

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ CERRAHPAŞA  
ADLI TIP ENSTİTÜSÜ  
Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Gönül Filoğlu Tüfek

X KROMOZOMU ÜZERİNDE BULUNAN INDEL LOKUSLARINA AİT MULTİPLEKS  
PANEL GELİŞTİRİLMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZÜLAL SEVAL USLU

BİYOLOG

İSTANBUL, 2019



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ CERRAHPAŞA  
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ  
Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Gönül Filoğlu Tüfek

X KROMOZOMU ÜZERİNDE BULUNAN INDEL LOKUSLARINA AİT MULTİPLEKS  
PANEL GELİŞTİRİLMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZÜLAL SEVAL USLU  
BİYOLOG  
İSTANBUL, 2019

İstanbul, 3 Temmuz 2019

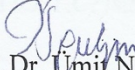
**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
ADLI TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA**

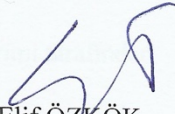
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 36.maddesi uyarınca Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nın yüksek lisans öğrencisi Zülal Seval USLU'nun

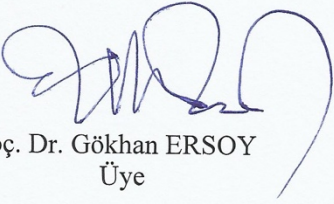
**"X Kromozomu Üzerinde Bulunan Indel Lokuslarına Ait Multipleks Panel Geliştirilmesi"**


Adlı tezi jürimizce tetkik edilmiş ve kendisine tez savunması yaptırılmıştır.

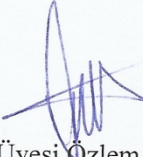
Yukarıda adı geçen tezin ve tez savunmasının kabul edilmesine oy birliğiyle karar verilmiştir.

  
Prof. Dr. Umur Naci GÜNDOĞMUŞ  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Elif ÖZKÖK  
Üye

  
Doç. Dr. Gökhan ERSOY  
Üye

  
Dr. Öğ. Üyesi Gönül FİLOĞLU  
Danışman

  
Dr. Öğr. Üyesi Özlem BÜLBÜL  
Üye

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

**Proje No:** TSA-2017-25221



## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, yardımını, anlayışını ve kıymetli zamanını benden esirgemeyen sevgili danışmanım, hocam **Dr. Öğr. Üyesi Gönül Filoğlu Tüfek'e**,

Tez çalışmam boyunca yardımları ve yol göstericiliği ile sorunların çözümünde her zaman yanımda olan kıymetli hocam **Dr. Öğr. Üyesi Özlem Bülbül Ercan'a**,

Laboratuvarda yardım etmekten hiç çekinmeyen **Öğr. Gör. Ömer Karataş'a**; tez süresince yan yana çalıştığım, lisansüstü eğitimimin bana kazandırdığı çok değerli arkadaşım **Selen Özyer'e**, sevgili arkadaşlarım **Sebahat Taş, İlkten Sarı O ve Sümeyye Zülal Şimşek'e**,

Verdikleri moral ve destek ile sevgilerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarım **Gizem Birinci, Sena Dönmez, Şeyma Kil, Büşra Yılmaz'a**; meslektaşlarım, kıymetli arkadaşlarım **Dilek Küçük, Nagehan Özkök ve Merve Birah'a**; akademik tecrübesini ve desteğini paylaşan manevi dayım **Mahmut Şener'e**, tez sürecimde destekçim olan Bayrampaşa Belediyesi Bilim Merkezi'nin idareci ve çalışanlarına,

Ve son olarak sonsuz sevgi, destek ve dualarını her daim hissettiğim, beni yetiştiren ve bugünlere gelmemi sağlayan canım aileme; **anneme, babama ve kardeşime** en içten teşekkürlerimi sunarım.

*Zülal Seval USLU*

## Tablolar ve Grafikler Dizini

<b>Tablo I:</b> Seçilen X InDel primerlerinin kromozomal yerleşimi, alel dizileri, amplicon büyüklükleri, floresans boya ları, Tm değerleri ve % GC oranları.....	32
<b>Tablo II:</b> PCR karışımı hazırlama.....	33
<b>Tablo III:</b> PCR protokolü.....	34
<b>Tablo IV:</b> Elektroforez koşulları.....	35
<b>Tablo V:</b> Multipleks 1 ve Multipleks 2 için optimize edilmiş primer konsantrasyonları.....	36
<b>Tablo VI:</b> Ağız içi sürüntü örneklerinden elde edilen DNA miktarları.....	39
<b>Tablo VII:</b> X InDel Multipleks 1 ve Multipleks 2 için analiz eşik değerleri.....	48
<b>Tablo VIII:</b> 5 DNA konsantrasyonuna ait pik yüksekliklerinin ortalaması.....	49
<b>Tablo IX:</b> Multipleks 1 ve Multipleks 2 için hassasiyet/duyarlılık değerlendirilmesi.....	51
<b>Tablo X:</b> Multipleks 1 ve Multipleks 2'ye ait stokastik eşik değeri.....	55
<b>Grafik 1:</b> Multipleks 1'e ait elde edilen pik yüksekliklerinin ortalamasına bağlı dinamik alan.....	50
<b>Grafik 2:</b> Multipleks 2'ye ait elde edilen pik yüksekliklerinin ortalamasına bağlı dinamik alan.....	50



## Şekiller Dizini

<b>Şekil 1:</b> Adli genetik analizleri etkileyen önemli gelişmelere ait zaman çizelgesi.....	11
<b>Şekil 2:</b> STR lokusu gösterimi.....	13
<b>Şekil 3:</b> İnsersiyon ve delesyon polimorfizminin şematize gösterimi.....	15
<b>Şekil 4:</b> İnsersiyon oluşumu.....	16
<b>Şekil 5:</b> Delesyon oluşumu.....	16
<b>Şekil 6:</b> PCR işleminin şematize gösterimi.....	19
<b>Şekil 7:</b> Lazer destekli kapiller elektroforezin şematik görünümü.....	24
<b>Şekil 8:</b> 2 pmol primer konsantrasyonunda yapılan singleplekse ait elektroforegram.....	40
<b>Şekil 9:</b> 0,2 pmol primer konsantrasyonunda yapılan singleplekse ait elektroforegram.....	40
<b>Şekil 10:</b> rs2307557 lokusuna ait elektroforegram.....	41
<b>Şekil 11:</b> rs67705557 lokusuna ait elektroforegram.....	41
<b>Şekil 12:</b> rs72434864 lokusuna ait elektroforegram.....	41
<b>Şekil 13:</b> rs59400186 lokusuna ait elektroforegram.....	41
<b>Şekil 14:</b> rs2307741 lokusuna ait elektroforegram.....	41
<b>Şekil 15:</b> rs16367 lokusuna ait elektroforegram.....	42
<b>Şekil 16:</b> rs2307762 lokusuna ait elektroforegram.....	42

<b>Şekil 17:</b> rs16368 lokusuna ait elektroforegram.....	42
<b>Şekil 18:</b> rs16632 lokusuna ait elektroforegram.....	42
<b>Şekil 19:</b> rs16680 lokusuna ait elektroforegram.....	42
<b>Şekil 20:</b> rs25581 lokusuna ait elektroforegram.....	43
<b>Şekil 21:</b> rs16397 lokusuna ait elektroforegram.....	43
<b>Şekil 22:</b> rs3048996 lokusuna ait elektroforegram.....	43
<b>Şekil 23:</b> rs25582 lokusuna ait elektroforegram.....	43
<b>Şekil 24:</b> rs11297248 lokusuna ait elektroforegram.....	43
<b>Şekil 25:</b> rs199639085 lokusuna ait elektroforegram.....	44
<b>Şekil 26:</b> rs2308280 lokusuna ait elektroforegram.....	44
<b>Şekil 27:</b> rs71948836 lokusuna ait elektroforegram.....	44
<b>Şekil 28:</b> rs3978254417 lokusuna ait elektroforegram.....	44
<b>Şekil 29:</b> rs16460 lokusuna ait elektroforegram.....	44
<b>Şekil 30:</b> rs62954660 lokusuna ait elektroforegram.....	45
<b>Şekil 31:</b> rs67588758 lokusuna ait elektroforegram.....	45
<b>Şekil 32:</b> 22 X InDel PCR denemelerinde, 20 döngü ile yapılan PCR'ye ait elektroforegram...45	
<b>Şekil 33:</b> 22 X InDel PCR denemelerinde, 25 döngü ile yapılan PCR'ye ait elektroforegram...46	

<b>Şekil 34:</b> 11 X-InDel Multipleks 1 için kadın DNA'sına ait elektroforegram.....	46
<b>Şekil 35:</b> 11 X-InDel Multipleks 2 için kadın DNA'sına ait elektroforegram.....	47
<b>Şekil 36:</b> 11 X-InDel Multipleks 1 için erkek DNA'sına ait elektroforegram.....	47
<b>Şekil 37:</b> 11 X-InDel Multipleks 2 için erkek DNA'sına ait elektroforegram.....	48
<b>Şekil 38:</b> 1 ng/µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 1'e ait elektroforegram.....	51
<b>Şekil 39:</b> 0,5 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 1' ait elektroforegram.....	51
<b>Şekil 40:</b> 0,25 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 1'e ait elektroforegram.....	52
<b>Şekil 41:</b> 0,125 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 1'e ait elektroforegram.....	52
<b>Şekil 42:</b> 0,063 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 1'e ait elektroforegram.....	52
<b>Şekil 43:</b> 1 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 2'ye ait elektroforegram.....	53
<b>Şekil 44:</b> 0,5 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 2'ye ait elektroforegram.....	53
<b>Şekil 45:</b> 0,25 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 2'ye ait elektroforegram.....	53
<b>Şekil 46:</b> 0,125 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 2'ye ait elektroforegram.....	54
<b>Şekil 47:</b> 0,063 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 2'ye ait elektroforegram.....	54
<b>Şekil 48:</b> 1. analist için Multipleks 1'e ait elektroforegram.....	55
<b>Şekil 49:</b> 2. analistin için Multipleks 2'ye ait elektroforegram.....	56
<b>Şekil 50:</b> 1. analist için Multipleks 2'ye ait elektroforegram.....	56

**Şekil 51:** 2. analist için Multipleks 2'ye ait elektroforegram.....56

**Şekil 52:** Farklı laboratuvar ve farklı cihazlarda elde edilen Multipleks 1'e ait elektroforegram.....57


**Şekil 53:** Farklı laboratuvar ve farklı cihazlarda elde edilen Multipleks 2'ye ait elektroforegram.....57



**Kısaltmalar Dizini**

DNA	Deoksiribonükleik asit
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotid polymorphism)
STR	Kısa ardışık tekrar dizileri (short tandem repeats)
InDel	İnsersiyon ve delesyon polimorfizmi
Bç	Baz çifti
HLA	İnsan lökosit antijenleri
RNA	Ribonükleik asit
RFLP	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
VNTR	Değişken sayıda ardışık tekrarlar (variable number tandem repeats)
FBI	Federal Araştırma Bürosu (Federal Bureau of Investigation)
CODIS	Combined DNA Index Systems
AIM	Soy bilgilendirici markırlar (Ancestry informative markers)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
T <sub>m</sub>	Temperature of melting
BLAST	Basic Logal alignment Search Tool
Pmol	Pikomol
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ng	Nanogram
mm	Milimetre
cm	Santimetre
kV	Kilovolt
sn	Saniye

NCBI	The National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
CE	kapiler elektroforez (Capillary Electrophoresis)
LOD	Limit of detection (Algılama limiti)
LOQ	Limit of quantitation (Miktar limiti)
RFU	Rölatif floresans birimi
Rs	Ref SNP cluster ID
Rpm	Rounds per minute
°C	Celcius



## İçindekiler

<b>Tablolar ve Grafikler Dizini</b> .....	i
<b>Şekiller Dizini</b> .....	ii
<b>Kısaltmalar Dizini</b> .....	vi
<b>1. Özet</b> .....	1
1.1. Türkçe Özet.....	1
1.2. Summary.....	2
<b>2. Giriş ve Amaç</b> .....	3
<b>3. Genel Bilgiler</b> .....	5
3.1. Adli Biyoloji.....	5
3.1.1. Deoksiribonükleik asit (DNA).....	6
3.1.2. X Kromozomunun Özellikleri.....	6
3.1.3. Polimorfizm.....	8
3.2. Adli Bilimlerde DNA Analizlerinin Temelleri ve Gelişimi.....	10
3.3. İnsersiyon ve Delesyon (InDel).....	14
3.3.1. İnsersiyon (Ekleme).....	15
3.3.2. Delesyon (Çıkarma).....	16
3.3.3. InDel polimorfizmi ve adli moleküler genetikte kullanımı.....	17
3.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	18
3.4.1. Multipleks PCR karışımı (PCR master miks).....	19
3.5. Multipleks Panel Dizaynı ve PCR Optimizasyon Çalışmaları.....	20
3.5.1. Primer dizaynı.....	20
3.5.2. Multipleks PCR ve primerlerin seçilme kriterleri.....	22
3.6. Kapiller elektroforez (Capillary Electrophoresis- CE).....	22
3.7. Multipleks Panel Geliştirilmesi ve Validasyon Çalışmaları.....	24

3.7.1. Analiz eşiğinin belirlenmesi (LOD).....	25
3.7.2. Duyarlılık (LOQ).....	25
3.7.3. Dinamik alanın belirlenmesi.....	25
3.7.4. Tekrarlanabilirlik.....	26
3.7.5. Tekrar üretilebilirlik.....	26
3.7.6. Stokastik eşik belirlenmesi (Pik denge analizi).....	26
<b>4. Materyal ve Metod.....</b>	<b>27</b>
4.1. Kullanılan Cihazlar, Kitler ve Kimyasallar.....	28
4.2. DNA Örneklerinin Toplanması, İzolasyonu ve Miktarının Belirlenmesi.....	29
4.2.1. DNA örneklerinin toplanması.....	29
4.2.2. DNA örneklerinin izolasyonu.....	29
4.2.3. DNA miktarının belirlenmesi.....	30
4.3. X Kromozomu InDel Lokuslarının Seçilmesi.....	31
4.4. Mutipleks PCR Optimizasyonu.....	33
4.4.1. Primerlerin Tm değerlerinin belirlenmesi.....	33
4.4.2. PCR öncesi ön hazırlıklar.....	33
4.4.2.1. <i>Primerlerin sulandırılması.....</i>	<i>33</i>
4.4.2.2. <i>PCR bileşenleri ve PCR döngü protokolü.....</i>	<i>33</i>
4.4.3. Elektroforez aşaması.....	34
4.4.4. 22 X InDel lokusunun multipleks PCR optimizasyonu.....	35
4.4.5. 22 X InDel lokusunun 2 multipleks olarak validasyonu.....	37
4.4.5.1. <i>Analiz eşiği.....</i>	<i>37</i>
4.4.5.2. <i>Dinamik alan (Hassasiyet).....</i>	<i>37</i>
4.4.5.3. <i>Duyarlılık.....</i>	<i>37</i>
4.4.5.4. <i>Stokastik eşik.....</i>	<i>38</i>



4.4.5.5. <i>Tekrarlanabilirlik &amp; tekrar üretilebilirlik</i> .....	38
4.4.6. 30 kişiye ait DNA örneğinde 22 X InDel Multipleks 1'in ve Multipleks 2'nin PCR'ı, elektroforezi ve tiplendirilmesi.....	38
<b>5. Bulgular</b> .....	<b>39</b>
5.1. Ağız İçi Sürüntü Örneklerinden DNA İzolasyonu ve DNA Miktarının Belirlenmesi...	39
5.2. 22 X InDel Lokusunda Her Bir Lokusunda Ayrı Ayrı PCR Optimizasyonu ve Analizi.....	40
5.2.1. PCR bileşenlerinin miktarları ve PCR protokolünün belirlenmesi.....	45
5.2.2. 22 X InDel panelinin primer konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	46
5.3. 22 X InDel lokusunun 2 Multipleks Olarak Validasyonu.....	48
5.3.1. Analiz eşiği.....	48
5.3.2. Dinamik alan.....	49
5.3.3. Duyarlılık (Limit of quantitation-LOQ).....	50
5.3.4. Stokastik eşik.....	54
5.3.5. Tekrarlanabilirlik & tekrar üretilebilirlik.....	55
<b>6. Tartışma ve Sonuç</b> .....	<b>58</b>
<b>7. Kaynakça</b> .....	<b>65</b>
<b>Ek-1</b> .....	<b>75</b>
<b>Ek-2</b> .....	<b>77</b>
<b>Ek-3</b> .....	<b>79</b>

## 1. Özet

### 1.1. Türkçe Özet

Biyolojik delillerin bulunduğu birçok adli vakada DNA analizlerinden yararlanılarak faillere ulaşılabilmektedir. İnsersiyon-delesyon polimorfizmi, insan genomundaki bazların insersiyonuna (eklenmesine) ve/veya delesyonuna (çıkmasına) dayanan ve günümüzde DNA kimliklendirilmesinde STR ve SNP sistemlerine alternatif olarak kullanılmaya başlanan bir polimorfizm çeşididir.

Bu çalışmada X kromozomuna özgü 22 InDel lokusu (rs2307557, rs67705557, rs72434864, rs59400186, rs2307741, rs16367, rs2307762, rs16368, rs16632, rs16680, rs25581, rs16397, rs3048996, rs25582, rs11297248, rs199639085, rs2308280, rs71948836, rs3978254417, rs16460, rs62954660, rs67588758) ile 11 lokuslu iki multipleks panel olarak geliştirilmiştir. Her iki multipleksin optimizasyon ve validasyon çalışması yapılmıştır. Optimizasyon çalışması sonucunda iki multiplekste (çoklu) belirlenen primer konsantrasyonları 0,2-5 pmol arasındadır.

Validasyon çalışmalarında; analiz eşiği, dinamik alan, duyarlılık, stokastik eşik, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik parametreleri uygulanmıştır. Analiz eşiği multipleks 1 için 103,11 RFU, multipleks 2 için 94,56 RFU olarak hesaplanmıştır. Dinamik alan çalışmasında optimum DNA konsantrasyonu 1 ng/µl, duyarlılık sonucunda da tam profil elde edilebilen DNA konsantrasyonunun 0,5 ng/µl olduğu belirlenmiştir. Stokastik eşik çalışmalarında Multipleks 1 için değer 1 ng/µl'de 57,67; 0,5 ng/µl 56,09 olarak, Multipleks 2 için bu değer 1 ng/µl'de 58,19; 0,5 ng/µl'de 43,15 olarak hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlikte aynı profiller elde edilmiştir.

Bu çalışmayla geliştirilen 22-X InDel lokusunun optimizasyon ve validasyon çalışması başarıyla yapılmıştır. Söz konusu multipleks panel Türkiye popülasyonunda yapılacak çalışmalardan sonra, çeşitli olgularda mevcut STR sistemlerine ek olarak kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** X kromozomu, InDel polimorfizmi, optimizasyon, validasyon, adli genetik

## 1.2. Summary

In many forensic cases where biological evidence is available, it is possible to reach the perpetrators by using DNA analysis. The insertion-deletion (InDel) polymorphism is a polymorphism based on the insertion and/or deletion of bases in the human genome and today, it is used as an alternative to STR and SNP systems in DNA identification.

In this study, novel 22 InDel loci specific to X chromosome (rs2307557, rs67705557, rs72434864, rs59400186, rs2307741, rs16367, rs2307762, rs16368, rs16632, rs16680, rs25581, rs16397, rs3048996, rs25582, rs11297248, rs199639085, rs2308280, rs71948836, rs3978254417, rs16460, rs62954660, rs67588758) is developed as two multiplex panels with 11 loci. The optimization and validation studies of the multiplexes are performed. As a result of the optimization study, the concentrations of the determined markers in the two multiplexes range from 0.2 to 5 pmol. In validation studies analysis threshold, precision, sensitivity, linearity, repeatability & reproducibility steps are applied. The analysis threshold is calculated as 103.17 RFU for multiplex 1, 94.56 RFU for multiplex 2. In precision study, the optimum DNA concentration is determined as 1 ng/ $\mu$ l, and as a result of sensitivity full profile obtained DNA concentration is determined as 0,5 ng/ $\mu$ l. In linearity studies, the value for Multiplex 1 is calculated as 57.67 at 1 ng/ $\mu$ l, 56,09 at 0.5 ng/ $\mu$ l. And the value for Multiplex 2 is calculated as 58,19 at 1 ng/ $\mu$ l, 43,15 at 0.5 ng/ $\mu$ l. The same profiles are obtained for repeatability and reproducibility. The optimization and validation studies of the 22 X InDel loci are performed successfully. After the work to be done in Turkey populations, this developed novel X InDel multiplex can be used in addition to existing multiplex STR system in various cases.

**Key Words:** X chromosome, InDel polymorphism, optimization, validation, forensic genetic.

## 2. Giriş ve Amaç

DNA analizlerinin adli bilimlerde kullanılmasıyla birlikte adli alanda yeni bir dönem başlamıştır. Biyolojik delillerin bulunduğu birçok adli vakada DNA analizlerinden yararlanılarak failere ulaşılabilir. Bir biyolojik delilin ilgili kişiye ait olduğunu belirleyebilmek için kişiler arasında genetik çeşitliliği sağlayan polimorfik özelliklerin analizi ile mümkündür. DNA'da polimorfizm, DNA uzunluğunu etkileyen polimorfizm (mikrosatellitler) veya yapısal değişiklik sonucu oluşan polimorfizm olarak iki şekilde ortaya çıkar. Yapısal değişiklik sonucu oluşan polimorfizm, nükleotid yer değiştirmesine bağlı (çoğunlukla tek nükleotid polimorfizmleri-SNPler), bir ya da birden fazla nükleotidin insersiyon ve/veya delesyona bağlı olan (InDel'ler) polimorfizmler olarak sayılabilirler. Mikrosatellitler insan genetik çalışmalarında ve adli olgularda 1990 yılından beri kullanılmaktadır. Son yıllarda milyonlarca aday SNP'ler tanımlanarak adli kimliklendirmede kullanılacak SNP panelleri oluşturulmuştur. Buna karşın dialelik InDel'lerle ilgili çok az çalışma bulunmaktadır (1,2).

İnsersiyon/delesyon polimorfizmleri (InDel) tek nükleotid polimorfizmlerinden (SNP) sonra DNA'da en fazla görülen polimorfizm şeklidir. Genomdaki genetik varyasyonların %20'sini InDel'ler oluşturmaktadır (1,2). InDel bir veya birden fazla nükleotidin genom üzerinde insersiyon ve / veya delesyonu (eklenmesi ve/ veya çıkarılması) sonucu oluşmuş dialelik uzunluk polimorfizmidir (2,3).

2002 yılında Weber ve arkadaşlarının insan genomunda 2000 dialelik InDel'i tanımlaması ve karakterize etmesi sonucu genetik kullanımı da artmıştır (1). InDel markırları X ve Y kromozomları dahil olmak üzere genomda geniş bir şekilde yayılmışlardır. InDel'lerin ampikon uzunlukları küçüktür. Bu nedenle degrede olmuş biyolojik örneklerde tipleme başarısı yüksektir (4). InDel polimorfizmi adli bilimlerde annelik, babalık, akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde ve kimliklendirmede kullanılmaktadır (5).

INDEL'ler, özellikle olay yerinden az miktarda veya bozunmuş olarak gelen biyolojik materyallerde hatta antropolojik ve arkeolojik araştırmalarda, STR lokusları ile tiplendirme yapılamadığı durumlarda ve SNP'ye göre daha kısa zamanda ve az maliyetle analiz edilebilmesi gibi özellikleri açısından adli bilimlerde kullanımı zamanla artacağı düşünölmektedir (6,7).

Baba-kız ilişkilerinin belirlenmesinde, iki kız kardeşin aynı babadan olup olmadığının tespiti gibi bazı özel olgularda DNA profillemesi X kromozomunun genetik aktarımından yararlanarak X kromozomu üzerinde bulunan InDel polimorfizmi kullanılarak yapılabilmektedir. Ancak bu alanda kullanılabilir hazır ticari kit yoktur. Günümüzde adli bilimciler adli kimliklendirmede kullanılacak multipleks panelleri oluşturmaktadır.

Bu tez çalışmasında da X kromozomuna özgü InDel lokuslarından oluşan yeni bir multipleks set oluşturmak ve bu multipleksin optimizasyon ve validasyonun yapılması amaçlanmıştır.

### 3. Genel Bilgiler

Adli bilimler; farklı bilim dallarının multidisipliner bir dalı olup çeşitli adli vakaların fiziksel delillere dayanarak bilimsel tekniklerle değerlendirilmesini ve çözümlenmesini amaçlamaktadır (8,9). Bu bağlamda biyoloji, toksikoloji, patoloji, antropoloji, diş hekimliği, mühendislik, fizik, jeoloji, matematik, psikoloji, psikiyatri gibi farklı disiplinlerden yararlanmaktadır (10).

Adli vakalarda hedef, olay-olay yeri ve olaya karışan kişiler arasındaki bağlantıyı kurmaktır. Bu amaçla, Locart'ın "her temas bir iz bırakır" teorisi de göz önünde bulundurularak, olay yeri ve faillerden elde edilen deliller değerlendirilerek tüm delillerin anlattığı hikâyenin birbirini desteklemesi ve bir bütünün tamamlayıcısı olması gerekir (11). Hiçbir delil önemsiz değildir ancak bazı deliller olay ile ilgili fikir almamıza ve çerçevenin daraltılmasına destek olurken, bazı deliller ise olay yeri ile kişiler arasındaki ilişkinin kurulmasında yüksek kesinlikte ve doğrulukta sonuç verebilir (12). DNA profili, delil ile kişiler arasında direkt bağlantı kurulmasını sağlayan güçlü delillerden biridir (13).

#### 3.1. Adli Biyoloji

Adli biyoloji adli bilimlerin alt dallarından biri olan; her türlü leke, biyolojik materyal ve mikroorganizmaları inceleyen; mikrobiyoloji, moleküler biyoloji ve genetik, entomoloji, zooloji, patoloji, botanik ve palinoloji gibi bilim dalları ile sıkı işbirliği içinde olan ve adli olaylarda adaletin sağlanmasına yardımcı olmak için çalışan multidisipliner bir bilim dalıdır.

Bu bilim dalı olay yerinde bulunan biyolojik örneklerde; kan, semen, ter, idrar, dışkı gibi vücut sıvılarında, saç, tırnak, diş, kemik, epitel dokular gibi insana ait ölüm öncesi (ante mortem) veya sonrasındaki (post mortem) çeşitli dokularda, bitkilerde, hayvanlarda, böceklerde, mantarlarda ve bakterilerde yapılan genetik incelemeleri kapsamaktadır (14).

### 3.1.1. Deoksiribonükleik asit (DNA)

DNA, nükleotid polimerlerinden oluşmuştur. Nükleotidler beş karbonlu şeker olan deoksiriboz, bir adet azotlu baz ve fosfat grubundan oluşurlar. Çift azot halkalı bazlar Adenin (A) ve Guanin (G)' dir ve bunlara pürin adı verilir. Tek azot halkasına sahip olan bazlar Timin (T) ve Sitozin (C) bazları olup pirimidin olarak adlandırılırlar (15). DNA molekülü iki zincir halinde bulunur. DNA'nın yapısı ilk kez 1953'te Watson ve Crick'in ortaya koyduğu heliks adı verilen modelle tanımlanmıştır. Bu modelde adenin bazı timin bazı ile iki hidrojen bağı, guanin bazı sitozin bazı ile üç hidrojen bağı ile bağlanmaktadır. Bu baz eşleşmeleri DNA molekülünün temelini oluşturmaktadır (16).

Gen, DNA'nın bilgi taşıyan kısmıdır. İnsan genomunda yaklaşık yüz bin gen olduğu düşünülmektedir. İnsan genomu ~3.000.000.000 baz çiftinden oluşur ( $3.290 \text{ Mb} = 3.2 \times 10^9$ ) ve 23 çift kromozom üzerinde dizilmiştir (17). Her bir kromozomumuzu bir ansiklopedi cildi gibi düşünersek, tek bir hücremizin içinde her biri milyonlarca harften oluşan 23 ciltlik, toplam  $6 \times 10^9$  harf içeren dev bir ansiklopedi olduğunu varsayabiliriz. En uzun kromozomumuz olan "1. kromozom" 279, en kısa kromozomumuz olan "21. kromozom" üzerinde ise 45 milyon baz çifti mevcuttur (17).

Eğer bir türün tüm bireyleri aynı gen dizisini sahip olsaydı, aralarındaki farklılıkları açıklamak mümkün olamazdı. Herhangi iki insanın, DNA dizisinin %99,9'u özdeştir, yani bireyler arasında DNA diziliminde minör farklılıklar mevcuttur. DNA'nın %80'lik bir kısmı protein kodlamaz (18).

### 3.1.2. X Kromozomunun Özellikleri

Sağlıklı bireylerde 23 çift kromozom bulunmaktadır. Bu 23 çift kromozomun 22 çifti otozomal, bir çifti ise gonozomaldır. Otozomal kromozomlar vücut özellikleriyle ilgili genler taşır. Gonozomal kromozomlar (eşey kromozomları) cinsiyeti belirlemeden sorumludur.

Cinsiyet kromozomları X ve Y diye adlandırılır ve bunların kombinasyonu cinsiyeti belirler (15).

Dişi bireyler iki adet X kromozomu (XX), erkek bireyler ise bir X ve bir Y (XY) kromozomu taşımaktadır. X ve Y kromozomlarının yapıları incelendiğinde birbirlerinden farklı oldukları görülmektedir. X kromozomunun ökromatin bölgesi, Y kromozomunda bu bölgeye karşılık gelen kısma göre daha aktif ve daha büyüktür. Bir diğer farklılık olarak, her iki eşey kromozomunun uç kısımlarında mayozda rekombinasyon sırasında eşleşen, homoloji gösteren iki bölge bulunmaktadır. Bu bölgeler yalancı otozomal bölgeler (pseudoautosomal regions, PARS) olarak adlandırılır (15). Eşey kromozomlarının kısa kolunun uç kısımları PAR1, uzun kollarının uçlarında ise PAR2 bölgesini bulundur. PAR1 bölgesi baz eşleşmesi ve erkeklerde mayozu düzenlemeden sorumlu aktif genler içerir (15,17).

Y kromozomunda 78, X kromozomunda ise 1098 gen bulunmaktadır. X kromozomunda 153 milyondan fazla baz çifti bulunur ve bunlar dişi bireylerin toplam DNA'sının %5'ini, erkek bireylerinkinin ise %2,5'ini oluşturmaktadır. X kromozomunda bulunan birçok genin homolojisi olmadığı için, erkeklerde X kromozomundaki her allel doğrudan fenotipte ifade edilir. Erkekler X-bağlantılı genler için ne homozigot ne de heterozigottur. Bu durum hemizigot olarak tanımlanır. İnsanlarda çeşitli hastalıklardan sorumlu X- bağlantılı genler tanımlanmıştır (Renk körlüğü, hemofili A ve B, musküler distrofi, hunter sendromu ve fabry's hastalığı gibi.) (15)

Dişi bireyler, X kromozomundan iki kopyaya sahip olmaları nedeniyle X'e bağlı gen ürünlerini de iki kat fazla üretme potansiyelleri bulunmaktadır. Bu nedenle X kromozomundan kaynaklanan doz eşitsizliğinin dengelenmesi için memelilerde bir genetik mekanizma oluşmuştur. Bu mekanizma ile X kromozomundan biri inaktive edilir. Etkisiz hale getirilen X kromozomuna Barr cisimciğidir. Lyon hipotezine göre, X kromozomu inaktivasyonu,



embriyonik gelişimin erken evrelerindeki somatik hücrelerde rastgele olarak bütün hücrelerde aynı X kromozomu inaktive edilmektedir. Lyon hipotezinin genellikle geçerli olduğu kabul edilmekte ve X kromozomunun Barr cisimciğine inaktivasyonu bazen İyonizasyon olarak da ifade edilmektedir (86).

### 3.1.3. Polimorfizm

Grekçe “poly” ve “morphos” kelimelerinden meydana gelen polimorfizm, “çeşitli form/çok çeşitlilik” anlamına gelmektedir. Genel olarak dört çeşit polimorfizmden bahsetmek mümkündür.

1. *Fenotipik Polimorfizm*: Birey düzeyindeki polimorfizm çeşidir. Farklı fiziksel özellikler, farklı yüz görünümü, deri-göz rengi gibi fenotipik özelliklerin farklılıklarından sorumludur (19).
2. *Kromozomal Polimorfizm*: Kromozomların morfolojik özelliğinde meydana gelen farklılıklardır. Kromozom heteromorfizmlerinin en çok görülen şekilleri; Y kromozomunun uzun kolunun büyüklüğündeki değişiklikler, sentromik heterokromatinin boyutundaki değişiklikler, satellit boyutunda ve yapısında meydana gelen değişikliklerdir (20).
3. *Biyokimyasal Polimorfizm*: Değişikliğe uğramış protein, enzim veya antijenlerin polimorfizmidir. Bu tip polimorfizmde genetik farklılıklar gizli kalır çünkü fenotipte bir farklılık gözlemlenmeyebilir. Örnek olarak; ABO, Rh kan grubu ve insan lökosit antijen sistemi (HLA), G6PD enziminin elektroforetik ve aktivite değişiklikleri verilebilir. Bu polimorfizmler ancak laboratuvar yöntemleri ile tespit edilebilir (21).
4. *DNA Polimorfizmi*: DNA düzeyindeki nükleotid farklılıklar bu polimorfizm çeşididir. Polimorfizm teriminin kullanımı aslında sıkça DNA polimorfizmini anlatma için kullanılmaktadır (22).

Genomdaki DNA dizilerinin bir kısmı, yaşam için oldukça önemli olduklarından sürekli olarak korunur. Bir kısım DNA'da ise kısıtlı değişiklikler oluşmaktadır. Bu tip değişikliklerin olduğu DNA bölümleri polimorfik, o kısımdaki DNA dizisine ise polimorfizm denmektedir. Polimorfizm, popülasyonda %1'den daha sık görülen, tür içerisinde değişiklikler olmasını sağlayan genetik farklılıklardır. Mutasyon ise gen ya da kromozomda meydana gelen kalıcı, kalıtsal sonuçlara yol açan sayısal ya da yapısal değişikliklerdir. Polimorfizmi mutasyondan ayıran görülme sıklığındaki farklılıklardır. Mutasyonlar polimorfizmlere göre çok nadirlerdir. Farklı popülasyonlarda ise polimorfizm sıklığı değişken olabilmektedir.

Alel sayısı artıkça toplumda o gen için polimorfizmde artar. Bu lokuslar kuşaktan kuşağa Mendel yasalarına göre aktarılır (23).

İnsan genomundaki genlerin bir çoğu polimorfiktir. Yani aynı lokusta 2 ya da daha çok farklı alel bulunabilir. Böylece bir popülasyonda farklı alellere bağlı olarak genetik olarak belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotip görülebilir. Genetik çeşitlilik oranının yüksek olması nedeniyle 2 farklı insanın, tek yumurta ikizleri hariç, genetik olarak idantik yani tamamen birbirinin aynı olması mümkün değildir.

Polimorfizmler, herhangi bir hastalık ya da bozuklukla doğrudan ilişkili değildir ve sıklıkla protein kodlamayan DNA dizilerinde yer alırlar. Birçok polimorfizm klinik özellik ortaya çıkarmaz. Çoğu polimorfizmler değişmiş gen ürünlerinin tanımlanmasıyla saptanır (18, 19).

Polimorfik bölgeler, "genetik markır" olarak "DNA fingerprinting" (DNA parmak izi) yani "DNA profillemeye" yöntemi ile suç mahallinde bulunan örneklerin değerlendirilmesi ya da babalık testlerinin yapılmasını mümkün kılmaktadır (24).

DNA kanıtının gücü, çalışılan bölgedeki polimorfizm sayısına ve popülasyonda bulunan alel sayısına bağlıdır. Ne kadar çok sayıda polimorfik bölge eşleşiyorsa (özellikle de bunlar yüksek derecede polimorfik ise) şüpheliyi bulunan örneklerle ilişkilendirmek de mümkün olur (18, 25).

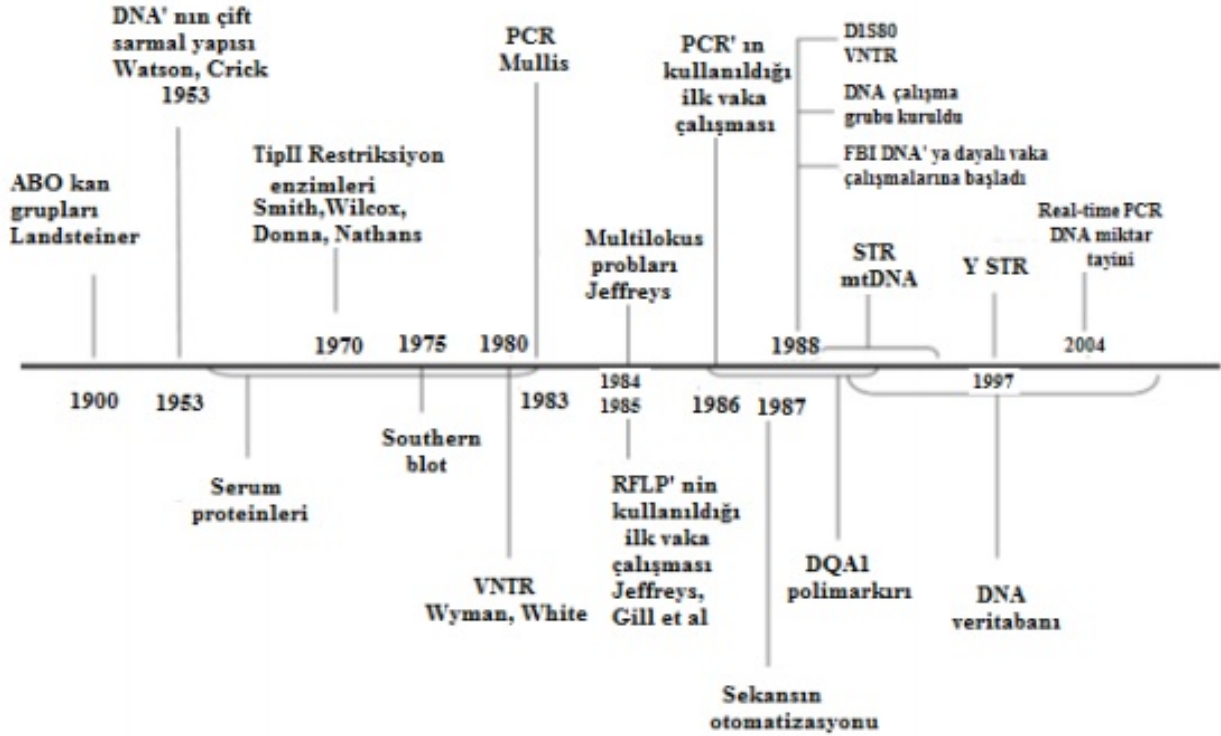
### 3.2. Adli Bilimlerde DNA Analizlerinin Temelleri ve Gelişimi

Yirminci yüzyılın sonlarında bilim ve teknoloji alanında meydana gelen gelişmeler bütün alanlarda olduğu gibi adli bilimlerde de ilerlemelere yol açmıştır. Günümüzde DNA profillemesi, kimliklendirme, annelik-babalık ve nesep tayini, vücut doku ve sıvılarının kimliklendirilmesi gibi adli amaçlı analizlerde kısa sürede, daha az maliyetle sonuca ulaşmak mümkün olmaktadır. Adli amaçlı analizlerde kimliklendirme ve soybağının tespiti amacıyla DNA'ya dayalı polimorfizmler, vücut sıvılarının kimliklendirilmesinde ise RNA kullanılmaktadır (26).

Adli genetikten; evrim çalışmaları, göç yollarının belirlenmesi, toplu felaketlerde kimliklendirme ve nesep tayini gibi birçok alanda yararlanılmaktadır. Ayrıca suç-suçlu-mağdur arasında bağlantı kurarak adalet sistemine hizmet etmektedir (27, 28).

İnsan Genom Projesi, 1990 yılında insan DNA'sının baz diziliminin aydınlatılması amacıyla başlatılmıştır. Bu çalışmada 24 kromozomun fiziksel haritası çıkarılmıştır. Böylece insanlar arasındaki genetik çeşitlilikleri analiz edebilmek kolaylaşmıştır. Genomun dizilimi, pek çok ülkeden yüzlerce bilim adamının çalışmalarıyla ve büyük maliyetlerle belirlenmiştir (29, 30).

Son yüzyılda İnsan Genom Projesi ve bunun gibi temel bilimlerde ve teknoloji alanlarında meydana gelen gelişmeler bütün bilim alanlarında olduğu gibi adli biyolojide de ilerlemelere yol açmıştır. Kan grupları ile başlayan ve gelişen teknoloji ile günümüzde DNA molekülünün kullanımına olanak sağlayan sistemler adli olguların çözümünde kullanılan en güvenilir sistemlerdir.



**Şekil 1:** Adli genetik analizlerini etkileyen önemli gelişmelere ait zaman çizelgesi (31).

1980'de David Botstein ve arkadaşları kişilerin DNA'ları üzerinde küçük farklılıkların olduğunu tespit edip bu varyasyon tipini restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) olarak adlandırmışlardır (32).

Adli DNA analizlerinin hız kazanmasına neden olan gelişme; ilk kez İngiliz genetikçi Sir Alec Jeffreys tarafından 1985 yılında DNA parmak izi veya DNA profili kavramının ortaya atılması ile olmuştur. Adli olguların aydınlatılmasında kullanılan DNA profillemeye çalışmalarının esası, yeryüzünde tek yumurta ikizleri hariç hiç bir bireyin DNA molekülünün tamamen aynı olamayacağına dayanmaktadır. Jeffreys, DNA'nın belirli bölümlerinde birbirini tekrarlayan diziler olduğunu ve bu dizilerin tekrar sayılarının kişiler arasında farklılık gösterdiğini, hastalıklar üzerinde genetik çalışmalar yaparken RFLP teknolojisinin kişilerin tanımlanmasında kullanılabileceğini keşfetmiştir. Değişken sayıda ardışık tekrarlar olarak adlandırılan, DNA tekrar dizileri olarak bilinen VNTR'lerin (Variable Number Tandem

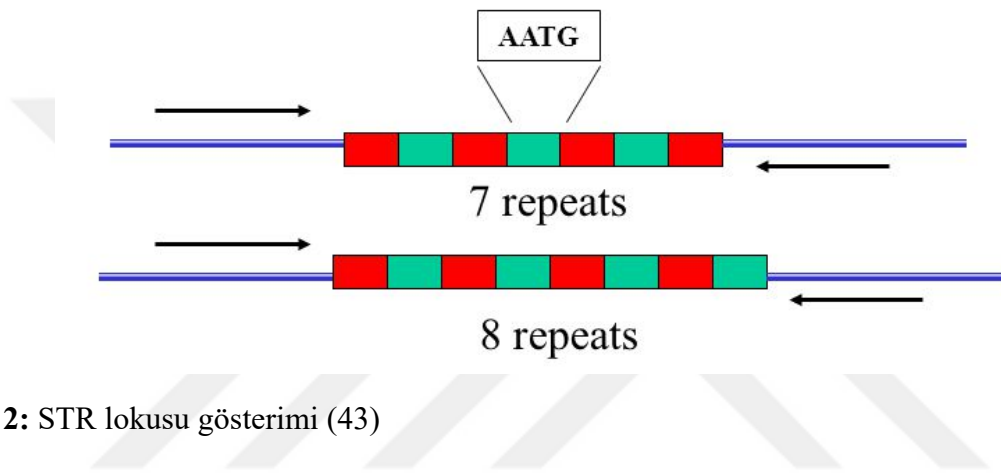
Repeats), uzunluklarındaki varyasyonların saptanmasını sağlayan bir yöntem geliştiren Jeffreys, adli bilimlerde kimliklendirmeye yönelik çığır açan bir sürecin öncüsü olmuştur. Adli bilimlerde yeni bir dönemi başlatan bu teknik, ilk kez İngiltere’de bir cinayet vakasının çözülmesinde kullanılmış ve o dönemde yapılan kimliklendirme çalışmalarında vazgeçilmez bir yöntem olarak rutin kullanıma geçmiştir (33,34).

Yirminci yüzyılın başından itibaren adli moleküler genetik uygulamalarında, ilk olarak kan grupları (eritrosit antijenleri) sonrasında eritrosit enzimleri, serum proteinleri, lökosit antijenleri (HLA) ve hemoglobinden yararlanılmıştır. Bu mekanizmaların incelenme yöntemleri, proteinlerin elektroforez ile elektroforetik ayırımına ve antijenlerin immünolojik reaksiyonlarına dayanmaktadır.

DNA profillemeye tekniği, kimliklendirme gerektiren ya da delil ile kişi arasında direkt bağlantının arandığı olayların tamamında kullanılabilir. Bu olaylar; polimorfizm gözlenen gen bölgesinde kişinin taşıdığı özelliklerin yarısı anneden diğer yarısı da babadan geldiği için babalık ve/veya annelik tespiti davalarında, nesep tespitinde, göçmenlik davalarında (35), cinayet, tecavüz, gasp, hırsızlık gibi kriminal olaylarda (36), felaket kurbanlarının kimliklendirilmesinde, kayıp kişilerin kimliklendirilmesi gibi davalarda (37,38), antropolojik çalışmalarda (39), vahşi yaşamda korumaya alınan ve farklı bölgelere transferi yasaklanan canlıların tespiti gibi olgularda kullanılabilir (40).

Değişken sayıdaki ardışık tekrar dizileri kısaca VNTR’ler adli bilimlerde DNA analizlerinin uygulamaya konulduğu ilk dönemlerde kullanıldı. VNTR’ler bir kromozom üzerinde, belirli bir bölgede art arda tekrarlayan DNA bölgelerinin sayılarındaki farklılıklar polimorfizme neden olur. Yani tekrar bölgelerindeki DNA parçalarından oluşan kopyaların sayısı değişkenlik gösterir ve bu polimorfizm “VNTR” olarak adlandırılır. Ayırım güçleri yüksek olan VNTR lokusları kimliklendirme çalışmalarında rutin olarak kullanılmışlardır.

Ancak bu lokuslar ile yapılan kimliklendirme çalışmalarında DNA'nın degrede olmamış ve fazla miktarda (350-500 ng) olması gerekmektedir. Ancak analizin uzun sürmesi ve radyoaktif maddeye maruz kalındığından dolayı VNTR'lerin yerini yeni teknolojiler almıştır. Son 20 senedir adli kimliklendirmede yaygın bir şekilde STR (Short Tandem Repeats) lokusları kullanılmaktadır (41, 42). 2-6 baz çiftlik uzunlukta, yaygın bir kullanıma sahip olan tekrar dizileri kısa ardışık tekrarlar yani STR'lerdir (43).



**Şekil 2:** STR lokusu gösterimi (43)

STR bölgelerindeki tekrarların kişiden kişiye farklılık göstermesi ve düşük mutasyon oranına sahip olması, kısa amplicona sahip olmaları, degrede olmuş biyolojik örneklerde başarılı sonuçlar elde edilebilmesi, multipleks analize uygun olmaları gibi avantajlarından dolayı son 25 yıldır adli bilimlerde genetik markır olarak kullanılmaktadır (45). Bir biyolojik delilin bir bireye ait olduğunu söyleyebilmek için o delilden elde edilen DNA ile referans örnekten elde edilen DNA'nın en az 13 STR bölgesinde uyumlu olması esası aranır. Bu STR lokusları Federal Araştırma Bürosu' nun (Federal Bureau of Investigation-FBI) CODIS (Combined DNA Index Systems) veri bankasında belirlenmiştir (43).

STR lokusları günümüzde halen kullanılmaktadır. Veri bankasına ve hazır ticari kitlelere eklenen yeni STR lokusları ile güncellemeler mevcut düzene ek olarak devam etmektedir. Ancak STR lokusları olay yerinden gelen yüksek derecede degrede olmuş biyolojik örneklerin

analizinde sorunlar yaşatmaktadır. Bu soruna yönelik olarak degrede örneklerde analiz yapılmasını mümkün kılan mini STR lokusları yani kısa DNA dizileri ortaya konmuştur (44). CODIS veri bankası da 13 STR lokusuna yeni mini STR lokuslarını ekleyerek lokus sayısını 20'ye yükseltmiştir (26).

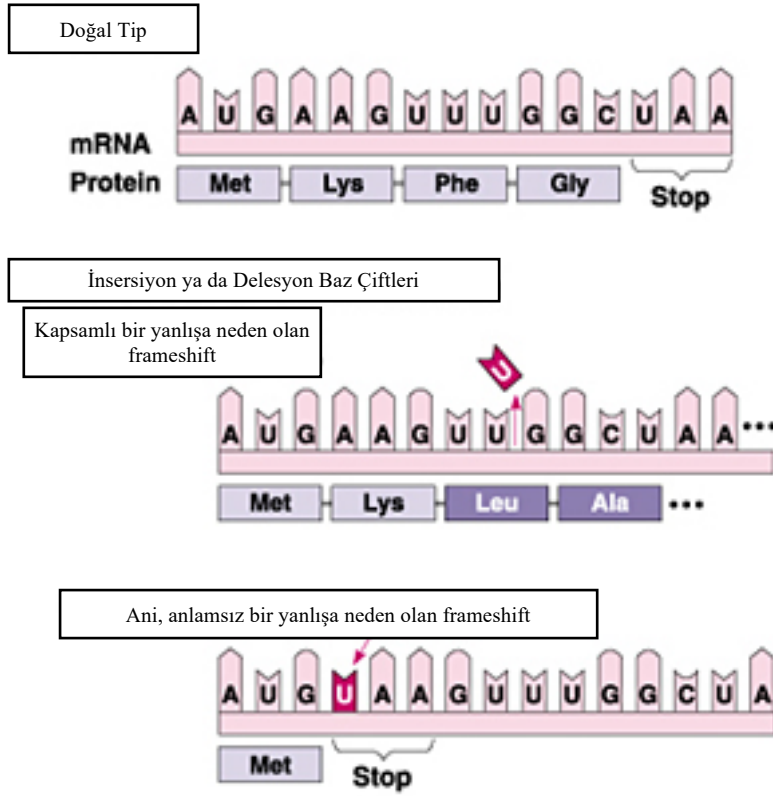
Son yıllarda degrede ve/ veya eser miktardaki örneklerin analizine olanak sağlayan DNA üzerinde çok az yer kaplayan tek nükleotid polimorfizmleri SNP'ler (tek nükleotid polimorfizmi) ve insersiyon-delesyon (InDel) polimorfizmi gibi farklı DNA polimorfizmlerine yönelinmiştir (27,46,47).

### **3.3. İnsersiyon ve Delesyon (InDel)**

İnsersiyon ve delesyon polimorfizmi olarak bilinen InDel'ler bir veya birden fazla nükleotidin genom üzerinde insersiyon ve / veya delesyonu (eklenmesi ve/ veya çıkarılması) sonucu oluşmuş genetik varyasyonlardır. SNP'ler kadar yaygın olmasalar da InDel polimorfizmi SNP'lerden sonra DNA'da en fazla görülen polimorfizm şeklidir. Genomdaki varyasyonların %20'si InDel'lerden oluşmaktadır. Yani genomda meydana gelen 15 milyon genetik varyasyondan 3 milyonu InDel polimorfizmidir (48, 49).

Polimorfizmler sonucu meydana gelen genetik farklılıklar Mendel yasalarına uygun olarak gelecek nesillere aktarılırlar. Nokta mutasyonları, bir ya da birden fazla nükleotidde oluşan mutasyonlardır. İnsersiyon ve/veya delesyon mutasyonları ise nokta mutasyonlarından farklı olarak DNA zincirinde birden fazla nükleotidin eklenmesi ya da çıkarılması sonucu frameshiftlere yani okuma çerçevesinin kaymasına neden olur. Bu da gen yapısında önemli değişikliklerin meydana geldiği polimorfizmlerin oluşmasına neden olur (50,51).

2002 yılında Weber ve arkadaşlarının insan genomunda 2000 dialelik InDel'i tanımlaması ve karakterize etmesi sonucu adli genetikte kullanımı artmıştır (1).

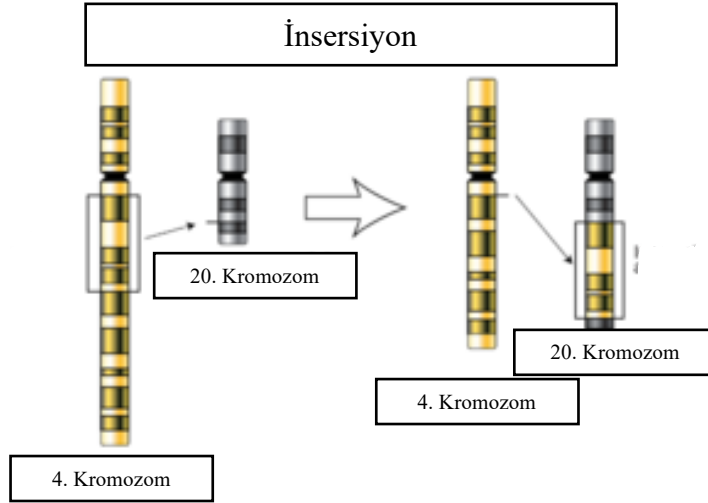


**Şekil 3:** İnsersiyon ve delesyon polimorfizminin şematize gösterimi (52).

### 3.3.1. İnsersiyon (Ekleme)

DNA dizisine bir ya da birden fazla bazın eklenmesi sonucu meydana gelen mutasyona insersiyon adı verilir (Şekil 4). Eklenen nükleotidler 3'ün katı değilse genin okuma çerçevesinde değişim (mutasyon) meydana gelir. Bu mutasyonlarda DNA'nın transkript dizisinde kodlanan aminoasitlerde ve durdurma kodonlarında tamamen değişikliğe neden olur. Böylece proteinlerin yapısı ve işlevi değişir. Ancak, eklenen nükleotidler 3'ün katı ise proteinin bir aminoasit fazla ya da eksik olması ile sonuçlanır. Bu da çerçeve içi bir insersiyondur ve proteinin yapısını etkilemez (53). İnsersiyon sadece bazın eklenmesi sonucunda meydana gelmez. Kromozomun bir bölümü ya da tamamı da insersiyona uğrayabilir. Bunun sonucunda da çeşitli ölümcül genetik hastalıklar oluşabilir (54).

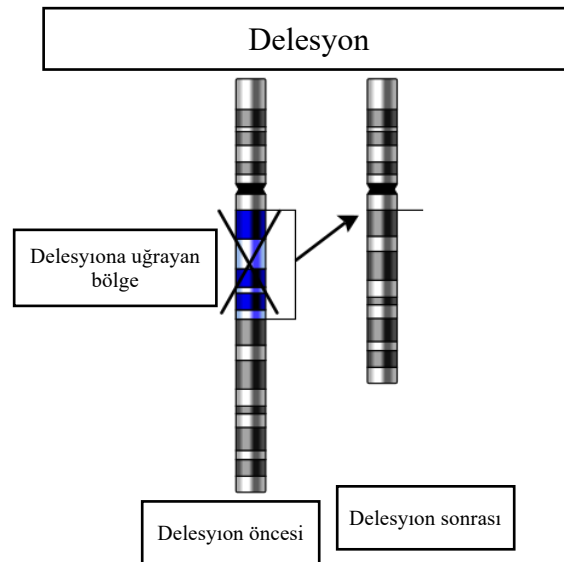




Şekil 4: İnsersiyon oluşumu (52).

### 3.3.2. Delesyon (Çıkarma)

DNA baz dizisinde bir ya da birden fazla bazın çıkarılması/eksilmesiyle meydana gelen mutasyona delesyon adı verilir (Şekil 5). Mayoz bölünmede dengesiz bir parça değişimi sonrasında delesyon meydana gelebilir. Delesyon, insersiyonda olduğu gibi çerçeve kayması mutasyonu oluşturabilir (53). Delesyonlar baz dizisinde meydana geldiği gibi kromozomun bir parçasının kopup, kaybolmasıyla da meydana gelebilen anomalilerdir. Eğer kopan gen parçaları büyükse gen dengesi ciddi olarak bozulur ve ciddi genetik hastalıklara sebep olur.



Şekil 5: Delesyon oluşumu (52).

### 3.3.3. InDel polimorfizmi ve adli moleküler genetikte kullanımı

InDel lokusları hem somatik hem de gonozomal -cinsiyet kromozomları- kromozomlar üzerinde bulunurlar. X kromozomuna bağlı polimorfizmde, baba/kız ilişkisinde otozomal genetik işaretlere ek olarak kullanılabilir. InDel markırları, STR ve SNP analizlerinin avantajlarını kendinde birleştirerek bu sistemlere alternatif oluşturur (55).

Genom üzerinde geniş bir biçimde yayılmışlardır. Aleller arası farklılıklar nükleotidlerin yer değiştirmesine bağlı olmak yerine büyüklerine bağlı oluşur. Mikrovaryant ürünleri yoktur (56).

InDel'lerin amplicon uzunlukları 100-200 bp arasındadır. Bu da degriden veya eski örneklerin analizinde önemlidir. Tüm InDel markırları STR'lerle karşılaştırıldığında düşük mutasyon oranlarına sahiptirler. Bu sebeple STR lokuslarına göre akrabalık ilişkisi analizlerine daha uygun markırlardır. Değişik popülasyonlar arasında alel sıklıkları farklılıkları içerdiğinden popülasyon için kullanılan Soy Bilgilendirici Markırlar (Ancestry Informative Markers-AIMs) için ve karışık popülasyonların altyapısını karakterize etmek için de uygun aday markırlar olarak kullanılmaktadırlar (57,58).

InDEL markır analizinde stutter piklerin olmaması, karışım (miks) örneklerin analizinin kolay olması ve her standart adli genetik laboratuvarının sahip olduğu kapiler elektroforez ekipmanı ile analiz edilebilmesinden dolayı adli genetikte kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (59).

Bazı özel adli olguların çözümünde; iki kız çocuğunun aynı babadan olup olmadığının belirlenmesinde, babanın olmadığı/bulunamadığı durumlarda, babaanne-kız çocuk arasındaki X'e bağlı polimorfizm analizine dayanarak babalık tespiti yapılabilir (59). Bu tür olgularda ve olay yerinden gelen delillerde, biyolojik örneklerin DNA profillendirmesinde gonozomal ve otozomal InDel'ler STR ve SNP lokuslarıyla birlikte kullanılarak daha başarılı sonuçlar elde edilebilir (58,59).

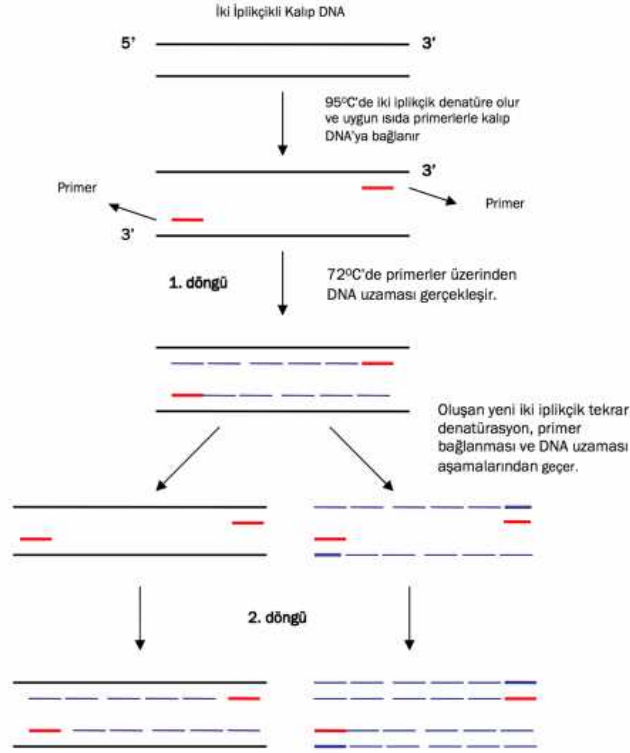
### 3.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'da, dizisi bilinen herhangi bir bölgenin çoğaltılmasını yani amplifikasyonunu sağlayan hücre dışı (in vitro) bir DNA sentez yöntemidir. Bu teknik çoğaltılacak DNA'nın bir DNA polimeraz, nükleotidler ve DNA sentezinde öncülük edecek tek zincirli sentetik kısa DNA parçaları (primerler) ile aynı tüpte farklı sıcaklıklarda inkübe edilmesi temeline dayanır. PCR reaksiyon tüpünde; genomik DNA, çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik oligonükleotid (primer), deoksi-nükleotit-trifosfatlar (dNTP: dATP, dGTP, dTTP, dCTP), yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi (Taq Polimeraz); uygun pH ve iyon koşullarını (Mg<sup>+2</sup>) sağlayan tampon karışımıdır (67). Kary Mullis tarafından 1983'te geliştirilen teknik, 1993'te Mullis'e kimya dalında Nobel ödülünü kazandırmıştır (66,67).

Başlangıç DNA miktarı PCR döngü sayısının kaç olacağını belirler. Genellikle döngü sayısı 20 ile 45 arasında değişir. PCR döngüsü sırayla "Denatürasyon", "Primerin Bağlanması (Annealing)" ve "Uzama" basamaklarını içerir (68).

Belirtilen bu aşamaların her biri farklı sıcaklıklarda ve sürelerde gerçekleştirilir.

1. *Denatürasyon (92°C-98°C)*: DNA'nın çift sarmal yapısının birbirinden ayrılmasıdır.
2. *Bağlanma (37°C-65°C)*: Denatürasyon sonrası sentetik oligonükleotidlerin (primerlerin) hedef DNA'ya bağlanmasıdır.
3. *Uzama (55°C -72°C)*: Primerlerin yeni çift zincirli DNA oluşturacak şekilde uzamasıdır. Uzama basamağı polimeraz enziminin en uygun düzeyde çalışmasına izin veren sıcaklıkta gerçekleşir. İleri ve geri primerler çoğaltılacak bölgenin sınırlarını belirler ve çoğaltılmış ürünün gerçek boyutunu tanımlar.



**Şekil 6:** PCR işleminin şematize gösterimi (69).

Moleküler genetik alanında yeni bir çağ açan PCR tekniğinin bulunuşu adli genetik analizleri için de önemli bir dönüm noktası olmuştur. Bu teknik sayesinde olay yerinde bulunabilecek eser miktardaki örnekten bile çalışmak mümkün hale gelmiştir.

### 3.4.1. Multipleks PCR karışımı (PCR master miks)

PCR master miks nükleaz içermeyen su, 2X PCR tamponu, Taq DNA polimeraz, dNTP ve  $MgCl_2$  reaksiyon tamponlarını içeren DNA amplifikasyonun verimli olması için kullanıma hazır bir ticari çözüldür (65). PCR master miks, PCR bileşenlerinin tek tek kullanılmak yerine tek bir tüpte bu karışımları içerir. Daha az maliyetli, multipleks PCR çalışmaları için optimize edilmiş olması, kontaminasyon riskini azaltması ve çalışma süresini kısaltması gibi sebeplerden dolayı araştırmacılar tarafından tercih edilirler.

### 3.5. Multipleks Panel Dizaynı ve PCR Optimizasyon Çalışmaları

PCR optimizasyonu, amplifiye edilecek markırın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bileşenlerinin uygun koşullara getirilmesi esasına dayanır. Optimize edilen PCR bileşenleri; primer konsantrasyonları, primerlerin Tm değerleri ve PCR döngü (siklus) sayılarıdır (60).

#### 3.5.1. Primer dizaynı

Primerler 18-22 baz çifti uzunluğunda değişen dizilerdir. Primer uzunluğunun bu aralıkta seçilmesinin sebebi ise, bu uzunluğun her yere bağlanmaya çalışan DNA zincirlerinin sadece kendine özgü (spesifik) yerlere bağlanması için bir hesaplama sonucu karar verilmiş olmasıdır.

Primerler, çoğaltılması istenen hedef DNA bölgesinin her iki ucuna tamamlayıcı olacak olan diziler olarak tasarlanır. Primer tasarımındaki amaç ise hedeflenen DNA bölgesine karşılık gelen ve tam hibridizasyona izin veren kısa bir DNA dizisi oluşturmaktır (61).

Primer dizaynında dikkat edilmesi gereken özellikler aşağıda belirtilmiştir (62):

- Oligonükleotidin (primerin) tek bir dizilime özgü olması gerekmektedir. Özgüllükte esas rolü oligonükleotidin 3' ucu oynamaktadır.
- Saç tokası (hairpin) oluşumunu engellemek için oligonükleotid kendi içinde karşılıklı eşlenik baz dizileri içermemelidir.
- Oligonükleotid çiftleri dimer oluşumuna (primer-dimer) neden olacak şekilde birbirleri ile eşlenik olmamalıdır.
- Oligonükleotidlerin uzunluğu 18-25 baz çifti arasında olmalıdır.
- Oligonükleotid çiftlerinin Tm değerleri birbirine denk ya da yakın olmalıdır.
- Oligonükleotid dizilimleri için üçten fazla tekrar eden baz olmamalıdır.
- GC oranlarının %50'nin altında olmasına dikkat edilmelidir.

Primerlerin baz dizisindeki GC miktarı ve primerlerin bağlanması için gerekli olan sıcaklık ( $T_m$ ) miktarı arasında kurulan denge primer dizaynında çok önemlidir. Bu denge sağlanamadığı zaman primerler kendi içlerinde saç tokası (hairpin) şeklinde hibridize olması, primerlerin aynı tür bir primerle uçlarından hibridize olması, primerlerin başka bir türde primerle uçlarından hibridize olması gibi istenmeyen sorunlar ortaya çıkabilir. Primer dizilerinde bu gibi sorunlarla karşılaşmamak için  $T_m$  sıcaklığı iyi belirlenmeli, G ve C bazlarının oranı ise %40-60 arasında olması gerekmektedir (63).

Primer tasarımının son halkası, tasarlanan primerlerin genomda nereye denk geldiğinin belirlenmesidir. Hesaplamalar sonucunda birçok alternatif primer çifti ortaya çıkabilir. Genomdaki istisnalar dışında çoğu zaman primerler için birden fazla alternatif bulunur. Primerin Taq polimerazın yerleştiği uçtaki yaklaşık 3 bazlık bağlanma tam olarak gerçekleştiği sürece, geri kalan kısımlardaki baz eşleşmelerinin bir kısmı tam olarak olmasa bile PCR reaksiyonu yine de gerçekleşecek ve o DNA bölgesini çoğaltacaktır. Bu gibi problemlerin önüne geçmek için öncelikle; (I) alternatif primer çiftlerinin hedef bölgeye uygun olacak şekilde tasarlanması, (II) bulunan alternatif primer çiftlerinin genoma nerelere bağlandığının tespit edilmesi gerekmektedir. Bunlar için günümüzde bilgisayar programları mevcuttur. Bu programlar Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) olarak adlandırılır.

Primerler, ticari olarak, firmalardan liyofilize bir şekilde ve steril olarak alınmaktadır. Satın alınan primerler genellikle 100 pmol/ $\mu$ l şeklinde sulandırılır ve ana stok oluşturulur. Kontaminasyonu önlemek için bu stoktan 10 pmol/ $\mu$ l şeklinde dilüsyonlar hazırlanır ve çalışmalar bu ara stoktan yapılır. Primer konsantrasyonlarının da yanlış bağlanma, primer-dimer oluşumu gibi sorunları engellemek için PCR'de 0,1-0,5  $\mu$ M arasında olması önerilmektedir (64).

### 3.5.2. Multipleks PCR ve primerlerin seçilme kriterleri

Multipleks PCR terimi birden fazla primer çifti ile yapılabilen PCR için kullanılmaktadır. Bu teknikte, eş zamanlı olarak hedef DNA'nın birçok bölgesini çoğaltılmaktadır. Böylece maliyet düşürülmüş ve zamandan kazanç sağlanmış olur (70).

Multipleks PCR için primerler aşağıdaki kriterlere göre seçilir (3, 71).

1. Oligonükleotidin (primerin) tek bir dizilime özgül olması gerekmektedir. Özgüllükte esas rolü oligonükleotidin 3' ucu oynamaktadır.
2. Saç tokası (hair pin) oluşumunu engellemek için oligonükleotid kendi içinde karşılıklı eşlenik baz dizileri içermemelidir.
3. Oligonükleotid çiftleri dimer oluşumuna (primer-dimer) neden olacak şekilde birbirleri ile eşlenik olmamalıdır.
4. Primerlerin uzunluğu 18-25 baz çifti arasında olmalıdır.
5. Primerlerin baz dizilerinin doğruluğu, komplementer olup olmadığı NCBI, VEGA, ENSEMBL gibi çeşitli veri tabanlarından kontrol edilmelidir.
6. Oligonükleotid dizilerinin GC oranlarının %50'nin altında olmasına dikkat edilmelidir.
7. Primerlerin Tm sıcaklıkları hesaplanmalı ve sıcaklıkları birbirine yakın olan primerler seçilmelidir.
8. Benzer ampikon uzunluğuna sahip bölgelerin primerleri floresans boyalar ile işaretlenmelidir.

### 3.6. Kapiller elektorofrez (Capillary Electrophoresis- CE)

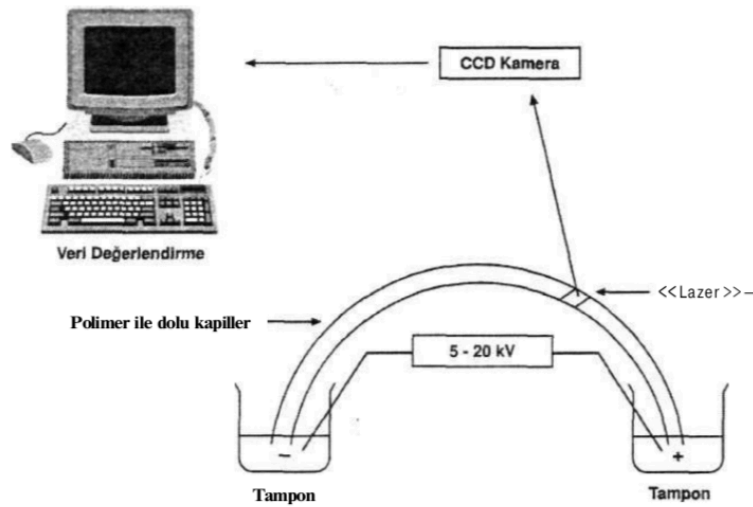
Kapiller elektroforez, 1970'lerin başında Hjerten'nin 3 mm çaplı dönen tüplerle yaptığı çalışmalar bugün atto-mol ve daha düşük miktardaki maddenin analizini yapabilen ve bilimin pek çok dalında kullanılan bir analiz tekniği haline gelmiştir. Kapiller elektroforez (CE), elektroforetik hareket kabiliyeti, faz ayırımı ve moleküler boyuttaki farklılıklara ya da bunların birkaçına bağlı olarak elektrokinetik ayırım yapan bir tekniktir (72).

Kapiler elektroforezde yürütülen örneklerin mobilitesi örneğin büyüklüğüne, taşıdığı yüke, tamponun iyonik gücüne ve tamponun elektro-osmotik akışına bağlıdır. Elektro-osmotik akış negatif yüklü katoda doğrudur (73-75).

Kapiler elektroforez cihazı, anot ve katot kutuplar arasında uzanan bir kapiller, sıcaklığı sabit tutacak bir ısıtıcı bölge ve anot uca yakın bir bölgede lazer ışık kaynağı ile CCD (charge coupled device) kameradan oluşur (Şekil 7). Kapillerin içine polimer dolduran bir şırınga ve her iki kutupta akımı sağlayacak tampon hazneleri bulunmaktadır. Kapillerler jel yerine özel polimerler ile doldurulurlar. Bu özel polimer POP7, POP6 ve POP4 (performance optimized polymer) olarak bilinir. POP4 polimeri, %4 DMA, 8 M üre, %5 2-pirolidinon ve 100 mM TAPS'dan oluşur. İçeriğindeki yüksek üre elektroforez sırasında PCR ürünlerindeki denatürasyonun devamını sağlar. Kapillerin çapının küçük olması hem yüksek voltaja izin vermekte hem de daha iyi bir ayırım sağlamaktadır. Analizörde kullanılan kapillerlerin iç yüzeyi silika ile kaplanmıştır. PCR ürünleri, uygulanan voltajla katottan (-) anoda (+) doğru büyüklüklerine göre ayrılırlar. Floresans boyalarla işaretlenmiş DNA fragmentleri dedektörden geçerken lazer tarafından tespit edilirler. Lazer ışını floresans boyaların belirli dalga boylarında yansıma yapmalarına neden olur. Yansıyan ışığın dalga boyu ve şiddeti ise CCD (charge coupled device) adı verilen özel kamera sistemi tarafından tespit edilir ve bu veri elektronik bilgiye (elektroferogram) dönüştürülür.

Genemapper, GeneScan gibi bilgisayar yazılımları tarafından değerlendirilen bu veriler ekran- da büyüklük ve yoğunluğu ifade eden pikler şeklinde belirir. Bu pikler bahsedilen yazılımlar tarafından daha önce bu yazılıma tanıtılan floresans boyalı ve fragman büyüklüğü bilinen standartlarla (size standart) karşılaştırılarak değerlendirilir (76, 77).





Şekil 7: Lazer destekli kapiller elektroforezin şematik görünümü (78).

### 3.7. Multipleks Panel Geliştirilmesi ve Validasyon Çalışmaları

TS EN ISO / IEC 17025 akreditasyon standardı; numune alma dâhil, deney ve/veya kalibrasyon hizmeti veren bir laboratuvarın yeterliliğinin tanınması ve sağlanması için gereken genel şartları kapsar. Bu standart, laboratuvar tarafından geliştirilen standart olan ve standart olmayan metotlarla yapılan deney ve kalibrasyonu da kapsar. Yani deney ve kalibrasyon laboratuvarlarının yeterliliği için genel şartların yanı sıra bir laboratuvarın teknik açıdan doğru ve güvenilir sonuçlar üretme kabiliyetini ve teknik yeterliliğini de TS EN ISO / IEC 17025 ele almaktadır (79).

EN ISO / IEC 17025 şartlarına göre test laboratuvarlarında kullanılan yöntemlerin valide edilmesi gerekir. Belirli bir protokol ya da cihazı doğrulamak için çeşitli yaklaşımlar olabilir. EN ISO / IEC 17025 uyarınca bir sistemi doğrulamak için kriterler ne olursa olsun, prosedürler ve cihazların amaca yönelik olduğunun ispatlanması gerekmektedir. Ayrıca, sonuçların yani DNA profillerinin laboratuvarlar arası karşılaştırılabilir olması için uluslararası standartlara uyması zorunludur. Validasyon parametreleri dahili doğrulamalar için test laboratuvarlarına göre değişmektedir. Adli genetik laboratuvarlar EN ISO / IEC 17025

kurallarına tabiidirler ve bu kurallara göre test laboratuvarları kullandıkları yöntemleri doğrulamalı ve geçerli kılmalıdır (80).

*Dahili doğrulama;* her adli DNA test laboratuvarı tarafından gerçekleştirilir ve prosedürün güvenilirliğinin ve sınırlamalarının kurum içi kanıtıdır.

*Gelişimsel doğrulama;* bir prosedürün doğruluğunun, kesinliğinin ve tekrarlanabilirliğinin üretici, teknik kuruluş ve diğer laboratuvarlar gibi taraflar tarafından kanıtlanmasıdır.

Yeni bir multipleks kit çalışmasında kullanılan yöntemin geçerli kılınması için gerekli olan asgari parametreler; analiz eşliğinin tespit edilmesi (LOD), duyarlılık (LOQ) belirlenmesi, dinamik alanın belirlenmesi, tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik ve stokastik eşğin belirlenmesi analizleridir (81).

### **3.7.1. Analiz eşliğinin belirlenmesi (LOD)**

Analiz eşliğini belirlemek için negatif kontrol örnekleri yürütülerek en yüksek piklerin RFU (Rölatif Floresans Birimi) değerlerinin ortalaması alınır.

### **3.7.2. Duyarlılık (LOQ)**

Duyarlılık; tam profil elde edilebilen en düşük DNA konsantrasyon aralığını belirlemek için yapılır. Aynı örneğin çeşitli konsantrasyonlarda dilüsyonları hazırlanarak yürütülür ve cihazın tam profil oluşturabilmek için gerekli olan en düşük DNA konsantrasyonu belirlenmiş olur (80, 82).

### **3.7.3. Dinamik alanın belirlenmesi**

Bu parametre ile genetik analizörün tespit edebileceği en düşük ve en yüksek DNA miktarı belirlenir. Bunun için; miktarı bilinen bir DNA örneğinden çeşitli konsantrasyonlarda dilüsyonlar hazırlanır ve genetik analizörde yürütülür. Elde edilen pik yükseklerinin RFU değerlerinin ortalaması alınarak dinamik alan belirlenir (80, 82).

#### **3.7.4. Tekrarlanabilirlik**

Tekrarlanabilirlik; farklı kişilerin aynı laboratuvarında aynı ekipmanları kullanılarak yaptığı analizlerin sonuçlarında değişiklik olup olmadığının belirlenmesi için yapılmaktadır.

#### **3.7.5. Tekrar üretilebilirlik**

Tekrar üretilebilirlik; farklı kişilerin farklı ölçüm cihazı kullanılarak farklı laboratuvarlarda yapılan analizlerin sonuçlarında değişiklik olup olmadığının belirlenmesi için yapılmaktadır.

#### **3.7.6. Stokastik eşik belirlenmesi (Pik denge analizi)**

Bir lokustaki heterozigot alellerinin pik dengesi belirlenir. Bu amaçla tam DNA profili elde edilmiş örneklerdeki heterozigot gen bölgelerindeki alel pik yüksekliklerinin RFU değerlerinin birbirlerine göre oranları alınarak bir eşik değeri hesaplanır. Kabul edilebilir lokuslar arası pik denge oranları en az %60 olmalıdır (80).

#### 4. Materyal ve Metod

Bu çalışmada X kromozomuna özgü 22 InDel lokusundan (rs2307557, rs67705557, rs72434864, rs59400186, rs2307741, rs16367, rs2307762, rs16368, rs16632, rs16680, rs25581, rs16397, rs3048996, rs25582, rs11297248, rs199639085, rs2308280, rs71948836, rs3978254417, rs16460, rs62954660, rs67588758) oluşan bir multipleks panel geliştirmek amacıyla primer seçimi ve primer tasarımı yapılarak multipleks panel yapılmıştır.

Sentezlettirilen her bir InDel lokusu ilk önce primerin çalışıp çalışmadığını ve elektroforegramdaki yerini (size) belirlemek için tek tek PCR (singlepleks) yapılmıştır. Sonrasında multipleks PCR optimizasyonu yapılmıştır ve 22 InDel lokusu, 11 lokuslu 2 multipleks olarak optimize edilmiştir. Optimizasyondan aşamasından sonra validasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimize edilen ve validasyonu yapılan 2 multiplekste 30 kişinin genotipi belirlenmiştir.

Uygulanan yöntemin iş akışı aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

- Ağız içi sürüntü örneklerinin toplanması
- Alınan örneklerden DNA izole edilmesi
- DNA miktar tayinin yapılması
- 22 X-InDel lokusunun seçimi ve tasarlanması
- 22 X-InDel lokusunun tek tek PCR optimizasyonunun yapılması
- 22 X-InDel lokusunun 11 lokuslu 2 multipleks olarak optimizasyonunun yapılması
- 22 X-InDel lokusunun 11 lokuslu 2 multipleks olarak validasyon parametrelerine uygun olarak validasyonunun yapılması
- 30 kişiye ait DNA örneğinde 22 InDel lokusunun 1. multipleksinin ve 2. multipleksinin PCR'si (çoğaltılması), elektroforezi ve değerlendirilmesi

#### 4.1. Kullanılan Cihazlar, Kitler ve Kimyasallar

Deneylerin tüm aşaması İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitüsü Ar-Ge ve öğrenci laboratuvarlarında gerçekleşmiştir.

##### **Kullanılan cihazlar**

1. Vorteks- Harmony Mixer Uzusio- VTX-3000L
2. Mikrosantrifüj-BIOSAN Microspin 12
3. Isıtıcı blok- BIOSAN Bio TDB-100
4. Florimetre cihazı- Qubit (Fluorometre)
5. Isı döngü cihazı (PCR)- SimpliAmp™ Thermal Cycler Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific
6. Genetik analizatör- ABI PRISM 310 Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific

##### **Kullanılan kitler**

###### *DNA izolasyonu için kullanılan kitler*

- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)

###### *DNA miktarı tayini için kullanılan kitler*

- Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen)

###### *PCR aşamasında kullanılan kitler*

- Floresan (6FAM, NED, VIC, PET) ile işaretli primerler (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific)

##### **Kullanılan Kimyasallar**

###### *PCR aşamasında kullanılan kimyasallar*

- PCR Master Mix (Qiagen)

###### *Kapiller elektroforez aşamasında kullanılan kimyasallar*

- Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific)
- GeneScan™- 500 LIZ™ Size standard (Applied Biosystems- Thermo Fisher Scientific)

## **4.2. DNA Örneklerinin Toplanması, İzolasyonu ve Miktarının Belirlenmesi**

### **4.2.1. DNA örneklerinin toplanması**

Çalışmada kullanılacak DNA örnekleri, örneklerinin bilimsel çalışmalarda kullanılmasına rıza gösteren (Ek 1: Asgari Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu), aralarında akrabalık bulunmayan İ.Ü. Cerrapaşa Adli Tıp Enstitüsü öğrencileri ve gönüllü kişilerden toplamda 30 kişiden ağız içi sıvap (sürüntü) örnekleri toplanmıştır.

### **4.2.2. DNA örneklerinin izolasyonu**

Örneklerin DNA izolasyonu QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) ticari kiti kullanılarak yapılmıştır. İzole edilen DNA çift ipliklidir.

İzolasyon aşağıdaki basamaklar izlenerek yapılmıştır.

1. Ağız içi sıvap 1,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 20 µl Proteinaz K ve 200 µl AL tamponundan eklenerek 15 saniye karıştırıldı (vortekslendi).
2. 56°C'de 10 dakika inkübe edildi. Tüp duvarındaki karışımın aşağı inmesi için, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
3. 200 µl %96-100'lük etanol eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Vorteksten sonra tekrar 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
4. QIAamp® mini spin kolon 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve 3. adımda elde edilen karışım, 2 ml'lik toplama tüpünün içinde bulunan QIAamp® mini kolona aktarıldı ve tüpün kapağı kapatılarak 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtratı içeren tüp atıldı.
5. QIAamp® mini kolon, 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 500 µl AW1 eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtratı içeren tüp atıldı.
6. QIAamp® mini kolon, 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 500 µl AW2 eklendi ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Filtratı içeren tüp atıldı.

7. Kolon membranının kuruması için, QIAamp® mini kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek 14000 rpm'de 1 dakika boş olarak santrifüj edildi.
8. QIAamp® mini spin kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. 200 µl AE tamponu eklendi. Oda ısısında 3 dakika inkübe edildi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Elde edilen DNA izolatları kısa süreli kullanım için +4 °C' ye, uzun süreli saklamak için -20°C' ye kaldırıldı.

#### 4.2.3. DNA miktarlarının belirlenmesi

DNA izolasyonu yapılmış olan örneklerin DNA miktarları flourometrik yöntem ile belirlenmiştir. Elde edilen izolatlar Qubit® dsDNA HS Assay (Invitrogen) kiti kullanılarak Qubit® fluorometer cihazı ile ölçülmüştür.

- Ölçülecek örnek sayısı ve cihazın kalibrasyonu için gerekli 2 adet standart ile birlikte toplam sayı belirlenerek, 0.5 ml'lik steril tüpler hazırlandı.
- Her bir örnek için 199 µl Quant-iT™ dsDNA HS Buffer ve 1 µl Quant-iT™ dsDNA HS Reagent karışımı hazırlandı.
- Cihazın kalibrasyonu için her ölçümde Standart 1 ve Standart 2 olmak üzere kontroller kullanıldı. Her bir standart için Buffer-reagent (200 µl) karışımdan cihaza özgü tüpe 190 µl alındı, üzerine 10 µl standart eklendi.
- Örnekler için ise Buffer-reagent (200 µl) karışımdan cihaza özgü tüpe 199 µl alındı, üzerine 1µl standart eklendi. Tüpler birkaç saniye vortekslendi.
- Oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Öncelikli olarak Standart 1 ve Standart 2 sırası ile okutularak Qubit™ fluorometre cihazında DNA konsantrasyonları belirlenerek aletin kalibrasyonu sağlandı.
- Örnekler sırasıyla cihaza yerleştirildi, karışım içindeki ölçümü yapıldı.

### 4.3. X Kromozomu InDel Lokuslarının Seçilmesi

Lokuslar aşağıda belirtilen kriterlere göre seçildi (Tablo I).

- Her bir lokusun farklı popülasyonlarda çalışılmış olmasına dikkat edildi.
- Her bir lokus için farklı popülasyonlardaki alel frekanslarına bakılarak minimum heterozigotluk oranı  $\geq 0.3$  olan lokuslar tercih edildi.
- Multipleks PCR çoğaltılmasındaki kriterlere uyularak primerlerin GC oranları, TM değerleri, primerler arası komplementerlik olup olmaması hususlarına dikkat edildi.

Türkiye popülasyonu için heterozigotluk oranı dolayısıyla polimorfik gücü en yüksek olabilecek X kromozomu üzerinde bulunan 22 InDel lokusu seçilmiştir. Bunun için Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) veri tabanından yararlanılmıştır. 22 InDel lokusunun dizaynı Primer-BLAST yazılımı kullanılarak (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) yapılmıştır. Seçilen primerlerin birbirleri arasında bir eşleşme olup olmadığı, homolojileri, primer-dimer oluşumları, saç tokası yapıları yine Primer-BLAST programı kullanılarak kontrol edilmiştir. Her bir lokus, kapiler elektroforezde görüntülenebilmesi için floresans boya ile (6-FAM, NED, PET ve VIC) işaretlenmiştir.



**Tablo I:** Seçilen X InDel primerlerinin kromozomal yerleşimi, alel dizileri, amplicon büyüklükleri, floresans boya ları, Tm değerleri ve % GC oranları

Kod	Ref SNP Cluster ID (rs)	Kromozom	Aleller	Amplicon Büyüklüğü (Bç)	Floresans Boya	TM (°C)	GC %
XID 1	rs2307557	X	-/AA/ACA	57	6-FAM	56.27 56.14	45.00 56.14
XID 2	rs67705557	X	AAATT/-	61	NED	58.69 58.52	57.89 52.38
XID 3	rs72434864	X	A/-	74	6-FAM	58.59 58.77	40.00 47.62
XID 4	rs59400186	X	-/GTTA	75	NED	59.30 59.47	50.00 50.00
XID 5	rs2307741	X	- /CCTCTGAAC/ CTGAAC	78	PET	58.27 58.81	50.00 47.83
XID 6	rs16367	X	-/AAGT	82	6-FAM	53.30 52.11	40.00 31.82
XID 7	rs2307762	X	-/GTATTGA	92	PET	53.29 53.81	26.09 40.00
XID 8	rs16368	X	-/AGA	99	6-FAM	55.33 57.80	42.11 50.00
XID 9	rs16632	X	-/AATA	117	PET	57.02 59.53	36.36 52.38
XID 10	rs16680	X	TGT/-	119	NED	53.85 53.05	40.00 42.11
XID 12	rs25581	X	TTCTA/-	128	VIC	55.81 58.52	45.00 55.00
XID 13	rs16397	X	GTG/-	132	6-FAM	57.96 56.11	55.00 40.00
XID 14	rs3048996	X	-/ATC	134	PET	55.78 57.56	42.86 45.00
XID 15	rs25582	X	-/CCTAGCC	135	NED	56.41 56.78	45.00 50.00
XID 16	rs11297248	X	T/-	140	VIC	58.02 55.70	50.00 45.00
XID 17	rs199639085	X	TTTTATTTTA TT/-	142	PET	57.03 59.75	47.62 60.00
XID 18	rs2308280	X	-/TAA	146	PET	58.08 56.56	47.62 32.00
XID 20	rs71948836	X	AC/-	148	6-FAM	59.38 58.50	50.00 60.00
XID 21	rs3978254417	X	-/AA	149	NED	53.98 56.11	45.00 42.86
XID 22	rs16460	X	- /TTC/TTCTTC C/TTCTTCT	163	NED	58.83 57.51	50.00 40.91
XID 23	rs62954660	X	A/-	167	6-FAM	57.57 58.17	45.00 50.00
XID 24	rs67588758	X	ATGA/-	204	NED	57.41 57.70	42.86 40.91

#### 4.4. Multipleks PCR Optimizasyonu

##### 4.4.1. Primerlerin Tm değerlerinin belirlenmesi

Her bir InDel lokusunun GC oranlarına göre Tm değerleri BLAST programı kullanılarak yapılmıştır. En yüksek Tm değeri 60 °C olarak bulunmuştur. Buna göre PCR döngü programında bağlanma (annealing) sıcaklığı en az 60 °C olacak şekilde belirlenmiştir (Tablo I).

##### 4.4.2. PCR öncesi ön hazırlıklar

###### 4.4.2.1. Primerlerin sulandırılması

Üretici firmadan temin edilen primerler öncelikle 4000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Firmanın önerileri doğrultusunda steril distile su eklenerek 100 µM'lık 'Ana Primer Stok' oluşturulmuştur. Herhangi bir kontaminasyon olduğu takdirde tüm primer stoklarının bundan etkilenmemesi için 'Ara Primer Stok' oluşturulmuştur. Ara primer stok 20 µM'lık 100 µl olarak ayarlanmıştır.

###### 4.4.2.2. PCR bileşenleri ve PCR döngü protokolü

PCR karışımında hazır multipleks PCR karışımı (PCR Master Mix (QIAGEN)) kullanılmıştır. PCR bileşenleri (Tablo II) ve PCR protokolü (Tablo III) aşağıda tablolarda verildiği gibidir. PCR protokolü belirlenirken TM oranına bağlı bağlanma (annealing) sıcaklığı ve genel PCR döngü koşullarına dikkat edilmiştir.

**Tablo II:** PCR karışımı hazırlama

Bileşenler	Hacim (µl) her örnek için
Master Mix	4
Primer Mix	3
Distile su	2
Genomic DNA (1ng/µl)	1

Toplam Hacim	10
--------------	----

**Tablo III:** PCR protokolü

Sıra	Aşama	Sıcaklık	Süre
1	Denatürasyon	95 °C	15 dakika
2	Amplifikasyon (30 döngü)	94 °C	30 saniye
		60 °C	90 saniye
		72 °C	45 saniye
3	Uzama	72 °C	60 dakika
4	Son sıcaklık	4 °C	∞

PCR aşamasında kontaminasyonu kontrol etmek amacıyla her reaksiyonda negatif kontrol kullanılmıştır. Tüm optimizasyon ve validasyon çalışmalarında miktarı bilinen K562 (Promega) ve 9947A (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific) pozitif kontrol örnekleri kullanılmıştır. PCR, SimpliAmp™ Thermal Cycler cihazında yapılmıştır. PCR sonrası tüplerin ağzı sıkıca kapatılmış ve parafilm ile sarılmıştır. 24 saat içinde elektroforeze yüklenecek örnekler +4 °C'ye, 24 saatten daha uzun süre bekleyecek örnekler ise -20 °C'ye kaldırılmıştır.

#### 4.4.3. Elektroforez aşaması

PCR ürünleri Applied Biosystems marka 310/3130 Genetik Analizör Cihazında yürütülmüştür. Örneklerin elektroforetik analizi aşağıda belirtilen 3 temel adımdan oluşmaktadır.

- Örneklerin elektroforeze hazırlanması
- Örneklerin elektroforeze yüklenmesi
- Verilerin analiz edilmesi

### ***Örneklerin elektroforeze hazırlanması***

10 µl Hi-Di Formamide, 0,5 µl LIZ 500 Size Standart ve 1 µl PCR ürünü elektroforeze yüklenmek üzere hazırlanmıştır.

### ***Örneklerin elektroforez cihazına yüklenmesi ve verilerin analizi***

Örnekler 36 cm kapillerle, POP-4 polimeri kullanarak GS STR POP4 (1 ml) G-5 modülünde; enjeksiyon 3 kV ve 5 sn, yürütme voltajı 15 kV, 60°C’de 30 dakika yürütülmüştür. (Tablo IV). Elektroforez sonrasında örnekler GeneMapper® programında analiz edilerek genotiplendirme yapılmıştır.

**Tablo IV:** Elektroforez koşulları

Parametre	GS STR POP-4 (1 ml) G5 modül
İnjeksiyon zamanı	5 sn
Yürütme voltajı	15 kV
Yürütme zamanı	30 dakika
Yürütme sıcaklığı	60 °C
Şırınga pompalama süresi	150 sn.

#### **4.4.4. 22 X InDel lokusunun multipleks PCR optimizasyonu**

22 X-InDel lokusunun ayrı ayrı PCR’si başarıyla tamamlandıktan sonra multipleks çalışmalara geçilmiştir. Multipleks çalışmalarında tekli PCR çalışmalarında optimize edilmiş olan PCR bileşenleri ve PCR döngü koşulları aynı şekilde uygulanmıştır. Multipleks çalışmalar yapılırken, primer konsantrasyonlarını belirleyebilmek ve optimize etmek için sırayla 2’li, 3’lü, 5’li, 6’lı, 8’li, 10’lu, 12’li, 14’lü, 16’lı, 18’li, 20’li ve son olarak 22’li mütipleksler oluşturulmuştur.

Bazı boyaların diğer lokusların olduğu bölgeye yansıma yapması nedeniyle, 11 lokustan meydana gelen 2 multipleks olacak şekilde PCR optimizasyonu yapılmıştır. Multipleks 1 ve Multipleks 2 için primer konsantrasyonları Tablo V’te gösterildiği gibi 0,2-5 pmol arasında değişmektedir.

**Tablo V:** Multipleks 1 ve Multipleks 2 için optimize edilmiş primer konsantrasyonları

	<b>Primer Kodu</b>	<b>Ref SNP Cluster ID (rs)</b>	<b>Konsantrasyon (pmol/ µl)</b>
<b>MULTIPLEKS 1</b>	XID 1	rs2307557	0,2
	XID 3	rs72434864	0,2
	XID 5	rs2307741	1
	XID 6	rs16367	5
	XID 9	rs16632	0,4
	XID 12	rs25581	0,4
	XID 14	rs3048996	0,7
	XID 17	rs199639085	0,4
	XID 18	rs2308280	0,9
	XID 20	rs71948836	0,2
	XID 23	rs62954660	0,5
	<b>Primer Kodu</b>	<b>Ref SNP Cluster ID (rs)</b>	<b>Konsantrasyon (pmol/ µl)</b>
<b>MULTIPLEKS 2</b>	XID 2	rs67705557	0,4
	XID 4	rs59400186	0,5
	XID 7	rs2307762	1
	XID 8	rs16368	0,9
	XID 10	rs16680	0,5
	XID 13	rs16397	0,6
	XID 15	rs25582	0,6
	XID 16	rs11297248	1
	XID 21	rs3978254417	0,4
	XID 22	rs16460	0,5
	XID 24	rs67588758	0,8

#### **4.4.5. 22 X InDel lokusunun 2 multipleks olarak validasyonu**

InDel multipleks panelinin optimizasyonu yapıldıktan sonra yöntemin geçerliliği ve uygulanabilirliği için validasyon çalışması yapılmıştır. Analiz eşiği, dinamik alan (hassasiyet), duyarlılık, stokastik eşik, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik parametreleri uygulanmıştır.

##### **4.4.5.1. Analiz eşiği**

DNA tiplendirilmesinde kullanılan genetik analizör cihazının (ABI PRISM 310/3130 Genetik Analizör Cihazı) analiz eşiğini belirlemek için, analiz edilen 10 negatif kontrol örneğinden elde edilen en yüksek piklerin RFU (Rölatif Floresan Unit) değerlerinin ortalaması alınmış ve standart sapması hesaplanmıştır.

##### **4.4.5.2. Dinamik alan (Hassasiyet)**

Dinamik alan için; DNA miktarı bilinen kontrol DNA'sından (K562) 5 adet dilüsyon (0,063 ng/µl, 0,125 ng/µl, 0,25 ng/µl, 0,5 ng/µl, 1 ng/µl) hazırlanmıştır. PCR ürünleri ABI PRISM 310 Genetik Analizör Cihazı'nda yürütülerek her bir konsantrasyon için elde edilen pik yüksekliklerinin ortalaması alınmıştır. Her bir konsantrasyona karşı, her 4 yürütme için pik yüksekliklerinin ortalaması alınarak grafik çizilmiştir ve her iki multipleksin analiz edilebildiği dinamik alan belirlenmiştir (Grafik 1, 2).

##### **4.4.5.3. Duyarlılık**

Dinamik alan çalışmasında kullanılan PCR ürünlerine ait yürütmeler en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru incelenerek tam profil elde edilen en düşük iki konsantrasyona göre duyarlılık belirlenmiştir. İki konsantrasyonda tespit edilen her bir alelin pik yüksekliklerinin ortalaması alınmıştır ve konsantrasyona bağlı duyarlılık değeri belirlenmiştir.

#### **4.4.5.4. Stokastik eşik**

Duyarlılık sonucunda belirlenmiş olan, tam profili elde edilen örneklerde heterozigot lokuslarda alel pik yüksekliklerinin birbirine olan oranı ve standart sapması hesaplanmıştır. Pik yükseklikleri oranı için bir eşik değeri (stokastik eşik) elde edilmiştir.

#### **4.4.5.5. Tekrarlanabilirlik & tekrar üretilebilirlik**

Tekrarlanabilirlik için; 5 örnek aynı laboratuvar ve aynı cihazlarda, farklı zamanlarda farklı analistler tarafından çalışılmıştır. Tekrar üretilebilirlik için; 5 örnek farklı bir laboratuvar, farklı cihazlarda, farklı zamanlarda ve farklı analistler tarafından çalışılmıştır.

#### **4.4.6. 30 kişiye ait DNA örneğinde 22 X InDel Multipleks 1'in ve Multipleks 2'nin PCR'ı, elektroforezi ve tiplendirilmesi**

Asgari Bilgilendirmiş Gönüllü Olur Formu (Ek 1) okutularak çalışma için rızası alınmış 30 kişiden ağız içi sürüntü örnekleri alınmıştır. Alınan bu örneklerin 22 X InDel lokusunun iki multiplekste optimizasyon ve validasyon çalışmalarına uygun olarak PCR'ı yapılmıştır (Tablo II, III). PCR aşamasından sonra belirtilen elektroforez koşullarına uygun olarak (Tablo IV) Applied Biosystems 310 Genetik Analizör Cihazı'nda (Kapiller Elektroforez) yürütülerek analiz edildi ve tiplendirildi (Ek 2).

## 5. Bulgular

Bu tez çalışmasında multipleks InDel paneli oluşturmak üzere X kromozomu üzerinde bulunan 22 InDel lokusun (rs2307557, rs67705557, rs72434864, rs59400186, rs2307741, rs16367, rs2307762, rs16368, rs16632, rs16680, rs25581, rs16397, rs3048996, rs25582, rs11297248, rs199639085, rs2308280, rs71948836, rs3978254417, rs16460, rs62954660, rs67588758) 11 lokustan oluşan 2 multiplekste optimizasyon ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Validasyon çalışması başarıyla yapılan 22 X InDel'in popülasyon ile ilgili bir ön fikir elde etmek amacıyla, çalışmaya katılmaya rıza gösteren, sağlıklı ve aralarında akrabalık ilişkisi olmayan 30 kişide tiplendirme yapılmıştır (Ek-2).

### 5.1. Ağız İçi Sürüntü Örneklerinden DNA İzolasyonu ve DNA Miktarının Belirlenmesi

30 kişiden alınan ağız içi sürüntü örneklerinin DNA izolasyonu yapılarak DNA miktarları ölçülmüştür. DNA miktarları Tablo VI'da gösterilmiştir.

**Tablo VI:** Ağız içi sürüntü örneklerinden elde edilen DNA miktarları

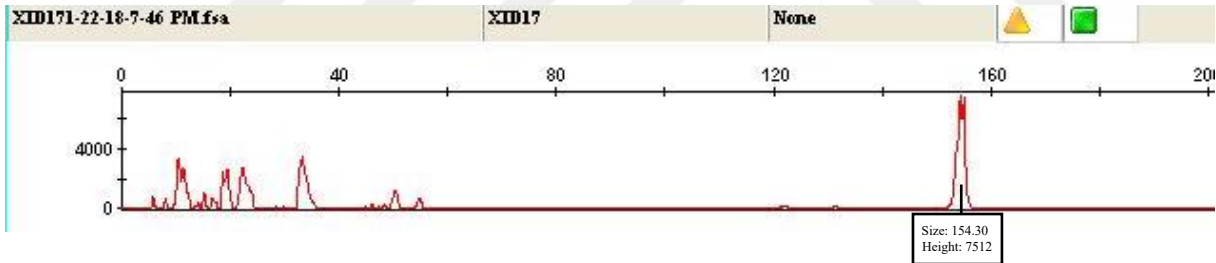
Sıra	DNA Örnek Kodu	DNA Miktarı
1	T-2017-XX-02	18,3 ng/ µl
2	T-2017-XX-09	1,12 ng/ µl
3	T-2018-XX-03	5,95 ng/ µl
4	T-2018-XX-155	7,7 ng/ µl
5	T-2018-XX-45	2,90 ng/ µl
6	T-2018-XX-56	1,01 ng/ µl
7	T-2018-XX-58	19,6 ng/ µl
8	T-2018-XX-59	4,30 ng/ µl
9	T-2018-XX-61	15,1 ng/ µl
10	T-2018-XX-62	3,55 ng/ µl
11	T-2018-XX-86	12,2 ng/ µl
12	T-2018-XX-87	1,24 ng/ µl
13	T-2018-XX-89	1,85 ng/ µl
14	T-2018-XX-90	4,06 ng/ µl
15	T-2018-XX-91	1,12 ng/ µl
16	T-2018-XY-01	1,09 ng/ µl
17	T-2018-XY-07	15,5 ng/ µl
18	T-2018-XY-08	5,90 ng/ µl
19	T-2018-XY-41	11,9 ng/ µl
20	T-2018-XY-43	2,96 ng/ µl
21	T-2018-XY-44	7,97 ng/ µl



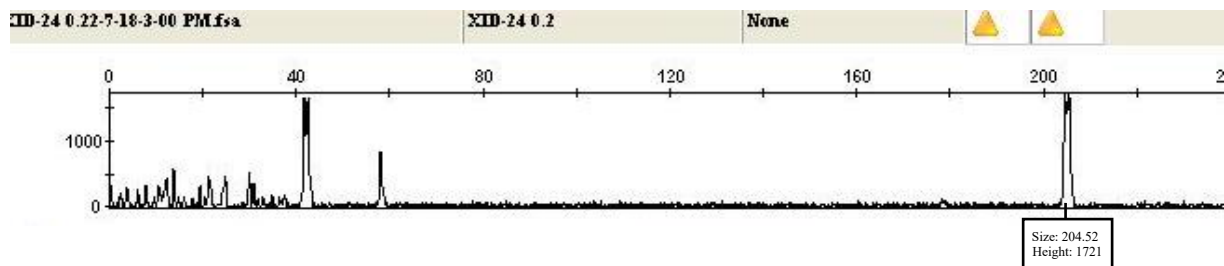
22	T-2018-XY-47	10,3 ng/ µl
23	T-2018-XY-49	23,5 ng/ µl
24	T-2018-XY-50	25,7 ng/ µl
25	T-2018-XY-51	16,7 ng/ µl
26	T-2018-XY-54	19,3 ng/ µl
27	T-2018-XY-60	0,503 ng/ µl
28	T-2018-XY-65	3 ng/ µl
29	T-2018-XY-77	45,3 ng/ µl
30	T-2018-XY-78	8,12 ng/ µl

### 5.2. 22 X InDel Lokusunda Her Bir Lokusun Ayrı Ayrı PCR Optimizasyonu ve Analizi

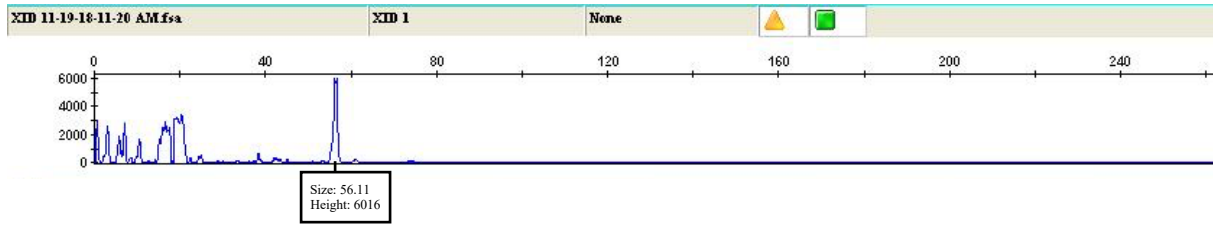
Her bir InDel lokusu ilk olarak singlepleks olarak ayrı ayrı çalışılmıştır. 22 X InDel lokusunun tek tek PCR'sinde, primer konsantrasyonları 0,2 ve 2 pmol olarak yapılmıştır. 2 pmol konsantrasyonda pikler çok yüksek olduğundan çalışmaya 0,2 pmol primer konsantrasyonunda devam edilmiştir (Şekil 8,9). Ayrı ayrı analiz edilen 22 lokusun elektroforegramları Şekil 10-31'de verilmiştir.



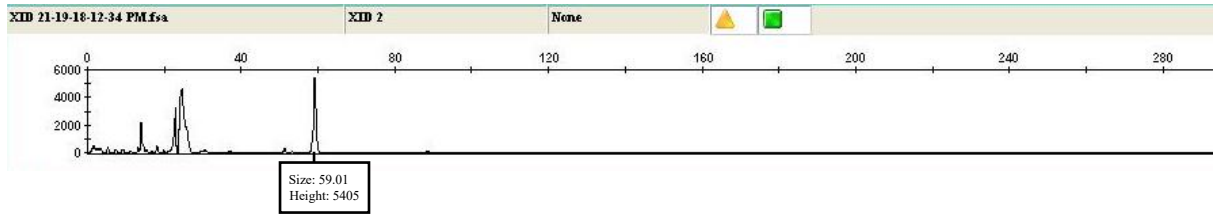
Şekil 8: 2 pmol primer konsantrasyonunda yapılan singleplekse ait elektroforegram



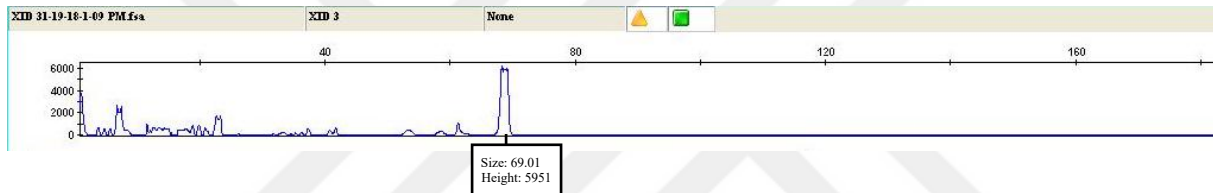
Şekil 9: 0,2 pmol primer konsantrasyonunda yapılan singleplekse ait elektroforegram



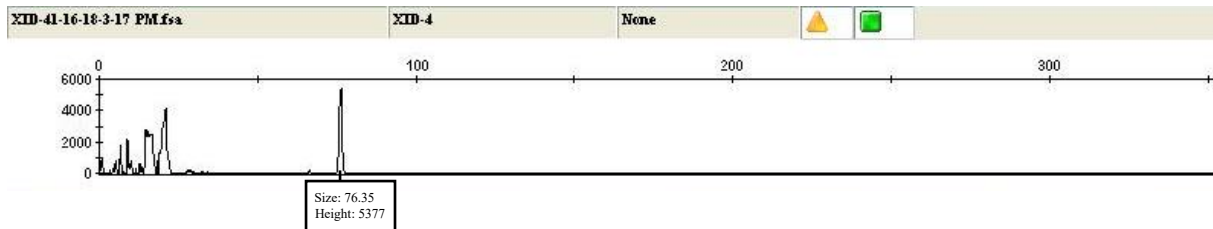
Şekil 10: rs2307557 lokusuna ait elektroforegram



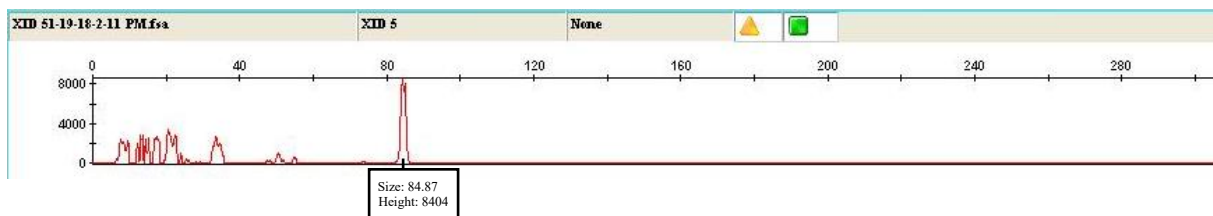
Şekil 11: rs67705557 lokusuna ait elektroforegram



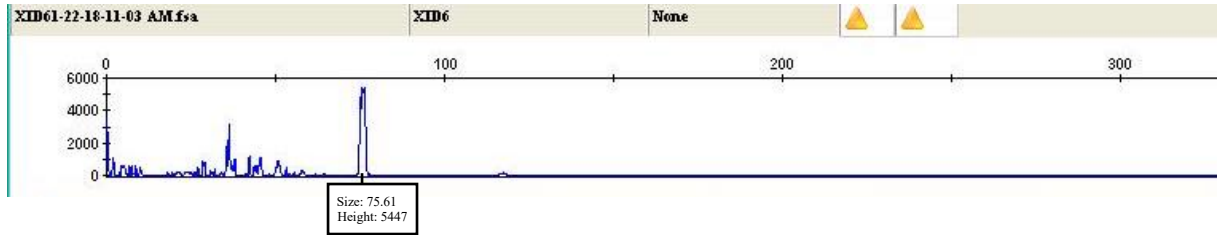
Şekil 12: rs72434864 lokusuna ait elektroforegram



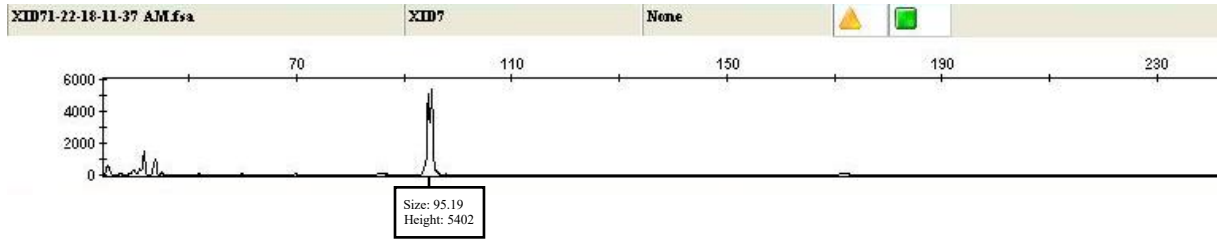
Şekil 13: rs59400186 lokusuna ait elektroforegram



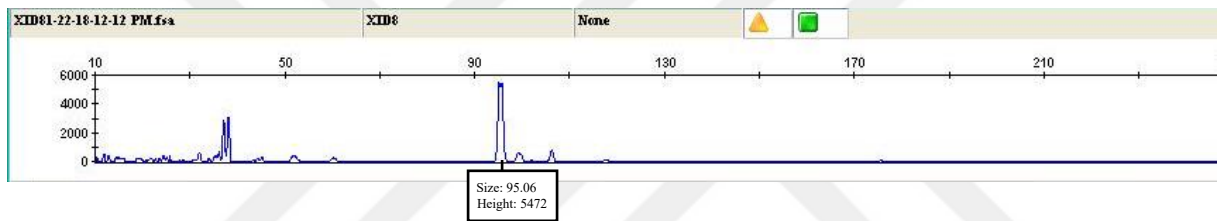
Şekil 14: rs2307741 lokusuna ait elektroforegram



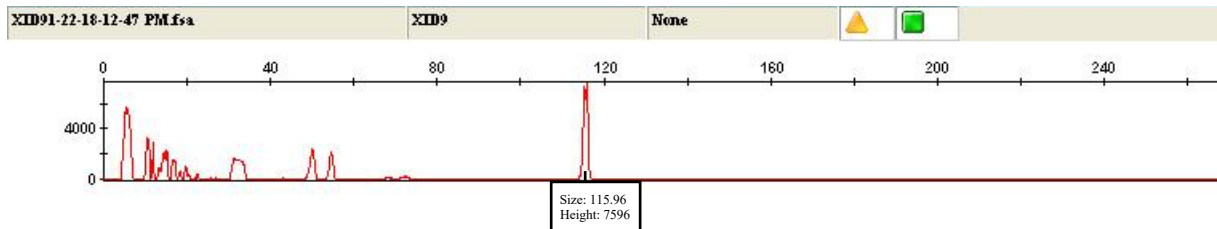
Şekil 15: rs16367 lokusuna ait elektroforegram



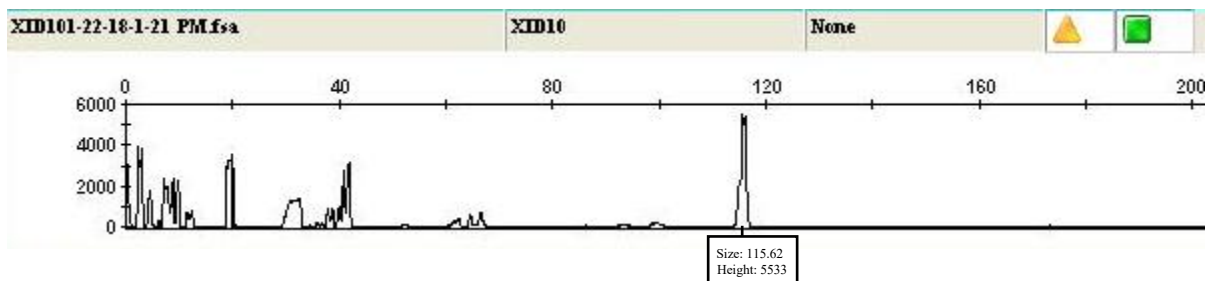
Şekil 16: rs2307762 lokusuna ait elektroforegram



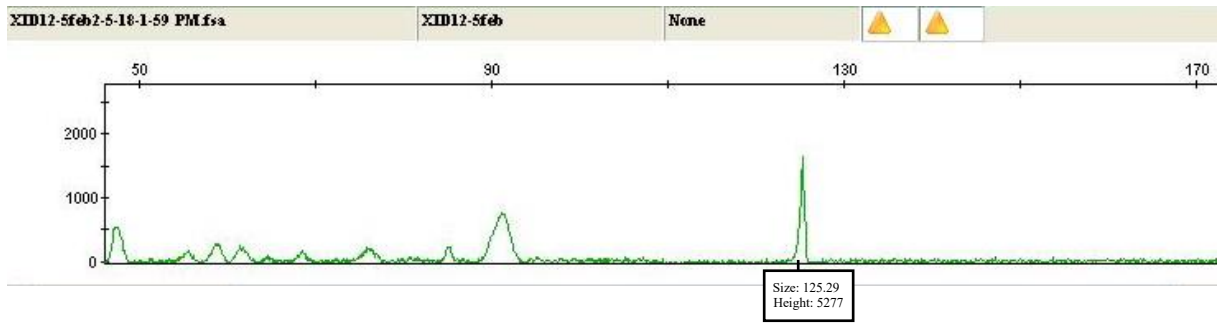
Şekil 17: rs16368 lokusuna ait elektroforegram



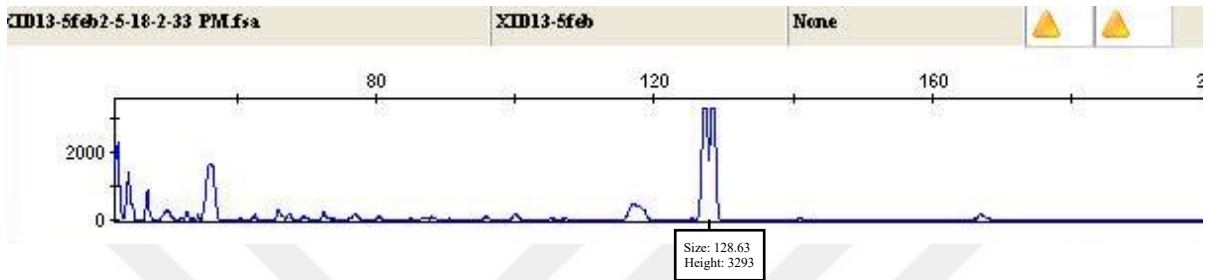
Şekil 18: rs16632 lokusuna ait elektroforegram



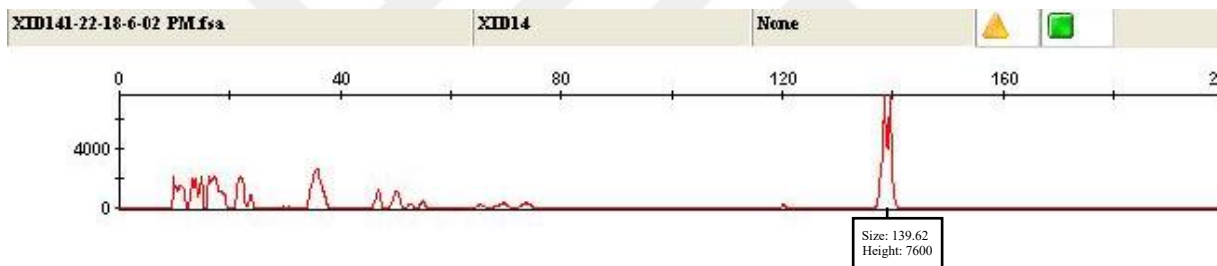
Şekil 19: rs16680 lokusuna ait elektroforegram



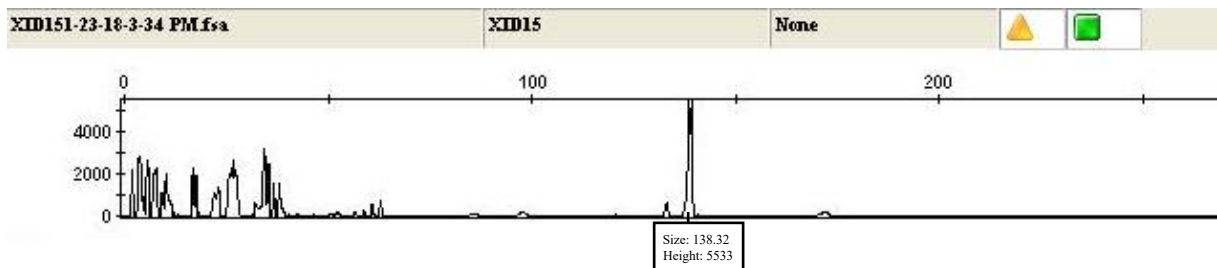
Şekil 20: rs25581 lokusuna ait elektroforegram



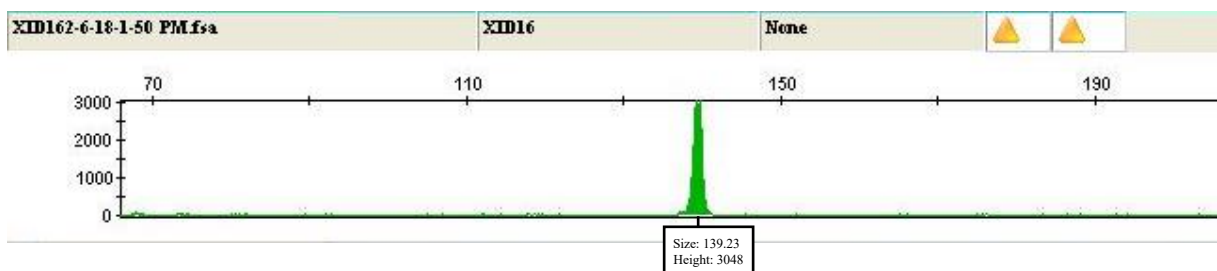
Şekil 21: rs16397 lokusuna ait elektroforegram



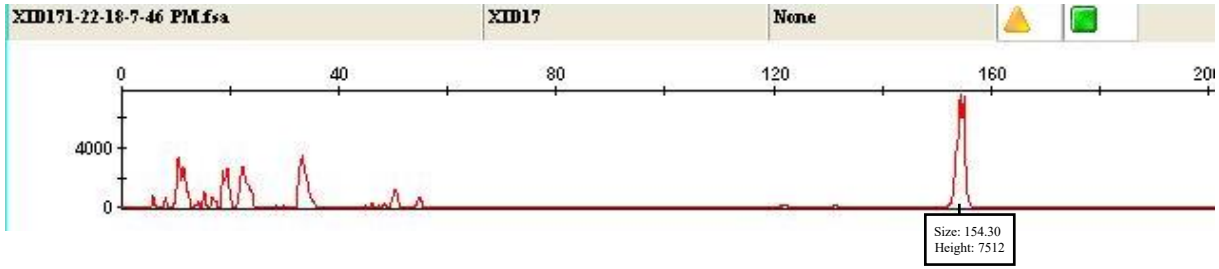
Şekil 22: rs3048996 lokusuna ait elektroforegram



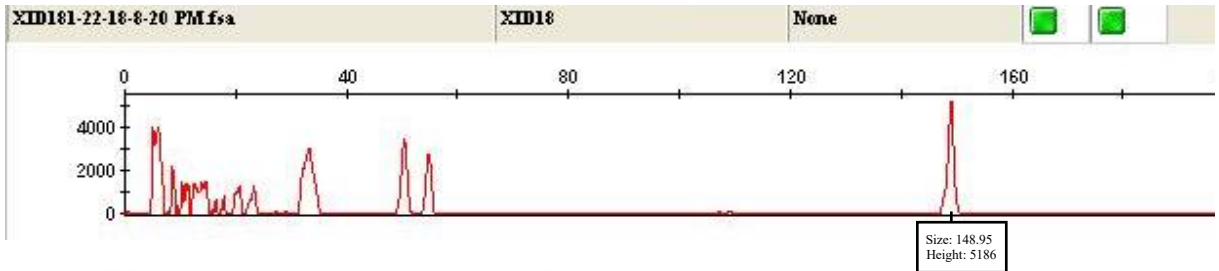
Şekil 23: rs25582 lokusuna ait elektroforegram



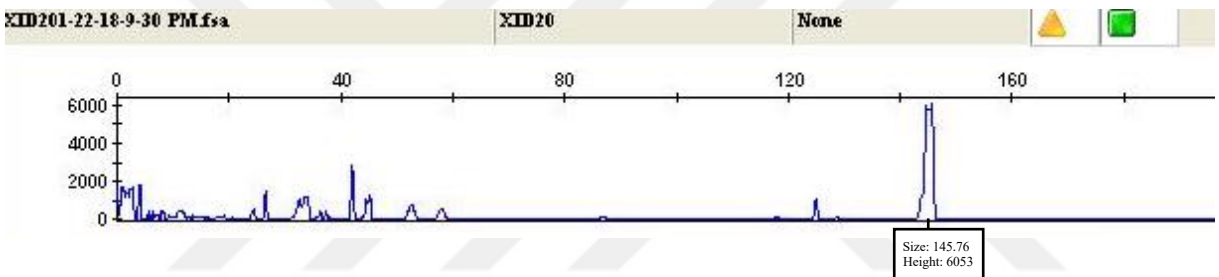
Şekil 24: rs11297248 lokusuna ait elektroforegram



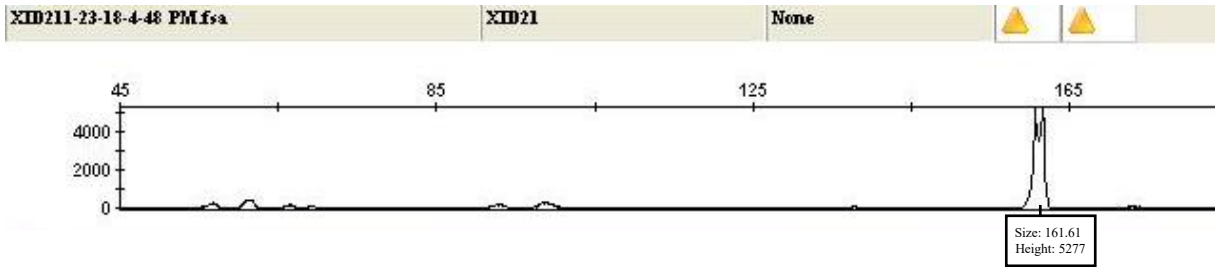
Şekil 25: rs199639085 lokusuna ait elektroforegram



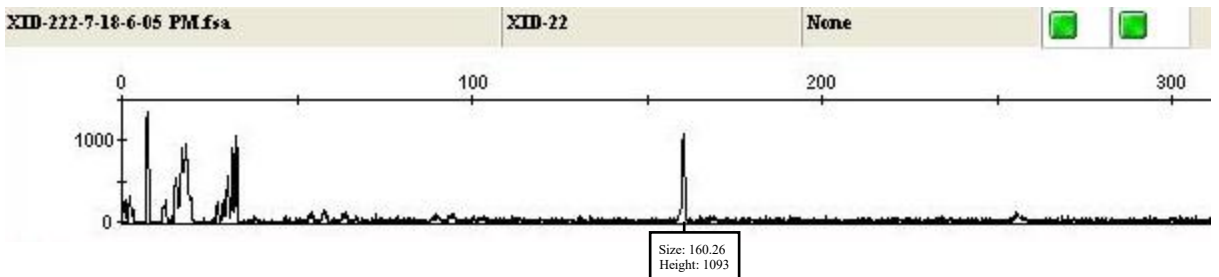
Şekil 26: rs2308280 lokusuna ait elektroforegram



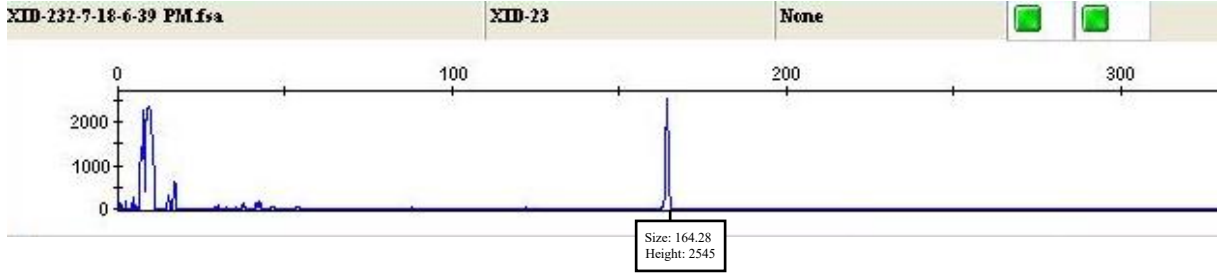
Şekil 27: rs71948836 lokusuna ait elektroforegram



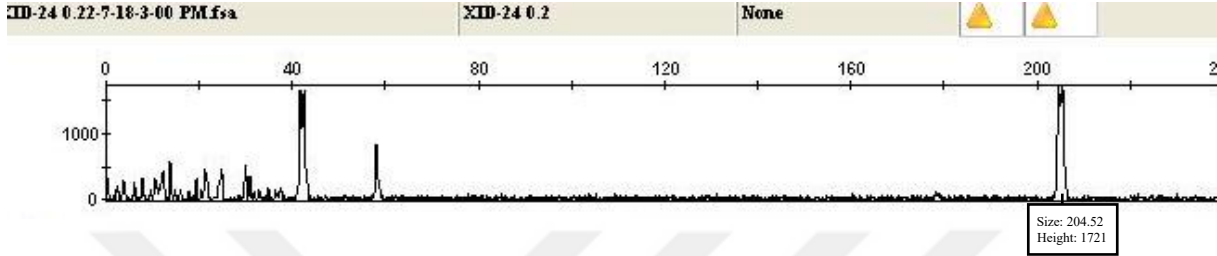
Şekil 28: rs3978254417 lokusuna ait elektroforegram



Şekil 29: rs16460 lokusuna ait elektroforegram



Şekil 30: rs62954660 lokusuna ait elektroforegram



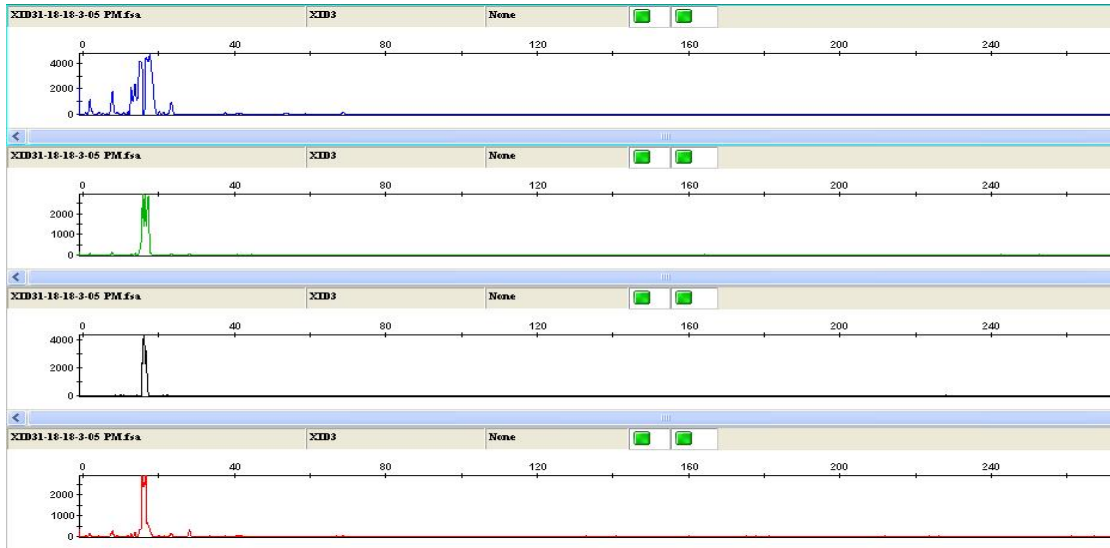
Şekil 31: rs67588758 lokusuna ait elektroforegram

### 5.2.1. PCR bileşenlerinin miktarları ve PCR protokolünün belirlenmesi

Her bir lokus ayrı ayrı çalışıldıktan sonra multipleks olarak 22 lokus bir arada çalışılmıştır. İlk PCR denemelerinde PCR, 20 ve 25 döngü olarak yapıldığında amplifikasyon başarısız olmuştur (Şekil 32,33). Bundan dolayı PCR döngü sayısı 30'a çıkarılmıştır.



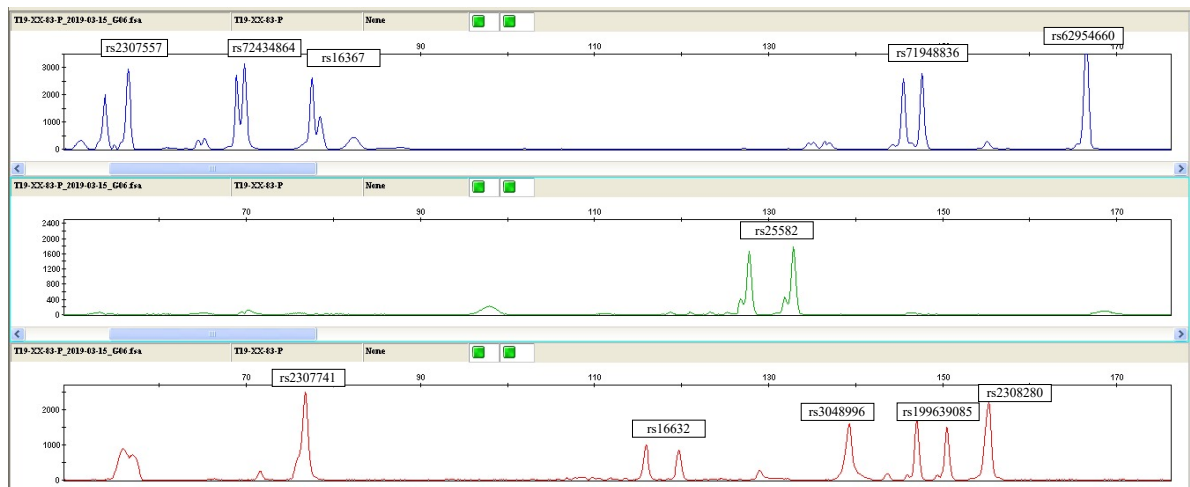
Şekil 32: 22 X InDel PCR denemelerinde, 20 döngü ile yapılan PCR'ye ait elektroforegram



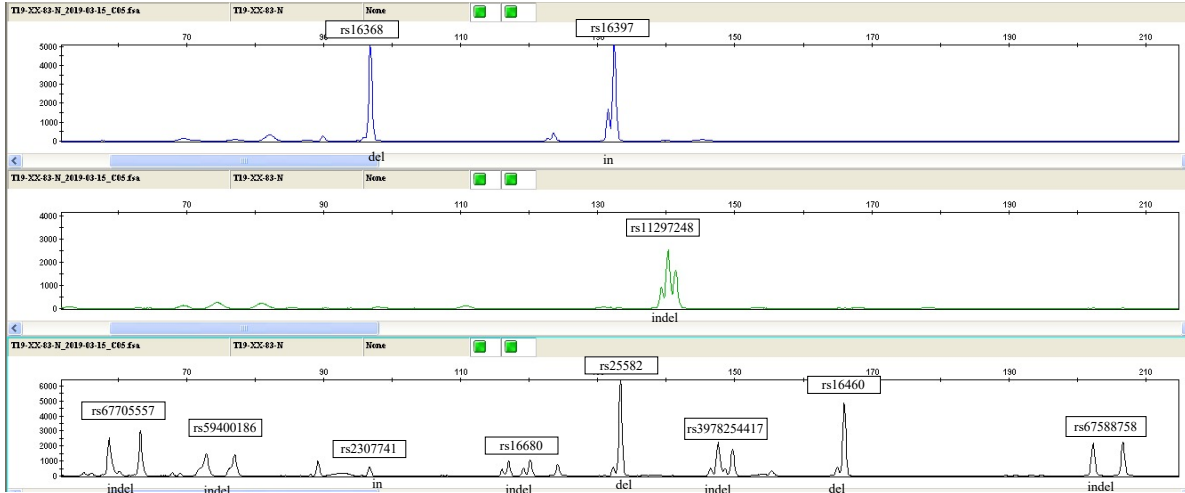
Şekil 33: 22 X InDel PCR denemelerinde, 25 döngü ile yapılan PCR'ye ait elektroforegram

### 5.2.2. 22 X InDel panelinin primer konsantrasyonlarının belirlenmesi

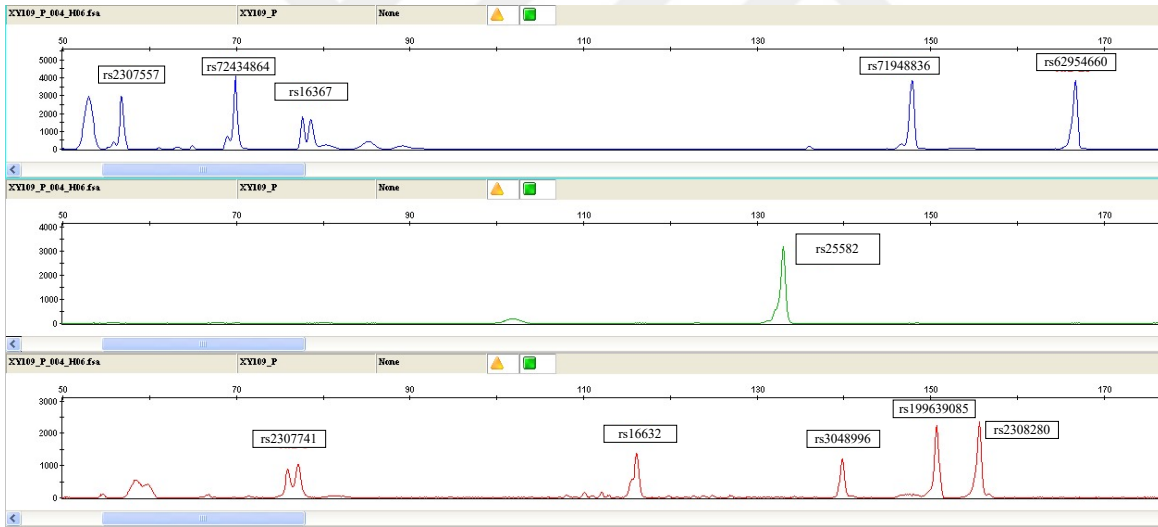
22-X InDel lokusunun iki ayrı multipleksinde aynı oranda ve eşit hacimde primer konsantrasyonu kullanılmasına rağmen alelik kayıplar ve piklerde dengesizlikler gözlemlenmiştir. Multipleks oluşturulurken primer konsantrasyonları elektroforegramdaki pik yüksekliklerine ve alel kayıplarına göre yeniden ayarlanarak her bir parametre için yeniden düzenleme yapılmıştır. Son olarak 11 lokuslu 2 multiplekste primer konsantrasyonları 0,2 – 5 pmol olarak düzenlenmiştir (Şekil 34-37).



Şekil 34: 11-X InDel Multipleks 1 için kadın DNA'sına ait elektroforegram

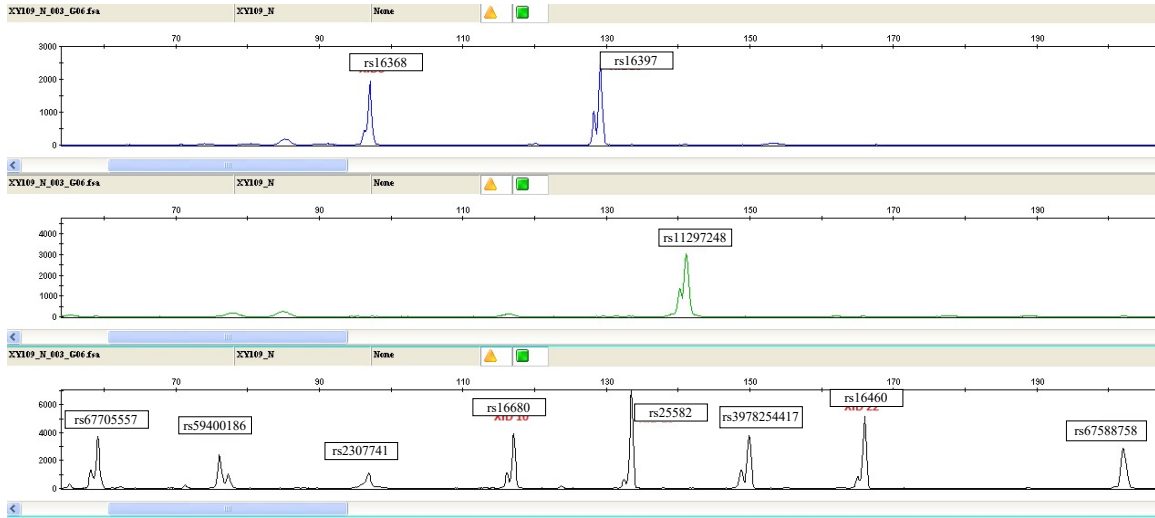


Şekil 35: 11-X InDel Multipleks 2 için kadın DNA'sına ait elektroforegram



Şekil 36: 11-X InDel Multipleks 1 için erkek DNA'sına ait elektroforegram





Şekil 37: 11-X InDel Multipleks 2 için erkek DNA'sına ait elektroforegram

### 5.3. 22 X InDel Lokusunun 2 Multipleks Olarak Validasyonu

22 X InDel lokusunun Multipleks 1 ve Multipleks 2 panelinin validasyonu için; analiz eşiği, dinamik alan, duyarlılık, stokastik eşik, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik parametreleri uygulanmıştır.

#### 5.3.1. Analiz eşiği

Analiz eşiğini belirlemek için çalışılan 10 negatif kontrol örneğinde Multipleks 1 için analiz eşik değeri 103,11 RFU; Multipleks 2 için analiz eşik değeri 94,56 RFU olarak belirlenmiştir (Tablo VII).

Tablo VII: X- InDel Multipleks 1 ve Multipleks 2 için analiz eşik değerleri

Multipleks 1			
Negatif kontrol çalışmasından elde edilen pik yükseklikleri (RFU)	Pik Yüksekliklerinin Ortalaması	Elde Edilen Pik Yüksekliklerinin Standart Sapması (EBPYS)	Analiz Eşiği (LOD) (RFU)
80	118	34,37	103,11
144			
98			
150			
Multipleks 2			
Negatif kontrol çalışmasından elde edilen pik	Pik Yüksekliklerinin Ortalaması	Elde Edilen Pik Yüksekliklerinin	Analiz Eşiği (LOD) (RFU)

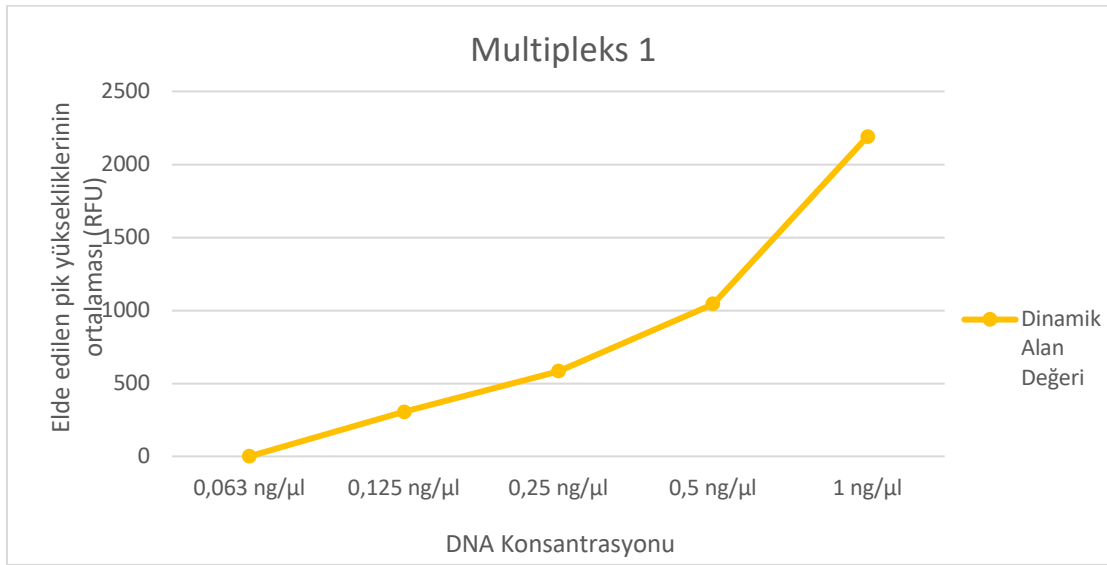
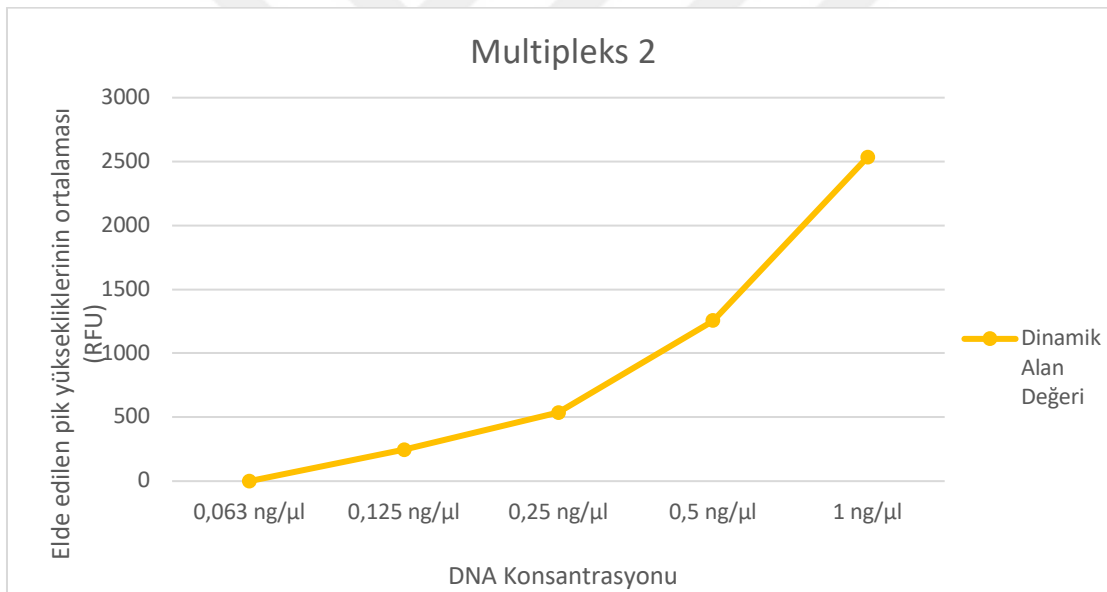
yükseklikleri (RFU)		Standart Sapması (EBPYS)	
90	111,25	31,52	94,56
81			
125			
149			

### 5.3.2. Dinamik alan

DNA miktarı bilinen pozitif kontrol örneğinden (K562) 5 adet dilüsyonla (0,063 ng/μl, 0,125 ng/μl, 0,25 ng/μl, 0,5 ng/μl, 1 ng/μl) 11 lokuslu her iki multiplekse ait yapılan analiz sonucunda elde edilen pik yüksekliklerinin ortalaması Tablo VIII'de verilmiştir. Her iki multipleksin analiz edilebildiği dinamik alan değeri Grafik 1 ve Grafik 2'de verilmiştir.

**Tablo VIII:** 5 DNA konsantrasyonuna ait pik yüksekliklerinin ortalaması

<b>Multipleks 1</b>	
<b>DNA Konsantrasyonu</b>	<b>Elde Edilen Pik Yüksekliklerinin Ortalaması (RFU)</b>
1 ng/μl	2190
0,5 ng/μl	1043
0,25 ng/μl	582
0,125 ng/μl	304
0,063 ng/μl	Analiz eşiği altında
<b>Multipleks 2</b>	
<b>DNA Konsantrasyonu</b>	<b>Elde Edilen Pik Yüksekliklerinin Ortalaması (RFU)</b>
1 ng/μl	2533
0,5 ng/μl	1255
0,25 ng/μl	536
0,125 ng/μl	244
0,063 ng/μl	Analiz eşiği altında

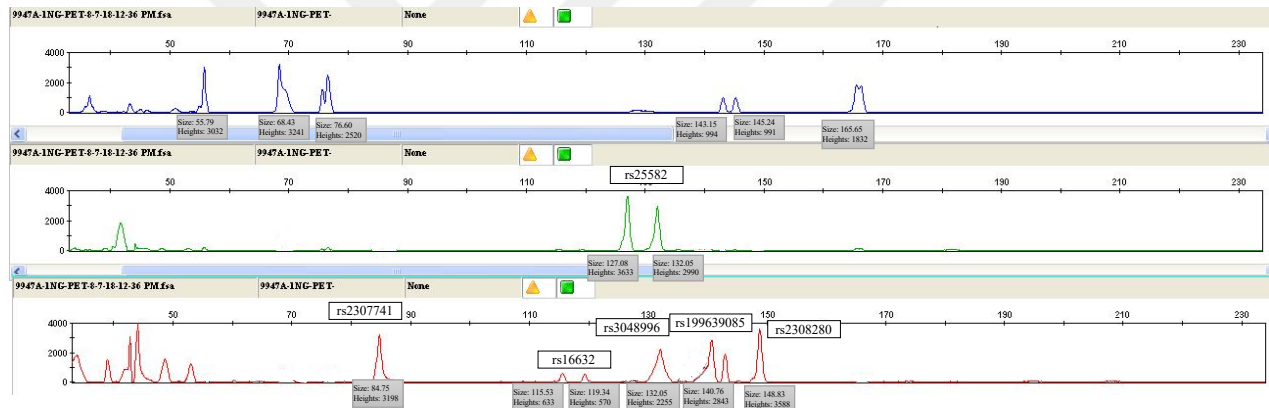
**Grafik 1:** Multipleks 1'e ait elde edilen pik yüksekliklerinin ortalamasına bağlı dinamik alan**Grafik 2:** Multipleks 2'ye ait elde edilen pik yüksekliklerinin ortalamasına bağlı dinamik alan

### 5.3.3. Duyarlılık (Limit Of Quantitation-LOQ)

Dinamik alan çalışmasında kullanılan 5 dilüsyondan (0,063 ng/μl, 0,125 ng/μl, 0,25 ng/μl, 0,5 ng/μl, 1 ng/μl) yapılan analizde tam profil elde edilmiş olan en düşük konsantrasyon belirlenmiştir. Multipleks 1 ve Multipleks 2 panellerinde tam profil elde edilebilen en düşük DNA konsantrasyonunun 0,5 ng/μl olduğu tespit edilmiştir (Tablo IX).

**Tablo IX:** Multipleks 1 ve Multipleks 2 için hassasiyet/duyarlılık değerlendirmesi

Multipleks 1			
DNA Konsantrasyonu	Duyarlılık Değeri (LOQ) (RFU)	Analiz Eşiği Değeri (LOD) (RFU)	Belirlenen Duyarlılık (LOQ)
1 ng/ µl	926,07	103,11	0,5 ng/ µl
0,5 ng/ µl	313,67		
Multipleks 2			
DNA Konsantrasyonu	Duyarlılık Değeri (LOQ) (RFU)	Analiz Eşiği Değeri (LOD) (RFU)	Belirlenen Duyarlılık (LOQ)
1 ng/ µl	117,64	94,56	0,5 ng/ µl
0,5 ng/ µl	527,88		

**Şekil 38:** 1 ng/µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 1'e ait elektroforegram

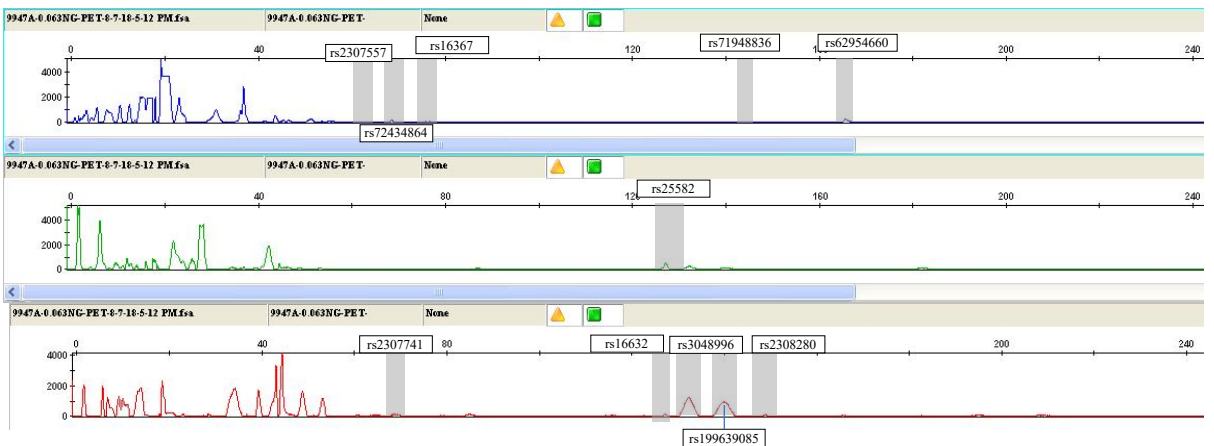
Şekil 39: 0,5 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 1' ait elektroforegram



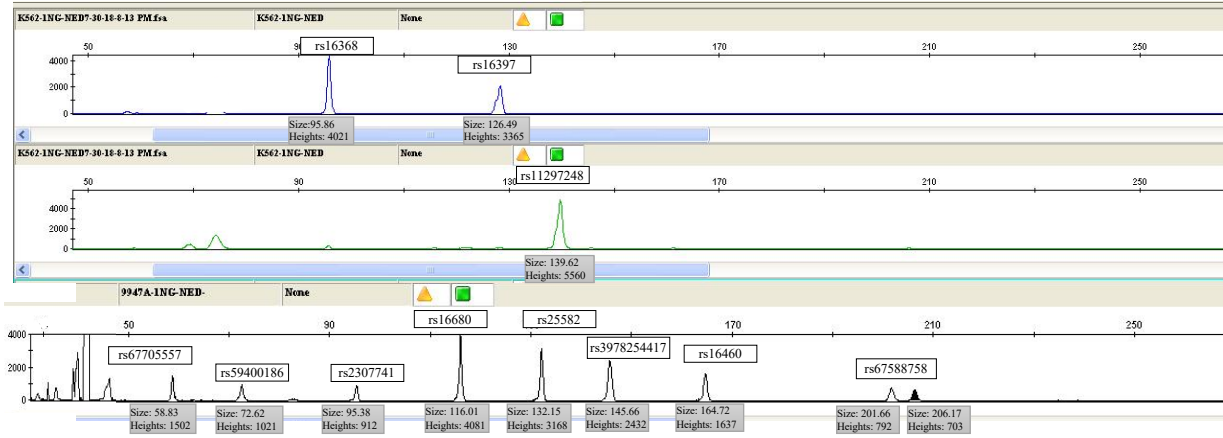
Şekil 40: 0,25 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 1'e ait elektroforegram



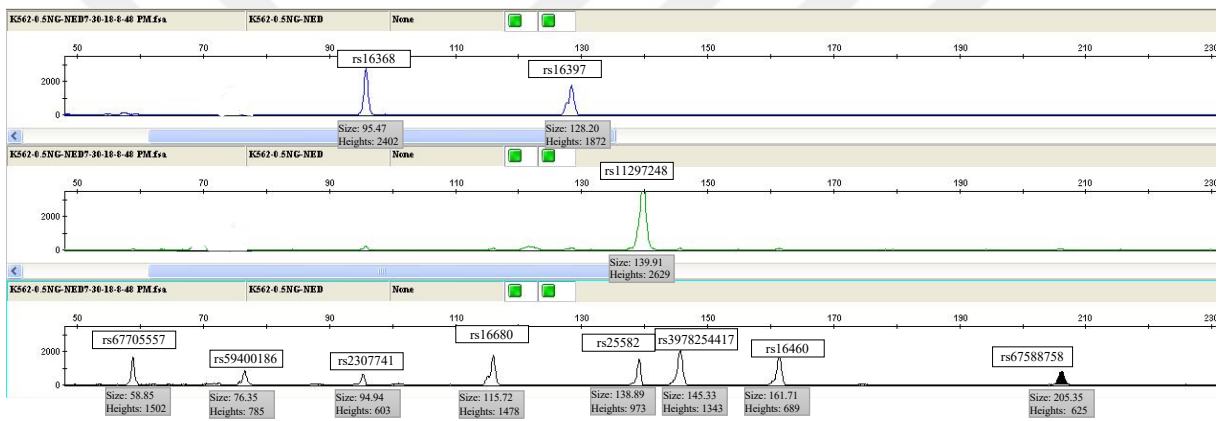
Şekil 41: 0,125 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 1'e ait elektroforegram



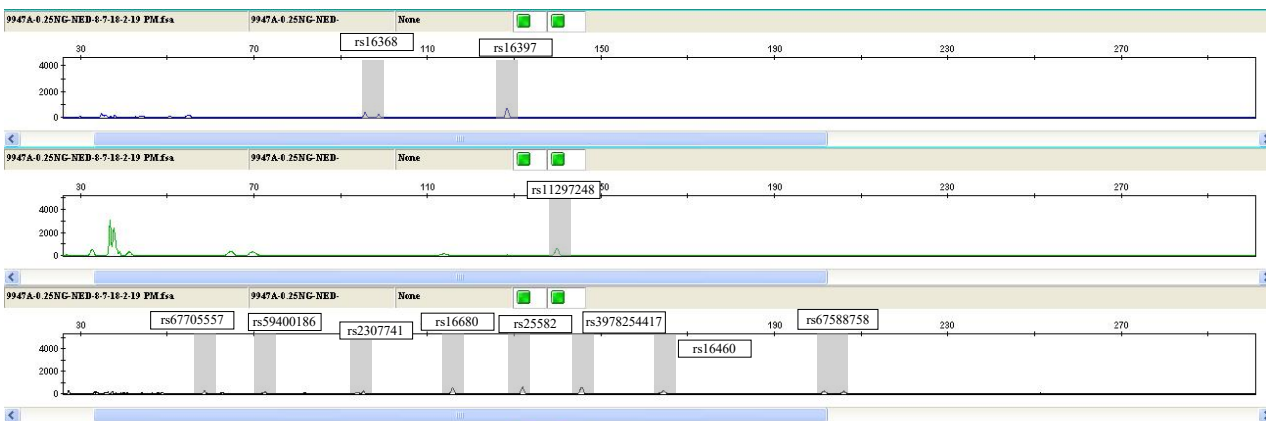
Şekil 42: 0,063 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 1'e ait elektroforegram



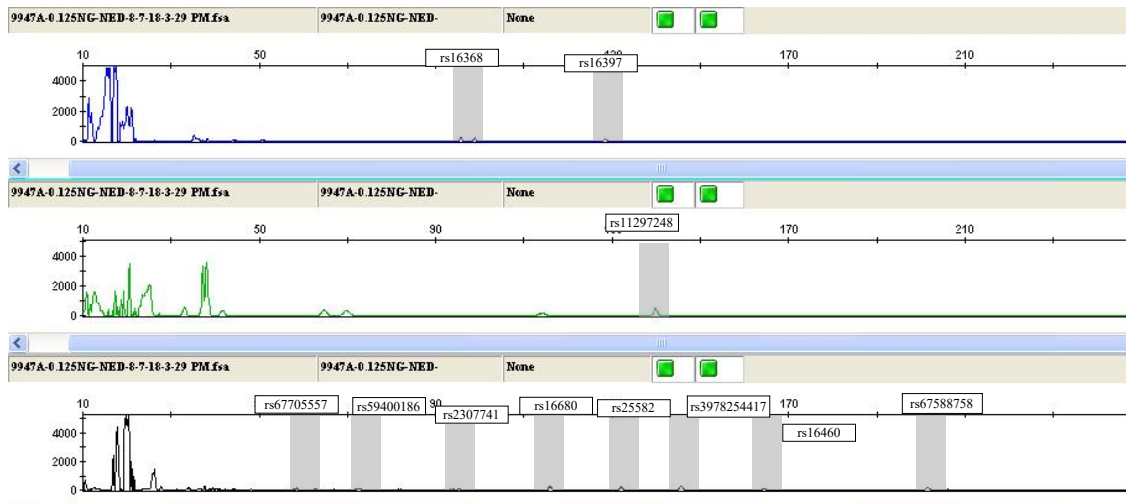
Şekil 43: 1 ng/  $\mu$ l DNA konsantrasyonunda Multipleks 2'ye ait elektroforegram



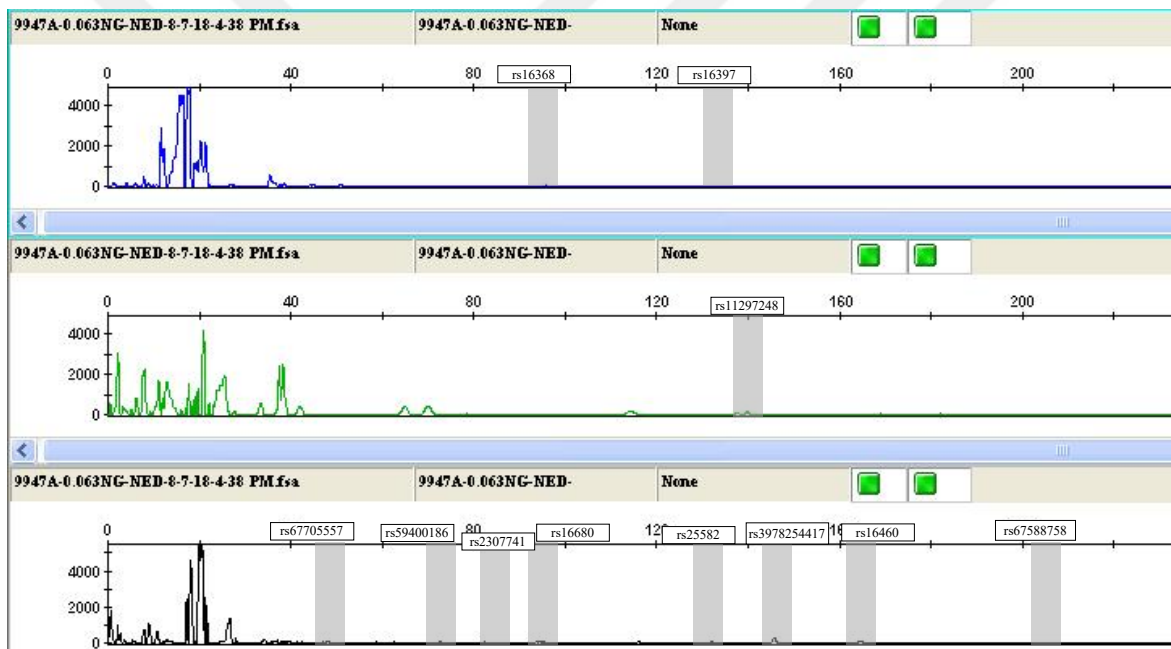
Şekil 44: 0,5 ng/  $\mu$ l DNA konsantrasyonunda Multipleks 2'ye ait elektroforegram



Şekil 45: 0,25 ng/  $\mu$ l DNA konsantrasyonunda Multipleks 2'ye ait elektroforegram



Şekil 46: 0,125 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 2'ye ait elektroforegram



Şekil 47: 0,063 ng/ µl DNA konsantrasyonunda Multipleks 2'ye ait elektroforegram

#### 5.3.4. Stokastik eşik

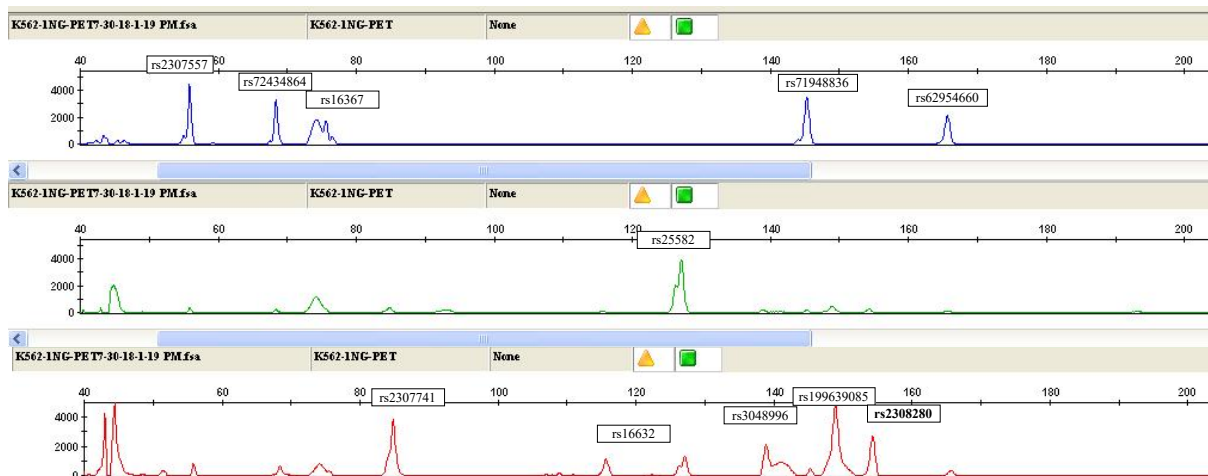
Tam profil elde edilen DNA örneklerinde heterozigot lokuslarda Multipleks 1 ve Multipleks 2 için belirlenen stokastik eşik değerleri Tablo X'da verilmiştir.

**Tablo X:** Multipleks 1 ve Multipleks 2'ye ait stokastik eşik değeri

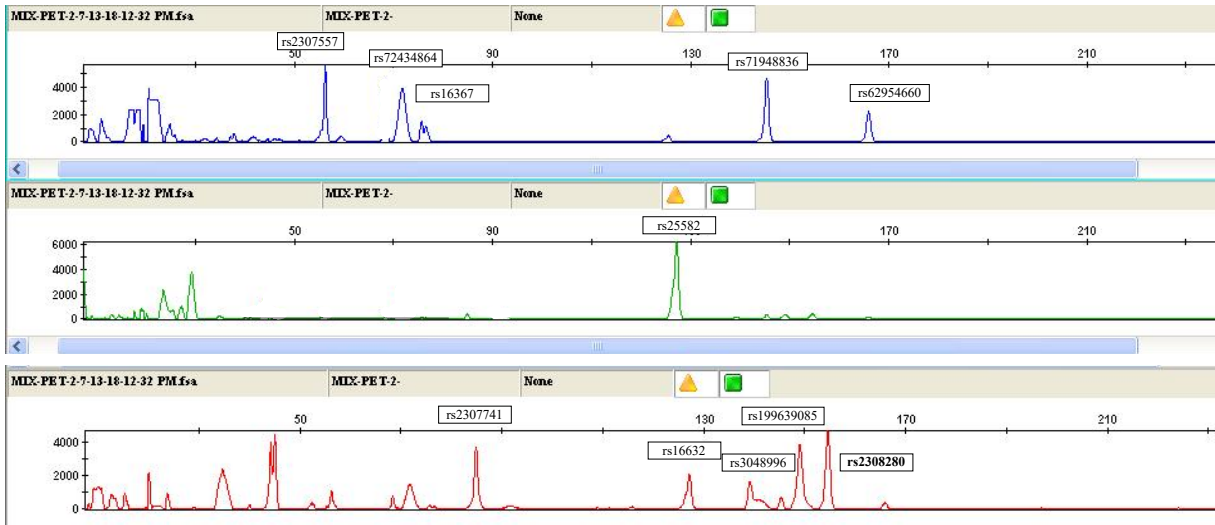
Multipleks 1			
DNA Konsantrasyonu	Kardeş Alel Pik Yüksekliklerinin Oranlarının (%) Ortalaması	Kardeş Alel Pik Yüksekliklerinin Oranlarının Standart Sapması	Stokastik Eşik Değeri
1 ng/µl	90,40	10,91	57,67
0,5 ng/µl	86	9,97	56,09
Multipleks 2			
DNA Konsantrasyonu	Kardeş Alel Pik Yüksekliklerinin Oranlarının (%) Ortalaması	Kardeş Alel Pik Yüksekliklerinin Oranlarının Standart Sapması	Stokastik Eşik Değeri
1 ng/µl	88,76	10,19	58,19
0,5 ng/µl	83,68	13,51	43,15

### 5.3.5. Tekrarlanabilirlik & tekrar üretilebilirlik

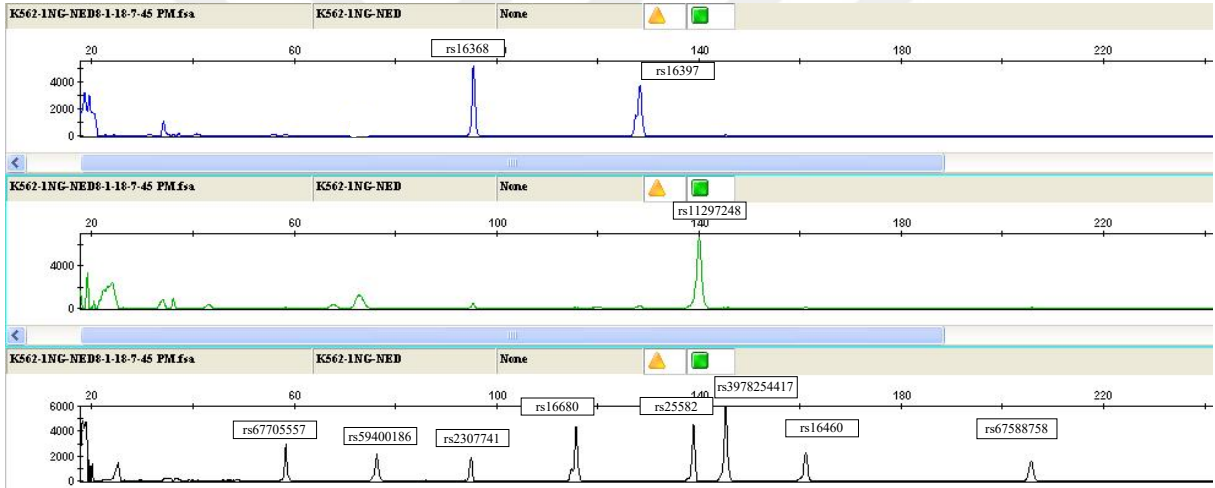
Tekrarlanabilirlik çalışması için, analizi yapılmış ve genotipleri belirlenmiş olan 5 örnek aynı laboratuvarında ve aynı cihazlarda farklı zaman dilimlerinde farklı analistler tarafından çalışıldı. Her iki çalışmanın analizi sonucunda aynı genotipler elde edilmiştir (Şekil 48-51).

**Şekil 48:** 1.analist için Multipleks 1'e ait elektroforegram

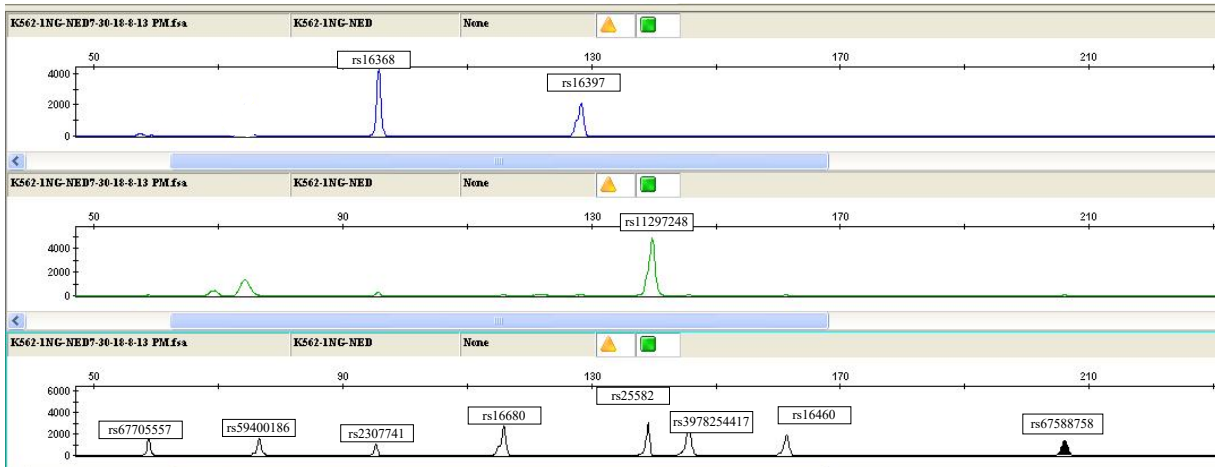




Şekil 49: 2. analistin için Multipleks 1'e ait elektroforegram

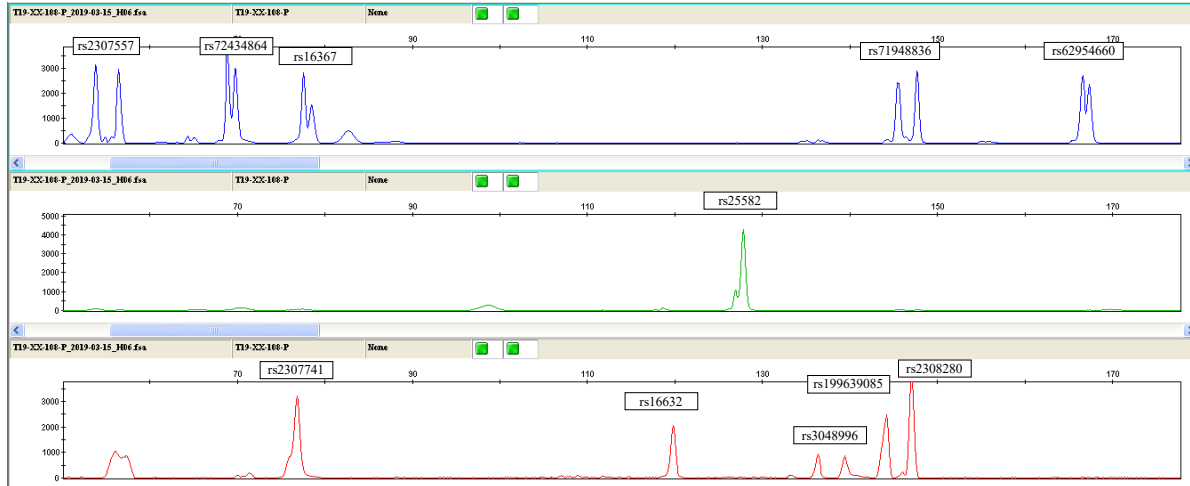


Şekil 50: 1. analist için Multipleks 2'ye ait elektroforegram

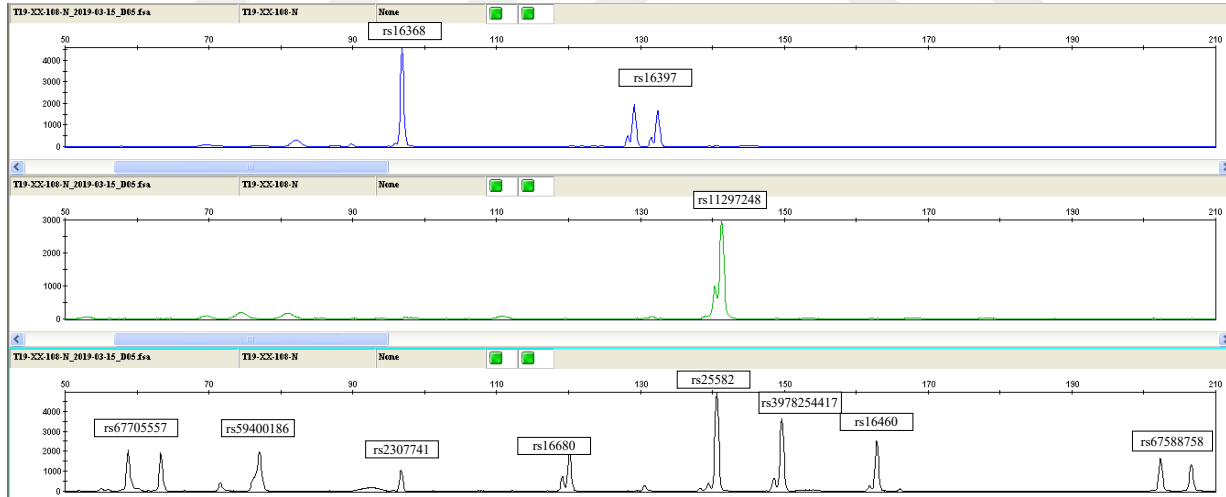


Şekil 51: 2. analist için Multipleks 2'ye ait elektroforegram

Tekrar üretilebilirlik çalışması için, analizi yapılmış ve genotipleri belirlenmiş olan 5 örnek farklı bir laboratuvarda ve farklı cihazlarda, farklı zaman dilimlerinde farklı analistler tarafından çalışılmıştır. Farklı cihazlarda ve farklı bir laboratuvarda çalışılmış olan örneklerin analizinde aynı genotipler elde edilmiştir (Şekil 52, 53).



Şekil 52: Farklı laboratuvar ve farklı cihazlarda elde edilen Multipleks 1'e ait elektroforegram



Şekil 53: Farklı laboratuvar ve farklı cihazlarda elde edilen Multipleks 2'ye ait elektroforegram

## 6. Tartışma ve Sonuç

Adli kimliklendirmede, son yirmi senedir STR lokusları kullanılmaktadır. Olay yerinden gelen örneklerin çoğunlukla degrede olması, eser miktarda bulunması gibi sorunlarla karşılaşılabilir. STR sistemleri rutinde en fazla kullanılan polimorfik sistemlerden biri olmasına rağmen yüksek derecede bozunmuş (degrede olmuş) örneklerde başarı oranı düşüktür. Bu sebeplerden ötürü STR sistemlerine alternatif olabilecek yeni polimorfik sistemler arayışına gidilmiştir. STR sistemlerine göre DNA üzerinde daha az yer kaplayan yani daha küçük ampikon büyüklüklerine sahip olan sistemler tercih edilmektedir. Bu durumda SNP'ler ve InDel'lerden yararlanılabilir. InDel'ler, SNP'lere göre daha az maliyetle, daha kısa sürede ve daha kolay analiz edilebilirler. InDel'lerin 60-200 bp uzunluğunda olmalarından dolayı degrede örneklerde başarılı DNA profili elde etme potansiyeli de diğer sistemlere göre yüksektir.

Weber ve arkadaşlarının (1) 2002 yılında 2000 InDel lokusunu tiplendirmesi ile, InDel polimorfizmi adli bilimlerde kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada X kromozomu üzerinde bulunan 22-X InDel lokusundan oluşan bir multipleks set oluşturulması ve bu panelin optimizasyon ve validasyon çalışmasının yapılması hedeflenmiştir.

### ***22 -X InDel lokuslarının seçimi ve multipleks dizaynı***

Çalışmada X kromozomuna özgü olan 22-X InDel lokusunun bir multipleks panel geliştirmek amacıyla primer seçimi ve multipleks dizaynı yapılmıştır. Konuyla ilgili literatürde çalışılan InDel lokusları araştırılmıştır. InDel lokusları Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) veri tabanından yararlanılarak seçilmiştir. Seçilen 22 X InDel lokusundaki 9 X InDel lokusu Ünsal T. ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları panel geliştirme çalışmalarından (71) heterozigotluk oranı ve ayırım gücü yüksek olan lokuslardan seçilmiştir. 13 X InDel lokusu ise literatürde çalışılan X InDel lokusları dışında kalan, özgün

lokuslardır. Çalışmada kullanılan X InDel lokuslarının bir arada bir multipleks kit olarak bulunup bulunmadığını araştırmak için literatür taraması yapılmıştır. InDel'lerle geliştirdiğimiz bu panel, literatürde bulunan InDel bölgelerinden farklı gen bölgelerini içermektedir.

### ***22 InDel lokusunun tek tek ve 2 multipleks olarak optimizasyonu***

Çalışmanın bu aşamasında dizayn edilen InDel lokusları tek tek PCR ile amplifiye edilmiş ve elektroforetik analizi yapılmıştır. 22 X InDel lokusunun PCR optimizasyonu çalışmasında; primer konsantrasyonları ayrı ayrı 2 pmol – 0,2 pmol olarak denenmiştir. Ancak 2 pmol konsantrasyonda piklerin çok yüksek ve dengesiz görülmesi nedeniyle primer konsantrasyonu tek tek PCR çalışmalarında 0,2 pmol olarak belirlenmiştir. PCR protokolü primerlerin Tm sıcaklıklarına göre belirlenmiştir. PCR döngü koşulları ilk denemelerde 20 döngü ve 25 döngü ile yapılmıştır. Ancak PCR de çoğalma olmadığından (Şekil 32,33) Rui ve arkadaşlarının 2011'deki InDel panel geliştirme çalışmalarında kullandıkları PCR koşullarından yararlanılmıştır (Tablo III). Çalışmada tüm InDel lokuslarının ayrı ayrı tiplendirilmesi başarıyla yapılmıştır (Şekil 10-31).

Multipleks çalışmasında öncelikle tekli lokus PCR'sinde kullanılan 0,2 pmol primer konsantrasyonu kullanılmıştır. Ancak bazı lokuslarda alel düşmesi gözlemlenmiştir. Lokuslar arası alel pik yüksekliklerini dengelemek için multipleksin her karışımına bir lokusa ait primer eklenerek oluşturuldu. Çeşitli konsantrasyonlarda yapılan denemeler sonucunda, her bir parametre için yeniden düzenleme yapılarak PCR tekrarlanmıştır. Alel pik yüksekliklerinin dengeli elde edilebildiği en iyi primer konsantrasyonları 0,2 -5 pmol olarak düzenlenmiştir (Tablo V). Buna bağlı olarak PCR koşulları multipleks çalışmaya uygulanabilir hale getirilerek 22 InDel lokusu iki multipleks (Multipleks 1 ve Multipleks 2) şeklinde optimize edilmiştir (Şekil 32-37).

## ***22 InDel lokusunun validasyon basamakları***

22 InDel lokusunun iki multiplekste optimizasyonu sonrasında, multipleks panelinin validasyonu için analiz eşiği, dinamik alan (hassasiyet), duyarlılık, stokastik eşik, tekrarlanabilirlik & tekrar üretilebilirlik parametreleri uygulanmıştır.

Analiz eşiği çalışmasında, analiz eşiği Multipleks 1 için 103,11 RFU; Multipleks 2 için 94,56 RFU olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla belirlenen analiz eşiği değerlerinin üzerindeki pikler alel olarak kabul edilmiştir.

Dinamik alan ve duyarlılık basamağında DNA miktarı bilinen 2 pozitif kontrol örneğinden (K562 (Promega)) (9947A (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific)) 0,063 ng/μl, 0,125 ng/μl, 0,25 ng/μl, 0,5 ng/μl, 1 ng/μl olmak üzere dilüsyonlar hazırlanarak analiz edilmiştir. Konsantrasyona karşı elde edilen pik yüksekliklerinin ortalamalarının grafikleri çizilerek dinamik alan belirlenmiştir (Grafik 1,2). Buna göre analiz eşiğinin üstündeki RFU değerlerine sahip ve tam profil elde edilebilen en düşük DNA konsantrasyon 0,5 ng/μl olarak tespit edildi. Optimum DNA konsantrasyonu ise 1 ng/μl olarak belirlenmiştir. 1 ng/μl DNA konsantrasyonundan yüksek konsantrasyonlarda pikler çatallı ve dengesiz olarak gözlemlenmiştir.

Stokastik eşik çalışmasında, tam profilin analiz edildiği ve heterozigot genotipin görüldüğü alellerdeki kardeş alel piklerin birbirine olan oranları belirlenmiştir. Bu oranlar sonucunda elde edilen değerler Multipleks 1 için 1 ng/μl'de 57,67; 0,5 ng/μ'de 56,09'dur. Multipleks 2 için ise 1 ng/μl'de 58,19; 0,5 ng/μl'de 43,15'tir (Tablo X). Buna göre heterozigot

alel pik yüksekliklerinin oranı Multipleks 1'de 56,09; Multipleks 2'de 43,15'in altına düştüğünde pikler heterozigot olarak yani kardeş alel piki olarak kabul edilmeyecektir.

Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarında 5 örnek farklı zamanlarda, aynı ve farklı laboratuvar ve cihazlarda, farklı analistler tarafından çalışılarak aynı profiller elde edilmiştir (Şekil 48-53). Buna göre bu çalışma farklı kişiler tarafından, farklı laboratuvarlarda çalışılmaya uygundur.

### ***Benzer çalışmalarla ait karşılaştırmalar***

Ünsal ve arkadaşları, 2017 yılında yaptıkları çalışmada 21 gonozomal InDel lokusuna ait bir multipleks set geliştirmiş ve Türkiye'deki gen sıklığını belirlemiştir (71). Bu çalışma kapsamında geliştirilen 22 X InDel paneli ile Ünsal'ın panelindeki 9 lokus ortakdır (rs16367, rs2307762, rs16368, rs16632, rs25581, rs16397, rs25582, rs397025417, rs16460). Ünsal ve arkadaşlarının çalışmasındaki validasyon parametreleri çalışmamızdaki validasyon parametrelerinin sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda 11 lokuslu 2 X-InDel multipleks panelinin hassasiyet sınırı 0,5 ng/ µl olarak belirlenmiş, optimum DNA konsantrasyonu 1 ng/ µl olarak tespit edilmiştir. X kromozomu panellerinin kullanımını açısından değerlendirildiğinde bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

2015 yılında Santos ve arkadaşları bialellik 40 InDel lokusu için 4 InDel multipleks paneli geliştirmişlerdir (83). Bu 40 InDel lokusu kromozomal dağılımına, multipleks oluşturma yeteneğine ayrıca Avrupa popülasyonunda 0.50'ye yakın alel frekansına sahip olan InDel lokusları arasından seçildiği belirtilmiştir. Çalışmamızda da da benzer şekilde alel frekansı (minimum alel frekansı, MAF)  $\geq 0.30$ 'dan yüksek olan lokuslar seçilmiştir.

Fan ve arkadaşları 2015 yılında 13 X-InDel lokusunun multipleks kullanılabilirliğini araştırmış ve 13 X-InDel lokusunu içeren bir multipleks panel geliştirmişlerdir (84). Çalışmamızda kullanılan 22 X-InDel lokusu bu çalışmada kullanılan lokuslardan farklıdır. Fan ve arkadaşları çalışmanın optimizasyon aşamasında analiz eşliğini 0.5 ng DNA, heterozigotluk oranını ise 0.5848 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamız bu parametrelerde bu çalışma ile uygunluk göstermektedir.

Zhang ve arkadaşları, 2018 yılında 17 multipleks InDel lokusunun Çin Hun popülasyonunda adli uygulanabilirliğini göstererek bir multipleks panel geliştirmişlerdir (85). Bu çalışmada da 17 InDel lokusu seçilirken amplicon büyüklüklerinin 270 bp altında, Tm değeri 58-62 °C arasında ve GC oranının %50 olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızdaki 22 X-InDel lokusu bu çalışmadaki lokuslardan farklıdır ve amplicon büyüklükleri daha küçük ve Tm değerleri daha düşüktür. Zhang ve arkadaşlarının çalışmasındaki lokusların minimum alel frekansları  $\geq 0.01$ 'dir. Bu parametrelere açısından değerlendirildiğinde çalışmamız bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Rui ve arkadaşları 2011 yılında 32 X InDel lokusu ile bir multipleks panel geliştirmişlerdir (5). Çalışmamızdaki 5 lokusun (rs16397, rs16680, rs2308280, rs25581, rs59400186) bu çalışmada kullanılmış olduğu görülmüştür. Çalışmada 32 InDel lokusunun minimum alel frekansı  $\geq 0.20$ 'ye yakın olan lokuslar arasından seçildiği belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında seçilen tüm lokusların alel frekansları  $\geq 0.20$ 'den büyük seçilmiştir.

***30 kişiden alınan DNA örneğinde 22 InDel multipleksinin PCR'i, elektroforetik analizi ve tiplendirilmesi***

Asgari Bilgilendirmiş Gönüllü Olur Formu (Ek-1) okutulmuş ve çalışma için rızası alınmış 30 kişiden ağız içi sürüntü örnekleri alınmıştır. DNA izolasyonları Qiagen QIAamp® DNA Mini Kit kullanılarak yapılmıştır ve DNA miktarları belirlenmiştir (Tablo I). 30 kişiye ait örneğin analizi yapılmış ve tam profil elde edilmiştir (Ek-2).

Sonuç olarak; bu tez kapsamında 11 lokuslu 2-X InDel multipleks paneli geliştirilmiştir. Geliştirilen bu panellerin optimizasyon ve validasyon çalışmaları başarıyla yapılmıştır. 22 X InDel lokusunun dizaynı yapılırken heterozigotluk oranı ve ayırım gücü yüksek olabilecek lokuslar seçilmesi, lokusların ampikon uzunluklarının 57-204 bp boyutunda olması ve panelin 1 ng/µl DNA ile çalışabilmesi gibi nedenlerden ötürü olay yerinde toplanmış olan degrade olmuş (bozulmuş), beklemiş ve eser miktardaki biyolojik örneklerde başarılı DNA tiplendirmesi yapabilme olasılığı yüksektir.

X kromozomuna bağlı InDel polimorfizmi, baba/kız ilişkisinde mevcut bulunan otozomal genetik sistemlere ek olarak kullanılabilir. Akraba olan iki erkeğin babalık davasında, çocuğun kız çocuk olması durumunda X kromozomu polimorfizmi ile babalık tespit edilebilir. Baba adayının bulunmadığı veya ölü olduğu, herhangi bir biyolojik delilin elde edilemediği bulgularda çocuk kız ise; feth-i kabir yapılmadan babaanne-kız çocuk arasında X kromozomuna bağlı polimorfizmden yararlanılarak babalık davaları çözülebilir. Anneleri farklı ya da aynı iki kız çocuğunun babasının aynı olup olmadığının tespiti için yine X'e bağlı polimorfizmden yararlanılır. Bu tip özel olgularda X-InDel polimorfizmi STR ve SNP sistemlerine birlikte kullanılarak, biyolojik örneklerin DNA profillemesinde daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir (1).



Oluřturulan bu 11 lokuslu 2-X InDel multipleks panelin Türkiye'deki kriminal laboratuvarlarda çalışılabilmesi için Türkiye'deki 7 coğrafı bölgeyi yansıtacak örnekler ile en az 200 kişide çalışılarak Türkiye'deki alel sıklığının belirlenmesi önerilmektedir.



## 7. Kaynakça

1. James L. Weber, Donna David, Jeremy Heil, Ying Fan, Chengfeng Zhao, Gabor Marth. (2002). Human diallelic insertion/ deletion polymorphism, *The American Journal of Human Genetics*, 71(4), 854-862.
2. Duvenci, A., Bulbul, O., Filoglu, G. (2019). Evaluation of Population Data and Forensic Parameters of Turkish Population on 30 Autosomal Insertion and Deletion Polymorphisms. *Russian Journal of Genetics*, 55(2), 246-252
3. Rui Pereira, Christopher Phillips, Cintia Alves, Antonio Amorim, Angel Carracedo, Leonor Gusmao. (2009). A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms, *Electrophoresis*, 30(21), 3682-3690.
4. Natalle S. C. Freitas, Rafael L. Resque, Elzemar M. Ribeiro-Rodrigues, João F. Guerreiro, Ney P. C. Santos, Ândrea Ribeiro -dos-Santos, Sindey Santos. (2010). X-linked insertion/deletion polymorphisms: forensic applications of a 33-markers panel, *International Journal of Legal Medicine*, c. 124, sayı. 6, sf. 589–593.
5. Rui Pereira, Vânia Pereira, Iva Gomes, Carmen Tomas, Niels Morling, António Amorim, Maria João Prata, Ángel Carracedo, Leonor Gusmão, (2011). A method for the analysis of 32 X chromosome insertion deletion polymorphisms in a single PCR, *International journal of legal medicine*, 126(1), 97-105.
6. Butler JM. (2014) *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*, Academic Press-Elsevier Science Publishing Co Inc, 3rd edition, San Diego, USA, sf 89-107.
7. da Silva C, Matos S, Costa HA, dos Santos RM, Espinheira R, Santos J, Amorim A. (2013). Genetic portrait of south Portugal population with InDel markers. *Forensic Science International: Genetics* 7(4): e101-e103.

8. Açıkgöz, N., Hancı, İ. H., Çakır, A. H. (2002). Olay yerinden DNA analizi için biyolojik örnek toplama ve örneklerin laboratuara gönderilme usulleri. Ankara Üniversitesi Hukuk Fakültesi Dergisi, 51(2).
9. Hancı İH. (2002). Adli tıp ve adli bilimler. Seçkin Yayıncılık, Ankara: 371-379.
10. Tuğ A., Doğan Y., Hancı H. (2002). Kriminalistik Kriminoloji Değildir. Ankara Barosu Dergisi, 2:175-181.
11. Eckert WG. (1992). Introduction to the forensic sciences. In “Introduction to Forensic Sciences” Ed. Eckert WG. CRC Press, New York, sf. 1–10.
12. Horswell J, Fowler C. (2004). Associative evidence- the Locard exchange principle. In “The practice of Crime Scene Investigation” Ed. Horswell J. CRC Press, sf. 45–57.
13. Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. Nature, 316(6023), 76.
14. Walsh SJ. (2007). Current and future trends in forensic molecular biology. Molecular Forensics, John Wiley & Sons, London: 1-20.
15. Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., Palladino, M. A., & Killian, D. (2006). Concepts of genetics, Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, p. 463-465.
16. Butler J. M. (2001). Forensic DNA Typing. Biology And Technology Behind Str Markers. Academic Pres. 4:39-43.
17. Connor JM, Ferguson-Smith MA. (1991). Nucleic acid structure and function. Essential medical genetics, 5<sup>th</sup> ed. London: Blackwell Scientific Publication; sf.9-23.
18. Hartl DL, Jones EW. (2002). Human karyotypes and chromosome behavior. Essential genetics a genomics perspective, 3<sup>rd</sup> ed. London: Jones and Bartlett Publishers, sf.167-207.

19. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Boerkoel CF. (2001). Principles of clinical cytogenetics. Thompson Thompson Genetics in medicine. 6<sup>th</sup> ed. London: WB Saunders Company, sf.135-55.
20. Ingram CJ, Elamin MF, Mulcare CA, Weale ME, Tarekegn A, Raga TO, et al. (2007). A novel polymorphism associated with lactose tolerance in Africa: multiple causes for lactase persistence? Hum Genet. 120(6):779-88
21. Kayser M, Kittler R, Erler A, Hedman M, Lee AC, Mohyuddin A, et al. (2004). A Comprehensive Survey of Human Y-Chromosomal Microsatellites. Am J Hum Genet. 74(6): 1183-97.
22. Jabs EW, Goble CA, Cutting GR. (1989). Macromolecular organization of human centromeric regions reveals high-frequency, polymorphic macro DNA repeats. Proc Natl Acad Sci. 86(1):202-6.
23. Hopkins D., Whitehouse D. (2000). Human blood cells: consequences of genetic polymorphisms and variations (M. J King,R.Edge, Eds) Imperial College Press, River Edge, NJ. Sf 1-14.
24. Kahn R. (1991). An Introduction to DNA Structure and Genome Organization. In "Forensic DNA Technology" Ed. Farley MA and Harrington JJ. Lewis Publishers. sf. 25-38.
25. Kortunay S. (2005). The pharmacogenetics of central nervous system drugs. Turkiye Klinikleri J Int Med Sci. (44):76-80.
26. 1. Uluslararası Adli Biyoloji ve Genetik Kongresi Kongre Bildiri Kitapçığı; 2014 Kasım 24-27, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2014.
27. Butler JM ve Levin BC. (1998) Forensic applications of mitochondrial DNA. Trends in biotechnology 16(4): 158-162.

28. Quintáns B, Alvarez-Iglesias V, Salas A, Phillips C, Lareu MV, Carracedo A. (2004) Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. *Forensic science international*, 140(2-3), 251-257
29. Stein LD. (2004). Human genome: end of the beginning. *431(7011)*: 915-6.
30. The international HapMap Consortium. The international HapMap project. *Nature* 2003; 426(6968):789-96.
31. Budowle, B., & Van Daal, A. (2008). Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques*, 44(5), 603-610
32. Duncan GT., Tracey ML. (1992). Serology and DNA Typing. In "Introduction to Forensic Sciences" Ed. Eckert WG. CRC Press. New York. p. 233–294.
33. Bouwman AS, Chilvers ER, Brown KA, Brown TA. (2006) Brief communication: identification of the authentic ancient DNA sequence in a human bone contaminated with modern DNA, *Am. J. Phys. Anthropol.* 131:428-431
34. Brown KA, O' Donoghue K, Brown TA. (1995). DNA in cremated bones from an early bronze age cemetery cairn, *Int. J. Osteoarchaeol.* 5:181 187.
35. Tracey M. (2001). Short Tandem Repeat-Based Identification of Individuals and Parents. *Croatian Medical Journal.* 42(3):233–238.
36. Gill P., Jeffreys AJ., Werrett DJ. (1985). Forensic Applications of DNA Fingerprints. *Nature.* 318, 577–579.
37. Bilge Y, Kedici PS, Alakoç YD, Ulkür KU, Ilkyaz YY. (2003). The identification of a dismembered human body: a multidisciplinary approach. *Forensic Sci Int.* 137(2-3):141-6.
38. Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, Morling N, Parsons TJ, Sajantila A, Scheithauer R, Schmitter H, Schneider PM. (2007). DNA Commission of the International Society for

- Forensic Genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci Int Genet.* 1(1):3–12.
39. Gerstenberger J, Hummel S, Schultes T, Häck B, Herrmann B. (1999). Reconstruction of a historical genealogy by means of STR analysis and Y-haplotyping of ancient DNA. *Eur J Hum Genet.* 7(4):469–77.
40. Finkeldey R, Leinemann L, Gailing O. (2010). Molecular genetic tools to infer the origin of forest plants and wood. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85(5):1251–8.
41. Robertson, J. R., Ross, A. M., & Burgoyne, L. (Eds.). (2002). *DNA in forensic science: theory, techniques and applications.* CRC Press.
42. Lee, H. C., Ladd, C., Bourke, M. T., Pagliaro, E., & Timnady, F. (1994). DNA typing in forensic science. I. Theory and background. *The American journal of forensic medicine and pathology,* 15(4), 269-282.
43. Butler JM. (2007). Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *BioTechniques.* 43(4).
44. Norrgard, K. (2008). Forensics, DNA fingerprinting, and CODIS. *Nature Education,* 1(1), 35. Jobling MA., Gill P. Encoded Evidence: DNA in Forensic Analysis. *Nature Reviews.* 2004; Volume 5.
45. Weber, J. L., & May, P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American journal of human genetics,* 44(3), 388.
46. National Institute of Justice. Predictions of the Research and Development Working Group. The Future of Forensic DNA testing. U.S. Department of Justice Office of Justice Programs. 2000; sf. 26–28.
47. Pereira, R., Phillips, C., Alves, C., Amorim, A., Carracedo, Á., & Gusmão, L. (2009). Insertion/deletion polymorphisms: a multiplex assay and forensic

- applications. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2(1), 513-515.
48. Pereira, R., Phillips, C., Pinto, N., Santos, C., dos Santos, S. E. B., Amorim, A., ... & Gusmão, L. (2012). Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PloS one*, 7(1), e29684.
49. The 1000 Genomes Project Consortium. (2010). A map of human genome variation from populationscale sequencing. *Nature*, 467(7319), 1061–1073.
50. Scharplatz, M., Puhan, M., Steurer, J., & Bachmann, L. (2004). What is the impact of the ACE gene insertion/ deletion (I/D) polymorphism on the clinical effectiveness and adverse events of ACE inhibitors? – Protocol of a systematic review. *BMC Medical Genetics*, 5(1),
51. Strachan, T., & Read, A. P. (2003). *Human molecular genetics* (3rd ed.). London/New York: Garland Science/Taylor & Francis Group.
52. Lewis, R. (2004). *Human Genetics Concepts and applications*. 7th Edition. McGraw Hill.
53. Scharplatz, M., Puhan, M., Steurer, J., & Bachmann, L. (2004). What is the impact of the ACE gene insertion/ deletion (I/D) polymorphism on the clinical effectiveness and adverse events of ACE inhibitors? – Protocol of a systematic review. *BMC Medical Genetics*, 5(1),
54. Strachan, T., & Read, A. P. (2003). *Human molecular genetics* (3rd ed.). London/New York: Garland Science/Taylor & Francis Group.
55. Arzu Düvenci, 2015, 30 insersiyon/delesyon (indel) lokusunun Türkiye'deki polimorfizmi (Yüksek Lisans Tezi), İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü.
56. Natalle S. C. Freitas, Rafael L. Resque, Elzemar M. Ribeiro-Rodrigues, João F. Guerreiro, Ney P. C. Santos, Ândrea Ribeiro -dos-Santos, Sidney Santos. (2010) X-

- linked insertion/deletion polymorphisms: forensic applications of a 33-markers panel, *International Journal of Legal Medicine*, Volume 124, Issue 6, pp 589–59.
57. Zheng Wang, Suhua Zhang, Shumin Zhao, Zhen Hu, Kuan Sun, Chengtao Li. (2014). Population genetics of 30 insertion–deletion polymorphisms in two Chinese populations using Qiagen Investigator® DIPplex kit. *Forensic Science International: Genetics*, 11, Issue null, e12-e14.
58. N.P.C. Santos, E.M. Ribeiro-Rodrigues, A.K.C. Ribeiro-dos-Santos, R. Pereira, L. Gusmão, A. Amorim, J.F. Guerreiro, M.A. Zago, C. Matte, M. Hutz, S.E.B. dos Santos. (2010). Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48 insertion-deletion (INDEL) ancestry- informative marker (AIM) panel, *Human Mutation*. 184–190.
59. Wang, L., Lv, M., Zaumsegel, D., Zhang, L., Liu, F., Xiang, J., & Zhang, L. (2016). A comparative study of insertion/deletion polymorphisms applied among Southwest, South and Northwest Chinese populations using Investigator® DIPplex. *Forensic Science International: Genetics*, 21, 10-14.
60. Jeffreys A.J., Wilson V. (1985). Thein SL. Hypervariable “minisatellit” regions in human DNA, *Nature*, 314: 67-73
61. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2008). (Çeviri: Buyru N, Dalay N, Özgüç M, Öztürk M, Sakızlı M). *DNA ve Kromozomlar, Hücrenin Moleküler Biyolojisi*, Tüba Yayınları, 191-197
62. Klug WS, Cummings MR, Spencer C. (2009). *DNA'nın Yapısı ve Analizi: Genetik Kavramlar*. Öner C. Editör. Palme Yayıncılık. 241-257.
63. Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR methods appl*, 3(3), S30-S37.



64. Lincoln, S.E., Daly, M.J. and Lander,S.E.(1991) PRIMER: A computer program for automatically selecting PCR Primers
65. <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/pcr-master-mix-protocol.pdf?la=en> (Son Erişim Tarihi: 28.05.2019)
66. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 51, Pt 1:263-73
67. Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction, *Methods in Enzymology*, 155, 335-50
68. Dieffenbach CW., Dveksler GS., (2003) PCR Primer A Laboratory Manual, 2th edt., Section 1, pp5-75, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
69. Turhan, H. (2008). Mide Kanserli Hastalarda Periferik Kanda Telomeraz Mrna Ekspresyonunun Real Time Pcr Kullanılarak Belirlenmesi ve Klinikopatolojik Özelliklerle İlişkinin Saptanması (Uzmanlık tezi).
70. Semizoğlu İ. (2016). Adli Dna Analizlerinde Kullanılmak Üzere Multipleks Str Kiti Oluşturulması, Dnş. Prof. Dr. Hatice Mergen, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi
71. Ünsal, T., Filoğlu, G., Aşıcıoğlu, F., & Bülbül, Ö. (2017). Population data of new 21 mini-InDels from Turkey. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 6, e189-e191.
72. Oda, R. P., Clark, R., Katzmann, J. A., & Landers, J. P. (1997). Capillary electrophoresis as a clinical tool for the analysis of protein in serum and other body fluids. *Electrophoresis*, 18(10), 1715-1723.
73. Wenz H, Robertson JM, Menchen S, Oaks F, Demorest DM, Scheibler D, Rossenblum BB, Wike C, Gilbert DA. (1998). Efcavitch JW. High precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis. *Genome Res.* 8: 69-80.

74. Deforce DL, Millecamps RE, Van Hoostat D, Van den Eeckhout EG. (1998). Comparison of slab gel electrophoresis an capillary electrophoresis for the detection of the fluorescently labeled polymerase chain reaction products of short tandem repeat fragments. *J. Chromatogr A*, 1998;806:149-55.
75. Wang X, Sawaguchi T, Sawaguchi A. (2000). Application of electrophoresis technology to DNA analysis. *Elektrophoresis*. 21:334-37.
76. ABI Prism 310 Genetic Analyzer User's Guide (2001) Applied Biosystems, USA
77. Buel E, Schwartz MB, La Fountain MJ. (1998). Capillary electrophoresis STR analysis: comparison to gel-based systems. *J. Forensic Sci.* 43: 164-70.
78. Aşcıoğlu, F., Koluacı, T., Çetinkaya, Ü., & Akyüz, F. (2002). Kapiller elektroforez teknolojisinin klinik ve adli amaçlı DNA analizlerinde kullanımı: geleneksel jel elektroforez yöntemi ile karşılaştırma. *Adli Tıp Der*, 16(2-4), 88-93.
79. [http://www.turkak.org.tr/TURKAKSITE/KurumsalBirimlerLabAkrdBskligi\\_1.aspx](http://www.turkak.org.tr/TURKAKSITE/KurumsalBirimlerLabAkrdBskligi_1.aspx)  
(Son Erişim Tarihi: 28.05.2019)
80. ENFSI DNA Working Group, Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process, 2010, 001: 1-11
81. Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B., & Cartuyvels, R. (2009). Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *Journal of clinical laboratory analysis*, 23(3), 145-151.
82. Holt, C. L., Buoncristiani, M., Wallin, J. M., Nguyen, T., Lazaruk, K. D., & Walsh, P. S. (2002). Twgdam Validation of Ampf\_str•: PCR Amplification Kits for Forensic DNA Casework. *Journal of Forensic Science*, 47(1), 66-96.

83. Santos, V. R., Pena, H. B., & Pena, S. D. (2015). A multiplex panel of short-amplicon insertion-deletion DNA polymorphisms for forensic analysis. *Genet Mol Res*, 14(2), 2947-52.
84. Fan, G., Ye, Y., Luo, H., & Hou, Y. (2015). Use of multi-InDels as novel markers to analyze 13 X-chromosome haplotype loci for forensic purposes. *Electrophoresis*, 36(23), 2931-2938.
85. Zhang, S., Zhu, Q., Chen, X., Zhao, Y., Zhao, X., Yang, Y., ... & Zhang, J. (2018). Forensic applicability of multi-allelic InDels with mononucleotide homopolymer structures. *Electrophoresis*, 39(16), 2136-2143
86. Lyon MF, (1988) X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes. *Am J Hum Genet*. 42:8-16.

## EK-1

	<b>ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ</b>	<b>Doküman Adı:</b> KADB-F.23-R.00
		<b>Yayın Tarihi:</b> 18.04.2013
		<b>Sayfa No:</b> 75/99
		<b>Onaylayan:</b> Daire Başkanı

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nde yüksek lisans tezi amacıyla yapılacak bir araştırmaya katılmanız istenmektedir. Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağına çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Formu imzalamanız çalışmanın kapsamı ve riskleri hakkında bilgilendirildiğinizi ve kararınızı serbestçe verdiğinizi belirtmektedir. Bu onay formunun bir kopyası size verilecektir. Bu formda anlamadığımız ifadeler varsa çalışmadaki araştırmacılara sorarak bilgi edinebilirsiniz.

### **X Kromozomu Üzerinde Bulunan InDEL Lokuslarına Ait Multipleks Panel**

#### **Geliştirilmesi**

Adli olaylarda olay yerinden kan, tükürük, semen, saç, kıl, tırnak, kemik gibi biyolojik örneklerin analizi vakanın aydınlatılması için oldukça önemlidir. Bu örneklerin analizi, DNA üzerindeki genetik işaretler yardımı ile yapılmaktadır. Olay yerinden toplanan biyolojik örneklerde, örneğin degrede olması ve/veya eser miktarda olması gibi önemli sorunlar ile karşılaşılabilir. Adli bilimlerdeki son gelişmeler göstermiştir ki insersiyon/delesyon polimorfizmi (InDEL) kimliklendirme için uygun birer genetik işaretlerdir. InDEL'lerin avantajı ise degrede olmuş ve/veya eser miktarda olan örneklerin analizinde iyi sonuç alınabilmesidir.

X kromozomu üzerindeki InDEL'lerin analizi ile kimliklendirme yapılabilir. Babalık davalarında babanın tespiti yapılabilir. Nesep tayini yapılabilir. Akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde ve soy tayininde, toplu felaketlerde kurbanların kimliklendirilmesinde kullanılabilir.

Bu çalışmada da X kromozomu üzerinde bulunan 30-35 InDel lokusu içeren bir multipleks panel geliştirilecektir. 30-35 InDel lokuslu multipleks panelin dizaynı ve optimizasyonu yapıldıktan sonra

bütün validasyon basamakları gerçekleştirilecektir. Optimizasyon ve validasyonu gerçekleştirilen InDEL lokusları adli olgularda kullanılabilir.

Araştırmanın deneysel süreci şu şekilde olacaktır; sizden ağız içi sürüntü yardımı ile alınan DNA izole edilecektir. DNA'nın miktarı belirlenecektir. Sonrasında PCR tekniği ile 30-35 InDEL lokusu çoğaltılacaktır. Elektroforez ile PCR ürünlerinin analizi yapılacaktır. Daha sonra 30-35 yeni X kromozomuna özgü multipleks set oluşturulacaktır.

Araştırmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına bağlıdır. 6698 sayılı kanununun 11. Maddesi uyarınca öğrenme, bilgi talep etme, düzeltilmesini talep etme ve verileri yok etme hakkınız bulunmaktadır. Araştırmaya katıldığınızda, araştırmanın herhangi bir aşamasında bir gerekçe göstermeksizin ayrılabilirsiniz. Bunun için herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz

kalması söz konusu değildir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcının araştırma dışı bırakılacağı bildirilebilir.

Alınan kişisel veriler, hukuka ve dürüstlük kurallarına, bilimsel çalışma kurallarına uygun olarak, işbu proje kapsamında ve projenin yapılması amacı ile sınırlı ve ölçüde anonim olarak kullanılacaktır. Kişisel veriler işbu projenin yapılıp bitirilmesi için gerekli olan süre ile sınırlı olarak muhafaza edilecektir. Kişisel veriler projenin sona ermesini müteakip proje yürütücüsü tarafından silinecek veya anonim hale getirilecektir.

Sizden araştırma ile ilgili herhangi bir para talebinde bulunulmayacağı gibi kendisine de ödeme yapılmayacaktır. Bağlı bulunduğunuz Sosyal Güvenlik Kurumundan (SGK)dan herhangi bir ücret alınmayacaktır.

Araştırmanın sizin açınızdan hedeflenen herhangi bir klinik yararı bulunmamaktadır.

Araştırma konusu ile ilgili ve sizin araştırmaya katılmaya devam etme isteğinizi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde siz ya da yasal temsilciniz zamanında bilgilendirilecektir.

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

Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü; 30-40 kişidir. Sizden pamuklu çubukla ağızdan sürüntü örneği alınacaktır. Sizden elde edilecek olan biyolojik materyal; proje yürütücüsü tarafından tıbbi personel yönetiminde ve denetiminde gerekli örnekler alınacaktır. Araştırma ile ilgili analizler İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü Öğrenci Laboratuvarında yapılacaktır.

Kendi haklarınız hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir bilgi almak istediğinizde, sorumlu araştırmacı Zülal Seval Uslu'dur.

*Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen görevli tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi veya kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından da araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.*

### **“X Kromozomu Üzerinde Bulunan InDEL Lokuslarına Ait Multipleks Panel Geliştirilmesi”**

*Yüksek lisans tez çalışması kapsamında alınan ağız içi sürüntü-tükürük örneğinin (Gönüllü tarafından uygun olan şık işaretlenmelidir)*

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

**Gönüllünün Adı Soyadı:**

**Gönüllünün İmzası**

**Tarih:**

**Yetkin Araştırmacının Adı-Soyadı:**

**Yetkin Araştırmacının İmzası:**

**Tarih:**

### EK-2 30 Kişiyeye Ait 22 X-InDel Lokusunun Profili

Sıra No	Kodu	XID1	XID2	XID3	XID4	XID5	XID6	XID7	XID8	XID9	XID10	XID12	XID13	XID14	XID15	XID16	XID17	XID18	XID20	XID21	XID22	XID23	XID24
1	T17XX002	2-2	1-1	1-2	1-2	1-2	1-1	1-2	1-1	2-2	1-1	2-2	1-1	2-2	1-1	2-2	2-2	1-2	1-1	1-1	1-1	1-2	2-2
2	T17XX009	1-1	2-2	2-2	2-2	1-2	1-2	2-2	2-2	1-2	1-2	2-2	1-1	2-2	1-2	1-2	1-1	1-1	1-1	1-2	1-2	2-2	1-1
3	T18XX003	2-2	2-2	1-2	1-2	1-2	1-2	2-2	1-1	1-1	1-1	1-2	1-1	1-2	1-1	1-2	2-2	1-1	1-1	1-2	2-2	1-2	1-2
4	T18XX045	2-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	2-2	1-2	1-2	1-2	2-2	1-1	2-2	1-1	1-1	2-2	1-2	1-2	1-2	1-2
5	T18XX056	2-2	1-2	2-2	1-2	1-1	2-2	1-2	1-2	2-2	2-2	2-2	1-1	1-1	1-2	1-2	1-2	1-1	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2
6	T18XX058	1-2	2-2	2-2	1-2	1-1	1-1	2-2	1-1	2-2	1-1	1-2	1-1	2-2	1-1	1-1	2-2	1-1	1-1	1-2	1-2	1-1	1-1
7	T18XX059	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-1	1-2	1-2	1-2	1-2	2-2	1-2	1-2	1-2	1-2	2-2	2-2	1-2	1-1	1-1	1-2	1-1
8	T18XX061	1-2	1-1	1-1	2-2	1-2	1-1	1-2	1-2	1-2	1-1	2-2	2-2	2-2	1-2	1-1	2-2	1-2	1-2	2-2	1-1	1-1	1-1
9	T18XX062	1-2	2-2	1-2	1-2	1-1	1-1	2-2	1-2	2-2	1-2	2-2	2-2	1-2	1-1	2-2	2-2	1-2	2-2	1-2	1-1	1-2	2-2
10	T18XX086	2-2	1-2	2-2	2-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-1	1-2	1-2	1-2	2-2	2-2	1-2	1-2	1-2
11	T18XX087	2-2	2-2	2-2	2-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-1	1-2	1-2	1-1	2-2	1-2	1-2	1-2	2-2	2-2	2-2	2-2	2-2	1-2
12	T18XX089	2-2	1-1	2-2	1-1	1-2	1-2	2-2	2-2	2-2	1-1	1-2	1-2	1-2	1-1	2-2	1-2	1-2	1-2	2-2	1-1	2-2	1-2
13	T18XX090	1-1	1-2	2-2	1-2	1-1	1-1	1-2	1-2	2-2	1-2	1-2	2-2	2-2	1-1	2-2	1-1	2-2	1-2	1-2	1-2	2-2	2-2
14	T18XX091	2-2	2-2	2-2	2-2	1-2	2-2	1-2	1-1	1-2	1-2	2-2	1-1	1-1	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	2-2	1-2	1-2
15	T18XX155	1-2	1-2	2-2	1-2	1-2	1-2	1-1	1-1	2-2	1-1	2-2	1-2	1-2	1-1	1-2	1-1	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	2-2
16	T18XY001	2-2	1-1	2-2	2-2	2-2	2-2	2-2	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	2-2	2-2	1-1	1-1	1-1	2-2	2-2	1-1	2-2
17	T18XY007	1-1	1-1	1-1	2-2	1-1	2-2	2-2	2-2	2-2	1-1	2-2	2-2	1-1	1-1	1-1	1-1	2-2	1-1	1-1	1-1	2-2	2-2
18	T18XY008	2-2	1-1	2-2	2-2	1-1	2-2	2-2	1-1	2-2	1-1	1-1	1-1	2-2	1-1	2-2	1-1	2-2	2-2	2-2	2-2	2-2	1-1
19	T18XY041	1-1	2-2	2-2	1-1	1-1	2-2	2-2	1-1	2-2	2-2	2-2	1-1	1-1	2-2	1-1	2-2	2-2	1-1	2-2	2-2	1-1	2-2
20	T18XY043	2-2	1-1	1-1	1-1	1-1	2-2	2-2	1-1	2-2	1-1	1-1	1-1	2-2	2-2	1-1	2-2	2-2	1-1	1-1	1-1	2-2	2-2
21	T18XY044	2-2	2-2	1-1	2-2	1-1	1-1	2-2	1-1	1-1	1-1	2-2	1-1	1-1	2-2	1-1	1-1	2-2	2-2	1-1	2-2	2-2	1-1
22	T18XY047	2-2	2-2	1-1	2-2	1-1	1-1	2-2	2-2	2-2	1-1	2-2	1-1	2-2	1-1	1-1	1-1	2-2	2-2	2-2	2-2	2-2	2-2
23	T18XY049	2-2	1-1	2-2	2-2	2-2	2-2	2-2	1-1	2-2	1-1	2-2	1-1	2-2	1-1	2-2	1-1	1-1	2-2	2-2	1-1	2-2	2-2
24	T18XY050	1-1	2-2	2-2	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	2-2	2-2	1-1	2-2	2-2	1-1	2-2	2-2	2-2	2-2	1-1	2-2	2-2
25	T18XY051	2-2	1-1	2-2	2-2	2-2	2-2	1-1	2-2	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	2-2	1-1	1-1	1-1	2-2	1-1	2-2	2-2

26	<b>T18XY054</b>	2-2	1-1	1-1	2-2	1-1	2-2	2-2	1-1	1-1	1-1	2-2	1-1	2-2	2-2	2-2	2-2	2-2	1-1	2-2	1-1	1-1	2-2
27	<b>T18XY060</b>	1-1	2-2	2-2	2-2	2-2	1-1	2-2	2-2	2-2	1-1	2-2	2-2	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	1-1	2-2	2-2
28	<b>T18XY070</b>	2-2	2-2	1-1	1-1	1-1	1-1	2-2	1-1	1-1	1-1	2-2	1-1	2-2	2-2	1-1	2-2	2-2	1-1	1-1	2-2	2-2	2-2
29	<b>T18XY077</b>	2-2	2-2	2-2	2-2	2-2	2-2	1-1	2-2	2-2	1-1	1-1	2-2	1-1	1-1	2-2	2-2	1-1	1-1	1-1	2-2	1-1	1-1
30	<b>T18XY078</b>	2-2	1-1	2-2	2-2	2-2	2-2	2-2	1-1	2-2	1-1	2-2	1-1	2-2	1-1	2-2	1-1	1-1	1-1	2-2	2-2	1-1	1-1

**EK-3 Etik Kurul Kararı**

Tarih ve Sayı: 05/01/2017-6569



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı



Sayı :59491012-604.01.02-  
Konu :Yüks.Lis.Öğr. Zülal Seval  
Uslu'nun etik kurul kararı A-27

**ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**

İlgi :15.12.2016 tarihli, 453640 sayılı yazı

Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı öğretim üyesi **Yard.Doç.Dr. Gönül FİLOĞLU'nun** danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğr. Zülal Seval USLU'nun** sorumluluğunda **Dokt. Öğr. Tuğba ÜNSAL'ın** yardımcılığında yürütülecek "**X Kromozomu Üzerinde Bulunan InDel Lokuslarına Ait Multipleks Panel Geliştirilmesi**" başlıklıYüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri **03 Ocak 2017** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup;Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP ) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı  
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR  
Başkan

e-İmzalı  
Prof. Dr. Feray SAVRUN  
Dekan a.  
Dekan Yardımcısı

EK :  
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için:<http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BENU6LYMD>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL

Tel : 0 (212) 414 30 00 21107- 21108 Fax : 0 (212) 632 00 33

e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr



Tarih ve Sayı: 06/01/2017-3834



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
Adli Tıp Enstitüsü Müdürlüğü



Sayı :86669574-302.14.06-  
Konu :Zülal Seval USLU'nun tez  
çalışmasının etik kurul tarafından  
değerlendirilmesi sonucu

**FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA**

İlgi :05/10/2016 tarihli, 161769 sayılı yazı

Enstitümüz Fen Bilimleri Anabilim Dalının yüksek lisans programına kayıtlı öğrencisi Zülal Seval USLU'nun "X Kromozomu Üzerinde Bulunan InDel Lokuslarına Ait Multipleks Panel Geliştirilmesi" konulu tez çalışması 3 Ocak 2017 tarihinde toplanan Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulu tarafından değerlendirilmiş olup Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alması koşulu ile uygun görüldüğü hakkındaki 05.01.2017 tarihli 6569 sayılı yazısı ilişikte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-İmzalı  
Prof. Dr. Faruk AŞICIOĞLU  
Enstitü Müdürü

EK :  
1

DAĞITIM  
Zülal Seval USLU  
Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanlığı

**Doğrulamak İçin:**<http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE8466MOP>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Mehmet SALDIRAN Dahili : 22833

İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü 34098 Cerrahpaşa/İSTANBUL  
Tel : (0212) 414 30 00 Fax : (0212) 588 00 11  
e-posta : adlitpens@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad:** Zülal Seval Uslu

**Doğum Tarihi:** 24.06.1993

**Doğum Yeri:** Fatih/İSTANBUL

**E-Posta:** [zulalusl@gmail.com](mailto:zulalusl@gmail.com)

### **Eğitim Bilgileri:**

2007-2011 Çemberlitaş Anadolu Lisesi

2011-2015 İstanbul Üniversitesi, Biyoloji (Lisans)

2015-2019 İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Adli Tıp Enstitüsü (Yüksek Lisans)

### **Sertifikalar:**

İlk Yardım, 2009

Pedagojik Formasyon Sertifika Programı / İstanbul Üniversitesi, Aralık 2015- Haziran 2016

Diksiyon/ İSMEK, 64 saat / 2016

### **İş Tecrübeleri:**

İstanbul Ticaret Odası Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi, Stajyer Biyoloji Öğretmeni / Mart 2015- Haziran 2015 (12 hafta/ 72 saat)

Oruçgazi Ortaokulu, Ücretli Fen Bilimleri Öğretmeni / Şubat 2017- Kasım 2017

Bayrampaşa Belediyesi Bilim Merkezi, Biyoloji Laboratuvarı Sorumlusu / Kasım 2017-Halen

**Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Posterler:**

Gonul Filoglu, Selen Ozyer, **Zulal Seval Uslu**, Tugba Unsal, Ozlem Bulbul, The Development of an X- Chromosome InDel Multiplex for Forensic Applications, AAFS American Academy of Forensic Sciences 70th Annual Scientific Meeting, February 19-24 2018, Washington USA

Gonul Filoglu, Selen Ozyer, **Zulal Uslu**, Tugba Unsal, Ozlem Bulbul, Development of a novel 24 X-Chromosome Insertion Deletion Polymorphisms (X- InDeL) Multiplex Panel, EAFS 8th European Academy of Forensic Science Conference, August 27-31 2018, Lyon France

**Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Oral Sunumlar:**

**Zülal Seval Uslu**, Selen Özyer, Sebahat Taş, Özlem Bülbül, Gönül Filoğlu, X Kromozomu Üzerinde Bulunan Indel Lokuslarına Ait Multipleks Panel Geliştirilmesi, 16. Adli Bilimler Kongresi, 4-7 Nisan 2019, İzmir Türkiye.