

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman
Dr. Öğr. Gör. Gönül Filoğlu

X KROMOZOMU INDEL LOKUSLARININ TÜRKİYE’DEKİ GEN SIKLIĞI

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG SELEN ÖZYER
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 Selen ÖZYER'in

"X Kromozomu Indel Lokuslarının Türkiye'deki Gen Sıklığı"

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. Faruk AŞICIOĞLU
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Elif ÖZKÖK
Üye

Doç. Dr. Gökhan ERSOY
Üye

Dr. Öğ. Üyesi Gözül FİLOĞLU
Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Özlem BÜLBÜL
Üye

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

Danışman
Dr. Öğr. Gör. Gönül Filoğlu

X KROMOZOMU INDEL LOKUSLARININ TÜRKİYE’DEKİ GEN SIKLIĞI

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG SELEN ÖZYER
İSTANBUL, 2019

Bu tezde, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından verilen TSA-2017-25221 numaralı proje desteği kullanılmıştır.

ÖNSÖZ

Öncelikle ders aşamam boyunca bilgi, birikim ve güler yüzlerini eksik etmeyen değerli hocalarım; *Prof. Dr. Münevver Açikkol, Prof. Dr. Gürsel Çetin, Dr. Öğr. Üyesi Gönül Filoğlu Tüfek, Doç. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu, Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Türkmen, Dr. Öğr. Üyesi Özlem Bülbül Ercan, Dr. Öğr. Üyesi Selda Mercan, Doç. Dr. Hüseyin Çakan, Prof.Dr.*

Salih Cengiz ve Prof. Dr. Faruk Aşıcıoğlu'na teşekkür etmek istiyorum.

Tez aşamamda laboratuvarıda geçirdiğim ilk günden bugüne yardımlarını esirgemeyen

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Ünsal ve Öğr. Gör. Ömer Karataş'a;

Yardımlarını ve manevi desteklerini hep hissettiğim

Sebahat Taş, Zülal Seval Uslu, Sümeyye Zülal Şimşek, Süeda Sarıca, Hümeysra Özel, Melis

Canbay, Tuğba Sohtorik, Arzu Düvenci'ye;

Bu uzun süreçte her aşamada odasının kapısını çaldığım, gülüşüyle pozitif enerji veren,

sohbetini esirgemeyen değerli danışman hocam *Dr. Öğr. Üyesi Gönül Filoğlu Tüfek'e*

teşekkürü borç bilirim.

Ve beni daima maddi ve manevi olarak destekleyen ***aileme*** sonsuz teşekkürler.

Selen Özyer

İçindekiler

TABLolar LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
KISALTMALAR.....	vii
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1. Moleküler Genetikten Adli Genetiğe Geçiş.....	3
2.1.1. DNA'nın keşfi	3
2.1.2. Adli genetikte DNA'nın yeri.....	4
2.2. Gen Mutasyonu	4
2.2.1. Baz değişimi (nokta) mutasyonları.....	5
2.2.2. Sessiz, yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyonlar	5
2.2.3. Çerçeve kayması mutasyonları.....	6
2.3. Genetik Polimorfizm	7
2.4. Adli Genetikteki Gelişmeler ve Polimorfizm Sistemleri	8
2.4.1. HLA (İnsan Lökosit Antijeni-Human Leukocyte Antigen) sistemi	8
2.4.2. VNTR (Değişken sayıda ardışık tekrarlar-Variable Number Tandem Repeats)	8
2.4.3. STR (Kısa ardışık tekrarlar-Short Tandem Repeats)	10
2.4.4. SNP (Tek nükleotid polimorfizmi-Single Nucleotide Polymorphism).....	10
2.4.5. InDel (İnseriyon-Delesyon) polimorfizmi	12
2.5. X Kromozomu ve InDel Polimorfizmi	14
2.6. Popülasyon Genetiği.....	15
2.6.1. Popülasyon genetiği ile ilgili bazı kavramlar	15
2.6.2. Popülasyon genetiğinin temelleri: C. Darwin ve G. Mendel	16
2.7. Adli Genetikte İstatistiksel Yaklaşımlar	17
2.7.1. Hardy-Weinberg prensibi.....	17
2.7.2. Adli istatistiksel parametreler.....	19
2.7.3. Popülasyonlar arası farklılaşma (F_{ST} değerleri).....	20
2.8. Veri Analizlerinde Kullanılan Programlar	21
2.8.1. Arlequin 3.5	21
2.8.2. Genetix 4.0.5.....	22
2.8.3. PowerStats v.1.12	22
2.8.4. MEGA X v.10.0.5	23
3. Gereç ve Yöntem	24
3.1. Deneyde Kullanılan Gereçler.....	24
3.1.1. Cihazlar	24

3.1.2. Ticari kitler.....	25
3.1.3. Kapiler elektroforez aşamasında kullanılan kimyasallar	25
3.1.4. Kit dışı kimyasal maddeler.....	25
3.2. Deney Aşaması	26
3.2.1. DNA örneklerinin toplanması	26
3.2.2. DNA izolasyonu ve DNA miktar tayini.....	26
3.2.2.1. <i>QIAamp® DNA mini kit ile ağız içi sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu</i>	27
3.2.2.2. <i>Quant-iT™ dsDNA HS Assay kit ile DNA miktar tayini</i>	28
3.2.3. PCR Aşaması	28
3.2.3.1. <i>PCR bileşenlerinin hazırlanması ve PCR aşaması</i>	29
3.2.3.2. <i>PCR programı</i>	30
3.2.4. PCR ürünlerinin ABI PRISM® 310/3130 genetik analizör cihazında analizi	31
3.2.4.1. <i>Örnek hazırlanması</i>	31
3.2.4.2. <i>Örneklerin elektroforezi</i>	31
3.2.4.3. <i>Örneklerin analizi</i>	32
4. Bulgular.....	34
4.1. 22-X InDel Lokusuna Ait Genotiplerin Belirlenmesi	34
4.2. İstatistiksel Bulgular.....	36
4.2.1. Alel frekanslarının belirlenmesi	36
4.2.2. Hardy-Weinberg dengesi	38
4.2.3. Adli İstatistik parametreleri.....	39
4.2.4. Popülasyonlar arası farklılaşma (F_{ST} değerleri).....	40
4.2.5. Filogenetik ağaç çizimi	42
5.Tartışma	44
6. Sonuç	48
7. Özet ve Anahtar Kelimeler	49
8. Özet (İngilizce)	51
9. Kaynaklar.....	53
EKLER.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	72

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo I. Adli DNA analizlerindeki bazı gelişmeler	12
Tablo II. Adli istatistik parametrelerin formülleri (27)	20
Tablo III. X kromozomu üzerindeki 22 InDel lokusuna ait bilgiler.....	29
Tablo IV. PCR bileşenleri ve miktarları	30
Tablo V. PCR koşulları	30
Tablo VI. Elektroforez bileşenleri ve miktarları.....	31
Tablo VII. Elektroforez koşulları.....	32
Tablo VIII. 22-X InDel lokusunun alel frekansları	37
Tablo IX. 22-X InDel lokusunun HW denge tablosu.....	38
Tablo X. 22-X InDel lokusunun adli istatistik analiz parametreleri.....	39
Tablo XI. Çeşitli popülasyonların 22-X InDel lokusuna ait alel frekansları.....	41
Tablo XII. 15-X InDel lokusunun popülasyonlar arası F_{st} değerleri.....	42
Tablo XIII. 22-X InDel lokusunun 250 kişiye ait genotipi.....	62

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: DNA'nın yapısı (17).....	3
Şekil 2: Transisyon ve transversiyon mutasyonları şeması (21).....	5
Şekil 3: Sessiz, yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyonun şeması (22).....	6
Şekil 4: Çerçeve kayması mutasyonu (23).....	7
Şekil 5: VNTR (31).....	9
Şekil 6: STR (35).....	10
Şekil 7: SNP (40).....	11
Şekil 8: İnsersiyonun oluşumu (41).....	12
Şekil 9: Delesyonun oluşumu (42).....	13
Şekil 10: X kromozomu diyagramı (49).....	14
Şekil 11: 500 LIZ Size Standard.....	32
Şekil 12: 22-X InDel lokusunun (multipleks 1 ve 2) bir kadın genotipine ait elektroforegram görüntüsü.....	35
Şekil 13: 22-X InDel lokusunun (multipleks 1 ve 2) bir erkek genotipine ait elektroforegram görüntüsü.....	36
Şekil 14: 22-X InDel lokusunun 250 kişiye ait Türkiye popülasyonundaki alel frekansları grafiği.....	37
Şekil 15: 20-X InDel lokusuna ait Türkiye popülasyonu ile diğer popülasyonların genetik farklılaşmasının (F_{ST}) her lokus için karşılaştırması.....	42
Şekil 16: Komşu birleştirme ağaç yöntemi ile çizilen filogenetik ağaç.....	43

KISALTMALAR

A: Adenin

ABI: Applied Biosystems, Inc

AR-GE: Araştırma-Geliştirme

AW1: Wash buffer 1 (Yıkama tamponu 1)

AW2: Wash buffer 2 (Yıkama tamponu 2)

Bç: Baz çifti

Buffer AE: Elution buffer (Elüsyon tamponu)

Buffer AL: Lysis buffer (Lizis tamponu)

C: Cytosine (Sitozin)

Del: Delesyon (Çıkarma)

DNA: Deoksiribonükleik Asit

dsDNA: Double stranded DNA (çift zincirli DNA)

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

F_{ST}: Fixation Index (Fiksasyon indeksi-Popülasyonlar arası genetik uzaklık)

G: Guanin

HLA: Human Leukocyte Antigens (İnsan lökosit antijeni)

HWD: Hardy-Weinberg Dengesi

Ins: İnsersiyon (Eklenme)

InDel: İnsersiyon-Delesyon (Eklenme-Çıkarma)

Kb: Kilobaz

Kbç: Kilobaz çifti

µl: Microliter (Mikrolitre)

mRNA: Mesajcı RNA

PBS: Phosphate Buffered Saline (Fosfat tamponu çözeltisi)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PD: Power of Discrimination (Ayrım Gücü)

PE: Power of Exclusion (Dışlama Gücü)

PIC: Polymorphism Information Content (Polimorfik Bilgi İçeriği)

Pm: Probability of Match (Eşleşme Olasılığı)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Sınırlayıcı parça uzunluğu polimorfizmi)

Rfu: Relative Fluorescence Units (Rölatif Floresan Birimi)

Rpm: Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)

Rs: Reference SNP ID number (SNP referans kimlik numarası)

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Tek nükleotid polimorfizmi)

STR: Short Tandem Repeats (Kısa tekrar dizileri)

T: Timin

TPI: Typical Paternity Index (Tipik Babalık İndeksi)

U: Urasil

VNTR: Variable Number of Tandem Repeats (Değişken sayıda ardışık tekrarlar)

1. Giriş ve Amaç

80'li yıllardan itibaren yapılan DNA (Deoksiribonükleik Asit) analizleri, adli alanda yeni bir dönemi başlatmıştır. Adli amaçlı DNA testlerinin gelişmesi ile akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi ve tecavüz, cinayet, hırsızlık gibi adli olgularda olay yerinde bulunan biyolojik delillerden yararlanarak faile ulaşılabilir (1,2). Biyolojik materyallerden elde edilen DNA profilleri sayesinde şüpheli şahıslar ile olay yeri ilişkilendirilebilmektedir.

Son 20 senedir adli kimliklendirmede yaygın olarak STR (Kısa ardışık tekrarlar-Short Tandem Repeats) lokusları kullanılmaktadır (3,4). STR lokusları günümüzde laboratuvarlarda halen kullanılmakla birlikte, olay yerinden gelen degrade biyolojik örneklerde tiplendirme sorunları yaşanmakta, birçok kez karşılaştırmaya yetecek tiplendirme sonuçları alınamamaktadır. Bu sorunu çözmek amacıyla degrade örneklerde dahi tiplendirme imkânı veren kısa DNA dizisine sahip mini STR'ler kullanılmaktadır (5). Son yıllarda ise aynı amaçla DNA üzerinde çok az yer kaplayan SNP (Single Nucleotide Polymorphism-Tek nükleotid polimorfizmi) ve InDel (İnseriyon- Delesyon) polimorfizmi gibi farklı DNA polimorfizm araştırmaları yapılmaktadır (2,6,7). Çünkü InDel ve SNP lokusları DNA üzerinde çok az yer kaplamaktadır.

InDel, genomdaki nükleotid veya nükleotidlerin, eklenmesi ve/veya çıkarılması sonucu oluşan polimorfizm çeşididir. Popülasyon ve kimliklendirme çalışmalarında InDel'lerin kullanımının en büyük nedeni; SNP ve STR'lerin özelliklerinin birçoğunun InDel'de bulunması, ayırım güçleri ve heterozigotluk oranlarının yüksek olmasıdır (8,9). Ayrıca popülasyonlar arasında iyi bir ayırım sağladığı için özellikle biyocoğrafik soy araştırmalarında ve kimliklendirme çalışmalarında tercih edilmektedir (9-11).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda otozomal InDel'ler ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmasına rağmen, gonozomal InDel'lerle ilgili pek çalışma bulunmamaktadır. Her iki cinsiyette bulunan X kromozomundaki InDel lokusları kullanılarak çeşitli olguların çözümünde kullanılmaktadır. Adli kimliklendirmede kullanılmak üzere araştırılan tüm

polimorfik sistemlerin olgu aydınlatmada kullanılabilmesi için öncelikle her lokusun ilgili toplumdaki gen sıklıklarının ve dağılımlarının bilinmesi gerekir.

Bu tez çalışmasının amacı; yeni geliştirilen X kromozomu üzerinde bulunan 22 InDel lokusunun (rs2307557, rs67705557, rs72434864, rs59400186, rs2307741, rs16367, rs2307762, rs16368, rs16632, rs16680, rs25581, rs16397, rs3048996, rs25582, rs11297248, rs199639085, rs2308280, rs71948836, rs397825417, rs16460, rs62954660, rs67588758) Türkiye'deki gen sıklığı belirlenerek ülkemizdeki adli laboratuvarlarda kullanımını sağlamaktır.

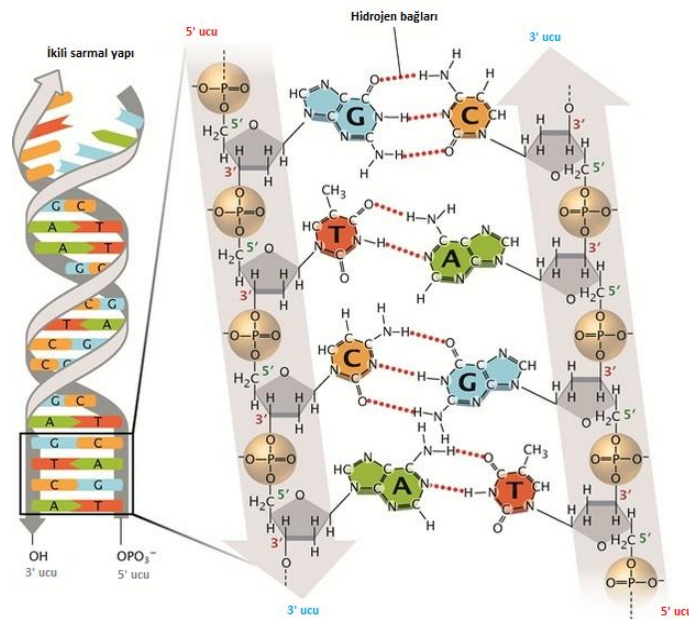


2. Genel Bilgiler

2.1. Moleküler Genetikten Adli Genetiğe Geçiş

2.1.1. DNA'nın keşfi

1800'lü yıllardan itibaren genlerin ve yapılarının anlaşılması için genetik (kalıtım) üzerine yapılan çalışmalar ile 1869 yılında DNA, İsveçli bilim adamı Friedrich Miescher tarafından, ilk kez izole edilmiştir. Kan hücrelerinden fosforca zengin bir yapı izole etmiş ve bu yapıya “nüklein” adını vermiştir (12). 1910 yılında Amerikalı zoolog Thomas Hunt Morgan sirke sinekleri ile yaptığı çalışmalarda genlerin kromozomların üzerinde olduğunu bulmuştur (13). Kanadalı bilim adamları Oswald Avery, Colin MacLeod, Maclyn McCarty ve İngiliz doktor Frederick Griffith bakteriler ile yaptıkları deneyler sonucunda kalıtsal materyalin DNA olduğunu keşfetmişlerdir (14). 1952 yılında Alfred Hershey ve Martha Chase'in bakteriyofaj (T2 fajı) ile yaptıkları deneyle DNA'nın genetik materyal olduğu kesin olarak kanıtlanmıştır (15). 1953'te DNA'nın fiziksel ve kimyasal yapısı (şekil 1) James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins, Erwin Chargaff ve Rosalind Franklin tarafından keşfedilmiştir (16).



Şekil 1: DNA'nın yapısı (17)

2.1.2. Adli genetikte DNA'nın yeri

20. yüzyılın sonlarına doğru moleküler genetik alanındaki gelişmeler, insan genomu üzerinde bulunan polimorfik özelliklerin direkt olarak DNA tabanlı araştırılmasına olanak tanımıştır. Bu da adli amaçlı DNA analizlerinin temelini oluşturmuştur. Adli DNA analizleri, dışlama üzerine kurulmuştur. Olay yerinden ve şüpheliden alınan biyolojik delillerden DNA profilleri elde edilir ve karşılaştırılır. DNA'nın %99,9'luk kısmı tüm bireylerde aynıdır ve %0,1'lik kısmı bireyler arasında farklılık göstermektedir. Adli olgularda tüm genomun analiz edilmesi mümkün değildir. Onun için her bir polimorfik lokusun toplumda hangi sıklıkta ve ne şekilde görüldüğünü bilmemiz gerekir. Buna göre iki DNA profilinin aynı kişiye ait olup olmadığı söylenebilir (18).

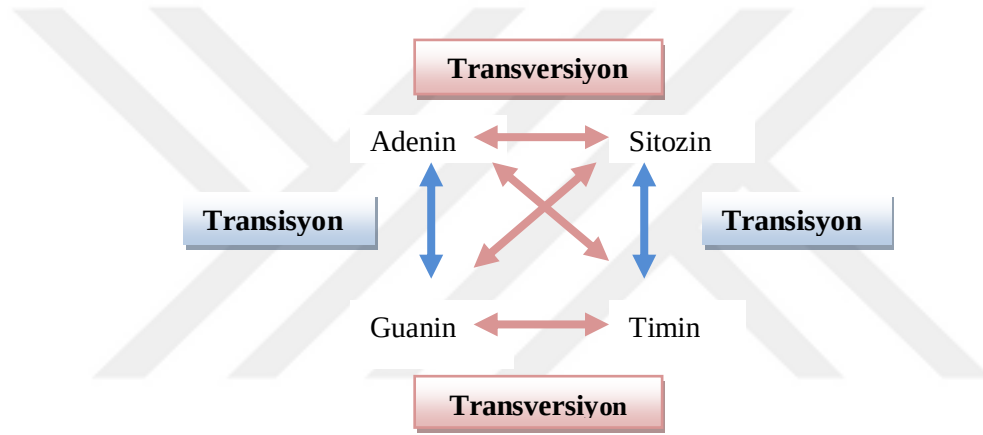
2.2. Gen Mutasyonu

Gende veya kromozomda, kendiliğinden veya çeşitli etkenlerle meydana gelen kalıtsal değişikliklere “mutasyon” denir. Bir genin mutasyonu sonucunda ilgili gen için yeni bir alel oluşturulur. Aynı genin ikinci kez ve ilkinden farklı bir mutasyonu daha gerçekleşecek olursa yeni bir alel daha meydana gelir ve böylece aynı karakter için çok alellik (multiple allelic) gerçekleşir. Bu da çeşitliliğe neden olur. Tripletlerden (kodonlardan) meydana gelen genetik şifrelerde görülebilecek bir değişiklik ile kodonlar tarafından kodlanan aminoasitlerde (sonlandırma kodonları hariç), hasara neden olabilir; dolayısıyla aminoasitlerin işlevlerini yerine getirmelerine engel olabilir. Genlerin ifade edilmesini engelleyen, translasyonun zamanından önce sonlanmasını sağlayan çeşitli gen mutasyonları vardır (19).

2.2.1. Baz değişimi (nokta) mutasyonları

Eğer bir nokta mutasyonu gamette ya da gamet oluşturan bir hücrede ortaya çıkarsa bu mutasyon yeni bireylere ve gelecek nesillere aktarılabilir. Eğer mutasyon fenotipi olumsuz yönde etkilerse bu durum bir kalıtsal bozukluk olarak adlandırılır (20).

Nükleotidlerdeki baz değişimleri iki şekilde görülebilmektedir. Pirimidin (timin, sitozin) bazı bir pirimidin bazıyla veya pürin (adenin, guanin) bazı bir pürin bazıyla yer değiştirirse **karşılıklı geçiş (transisyon) mutasyonu** oluşur. Bir pirimidin bazı, bir pürin ile yer değiştirirse **çapraz geçiş (transversiyon) mutasyonu** oluşur (şekil 2)(19).



Şekil 2: Transisyon ve transversiyon mutasyonları şeması (21)

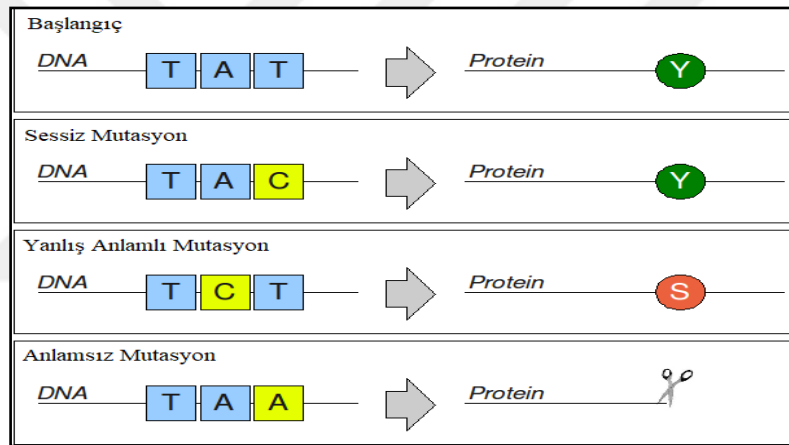
2.2.2. Sessiz, yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyonlar

DNA üzerinde gerçekleşen değişikliklerin çoğu mutasyon olarak kabul görse de, fenotip üzerinde gözle görünür değişikliğe neden olmayan mutasyonlar da bulunmaktadır. Bu tarz mutasyonlar genin ifade edilmesini etkilemedikleri için **sessiz mutasyon (silent mutation)** olarak adlandırılır (şekil 3). Genin aminoasit tercüme edilmeyen “intron” adı verilen bölgesinde baz değişiminin meydana gelmesi de sessiz mutasyona neden olur (19).

Kodonların anlamlarının değişmesine ve doğru anlamda olmayan aminoasiti kodlamalarına neden olan nokta mutasyonlara **yanlış anlamlı mutasyon (missense mutation)** denir (şekil 3)(19). Bu mutasyonlar çoğunlukla hücre fonksiyonunu bozan,

kullanışsız ya da daha düşük aktiviteli bir proteinin yapımına neden olarak zararlı etki gösterir (20).

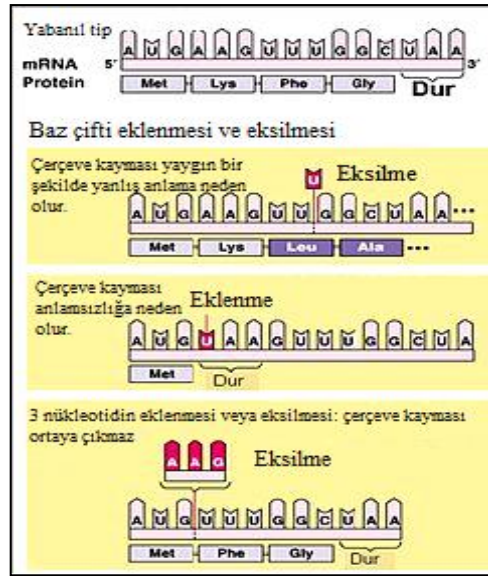
Çoğu zaman gen mutasyonları aminoasit kodlayan kodonun, dur anlamına gelen üçlü nükleotid gruplara (UGA, UAA, UAG) dönüşmesine ve dur sinyali vermesine neden olabilmektedir. Bu tip mutasyona **anlamsız mutasyon (nonsense mutation)** denir (şekil 3)(19). Anlamsız mutasyonun gen dizisinde başlangıç kısmında veya orta kısımlarında meydana gelmesiyle, translasyon zamanından önce sonlanacak ve zincirin erken sonlanmasına neden olacaktır. Başka bir deyişle, protein molekülünün sadece bir kısmının sentezlenmesine neden olacaktır. Bu şekilde üretilen protein işlevsel değildir (19, 20).



Şekil 3: Sessiz, yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyonun şeması (22)

2.2.3. Çerçeve kayması mutasyonları

DNA'daki bazlara bir ya da daha fazla, üç ve üçün katlarında olmayan sayıda nükleotidin insersiyonu (eklenme) ve delesyonları (çıkarılma) sonucunda kodonların değişmesine yol açan mutasyonlara **çerçeve kayması mutasyonları (frame-shift mutations)** adı verilir (şekil 4)(19). Bu mutasyon, gen dizisinin sonuna yakın bir bölgede gerçekleşmezse işlevsel olmayan bir protein üretiliecektir (20).



Şekil 4: Çerçeve kayması mutasyonu (23)

2.3. Genetik Polimorfizm

Bireyler arasındaki fenotipik değişikliğin küçük bir kısmı, mutasyon olarak adlandırılan, nükleotidlerdeki kalıcı olabilen ve kalıtılabilen değişikliklerden kaynaklanır. Bir genin, bir ve/veya iki alelinde meydana gelen mutasyonlarla, gene bağlı hasarlar görülür. Ancak bir gende mutasyonun var olması ve bu mutasyonun kişide fenotipik değişikliğe neden olması bu mutasyonun diğer nesillere aktarılacağı veya toplumda görülme sıklığının yüksek olduğunu göstermez. Genomda meydana gelen bir değişiklik genel olarak popülasyonda bir farklılığa neden oluyorsa söz konusu değişim mutasyon değildir. Bu noktadan sonra “polimorfizm”den söz etmeye başlıyoruz demektir (24). Polimorfizm, alellerin %1'den daha yüksek bir frekansta görüldüğü bir lokusta, çoklu alellerin oluşumu olarak tanımlanır. Polimorfizmi mutasyondan ayıran görülme sıklığındaki bu farktır (25). Mutasyonlar canlıların üreme potansiyellerini ve canlılıklarını sürdürebilmelerini doğrudan etkilediğinden toplumdaki görülme sıklıkları polimorfizme göre daha azdır (26). DNA polimorfizmleri genlerin protein kodlayan (ekzon) ya da kodlamayan (intron) bölgelerinde görülür ve Mendel kurallarına uygun şekilde

kalıtılırlar (20,25). Genomun yaklaşık % 23'ü kodlanmayan bölgeden, % 1,5'u kodlama yapan ve düzenleyici bölgeden, % 9'u ise tekrar dizilerinden oluşmaktadır (27).

Genetik polimorfizmler ikiye ayrılır. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ve insersiyon-delesyon polimorfizmi (InDel) içeren **dizi polimorfizmleri** ve minisatalit (VNTR) ve mikrosatalitleri (STR) içeren **uzunluk polimorfizmleri**dir (27-30). Bu genetik işaretlerin adli genetikte kimliklendirme amaçlı kullanılabilmesi için popülasyonda görülme sıklıklarının araştırılması gerekir. Gen sıklıkları, mutasyon ve doğal seleksiyon gibi nedenlerle değişikliğe uğrayabilir (28).

2.4. Adli Genetikteki Gelişmeler ve Polimorfizm Sistemleri

2.4.1. HLA (İnsan Lökosit Antijeni-Human Leukocyte Antigen) sistemi

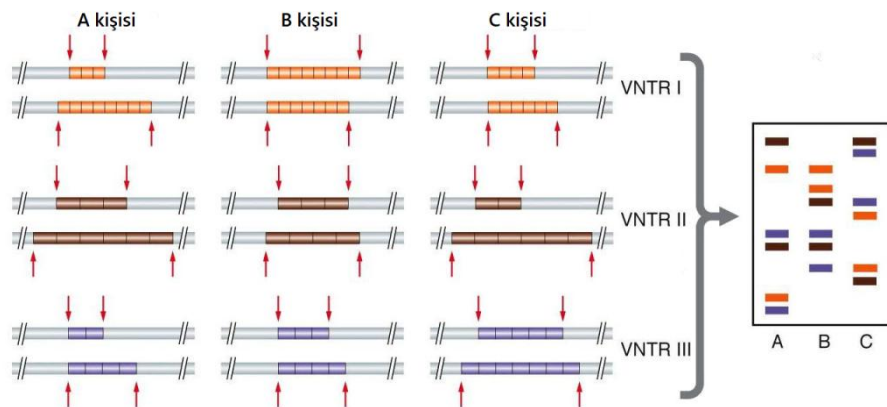
Biyolojik örnekler adli olgu aydınlatılmasında ilk kez, 1901 yılında Karl Landsteiner tarafından keşfedilen, insan kan grupları (ABO antijenleri) kullanılmıştır. 1955'te serum proteinlerinde genetik polimorfizmler tanımlanmıştır. Bunları eritrosit enzimidaki polimorfizmler ve lökositlerde bulunan HLA (İnsan Lökosit Antijeni- Human Leukocyte Antigen) sistemi izlemiştir. HLA, yüksek derecede polimorfik olup 4.000'den fazla aleli tanımlanmıştır (29).

2.4.2. VNTR (Değişken sayıda ardışık tekrarlar-Variable Number Tandem Repeats)

Adli genetikte DNA analizleri, ilk olarak 1984 yılında RFLP (Sınırlandırılmış parça uzunluk polimorfizmi-Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemine dayalı minisatalit (VNTRs- Değişken sayıda ardışık tekrarlar- Variable Number Tandem Repeats) ile başladıysa da oldukça kısa süre kullanıldı. DNA parmak izi (DNA fingerprint) olarak adlandırılan bu yöntem ilk olarak 1985 yılında Alec Jeffreys tarafından kullanılmaya başlandı.

İlk olarak, bir çocuğun aile üyesi olduğunu göstermek için kullanılmış ve DNA'nın dışlama dışında da kullanılabileceği gösterilmiştir (1,30).

VNTR'ler 6-100 bç (baz çifti)'lik (1 kb (kilobaz)= 1000 bç) tekrarlardır. Bunların kromozom içerisindeki dağılımı eşit değildir ve büyük kısmı, yaklaşık % 80'i, telomere yakın bölgelere konumlanmıştır (24,27). Çok sayıda farklı uzunlukta alele sahip olduklarından bireyleri birbirinden ayırt etme güçleri yüksektir (şekil 5). Değişken sayıda ardışık tekrarlar, adli vakalarda DNA profillemesinde kullanılan ilk polimorfizm çeşididir. Uzun ampliconlara sahip oldukları için analizlerinde PCR aşaması yerine, DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesiminin ardından, Southern blot tekniği kullanılır (RFLP). Yüksek kalitede ve büyük miktardaki DNA ile çalışıldığında başarılı tiplendirme yapılabildiği için yerini kısa ardışık tekrarlar (STR) almıştır (1,4).

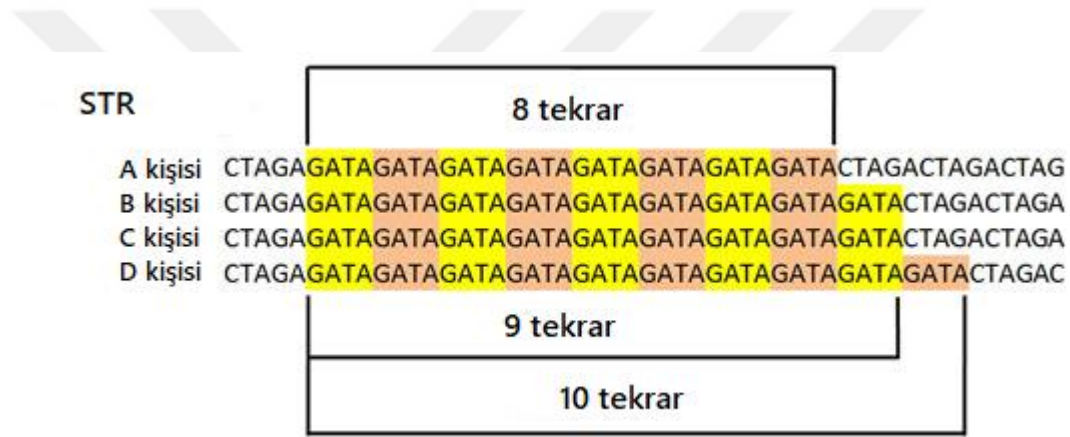


Şekil 5: VNTR (31)

Kısa bir süre sonra PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu-Polymerase Chain Reaction) yöntemi keşfedildi. Bu yöntemin en büyük avantajı, az miktardaki DNA ile analiz yapılabilmesidir. DNA üzerinde, istenilen bölgelerin milyonlarca kopyası elde edilebilmektedir (1,30).

2.4.3. STR (Kısa ardışık tekrarlar-Short Tandem Repeats)

1991 yılında DNA’da daha az yer kaplayan ve çevresel faktörlerden daha az etkilenen STR (Kısa ardışık tekrarlar- Short Tandem Repeats) lokusları çalışılmaya başlandı (32,33). 2-6 bç’lik birimlerin ardışık tekrar etmesiyle oluşmuşlardır. Bireyden bireye değişen tekrar sayılarındaki farklılıklar polimorfizm olarak adlandırılır (şekil 6). Ortalama olarak 6 kb’da bir STR lokusu bulunmaktadır. Yüksek mutasyon oranına sahiptirler. Amplikon uzunlukları genellikle 100-400 bç arasındadır. Degrade DNA örneklerinin uzunlukları 200 bç’nden daha kısadır. Bu nedenle degrade örneklerde tiplendirilmeleri zordur (24,34).



Şekil 6: STR (35)

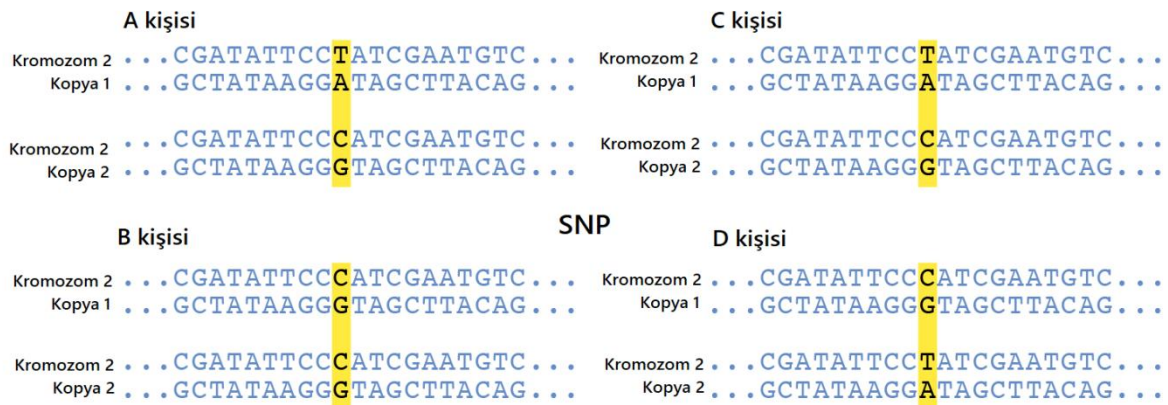
Bu gelişmeler ile DNA analizi tekniklerinin yetersizliği nedeniyle uzun yıllar cezaevinde kalan masumların beraat etmesi için, 1992 yılında Masumiyet Projesi (Innocence Project) ortaya çıkmıştır (36).

2.4.4. SNP (Tek nükleotid polimorfizmi-Single Nucleotide Polymorphism)

Temelleri 1980’li yılların başlarında atılmış olan İnsan Genom Projesi-İGP (Human Genome Project-HGP) ile, 1990-2003 yılları arasında gerçekleştirilen, sayısı ve kimliği gizli tutulan gönüllülerden alınan örneklerden insan genomunun tümü dizilenmiştir (37). Bu projenin en büyük getirilerinden biri de SNP (Tek nükleotid polimorfizmi- Single Nucleotide

Polymorphism) lokuslarının keşfedilmesidir. Bu keşifle adli kimliklendirme ile ilgili çalışmalar farklı bir boyut kazanmıştır.

Proteinin işlevini etkileyen SNP'ler DNA'nın kodlayan bölgelerinde yer alırlar. Ancak çoğu SNP'nin fenotip üzerine etkisi bulunmamaktadır. Bu tarz SNP'ler "nötr SNP" olarak adlandırılırlar. DNA'da kodlama yapan bölgede görülme sıklığı 1-3 kb, kodlama yapmayan bölgede görülme sıklığı 0.5-1 kb'dır (24,26). En sık görülen polimorfizm tipidir (Şekil 7). İnsan genomunda yaklaşık olarak 3-10 milyon arasında SNP varyantı olduğu tahmin edilmektedir (38). Adenin ve guanin insanlarda en çok gözlemlenen tek nükleotid değişimidir (26). SNP'nin analizinde çok basamaklı prosedüre ihtiyaç vardır (39). SNP'ler, STR'ye göre daha düşük mutasyon oranına ve daha kısa amplikonlara sahiptir.



Şekil 7: SNP (40)

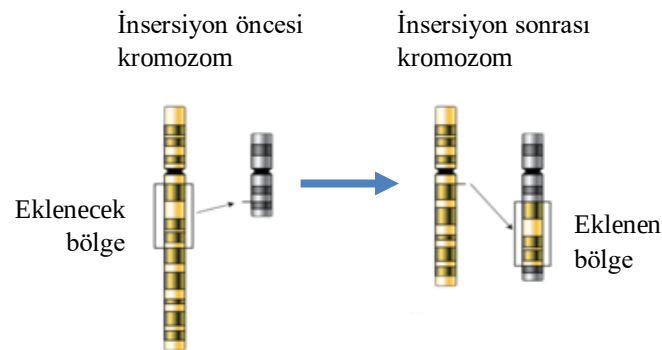
Örneklerin azlığı ve eski DNA teknolojileriyle analizlerin sonuç vermemesi nedeniyle çözülemeyen adli vakalar, yeni DNA teknolojileriyle çözülmeye başlanmıştır (Tablo I). Son yıllarda adli genetikte STR ve SNP'ye ek olarak InDel (insersiyon-delesyon) polimorfizmi de kullanılmaya başlanmıştır.

Tablo I. Adli DNA analizlerindeki bazı gelişmeler

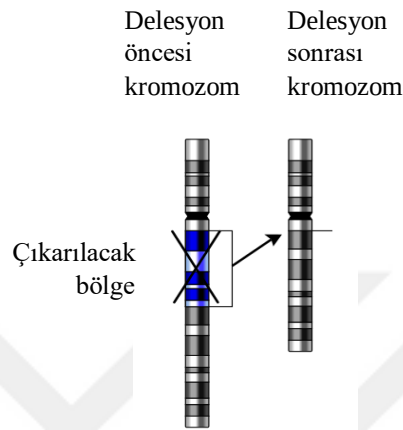
1901,	HLA SİSTEMİ
1980,	RFLP
1984,	VNTR
1985,	DNA PARMAK İZİ
1985,	PCR
1986,	DNA PROFİLLEMESİ
1991,	STR
1992,	MASUMİYET PROJESİ
2000,	SNP
2002,	INDEL
2003,	İNSAN GENOM PROJESİ

2.4.5. InDel (İnseriyon-Delesyon) polimorfizmi

İnseriyon (ekleme), bir ya da daha fazla sayıda nükleotid çiftinin bir gene ilave edilmesiyle ortaya çıkan mutasyondur. Nükleotid eklenen gen, protein kodlayan bir gen ise aminoasit dizilimi değişeceği için ortaya çıkan protein işlevini kaybedecektir (4, 35). İnseriyonun oluşumu Şekil 8’de gösterilmiştir.

**Şekil 8:** İnseriyonun oluşumu (41)

Delesyon (çıkartılma, eksilme), bir genden bir ya da daha fazla sayıda nükleotid çiftinin mutasyonal kaybıdır. Gen eğer protein kodlayan bir gen ise proteinin aminoasit dizisinde de değişim olacağından insersiyondaki gibi protein işlevini yitirecektir (4, 35). Delesyonun oluşumu Şekil 9’da gösterilmiştir.



Şekil 9: Delesyonun oluşumu (42)

InDel, genomdaki bir veya birkaç nükleotidin eklenmesi ve/veya çıkarılması sonucu oluşan polimorfizm çeşididir. Weber ve arkadaşları 2002 yılında yaklaşık 2.000 dialelik InDel polimorfizmini tanımlayarak 4 popülasyon grubunu (Avrupalılar, Afrikalılar, Japonlar, Amerikan Yerlileri) çalışarak alel frekanslarını belirlemişlerdir (43).

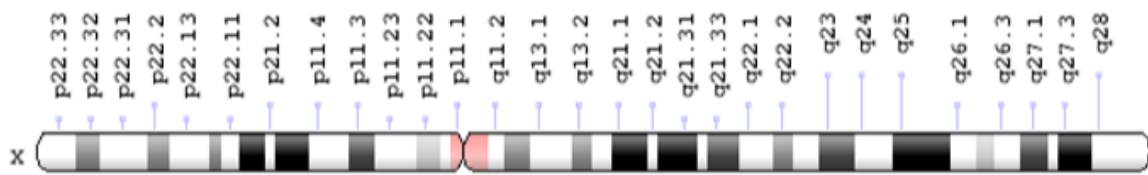
InDel’lerde multialelik (çoklu alelik) olabildiği gibi sadece dialelik (ikili alelik) de söz konusu olabilmektedir. InDel’ler insandaki tüm dizi polimorfizmlerinin %16 ile %25’ini oluşturmaktadır. Bunların % 8’i dialeliktir (43,44). Mills ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmayla genomda 7.2 kb’da bir InDel polimorfizmi görüldüğünü ve InDel’lerin, SNP’den sonra genomda en sık rastlanan ikinci polimorfizm şekli olduğunu bildirmişlerdir (9,45). Dialelik içeren fragmanın uzunluğu, bir bç olabileceği gibi yüzlerce kbç de olabilir. InDel’lerin ampikon uzunlukları 70-250 bç arasındadır (43,44). Az miktarda ve degrade olan biyolojik örneklerden başarılı DNA profilleri elde edilebilmektedir. SNP’lere göre daha az

maliyetle ve kısa zamanda genotipleme yapılabilir. STR'lerin aksine düşük mutasyon oranına sahiptirler. Karışık (mixture) DNA'nın analizi STR'lere kıyasla daha kolaydır (33,39,44).

InDel'lerin genomda çok sayıda bulunması ve kolay analiz edilmesi, InDel'lerin adli DNA analizleri için elverişli hale getirmektedir (33). Ayrım güçleri ve heterozigotluk oranları yüksektir (46). Alel frekansları coğrafik olarak ayrılmış popülasyon grupları arasında farklılık göstermektedir (33). InDel'ler biyojeografik soy, etnik karışımlar, antropoloji ve popülasyon belirleme çalışmaları da dahil olmak üzere popülasyon genetiğinde de kullanılabilir (44,47). Biyocoğrafik soy araştırmalarında ve toplu ölümlerde kimliklendirmede son yıllarda tercih edilmektedir (9, 33). Elektroforez sonrası analizde artefakt pik (stutter peak) görülmez. Birçok InDel lokusunu tek reaksiyonda multipleks (çoklu) olarak çalışılabilme kapasitesi yüksektir (44).

2.5. X Kromozomu ve InDel Polimorfizmi

İnsanların X ve Y olmak üzere iki cinsiyet kromozomu vardır. Kadınların hücrelerinde iki X kromozomu vardır. Erkeklerde ise hücrelerinde X ve Y kromozomları bulunur. Yumurta hücrelerinin hepsi bir X kromozomu içerirken, sperm hücreleri bir X veya bir Y kromozomu içerir(48,49).



Şekil 10: X kromozomu diyagramı (49)

X kromozomu yaklaşık 155 milyon DNA baz çiftini kapsar ve hücrelerdeki toplam DNA'nın yaklaşık %5'ini temsil eder (Şekil 10). Protein sentezi 800-1.400 gen tarafından yapılmaktadır (48,49).

InDel'ler hem otozomal (somatik) hem de gonozomal (cinsiyet) kromozomlar üzerinde bulunmaktadır. X kromozomu, karakteristik özelliklerinden dolayı popülasyon genetiği ve adli genetik çalışmalarında önem kazanmıştır. Her jenerasyonda, her iki cinsiyette de bulunup, erkeklerde hemizigottur.

X'e bağlı InDel'ler kullanılarak özellikle baba ve kız çocuğu arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde kullanılabilir. İki kız kardeşin aynı babadan olup olmadığının belirlenmesinde, encest olgularında ve babanın hayatta olmadığı veya bulunmadığı durumlarda; babaanne-kız çocuğu arasındaki geçişten yararlanarak babalık belirlenmesi yapılabilmektedir (9, 33,50).

2.6. Popülasyon Genetiği

2.6.1. Popülasyon genetiği ile ilgili bazı kavramlar

Popülasyon, aynı türe ait bireylerden oluşmuş belirli bir alanda bulunan bir gruptur. **Tür** ise, bireyleri doğal yollarla kendi içerisinde eşleşme yeteneğine sahip ve verimli yavrular meydana getiren bir popülasyon grubudur.

Alel, bir lokustaki DNA dizisinin, genin, alternatif versiyonuna denir. Bir popülasyondaki genlerin toplam miktarına o popülasyonun **gen havuzu** adı verilir. Bu popülasyonda tüm gen lokuslarındaki bütün aleller bulunur. Canlının görünür özelliklerine **fenotip**, genetik yapısına ise **genotip** denir.

Varyasyon, aynı türün bireyleri arasındaki özelliklerde görülen farklılıklara denir. Doğal seçim için ham maddedir. Eşeyli üreme ve mutasyonlar, varyasyonu yaratır (20).

2.6.2. Popölasyon genetiğinin temelleri: C. Darwin ve G. Mendel

Modern biyolojinin gelişmesi ile popölasyon ve popölasyon genetiği ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Charles Darwin ve Gregor Mendel'in çalışmaları ile popölasyon genetiği gelişmeye başlamıştır. Darwin, 1859 yılında yayınlanan "Türlerin Kökeni" adlı eserinde 2 önemli noktayı tespit etmiştir:

1. Dünyada yaşayan türler, atasal türlerinden türemiştir.
2. Evrimleşme, doğal seçilim mekanizması ile gerçekleşmiştir.

Doğal seçilim, popölasyon içinde yer alan ve diğer bireylere göre daha fazla sayıda döl meydana getirmek için belirli kalıtsal özelliklere sahip bireylerin kuşaklar boyunca zamanla değişmesidir. Başka bir değişle; organizmaların belirli bir çevrede üremesini, yaşamasını kolaylaştıran kalıtsal özelliklerin etkili olması durumudur. Darwin, kalıtılabilen varyasyonların evrimleşmeye yol açabileceğini anlamış olmasına karşın yavruların neden ebeveynlerine benzerlik gösterdiğini ancak birbirlerinin aynı olmadıklarını açıklayamamıştır.

Mendel, kalıtımın temel prensiplerini bezelyelerde planlamış, çaprazlama deneyleri yaparak geliştirmiştir. Sonuç olarak birbiri ile bağlantılı dört görüş ileri sürmüştür:

- Aleller, yeni nesillere aktarılan karakterlerdeki varyasyonlardan sorumludurlar.
- Bir canlı sahip olduğu her karakter için, annesinden ve babasından kalıtımla gelen, 2 alel taşır.
- Eğer 2 alel farklı ise, alellerden biri canlının görünümünde tamamiyle etkili olan **baskın (dominant) alel**, diğerisi ise canlının genel görünümünde gözle görünür hiçbir etkisi olmayan **ekinik (resesif) alel**dir.
- Her bir karakterin 2 aleli, gamet oluşumu sırasında ayrılır (dağılır).

Darwin'in tespitlerinde yer almayan, bir popülasyonda varyasyonların nasıl çıktığı ve bunların ebeveynlerden yavrulara nasıl aktarıldığını açıklayan “kalıtım” kavramı olmuştur. Mendel, kalıtımın temel prensiplerini açıklayarak Darwin'in görüşündeki eksiklikleri tamamlamıştır (51,52).

2.7. Adli Genetikte İstatistiksel Yaklaşımlar

Araştırmacılar elde edilen biyolojik verileri matematik biliminden yararlanarak sayısal veriler ile somutlaştırmaya çalışmışlardır. Bu amaçla çok sayıda formüller, yaklaşımlar, parametreler vb. ortaya çıkmıştır. Popülasyon çalışmalarında lokusların alel frekansları, beklenen-gözlenen heterozigotluk değerleri ve Hardy-Weinberg dengesi (HWD) araştırılmaktadır. Alel sıklıkları popülasyonlar arasında farklılık gösterir. Bu farklılık birbirine yakın olan popülasyonlarda uzak olanlara nazaran daha azdır (53).

Adli istatistikte sadece ilgili lokusların özellikleri karşılaştırıldığında, rastlantısal benzerliğin istatistiksel olarak hesaplanması gerekir. Bu lokusların belirli parametreleri (ayrım gücü, eşleşme olasılığı vb.) hesaplanarak her bir lokusun olgu çözümündeki gücü belirlenir.

2.7.1. Hardy-Weinberg prensibi

1908 yılında Alman fizikçi Wilhelm Weinberg ve İngiliz matematikçi Godfrey Harold Hardy tarafından bulunan Hardy-Weinberg (HW) prensibi; doğal seleksiyon ve göçün olmadığı, mutasyonların görülmediği, sınırsız büyüklükte olan ve bireyleri rastgele eşleşen bir popülasyonun bir sonraki neslinde alel frekanslarının değişmeyeceğini, dolayısıyla popülasyonun evrimleşmeyeceğini ifade etmektedir. HW prensibi, Mendel kalıtımının bir kuşaktan diğerine kalıtsal varyasyonun nasıl korunduğunu açıklar (20,53).

Hardy-Weinberg eşitliğine göre;

$$p+q=1\text{'dir.}$$

P, gözlenen homozigot dominant karakteri temsil ederken; q ise, gözlenen homozigot resesif karakteri temsil etmektedir. Bireylerin genotipi, p ve q alellerini taşıyan sperm ile yumurtanın döllenmesi sonucu oluşur. Bu nedenle;

$$p^2+2pq+q^2=1\text{'dir.}$$

İki aleli olan bir lokusun, ilgili popülasyondaki alel frekansları p ve q ise, beklenen genotip frekansları da

$$p^2, 2pq, \text{ ve } q^2 \text{ dir.}$$

Burada pq heterozigot karakteri temsil etmektedir.

Bir popülasyon Hardy-Weinberg Dengesi'ne ulaştığında; bu frekans dağılımı nesilden nesile değişmeyecektir. Yani atasal popülasyonun gen havuzundaki alel frekansları ile sonraki kuşağın gen havuzundaki alel frekansları sabittir. Beklenen genotip ile gözlenen genotip dengededir. Tamamen aynı olması beklenmez. Çünkü bireyler rastgele seçilmiştir (20,53).

Hardy-Weinberg prensibini ikiden daha fazla aleli olan lokuslara uygulamak mümkündür. Bu durumda beklenen genotip frekansları popülasyonda ayrılan bütün k alellerinin multinom açılımı ile verilir: $(p_1 + p_2 + p_3 + \dots + p_k)^2$.

Gözlenen ve beklenen genotip frekansları hesaplandıktan sonra popülasyonun Hardy-Weinberg Dengesi'nde olup olmadığına bakmak için Ki-kare testi yapılır.

Bunun için;

$$\chi^2 = \sum \frac{(G-B)^2}{B} \quad \text{formülü kullanılır.}$$

G= Gözlenen genotip frekansı

B= Beklenen genotip frekansı

Ki-kare değeri hesaplandıktan sonra değere karşılık gelen olasılık değeri (p değeri-probability value- p)'ne bakılır. $P \leq 0.05$ ise, sapma önemlidir ve popülasyonda denge yoktur. $P \geq 0.05$ ise, sapma istatistiksel olarak anlamlı değildir ve popülasyon dengededir (54).

Hesaplanmak istediğimiz değerleri manuel olarak hesaplayabileceğimiz gibi “Arlequin” gibi programlar kullanarak da hesaplanabilir (55).

2.7.2. Adli istatistiksel parametreler

Adli amaçlı incelemeler ve nesep tayini analizlerinde kullanılan çeşitli parametreler bulunmaktadır. Bu parametreler, olgu aydınlatmada, ilgili lokusların gücünü göstermektedir. Bu parametreler; rastlantısal olarak seçilmiş iki kişinin farklı genotipe sahip olma olasılığını gösteren **ayırım gücü** (power of discrimination- PD), rastlantısal olarak seçilmiş iki kişinin aynı genotipe sahip olma olasılığını gösteren **eşleşme olasılığı** (probability of match- Pm), toplumdan rastgele seçilmiş bir bireyden farklı olan bireylerin oranını gösteren **dışlama gücü** (power of exclusion- PE), bir lokusun polimorfik seviyesini gösteren **polimorfik bilgi içeriği** (polymorphism information content- PIC), baba olduğu düşünülen kişinin biyolojik baba olma olasılığını gösteren **tipik babalık indeksi** (typical paternity index- TPI) olarak tanımlanabilir (Tablo II) (56).

Tablo II. Adli istatistik parametrelerin formülleri (27).

Adli istatistik parametreler	Formüller
Ayrım Gücü	$PD = 1 - P_m$
Eşleşme Olasılığı	$P_m = \sum_{k=1}^m p_k^2$
Dışlama Gücü	$PE = h^2(1 - 2hH^2)$
Polimorfik Bilgi İçeriği	$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + \sum_{i=1}^n p_i^4$
Tipik Babalık İndeksi	$TPI = (H + h) / 2H$

*H (homozigot), h (heterozigot), p_k (her farklı genotipin sıklığı), m (farklı genotiplerin sayısı), p_i (her farklı genotipin sıklığı), n (farklı alellerin sayısı).

Adli istatistiksel parametreler formüller (Tablo II) kullanılarak manuel hesaplanılacağı gibi “PowerStats Microsoft® Excel dosyası” programı kullanılarak da hesaplanabilir (55).

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

İki popülasyon arasındaki genetik farklılıkları ölçmek amacıyla, bir araya getirilen iki popülasyondaki gametlerin oranına göre, iki popülasyondaki rastgele seçilmiş gametler arasındaki korelasyonu veren F istatistiği kullanılabilir. Popülasyon genetikçisi Sewall Wright, hem popülasyonlar arasındaki hem de popülasyonlar içindeki fiksasyon indekslerini (F_{IS} , F_{IT} ve F_{ST}) kullanarak bir yöntem geliştirmiştir. F_{ST} , ırklar arasındaki genetik farklılaşmanın ölçütüdür. F_{ST} 0-1 arasında bir değer alır. Popülasyonlar birbirlerinden farklılaşmışsa ve aralarında gen akımı yoksa F_{ST} değeri 1’e yakın olur (57,58).

Eğer F_{ST} değeri;

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

0.05 - 0.15 arasında bir değerse orta düzeyde genetik farklılaşma,

0.15 - 0.25 arasında bir değerse büyük bir genetik farklılaşma,

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

F_{ST} şu formül ile hesaplanır:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_E}{H_T}$$

F_{ST} = Popülasyonlar arası standardize varyans,

H_E = Alt popülasyonlarda beklenen heterozigotluk ortalaması,

H_T = Tüm popülasyonlardaki heterozigotluk ortalaması.

Çeşitli popülasyonların popülasyonlar arası farklılaşmasının (F_{ST}) hesaplanması Arlequin v.3.5.1.2 programı ile yapıldı. Bulunan F_{ST} değerleri ile Mega X v.10.0.5 programında “komşu birleştirme” yöntemi kullanılarak filogenetik ağaç çizildi.

2.8. Veri Analizlerinde Kullanılan Programlar

2.8.1. Arlequin 3.5

Arlequin programının amacı, popülasyon verilerinden yararlanarak genetik ve demografik özellikler hakkında bilgi elde etmek için, popülasyon genetiği kullanıcılarına oldukça geniş istatistiksel testler sunmaktır. Bu testler ile DNA dizi, RFLP, DNA mikrodizinler ve alel sıklığı gibi verilerin analizi gerçekleştirilmektedir.

Arlequin analizleri, iki ana kategoriye ayrılabilir; popülasyon içi ve popülasyonlar arası yöntemler. Birinci kategoride istatistiksel bilgiler her popülasyondan bağımsız olarak çıkarılır, ikinci kategoride ise örnekler birbirleriyle karşılaştırılır. Popülasyon içi; bağlantı dengesizliği (LD, Linkage Disequilibrium), Hardy-Weinberg kesin testi, standart endeksler, moleküler çeşitlilik, haplotip frekansı tahmini, gametik faz tahmini gibi testlerden oluşmaktadır. Popülasyonlar arası ise; F-istatistiği ve popülasyonlar arası ilişkiler, çoklu genotiplere ait gametik faz değerlendirmeleri, moleküler çeşitlilik analizi (AMOVA) ve popülasyon farklılaşması gibi testlerden oluşmaktadır (59).

2.8.2. Genetix 4.0.5

Bu program ile genotip verileri istenilen genetik analiz yazılım formatına (Arlequin, Genepop, FSTAT, Biosys) dönüştürebileceği gibi genetik uzaklık, bağlantı dengesizliği, permütasyona dayalı analizler gibi testler de uygulanabilmektedir. Genotip verileri manuel olarak girebileceği gibi Microsoft® Excel dosyasına kayıtlı olan verileri de metin sekmeyle ayrılmış (.txt) formatında açabilir veya Microsoft® Excel dosyasındaki veriler kopyalanabilir (60).

2.8.3. PowerStats v.1.12

PowerStats, Microsoft® Excel çalışma sayfasına sahip standart yazılımla gerçekleştirilen bir yazılım dosyasıdır. Genotip verileri direkt olarak çalışma sayfasına yapıştırılabilir. Veriler girildikten sonra şablon otomatik olarak ırk ya da alt grup için parametre analizlerini yapar ve alel frekanslarını hesaplar (61).

2.8.4. MEGA X v.10.0.5

Mega (Moleküler Evrimsel Genetik Analizi) filogeni, uzaklık, çeşitlilik gibi analizlerin yapılmasına olanak sağlayan bir programdır. Program, çoklu gen dizisi grupları oluşturarak gruplar içindeki ve arasındaki çeşitliliğin hesaplanmasını kolaylaştırarak, genler ve türler arasındaki evrimsel ilişkileri ortaya çıkarır (62).



3. Gereç ve Yöntem

Bu tez çalışmasında Türkiye'deki tüm coğrafi bölgeleri homojen olarak kapsayan, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan, çalışmaya rıza gösteren 250 kişiden (126 erkek, 124 kadın) alınan ağız içi sürüntü (sıvap) örnekleri kullanıldı.

X kromozomu üzerinde bulunan 22 InDel (rs2307557, rs67705557, rs72434864, rs59400186, rs2307741, rs16367, rs2307762, rs16368, rs16632, rs16680, rs25581, rs16397, rs3048996, rs25582, rs11297248, rs199639085, rs2308280, rs71948836, rs397825417, rs16460, rs62954660, rs67588758) lokusu çalışılarak tiplendirilme yapıldı.

250 kişide, X kromozomu üzerinde bulunan 22 InDel (22-X InDel) lokusunun profilleri çıkarıldıktan sonra elde edilen verilerle istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Alel frekansları, Hardy-Weinberg dengesi, popülasyonlar arası farklılaşmanın (F_{ST}) hesaplanması için Arlequin v.3.5.1.2 yazılım programı; Genetix v.4.0.5.2 dosya formatı çevirici program ve adli istatistiksel parametrelerin hesaplanması için PowerStats (Promega) Microsoft® Excel dosyası programı kullanıldı. Filogenetik ağaç çizimi için ise Mega X v.10.0.5 programı kullanıldı.

Çalışmanın deneysel aşamaları İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik AR-GE Laboratuvarında bulunan demirbaş cihazlar ve laboratuvar ekipmanları ile gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması sırasında kullanılan cihaz, malzeme ve kitlerin listesi aşağıda detaylı bir şekilde verilmiştir.

3.1. Deneyde Kullanılan Gereçler

3.1.1. Cihazlar

- Derin Dondurucu (Delta)
- Buzdolabı (Altus)
- Otomatik Pipet (2,5 µl, 20 µl, 100 µl, 1000µl) (Eppendorf/ Research Plus)

- Vorteks (BioSan/ V-1 plus)
- Kuru Isıtıcı Blok (BioSan/ Bio TDB-100)
- Mikrosantrifüj (BioSan/ Microspin 12)
- Florometre cihazı (Thermo Fisher/ Fluorometer Qubit® 4.0)
- Isı Döngü Cihazı (Applied Biosystems/ Veriti Thermal Cycler)
- Bilgisayar kontrollü genetik analizör 310/3130 (Thermo Fisher Scientific/ ABI PRISM® 310/3130)

3.1.2. Ticari kitleler

- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)
- Quant-iT™ dsDNA HS (High Sensitive) Assay (Invitrogen)
- PCR Master Mix (Qiagen)
- Floresan (6FAM, VIC, PET, NED) ile işaretli primerler (Thermo Fisher Scientific)

3.1.3. Kapiler elektroforez aşamasında kullanılan kimyasallar

- Hi-Di™ (highly deionized) Formamide (Thermo Fisher Scientific)
- GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard (Thermo Fisher Scientific)
- Polimer Pop-4 (Performance Optimized Polymer 4) (Thermo Fisher Scientific)
- 10X EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) tamponu (Thermo Fisher Scientific)

3.1.4. Kit dışı kimyasal maddeler

- Etanol (%96'lık)
- PBS (Phosphate Buffered Saline) tamponu

3.2. Deney Aşaması

Süreç,

- Örneklerin toplanması
- DNA izolasyonu
- DNA miktarlarının belirlenmesi
- PCR
- PCR ürünlerinin ABI PRISM® 310 / 3130 genetik analiz cihazında elektroforezi
- Elektroforez sonrası verilerin analizi

aşamalarından oluşmaktadır.

3.2.1. DNA örneklerinin toplanması

Bu çalışmada İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulunca 16.12.2016 tarih, 214698 sayılı Etik kurul kararı (Ek-1) ile uygun görülerek “Bilgilendirmiş Olur Formu” nu (Ek-2) imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul eden, Adli Tıp Enstitüsü öğrencileri, İ.Ü.Cerrahpaşa öğrencileri ve gönüllü kişilerden oluşan, Türkiye’deki tüm coğrafi bölgeleri homojen olarak kapsayan, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan, 250 kişiden (126 erkek, 124 kadın) alınan ağız içi sürüntü örneği kullanıldı. Türkiye popülasyon verisi oluşturulurken TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) 2018 nüfus verilerinden yararlanıldı (63).

3.2.2. DNA izolasyonu ve DNA miktar tayini

Ağız içi sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu QIAamp® DNA Mini Kit ile yapılmıştır (64). DNA izolasyonu yapılmış olan örneklerin miktar tayinleri Quant-iT™ dsDNA HS (High Sensitive) Assay Kit ile florometrik yöntemle yapılmıştır (65). Florometre cihazı olarak Qubit® 4.0 kullanılmıştır.

3.2.2.1. QIAamp® DNA mini kit ile ağız içi sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu

1. Sıvı ucu kesilip alınarak 1,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
2. Üzerine 400 µL PBS tamponundan eklendi. 10 dk. beklendi.
3. Swabı attıktan sonra, 20 µl Proteinaz K ve 400 µl Buffer AL eklendi.
15 sn. karıştırıldı (vortekslendi).
4. 56° C'de 10 dk. inkübe edildi.
5. Üzerine 400 µl Etanol (%96-100) eklendi ve 5 sn. vortekslendi.
6. Elde edilen karışım QIAamp® mini spin kolona aktarıldı. 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve temiz toplama tüpü takıldı.
7. Kolona 500 µl AW1 tamponu eklendi. 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve temiz toplama tüpü takıldı.
8. Kolona 500 µl AW2 tamponu eklendi. 14.000 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi.
9. QIAamp® mini spin kolon, steril 1,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. 150 µl Buffer AE tamponu eklendi. Oda ısısında (25°C) 1 dk. inkübe edilip, 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
10. QIAamp® mini spin kolon atıldı. 1,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpündeki izolat parafilmlemlendi.
11. Uzun süreli saklama için -20°C 'ye kaldırıldı.

3.2.2.2. *Quant-iT™ dsDNA HS Assay kit ile DNA miktar tayini*

1. Qubit® 4.0 cihazının kalibrasyonu için 2 adet standart ve DNA miktarı ölçülecek örnek sayısı ile toplam sayı belirlenerek, 0,5 ml'lik tüpler hazırlandı.
2. 1 µl Quant-iT™ reagent ve 199 µl Quant-iT™ buffer, tüpe konularak 200 µl toplam hacme sahip çalışma solüsyonları hazırlandı.
3. Hazırlanan çalışma solüsyonlarından standartların ölçüleceği tüplere 190 µl, örneklerin ölçüleceği tüplere 199 µl konuldu.
4. İki standarttan da 10 µl alınarak, 190 µl'lik çalışma solüsyonu içeren tüplere eklendi.
5. İncelenecek izolatlardan 1 µl alınarak, 199 µl'lik çalışma solüsyonu içeren tüplere eklendi.
6. Tüpler 2-3 sn. vortekslendi ve 2 dk. oda sıcaklığında (25°C) inkübe edildi.
7. Önce standartların Qubit® cihazında DNA miktarları ölçülerek cihazın kalibrasyonu sağlandı.
8. Kalibrasyonu yapılan Qubit® cihazında örneklerin DNA miktarları ölçüldü.

3.2.3. PCR Aşaması

Bu çalışmada Filoğlu ve arkadaşları tarafından geliştirilen X kromozomu üzerinde bulunan 11 lokuslu 2 multipleks InDel lokusu çalışılmıştır (Tablo III) (66,67).

Tablo III. X kromozomu üzerindeki 22 InDel lokusuna ait bilgiler

	Lokusa Verilen Ad	Rs numarası	Fragment uzunluğu	Alel	Boya
Multipleks-1	XID1	rs2307557	57	-/AA/ACA	6-FAM
	XID3	rs72434864	74	A/-	6-FAM
	XID5	rs2307741	78	-/CCTCTGAAC/CTGAAC	PET
	XID6	rs16367	82	-/AAGT	6-FAM
	XID9	rs16632	117	-/AATA	PET
	XID11	rs25581	128	TCTCA/-	VIC
	XID13	rs3048996	134	-/ATC	PET
	XID16	rs199639085	142	TTTTATTTTATT/-	PET
	XID17	rs2308280	146	-/TAA	PET
	XID18	rs71948836	148	AC/-	6-FAM
	XID21	rs62954660	167	A/-	6-FAM
Multipleks-2	XID2	rs67705557	61	AAATT/-	NED
	XID4	rs59400186	75	-/GTTA	NED
	XID7	rs2307762	92	-/CTCAATA/TCAATAC	NED
	XID8	rs16368	99	-/AGA	6-FAM
	XID10	rs16680	119	ACA/-	NED
	XID12	rs16397	132	GTG/-	6-FAM
	XID14	rs25582	135	-/GGCTAGG	NED
	XID15	rs11297248	140	T/-	VIC
	XID19	rs397825417	149	-/TT	NED
	XID20	rs16460	163	-/TTC/TTCTTCC/TTCTTCT	NED
	XID22	rs67588758	204	ATGA/-	NED

3.2.3.1. PCR bileşenlerinin hazırlanması ve PCR aşaması

İzole edilen 250 kişiye ait DNA örneğinin her biri için, 22-X InDel lokusunun 11’li 2 multipleks amplifikasyonu yapıldı (66,67). Söz konusu PCR bileşenleri Tablo IV’de belirtilmiş olan miktarlarda oluşturuldu. DNA örnekleri 0.5-1 ng aralığında olacak şekilde sulandırılarak PCR karışımına eklendi. PCR karışımı buz üstünde hazırlandı. Karışımın bulunduğu tüplerde baloncuk olmamasına dikkat edildi. Primer karışımı, ışıktan etkilenmemesi için alüminyum folyo ile sarılarak steril ependorf tüplerde saklandı.

Tablo IV. PCR bileşenleri ve miktarları

Kullanılan Malzemeler	Miktar (µl) (1 örnek için)
PCR Master Mix (Qiagen)	4
Primer Karışımı (optimize)	3
Distile Su	2
DNA (0.5-1 ng)	1
Toplam Hacim	10

3.2.3.2. PCR programı

PCR, Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) ısı döngü cihazında yapıldı. PCR döngü koşulları Tablo V’de gösterilmiştir.

Tablo V. PCR koşulları

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	Sonuç	4 °C	∞

3.2.4. PCR ürünlerinin ABI PRISM® 310/3130 genetik analizör cihazında analizi

Örneklerin elektroforeze hazırlanması, yüklenmesi ve verilerin analizi olmak üzere üç temel adımdan oluşmaktadır. Elektroforez sonrası elde edilen veriler, GeneMapper v.4.0 (Thermo Fisher Scientific) programında analiz edilerek 250 gönüllünün X kromozomundaki 22 InDel lokusuna ait genotipleri belirlenmiştir (Ek-3).

3.2.4.1. Örnek hazırlanması

ABI PRISM® 310/3130 genetik analizör cihazında, analizi yapılacak her bir örnek için Tablo VI'daki karışım hazırlandı.

Tablo VI. Elektroforez bileşenleri ve miktarları

Kullanılan Malzemeler	Miktar (µl) (1 örnek için)
Hi-Di™ formadide	10
GeneScan™ LIZ 500 Size Standard	0,5
PCR ürünü	1
Toplam Hacim	11,5

3.2.4.2. Örneklerin elektroforezi

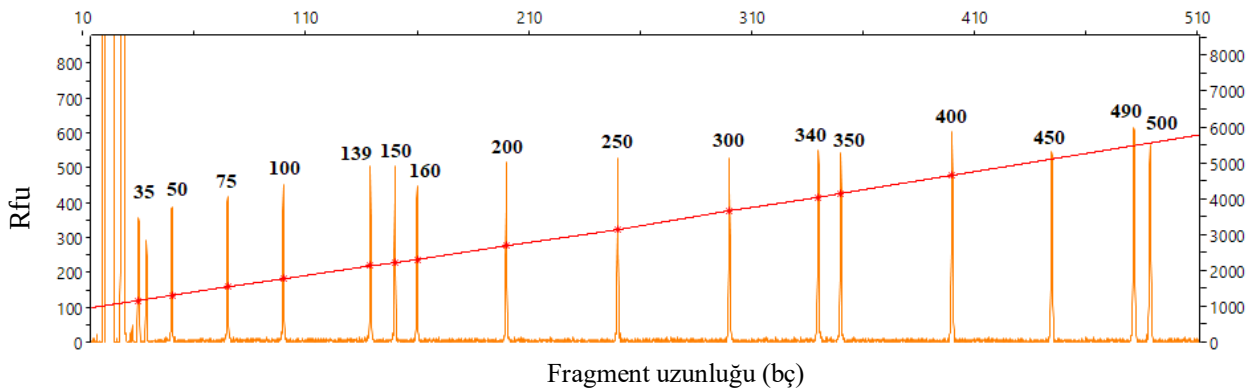
Örnekler 36 cm kapillerle, POP-4 polimeri kullanarak DS-33 Matriks Standart'ında (Applied Biosystems) G5 filtresi seçilerek, enjeksiyon süresi 5 sn. ve voltajı 3 kV, yürütme voltajı 15 kV, 60 °C'de 30 dk. yürütüldü (Tablo VII).

Tablo VII. Elektroforez koşulları

Parametre	GS STR POP-4 (1ml) G5 modül
Matriks	DS-33
İnjesiyon zamanı	5 sn.
İnjesiyon voltajı	3 kV
Yürütme zamanı	30 dk.
Yürütme sıcaklığı	60°C

3.2.4.3. Örneklerin analizi

ABI 310/3130'daki elektroforez sonrası örneklerden elde edilen sonuçların değerlendirilmesi Genemapper® v.4.0 analiz programı kullanılarak yapıldı. Önce her örnek için 500 LIZ™ Size Standard (35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 ve 500) kontrol edildikten sonra analiz yapıldı (şekil 11). InDel'lerin yerleri standart referans alınarak belirlendi. Alel boyutları bilinen ve mavi, yeşil, siyah, kırmızı renklerdeki floresan boyalar (6-FAM, VIC, NED, PET) dikkate alınarak elektroforegramdaki pikler değerlendirildi ve InDel noktaları belirlendi.

**Şekil 11:** 500 LIZ Size Standard

3.2.5. Çalışmada kullanılan istatistiksel yöntemler

X kromozomundaki 22 InDel lokuslarına ait elektroforez sonrası 250 kişiye ait elde edilen genotiplere göre Türkiye'deki alel frekansları, beklenen (H_e) - gözlenen (H_o) heterozigotluk oranları, Hardy-Weinberg dengesi (p değeri) Arlequin v.3.5.1.2 programıyla (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3512/>) hesaplandı. Arlequin için gerekli olan dosya formatının oluşturulması için Genetix v.4.0.5.2 (<https://kimura.univ-montp2.fr/genetix/>) yazılım programı kullanıldı. Ayrıca adli istatistiksel parametreler PowerStats (Promega) Microsoft® Excel dosyası programı kullanılarak her bir lokus için; ayırım gücü (PD), eşleşme olasılığı (Pm), dışlama gücü (PE), polimorfik bilgi içeriği (PIC), tipik babalık indeksi (TPI) hesaplanmıştır. Popülasyonlar arasındaki farklılaşma değerleri (F_{ST}) Arlequin v.3.5.1.2 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Filogenetik ağaç çizimi için Mega X v.10.0.5 programı kullanıldı.

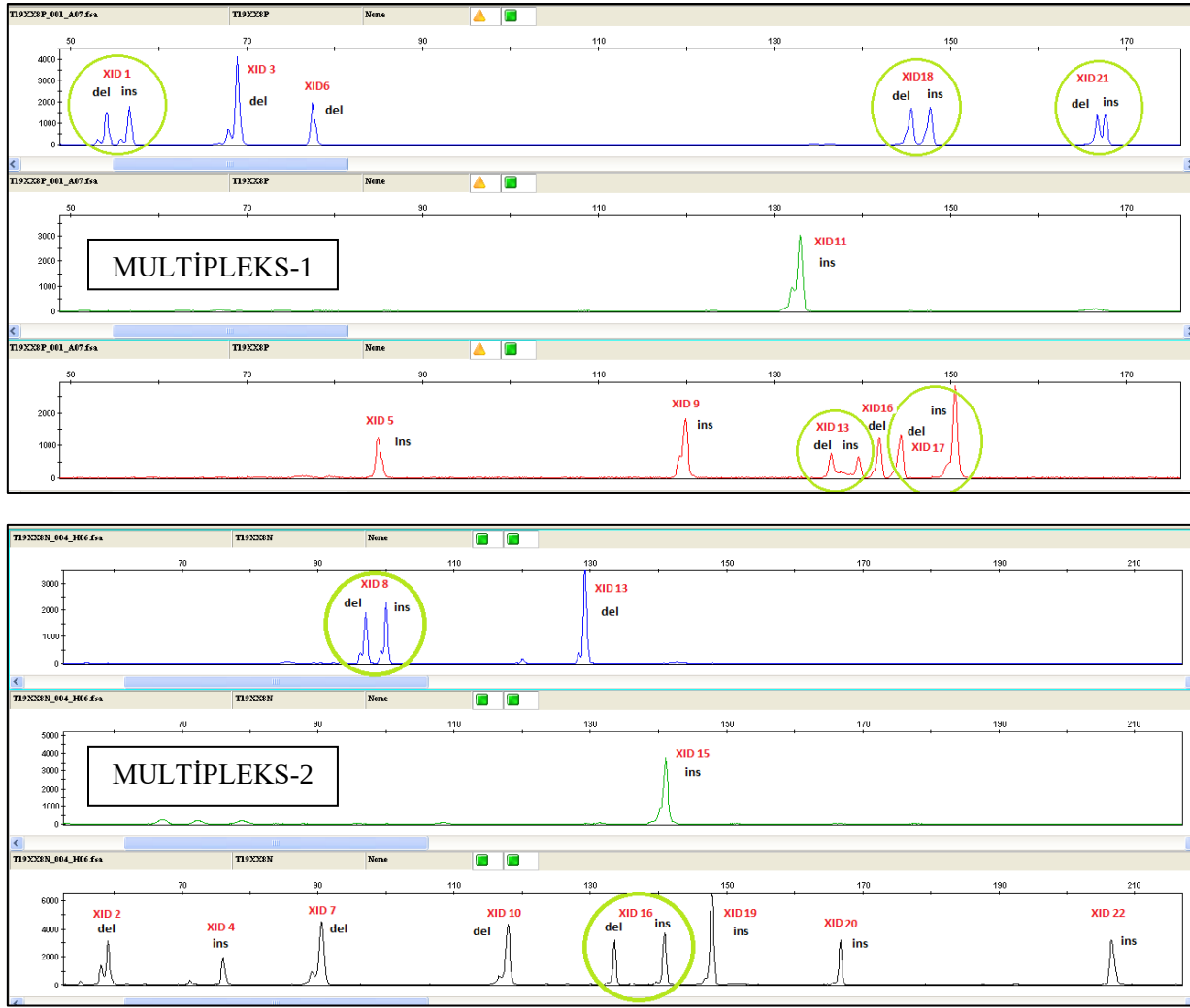
4. Bulgular

Bu çalışmada Filoğlu ve arkadaşları tarafından optimizasyon ve validasyonu yapılmış 22-X InDel lokusunun (rs2307557, rs67705557, rs72434864, rs59400186, rs2307741, rs16367, rs2307762, rs16368, rs16632, rs16680, rs25581, rs16397, rs3048996, rs25582, rs11297248, rs199639085, rs2308280, rs71948836, rs397825417, rs16460, rs62954660, rs67588758) ağız içi sürüntü örnekleri kullanılarak Türkiye popülasyonundaki (250 kişide) genotipi belirlendi. Elde edilen veriler ile istatistiksel analizler yapıldı.

Genotip tayini için Genemapper® v.4 (Thermo Fisher Scientific) analiz programı kullanıldı. İstatistiksel analizler için Arlequin v.3.5.1.2, Genetix v.4.0.5.2 yazılım programları ve Promega PowerStats Microsoft® Excel dosyası kullanıldı. Filogenetik ağaç çizimi için Mega X v.10.0.5 programı kullanıldı.

4.1. 22-X InDel Lokusuna Ait Genotiplerin Belirlenmesi

250 kişiden (126 erkek, 124 kadın) alınan ağız içi sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu ve miktarı belirlendikten sonra, optimize edilmiş 22-X InDel primerleri kullanılarak 0,5-1 ng DNA ile PCR yapıldı. ABI PRISM® 310/3130 genetik analizör cihazında elektroforez yapıldıktan sonra Genemapper® v.4 analiz programı kullanılarak 22-X InDel lokusunun 250 kişideki genotipi belirlendi. 250 kişiye ait 22 InDel profili Ek-3'de gösterilmektedir. Bir kadına ait genotip elektroforegram görüntüsü şekil 12'de (heterozigot olan lokuslar yeşil renk ile işaretlenmiştir) ve bir erkeğe ait genotip elektroforegram görüntüsü şekil 13'te gösterilmektedir.



Şekil 12: 22-X InDel lokusunun (multipleks 1 ve 2) bir kadın genotipine ait elektroforegram görüntüsü



Şekil 13: 22-X InDel lokusunun (multipleks 1 ve 2) bir erkek genotipine ait elektroforegram görüntüsü

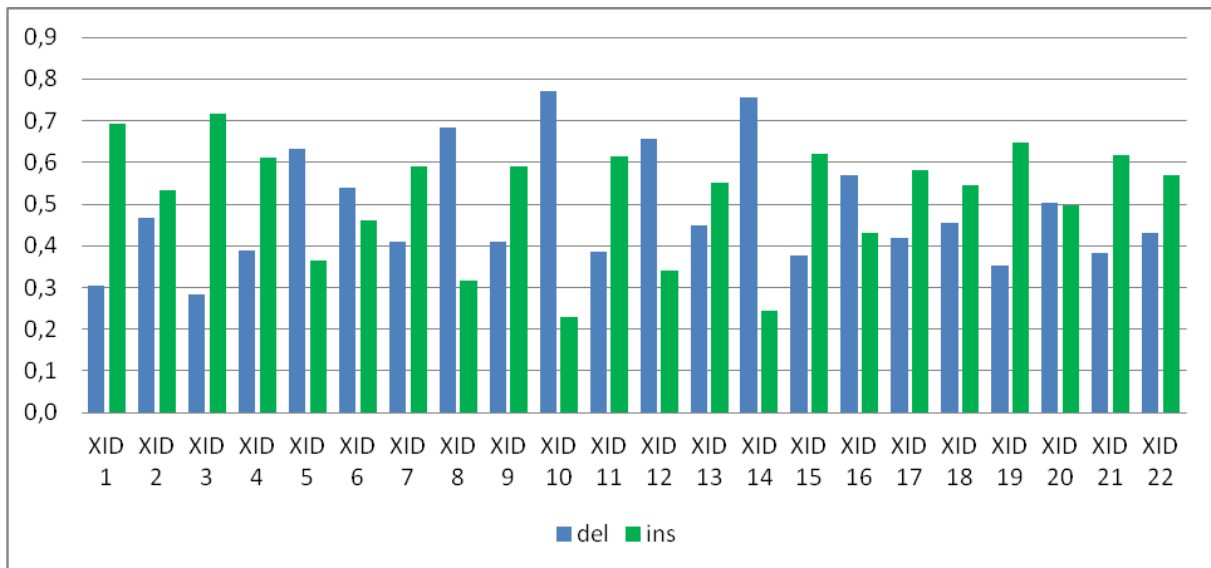
4.2. İstatistiksel Bulgular

4.2.1. Alel frekanslarının belirlenmesi

250 kişide 22-X InDel lokusunun alel sıklığının belirlenmesi Arlequin v.3.5.1.2 programı ile yapıldı. Alel frekansları tablo VIII’de ve grafiksel görünümü şekil 14’te verilmiştir.

Tablo VIII. 22-X InDel lokusunun alel frekansları

Lokuslar	Erkek (n= 126)		Kadın (n= 124)		Toplam (n= 250)	
	Frekans del	Frekans ins	Frekans del	Frekans ins	Frekans del	Frekans ins
XID 1	0,270	0,730	0,343	0,657	0,306	0,694
XID 2	0,389	0,611	0,548	0,452	0,468	0,532
XID 3	0,270	0,730	0,298	0,702	0,284	0,716
XID 4	0,341	0,659	0,435	0,565	0,388	0,612
XID 5	0,659	0,341	0,609	0,391	0,634	0,366
XID 6	0,500	0,500	0,581	0,419	0,540	0,460
XID 7	0,397	0,603	0,423	0,577	0,410	0,590
XID 8	0,667	0,333	0,702	0,298	0,684	0,316
XID 9	0,452	0,548	0,367	0,633	0,410	0,590
XID 10	0,802	0,198	0,738	0,262	0,770	0,230
XID 11	0,341	0,659	0,431	0,569	0,386	0,614
XID 12	0,659	0,341	0,657	0,343	0,658	0,342
XID 13	0,500	0,500	0,395	0,605	0,448	0,552
XID 14	0,746	0,254	0,766	0,234	0,756	0,244
XID 15	0,357	0,643	0,399	0,601	0,378	0,622
XID 16	0,587	0,413	0,548	0,452	0,568	0,432
XID 17	0,397	0,603	0,440	0,560	0,418	0,582
XID 18	0,452	0,548	0,456	0,544	0,454	0,546
XID 19	0,294	0,706	0,411	0,589	0,352	0,648
XID 20	0,484	0,516	0,524	0,476	0,504	0,496
XID 21	0,357	0,643	0,407	0,593	0,382	0,618
XID 22	0,421	0,579	0,440	0,560	0,430	0,570

**Şekil 14:** 22-X InDel lokusunun 250 kişiye ait Türkiye popülasyonundaki alel frekansları grafiği

4.2.2. Hardy-Weinberg dengesi

Arlequin v.3.5.1.2 programında 22-X InDel lokusunun p-değerleri hesaplandı ve Hardy-Weinberg dengesine bakıldı. Bu değerler Tablo IX'da gösterilmektedir. Analiz sonucu elde edilen p-değerlerinin anlamlılığını değerlendirebilmek için $p = 0,05/22$ şeklinde Bonferonni düzeltmesi yapılarak anlamlılık düzeyi $p > 0,002272$ olarak alındı. Bonferonni düzeltmesinden sonra genotip dağılımı istatistiksel olarak Hardy-Weinberg dengesinden sapma göstermemiştir. Tüm lokusların ortalama heterozigotluğu 0,4690 olarak bulunmuştur.

Tablo IX. 22-X InDel lokusunun HW denge tablosu

Lokuslar	Gözlenen Heterozigotluk	Beklenen Heterozigotluk	P- değeri
XID 1	0,50806	0,45236	0,22980
XID 2	0,46774	0,49732	0,58874
XID 3	0,41935	0,42040	1,00000
XID 4	0,61290	0,49367	0,01107
XID 5	0,55645	0,47822	0,09105
XID 6	0,41935	0,48896	0,13732
XID 7	0,36290	0,49024	0,00546
XID 8	0,40323	0,42040	0,66958
XID 9	0,45968	0,46647	1,00000
XID 10	0,39516	0,38837	1,00000
XID 11	0,45968	0,49259	0,46945
XID 12	0,39516	0,45236	0,16960
XID 13	0,45161	0,47995	0,57436
XID 14	0,38710	0,35980	0,45994
XID 15	0,57258	0,48162	0,04073
XID 16	0,53226	0,49732	0,47185
XID 17	0,55645	0,49468	0,20203
XID 18	0,50806	0,49807	0,85643
XID 19	0,41935	0,48622	0,13779
XID 20	0,40323	0,50085	0,03165
XID 21	0,45968	0,48475	0,57891
XID 22	0,49194	0,49468	1,00000

4.2.3. Adli İstatistik parametreleri

22-X InDel lokusunun ayırım gücü (PD), eşleşme olasılığı (Pm), polimorfik bilgi içeriği (PIC), dışlama gücü (PE), tipik babalık indeksi (PI) adli istatistik parametreleri PowerStats (Promega) Microsoft® Excel dosyası kullanılarak hesaplandı. Bu istatistiksel parametreler Tablo X’da gösterilmiştir.

Tablo X. 22-X InDel lokusunun adli istatistik analiz parametreleri

Lokuslar	Pm	PD	PIC	PE	TPI
XID 1	0,423	0,577	0,33	0,048	0,68
XID 2	0,349	0,651	0,37	0,040	0,65
XID 3	0,447	0,553	0,33	0,033	0,63
XID 4	0,360	0,640	0,36	0,067	0,72
XID 5	0,372	0,628	0,36	0,056	0,69
XID 6	0,358	0,642	0,37	0,033	0,63
XID 7	0,383	0,617	0,37	0,027	0,62
XID 8	0,431	0,569	0,34	0,030	0,63
XID 9	0,368	0,632	0,37	0,038	0,65
XID 10	0,516	0,484	0,29	0,028	0,62
XID 11	0,374	0,626	0,36	0,040	0,65
XID 12	0,414	0,586	0,35	0,029	0,62
XID 13	0,355	0,645	0,37	0,038	0,65
XID 14	0,487	0,513	0,30	0,029	0,62
XID 15	0,363	0,637	0,36	0,059	0,70
XID 16	0,346	0,654	0,37	0,051	0,68
XID 17	0,353	0,647	0,37	0,054	0,69
XID 18	0,348	0,652	0,37	0,046	0,67
XID 19	0,412	0,588	0,36	0,199	1,03
XID 20	0,358	0,642	0,37	0,031	0,63
XID 21	0,374	0,626	0,36	0,038	0,65
XID 22	0,354	0,646	0,37	0,044	0,66

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

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

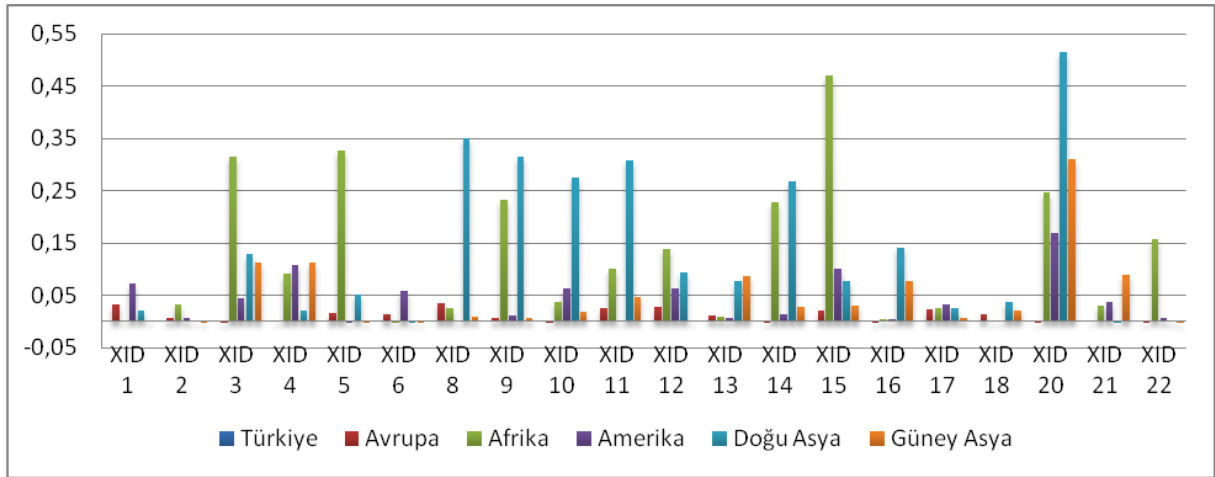
Bu tez çalışmasında Türkiye popülasyonu için araştırılan 20-X InDel lokusunun dünya popülasyonlarıyla olan genetik benzerliği veya uzaklığını tespit etmek için F_{ST} hesaplandı. Ensembl (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index) veri tabanından çeşitli popülasyonlara ait 20 InDel lokusunun (rs2307557, rs67705557, rs72434864, rs59400186, rs2307741, rs16367, rs16368, rs16632, rs16680, rs25581, rs16397, rs3048996, rs25582, rs11297248, rs199639085, rs2308280, rs71948836, rs16460, rs62954660, rs67588758) alel frekansı bilgilerine ulaşılmıştır (Tablo XI). Rs2307762 (XID 7) ve rs397825417 (XID 19) lokusuna ait popülasyon çalışması olmadığı için lokuslar analize dahil edilmedi.

Ensembl veri tabanından Avrupa, Afrika, Amerika, Doğu Asya, Güney Asya popülasyonlarına ait alel frekansı verileri kullanılarak 20-X InDel lokusunun her biri için Arlequin ver 3.5.1.2 programı yardımıyla F_{ST} değerleri hesaplandı. İlgili lokusların Türkiye popülasyonu ile diğer popülasyonların genetik farklılaşmasının karşılaştırması şekil 14’de gösterilmiştir. Ensembl veri tabanından genotip bilgileri bulunan 15-X InDel lokusunun (rs2307557, rs67705557, rs72434864, rs59400186, rs2307741, rs16367, rs16368, rs16632, rs3048996, rs25582, rs11297248, rs199639085, rs71948836, rs62954660, rs67588758) popülasyonlar arası farklılıkları gösteren F_{ST} değerleri Tablo XII’de gösterilmiştir.

Tablo XI. Çeşitli popülasyonların 22-X InDel lokusuna ait alel frekansları

Lokuslar	Türkiye (n=250)		Avrupa (n=503)		Afrika (n=661)		Amerika (n=347)		Doğu Asya (n=504)		Güney Asya (n=489)	
	Frekans Del	Frekans Ins	Frekans Del	Frekans Ins	Frekans Del	Frekans Ins	Frekans Del	Frekans Ins	Frekans Del	Frekans Ins	Frekans Del	Frekans Ins
XID 1	0,306	0,694	0,217	0,783	0,391	0,609	0,174	0,826	0,236	0,764	0,290	0,710
XID 2	0,468	0,532	0,477	0,523	0,414	0,586	0,481	0,519	0,500	0,500	0,531	0,469
XID 3	0,284	0,716	0,268	0,732	0,730	0,270	0,452	0,548	0,567	0,433	0,549	0,451
XID 4	0,388	0,612	0,394	0,606	0,234	0,766	0,214	0,786	0,331	0,669	0,210	0,790
XID 5	0,634	0,366	0,513	0,487	0,191	0,809	0,616	0,384	0,760	0,240	0,643	0,357
XID 6	0,540	0,460	0,666	0,334	0,553	0,447	0,405	0,595	0,609	0,391	0,588	0,412
XID 7	0,410	0,590	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XID 8	0,684	0,316	0,569	0,431	0,586	0,414	0,742	0,258	0,990	0,010	0,774	0,226
XID 9	0,410	0,590	0,303	0,697	0,093	0,907	0,450	0,550	0,788	0,212	0,433	0,567
XID 10	0,770	0,230	0,730	0,270	0,847	0,153	0,880	0,120	0,980	0,020	0,820	0,180
XID 11	0,386	0,614	0,317	0,683	0,223	0,777	0,390	0,610	0,830	0,170	0,590	0,410
XID 12	0,658	0,342	0,766	0,234	0,379	0,621	0,816	0,184	0,844	0,156	0,705	0,295
XID 13	0,448	0,552	0,477	0,523	0,473	0,527	0,332	0,668	0,212	0,788	0,614	0,386
XID 14	0,756	0,244	0,763	0,234	0,399	0,591	0,837	0,161	0,988	0,012	0,858	0,142
XID 15	0,378	0,622	0,510	0,490	0,893	0,107	0,634	0,366	0,605	0,395	0,531	0,469
XID 16	0,568	0,432	0,578	0,422	0,604	0,396	0,483	0,517	0,800	0,200	0,740	0,260
XID 17	0,418	0,582	0,330	0,670	0,324	0,676	0,310	0,690	0,560	0,440	0,510	0,490
XID 18	0,454	0,546	0,363	0,637	0,509	0,491	0,510	0,490	0,317	0,683	0,348	0,652
XID 19	0,352	0,648	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XID 20	0,504	0,496	0,520	0,480	0,181	0,819	0,230	0,770	0,041	0,959	0,140	0,860
XID 21	0,382	0,618	0,362	0,638	0,289	0,711	0,273	0,727	0,436	0,564	0,625	0,375
XID 22	0,430	0,570	0,439	0,561	0,182	0,818	0,368	0,632	0,484	0,516	0,444	0,556

*- Popülasyon verileri bulunmamaktadır.



Şekil 15: 20-X InDel lokusuna ait Türkiye popülasyonu ile diğer popülasyonların genetik farklılaşmasının (F_{ST}) her lokus için karşılaştırması

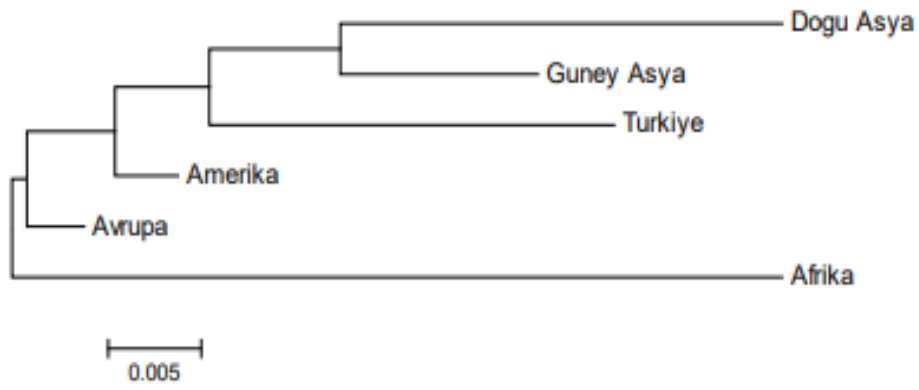
Tablo XII. 15-X InDel lokusunun popülasyonlar arası Fst değerleri

15 InDel Lokusu	Türkiye (n=250)	Avrupa (n=503)	Afrika (n=661)	Amerika (n=347)	Doğu Asya (n=504)	Güney Asya (n=489)
Türkiye	0.00000					
Avrupa	0.02706	0.00000				
Afrika	0.07846	0.04525	0.00000			
Amerika	0.03304	0.01558	0.04590	0.00000		
Doğu Asya	0.05097	0.04282	0.09515	0.02911	0.00000	
Güney Asya	0.04093	0.02896	0.06522	0.03058	0.03436	0.00000

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

4.2.5. Filogenetik ağaç çizimi

Bu çalışmada Türkiye için elde edilen ve Avrupa, Afrika, Amerika, Güney Asya, Doğu Asya popülasyonlarına ait Ensembl'dan alınan genotip verileri kullanılarak 15-X InDel lokusu için Tablo XII'de bulunan Fst değerleri ile Mega X v.10.0.5 programında "komşu birleştirme" (neighbor joining) yöntemi kullanılarak filogenetik ağaç çizildi (Şekil 15). Türkiye, Asya, Afrika, Amerika ve Avrupa popülasyonlarının beş farklı ana hatta bulunduğu görülmektedir.



Şekil 16: Komşu birleştirme ağaç yöntemi ile çizilen filogenetik ağaç

5.Tartışma

90'lı yıllarda VNTR'ye göre DNA'da daha az yer kaplayan ve çevresel faktörlerden daha az etkilenen STR lokusları "altın standart" olarak kimliklendirme amaçlı laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmıştır. 2000'li yıllarda STR'ye göre daha düşük mutasyon oranına, daha kısa ampliconlara sahip olan SNP keşfedilmesiyle adli genetikte kullanılmaya başlandı. Ancak SNP analizinin hem uzun sürmesi hem de daha maliyetli olmasından dolayı yine benzer özelliklere sahip alternatif markır olan InDel lokusları tanımlanmıştır. Weber ve arkadaşlarının 2002 yılında yaklaşık 2.000 dialelik InDel polimorfizmini tanımlayarak; Mills ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları çalışmayla genomda 7,2 kb'da bir görülen 1,6-2,5 milyon insersiyon-delesyon tanımlamasıyla InDel ile ilgili araştırmalar artmaya başlamıştır. Bu lokusların en önemli avantajı kısa ampliconlara sahip olduklarından az miktarda ve degrade olan biyolojik örneklerden başarılı DNA profilleri elde edilebilmesidir. InDel polimorfizim çalışmaları; günümüzde adli bilimlerde hatta antropolojik ve arkeolojik araştırmalarda kullanılan SNP ve STR polimorfizmine alternatif oluşturacağı düşünülmektedir. X kromozomu, karakteristik özelliklerinden dolayı popülasyon genetiği ve adli genetik çalışmalarında önem kazanmıştır. Her jenerasyonda, her iki cinsiyette de bulunup, erkeklerde hemizigottur. Bu özelliğinden yararlanarak nesep tayinlerinde ve kimliklendirmelerde X'e bağlı InDel lokusları kullanılabilir.

Bu tez çalışmasının amacı; Filoğlu ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve X kromozomu üzerinde bulunan 11 lokuslu 2 multipleks InDel lokusunun (rs2307557, rs67705557, rs72434864, rs59400186, rs2307741, rs16367, rs2307762, rs16368, rs16632, rs16680, rs25581, rs16397, rs3048996, rs25582, rs11297248,rs199639085, rs2308280, rs71948836, rs397825417, rs16460, rs62954660, rs67588758) Türkiye'deki polimorfizmini belirleyerek ülkemizde adli laboratuvarlarda X kromozomu geçiş özelliğinden yararlanarak bazı özel olgularda kullanımını sağlamaktır.

Araştırmanın ilk aşamasında 250 kişiye (126 erkek, 124 kadın) ait ağız içi sürüntü örneğinden DNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra DNA miktar tayinleri yapıldı. Araştırmanın ikinci aşamasında 250 kişiye ait örneğin, optimize edilmiş primerler kullanılarak, ilgili lokuslar için 11' li 2 multipleks ile PCR yapıldı (Tablo III ve Tablo IV). Üçüncü aşamada ABI PRISM® 310/3130 genetik analizör cihazında elektroforez yapıldı ve Genemapper® v.4 analiz programıyla 22-X InDel lokusunun genotipi belirlendi (Ek-2). Kadına ait örnek genotip elektroforegram görüntüsü Şekil 12'de ve erkeğe ait örnek genotip elektroforegram görüntüsü Şekil 13'te gösterilmektedir. Son aşamada ise Arlequin v.3.5.1.2 yazılım programı ile 22-X InDel lokusunun alel frekansı, beklenen ve gözlenen heterozigotluk değeri ve p değeri hesaplandı (Tablo IX). Alel frekansı sonuçlarına bakıldığında; en düşük alel frekansı 0,230 ile XID 10 lokusunda insersiyon için gözlemlendi (Tablo VIII ve Şekil 14). 3 lokusta (XID 3, XID 10, XID 14) alel frekansları oranlarının dengeli olmadığı (XID 3; 0,284/0,716, XID 10; 0,770/0,230, XID 14; 0,756/0,244) ve heterozigotluk oranlarının diğer lokuslara göre düşük olduğu (XID 3; 0,42040, XID 10; 0,38837, XID 14; 0,35980) gözlemlendi.

İncelediğimiz, Türkiye popülasyonuna ait, örneklerin 22-X InDel lokusunun Hardy–Weinberg dengesinde olup olmadığını belirlemek üzere Arlequin v.3.5.1.2 yazılım programı ile p değerleri hesaplandı (Tablo IX). 4 lokusta (XID 4; 0,01107, XID 7; 0,00546, XID 15; 0,04073, XID 20; 0,03165) sapma olduğu ($p \leq 0.05$) görüldü. Bu nedenle Bonferroni düzeltmesi yapılarak anlamlılık düzeyi $p > 0,002272$ olarak alındı ve Hardy-Weinberg dengesine göre beklenenden farklı bir sapma göstermediği sonucuna varıldı. Bu da çalışılan popülasyonun dengede olduğunu göstermektedir.

22-X InDel lokuslarının her birinin ayırım gücü (PD), eşleşme olasılığı (Pm), polimorfik bilgi içeriği (PIC), dışlama gücü (PE) ve babalık indeksi (PI) istatistik parametreleri PowerStats Microsoft® Excel dosyası kullanılarak hesaplandı (Tablo X). Bu parametreler ayrı ayrı her lokus için ele alındığında; 2 lokusun diğer lokuslara göre ayırım gücünün düşük (XID

10; 0,484 ve XID 14; 0,513) olduğu, ayırım gücünün en yüksek (0,654) olduğu lokusun XID 16 olduğu görüldü. XID 19 lokusunun dışlama gücünün yüksek (0,199) olduğu, 4 lokusun (XID 7; 0,027, XID 10; 0,028, XID 12; 0,029, XID 14; 0,029) ise dışlama gücünün düşük olduğu; eşleşme olasılığı en yüksek (0,516) olan lokusun XID 10 olduğu, en düşük (0,346) olan lokusun XID 16 olduğu görüldü. XID 3, XID 8, XID 10 ve XID 14 lokuslarının heterozigotluk oranları ve alel frekansları da dikkate alındığında kimliklendirmede en az tercih edilmesi gereken lokuslar olduğu saptanmıştır. Alel frekans oranları dengeli, heterozigotluk oranlarının, ayırım ve dışlama gücünün en yüksek olduğu lokuslar XID 2, XID 16, XID 19 ve XID 20'dir. Bu lokusların kimliklendirmede en çok tercih edilmesi gereken lokuslar olduğu saptanmıştır.

Tüm lokusların ortalama heterozigotluğu 0.4690 olarak bulundu. 22 lokus birlikte çalışıldığında ayırım gücü % 99 olarak bulunmuştur. 22 lokusu içeren panel tek başına çalışıldığında hem kimliklendirmede hem de nesep tayininde kullanılabilecek oranda gerekli dışlama, ayırım gücüne ulaşılabilceği görülmüştür.

Diğer çalışmalara bakıldığında, Ünsal T. ve arkadaşlarının 2016'da Türkiye popülasyonunun da yaptıkları 21-X InDel panelinde heterozigotluk oranı 0.401; Rui P. ve arkadaşlarının 2012'de Afrika, Avrupa, Doğu Asya popülasyonunda 32-X InDel panelinde yaptıkları çalışmada heterozigotluk oranı 0.424; Caputo M. ve arkadaşlarının 2016'da Arjantin popülasyonunda 33-X InDel paneli ile yaptıkları çalışmada heterozigotluk oranı 0.381 bulunduğu görülmektedir.

Ensembl (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index) veri tabanında, çalışılan 22-X InDel lokusundan, 20 InDel lokusunun Avrupa, Afrika, Amerika, Güney Asya, Doğu Asya popülasyonlarına ait alel frekansları verilerine ulaşılmış ve Türkiye popülasyonu (bu çalışma) alel frekansları ile karşılaştırılmıştır (Tablo XI). Karşılaştırma sonucunda; Amerika ile 4 lokusta (XID 1, XID 12, XID 15, XID 20), Afrika ile 7 lokusta (XID 3, XID 5, XID 9,

XID 14, XID 15, XID 20, XID 22), Doğu Asya ile 9 lokusta (XID 8, XID 10, XID 11, XID 12, XID 13, XID 14, XID 15, XID 16, XID 20), Güney Asya ile 4 lokusta (XID 13, XID 16, XID 20, XID 21) farklılık olduğu saptanmıştır. En çok Avrupa'yla alel frekanslarının benzer olduğu gözlenmiştir. XID 20 lokusunun Türkiye ile karşılaştırılan tüm popülasyonlarda (Avrupa popülasyonu hariç) F_{ST} değerlerinde büyük farklılık vardır. Bu nedenle bu lokusun Türkiye popülasyonuna özgü gen sıklığı içerdiği ve heterozigotluk oranı yüksek olduğu için; bundan sonraki biyocoğrafik soy ile ilgili yapılacak çalışmalarda kullanılabileceği düşünülmektedir. Ensembl veri tabanında bulunan 15-X InDel lokusuna ait genotip bilgilerinden yararlanarak Türkiye, Avrupa, Afrika, Amerika, Güney Asya ve Doğu Asya popülasyonlarının genetik farklılaşması (F_{ST}) Arlequin v.3.5.1.2 programı kullanılarak karşılaştırılmıştır (Tablo XII). Buna göre; Türkiye popülasyonu ile Avrupa popülasyonu arasında 0.02706, Amerika popülasyonu ile 0.03304 ve Güney Asya popülasyonu ile 0.04093 F_{ST} değeri ile küçük bir genetik farklılaşma olduğu görülürken, Türkiye popülasyonu ile Doğu Asya popülasyonu arasında 0.05097 ve Afrika popülasyonu ile 0.07846 F_{ST} değeri ile orta düzeyde bir genetik farklılaşma olduğu gözlemlendi. Türkiye popülasyonu ile diğer popülasyonları karşılaştırdığımızda en küçük genetik farklılaşmanın Avrupa popülasyonu ile olduğu saptanmıştır.

Bulunan F_{ST} değerleri ile Mega X 10.0.5 programında “komşu birleştirme” yöntemiyle filogenetik ağaç çizildi. Bu ağaç ile çeşitli popülasyonların F_{ST} değerleri arasındaki farklılık daha net bir şekilde görülmektedir. Filogenetik ağaçta Türkiye, Asya, Afrika, Amerika ve Avrupa popülasyonlarının beş farklı ana hatta bulunduğu görülmektedir (Şekil 16). Bu filogenetik ağaçta, Türkiye popülasyonunun Avrupa, Güney Asya ve Amerika popülasyonlarına daha yakın konumda olduğu görüldü.

6. Sonuç

Sonuç olarak Türkiye popülasyonu için yüksek polimorfizm gösteren 22-X InDel lokusunun (rs2307557, rs67705557, rs72434864, rs59400186, rs2307741, rs16367, rs2307762, rs16368, rs16632, rs16680, rs25581, rs16397, rs3048996, rs25582, rs11297248, rs199639085, rs2308280, rs71948836, rs397825417, rs16460, rs62954660, rs67588758) adli bilimlerde kullanılabileceği belirlenmiş olup, alel frekansları, p değeri ve diğer adli istatistik parametreleri saptanmıştır. 22-X InDel panel tek başına çalışıldığında; hem kimliklendirmede hem de nesep tayinlerinde kullanılabilmesi için gerekli ayırım ve dışlama gücüne sahip olduğu saptanmıştır. Çeşitli popülasyonlarla Türkiye popülasyonunun genetik farklılaşması (F_{ST}) karşılaştırıldığında Avrupa popülasyonunun Türkiye popülasyonuna en yakın topluluk olduğu belirlenmiştir. Yeni 22-X InDel paneli, Türk kriminal laboratuvarlarında olgu aydınlatmada kullanılabilecektir. InDel'lerin degrade ve az miktardaki örneklerde, STR lokuslarının tiplendirmede yetersiz kaldığı durumlarda ve SNP' ye göre daha az maliyetle ve kısa sürede başarılı genotip analizi yapılabilmesi gibi özelliklerinden dolayı adli genetik laboratuvarlarında rutin olarak kullanılmaya başlanacağı düşünülmektedir.

7. Özet ve Anahtar Kelimeler

Son yıllarda önem kazanan genetik varyasyonlardan InDel (insersiyon-delesyon) genomda nükleotidlerin, eklenmesi veya çıkarılması sonucu oluşan polimorfizm çeşididir. InDel'ler tüm, insan, DNA polimorfizminin yaklaşık %16'sını oluşturur. Bu lokuslar hem somatik kromozomların hem de cinsiyet kromozomlarının üzerinde bulunmaktadır. Ayrım güçleri ve heterozigotluk oranları yüksektir. Popülasyonlar arasında iyi ayrım sağladığı için özellikle biyocoğrafik soy araştırmalarında ve kimliklendirme çalışmalarında tercih edilmektedir. X kromozomu üzerindeki InDel lokusları; babalık tayininde, nesep davalarında, akrabalık ilişkilerinde, felaket kurbanlarına ait DNA profillemesinde, olay yerinden toplanan biyolojik delillerin kimliklendirilmesinde kullanılabilir. PCR ürünleri küçük olduğundan degrade ve eser miktardaki örneklerde başarılı tiplendirme yapmak mümkündür. InDel'lerin rutin kriminal laboratuvarlarda olgu çözümünde kullanılabilmesi için ilgili popülasyondaki görülme sıklığının bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla bu proje kapsamında X kromozomunda bulunan 22 InDel lokusunun Türkiye'deki gen sıklıkları belirlenmiştir. Bunun için; Türkiye' nin tüm bölgelerini yansıtacak şekilde 250 gönüllüden (126 erkek, 124 kadın) alınan ağız içi sürüntü örneklerinden ilk aşamada, DNA izole edilmiş ve miktarı belirlenmiştir. İkinci aşamada; bu tez çalışmasıyla birlikte paralel olarak yürütülen "X Kromozomu Üzerinde Bulunan InDel Lokuslarına Ait Multipleks Panel Geliştirilmesi" adlı çalışmada yapılan optimizasyon ve validasyon çalışmasından sonra InDel lokuslarına ait panelin PCR'ı yapılarak çoğaltılmıştır. Üçüncü aşamada; PCR ürünlerinin elektroforezi ve analizi yapılmıştır. En son aşamada; Genemapper® v.4 genetik analizörde gen sıklıkları belirlenmiştir. Her bir lokusun Arlequin v.3.5.1.2 programında HW dengesi ve popülasyonlar arası farklılaşması (F_{ST}) Promega PowerStats Microsoft® Excel dosyası ile de adli istatistiksel parametreleri hesaplanıp, F_{ST} sonucuna göre Mega X v.10.0.5 programında filogenetik ağaç çizilmiştir. 22 InDel lokusunun ortalama heterozigotluğu 0,4690; 22 lokus birlikte

alışıldığında ayırım gücü % 99 olarak bulunmuştur. 22-X InDel panel tek başına çalışıldığında; hem kimliklendirmede hem de nesep tayinlerinde kullanılabilecek oranda gerekli dışlama ve ayırım gücüne ulaşılabildiği saptanmıştır. Türkiye popülasyonunun çeşitli popülasyonlar (Avrupa, Afrika, Amerika, Güney Asya ve Doğu Asya) ile genetik farklılaşması karşılaştırıldığında en kk farklılaşmanın Avrupa popülasyonu ile olduğu grlmştr.

Anahtar Kelimeler: insersiyon-delesyon polimorfizmi, X kromozomu, poplasyon genetiği, adli DNA analizi, adli genetik



8. Özet (İngilizce)

In recent years, InDel (insertion-deletion) is a polymorphism that occurs as a result of the addition or subtraction of nucleotides in the genome from the genetic variants that have gained importance. The InDels make up about 16% of all human DNA polymorphisms. These locus are located on both somatic chromosomes and sex chromosomes. Power of discrimination and heterozygosity rates are high. It is preferred especially for biogeographical ancestry research and identification studies, as it provides a good distinction between populations. InDel locus located on chromosome X can be used in paternity and maternity cases, kinship relationships, DNA profiling of disaster victims, identification of biological evidence collected from crime scene. Since PCR products are small, it is possible to make a successful typing in degraded samples and trace quantities. In order to be able to use InDels in the solution of cases in routine criminal laboratories, it is necessary to know the frequency of the cases in the relevant population. 22 InDel locus of X chromosome have been identified gene frequencies in Turkey. For this purpose at the first stage, DNA was isolated and the amount was determined of the buccal swab samples taken from 250 volunteers (126 males, 124 females) to reflect all regions of Turkey. In the second stage, after optimization and validation studies carried out in parallel with this thesis study, “Multiplex panel development of InDel locus located on X chromosome”, the panel of InDel locus was amplification by PCR. In the third stage, electrophoresis and analysis of PCR products were performed. At the latest stage; gene frequencies were determined in the Genemapper[®] v.4 genetic analyzer. The HW balance and the differentiation between populations (F_{ST}) of each locus were calculated in the Arlequin v.3.5.1.2 program. With the PowerStats Microsoft[®] Excel file, the forensic statistical parameters were calculated. And the phylogenetic tree was drawn in the Mega X v.10.0.5 program according to the F_{ST} result. The average heterozygosity of 22 InDel locus was 0.4690. When 22 locus were studied together, the discrimination power was 99%. 22-X

InDel panel working alone; it was determined that the necessary power of exclusion and power of discrimination could be used both in identification and in the determination of kinship relations. In comparison with the genetic differentiation of Turkey population with various populations (Europe, Africa, America, South Asia and East Asia), the smallest difference was observed with the European population.



9. Kaynaklar

- 1- Jeffreys A.J. Genetic fingerprinting. Nature Medicine, Nature Publishing Group 2005, 11(10): 1035-1039.
- 2- Pereira R., Phillips C., Alves C., Amorim A., Carracedo A., Gusmao L. A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms. Electrophoresis 2009, 30: 3682–3690.
- 3- Lee H.C., Ladd C., Bourke M.T., Pagliaro E., Tirnady F. DNA typing in forensic science. I. Theory and background. The American Journal of Forensic Medicine and Pathology 1994, 15(4):269-282.
- 4- Fowler C. Polymorphism in the major human repetitive DNA sequences, Robertson J., Ross A. M., Burgoyne L. A. DNA In Forensic Science: Theory, Techniques and Applications. London: Ellis Horwood Limited 1990, 87-103.
- 5- Coble, M. and Butler, J., Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA. Journal of Forensic Sciences 2005, 50(1):6-11.
- 6- Pereira R., Pereira V., Gomes I., Tomas C., Morling N., Amorim A. ve ark. A method for the analysis of 32 X chromosome insertion deletion polymorphisms in a single PCR. Int J Legal Med 2012, 126:97–105.
- 7- Bülbul Ö. Fenotip ve soya ait bilgi veren SNP noktalarının (markırlarının) belirlenmesi ve multipleks kit geliştirilmesi [PhD tezi]. İstanbul, İstanbul Üniversitesi, 2013.
- 8- Huang J.,Luo H., Wei W.,Hou Y. A novel method for the analysis of 20 multi-Indel polymorphisms and its forensic application. Electrophoresis 2014, 35: 487–493.
- 9- Fan G.,YeY., LuoH., HouY. Use of multi-InDels as novel markers to analyze 13 X-chromosome haplotype loci for forensic purposes. Electrophoresis 2015, 36: 2931–2938.

- 10- Martínez-Cortés G.,Gusmão L.C., Pereira R., Salcido V.H., Favela-Mendoza A.F., Muñoz-Valderrama J.F. ve ark. Genetic structure and forensic parameters of 38 Indels for human identification purposes in eight Mexican populations. *Forensic Science International: Genetics* 2015, 17: 149–152.
- 11- Edelmann J., Kohl M., Dressler J., Hoffmann A. X-chromosomal 21-indel marker panel in German and Baltic populations. *Int J Legal Med* 2016, 130:357–360.
- 12- Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology* 2005, 278(2):274–288.
- 13- Jennings B. H. *Drosophila – a versatile model in biology & medicine*. *Materials Today* 2011, 14(5):190–195.
- 14- Cobb M. Oswald Avery, DNA, and the transformation of biology. *Current Biology* 2014, 24(2):55–60.
- 15- Van D.V., Wu D., Chen Y.J., Tuson H., Wiggins P., Phillips R. A Single-Molecule Hershey-Chase Experiment. *Current Biology* 2012, 22: 1339–1343.
- 16- Watson J. D., Crick F. H. C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953, 171:737-738.
- 17- “<https://www.nature.com/scitable/topicpage/discovery-of-dna-structure-and-function-watson-397> (Son erişim tarihi: 12.05.2019).”
- 18- Kara U., Yükseloğlu H. E. *Adli DNA Analizi Sonuçlarının Yorumlanması*. *Temel Adli Genetik*, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri Tic. Ltd. Şti. 2015, 129-173.
- 19- Arı F. F. *Mutasyonlar ve Mutagenез*. Yıldırım A., Bardakcı F., Karataş M., Tanyolaç B. (editörler) *Moleküler Biyoloji*. Nobel Yayın Dağıtım 2007, 295-321.
- 20- Campbell N.A., Reece J.B. *Biyoloji*, 6.Baskı, Palme Yayıncılık 2008.
- 21- “https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/57919/mod_resource/content/2/Temel%20Genetik%20Kavramlar_8_mutasyonlar.pdf (Son erişim tarihi: 12.05.2019).”

- 22- “<https://forum.donanimhaber.com/evrim-teorisi-bilgi-kaynaklari-yazili-gorsel--31800932-120> (Son erişim tarihi: 12.05.2019).”
- 23- “https://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Baz_%C3%A7ifti_Eklenmesi_ya_da_%C3%A7%C4%B1kar%C4%B1lmas%C4%B1.JPG (Son erişim tarihi: 12.05.2019).”
- 24- Bozkaya Ö. Klinisyenler İçin Mutasyon ve Polimorfizm. Türkiye Klinikleri J. Pediatr 2009, 18(2):147-153.
- 25- Aksoy Z. B., Soydemir E. Polimorfizm. Güncel Gastroenteroloji 2017, 21(1):9-13.
- 26- Gonzalez F. J. Polymorphisms in xenobiotic metabolism. In Molecular and Applied Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes. Life Sciences Pharmacogenetics 1999, 303: 91-110.
- 27- Goodwin W., Linacre A., Hadi S. Introduction to forensic genetic. An Introduction to Forensic Genetics. England, John Wiley & Sons Ltd 2007, 1-5.
- 28- Budowle B., Lindsey J., DeCou J., Koons B., Giusti A., Comey, C. Validation and Population Studies of the Loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, and Gc (PM loci), and HLA-DQ α Using a Multiplex Amplification and Typing Procedure. Journal of Forensic Sciences 1995, 40(1): 45-54.
- 29- Geserick G., Wirth I. Genetic Kinship Investigation from Blood Groups to DNA Markers. Transfus Med Hemother 2012, 39(3): 63–175.
- 30- Jeffreys, A.J. Individual-specific fingerprints of human DNA. Nature 1985, 316:76–79.
- 31- “https://www.mun.ca/biology/scarr/MGA2_09-06.html (Son erişim tarihi: 12.05.2019).”
- 32- Weber J.L., May P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet 1989, 44: 388-396.

- 33-Caputo M., Amador M. A., Santos S., Corach D. Potential forensic use of a 33 X-InDel panel in the Argentinean population. *International Journal of Legal Medicine* 2017 (doi:10.1007/s00414-016-1399-z).
- 34- Chen P., He G., Zou X., Wang M., Jia F., Bai H. ve ark. Forensic characterization and genetic polymorphisms of 19 X-chromosomal STRs in 1344 Han Chinese individuals and comprehensive population relationship analyses among 20 Chinese groups. *PLoS ONE* 2018, 13(9).
- 35- “<https://www.stewartsociety.org/bannockburn-genetic-genealogy-project.cfm> (Son erişim tarihi: 12.05.2019).”
- 36- Houck M.M. *Forensic Biology*, London, Academic Press 2016.
- 37- Fidanoğlu P., Belder N., Erdoğan B., İlk Ö., Rajabli F., H. Özdağ, *Genom projeleri 5N1H: Ne, nerede, ne zaman, nasıl, neden ve hangi popülasyonda?. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2014, 71(1): 45-60.
- 38- Wright A. Genetic variation: polymorphisms and mutations. *eLS*. 2005 (doi:10.1038/npg.els.0005005).
- 39- Wei Y. L., Qin C. J., Dong H., Jia J., Li C.X. A validation study of a multiplex INDEL assay for forensic use in four Chinese populations. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014, 9: 22-25.
- 40- “<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Single-Nucleotide-Polymorphisms> (Son erişim tarihi: 12.05.2019).”
- 41- “<https://tr.wikipedia.org/wiki/%C4%B0nsersiyon> (Son erişim tarihi: 12.05.2019).”
- 42- “https://tr.wikipedia.org/wiki/Delesyon#/media/Dosya:Deletion_of_chromosome_section.svg (Son erişim tarihi: 12.05.2019).”
- 43- Weber J. L., David D., Heil J., Fan Y., Zhao C., Marth G. Human Diallelic Insertion/Deletion Polymorphisms, *Am. J. Hum. Genet* 2002, 71: 854–862.

- 44- Carvalho A., Cainé L., Carvalho R., Pinheiro M. F., Application of indels (investigator DIPplex) in mixture samples. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2011, 3(1): 351–352.
- 45- Mills RE, Pittard WS, Mullaney JM, Farooq U, Creasy TH, Mahurkar AA, ve ark. Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. *Genome research* 2011, 21(6): 830-839.
- 46- Song F., Luo H. B., Li J. N., Hou Y. P., Validation of a multiplex system with 20 multi-Indels for forensic purposes. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2015, 48-49.
- 47- Zhang Y. D. ve ark. Forensic evaluation and population genetic study of 30 insertion/deletion polymorphisms in a Chinese Yi group. *Electrophoresis* 2015, 36: 1196–1201.
- 48- “<https://www.genome.gov/genetics-glossary/X-Chromosome> (Son erişim tarihi: 17.05.2019).”
- 49- “<https://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/X> (Son erişim tarihi: 17.05.2019).”
- 50- Martinez J. ve ark. Genetic characterization of 32 X-InDels in a population sample from São Paulo State (Brazil). *Int. J. Legal Med.*, 2019 (<https://doi.org/10.1007/s00414-018-01988-w>).
- 51- Schwarzbach E., Smýkal P., Dostál O., Jarkovská M., Valová S. Gregor J. Mendel – Genetics Founding Father. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2014; 50(2): 43–51.
- 52- Darwin C. (1859) *On the Origin of Species*, England, Oxford World’s Classics.
- 53- Basavarajaiah D. M. *Advances in Genetic Statistics: Law of Hardy Weinberg Equilibrium Revisited*. London, Educreation Publishing.
- 54- Zheng G., Yang Y., Zhu X., Elston R. C. *Analysis of Genetic Association Studies*. Springer Science & Business Media 2012.

- 55- Butler J. M. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation. USA, Academic Press 2015.
- 56- Fung W. K., Hu Y. Q. Statistical DNA Forensics: Theory, Methods and Computation. England, John Wiley & Sons Ltd. 2008.
- 57- Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution 1965, 395-420.
- 58- Pasternak J. J. An Introduction to Human Molecular Genetics: Mechanisms of Inherited Diseases. England, 2. Baskı, John Wiley & Sons Ltd. 2008.
- 59- “<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/Arlequin35.html> (Son erişim tarihi: 17.05.2019).”
- 60- “<https://kimura.univ-montp2.fr/genetix> (Son erişim tarihi: 17.05.2019).”
- 61- PowerStats Microsoft® Excel dosyası (Promega).
- 62- “<http://e.informer.com/megasoftware.net/mega.php> (Son erişim tarihi: 17.05.2019).”
- 63- “<http://www.tuik.gov.tr> (Son erişim tarihi: 17.05.2019).”
- 64- QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook.
- 65- Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit Prosedure.
- 66- Filoglu G. Uslu Z. S., Özyer S., Bulbul O. The Development of an X Chromosome InDel Multiplex for Forensic Applications. 2018, Seattle, Amerika 70. AAFS (American Academy of Forensic Sciences) Toplantısı, Poster.
- 67- Filoglu G. Uslu Z. S., Özyer S., Bulbul O. Development of a novel 24 X Chromosome Insertion-Deletion Polymorphisms (X-InDel) Multiplex Panel. 2018, Lyon, Fransa, 8. EAFS (European Academy of Forensic Science Conference) Konferansı, Poster.

EKLER

EK-1 ETİK KURUL ONAY FORMU



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı

Tarih ve Sayı: 07/12/2016-442911



★ B E N D L 9 2 A J ★



Sayı :59491012-604.01.02-
Konu :Yük.Lis. Öğr. Selen Özyer'in etik kurul kararı A-19

ADLI TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi :17.11.2016 tarihli 416871 sayılı yazı

Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı öğretim üyesi **Yard.Doç.Dr. Gönül FİLOĞLU'nun** danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğr. Selen ÖZYER'in** sorumluluğunda **Doktora Öğr. Tuğba ÜNSAL'ın** yardımcılığında yürütülecek olan "**X Kromozomu InDel Lokuslarının Türkiye'deki Gen Sıklığı**" başlıklı **Yüksek Lisans Tezi** hakkında ilgi yazınız ve ekleri **06 Aralık 2016** 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=BENDL92AJ>

Ayrıntılı bilgi için iritibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300

Istanbul 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

EK-2 Bilgilendirilmiş Olur Formu

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 kullanılacağını 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 anlamadığınız ifadeler varsa çalışmadaki araştırmacılara sorarak bilgi edinebilirsiniz.

X Kromozomu InDel Lokuslarının Türkiye'deki Gen Sıklığı

Adli olgularda olay yerinden gelen örnekler (kan, kıl, meni, vajinal sıvı, tükürük, diş vb.) genellikle az miktarda bulunmaktadır ve çevresel koşullara bağlı olarak bozulmaktadır. Bu tür biyolojik örnekler ile DNA analizi yapılabilmesi için yeni metodlar geliştirilmiştir. Günümüzde X kromozomu üzerinde bulunan genetik işaretler kullanılmaktadır. Son yıllarda adli kimliklendirmede InDel (insersiyon-delesyon)'ler kullanılmaya başlanmıştır. Bu lokuslar; babalık tayininde, nesep davalarında, akrabalık ilişkilerinde, felaket kurbanlarına ait DNA profillemesinde, olay yerinden toplanan biyolojik delillerin kimliklendirilmesinde kullanılabilmektedir.

Bu çalışmada X kromozomunda ki 24 InDel lokusunun ülkemizde kimliklendirmede ve nesep tayininde kullanılabilesi için, bu lokusların ülkemiz (Türkiye) popülasyonundaki gen frekanslarının belirlenmesi gerekir. Bu amaca yönelik olarak bu çalışmada X kromozomunda ki InDel lokuslarının Türkiye toplumundaki gen frekansları belirlenerek adli bilimlerde kullanımı sağlanacaktır.

Uygulanacak yöntem şu şekildedir: Önce sizden alınılacak ağız içi sürüntü örneğinden DNA izole edilecek ve miktarı belirlenecektir. Sonra PCR tekniği ile 24 InDel lokusu çoğaltılacak ve PCR ürünlerinin elektroforezi ve analizi yapılacaktır. En son elde edilen genotiplerin alel frekansları hesaplanacaktır.

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; 100-150 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 AR-GE Laboratuvarında yapılacaktır.

Kendi haklarınız hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir bilgi almak istediğinizde, sorumlu araştırmacı Gönül Filoğlu'dur. Araştırmacıya günün 24 saatinde erişebilecek telefon numarası; 0(532) 2260828 'dir.

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 ayrılabilceğimi 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 InDel Lokuslarının Türkiye’deki Gen Sıklığı” yüksek lisans tez çalışması kapsamında alınan ağız içi sürüntü-tükürük örneğinin (Gönüllü tarafından uygun olan sık işaretlelenmelidir)

- ☐ *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: Gönül Filoğlu

Yetkin Araştırmacının İmzası:

Tarih:



EK-3 22-X InDel lokusunun 250 kişiye ait genotipi

Tablo XIII. 22-X InDel lokusunun 250 kişiye ait genotipi

Örnek	XID1	XID2	XID3	XID4	XID5	XID6	XID7	XID8	XID9	XID10	XID11	XID12	XID13	XID14	XID15	XID16	XID17	XID18	XID19	XID20	XID21	XID22
S1	del	del	del	ins	del	ins	del	del	ins	ins	del	Ins	ins	ins	del	del	ins	ins	ins	ins	ins	del
S2	del	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	del	del	ins	Del	del	del	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins
S3	ins	ins	ins	del	del	del	ins	del	del	del	ins	Ins	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins
S4	ins	ins	del	ins	ins	del	ins	del	ins	del	del	del	ins	del	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	del
S5	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	ins	del	ins	ins	del	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins
S6	ins	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	del	del	del	ins	ins	del	ins	del	del	ins
S7	ins	del	del	ins	ins	del	del	ins	del	del	ins	del	del	del	del	ins	ins	del	ins	ins	ins	del
S8	del	ins	del	del	del	ins	ins	ins	del	del	ins	del	ins	del	ins	del	del	ins	ins	del	del	del
S9	del	ins	ins	ins	del	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	del	del	del	del	del	del	ins	ins	ins	ins
S10	ins	del	ins	ins	del	ins	ins	del	ins	del	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins	del	del	del	del
S11	ins	del	indel	indel	indel	indel	indel	del	indel	del	indel	del	del	del	ins	indel	indel	indel	indel	ins	indel	indel
S12	del	del	del	ins	indel	indel	indel	indel	indel	ins	del	indel	ins	del	del	indel	indel	indel	ins	ins	indel	ins
S13	ins	indel	indel	indel	del	indel	ins	indel	indel	del	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	del	ins	indel	indel	indel
S14	ins	indel	indel	indel	indel	del	ins	del	indel	del	ins	del	del	del	indel	indel	indel	del	indel	ins	indel	indel
S15	indel	ins	indel	del	indel	del	del	indel	indel	indel	ins	del	indel	indel	ins	indel	indel	del	del	indel	del	indel
S16	indel	indel	ins	indel	indel	del	indel	del	indel	indel	indel	del	ins	indel	indel	del	ins	indel	del	indel	del	indel
S17	ins	del	del	indel	indel	indel	ins	indel	indel	ins	indel	indel	ins	del	indel	del	indel	indel	indel	del	indel	ins
S18	ins	indel	indel	indel	indel	del	ins	del	indel	del	indel	ins	del	indel	ins	indel	indel	indel	indel	ins	indel	indel
S19	indel	del	indel	ins	del	del	del	indel	indel	del	del	ins	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	del	del	del
S20	indel	indel	ins	ins	indel	del	indel	del	indel	del	del	ins	indel	indel	indel	indel	del	indel	ins	del	indel	indel
S21	indel	ins	indel	indel	ins	del	del	ins	del	indel	ins	ins	ins	indel	ins	indel	del	indel	indel	del	indel	ins
S22	del	ins	ins	ins	del	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	del	del	del	del	del	del	ins	ins	ins	ins
S23	del	ins	ins	del	ins	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	del	ins
S24	ins	ins	ins	del	del	del	ins	del	del	del	ins	del	del	ins	ins	del	ins	del	del	del	del	del
S25	del	ins	ins	ins	del	del	ins	del	ins	del	ins	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins

S26	indel	ins	ins	indel	indel	indel	indel	del	indel	del	indel	del	del	indel	indel	indel	del	ins	ins	indel	del	del
S27	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	del	del	del	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins
S28	del	ins	del	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	ins	del	del	ins	del
S29	ins	del	ins	indel	indel	indel	ins	indel	indel	indel	del	ins	indel	del	indel	indel	indel	indel	indel	del	indel	ins
S30	indel	del	ins	indel	del	indel	del	del	indel	del	ins	indel	indel	del	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	del
S31	ins	ins	del	del	del	del	indel	indel	indel	del	indel	ins	indel	del	ins	indel	indel	indel	ins	ins	del	indel
S32	ins	del	ins	indel	del	indel	indel	del	indel	del	del	del	indel	del	indel	indel	indel	indel	indel	ins	ins	del
S33	indel	del	indel	ins	del	ins	del	indel	del	ins	del	del	del	del	indel	indel	ins	indel	ins	indel	ins	indel
S34	ins	indel	indel	ins	indel	del	ins	del	indel	indel	ins	indel	ins	del	indel	del	indel	indel	indel	indel	ins	indel
S35	del	del	ins	ins	del	del	ins	ins	ins	del	del	del	ins	del	ins	ins	del	ins	del	ins	ins	ins
S36	ins	del	ins	ins	del	ins	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	del	ins	ins	ins	del	ins
S37	ins	ins	ins	del	del	del	ins	del	ins	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	del
S38	ins	del	del	ins	del	del	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins
S39	ins	ins	ins	del	del	del	ins	del	del	del	del	ins	ins	del	ins	del	del	ins	ins	ins	ins	ins
S40	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	del	del	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins
S41	del	ins	ins	ins	del	del	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins
S42	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	del	ins	del	del	del	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	del	del
S43	ins	ins	ins	ins	del	del	del	del	del	del	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del
S44	del	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	del	ins	del	del	ins	ins	del	ins	del
S45	ins	del	indel	indel	indel	del	indel	del	ins	del	ins	del	ins	del	ins	ins	indel	del	del	del	indel	ins
S46	del	ins	ins	ins	indel	indel	ins	ins	indel	indel	ins	del	ins	indel	indel	del	del	del	indel	indel	ins	del
S47	ins	del	del	ins	del	ins	del	del	ins	del	del	del	ins	del	del	del	ins	del	del	del	del	del
S48	ins	del	ins	ins	del	del	del	ins	del	ins	ins	del	del	ins	ins	ins	del	del	del	del	del	ins
S49	ins	ins	ins	del	del	del	del	ins	ins	del	ins	del	ins	del	del	del	del	ins	del	del	ins	del
S50	ins	del	del	del	del	del	ins	del	ins	del	del	del	del	del	del	del	del	ins	del	del	ins	del
S51	del	ins	ins	del	del	ins	del	del	ins	del	del	ins	ins	del	del	del	del	del	del	del	ins	ins
S52	del	del	ins	del	del	del	ins	ins	ins	del	del	ins	ins	del	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins
S53	ins	ins	ins	ins	del	del	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	del	del	ins	ins	ins	del	ins	ins
S54	ins	ins	del	ins	del	del	del	del	del	ins	del	del	ins	del	ins	del	del	ins	del	ins	ins	ins

S55	del	del	ins	del	ins	del	del	del	del	del	del	del	ins	ins	ins	del	del	del	ins	ins	del	ins
S56	del	del	ins	ins	del	ins	del	del	ins	del	ins	del	del	del	ins	del	del	ins	ins	del	ins	ins
S57	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	ins	del	del	ins	del	ins	del	ins	ins	del	ins	ins	del	ins	ins
S58	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	del	del	ins	ins	ins	ins	ins
S59	ins	ins	ins	ins	ins	del	del	ins	ins	del	del	del	ins	del	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	ins
S60	ins	ins	indel	indel	indel	indel	ins	del	del	del	indel	del	indel	del	indel	ins	del	del	indel	ins	indel	indel
S61	ins	indel	del	indel	indel	ins	indel	del	ins	del	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	ins	indel	ins	indel	ins
S62	ins	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	ins	indel	indel	indel	ins	del	ins	del	del	ins	indel	indel	indel	indel
S63	ins	indel	ins	indel	del	ins	indel	indel	ins	ins	ins	del	del	indel	indel	indel	del	indel	indel	indel	indel	indel
S64	indel	ins	ins	indel	del	del	ins	del	ins	del	indel	del	ins	del	del	ins	del	del	indel	indel	del	del
S65	indel	indel	indel	indel	indel	del	indel	indel	indel	indel	ins	indel	indel	indel	indel	ins	ins	indel	del	del	indel	del
S66	indel	del	del	ins	indel	del	indel	indel	indel	del	ins	ins	ins	indel	del	ins	indel	indel	ins	del	del	del
S67	indel	ins	indel	indel	del	del	ins	indel	ins	indel	ins	ins	indel	del	ins	ins	indel	ins	indel	del	indel	ins
S68	ins	indel	del	ins	ins	del	del	indel	indel	del	indel	indel	ins	indel	del	del	ins	del	del	del	del	indel
S69	indel	del	ins	indel	del	del	indel	indel	ins	indel	del	del	indel	indel	indel	ins	indel	indel	indel	indel	del	indel
S70	indel	del	ins	indel	del	indel	del	indel	indel	indel	ins	indel	indel	del	indel	indel	ins	indel	ins	indel	del	indel
S71	ins	indel	ins	ins	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	del	indel	indel	indel	ins	ins	indel	indel	indel
S72	ins	ins	ins	ins	indel	indel	indel	indel	del	indel	indel	del	ins	indel	indel	indel	ins	ins	ins	ins	ins	indel
S73	ins	del	ins	del	indel	indel	ins	ins	ins	del	indel	indel	indel	del	ins	indel	indel	indel	ins	del	ins	indel
S74	del	indel	ins	indel	del	del	indel	indel	ins	indel	indel	ins	ins	del	ins	del	ins	indel	indel	indel	ins	ins
S75	ins	ins	ins	ins	indel	ins	indel	del	indel	indel	ins	del	del	indel	indel	indel	indel	indel	indel	ins	indel	indel
S76	indel	indel	ins	ins	indel	del	del	indel	del	ins	ins	ins	indel	del	indel	del	indel	indel	ins	del	indel	indel
S77	indel	del	ins	ins	indel	ins	indel	indel	ins	indel	indel	del	del	del	del	indel	indel	indel	ins	indel	ins	ins
S78	indel	ins	ins	del	del	indel	del	ins	ins	del	ins	del	indel	del	ins	del	indel	del	del	del	indel	ins
S79	indel	indel	ins	indel	indel	indel	ins	del	del	del	ins	del	del	indel	ins	del	indel	indel	ins	del	ins	ins
S80	indel	indel	del	indel	indel	indel	ins	indel	indel	indel	ins	indel	ins	del	indel	del	indel	ins	del	indel	ins	ins
S81	ins	del	ins	indel	indel	indel	del	indel	ins	del	del	indel	del	indel	ins	indel	indel	ins	indel	indel	indel	del
S82	ins	indel	del	indel	indel	indel	del	indel	ins	del	del	indel	ins	indel	del	indel	indel	del	indel	del	ins	del
S83	indel	del	ins	indel	del	ins	indel	indel	ins	indel	del	ins	ins	indel	ins	indel	indel	indel	ins	indel	ins	indel

S84	ins	indel	indel	indel	ins	del	del	del	del	indel	del	indel	indel	del	del	del	ins	del	indel	del	ins	indel
S85	ins	indel	del	indel	indel	del	del	del	indel	del	indel	del	indel	indel	del	ins	indel	del	indel	del	ins	indel
S86	indel	indel	ins	del	indel	indel	ins	indel	del	del	indel	indel	indel	del	indel	indel	indel	indel	ins	indel	ins	ins
S87	ins	ins	ins	ins	del	indel	indel	del	ins	del	indel	del	indel	indel	indel	ins	indel	ins	ins	del	indel	indel
S88	ins	ins	ins	ins	del	del	del	del	ins	del	ins	indel	del	del	del	indel	del	indel	indel	indel	ins	del
S89	ins	del	ins	indel	del	ins	del	del	ins	del	del	ins	ins	indel	ins	del	del	ins	ins	ins	ins	ins
S90	indel	ins	indel	indel	indel	indel	indel	indel	del	indel	indel	indel	indel	del	indel	indel	ins	del	ins	indel	indel	ins
S91	indel	indel	del	indel	indel	del	ins	indel	indel	indel	indel	del	ins	indel	del	indel	indel	ins	del	del	indel	ins
S92	indel	ins	indel	indel	indel	ins	del	ins	del	del	ins	del	indel	del	indel	del	del	del	ins	del	ins	del
S93	ins	indel	indel	indel	indel	del	ins	del	ins	indel	ins	indel	indel	del	del	indel	indel	indel	del	indel	del	del
S94	ins	del	ins	del	del	ins	ins	del	indel	indel	indel	indel	ins	del	indel	ins	indel	del	ins	indel	indel	del
S95	ins	indel	indel	indel	del	ins	indel	del	ins	indel	indel	del	indel	indel	ins	indel	indel	ins	ins	del	ins	del
S96	indel	del	indel	indel	ins	indel	del	del	indel	del	ins	del	del	del	indel	indel	indel	indel	del	del	ins	indel
S97	indel	del	indel	indel	indel	indel	indel	del	ins	indel	indel	indel	del	indel	ins	del	ins	ins	ins	indel	ins	indel
S98	del	indel	ins	indel	del	indel	del	del	del	del	indel	ins	indel	del	indel	indel	indel	indel	ins	ins	indel	ins
S99	indel	indel	ins	indel	del	ins	indel	del	indel	del	ins	del	del	ins	indel	indel	ins	del	indel	indel	ins	ins
S100	indel	ins	indel	indel	indel	indel	ins	indel	ins	del	indel	indel	indel	del	ins	indel	indel	indel	ins	indel	ins	indel
S101	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	del	ins	indel	ins	del	indel	ins	indel	indel	ins	indel	ins	indel
S102	indel	indel	ins	indel	indel	indel	del	del	ins	del	ins	indel	indel	del	indel	del	indel	indel	indel	indel	indel	ins
S103	del	indel	indel	del	indel	indel	indel	del	indel	del	indel	indel	indel	del	indel	ins	indel	indel	ins	ins	ins	indel
S104	indel	del	ins	indel	ins	indel	del	ins	indel	indel	del	indel	indel	del	indel	ins	ins	indel	indel	ins	indel	indel
S105	indel	ins	indel	indel	del	ins	ins	indel	del	ins	ins	del	ins	del	indel	del	del	ins	indel	ins	ins	ins
S106	del	indel	ins	indel	del	ins	ins	del	ins	del	indel	del	ins	ins	indel	indel	ins	ins	indel	indel	ins	ins
S107	indel	indel	indel	indel	indel	indel	ins	del	ins	del	del	del	indel	del	indel	indel	indel	ins	ins	indel	ins	ins
S108	indel	indel	ins	indel	indel	ins	del	indel	indel	indel	del	indel	ins	del	indel	ins	indel	del	ins	ins	ins	ins
S109	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	del	del	del	del	ins	del	del	ins	ins	del	ins	del
S110	indel	del	ins	indel	del	del	indel	indel	ins	del	indel	del	indel	indel	indel	del	ins	indel	indel	indel	indel	ins
S111	indel	indel	indel	del	indel	indel	del	del	indel	del	indel	del	indel	del	ins	indel	ins	del	ins	del	indel	ins
S112	indel	indel	indel	indel	indel	indel	ins	del	indel	del	ins	del	indel	indel	indel	del	indel	indel	del	indel	del	ins

S113	indel	indel	ins	ins	indel	del	ins	del	del	indel	del	del	indel	indel	indel	indel	ins	del	ins	ins	ins	ins
S114	indel	del	ins	indel	indel	indel	ins	indel	ins	indel	indel	del	indel	indel	indel	indel	indel	ins	indel	del	ins	indel
S115	indel	indel	ins	del	del	ins	indel	indel	indel	indel	del	indel	indel	del	ins	del	indel	ins	ins	ins	ins	ins
S116	indel	indel	indel	ins	indel	del	ins	del	ins	del	del	indel	ins	del	ins	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel
S117	indel	ins	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	del	ins	ins	ins	del	ins	indel	ins	del	ins	del	ins	indel
S118	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del	del	del	del	del	del	ins	ins	del	del	del	ins	ins	del	ins
S119	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	del	del	del	del	ins	del	del	del	ins	ins
S120	ins	del	ins	ins	del	ins	ins	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del
S121	del	ins	ins	del	del	ins	ins	del	ins	ins	ins	del	del	ins	del	ins	ins	del	ins	ins	del	ins
S122	ins	del	del	ins	del	del	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	del
S123	ins	del	del	del	del	ins	ins	del	ins	del	del	del	ins	ins	del	ins	ins	del	del	del	ins	ins
S124	ins	ins	del	ins	del	del	ins	del	del	del	ins	del	del	ins	del	del	ins	ins	del	ins	ins	del
S125	ins	ins	del	ins	del	del	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	del	del	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins
S126	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	del	ins	ins	del	ins	ins
S127	del	ins	ins	del	del	del	del	del	del	ins	ins	del	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins
S128	ins	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	del	del	del	del	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	ins
S129	ins	del	del	ins	del	ins	ins	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	del	ins
S130	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	ins	del	del	del	del	del	del	del	del	ins	ins
S131	ins	ins	del	del	del	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	ins	del	ins	ins	del	del	ins	ins	ins
S132	ins	ins	del	del	del	ins	del	del	del	del	ins	del	del	del	ins	ins	del	del	del	del	del	ins
S133	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	del	del	ins	del	del	ins	ins	del	del	del	ins	del	del
S134	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	del	del	ins	ins	del	del
S135	ins	del	ins	ins	del	del	ins	del	ins	del	del	ins	ins	ins	ins	del	del	del	del	del	del	del
S136	del	del	ins	ins	del	del	del	del	del	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	del	ins	del	del	del
S137	del	del	ins	ins	del	ins	del	ins	ins	del	del	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	del	del
S138	ins	del	del	del	del	del	ins	del	del	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	del	del	del	ins	ins
S139	ins	del	ins	ins	del	del	ins	del	ins	ins	ins	del	del	del	ins	ins	ins	del	del	del	del	ins
S140	ins	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	ins	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	del	del	ins	ins	ins
S141	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	del	del	del	ins	del	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	del

S142	ins	del	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	ins	ins	ins	del	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins
S143	ins	ins	del	ins	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	del	del	del	ins	ins	del	del	del	del	del
S144	ins	ins	del	del	del	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	del	del	ins	del
S145	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	del	del	del	del	ins	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins
S146	del	ins	ins	ins	ins	del	del	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del
S147	del	ins	ins	del	del	del	ins	ins	del	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del
S148	ins	ins	del	del	del	del	del	del	ins	del	del	del	ins	ins	del	ins	ins	del	del	del	del	del
S149	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	del	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	del
S150	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	del	del	del	del	ins	del	del	ins	ins	del	ins	del
S151	ins	ins	ins	del	del	ins	ins	del	del	del	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins
S152	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	del	del	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	del	ins	ins
S153	del	del	ins	ins	ins	del	del	ins	ins	del	ins	del	ins	del	ins	ins	del	ins	ins	del	ins	ins
S154	del	ins	ins	ins	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	del	del	ins	del	del	ins	ins	ins	ins	ins
S155	ins	del	ins	ins	del	ins	del	del	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	ins	ins
S156	del	ins	ins	ins	del	ins	del	del	del	del	del	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del
S157	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	del	del	ins	ins	del	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del
S158	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	del	ins	del	del	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	ins
S159	ins	del	del	ins	ins	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	ins
S160	ins	indel	ins	indel	indel	indel	indel	indel	indel	del	del	ins	ins	del	indel	del	ins	indel	ins	indel	ins	indel
S161	ins	ins	indel	ins	del	del	ins	del	indel	del	ins	del	indel	del	ins	indel	indel	indel	indel	ins	indel	del
S162	ins	ins	ins	indel	indel	ins	indel	del	del	indel	ins	indel	ins	del	indel	indel	ins	ins	indel	indel	ins	indel
S163	indel	del	del	ins	ins	del	del	indel	ins	del	ins	del	indel	indel	ins	del	indel	indel	ins	ins	indel	ins
S164	indel	indel	ins	indel	del	ins	del	indel	ins	indel	indel	del	ins	del	indel	indel	ins	indel	ins	indel	ins	indel
S165	ins	indel	indel	indel	del	indel	indel	del	indel	del	indel	ins	ins	del	indel	indel	ins	indel	indel	del	del	indel
S166	ins	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	indel	indel	del	indel	del	ins	indel	ins	del	indel	del	ins	del
S167	ins	del	indel	ins	del	del	ins	del	indel	del	indel	del	indel	indel	indel	del	indel	indel	ins	ins	indel	indel
S168	indel	indel	ins	ins	ins	indel	indel	indel	ins	del	ins	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	del	indel	indel
S169	ins	del	ins	ins	indel	ins	ins	del	indel	indel	indel	del	ins	del	ins	del	ins	indel	indel	del	indel	ins
S170	ins	del	ins	indel	indel	ins	ins	indel	indel	indel	indel	del	ins	indel	indel	ins	indel	ins	del	indel	del	ins

S171	indel	ins	indel	ins	indel	indel	ins	del	ins	del	ins	del	del	del	ins	indel	ins	indel	del	del	indel	del
S172	ins	indel	ins	indel	del	ins	ins	indel	indel	indel	del	del	indel	indel	indel	del	ins	del	ins	del	indel	ins
S173	indel	del	indel	indel	del	indel	indel	ins	ins	del	indel	indel	del	del	indel	indel	del	ins	ins	indel	indel	indel
S174	ins	del	ins	ins	indel	indel	indel	del	indel	del	indel	del	indel	indel	ins	indel	del	ins	ins	ins	indel	indel
S175	indel	indel	ins	indel	del	del	ins	ins	indel	del	ins	ins	ins	del	indel	ins	del	ins	ins	indel	indel	ins
S176	indel	del	ins	indel	indel	ins	del	indel	indel	del	indel	del	indel	ins	ins	indel	indel	del	del	indel	del	indel
S177	indel	indel	indel	del	indel	del	ins	del	indel	indel	indel	indel	ins	del	indel	indel	indel	indel	ins	ins	indel	ins
S178	indel	indel	ins	del	indel	indel	ins	del	ins	indel	indel	del	del	del	indel	indel	ins	indel	del	indel	indel	indel
S179	del	ins	ins	indel	indel	del	indel	indel	indel	indel	ins	del	ins	del	del	ins	ins	indel	indel	ins	ins	indel
S180	indel	del	ins	del	del	del	del	del	indel	del	ins	del	ins	indel	ins	ins	indel	ins	indel	del	indel	indel
S181	indel	indel	indel	ins	del	del	ins	del	ins	ins	del	indel	indel	ins	ins	del	del	indel	ins	del	indel	indel
S182	indel	indel	ins	indel	del	indel	indel	del	del	del	ins	indel	indel	del	ins	indel	indel	ins	del	del	del	indel
S183	ins	del	ins	indel	del	del	ins	ins	indel	indel	indel	indel	ins	del	indel	indel	indel	indel	del	del	del	indel
S184	ins	del	indel	indel	del	indel	ins	indel	indel	del	indel	indel	ins	del	ins	ins	ins	ins	indel	ins	indel	indel
S185	ins	del	indel	indel	indel	del	indel	del	ins	del	ins	del	ins	del	ins	indel	indel	ins	del	ins	indel	ins
S186	del	indel	indel	indel	indel	indel	indel	ins	ins	indel	ins	del	ins	indel	ins	del	ins	ins	del	indel	del	indel
S187	ins	indel	ins	del	indel	del	ins	del	ins	indel	ins	indel	ins	indel	del	indel	ins	ins	ins	ins	ins	indel
S188	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	del	del	del	del	del	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del
S189	ins	ins	ins	ins	del	del	del	del	ins	del	del	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins
S190	ins	ins	ins	del	del	ins	ins	del	del	ins	ins	del	ins	del	del	del	ins	ins	ins	del	del	del
S191	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	del	del	ins	ins	ins	del	del	del	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins
S192	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	del	del	del	del	del	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	del
S193	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	del	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	ins
S194	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	del	del	ins	ins	del	del	ins	del	del	ins	ins	del	del	ins
S195	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins	del	del	del	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del
S196	ins	ins	ins	del	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	del	del	del	del	ins
S197	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	del	del	del	ins	del	del	ins	ins	ins	del
S198	ins	ins	ins	ins	del	del	ins	del	ins	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	del	ins	del	del	ins
S199	del	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	del	del	del	del	ins	del	ins	ins

S200	ins	ins	ins	ins	del	del	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	del	del	ins	ins	ins	del
S201	ins	del	ins	del	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	del	del	ins	del	ins	del	del	del	del	ins
S202	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	del	del	del	del	del	del	del	ins	del	del	ins	ins	del	ins
S203	ins	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	del	ins	ins	del	del	ins	ins	ins	del	ins	del	del	ins
S204	ins	del	ins	ins	ins	ins	del	del	del	del	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins
S205	ins	del	ins	ins	del	ins	del	del	del	del	ins	del	ins	del	del	ins	del	del	ins	del	del	ins
S206	ins	ins	del	del	del	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	del	ins	ins	del	del	del	del	ins	del
S207	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	ins	del	del	ins	ins	ins	del	del	del	del	ins	ins	ins	del	del
S208	ins	del	ins	ins	ins	ins	del	del	ins	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins	del	del	ins
S209	ins	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	del	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins
S210	ins	ins	del	del	del	ins	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	del	del	del	del	del	del	del	del
S211	ins	ins	ins	ins	del	del	del	del	del	del	ins	ins	ins	del	del	del	ins	ins	del	ins	ins	del
S212	ins	ins	ins	ins	del	del	del	ins	ins	del	ins	del	del	del	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del
S213	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	ins	del	del	del	del	ins	del	ins	ins
S214	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	ins	ins	ins	ins	del	ins	del
S215	ins	ins	del	ins	ins	del	del	del	del	del	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins
S216	ins	del	del	ins	ins	ins	del	ins	del	del	ins	del	del	del	del	ins	ins	del	ins	ins	ins	del
S217	ins	ins	ins	ins	del	del	del	del	ins	del	ins	del	del	del	ins	ins	del	del	ins	ins	del	del
S218	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	del	ins	ins	del	ins	del	ins	del
S219	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	del	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	ins
S220	ins	ins	del	del	ins	ins	ins	del	del	del	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins	del	ins
S221	ins	ins	ins	ins	del	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	del	del	del	del	ins	ins	ins	ins	del
S222	ins	del	ins	indel	del	del	del	indel	ins	del	indel	indel	indel	del	indel	del	ins	indel	del	del	indel	indel
S223	ins	del	ins	indel	del	indel	ins	del	ins	del	del	del	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	del	indel
S224	indel	ins	ins	indel	ins	del	del	del	ins	del	indel	indel	ins	del	indel	ins	indel	ins	del	ins	indel	indel
S225	ins	indel	indel	ins	ins	indel	ins	del	ins	del	indel	del	ins	indel	indel	ins	indel	indel	indel	ins	indel	del
S226	indel	indel	indel	ins	ins	del	indel	ins	ins	indel	del	ins	del	del	indel	indel	indel	ins	ins	indel	indel	ins
S227	indel	indel	indel	ins	indel	indel	indel	del	ins	del	indel	indel	indel	indel	ins	indel	indel	indel	indel	del	indel	del
S228	indel	ins	indel	del	ins	del	ins	indel	indel	del	ins	del	indel	indel	indel	del	indel	indel	del	ins	del	indel

S229	del	ins	ins	indel	indel	indel	indel	del	ins	ins	indel	del	ins	del	indel	indel	indel	ins	indel	indel	ins	ins
S230	ins	indel	indel	del	indel	del	indel	del	indel	indel	del	del	ins	del	ins	indel	indel	indel	ins	indel	indel	ins
S231	indel	indel	indel	indel	ins	ins	ins	indel	ins	indel	ins	indel	del	del	del	indel	ins	indel	del	indel	del	indel
S232	ins	indel	indel	indel	indel	del	ins	indel	ins	indel	indel	indel	indel	indel	indel	indel	del	indel	indel	indel	indel	del
S233	del	indel	indel	indel	ins	ins	del	del	indel	del	indel	indel	indel	del	indel	del	ins	ins	ins	del	indel	indel
S234	indel	indel	indel	ins	indel	indel	indel	del	ins	del	indel	del	indel	indel	indel	ins	ins	del	del	indel	del	indel
S235	ins	ins	ins	del	indel	ins	indel	del	indel	del	indel	indel	indel	indel	indel	indel	ins	ins	indel	del	del	indel
S236	indel	del	indel	indel	del	del	ins	indel	ins	del	indel	indel	ins	ins	indel	del	indel	indel	indel	ins	ins	del
S237	indel	indel	indel	indel	indel	del	ins	del	ins	indel	indel	del	del	indel	ins	del	del	ins	indel	ins	ins	del
S238	del	del	ins	del	del	ins	del	del	ins	del	del	ins	del	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins	del	del
S239	ins	del	del	del	del	del	ins	del	del	del	del	ins	ins	ins	ins	del	del	ins	del	ins	del	ins
S240	ins	del	ins	del	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	ins	del	ins	del	del	ins	ins	del	del	ins	del
S241	del	del	ins	ins	del	del	del	del	ins	ins	ins	ins	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del	ins	del
S242	ins	ins	del	del	del	del	ins	del	ins	del	del	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins	ins	del	ins
S243	ins	ins	ins	ins	del	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	ins	ins	del	del	del	del	del	del	ins
S244	del	ins	del	del	del	ins	del	ins	del	del	ins	del	ins	del	del	del	del	ins	del	del	del	del
S245	ins	ins	del	del	ins	ins	del	del	del	del	ins	del	del	del	ins	ins	ins	ins	del	del	del	del
S246	indel	indel	indel	ins	indel	indel	indel	del	ins	del	indel	del	indel	indel	indel	ins	ins	del	del	indel	del	indel
S247	del	del	ins	ins	del	del	del	del	ins	ins	del	del	del	del	ins	del	del	del	del	del	ins	ins
S248	ins	del	del	ins	del	del	ins	ins	ins	del	ins	del	del	del	del	del	ins	ins	ins	ins	ins	ins
S249	indel	del	ins	indel	indel	indel	ins	del	indel	del	indel	indel	del	del	indel	del	indel	ins	indel	ins	ins	ins
S250	indel	indel	indel	indel	indel	ins	del	del	del	indel	indel	indel	ins	del	indel	ins	del	indel	del	ins	indel	indel

ÖZGEÇMİŞ

SELEN ÖZYER

Doğum tarihi ve Yeri: 05\10\1992, Üsküdar

Tel: +90 (537) 608 65 00

E-mail: selenozyer@outlook.com

Eğitim

İstanbul Üniversitesi	2015-2019
Fen Bilimleri Anabilim Dalı, Adli Tıp Enstitüsü (Tezli Yüksek Lisans Programı)	
İstanbul Üniversitesi	2014-2015
Biyoloji Öğretmenliği, Hasan Ali Yücel Eğitim Fakültesi (Pedagojik Formasyon Programı)	
İstanbul Üniversitesi	2010-2014
Biyoloji, Fen Fakültesi (Lisans Programı)	

Sunum &

Poster

16. Adli Bilimler Kongresi	Nisan 2019
İzmir, Türkiye, Sunum	
22 Multipleks X-InDel Lokusunun Türkiye'deki Gen Sıklığı	
8. EAFS (European Academy of Forensic Science Conference) Konferansı Lyon, Fransa, Poster	Ağustos 2018
Development of a novel 24 X-Chromosome Insertion- Deletion Polymorphisms (X-InDel) Multiplex Panel	
70. AAFS (American Academy of Forensic Sciences)	Şubat 2018
Toplantısı Seattle, Amerika, Poster	
The Development of an X-Chromosome InDel Multiplex for Forensic Applications	