edilen DNA Konsantrasyonları (ng/μl) **</b>	<b>Modifiye 2. Yöntem ile elde edilen DNA Konsantrasyonları (ng/μl) ***</b>
<b>Köksüz Saç (1.olgu)</b>	8 adet yaklaşık 15-20 cm	- ****	-	0,31
<b>Köksüz Saç (2.olgu)</b>	8 adet yaklaşık 15-20 cm	-	-	0,48
<b>Köksüz Saç (3.olgu)</b>	10 adet yaklaşık 3-6 cm	-	-	0,43
<b>Köksüz Saç (4.olgu)</b>	10 adet yaklaşık 3-6 cm	-	-	0,55
<b>Köklü Saç (5.olgu)</b>	7 adet yaklaşık 12-22 cm	0,20	0.18	1,17
<b>Tırnak (1.olgu)</b>	1adet tırnak	0,41	0,26	3,20
<b>Tırnak (2.olgu)</b>	1 adet tırnak	-	-	1,82
<b>Tırnak (3.olgu)</b>	1 adet tırnak	0.27	0,15	2,52
<b>Tırnak (4.olgu)</b>	1 adet tırnak	0.39	0,33	3,45
<b>Tırnak (5.olgu)</b>	1 adet tırnak	-	0,26	2,49

\* QIAamp DNA Micro Kit, saç ve tırnaktan DNA izolasyonu prosedürü kullanıldı.

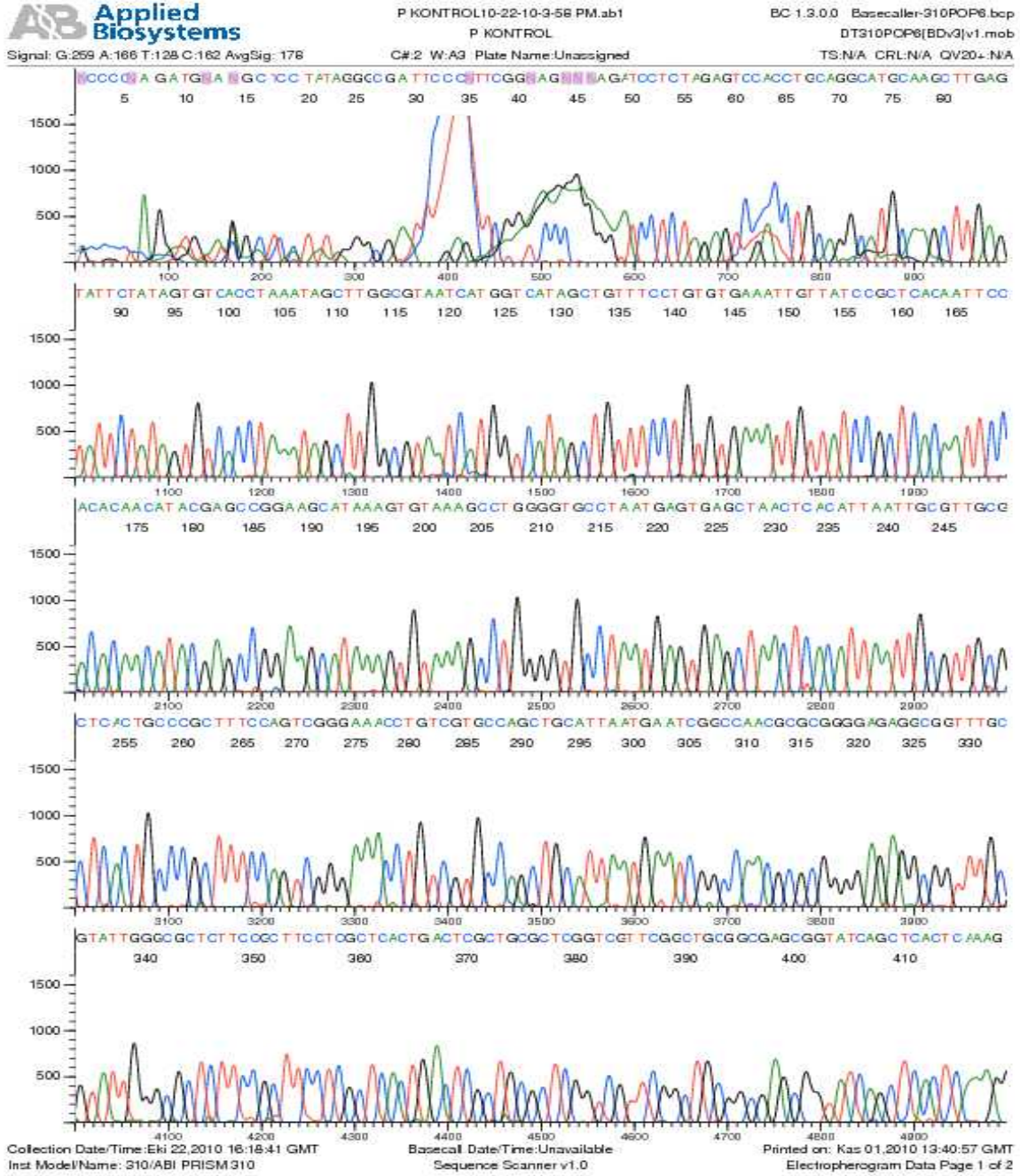
\*\* ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit prosedürü uygulandı.

\*\*\* Lizis tamponlarına 20 μl DTT ilave edildi ve inkubasyon süresi 1 gece olarak değiştirildi.

\*\*\*\* Qubit® fluorometer cihazı ile 10 pg/μl'nin altındaki DNA miktarı tespit edilememektedir.

Çalışma esnasında BigDye Terminator dizinleme kitinin çalışmasını kontrol etmek için kitin içeriğinde bulunan kontrol DNA (pGEM®-3Zf(+)) çift zincirli DNA) ve kontrol primer karışımı (-21 M13 Kontrol Primer 3.2 μM) kullanılarak pozitif ve negatif kontroller

yapıldı. Pozitif ve negatif kontrol reaksiyonları gereç ve yöntem bölümünde Tablo 9'da belirtildiği şekilde hazırlandı. PCR ve elektroforez gerçekleştirildi. Pozitif kontrol reaksiyonundan beklenen dizi elde edildi (Şekil 9). Negatif kontrol reaksiyonunun da ise Şekil 10'da görüldüğü gibi her hangi bir pik elde edilmedi. Bu durum çalışmada her hangi bir kontaminasyonun olmadığını göstermektedir.

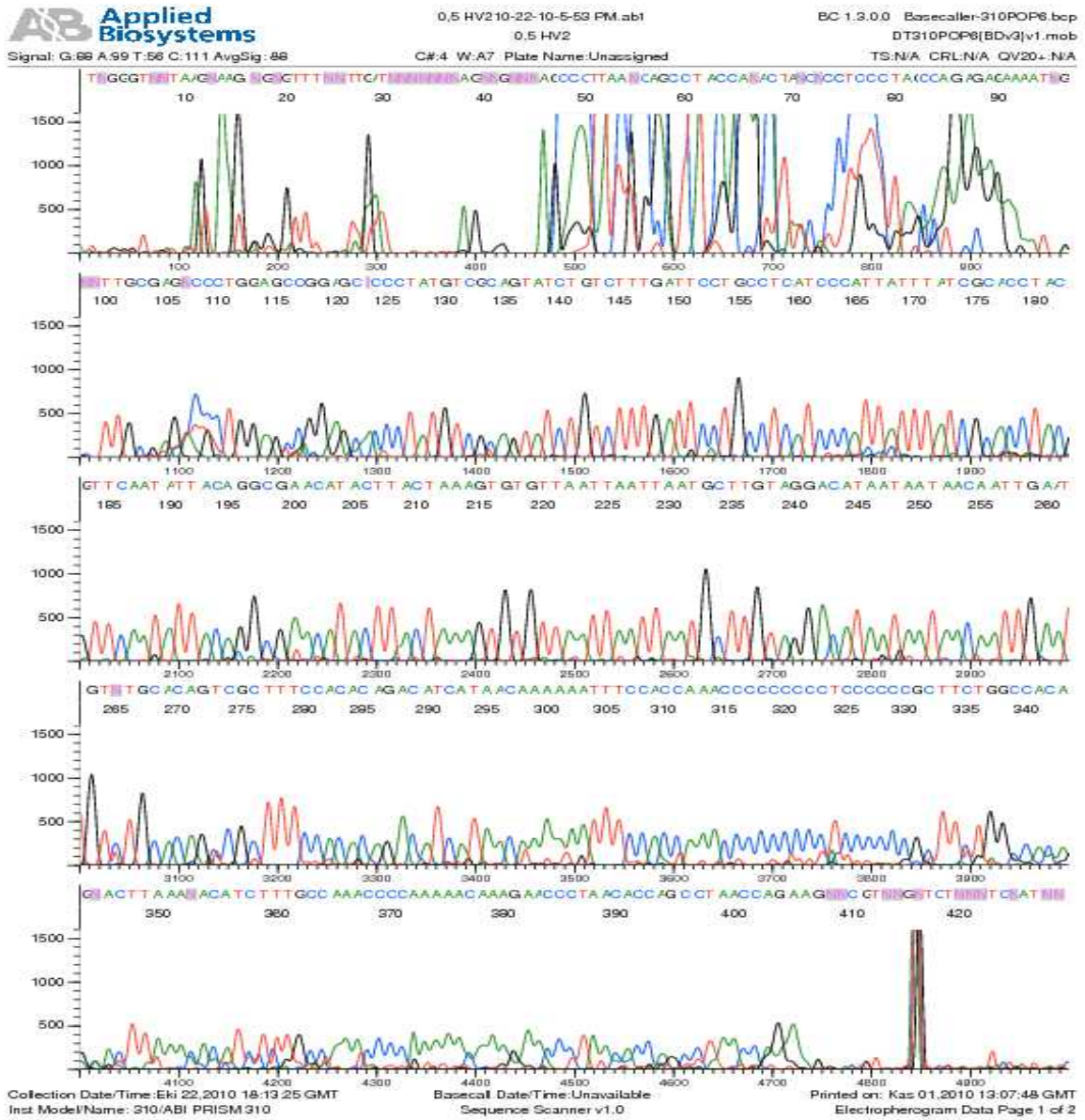


Şekil 9. BigDye Terminator pozitif kontrol reaksiyonu elektroforegramı





Yöntemin hassasiyetini belirlemek için 9947A (Promega Product 9947A, 2011) kodlu konsantrasyonu bilinen kontrol DNA ile çalışıldı. 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 ng miktarındaki kontrol DNA'sı 1. PCR aşamasına eklendi ve materyal ve metotta anlatılan yöntemle dizin analizi yapıldı. Sonuçlar incelendiğinde 0.25 ng, 0.5 ng ve 1 ng'lık örneklerin analizinin başarılı olduğu, 0.1 ve 0.05 ng'lık örneklerden ise dizin analizi yapılamadığı saptandı. Dolayısı ile yöntemin hassasiyeti, dizin analizi yapılan en düşük DNA miktarı olan 0.25 ng'dır. Hassasiyet yürütmelerine ait örnek elektroforegramlar Şekil 11 ile Şekil 14 arasında verildi.



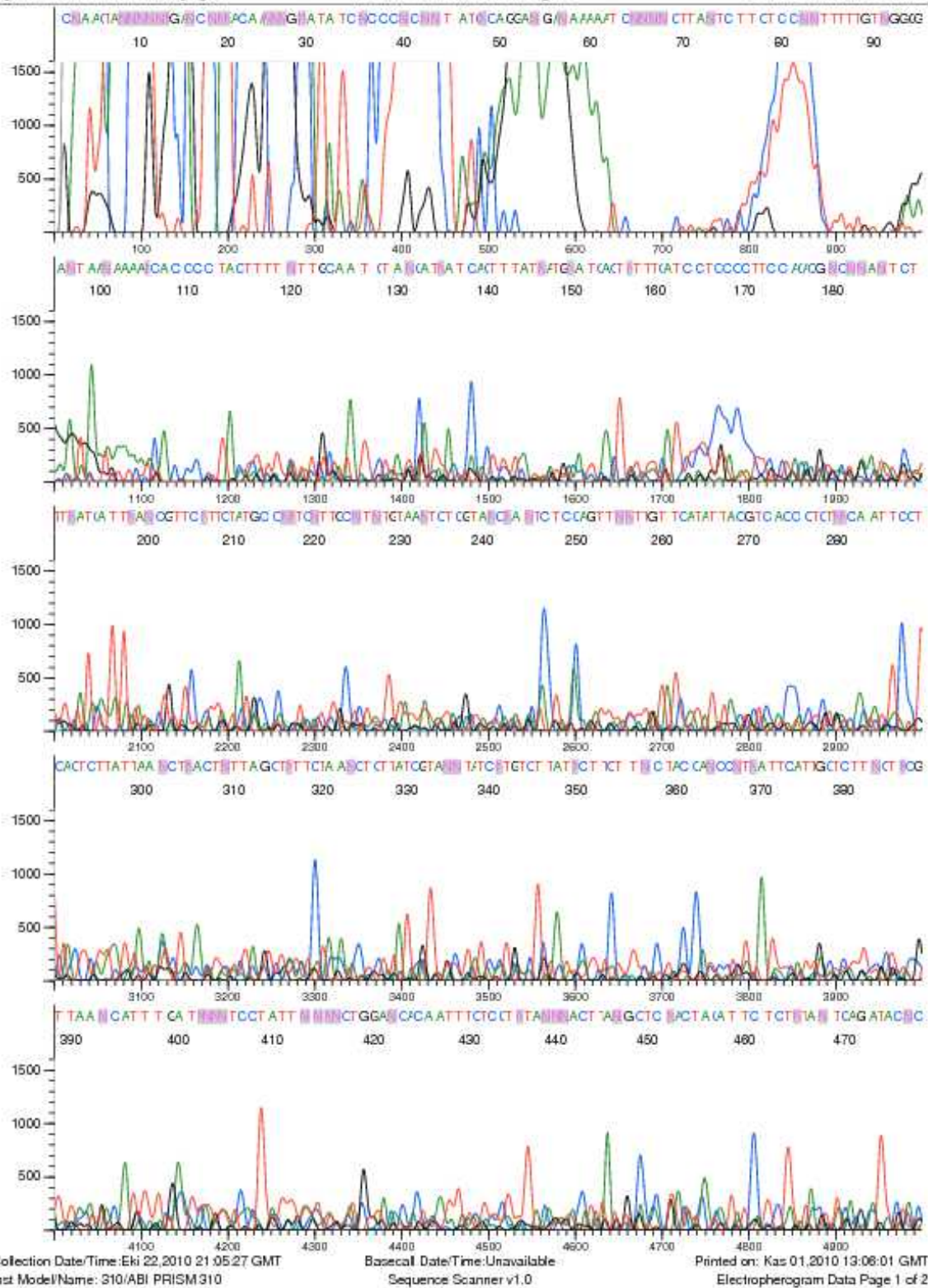
Şekil 11. 0.5 ng kontrol DNA ile yapılan dizin analizine ait elektroforegram











Şekil 14.05 ng kontrol DNA ile yapılan sonuç alınmamış elektroforegram

Yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermek için aynı örnekler 7 ay sonra aynı kişi ve farklı kişi tarafından çalışıldı ve aynı genotip elde edildi. Tekrarlanabilirlik çalışmasına ait elektroforegramlar Ek 4’de verilmiştir.

İlk 5 olguya ait farklı örnekler gönüllü kişilerden toplandıktan sonra farklı plastik tüpler içerisinde oda ısısında tüplerin kapakları kapalı olarak saklandı. Genotipleme sonunda, aynı olguların farklı örneklerinde aynı genotipler tayin edildi. Ayrıca 12 kan örneğinde de başarılı dizin analizi yapıldı. Tablo 14’de çalışılan örnekler gösterilmektedir. Her olgu için incelenilen örnek “√” sembolü ile işaretlenmiştir.

**Tablo 14.** Çalışılan örnekler tablosu

<b>Olgular:</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3.</b>	<b>4.</b>	<b>5.</b>	<b>6.</b>	<b>7.</b>	<b>8.</b>	<b>9.</b>	<b>10.</b>	<b>11.</b>	<b>12.</b>	<b>13.</b>	<b>14.</b>	<b>15.</b>	<b>16.</b>	<b>17.</b>
<b>Kan</b>						√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
<b>Tırnak</b>	√	√	√	√	√												
<b>Küpe</b>	√	√			√												
<b>Diş fırçası</b>	√		√														
<b>Saç</b>	√	√	√	√	√												
<b>Sakız</b>		√															
<b>Bardak kenarı</b>		√															
<b>Jilet</b>			√														
<b>Sigara izmariti</b>				√	√												
<b>Kulak pamuğu</b>				√													

Aynı olguya ait farklı biyolojik materyallerden elde edilen dizin analizi ve Cambridge referans dizi ile karşılaştırma sonuçları Tablo 15-20 arasında verilmiştir.

**Tablo 15.** Birinci olguya ait örneklerin dizin analiz sonuçları

Örnekler	Kaliteli veri alınan aralık (bç)	Polimorfik nokta	Referans dizi	Gözlenen varyant
<b>Saç</b>	HV2, 112-376	152	T	C
		263	A	G
309.1*		-***	C ins	
309.2 **		-	C ins	
315.1		-	C ins ****	
<b>Tırnak</b>	HV1, 16087-16408	16223	C	T
		16274	G	A
		16362	T	C
HV2, 58-363		152	T	C
		263	A	G
		309.1	-	C ins
<b>Küpe</b>	HV1, 16074-16408	309.2	-	C ins
		315.1	-	C ins
		16223	C	T
16274		G	A	
16362		T	C	
<b>Diş fırçası</b>		HV2, 88-365	152	T
	263		A	G
	309.1		-	C ins
	309.2		-	C ins
	315.1		-	C ins
<b>Diş fırçası</b>	HV1, 16135-16409	16223	C	T
		16274	G	A
		16362	T	C
HV2, 107-360		152	T	C
		263	A	G
		309.1	-	C ins
<b>Diş fırçası</b>	HV1, 16122-16411	309.2	-	C ins
		315.1	-	C ins
		16223	C	T
16274		G	A	
16362		T	C	

\* 309.1 ifadesi 309. bazdan sonra 1 insersiyon olduğunu göstermektedir.

\*\* 309.2 ise 309. Bazdan sonra ikinci bir insersiyonun da olduğunu belirtmektedir.

\*\*\* Referans dizide bu noktalardaki bazlar eksik olduğu için “-“ ifadesi kullanıldı.

\*\*\*\* Gözlenen varyant sütunlarında C ins ile belirtilen noktalarda bir adet C insersiyonu tespit edilmiştir.

**Tablo 16.** İkinci olguya ait örneklerin dizin analiz sonuçları

Örnekler	Kaliteli veri alınan aralık (bç)	Polimorfik nokta	Referans dizi	Gözlenen varyant
Saç	HV2, 56-307	73	C	T
		150	A	G
263		A	G	
	HV1, 15995-16316	- *	-	-
Tırnak	HV2, 74-390	150	A	G
		263	A	G
		315.1	-	C ins
	HV1, 16074-16408	16343	A	G
Küpe	HV2 176-293	263	A	G
	HV1, 16124-16410	16343	A	G
Sakız	HV2, 113-389	150	A	G
		263	A	G
		315.1	-	C ins
	HV1, 16122-16411	16343	A	G
Bardak kenarı	HV2, 177-323	263	A	G
		315.1	-	C ins
		HV1, 16083-16411	16343	A

\* Referans dizi ile herhangi bir farklılık saptanmamıştır.

**Tablo 17.** Üçüncü olguya ait örneklerin dizin analiz sonuçları

Örnekler	Kaliteli veri alınan aralık (bç)	Polimorfik nokta	Referans dizi	Gözlenen varyant
Saç	HV2, 78-378	152	T	C
		263	A	G
		309.1	-	C ins
		309.2	-	C ins
		315.1	-	C ins
		HV1, 16069-16408	16261	C
		16304	T	C
		16319	G	A
Tırnak	HV2, 88-365	152	T	C
		263	A	G
		309.1	-	C ins
		309.2	-	C ins
		315.1	-	C ins
		HV1, 15997-16322	16223	C
		16274	G	A
		16362	T	C

<b>Jilet</b>	HV2, 110-378	152	T	C
		263	A	G
		309.1	-	C ins
		309.2	-	C ins
		315.1	-	C ins
HV1, 16079-16410	16223	C	T	
	16274	G	A	
	16362	T	C	
<b>Diş fırçası</b>	HV2, Sonuç alınamadı			
	HV1, 15989-16338	16223	C	T
		16274	G	A
		16362	T	C

**Tablo 18.** Dördüncü olguya ait örneklerin dizin analiz sonuçları

<b>Örnekler</b>	<b>Kaliteli veri alınan aralık (bç)</b>	<b>Polimorfik nokta</b>	<b>Referans dizi</b>	<b>Gözlenen varyant</b>
<b>Saç</b>	HV2, 130-390	195	T	C
		263	A	G
		315.1	-	C ins
	HV1, 16058-16409	16126	T	C
		16195	T	C
16294		C	T	
16296		C	T	
<b>Tırnak</b>	HV2, 115-390	195	T	C
		263	A	G
		315.1	-	C ins
	HV1, 16078-16410	16126	T	C
		16195	T	C
16294		C	T	
16296		C	T	
<b>Sigara izmariti</b>	HV2, 69-390	73	A	G
		195	T	C
		263	A	G
		315.1	-	C ins
	HV1, 15976-16300	16126	T	C
16195		T	C	
16294		C	T	
16296		C	T	
<b>Kulak pamuğu</b>	HV2, 87-390	195	T	C
		263	A	G
		315.1	-	C ins
	HV1 15992-16300	16126	T	C
		16195	T	C
16294		C	T	
16296		C	T	

**Tablo 19.** Beşinci olguya ait örneklerin dizin analizi sonuçları

Örnekler	Kaliteli veri alınan aralık (bç)	Polimorfik nokta	Referans dizi	Gözlenen baz
<b>Saç</b>	HV2, 59-378	73	A	G
		195	T	C
263		A	G	
309.1		-	C ins	
315.1		-	C ins	
	HV1, 15979-16301	-	-	-
<b>Tırnak</b>	HV2, 100-375	195	T	C
		263	A	G
309.1		-	C ins	
315.1		-	C ins	
		HV1, 16065-16408	-	-
<b>Sigara izmariti</b>	HV2, 82-390	195	T	C
		263	A	G
309.1		-	C ins	
315.1		-	C ins	
		HV1, 15989-16298	-	-
<b>Küpe</b>	HV2, 57-390	73	A	G
		195	T	C
263		A	G	
309.1		-	C ins	
315.1		-	C ins	
		HV1, 16102-16409	-	-

Tez kapsamında ayrıca 12 kişiden alınan kan örnekleri çalışıldı. Çalışılan tüm örneklere ait belirlenen HV1 ve HV2 genotip sonuçları Tablo 20’de görülmektedir. Bu tablonun 3. sütunundaki ilk baz referans dizide bilinen, ikinci baz ise olguda gözlenen bazı göstermektedir. Olguların referans dizi ile farklılık gösterdikleri bazların konumları ise ikinci sütunda verildi. Tablodaki ilk 5 olgu eser miktarda DNA içeren örnekleri kapsamaktadır (saç, tırnak, diş fırçası, sigara izmariti, tıraş jileti, bardak kenarı swabı, kulak pamuğu). Tablo 20 oluşturulurken incelenen her kişi için dizin analizi yapılan ortak aralıklar göz önüne alındı.



**Tablo 20.** HV1 ve HV2 bölgeleri için saptanan sonuçlar.

Olgular	HV1 (16119-16401)		HV2 (140-320)	
	Polimorfik nokta	Değişim	Polimorfik nokta	Değişim
<b>1. Olgu</b>	16223	C-T	152	T-C
	16274	G-A	263	A-G
			309.1	C ins
	16362	T-C	309.2	C ins
			315.1	C ins
<b>2. Olgu</b>	16343	A-G	150	C-T
			263	A-G
			315.1	C ins
<b>3. Olgu</b>	16261	C-T	152	T-C
	16304	T-C	263	A-G
			309.1	C ins
	16319	G-A	309.2	C ins
			315.1	C ins
<b>4. Olgu</b>	16126	T-C	195	T-C
	16195	T-C	263	A-G
	16294	C-T		
	16296	C-T	315.1	C ins
<b>5. Olgu</b>	-	-	195	T-C
			263	A-G
			309.1	C ins
			315.1	C ins
<b>6. Olgu</b>	16260	C-T	263	A-G
			309.1	C ins
	16399	A-G	309.2	C ins
			315.1	C ins
<b>7. Olgu</b>	16183	A-C	153	A-G
	16189	T-C	195	T-C
	16194	A-C	263	A-G
			315.1	C ins
<b>8. Olgu</b>	16256	C-T	263	A-G
	16270	C-T	309.1	C ins
	16399	A-G	315.1	C ins
<b>9. Olgu</b>	16395	T-C	263	A-G
	16294	C-T	315.1	C ins
	16296	C-T		
<b>10. Olgu</b>	Sonuç alınamadı		215	A-G
			263	A-G
			309.1	C ins
			315.1	C ins
<b>11. Olgu</b>	16129	G-A	152	T-C
			263	A-G
	16223	C-T	315.1	C ins

<b>12. Olgu</b>	16168	C-T	150	A-G
	16294	C-T	152	T-C
			263	A-G
	16343	A-G	309.1	C ins
			315.1	C ins
<b>13. Olgu</b>	16311	T-C	263	A-G
			315.1	C ins
<b>14. Olgu</b>	-	-	263	A-G
			315.1	C ins
<b>15. Olgu</b>	16172	T-C	242	C-T
			263	A-G
	16189	T-C	295	C-T
			315.1	C ins
<b>16. Olgu</b>	16319	G-A	185	G-A
			228	G-A
			263	A-G
			295	C-T
			309.1	C ins
			309.2	C ins
315.1	C ins			
<b>17. Olgu</b>	16223	C-T	189	A-G
			194	C-T
	16292	C-T	195	T-C
			204	T-C
			207	G-A

Tüm polimorfik noktalar Tablo 21’de görülmektedir. rCRS (revised Cambridge Reference Sequence) sütununda karşılaştırma yapılan referans dizideki, değişim sütununda ise incelenen olgularda tespit edilen bazlar yer almaktadır.

Sonuçların genel değerlendirmesi yapıldığında Tablo 21’de görüleceği gibi, iki kişinin HV1 bölgesi referans dizi ile tam uygunluk gösterdi (5. ve 14. Olgular). HV2 bölgesinde ise:

a) 9. ve 14. olguda yalnız 263 A-G, 315.1 C değişimleri,

b) 1. ve 3. olguda 152 T-C, 263 A-G, 309.1C, 309.2 C, 315.1 C değişimleri saptandı.

Yani a ve b seçeneğinde belirtilen kişilerin HV2 için aynı genotipe sahip oldukları belirlendi. Ancak HV1 ve HV2 bölgeleri birlikte değerlendirildiğinde çalışmaya katılan 17 kişinin tümünün farklı birer genotipe sahip oldukları saptandı.

Bütün olgularda HV2 bölgesinde yer alan 263. bazın Cambridge referans dizisiyle farklılık gösterdiği ve 315. bazdan sonra bir adet C insersiyonu (ins) olduğu belirlendi.

Tablo 22’de Referans diziden farklılık gösteren noktaların gözleendiği kişi sayısı ve görölme sıklıkları yer almaktadır.

Polimorfik noktalar incelendiğinde, görülen mutasyonların çoğunluğunun (69.52 %) transisyon tipi mutasyon olduğu görüldü. Sadece 16194 ve 16183 polimorfik noktaları transversiyon tipi mutasyonlarla meydana gelmiştir ve bu mutasyonlar birer kez tespit edilmiştir. İnsersiyonlar 3 noktada belirlenmiştir (309.1 309.2 ve 315.5) ve insersiyonların görölme sıklığı 28.57 % olarak hesaplandı.

Tablo 21. Tüm olgularda belirlenen polimorfik noktalar

	Polimorfik noktalar	rCRS	Değişim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*	11	12	13	14	15	16	17	
HV2	150	C	T		√										√						
	152	T	C	√		√								√	√						
	153	A	G							√											
	185	G	A																√		
	189	A	G																	√	
	194	C	T																	√	
	195	T	C				√	√		√										√	
	204	T	C																	√	
	207	G	A																	√	
	215	A	G											√							
	228	G	A																	√	
	242	C	T																√		
	263	A	G	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
	295	C	T																√	√	√
	309.1	-	C ins	√		√			√	√		√		√		√				√	
309.2	-	C ins	√		√				√										√		
315.1	-	C ins	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
HV1	16126	T	C				√						-								
	16129	G	A										-	√							
	16168	C	T										-		√						
	16172	T	C										-					√			
	16183	A	C							√			-								
	16189	T	C							√			-					√			
	16192	C	T										-								
	16194	A	C							√			-								
	16195	T	C				√						-								

	Polimorfik noktalar	rCRS	Değişim	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*	11	12	13	14	15	16	17
HV1	16223	C	T	√									-	√						√
	16256	C	T								√		-							
	16260	C	T						√				-							
	16261	C	T			√							-							
	16270	C	T								√		-							
	16274	G	A	√									-							
	16292	C	T										-							√
	16294	A	T				√					√	-		√					
	16296	C	T				√					√	-							
	16304	T	C			√							-							
	16311	T	C										-			√				
	16319	G	A			√							-							√
	16325	T	C										-							
	16343	A	G		√								-		√					
	16362	T	C	√									-							
	16395	T	C										√	-						
16399	A	G							√		√	-								

\* HV1 bölgesinden sonuç alınamamıştır.

**Tablo 22.** Referans diziden farklılık gösteren noktaların dağılımı

<b>Noktalar</b>	<b>rCRS</b>	<b>Değişim</b>	<b>Gözlenen kişi sayısı</b>	<b>Görülme sıklığı (%)</b>
150	C	T	2	1,90
152	T	C	4	3,80
153	A	G	1	0,95
185	G	A	1	0,95
189	A	G	1	0,95
194	C	T	1	0,95
195	T	C	4	3,80
204	T	C	1	0,95
207	G	A	1	0,95
215	A	G	1	0,95
228	G	A	1	0,95
242	C	T	1	0,95
263	A	G	17	16,19
295	C	T	2	1,90
309.1	-	C ins	9	8,57
309.2	-	C ins	4	3,80
315.1	-	C ins	17	16,19
16126	T	C	1	0,95
16129	G	A	1	0,9
16168	C	T	1	0,95
16172	T	C	1	0,95
16183	A	C	1	0,95
16189	T	C	2	1,90
16192	C	T	1	0,95
16194	A	C	1	0,95
16195	T	C	1	0,95
16223	C	T	4	3,80
16256	C	T	1	0,95
16260	C	T	1	0,95
16261	C	T	1	0,95
16270	C	T	1	0,95
16274	G	A	1	0,95
16292	C	T	2	1,90
16294	C	T	3	2,85
16296	C	T	2	1,90
16304	T	C	1	0,95
16311	T	C	1	0,95
16319	G	A	2	1,90
16325	T	C	1	0,95
16343	A	G	2	1,90
16362	T	C	1	0,95
16395	T	C	1	0,95
16399	A	G	2	1,90

## 5 TARTIŞMA

DNA analizleri ile günümüzde pek çok dava aydınlatılmaktadır. Rutin olarak uygulanan analiz yöntemlerinin sonuç vermediği durumlarda ise mitokondriyal DNA dizin analizi gibi alternatif yöntemlere başvurulması sonucu alınabilir. Bu tez çalışmasında; saç, tırnak, sigara izmariti, diş fırçası, küpe, bardak kenarından alınmış salya, sakız gibi örneklerden DNA izolasyonu ve mitokondriyal DNA'nın D-loop (HVI ve HVII) bölgesinin dizin analizinin optimizasyonunun yapılması amaçlandı. Mitokondriyal DNA dizin analizi için çalışılan yöntemin optimizasyonu ve rutin uygulamaya girmesi günümüzde halen çözülememiş birçok olgunun aydınlatılmasına fayda sağlayacaktır.

Adli bilimlerde mitokondriyal DNA çalışmalarında sıklıkla HV1 ve HV2 bölgelerinin dizin analizleri yapılır (Holland ve ark, 1999). Ayrıca tek nükleotid değişimi (SNP) analizlerinden yararlanılmaktadır (Vallone ve ark. 2004). Ancak mitokondri analizlerinin ayırım gücünü arttırmak için HV1/HV2 bölgeleri dizinlenmesi ve mitokondriyal SNP çalışmasının eş zamanlı yapılması önerilmektedir (Parsons ve ark 2006). SNP lokusları çoğunlukla bialelik oldukları için ayırım güçleri düşüktür. Bu nedenle analizlerinde yeterli ayırım gücüne ulaşmak için çok sayıda lokusun incelenmesi gerekir. İncelenen bölgelerin seçiminde etik değerler dikkate alınmalı, kişinin özel bir durumunu yansıtmayan (hastalıklarla ilgili veya etnik köken gibi bilgiler vermeyen) SNP lokusları tercih edilmelidir. HV1/HV2 yüksek değişken bölgeleri mitokondriyal genomun kodlama yapmayan kontrol bölgesindedir. STR bölgeleri gibi HV1/HV2 bölgeleri de kodlama yapmaz ve kişinin fenotipinde bir etkileri yoktur. Bu tez çalışması adli bilimlere etğine uymaktadır.

Adli bilimlerde genel yaklaşım DNA üzerinde küçük bölgeler ile çalışmaktır. Bunun sebebi DNA miktarı az ve bozulmuş örneklerle çalışma zorunluluğudur. Bu çalışmada incelenen HV1 bölgesi ampliconları 443 bp, HV2 bölgesi ampliconları ise 375 bp uzunluğundadır. Bu amplicon boyu adli bilim çalışmaları için uzundur ve çoğaltılması zordur. Adli bilimciler bu zorluğu gidermek için amplicon uzunluğu yaklaşık 250 bp olacak şekilde (HV1 ve HV2 primerlerin bağlandığı bölgeler de dâhil) primer dizaynı yapmaktadır (Rapley ve ark. 2007). Bu çalışmada incelenilen bölgeler degrade örnekler için önerilen uzunluktan fazla olmakla birlikte, eser miktarda DNA içeren örneklerden başarı ile dizinleme yapılmıştır. Ayrıca dizin analizinde ilk ve son bazlarda artefak piklerden ötürü kayıplar bekleneceği için ampliconların boyu ne kadar fazla seçilirse kayıpların bütüne etkisi o kadar azalır.

DNA dizin analizi için günümüzde kullanılan pek çok yöntem vardır (Franca ve ark. 2002). Bu yöntemlerden adli laboratuvarlarda kullanılmaya en uygun olanı Sanger dizinleme metodudur. Adli laboratuvarlarda kimlik tespitinde rutin olarak STR analizleri yapılır. STR analizlerinde kullanılan temel cihazlar PCR ve kapiler elektroforez aletleridir. Sanger yöntemi kullanılarak yapılan dizin analizleri de aynı cihazlarla yapılabilmektedir. Bu çalışma İ. Ü. Adli Tıp Enstitüsü laboratuvarında mevcut olan PCR ve kapiler elektroforezinde Sanger metodu kullanılarak gerçekleştirildi.

Örneklerden DNA izolasyonu optimize edilirken kullanılan ticari kitlerin prosedürlerinde modifikasyonlar yapılarak ve elde edilen DNA konsantrasyonları artmıştır (ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kits Instruction Manual, 2005, QIAamp® DNA Micro Handbook, 2010). Özellikle tırnak ve saç örneklerinden DNA izolasyonu esnasında Dithiothreitol (DTT) ilavesinin, elde edilen DNA miktarını arttırdığı gözlemlendi. DTT saç ve tırnağın yapısında bulunan disülfid bağlarını yıkar. DTT'nin hücrelerin kimyasal ve enzimatik olarak parçalandığı lizis aşamasında eklenmesi gerekir (Hühne ve ark. 1999). Diğer bir modifikasyon ise inkübasyon süresinin uzatılmasıdır. Özellikle saç ve tırnak örnekleri, lizis tamponunda, 56°C'de 12 ila 24 saat arasında bekletildiğinde, izolatlardaki DNA konsantrasyonunun belirgin oranda arttığı saptanmıştır.

Takılar, diş fırçası, tıraş jiletleri, bardak kenarı gibi eşyalardan elde edilen epitel hücrelerini parçalamak için kullanılan lizis tampon ile saç ve tırnak gibi dehidrete olmuş yüksek oranda protein içeren örnekler için kullanılan lizis tamponun içeriği bazı farklılıklar göstermektedir. Örneğin saç ve tırnağın lizis tamponuna indirgen madde olarak DTT ve proteinaz olarak Proteinaz K eklenirken, epitelyum hücrelerinin lizisi için indirgen madde eklemek gerekmedi (McNevin ve ark. 2005). Dehidre olmamış epitel hücrelerinin lizisi için pH'ı ayarlayan tampon, deterjan ve tuzlar yeterli olmaktadır (Sambrook ve ark. 2001). Ancak bu çalışmada kullanılan kitlerin prosedürlerinde önerildiği üzere epitel hücrelerinin lizis tamponlarına proteinaz K enzimi eklenmiş ve başarılı sonuç alınmıştır. Epitel hücrelerinin parçalanması daha kolay olduğu için inkübasyon zamanları kullanılan QIAamp DNA Micro Kit'in prosedüründe belirtildiği gibi 1 ila 2 saat arası seçilmiştir.

Lizis tamponlarında kullanılan DTT'nin elde edilen toplam DNA miktarını düşürdüğü ile ilgili de araştırmalar yapılmıştır. Kalbe ve arkadaşlarının (Kalbe ve ark. 1988) yaptıkları araştırmada, lizis tamponlarında indirgeyici madde olarak kullanılan DTT'nin DNA'daki



nükleotidleri dideoksinükleotidlere indirgeyebileceği ortaya konulmuştur. Dolayısı ile DTT konsantrasyonu çok yüksek olmamalıdır. Tez çalışması esnasında 1 ml lizis tamponunda 20 mM DTT konsantrasyonu ile saç ve tırnak örneklerinden başarı ile DNA izole edildi ve PCR yöntemi ile DNA çoğaltılabildi.

Proteinaz K yada endopeptidaz K stabil, yüksek aktivite gösteren subtilisin ailesine ait bakteriler tarafından sentezlenen bir proteaz enzimidir. Keratini parçalayabilen proteinaz K aynı zamanda DNA'yı degrade edebilen deoksiribonükleaz enzimlerini de hedef alır (Kraus ve ark. 1976). Proteinaz K aktivitesi için kalsiyum iyonlarının ortamda bulunması gerekmektedir. Bu nedenle kalsiyum ticari kitlerin lizis tamponlarında yer almaktadır.

Örnekler lizis aşamasında parçalanıp DNA'larını ortama verdiler. Lizis aşamasından sonra ortamdaki DNA'lar kullanılan ticari kite göre farklı şekillerde izole edildi. Kullanılan kitlerden biri lizatlardaki DNA'yı silika membrana bağlar (QIAamp® DNA Micro Handbook, 2010). Kademeli santrifüj aşamalarında ethanol içeren yıkama tamponları kullanılarak membrana bağlanmış DNA kontraminalardan (proteinler, hücresel kanıtlılar) arındırılır. Kullanılan diğer kit ise (ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit) düşük pH değerlerinde pozitif yüklü olan manyetik boncuklar ile DNA'yı bağlamaktadır (ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kits Instruction Manual, 2005). Manyetik bir stand yardımı ile DNA'yı bağlayan boncuklar izolasyon tüplerinin bir bölümüne çekilir ve ortamdaki kontaminantlardan temizlenir. Ortam pH'sı artırılarak manyetik boncuklara pozitif yük kazandırılır ve böylece DNA serbest bırakılır. Saç ve tırnak örneklerinin izolasyonunda iki kit de denendi ve ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit ile daha yüksek konsantrasyonlarda DNA izole edildi.

İncelenilen örnekler arasında en yüksek konsantrasyonda DNA tırnaktan elde edildi. Saç ve tırnak benzer keratinize yapılar olsa da tırnaktan daha fazla DNA izole edilebildiği bilinmektedir (McNevin ve ark. 2005, Heywood ve ark. 2003, Kaneshige ve ark. 1992). Epitel hücrelerin bulaştıkları jilet, kulak pamuğu, bardak kenarı sıvabı, diş fırçası, sigara izmariti ve sakız gibi örneklerde ise malzemelere bulaşan hücreler çok düşük sayıda oldukları için DNA konsantrasyonları tırnağa göre daha düşüktür. Köksüz saçtan nucDNA ile genotip tayinini çoğu zaman başarısız olmaktadır. Bunun nedeni saç yapısı oluşurken nucDNA'nın yüksek derecede degrade olmasıdır (Linch ve ark. 2001, Ferri ve ark. 2001). Bu çalışmada köksüz saçtan izole edilen mtDNA'nın kontrol bölgesi tiplendirilebildi. Literatür taraması

yapıldığında köksüz saç örneklerinin genotiplenmesinde en sık kullanılan yöntemin mtDNA analizleri olduğu saptanmıştır (Hühne ve ark. 1999, Graffy ve ark. 2005, Wilson ve ark. 1995, Takayanagi ve ark. 2003).

Mitokondriyal DNA HV1 ve HV2 bölgeleri dizinlemelerinde bölgelerin ne şekilde çoğaltılacağı ve ne şekilde dizinleneceğine dair farklı yöntemler vardır (Brinkmann ve ark. 2000). Bu yöntemler temelde DNA izolasyonu, PCR aşaması, PCR sonrası temizlik, dizinlemeye yönelik 2. PCR, 2. PCR ürünlerinin temizliği ve elektroforetik analiz aşamalarından oluşur. Yöntemlerin farkı ise primerlerin seçimi ve çoğaltılacak bölgenin saptanması ile belirlenir. Yöntemlerden biri mtDNA D-Loop bölgesinin tümünü kapsayan bir primer çifti belirlenip birinci PCR aşamasında D-Loop bölgesinin tamamının çoğaltılmasını kapsar (Brandstätter ve ark. 2004). İlk PCR aşamasında çoğaltılan D-Loop bölgesinin dizinlenmesi ise bu bölgenin içindeki dizilere uygun alternatif bir primer seçilerek yapılır. Dizinlemeye yönelik 2. PCR reaksiyonlarında unutulmaması gereken her zaman tek bir adet primerin kullanılması gerektiği ve kullanılan primer hangi mtDNA zincirine ait ise o zincirin dizin analizinin yapılacağıdır. Yöntem D-Loop bölgesini tamamıyla çoğalttığı ve dizinleme primerleri çoğalan bölgenin içinden seçildiği için D-Loop bölgesindeki yüksek mutasyon oranı göz önüne alınmalı ve 2. PCR primerlerinin bağlanma noktalarında meydana gelebilecek mutasyonların PCR aşamasını olumsuz etkileyebileceği göz önüne alınmalıdır (Parson ve ark. 2007).

Diğer yöntem ise HV1 ve HV2 bölgelerinin özgül primer çiftleri kullanılarak farklı PCR reaksiyonlarında çoğaltılmasına dayanır (Parson ve ark. 2007). Daha sonra dizinlemeye yönelik 2. PCR aşamasında birinci PCR aşamasında kullanılan primer çiftlerinden tek bir tanesi kullanılır. Primerin bağlanacağı bölge ilk PCR aşamasında çoğaldığı için aynı primer bu sefer çoğalan DNA'ya bağlanır ve dizin analizi gerçekleştirilir. Tez çalışması esnasında eser miktarda DNA taşıyan örnekler kullanıldığı için ve bu örneklerde DNA'nın degrade olma riski göz önüne alınarak, HV1 ve HV2 bölgelerinin ayrı PCR reaksiyonlarında çoğaltılmasını kapsayan ikinci yöntem kullanıldı. Böylece yaklaşık 1122 bazlık uzun bir D-Loop bölgesinde meydana gelebilen degradasyon ve kırılmalar sonucu PCR aşamasının başarısız olmasının önlenmesi amaçlandı. HV1 ve HV2 bölgeleri ayrı ayrı çoğaltıldıklarında 1. PCR amplikonlarının boyu daha kısa olmaktadır. Eser miktarda DNA taşıyan degrade örneklerde her zaman kısa boylardaki amplikonlarla çalışmak tercih edilmelidir (Grubwieser ve ark. 2006, Butler ve ark. 2003).

Bu çalışmada DNA çoğaltma ve dizin analizi için düşük miktarda DNA ile çalışmaya uygun olan Pajnič Z. I. ve arkadaşlarının (Pajnič ve ark. 2003) PCR koşulları uygulandı. Yöntemin hassasiyetini belirlemek için DNA konsantrasyonları ve genotipleri bilinen DNA ile çalışıldı. Birinci PCR aşamasında 0.12 ng/μl, 0.08 ng/μl, 0.06 ng/μl, 0.04 ng/μl, 0.02 ng/μl, 0.01 ng/μl ve 0.004 ng/μl olan DNA konsantrasyonları kullanıldı. Başarılı bir dizin analizi için en fazla 0.12 ng/μl ve en az 0.01 ng/μl DNA konsantrasyonu kullanmak gerektiği saptandı.

1. PCR ürünlerinin saflaştırılması aşamasında tercih edilen EXO 1 ve SAP enzimleriyle inkübasyon, PCR sonrası ortamda bulunan fazla primer ve dNTP'lerin enzimatik yolla parçalanmasını sağlamak amacı ile yapılır (Parsons 2006). Kullanılan prosedürde önerilen miktar 15 μl lik PCR ürünü üzerine 4.3 ünite (U) SAP ve 11.6 U EXO 1 enzimlerinden eklenmesidir (Argaç 2010). Ancak dizin analizinde ikinci PCR için kullanılan PCR ürünü hacmi 15 μl'den daha düşük olduğu için (0.46 μl) PCR ürün miktarı ve enzim miktarları ¼ oranında azaltılarak kullanıldı. Bu şekilde başarılı sonuç alındı. Bu nedenle EXO-SAP enzimlerinin daha düşük miktarlarda kullanılabilirliklerine karar verildi.

2. PCR reaksiyonuna eklenmesi gereken kalıp DNA miktarını hesaplamak için kullanılan BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit'inin protokolüne bakıldı. 300 ile 400 bp uzunluğundaki bölgeler için önerilen EXOSAP ile saflaştırılmış PCR ürün miktarı 3-10 ng'dır. Bu çalışmada Ek 2'de anlatılan flüorometrik yöntemle EXO-SAP'lı PCR ürünlerinin DNA konsantrasyonları ölçüldü ve ölçülen bütün ürünler için miktarların 10 ila 20 ng/ μl arasında değiştiği saptandı. Dolayısı ile 0.46 μl EXOSAP ile saflaştırılmış PCR ürünlerinin 2. PCR reaksiyonunda başarılı sonuç vereceğine karar verildi. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit'in protokolünde; kit içinde yer alan hazır reaksiyon karışımından reaksiyon başına 8 μl veya 4 μl kullanılabilirliği belirtilmektedir. Kullanılan malzemede tasarrufa gitmek için tez çalışmasında 2. PCR aşamasında 4 μl hazır reaksiyon karışımı kullanıldı. İkinci PCR reaksiyonu toplam hacimleri değiştirilmediği için kullanılan hazır reaksiyon karışımının miktarı azaltılınca meydana gelebilecek pH ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu farklarını ortadan kaldırmak için Applied Biosystems 5X dizinleme tamponu PCR ortamına ilave edildi (Applied Biosystems 5X Sequencing Buffer, Product Insert, 2002).

Dizinleme reaksiyonu sonrası, ortamdaki bağlanmamış floresan işaretli ddNTP'lerin temizliği için DyEx 2.0 Spin Kit kullanıldı. Hazır saflaştırma kiti, dizinleme sonrası

geleneksel temizleme yöntemi olan etanol ile çöktürme yöntemine göre daha pratik, hata oranı düşük, sağlıklı ve hızlı olduğu için tercih edildi (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer User's Manual, Applied Biosystems, 2001). Temizleme işleminden daha başarılı sonuçlar almak için, Dyex Spin kolondaki santrifüjle jel hale gelen yüzeyin orta noktasına örnek dikkatlice eklendi ve santrifüj edildi. Dyex Spin kolon prosedüründe jel oluşma ve örneğin jelden geçirilme aşamalarında yapılan santrifüj için önerilen süre 3 dakikadır. Ancak bu prosedür uygulandığında ürünün istenilen oranda temizlenmediği saptandı. Yapılan deneyler sonucunda en başarılı temizlik işleminin birinci santrifüjde sürenin 4 dakikaya çıkarıldığında, ikinci santrifüj süresinin ise 2 dakikaya indirildiğinde alındığı belirlendi ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarında bu süreler kullanıldı.

Kullanılan dizinleme kit prosedürü gerekli sinyal şiddetinin sağlanması için saflaştırılmış PCR ürünlerinin kurutulmasını önermektedir. Bu çalışmada kurutma işlemi gereç ve yöntemde belirtildiği şekilde uygulandı ve başarılı sonuç alındı.

Bu çalışmada kullanılan yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermek için bir adet örnek üç kez çalışıldı. 2. tekrar, çalışmanın üzerinden 7 ay geçtikten sonra aynı kişi tarafından, 3. tekrar ise farklı bir kişi tarafından yapıldı. Elde edilen genotipler karşılaştırıldığında aynı örneğin aynı kişi tarafından farklı zamanlarda ve farklı kişi tarafından farklı zamanlarda çalışıldığında aynı genotipin elde edildiği belirlendi.

Çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde belirlenen 34 genotip içinde, 73 transizyon, 2 transversiyon ve 30 insersiyon saptandı. Belirlenen değişimlerin % 35.23'ü HV1 ve % 64.77'si HV2 bölgesindedir. Transizyon tipi nokta mutasyonları transversiyon tiplerine göre daha sık rastlanır. Transizyon, bir pürin ya da pirimidinin başka bir pürin ya da pirimidin ile yer değiştirmesi demektir. Transversiyon, bir pürinin yerini pirimidinin alması ya da tam tersidir. En çok transversiyon C'nin G'ye dönüştüğü noktalar olup, çoğunlukla HV2 bölgesinde rastlanmaktadır (Maruyama, ve ark. 2003, <http://www.mitomap.org>). Bu çalışmada insersiyonlar ise HV2 bölgesinde 303 ile 316 noktaları arasındaki C tekrarı bölgesinde gözlemlendi. İncelenen olgularda bu noktalarda farklı sayılarda C tekrarları olduğu saptandı. Bu bölgedeki C tekrarları kişiler arasında yüksek oranda uzunluk polimorfizmi gösterdiği için adli kimliklendirmede kullanıma uygundur. Tüm popülasyon gruplarında ard arda sıralanan C insersiyonları yaygındır (Feng ve ark. 2009).

HV1 ve HV2 bölgelerinde bulunan C/G tekrarları dizinleme analizlerinde teknik zorluklar meydana getirir. HV1’de 16184 ve 16193 arasında, HV2 bölgesinde 303 ve 315 bazları arasında C/G tekrarlarına rastlanmaktadır (Carracedo ve ark. 2000, Stewart ve ark. 2001). Bu tekrarlar arasında 16189. ve 310. bazlar birer T nükleotididir. HV1 bölgesi için 16819. ve HV2 bölgesi için 310. bazda oluşan bir transisyon ile T’nin C’ye dönüşümü uzunluk heteroplazmisi olarak değerlendirilir. Uzunluk heteroplazmileri görülen mtDNA’larda replikasyonun hatalı olma olasılığı artar (Hauswirth ve ark. 1984). Çoklu G/C tekrarlarının bulunduğu bölgelerin replikasyonu sırasında bu bölgelerdeki G/C tekrar sayılarında artma ya da azalma olabilmektedir. Bu durum dizinleme analizlerinde C tekrarlarından sonra gelen dizilerin net bir şekilde belirlenmesini önler. Tez çalışmasında incelenen iki kişide (Tablo 21, 7. ve 15. olgular) 16189. bazda T-C değişimi görülmektedir. Bu kişilerin HV1 dizisinin C tekrarlarından sonra gelen kısmı belirlenememiştir. Bu sorun C tekrarlarını hedef alan dizinleme primerleri kullanımı ile çözülebilir. C tekrar hedef alan primer kullanımı ile C tekrarlarından sonra gelen diziler belirlenebilse de, C tekrarlarının kesin sayısı tam olarak belirlenememektedir (Rapley 2007).

İncelenilen bölgelerin uzunlukları her yürütmede farklılık gösterdiği saptandı ve bu farklılık Tablo 15 - 19 arasında kaliteli veri alınan aralık sütununda gösterildi. Kaliteli veri alınan aralık sonuçların yorumlandığı SeqScape 2.7 yazılımının kesintisiz kaliteli dizin analizi bilgisi alınan baz aralığıdır. Bu farklılık DNA’ların saflığından kaynaklanmaktadır. Dizlenme reaksiyonlarında ilk ve son bazlarda düşük sinyal kalitesi ve artefak pikler beklenir. Dizinlenen bölgenin başındaki ve sonundaki bu diziler değerlendirmeye alınmaz. Bazı örneklerde dizin analizinin başında ve sonunda daha fazla artefak piklere rastlandı ve bu bölgeler inceleme kapsamına alınmadı. Tablo 15 – 19 arasında aynı olguların incelenilen farklı örneklerinde, her örneğin analizinde kaliteli veri alınan aralık farklı büyüklükte olduğu için saptanan polimorfik noktaların sayısı değişim gösterdi. Bu değişimin sebebi heteroplazmi değildir. Sonuçlar değerlendirirken eğer iki örnek karşılaştırılacaksa, iki örnek için incelenilen ortak aralığın göz önüne alınması gerekir.

Her ne kadar tez çalışmasının örnek sayısı az olsa da elde edilen sonuçlar daha geniş kapsamlı çalışmalar için bir ön adım oluşturmaktadır. Sonuçlar incelendiğinde her farklı kişiyi HV1ve HV2 profillerini göz önüne alarak birbirinden ayırmak mümkün olmuştur. HV1 ve HV2 bölgelerinin birlikte dizinlenmesiyle ulaşılabilecek ayırım gücü farklı toplumlarda yapılan araştırmalarla saptanmıştır. Tagliabracci ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışmada

İtalyan toplumu için iki kişinin rastgele aynı HV1ve HV2 profillerine sahip olma şansları 1.9% (Tagliabracci ve ark. 2000), Brandstaetter ve arkadaşlarının 2007 yılında Almanya’da yaptıkları çalışmada 0.79% (Brandstaetter ve ark. 2007), Kato ve arkadaşlarının 2008 yılında Japonya’da yaptıkları çalışmada 1.95% (Kato ve ark. 2008) olarak hesaplanmıştır. (Brandstaetter ve ark 2007, Kato ve ark, 2008, Tagliabracci ve ark, 2000). Ayırım gücü her ne kadar yüksek olsa da adli bilimlerde rastgele iki kişiyi birbirinden ayırmak için yeterli değildir. MtDNA analizlerinde ayırım gücünü yükseltmek için HV1ve HV2 bölgeleri dizinlenmesi ile birlikte mitokondriyal SNP analizi yapılması önerilmektedir (Parsons, 2006).

## 6 ÖZET

Adli bilimler olay yerinde başlar. Günümüzde en karmaşık ve ardında iz bırakılmadığı düşünülen suçların bile çözümü, adli bilimler sayesinde mümkün olmaktadır. Tüm bu gelişmelere rağmen bazı özel durumlarda, özellikle eser miktarda elde edilen biyolojik materyal söz konusu olduğunda genomik DNA üzerinden bir olguyu aydınlatmak mümkün olmayabilir. Bu durumda hücrenin DNA taşıyan bir diğer organeli olan mitokondriler içinde yer alan mitokondriyal DNA (mtDNA) kullanılabilir. Mitokondriler hücre içinde çok sayıda buldukları için (~1000) çekirdek DNA'ya oranla hasar görmemiş halde mtDNA elde edilme olasılığı oldukça yüksektir. Adli bilimlerde mtDNA'nın polimorfik bölgeleri kullanılmaktadır. MtDNA baz dizisinde en yüksek polimorfizm, kodlama yapmayan kontrol bölgesi dizilerinde (1120 baz çifti boyunda) görülür. Bu kontrol bölgesi 3 adet polimorfik yüksek değişken bölge içerir: HV1 (16024–16383), HV2 (73–354), HV3 (438–574). Yaygın olarak HV1 ve HV2 bölgelerinin dizin analizi yapılmaktadır. Bu çalışmanın amacı kan, saç, tırnak, küpe, diş fırçası, kulak pamuğu, bardak kenarı svabı, sakız, jilet, sigara izmariti, gibi örneklerden DNA izolasyonu ve mitokondriyal DNA'nın ileri değişken HV1 ve HV2 bölgelerinin dizin analizinin optimizasyonunun yapılmasıdır. Optimizasyon aşamasında yöntemde bazı modifikasyonlar yapıldı. Araştırmada birbirleriyle akrabalık ilişkisi bulunmayan 5 kişiden kan, saç, tırnak, küpe, diş fırçası, kulak pamuğu, bardak kenarı svabı, sakız, jilet, sigara izmariti gibi materyaller ve farklı 12 kişiden alınan kan örnekleri çalışıldı. Birinci PCR aşamasında, hedef bölgelere özgü primerler ile HV1 ve HV2 bölgeleri ayrı reaksiyonlar halinde çoğaltıldı, ikinci PCR aşamasında ise Applied Biosystem BigDye v3.1 Cycle Sequencing Kit kullanıldı. Dizin analizi bilgisayar kontrollü kapiler elektroforez cihazında yapıldı. Sonuçlar Sequence Scanner, SeqScape (Applied Biosystems) ve Sequencher 4.10.1 yazılımları ile analiz edildi. Aynı kişilere ait farklı örneklerden aynı sonuçlar elde edildi. İncelenilen genotiplerde en sık rastlanan polimorfik nokta 263, A-G nokta mutasyonu ve 315.1 C insersiyonudur. Örneklerin ait olduğu kişilerin profilleri kendi aralarında karşılaştırıldıklarında iki kişinin HV1 bölgelerinin referans dizi ile farklılık göstermediği, “152, T-C 263, A-G 309.1 C 309.2 C 315.1 C” HV2 profiline ise iki kişide rastlandığı belirlenmiştir. Yöntemin Türkiye'deki kriminal laboratuvarlarda rutin olarak kullanıma başlayabilmesi için Türk toplumunda HV1 ve HV2 bölgelerinin popülasyon verilerinin araştırılması gerekmektedir.

## 7 SUMMARY

Forensic sciences begin at the crime scene. Nowadays, even the most complex crimes can be solved with the help of forensic sciences branches. Despite all these developments, some cases are even harder to solve, especially when there is not sufficient, or degraded biological evidence. Most of these degraded biological samples can't be genotyped with the routine STR analyzes. At these cases, mitochondrial DNA analyzes can be done to correctly genotype the degraded samples. The most diversity between two random mtDNA molecules is in the control region of mtDNA. The control region of mtDNA consists of 3 hyper variable regions: HV1 (16024–16383), HV2 (73–354), and HV3 (438–574). In routine, HV1 and HV2 regions are used for forensic analysis. The aim of this work were optimizing the sequencing of mtDNA's HV1 and HV2 regions from samples like hair, nails, earrings, toothbrushes, q-tips, glass edge swabs, gums, razors and cigarette butts. At this work 5 unrelated individuals' samples mentioned above were sequenced and other 13 individuals blood samples were sequenced for the reliability of the procedure. In the first PCR reaction, the target regions were amplified separately with their specific primer pairs and in the second PCR reaction Applied Biosystem BigDye v3.1 Cycle Sequencing Kit was used. The electroforetic separation of the products was carried out on capillary electrophoresis, and results were analyzed with Sequence Scanner, SeqScape (Applied Biosystems) and Sequencher 4.10.1 software's. The most common polymorphic positions are 263, A>G point mutation, and 315.1 C insertion. The HV2 profile "263, A-G 315.1C" has been observed on 2 individuals and "152, T-C 263, A-G 309.1 C 309.2 C 315.1 C" profile has been observed on 2 individuals. 2 individual also shared a profile same as rCRS on their HV1 regions. Every analyzed person has unique HV1 + HV2 profiles together. Although it was possible to distinguish every analyzed individual according to their HV1 and HV2 profiles together, a more comprehensive population study should be done at Turkey to calculate the population frequencies, for HV1 and HV2 sequencing to take its place in forensic laboratories.



## 8 KAYNAKLAR

ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer User's Manual, Copyright 2001, Applied Biosystems.

Adcock, G.J., Dennis, E.S., Easteal, S., Huttley, G.A., Jermiin, L.S. (2001) Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: implications for modern human origins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 537-42.

Anderson, S. (1981) Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments, *Nucleic Acids Research*, 13: 3015-27.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., De Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R., Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, 290: 457-465.

Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Näslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., Kurland, C.G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria, *Nature*, 396: 133-40.

Andrews, M. R., Kubacka, I., Howell, N. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA, *Nature Genetics*, 23: 147.

Argaç, G. (2010) Snapshot minisekanslama tekniği kullanılarak mitokondriyal DNA'da SNP lokuslarının analizi, Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.

Bendall, K.E., Macaulay, V.A., Baker J.R., Sykes, B.C. (1996) Heteroplasmic Point Mutations in the Human mtDNA Control Region, *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 1276-1287.

5X Sequencing Buffer, Product Insert, Copyright 2002, Applied Biosystems.

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol, Copyright 2002, Applied Biosystems.

Biggin, M.D., Gibson, T. J., Hong, G. F. (1983), Buffer gradient gels and 35S label as an aid to rapid DNA sequence determination, *Proc. natn. Acad. Sci.*, 80: 3963-3965.

Bogenhagen, D., Clayton David, A. (1974) The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid, *J Biol Chem.*, 249: 7991–5.

Brinkmann, B., Bar. W., Budowle, B., Carracedo, A., Gill, P., Holland, M., Lincoln, P.J., Mayr, W., Morling, N., Olaisen, B., Schneider, P.M., Tully, G., Wilson, M. (2000) DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing, *Int. J. Legal Med.*, 113: 193–196.

Butler, J. M., Shen, Y., Bruce, McCord, B. R. (2003) The Development of Reduced Size STR Amplicons as Tools for Analysis of Degraded DNA, *J Forensic Sci.*, 48: 1054-64

Carracedo, A., Bär, W., Lincoln, P., Mayr, W., Morling, N., Olaisen, B., Schneider, P., udowle, B., Brinkmann, B., Gill, P., Holland, M., Tully, G. and Wilson, M. (2000) DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing, *Forensic Sci. Int.*, 110: 79–85.

Carson, S., Cohen, A.S., Belenkii, A., Ruiz-Martinez, M. C., Berka, J., Karger, B. L. (1993) DNA sequencing by capillary electrophoresis: use of a two-laser-two-window intensified diode array detection system, *Analyt. Chem.*, 65: 3219-3226.

ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kits Instruction Manual, Copyright 2005, Invitrogen

Cohen, A. S., Karger, B. L. (1987) High-performance sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel capillary electrophoresis of peptides and proteins, *J. Chromatogr.*, 397: 409-417.

Cooper, G. M., Hausmann, R. E. (2004) The cell: a molecular approach, 3. edition Sunderland. Sinauer Associates.

Date Chong, M., Calloway, CD., Klein, SB. (2005) Optimization of a duplex amplification and aequencing strategy for the HVI/HVII regions of human mitochondrial DNA for forensic casework, *Forensic Sci Int.*, 154: 137–48.

Davis, L.M., Fairfield, F.R., Harger, C.A., Jett, J. H., Keller, R.A., Hahn, J.H., Krakowski, L. A., Marrone, B.L., Martin, J.C., Nutter, H. L., Ratliff, R.L., Shera, E.B., Simpson, D. J., Soper, S. A. (1991) Rapid DNA sequencing based upon single molecule detection, *Genetic Analysis - Biomolec. Engng.*, 8: 1-7.

Dennis McNevin, D., Wilson-Wilde, L., Robertson, J., Kyd, J., Lennard, C. (2005) Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair Part 1. Review of current status and knowledge gaps, *Forensic Science International*, 153: 237–246.

DyeEx™ Handbook, Copyright 2002, Qiagen.

Feng C., Yong-hui D., Chun-xia Y., Yan-ling L., Ya-jun D., David J. R. F., Teng C. (2009) Sequence-length variation of mtDNA HVSI C-stretch in Chinese ethnic groups, *J Zhejiang Univ Sci B.*, 10: 711–720.

Ferri, G., Colalongo, C., Bini, C., Pelotti, S., Pappalardo G. (2001) DNA typing of hair shafts by microwave irradiation: real or deceptive evidence, *Int J Legal Med.*, 115: 118–119

Garoff, H., Ansorge, W. (1981) Improvements of DNA sequencing gels, *Analyt. Biochem.*, 115: 450-457.

Gilbert, MT., Tomsho, LP., Rendulic, S., Packard, M., Drautz, DI., (2007) Whole-genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts, *Science*, 317: 1927–30.

Gill, P., Ivanov, P.L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., Evett, I., Hagelberg, E., Sullivan, K. (1994) Identification of the remains of the Romanov Family by DNA analysis, *Nat Genet.*, 6: 130.

Graffy, E.A., Foran, D.R. (2005) A Simplified Method for Mitochondrial DNA Extraction from Head Hair Shaft, *J Forensic Sci.*, 50: 1119-1122.

Green, RE., Krause, J., Ptak, SE., Briggs, AW., Ronan, MT. (2006) Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA, *Nature*, 444: 330–36.

Grubwieseri P., Mühlmann, R., Berger, B., Niederstätter, H., Pavlic, M. (2005) A new “miniSTR-multiplex” displaying reduced amplicon lengths, *Int J Leg Med.*, 120: 115–120.

Han, J.J., Kyoung D.K., Seung B.H., Dong J.S. (2005) Forensic genetic analysis of mitochondrial DNA hypervariable region I/II sequences: An expanded Korean population database, *Forensic Science International*, 158: 125–130.

Hauswirth, W.W., Van de Walle, M.J., Laipis, P.J. and Olivo, P.D. (1984) Heterogeneous mitochondrial DNA D-loop sequences in bovine tissue. *Cell*, 37: 1001–1007.

Heywood, D. M., Skinner, R., Cornwell, P. A. (2003) Analysis of DNA in hair fibres, *J. Cosmet. Sci.*, 54: 21–27.

Holland M.M., Parson T.J. (1999) Mitochondrial DNA Sequence Analysis – Validation and Use For Casework, *Forensic Science International.*, 12: 417.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Mitochondrion>

[http://www.nfstc.org/pdi/Subject09/pdi\\_s09\\_m02\\_01\\_a.htm](http://www.nfstc.org/pdi/Subject09/pdi_s09_m02_01_a.htm)

[http://www.springerimages.com/Images/MedicineAndPublicHealth/1-10.1385\\_1-59259-867-6\\_179-0](http://www.springerimages.com/Images/MedicineAndPublicHealth/1-10.1385_1-59259-867-6_179-0)

[http:// www.istanbul.edu.tr/ngslab/tumGenome.php](http://www.istanbul.edu.tr/ngslab/tumGenome.php).

Hühne, J., Pfeiffer, H., Waterkamp, K., Brinkmann B. (1999) Mitochondrial DNA in human hair shafts—existence of intraindividual differences?, *Int. J. Legal Med.*, 112: 172–175.

Ivanov, P.L., Wadhams, M.J., Roby, R.K., Holland, M.M., Weedn, V.W., Parsons, T.J. (1996) Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II, *Nat Genet.*, 12: 417–420.

Jorgenson, J.W., Lukacs, K. D. (1983) Capillary zone electrophoresis. *Science*, 222: 266-272.

Kalbe, J., Kuroпка, R., Meyer-Stork, L.S., Sauter, L.S., Loss, P., Henco, K., Riesner, D., Höcker, H., Berndt, H., (1988) Isolation and characterization of high-molecular massDNA from hair shafts, *Biol. Chem.*, 369: 413–416.

Kaneshige, T., Takagi, K., Nakamura, S., Hirasawa, T., Sada, M., Uchida, K. (1992) Genetic analysis of fingernail DNA, *Nucleic Acids Res.*, 20: 5489–5490.

Karger, A.E., Harris, J.M., Gesteland, R.F. (1991) Multiwavelength fluorescence detection for DNA sequencing using capillary electrophoresis, *Nucleic Acids Res.*, 19: 4955-4962.

Kato, H., Maeno, Y., Ohira, H., Yamada, Y. (2008) Molecular analysis of mitochondrial hypervariable region 1 in 394 Japanese individuals, *Leg Med (Tokyo)*, 1: 443-445.

King, MC., Attardi, G. (1988) injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of endogenous mitochondrial DNA, *Cell*, 52: 811.

Kraus, E., Kiltz, H. H., Femfert, U. F. (1976) The specificity of proteinase K against oxidised insulin B chain, *Physiol. Chem.*, 357: 233–237.

Krings, M., Geisert, H., Schmitz, RW., Krainitzki, H., Paabo, S. (1999) DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neandertal type specimen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 5581–85.

Kunkel. T.A., Loeb, L.A. (1981) Fidelity of mammalian DNA polymerases, *Science*, 213: 765.

Lilian T. C. Franca, Emanuel Carrilho, Tarso B. L. Kist. (2002) A review of DNA sequencing techniques, *Quarterly Reviews of Biophysics.*, 35: 169-200.

Linch C.A., Whiting, D.A., Holland, M.M. (2001) Human hair histogenesis for the mitochondrial DNA forensic scientist, *J. Forensic Sci.*, 46: 844–853.

Linch, CA., Smith, SL., Prahlow, JA. (1998) Evaluation of the human hair root for DNA typing subsequent to microscopic comparison, *J Forensic Science*, 43: 305–14.

Lutz, S., Weisser, H.J., Heizmann, J., Pollak, S. (1996) MtDNA as a tool for identification of human remains Identification using mtDNA, *Int J Legal Med.*, 109: 205-209.

Lyne, A.G., Short, B.F. (1965) *Biology of the skin and hair growth*, American Elsevier, NewYork.

Mardis, R.E. (2008) Next-Generation DNA Sequencing Methods, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9: 387–402.

Maruyama, S., Minaguchi, K., Saitou, N. (2003) Sequence polymorphisms of the mitochondrial DNA control region and phylogenetic analysis of mtDNA lineages in the Japanese population, *Int J Legal Med.*, 117: 218-25.

Maxam, A.M., Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 74: 560-564.

Mercer, E.H., Birbeck, M.S.C., Barnicott, N.A. (1956) The structure and formation of pigment granules in human hair, *Experimental Cell Research*, 10: 505–14.

MITOMAP: A human mitochondrial genome database. <http://www.mitomap.org>.

Noonan, JP., Hofreiter, M., Smith, D., Priest, JR., Rohland, N. (2005) Genomic sequencing of Pleistocene cave bears, *Science*, 309: 597–99.

Olsen EA, (1994), Disorders of hair growth, diagnosis and treatment. Chapter 2: Differentiation of the hair shaft. McGraw-Hill Inc. New York.

Ornstein, D.L., Kashdan, M. A. (1985) Sequencing DNA using <sup>35</sup>S labeling: a troubleshooting guide, *BioTechniques* 3, 476-484.

Pajnič Z. I., Balažic J., Komel R. (2004) Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA control region in the Slovenian population, *Int J Legal Med.*, 118: 1–4.

Parson, W., Parsons, T.J., Scheithauer, R., Holland, M., (1998) Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial D-loop sequences: Application of mtDNA sequence analysis to a forensic case, *Int J Leg Med.*, 111: 124.

Parsons, J. T. (2006) Mitochondrial DNA Genome Sequencing and SNP Assay Development for Increased Power of Discrimination, Final Report.

Petridis. G. (2005), Mitokondriyal Genomun HV1 HV2 Değişken Bölgelerinin Adli Amaçlı Dizinlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.

Poinar, HN., Schwarz, C., Qi, J., Shapiro, B., Macphee, RD. (2006) Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA, *Science*, 311: 392–94.

QIAamp® DNA Micro Handbook, Copyright 2010, Qiagen.

Rapley, R., Whitehouse, D. (2007) *Molecular Forensics*, 1 st ed. pp 134, John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester England.

Rogaev, EI., Moliaka, YK., Malyarchuk, BA., Kondrashov, FA., Derenko, MV. (2006), Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene mammoth *Mammuthus primigenius*, *PLoS Biol.*, 4: 73.

Salas-Solano, O., Carrilho, E.,Kotler, L.,Miller, A. W., Goetzinger, W., Sobic, Z. (1998) Routine DNA sequencing of 1000 bases in less than one hour by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide solutions. *Analyt.Chem.*, 70: 3996-4003.

Sambrook, J., Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. natn. Acad. Sci.*, 74: 5463-5467.

Sekiguchi, K., Imaizumi, K., Fujii, K., Mizuno, N., Ogawa, Y., Akutsu, T., Nakahara, H., Kitayama, T. (2008) Mitochondrial DNA population data of HV1 and HV2 sequences from Japanese individuals, *Legal Medicine*, 10: 284-286.

Shera E.B., Seitzinger, N.K., Davis, L.M., Keller, R.A., Soper, S. A. (1990) Detection of single Fluorescent molecules, *Chem. Phys. Lett.*, 174: 553-557.

Smith, L.M., Fung, S., Hunkapiller, M.W., Hunkapiller, T.J., Hood, L. E. (1985) The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5 terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis, *Nucleic Acids Res.*, 13: 2399-2412.

Smith, L.M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S. B. H., Hood, L. E. (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis, *Nature*, 321: 674-679.

Stewart, J.E., Fisher, C.L., Aagaard, P.J., Wilson, M.R., Isenberg, A.R., Polansky, D., Pokorak, E., DiZinno, J.A. and Budowle, B. (2001) Length variation in HV2 of the human mitochondrial DNA control region, *J. Forensic Sci.*, 46: 862–870.

Strachan. T. Rean A.P., (2004) Human Molecular Genetics, 3. edition, Garland Science, New York.

Sudbery, P. (2002) Human molecular genetics, 2. edition, Harlow: Pearson Education.

Swerdlow, H., & Gesteland, R. (1990) Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing, *Nucleic Acids Res.*, 18: 1415-1419.

Tagliabracci, A., Turchi, C., Buscemi, L., Sassaroli, C. (2000) Polymorphism of the mitochondrial DNA control region in Italians, *Int J Legal Med.*, 114 : 224–228.

Takayanagi, K., Asamura, H., Tsukada, K., Ota, M., Saito, S., Fukushima, H. (2003) Investigation of DNA extraction from hair shafts, *International Congress Series*, 1239: 759-764.

Toda, K., Ishibashi, Y., Hori, Y., Morikawa, F. (1975) Biology and disease of the hair. Baltimore: University Park Press.

Tully, L.A., Parsons, T.J., Steighner, R.J., Holland, M.M., Marino, M.A., Prenger, V.L. (2000) A sensitive denaturing gradient-gel electrophoresis assay reveals a high frequency of heteroplasmy in hypervariable region 1 of the human mtDNA control region, *Am J Hum Genet.*, 67: 432–43.

Vallone, P. M., Just, R. S., Coble, M. D., Butler, J. M., Parsons, T. J. (2004) A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome, *Int J Legal Med.*, 118: 147-157.

Wallace, D.C. (1992) Diseases of the mitochondrial DNA, *Annu Rev. Biochem.*, 61:1175.

Walsh, P.S., Varlaro, J., Reynolds, R. (1992) A rapid chemiluminescent method for quantitation of human DNA, *Nucleic Acids Res.*, 20: 5061-5.



Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A., Weiner, A.M. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, 4. edition, Benjamin Commings Pub Com Ins, San Francisco.

Wilson, M.R., Polanskey, D., Butler, J., DiZinno, J.A., Replogle, J., Budowle, B. (1995) Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts, *Biotechniques*, 18: 662-669.

## **EKLER**

### **Ek 1 DNA izolasyon Prosedürleri**

#### **Kıl ve tırnak örneklerinden İnvitrogen ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit kullanılarak modifiye edilmiş DNA izolasyonu prosedürü**

- I. Başlamadan önce 55 °C'ye etüv ayarlandı.
- II. Kıl kökü steril makas yardımı ile kesilip uzaklaştırıldı, kalan kısımlar 0.5-1 santimetrelük parçalar halinde kesildi. 1.5 veya 2.0 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine örnekler yerleştirildi.
- III. Tırnaklar distile su ile yıkayıp temizlendi ve yüzey alanını arttırmak için 0.5-1 santimetrelük parçalar halinde kesildi. Kesilen tırnak parçaları 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- IV. Örneklerin alındığı tüplere izolasyon kitinin içeriğinde yer alan lizis tamponundan 1 ml, Proteinaz K çözeltisinden 10 µl, kitin içeriğinde bulunmayan toz halindeki DTT maddesi sulandırılıp hazırlanan 20 µl 1M DTT eklendi.
- V. Karışımlar 10 saniye vortekslendi.
- VI. Örnekler 55 °C'ye getirilmiş etüve yerleştirildi. Bir gece boyunca örnekler inkubasyona bırakıldı.
- VII. İnkubasyon aşamasından sonra tüplerdeki ayrılmış DNA'yı da içeren sıvı steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- VIII. Kit içeriğindeki manyetik boncukların bulunduğu tüp vortekslendi ve içeriği homojen bir karışım haline getirildi.
- IX. Lizatın üzerine 200 µl CS purification tamponu eklendi. Bu aşama ortamın pH'ını 6.5'in altına düşürdü. Düşük pH değerlerinde manyetik boncuklar pozitif yük kazandı ve ortamdaki DNA'ya tutundu.
- X. Örneğin üzerine 20 µl manyetik boncuk karışımı eklendi.
- XI. Oda sıcaklığında 1-5 dakika inkubasyona bırakıldı.
- XII. Örnekler manyetik mikrosantrifüj tüpü standına yerleştirildi. 1 dakika bekletildi.
- XIII. Manyetik boncuklar ve bağladıkları DNA mikrosantrifüj tüplerinin manyetik standı bakan taraflarında pellet oluşturdu.
- XIV. Tüp manyetik standdan uzaklaştırılmadan üst sıvı çekildi ve uzaklaştırıldı.
- XV. Tüpler manyetik standdan uzaklaştırıldı ve 500 µl kit içeriğinde bulunan yıkama tamponu eklendi.

- XVI. Örnekler tekrar 1 dakikalığına manyetik boncukların stand etrafında pellet oluşturuncaya dek manyetik standda yerleştirildi.
- XVII. Tüp manyetik standdan uzaklaştırılmadan üst sıvı çekildi ve uzaklaştırıldı.
- XVIII. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı.
- XIX. Tüp manyetik standdan uzaklaştırıldı.
- XX. Tüpe 50 µl kitin içeriğinde bulunan ayrıştırma tamponu eklendi. Bu aşamada ortamın pH değeri 8.5 in üzerine yükseldi. 8.5 den yüksek pH değerlerinde manyetik boncuklar negatif yük kazandılar ve bağladıkları DNA'dan ayrıldılar.
- XXI. 1-5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı
- XXII. Tüp 1 dakikalığına manyetik standda yerleştirildi
- XXIII. Tüp manyetik standtan uzaklaştırılmadan DNA'nın bulunduğu üst sıvı çekildi ve steril PCR tüplerine aktarıldı.
- XXIV. Kısa süreli içinde kullanılacaklarsa 4 C°de, uzun süre sonra kullanılacaklarsa -20 C°de izolatlar saklandı.

### **Swab kullanılarak alınan örneklerden ve kulak pamuklarından QIAamp DNA Micro Kit ile DNA izolasyonu prosedürü**

- I. *Traş jiletlerinin izolasyona hazırlanması:* Traş jiletlerinin yüzeyinden doku ve sakal kalıntıları steril swab yardımıyla alınıp swabların başı kesilerek 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Örneklerin üzerine izolasyon kitinin içeriğinde bulunan ATL tamponundan 400 µl ve proteinaz K çözeltisinden 20 µl eklenip tüplerin kapağı kapatıldı. 10 saniyeliliğine tüpler vortekslendi.
- II. *Bardak kenarı swablarının izolasyona hazırlanması:* Bardak kenarından salya kalıntıları steril swab yardımıyla alınıp swabın başı kesilerek 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Örneklerin üzerine izolasyon kitinin içeriğinde bulunan ATL tamponundan 400 µl ve proteinaz K çözeltisinden 20 µl eklenip tüplerin kapağı kapatıldı. 10 saniyeliliğine tüpler vortekslendi.
- III. *Kulak pamuklarının izolasyona hazırlanması:* Kulak pamuklarının pamuk kısmı kesilerek 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Örneklerin üzerine izolasyon kitinin içeriğinde bulunan ATL tamponundan 400 µl ve proteinaz K çözeltisinden 20 µl eklenip tüplerin kapağı kapatıldı. 10 saniyeliliğine tüpler vortekslendi.
- IV. Örnekler 56 C°de en az 1 saat inkübe edildi.
- V. Tüpler alındı üzerine 400 µl AL tamponu eklendi.

- VI. Tüplere 1 µl taşıyıcı RNA (1 µg/µl) karışımı eklendi.\*
- VII. Örnekler 70 C°de 10 dakika etüvde inkübe edildi.
- VIII. Örnekler alındı ve üzerlerine 200 µl etanol (%100) eklendi.
- IX. Tüpün içeriği mikropipet aracılığı ile 2ml'lik toplama tüpünün içinde bulunan QIAamp® mikro spin kolona aktarıldı ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- X. Toplama tüpü değiştirildi QIAamp® mikro spin kolona 500 mikrolitre AW1 eklendi ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- XI. Toplama tüpü yeniden değiştirildi 500 mikrolitre AW2 eklendi ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- XII. QIAamp® mikro spin kolona membranının tamamen kurummasını sağlamak için, toplama tüpü yeniden değiştirilip 14000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi.
- XIII. Son olarak, QIAamp® mikro spin kolon, steril 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve AE tamponundan 25 µl eklenerek, 5 dakika oda ısısında bekletildi. Bu aşamada spin kolonun membranına bağlanmış olan DNA'lar AE tamponunda çözündü.
- XIV. 14000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- XXV. QIAamp® mikro spin kolon atılarak, mikrosantrifüj tüpünde kalan izolat etiketlenip ağzı parafilmle sarıldı. Kısa süre içinde kullanılacaklarsa 4 C°de, uzun süre sonra kullanılacaklarsa -20 C°de izolatlar saklandı.

\* Taşıyıcı RNA, örneklerdeki genetik materyalin spin kolon memranı tarafından tutulabilirliğini artırır. 1 µg/µl konsantrasyonunda taşıyıcı RNA çözeltisi hazırlamak için 320 µg liyofilize halde taşıyıcı RNA içeren izolasyon kiti içeriğinde bulunan tüpe 320 µl AE tamponu eklendi. Hazırlanan çözelti kontaminasyon riskini azaltmak için steril PCR tüplerine bölünüp -20 C°de saklandı

### **Sakızdan QIAamp DNA Micro Kit ile DNA izolasyonu prosedürü:**

- I. Çiğnenmiş sakızlar steril makas yardımıyla ufak parçalara bölünüp steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. . Örneklerin üzerine izolasyon kitinin içeriğinde bulunan ATL tamponundan 300 µl ve proteinaz K çözeltisinden 20 µl eklenip tüplerin kapağı kapatıldı. 10 saniyeliliğine tüpler vortekslendi
- II. Örnekler 56 C°de en az 2 saat inkübe edildi. Tüpler alındı üzerine 300 µl AL tamponu eklendi
- III. Tüplere 1 µl taşıyıcı RNA (1 µg/µl) karışımı eklendi.
- IV. Örnekler 70 C°de 1 saat inkübe edildi.

- V. Örneklerin üzerine 150 µl etanol eklendi
- VI. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- VII. Tüplerdeki sıvı dikkatlice 2ml'lik toplama tüpünün içinde bulunan QIAamp® mikro spin kolona aktarıldı ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- VIII. Toplama tüpü değiştirildi QIAamp® mikro spin kolona 500 mikrolitre AW1 eklendi ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- IX. Toplama tüpü yeniden değiştirildi 500 mikrolitre AW2 eklendi ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- X. QIAamp® mikro spin kolona membranının tamamen kurummasını sağlamak için, toplama tüpü yeniden değiştirilip 14000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi.
- XI. Son olarak, QIAamp® mikro spin kolon, steril 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve AE tamponundan 25 µl eklenerek, 5 dakika oda ısısında bekletildi. Bu aşamada spin kolonun membranına bağlanmış olan DNA'lar AE tamponunda çözüldü.
- XII. 14000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- XIII. QIAamp® mikro spin kolon atılarak, mikrosantrifüj tüpünde kalan izolat etiketlenip ağzı parafilmle sarıldı. Kısa süreli içinde kullanılacaklarsa 4 derecede, uzun süre sonra kullanılacaklarsa -20 derecede izolatlar saklandı.

### **Diş fırçası, küpe ve sigara izmaritinden QIAamp DNA Micro Kit ile DNA izolasyonu prosedürü**

- I. Başlamadan önce 56 °C'ye etüv ayarlandı.
- II. *Diş fırçalarının izolasyona hazırlanması:* Diş fırçalarının fırça tarafları kesildi ve 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Örneklerin üzerine izolasyon kitinin içeriğinde bulunan ATL (Tissue lysis) tamponundan 300 µl ve proteinaz K çözeltisinden 20 µl eklenip tüplerin kapağı kapatıldı. 10 saniyeliğine tüpler vortekslendi.
- III. *Küpelerin izolasyona hazırlanması:* Küpeler olduğu gibi 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Örneklerin üzerine izolasyon kitinin içeriğinde bulunan ATL tamponundan 300 µl ve proteinaz K çözeltisinden 20 µl eklenip tüplerin kapağı kapatıldı. 10 saniyeliğine tüpler vortekslendi.
- IV. *Sigara izmaritlerinin izolasyona hazırlanması:* Sigara izmaritleri ufak parçalar halinde ağza denk gelen kısımları kesilip 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Örneklerin üzerine izolasyon kitinin içeriğinde bulunan ATL tamponundan 300 µl ve proteinaz K çözeltisinden 20 µl eklenip tüplerin kapağı kapatıldı. 10 saniyeliğine tüpler vortekslendi.

- V. Örnekler 56 C°de en az 1 saat inkübe edildi.
- VI. Tüpler alındı üzerine 300 µl AL tamponu eklendi
- VII. Tüplere 1 µl taşıyıcı RNA (1 µg/µl) karışımı eklendi.
- VIII. Örnekler 70 C°de 10 dakika inkübe edildi.
- IX. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- X. Tüplerdeki sıvı dikkatlice 2ml'lik toplama tüpünün içinde bulunan QIAamp® mikro spin kolona aktarıldı ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- XI. Toplama tüpü değiştirildi QIAamp® mikro spin kolona 500 mikrolitre AW1 eklendi ve 8000'rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- XII. Toplama tüpü yeniden değiştirildi 500 mikrolitre AW2 eklendi ve 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- XIII. QIAamp® mikro spin kolona membranının tamamen kurummasını sağlamak için, toplama tüpü yeniden değiştirilip 14000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi.
- XIV. Son olarak, QIAamp® mikro spin kolon, steril 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve AE tamponundan 25 µl eklenerek, 5 dakika oda ısısında bekletildi. Bu aşamada spin kolonun membranına bağlanmış olan DNA AE tamponunda çözüldü.
- XV. 14000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- XVI. QIAamp® mikro spin kolon atılarak, mikrosantrifüj tüpünde kalan izolat etiketlenip ağzı parafilmle sarıldı. Kısa süre içinde kullanılacaklarsa 4 °C'de, uzun süre sonra kullanılacaklarsa -20 °C'de izolatlar saklandı.

### **Kandan DNA izolasyonu (QIAamp® DNA Mini Kit ile)**

- I.200 µl kan 1,5 ml 'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
- II.20 µl Proteinaz K, 200 µl Buffer AL eklenerek 15 saniye vortekslendi.
- III.56°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- IV.Tüpün duvarındaki damlaların aşağı inmesi için, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- V.%96- 100 oranındaki etanolden 200 µl eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Vorteksdan sonra tekrar 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- VI.Elde edilen karışım, 2 ml'lik toplama tüpünün içinde bulunan, QIAamp® mini kolona aktarıldı, kapağı kapatılarak 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- VII.Alttaki 2 ml'lik topmala tüpü atılarak, QIAamp® mini kolon, 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- VIII.500 µl AW1 tamponu eklenerek, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

- IX. Alttaki 2 ml'lik topmala tüpü atılarak, QIAamp® mini kolon, 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- X. 500 µl AW2 tamponu eklenerek, 8000 rpm'de santrifüj edildi.
- XI. Membranın kurumasını sağlamak için, QIAamp® mini kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
- XII. QIAamp® mini kolon, 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpüne yerleştirilerek, 75 µl AE tamponu eklendi, oda ısısında 3 dakika inkübe edildikten sonra, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- XIII. Elde edilen izolatlar kısa süreli kullanım için, +4 °C'de, uzun süreli saklama için -20°C'de muhafaza edildi.

## **Ek 2 Florometrik yöntem ile DNA miktarının tayini**

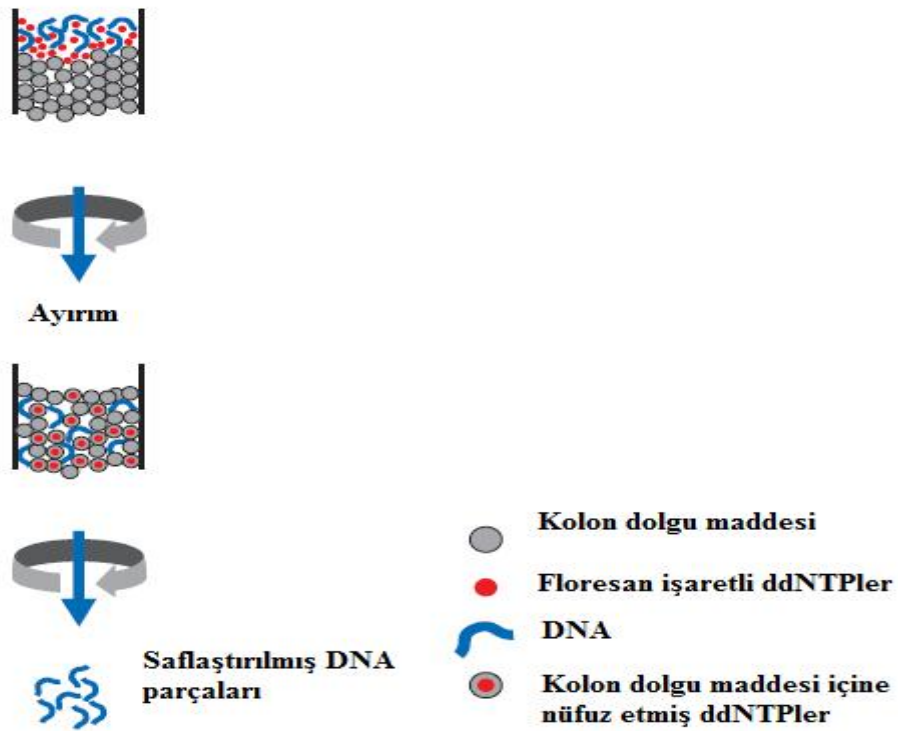
- I. Ölçülecek örnek sayısı ve cihazın kalibrasyonu için gerekli 2 adet standart için yeterli sayıda 0.5 ml'lik steril tüpler ayırıldı.
- II. Tüplerin kapaklarına örneklerin kodları yazıldı tüplerin yanına herhangi bir yazı yazılmamasına dikkat edildi.
- III. Miktar tayin kitinin içeriğinde bulunan Quant-iT™ dsDNA HS reaktifi, ölçümü yapılacak her örnek için 200:1 oranında Quant-iT™ working solüsyonu ile seyreltilerek, 200 µl'lik karışımlar hazırlandı.
- IV. Hazırladığımız karışımdan standartların ölçüleceği tüplere 190 µl örneklerin ölçüleceği tüplere ise 199 µl aktarıldı.
- V. Standartlardan 10 µl çekildi ve tüplere eklendi.
- VI. Örneklerden 1 µl çekildi ve tüplere eklendi.
- VII. Karışımlar kısa bir süre vortekslendi ve oda ısısında 5 dakika inkubasyona bırakıldı.
- VIII. Standartlar sırasıyla Qubit™ fluorometer cihazında ölçüldü ve aletin kalibrasyonu yapıldı.
- IX. Örnekler sırasıyla okutuldu ve DNA miktarları not alındı.



### Ek 3 DyeEx 2.0 spin kit çalışma mekanizması

Ticari kit jel-filtreleme kromatografisi prensibi ile çalışır, moleküllerin moleküler ağırlıklarını baz alarak birbirlerinden ayırır. DNA gibi yüksek moleküller ağırlıklı moleküller santrifüj yapıldığında jeli çabuk terk ederken, flüoresan işaretli bağlanmamış ddNTP'ler jelin porları içine nüfuz eder ve jel içinde tutulur. Kitin çalışması Şekil 15'de görülmektedir.

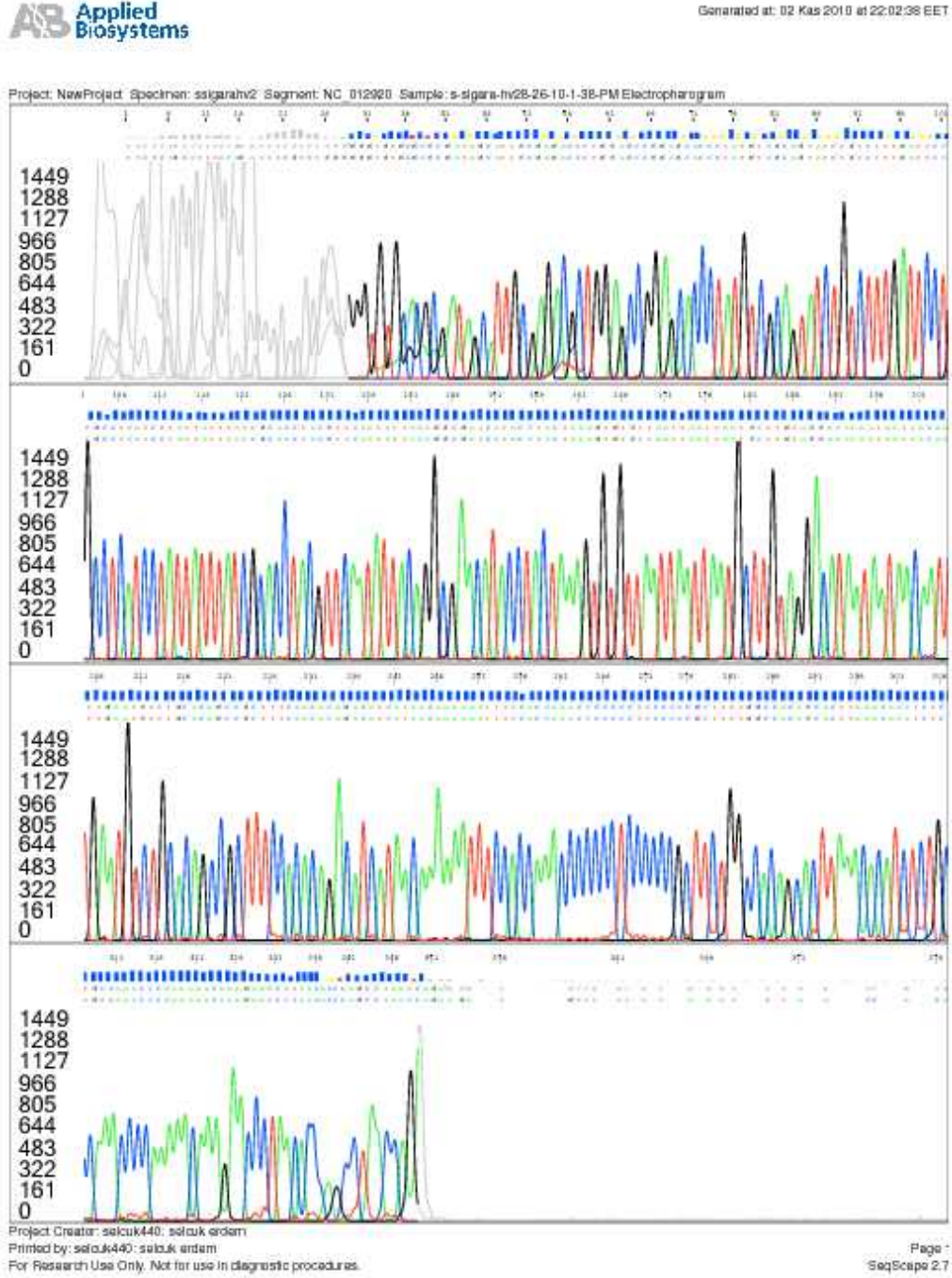
#### PCR ürünlerinin jele yüklenmesi



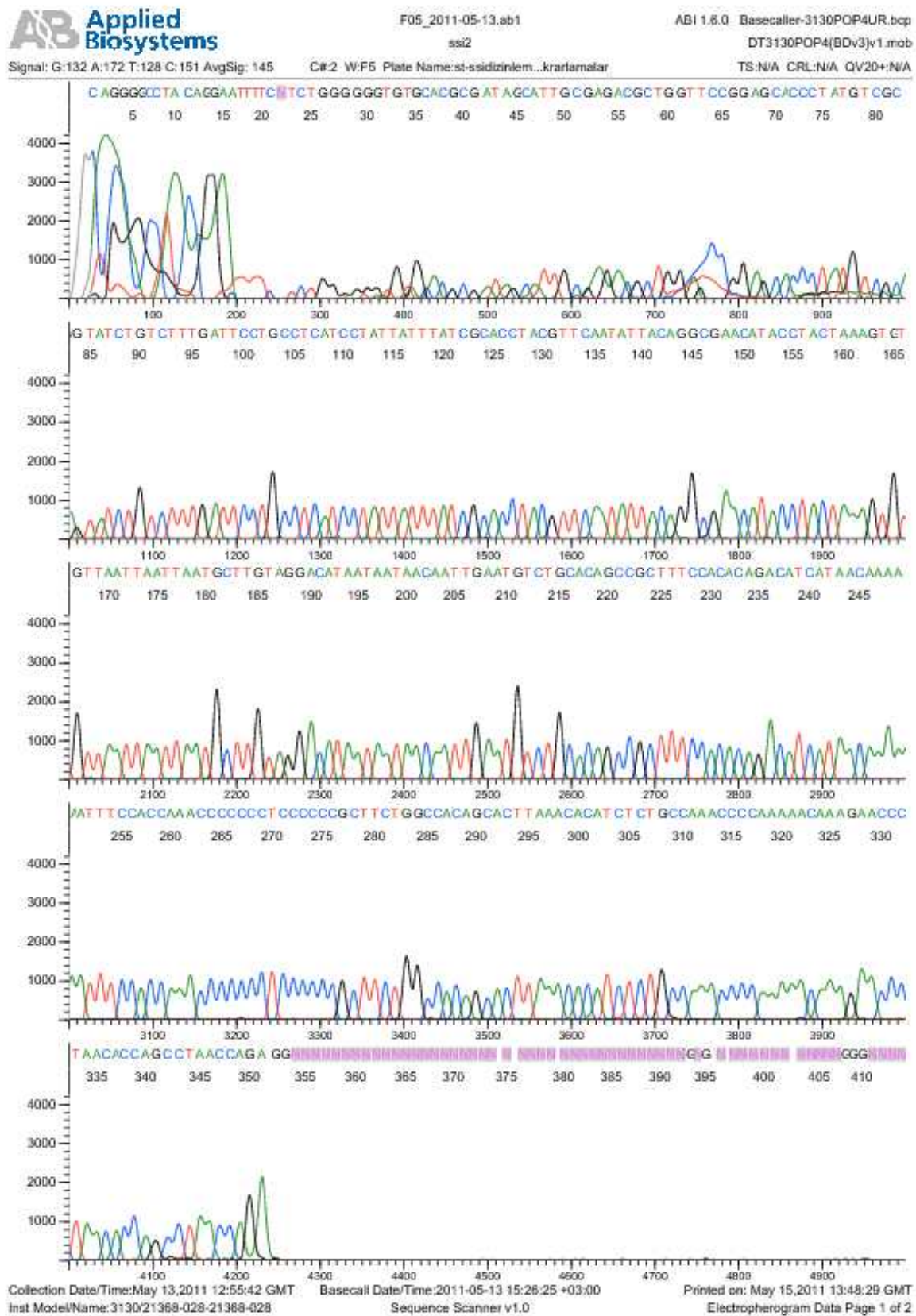
Şekil 15 Dye Ex 2.0 Spin Kit çalışma mekanizması temsili şeması\*

\* Dye Ex 2.0 Spin Kit kullanım kılavuzundan alınmıştır (DyeEx™ Handbook, Qiagen 2002)

## Ek 4 Tekrarlanabilirlik çalışmasına ait elektroforegramlar



Şekil 16 Dördüncü kişinin sigara izmariti örneğinin HV2 bölgesine ait dizinleme elektroforegramı



**Şekil 17** Dördüncü kişinin sigara izmariti yedi ay sonra tekrar çalışıldığında alınan elektroforegram





Elektroforegramlar incelenildiğinde, 7 ay sonraki tekrarlamalarda dizin analizi yapılabilen bölgelerin kısaldığı fakat incelenilen bölgelerde aynı sonuçların alındığı saptanmıştır.

**Tablo 23 Tekrarlanabilirlik çalışmasında incelenilen bölgelerin uzunlukları**

<b>Örnek</b>	<b>İlk analiz bölge uzunluğu (baz)</b>	<b>Tekrar bölge uzunluğu (baz)</b>	<b>Tekrar bölge uzunluğu (baz) *</b>
Sigara izmariti	321	267	268

\* Farklı bir kişi tarafından yapılan analiz sonucu.

## Ek 5 Aydınlatılmış Onam Formu

Bu form, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi, Selçuk ERDEM tarafından hazırlanan “Eski ve Bozulmuş Örneklerde Mitokondriyal DNA Dizinlenmesi” konulu tez çalışması ile ilgilidir.

Gönüllü katılımcılardan alınan kan örnekleri ve tırnak, saç, sigara izmariti, sümüklü mendil, diş fırçası, yüzük-küpe tarzı aksesuarlar, bardak kenarı gibi eser miktarlarda DNA barındıran materyaller İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı’na getirilip incelenecektir.

Mol. Biyolog Sayın Selçuk ERDEM tarafından İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı’nda yapacak olduğu “Eski ve Bozulmuş Örneklerde Mitokondriyal DNA Dizinlenmesi” konulu yüksek lisans tezi için yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam araştırmacı ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun araştırmacı ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

**Gönüllünün**Adı-soyadıİmzasıYaşıTarihİletişim AdresiTelefonu**Araştırmacının**Adı-soyadıİmzası

Selçuk Erdem

**Ek 6 İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi  
Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulu Onayı**

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>	
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>	
	ILAN	<input type="checkbox"/>	
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	
	DİĞER	<input type="checkbox"/>	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: B-002	Tarih: 27.10.2009
	Yüksek Lisans Öğrencisi Selçuk Erdem'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına / <del>bulunmadığına</del> ve Kurulumuz kararının başvuru sahibi tarafından Sağlık Bakanlığı'na arzına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

**ETİK KURUL BİLGİLERİ**

<b>ÇALIŞMA ESASI</b>	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, ve Etik Kurul SOP
<b>ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI:</b>	Prof. Dr. Öner Süzer

**ETİK KURUL ÜYELERİ**

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. Öner SÜZER (Başkan)	Farmakoloji	I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR (Başkan Yardımcısı)	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İlkay ALP (Genel Sekreter)	Eczacı	I.Ü. Eczacılık Fakültesi	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hüseyin ÖZ (Üye)	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Zerrin YIĞIT (Üye)	Kardiyoloji	I.Ü. Kardiyoloji Enstitüsü	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Mehmet Rıza ALTIPARMAK (Üye)	İç Hastalıkları	I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Akif TURNA (Üye)	Göğüs Cerrahisi	Yedikule Göğüs Hst. ve Göğüs Cerrahisi EAH	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Soykan ARIKAN (Üye)	Genel Cerrahi	İstanbul EAH	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Ayşem KAYA (Üye)	Biyokimya	I.Ü. Kardiyoloji Enstitüsü	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Fatma Arın NAMAL (Üye)	Deontoloji	I.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ertan YURDAKOŞ (Üye)	Fizyoloji	I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Gülsüm Nurhan İNCE (Üye)	Halk Sağlığı	I.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ÖZCAN (Üye)	Hukukçu	I.Ü. Hukuk Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Öğretmen Zümrüt GAMLİ (Üye)	Fransızca Öğretmeni	Emekli	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

\* :Araştırma ile İlişki

\*\* :Toplantıda Bulunma



## ÖZGEÇMİŞ

**Adı-soyadı:** Selçuk ERDEM

**Doğum Tarihi:** 08.04.1983

**İletişim Adresi:** Ataköy 1. Kısım i-52 blok daire 4 /Bakırköy-İstanbul

**Telefon:** 0536 311 17 96

### Eğitim Durumu

İ.Ö. Alman Lisesi	(1994-2002)
İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	(2004-2008)
İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Yüksek Lisans Programı	(2008- 2011)

### Uluslar arası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Posterler:

Erdem. S., Altunçul H., Filoğlu G., Ölçen. A.M., Bülbül. Ö. (2011) Sequencing of mtDNA hv1 and hv2 regions from samples with trace amount of DNA. 24th Congress of the International Society for Forensic Genetics. Vienna, Austria.

Ölçen. A.M., Filoğlu G., Altunçul H., Erdem. S., Bülbül. Ö. (2011) Analysis of 9 Mitochondrial SNP's From Samples With Trace Amount of DNA. 24th Congress of the International Society for Forensic Genetics. Vienna, Austria.