T.C

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman: Doç. Dr. Gönül Filoğlu

GÖZ VE SAÇ RENGİNİ BELİRLEYEN SNP PANELİNİN OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

UZM. BİYOLOG İLKSEN SARI O

İSTANBUL - 2022

T.C

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman: Doç. Dr. Gönül Filoğlu

GÖZ VE SAÇ RENGİNİ BELİRLEYEN SNP PANELİNİN OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

UZM. BİYOLOG İLKSEN SARI O

İSTANBUL - 2022

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

Proje No: TSA-2017-26105

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşan değerli hocalarım; ***Doç. Dr. Gönül Filoğlu Tüfek, Doç.Dr. Üyesi Özlem Bülbül Ercan, Dr. Havva Altunçul, Prof. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu, Doç.Dr. Hüseyin Çakan, Doç Dr. Selda Mercan, Doç. Dr. Zeynep Türkmen, Prof. Dr. Faruk Aşıcıoğlu'na***

Çalışmam boyunca desteğini her an hissettiğim yaşadığım zorluklar karşısında pozitif bakış açısıyla sorunları çözmeme yardımcı olan, üzerimde emeğinin çok büyük olduğu değerli danışmanım ***Doç. Dr. Gönül Filoğlu Tüfek'e***

Kendisinden çok şey öğrendiğim, bilgi ve tecrübelerini cömertçe paylaşan, karşılaştığım zorlukların çözümünde bana sabırla katlanan, laboratuvar çalışmalarımda beni yönlendiren, tezime büyük katkısı olan kıymetli hocam ***Doç. Dr. Özlem Bülbül Ercan'a***

Çalışmalarım boyunca bana verdikleri destekleri için ***Sümeyye Zülal Şimşek, Sabahat Taş, Veysel Sapan, Cemalattin Arslan'a***

Tezimin gerçekleşmesinde katkıda bulunan ***Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne***

Tez çalışmam boyunca manevi desteklerinden dolayı ***Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü'nün idari personeline,***

Sonsuz sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim biricik babam ***Zeki TAVACI,*** annem ***Asuman TAVACI*** ve kardeşim ***İvgen KOCA***'ya

En zor zamanlarımda itici gücüm olan, sevgi ve desteğini hep hissettiğim sevgili eşim ***Selahattin SARI O***'ya ve asıl dünyam, güzel kızım ***KUMRU***'ya teşekkürü bir borç bilirim

İlksen SARI O

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER……..ii

ŞEKİLLER DİZİNİ.....……...……...v

TABLOLAR DİZİNİ…….....vi

SİMGELER VE KISALTMALAR…….....……....vii

1. ÖZET ix

2. SUMMARY x

3. GİRİŞ VE AMAÇ 1

4. GENEL BİLGİLER 4

4.1 Adli Genetikte Kullanılan DNA Markırların Gelişimsel Süreci 4

4.2 Adli Bilimlerde SNP Markırlarının Kullanımı 8

4.2.1 Kimliklendirmede kullanılan SNP'ler (Identity Informative SNPs-IISNPs)..... 8

4.2.2 Yakın soybağını belirleyen SNP'ler (Lineage Informative SNPs-LISNPs) 10

4.2.2.1 Mitokondriyal DNA (mtDNA): 10

4.2.2.2 Y Kromozomu: 11

4.2.2.3 X Kromozomu: 11

4.2.3 Atasal soy (biyocoğrafik soy) ile ilgili bilgi veren SNP'ler (Ancestry Informative Markers AISNPs) 12

4.2.4 Fenotipi belirleyen SNP'ler (Phenotypic Informative SNPs -PISNPs) 16

4.3 İnsan Pigmentasyonu Biyolojisi ve Genetiği 19

4.3.1 Melanositler ve Melanogenez 19

4.3.2 Ten Rengi 20

4.3.3 Saç Rengi 22

4.3.4 Göz Rengi 24

4.4. Adli DNA Fenotiplemede (FDP): Göz ve Saç rengi tahmini 26

4.4.1 Göz renginden sorumlu olan genler 27

4.4.1.1. OCA2 geni 27

4.4.1.2 HERC2 geni 28

4.4.1.3 SLC45A2 28

4.4.1.4 TYR geni 29

4.4.1.5 IRF4 geni 30

4.4.2 Saç Renginden Sorumlu Genler 30

4.4.2.1 MC1R geni 31

4.4.2.2 ASIP geni 31

4.5 Gözle Görülebilir Fiziksel Özelliklere (EVC- External visible characteristics) ait Tahmin Modelleri 32
4.5.1 Göz Rengi Tahmin Modeli 33
4.5.2 Saç Rengi Tahmin Modeli 35
4.6 Optimizasyon ve Validasyon (Geçerlilik) 39
4.6.1 Optimizasyon 39
4.6.2 Validasyon (Geçerlilik) 40
4.6.3 Validasyon Parametreleri 41
4.6.3.1Analiz Eşiği /Tespit sınırı (LOD-Limit of Detection) 41
4.6.3.2 Duyarlılık /Tayin sınırı (Limit of Quantition-LOQ) 42
4.6.3.3 Dinamik Alan 42
4.6.3.4 Tekrarlanabilirlik 43
4.6.3.5 Tekrar Üretilebilirlik (Tutarlılık) 43
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER 44
5.1 Kullanılan Cihazlar 45
5.2 Kullanılan Kitler 45
5.3 Kullanılan Kimyasallar 45
5.4 Çalışmada Kullanılan Örnekler 46
5.5 DNA İzolasyonu 46
5.6 DNA Miktar Tayini 47
5.7 PCR Öncesi Ön Hazırlıklar 48
5.7.1 Primerlerin Sulandırılması ve Konsantrasyonlarının Ayarlanması 48
5.7.1.1 Multipleks PCR Primerlerinin Konsantrasyonlarının Ayarlanması 48
5.7.1.2 SNaPshot (Minisekans) Primerlerin Konsantrasyonlarının Ayarlanması 48
5.8 Multipleks PCR Aşaması 51
5.9 Multipleks PCR Ürünlerinin Saflaştırılması 51
5.10 Minisekanslama (Tek Baz Uzama Reaksiyonu -SNaPshot™) 52
5.11 Minisekanslama Ürünlerinin Saflaştırılması 53
5.12 Minisekans Ürünlerinin ABI 310/3130 ile Elektroforezi 53
5.13 Minisekanslama Ürün Sonuçlarının Değerlendirilmesi 54
5.14 Verilerin Analizi ve Sonuçların Değerlendirilmesi 54
5.14.1 Genotipleme 54
5.14.2 Yöntemin Validasyon Parametrelerinin Yapılması 56
5.14.2.1 Analiz Eşiği 56
5.14.2.2 Dinamik Alan 56
5.14.2.3 Hassasiyet (Limit of Quantition-LOQ) 56

5.14.2.4 Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik 56
5.14.3 İstatistiksel Analiz 57
6. BULGULAR 59
6.1 HIrisPlex Panelinin Optimizasyon Çalışması 59
6.2 HIrisPlex Panelinin Validasyon Çalışması 63
6.2.1 Analiz Eşiği (Limit of Detection - LOD) 63
6.2.2 Dinamik Alan 63
6.2.3 Hassasiyet (LOQ- Limit of Quantitation) 65
6.3 HIrisPlex Panelinin Türkiye Populasyona ait örneklerin Analizleri 67
6.3.1 Göz Rengi Tahmin Değerleri 67
6.3.2 Saç Rengi Tahmin Değerleri 72
7. TARTIŞMA VE SONUÇ 78
8. KAYNAKLAR 88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Farklı mutasyon tipleri ile oluşan tek nükleotid polimorfizmin yapısı..... 7
Şekil 2. Melanin pigmentinin oluşumu 20
Şekil 3. İnsan ten renginin dünya üzerindeki dağılımı..... 21
Şekil 4. Popülasyonlara göre ten rengi farklılığı - melanozom şekilleri, boyutu ve dağılımı . 22
Şekil 5. Kıl yapısının şematik ve immünohistolojik gösterimi 23
Şekil 6. OCA2 gen ekspresyonunun düzenlenmesinde mavi- kahverengi göz renginin belirlenmesi 25
Şekil 7. Mavi, gri, yeşil, ela, açık kahveden koyu kahverengiye değişen temsili göz renkleri 26
Şekil 8. HIrispleks panelindeki genlerin kromozomlar üzerinde bulunduğu bölgeler..... 27
Şekil 9. Irisplex panelindeki 6 SNP lokusuyla mavi ve kahverengi göz renklerinin belirlenmesi. 34
Şekil 10. Irispleks panelinin Dünya üzerindeki göz rengi tahmini 35
Şekil 11. Saç renklerinin Dünya üzerindeki dağılımı 37
Şekil 12. Saç rengini belirleyen 22 SNP lokusunun homozigot minör alel girdisine göre tahmin modeli 38
Şekil 13. Genel metot validasyon parametreleri 40
Şekil 14. Kapiller elektroforez cihazında elde edilen sinyallere göre LOD, LOQ, dinamik alanın gösterilmesi..... 42
Şekil 15. GeneScan-120 Liz internal size standart uzunlukları 55
Şekil 16. Örnek analiz sayfası 58
Şekil 17. P15 (rs4959270) lokusuna ait singelpleks çalışması 59
Şekil 18. P17 (rs12203592) lokusuna ait singlepleks çalışması 60
Şekil 19. İlk primer konsantrasyonundan elde edilen elektroforegram 60
Şekil 20. 24 SNP lokusunun görüldüğü örnek elektroforegram 61
Şekil 21. HIrisPlex panelinin 9947A kontrol örneğine ait dengelenmiş elektroforegram görüntüsü 61
Şekil 22. Çeşitli miktarlarda (1,5 ng, 0,5 ng, 0,25 ng, 0,125 ng) DNA ile yapılan HIrisplex paneli çalışmasında her bir alele ait pik yüksekliklerinin (RFU) ortalaması. 64
Şekil 23. Pik yükseklikleri değerlerine bağlı DNA konsantrasyon grafiği..... 64
Şekil 24. 1. Analistin çalışmasına ait elektroforegram sonucu 66
Şekil 25. 2. Analistin çalışmasına ait elektroforegram sonucu 66
Şekil 26. 1. Analistin ABI 310 genetik analizöre ait yürütme sonucu..... 66
Şekil 27. 2. Analistin ABI 3130'a genetik analizöre ait yürütme sonuçları 66
Şekil 28. Mavi göz tahminine ait ROC ve AUC eğrisi..... 68
Şekil 29. Yeşil göz tahminine ait ROC ve AUC eğrisi..... 68
Şekil 30. Kahvernegi göz tahminine ait ROC ve AUC eğrisi..... 68
Şekil 31. Yeşil gözlü bireylerin gözlenen fenotipleri 70
Şekil 32. Siyah saç tahminine ait ROC ve AUC eğrisi..... 73
Şekil 33. Kahverengi saç tahminine ait ROC ve AUC eğrisi 73
Şekil 34. Kızıl saç tahminine ait ROC ve AUC eğrisi..... 74
Şekil 35. Kızıl saç tahminine ait ROC ve AUC eğrisi..... 74
Şekil 36. Sarı saçlı bireylerin saç rengi dağılımı ve tahmin sonuç 77

TABLO DİZİNİ

Tablo I. Adli DNA analiz aşamaları ve faaliyetleri 6
Tablo II. Kullanılan IISNP setleri 10
Tablo III. Adli genetik alanında geliştirilen başlıca AISNPs panelleri..... 15
Tablo IV. Göz, saç ve ten rengini belirleyen adli DNA test sistemleri 18
Tablo V. Multipleks PCR primerlerinin reaksiyondaki konsantrasyonu ve hacimleri..... 49
Tablo VI. SNapShot™ (SBE) primerlerinin reaksiyondaki konsantrasyonları ve hacimleri . 50
Tablo VII. Multipleks PCR bileşenleri ve miktarı 51
Tablo VIII. Multipleks PCR koşulları 51
Tablo IX. Exo-Sap karışımının hazırlanması 52
Tablo X. Minisekans reaksiyon karışımı 52
Tablo XI. Minisekanslama reaksiyon koşulları..... 53
Tablo XII. Elektroforez koşulları..... 54
Tablo XIII. Floresan işaretli ddNTP'lerin boyaları 55
Tablo XIV. 9947A kontrol DNA'sına ait HIrisPlex panelinin ABI 310 cihazında gözlenen SNP uzunluklarının ortalamaları ve standart sapmaları. 62
Tablo XV. HIrisplex panelinin ABI 310 genetik analizör cihazındaki analiz eşiği değeri 63
Tablo XVI. HIrisplex panelinin duyarlılık sonucu..... 65
Tablo XVII. 149 gönüllünün göz rengi tahmin başarısı 67
Tablo XVIII. HIrisplex panelinin Türkiye popülasyonundaki göz rengi tahmini için hesaplanan hassasiyet, özgüllük, PPV, NPV ve AUC değerleri. 67
Tablo XIX. Türkiye populasyonunun HIrisplex paneline ait göz rengi p değerleri sonuçları 71
Tablo XX. 149 gönüllünün saç rengi tahmin başarısı 73
Tablo XXI. HIrisplex panelinin Türkiye popülasyonundaki saç rengi tahmininde hesaplanan hassasiyet, duyarlılık, PPV, NPV ve AUC değerleri. 73
Tablo XXII. Türkiye populasyonunun HIrisplex paneline ait saç rengi p değerleri sonuçları74

SİMGELER VE KISALTMALAR

AUC	ROC eğrisinin altında kalan alan (Area under the ROC Curve)
AISNPs	Atasal soyu (biyocoğrafik soy) birleyen SNP'ler (Ancestry Informative SNP)
ASIP	Agouti sinyal protein geni (Agouti signalling protein gene)
cAMP	Siklik Adenozoin Monofosfat (Cyclic adenosine monophosphate)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit (Deoxyribonucleic acid)
DOPA	Dihidroksifenilalanin
EDNAP	Avrupa DNA profili (The European DNA Profiling)
EVC	Gözle görülebilir karekteristikler (External visible characteristics)
FBI	Federal Soruşturma Bürosu (Federal Bureau of Investigation)
FDP	Adli DNA Fenotiplemesi (Forensic DNA Phenotyping)
F_{st}	Popülasyonlar arası genetik uzaklık (Fixation Index)
GWAS	Genom Boyu İlişkilendirme Çalışmaları (Genome-Wide Association Study)
HapMap	Haplotip Haritası (Haplotype Map)
HLA	İnsan Lökosit Antijeni (Human Leucocyte Antigen)
HERC2	E3 ubikuitin protein ligaz 2 içeren HECT ve RLD alan (HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2)
HGDP	İnsan Genomu Çeşitlilik Projesi (Human Genome Diversity Project)
HGP	İnsan Genom Projesi (Human Genome Project)
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High-performance liquid chromatography)
HUGO	İnsan Genom Organizasyon (Human Genome Organisation)
IGSR	Uluslararası Genom Örnek Kaynağı (International Genome Sample Resource)
ISMWG	Uluslararası SNP Harita Çalışma Grubu (The International SNP Map Working Group)
IRF4	İnterferon düzenleyici faktör 4 (Interferon regulatory factor 4)
IISNPs	Kimliklendirmede kullanılan SNP'ler (Identity Informative SNPs- IISNPs)
LISNPs	Yakın soybağını (nesep) belirleyen SNP'ler (Lineage Informative SNPs-LISNPs)

LOD	Tespit sınıdır (Limit of Detection)
LOQ	Tayin sınırı (Limit of Quantition)
MC1R	Melanokortin 1 reseptörü (Melanocortin 1 Receptor)
MPS	Kitlesel Paralel Dizileme (Massive Paralell Sequencing)
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
NPV	Negatif Tahmin Değeri (Negative Predictive Value)
PARs	Yalancı Otozomal Bölgeler (Pseudoautosomal Regions)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
PISNPs	Fenotipi belirleyen SNP'ler (Phenotypic Informative SNPs –PISNPs)
PPV	Pozitif Tahmin Değeri (Positive Predictive Value)
RFLP	Sınırlı Parçacık Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RFU	Rölatif Floresans Birimi (Rölatif Floresan Unit)
ROC	Alıcı İşletim Karakteristiği (Receiver Operating Characteristic)
SWGDAM	DNA Analiz Yöntemleri Bilimsel Çalışma Grubu (SWDGAM-Scientific Working Group on DNA Analysis Methods)
SLC24A4	Çözünür taşıyıcı nakit proteini, aile 24, üye 5 (Solute carrier transport protein, family 24 member 5)
SLC45A2	Çözünür taşıyıcı aile 45, üye 2 (Solute Carrier Family 45 Member 2)
STR	Kısa Tekrar Dizinleri (Short Tandem Repeat)
OCA2	Okülokutanöz albinizm II (Oculocutaneous albinism II)

1. ÖZET

Adli DNA Fenotipleme (Forensic DNA Phenotyping-FDP), suç mahallinde elde edilen DNA'dan soy, fenotip (yani saç, göz, ten rengi) ve yaşı tahmin ederek bilinmeyen bir bireyin görünümünü ortaya çıkarabilir. HIrisPlex sistemi, göz ve saç rengini aynı anda tahmin yapmak amacıyla geliştirilmiştir. FDP'nin vaka çalışmasına uygulanmasından önce, test edilen popülasyon için sistemin tahmin doğruluğunun değerlendirilmesi gerekir. Bu çalışmada HIrsipleks panelinin optimizasyon ve validasyon çalışmaları yapılarak Türkiye popülasyonundan 149 birey üzerinde tahmin performansı değerlendirilmiştir. Göz ve saç renklerinin tahminini test etmek için ise HIrisPlex çevrimiçi web aracı kullanıldı. Çalışmanın validasyonunda duyarlılık limiti 0.25 ng ve analiz eşiği 110 RFU (Rölatif Floresan Unit) olarak belirlendi. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik çalışmalarından aynı genotipler elde edildi. HIrisPlex sisteminin doğruluğu, ROC-AUC eğrisi (alıcı çalışma karakteristikleri-eğri altındaki alan) duyarlılık, özgüllük, pozitif tahmin değeri (PPV) ve negatif tahmin değeri (NPV) hesaplanarak değerlendirildi. Sonuçlar, önerilen yöntemin özellikle mavi (%100) ve kahverengi (%95.60) göz ve siyah (95.23) ve kahverengi (98.94) saç renkleri için göz ve saç rengini başarılı bir şekilde tahmin ettiğini göstermiştir. Türkiye popülasyonunda %25'i temsil eden yeşil göz (ara renk) rengini tahmin edemedi. Saç rengi için yanlış tahminlerin çoğu sarı saç için gözlemlendi. Çalışmamızın sonuçları HIrisPlex sisteminin Türkiye'deki adli vaka çalışmaları için uygulanabileceğini göstermektedir.

2. SUMMARY

Forensic DNA Phenotyping (FDP) can reveal the appearance of an unknown individual by predicting the ancestry, phenotype (i.e., hair, eye, skin color), and age from DNA obtained at the crime scene. HIrisPlex system has been developed to predict eye and hair color simultaneously. However, the prediction accuracy of the system needs to be assessed for the tested population before the implementation of FDP to casework. In this studyis to perform optimization and validation studies and than we evaluated the performance of the HIrisPlex system on 149 individuals from the Turkish population. We used HIrisPlex online tool for testing the prediction of the eye and hair colors. In the validation of the study, the sensitivity limit is determined as 0.25 ng and 110 RFU (Rölatif Floresan Unit). The same genotypes were obtained from the reproducibility and reproducibility studies. The accuracy of the HIrisPlex system was assessed through the calculation of the area under the receiver characteristic operating curves (AUC), sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV). The results showed that the proposed method successfully predicts the eye and hair color especially for blue (100%) and brown (95.60%) eye and black (95.23) and brown (98.94) hair colors. As observed in previous studies, the system failed to predict intermediate eye color which represented 25% in our cohort and the majority of incorrect predictions were observed for blond hair color. Our study shows that the HIrisPlex system can be applied for forensic casework in Turkey.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Adli bilimlerde olay yerinden elde edilen Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) profilinin şüpheli olan kişinin profiliyle eşleşmesi adli bilimlerde 'altın standart' olarak kabul edilir (1) . Klasik DNA profillerinin elde edildiği STR (Short Tandem Repeat- Kısa Tekar Dizileri) markırları (belirteçleri) adli DNA analizinde en çok kullanılan sistemlerdir. Ancak bu markırlarla elde edilen profiller bazı durumlarda yetersiz kalmaktadır. Bu profillerin sınırlamaları; şüphelilerinin bulunmadığı veya ulusal adli DNA veri tabanlarında aranan profille eşleşme sağlanamadığı durumlar olabilir. Bu durum soruşturmanın durdurulmasına ve vakaların çözülememesine neden olur. Ayrıca toplu felaket kurbanlarının ve kayıp kişilerin kimliklendirilmesinde yaşanan bazı sorunlarda klasik STR sistemlerini yetersiz bırakmaktadır. Tüm bu sorunlar karşısında alternatif yaklaşımlara gerek duyulmuştur (2).

2000'li yıllardan itibaren insan genomunun tamamının dizinlemesi (İnsan Genom Projesi-Human Genome Project-HGP) ve uluslararası HapMap projesi ile beraber insan genetik yapısının hakkında daha fazla bilgi veren sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemlerden biri de adli genetikte kullanımıyla adli bilimlerde büyük rol oynayacağı düşünülen Tek Nükleotid Polimorfizmi (Singel Nucleotide Polymorphism-SNP) markırlarıdır. SNP markırları tek bir nükleotidde oluşan DNA sekans varyasyonları olup bütün genomda oldukça sık görülür. Genom boyunca dağılmış olan bu markırlar genetik yapı hakkında pek çok bilgiyi içerir. SNP markırları adli uygulamalarda kimliklendirmede, nesep ve soy tayininde, fenotip belirlemede kullanılmaktadır (3-5).

Adli bilimlerde son yıllarda geliştirilen fenotip SNP (Phenotypic Informative SNPs -PISNPs) markırları ile adli DNA fenotiplemesi (FDP-Forensic DNA Phenotyping) yapılarak kişilerin göz, saç ve ten rengi gibi gözle görülebilir fiziksel özelliklerini (EVC- External visible characteristics) güvenilir bir şekilde tahmin etmek mümkün olmuştur. Böylelikle çeşitli faktörlerle

kolayca etkilenen insan hafızası ile verilen ifadelerin yerini, fenotipten sorumlu bu SNP markırları kullanılarak yapılan "Moleküler görgü tanıklığı" almış olur. Özellikle soruşturma aşamasında şüphelinin olmadığı durumlarda faile ait olduğu düşünülen herhangi bir biyolojik delilden (kan lekesi, semen, tükürük gibi) kişinin dış görünüşüne ait fikir verebilecek herhangi bir bilginin DNA yoluyla bulunması soruşturmanın aydınlatılması için oldukça önemlidir. Böylece şüpheli havuzu daralarak polis, jandarma ve savcılık birimlerince şüphelinin moleküler robotik görüntüsü elde edilerek aranan şüpheliye daha kolay ulaşılabilecektir (4,3).

Gözle görülebilir fiziksel özellikleri kullanabilmek için bu özelliklerden sorumlu olan genlerin genetik yapılarına ait araştırmaların tamamlanması ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi gerekmektedir. Günümüzde genetik yapısı en iyi bilinen pigmentasyon varyasyonları göz, saç ve ten rengidir. Bu nedenle araştırmalar bu üç fenotip ile başlamıştır (5).

Genetik yapısı en iyi bilinen fiziksel özellik olan göz rengi ile ilgili birçok adli amaçlı analiz ve tahmin yöntemi geliştirilmiştir. Özellikle Okülokutanöz albinizm II (Oculocutaneous Albinism II - OCA2) geninin promotor bölgesinde bulunan ve E3 ubikuitin protein ligaz 2 içeren HECT ve RLD alan (HECT and RLD domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 2- HERC2) geninde yer alan mavi ve kahverengi göz rengi varyasyonlarının büyük bir bölümünden sorumlu olan rs12913832 SNP markırı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (10,9,8,7,6). Göz rengi ile ilgili bilinen ve Avrupa'da pek çok laboratuvarda rutin olarak kullanılan Irisplex panelinde 6 SNP bölgesi ile mavi ve kahverengi göz rengi tahmini yapmak mümkündür (12,11,10).

Saç rengi ile ilgili de adli amaçlı araştırmalar yapılmış olup (13), bu çalışmalardan en önemlisi Irisplex panelini oluşturan araştırma grubunun oluşturduğu HIrisplex panelidir (14). Adli amaçlı geliştirilen HIrisplex panelinde yer alan 24 SNP bölgesi ile saç ve göz rengi tahmini yapılabilmektedir (15,14).

Bu çalışmanın hedefi, göz ve saç rengi ile ilgili bilgi veren SNP markırlarını içeren bir SNP multipleksi olan HIrisPlex panelinin Türkiye popülasyonunda kullanılabilirliğini belirlemektir.

Elde edilecek DNA verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi multinominal lojistik regresyon (MLR) analizi yapılarak saç ve göz rengi tahmin etmektir. Türkiye popülasyonu üzerinde yapılan ilk çalışma bakımından önemlidir. Bu çalışma sonunda olay yerinden gelen örneklerde (tükürük, kan lekesi, parmak iz vb.) kişinin fiziksel özellikleri (saç ve göz rengi) hakkında güvenilir bir bilgiye varılması amaçlanmaktadır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Adli Genetikte Kullanılan DNA Markırların Gelişimsel Süreci

İnsanlar arasında DNA molekülünün büyük çoğunluğu (%99.9) aynıdır. DNA'mızın sadece küçük bir kısmı insanlar arasında farklılık gösterir ve bizi benzersiz yapar (16). DNA'nın bu değişken bölgeleri, DNA bilgisinin insan kimliği amaçları için kullanılabilmesini sağlar. İnsan genomundaki belirli bölgelerde bu genetik polimorfizmlerini bulmak ve karakterize etmek için yöntemler geliştirilmiştir. Adli genetikçilerin amacı biyolojik örneğin kökenini olabildiğince kesin olarak belirlemektir. DNA üzerinde yüksek polimorfizm özelliği gösteren, bilgi verici belirteçlerin analizi günümüzde kolayca yapılabilmektedir (17).

Adli genetik, Karl Landsteiner'in insan ABO kan gruplarının keşfetmesi ile başlamıştır. Bu keşifle çalışmalar insan genetiğine ait varyasyonları araştırmaya yönelmiştir (18). 1980'lerin ortalarına kadar serolojik ve protein temelli elektroforetik yöntemler kullanılarak, kan grupları ve polimorfik proteinler üzerindeki çalışmalar devam etmiştir. Bu belirteçlerin en büyük dezavantajı hızlı bozulma eğiliminde olmaları veya bakteriyel enzimler tarafından risk altında olmalarıdır (17). Adli Bilimlerde DNA devrimi, Alec Jeffreys tarafından DNA parmak izi ya da şu an ki adıyla DNA profilini keşfetmesiyle başlamıştır. Jeffreys DNA'da bazı bölgelerin birden fazla tekrar eden diziler içerdiğini keşfetmiştir. Ayrıca DNA'da bulunan bu dizilerin tekrar sayıları bakımından kişiden kişiye değişebileceğini bulmuştur (19). Bu tekrar bölgeleri minisatelitler diğer bir adıyla Değişken Sayılarda Ardışık Tekrar Dizinleri (Variable Numbers of Tandem Repeats-VNTR) olarak bilinir. VNTR'ler, Sınırlı Parçacık Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism- RFLP) ile çalışılmıştır. Yöntem yüksek kalitede ve sayıda (>50 ng) DNA molekülüyle çalışıldığından birçok adli vaka için ciddi sınırlamalara sahiptir (20,17). 1985'te Kary Mullis'in PCR (Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemini bulmasıyla DNA analizleri PCR tabanlı olarak çalışılmaya başlanmıştır. İlk PCR tabanlı DNA çalışmaları İnsan Lökosit Antijeninden (HLA) sorumlu DQA1 geni üzerinde yapılmıştır (17).

Jel tabanlı analizlerde bir DNA profilini elde etmek ve yorumlamak için oldukça fazla iş gücü, zaman ve uzmanlık gerekir. Bu analiz yöntemlerinin yerini otomatik ve yüksek verimde çalışan, lazerle floresan tespitinin yapıldığı kapiler elektroforeze bırakmıştır. 1990'ların ortalarına gelindiğinde STR markırlarından oluşan kitler oluşturularak bu genetik analizörlerle çalışılmaya başlanmıştır (22,21).

STR markırları 2-6 bç uzunluğunda tekrar eden mikrosatelitlerdir. İnsan genomunun %3'ünü oluştururlar. STR'ler genomun her yerine dağılmış ve 500-1,000 bp/Mb bir tekrar ederler (23).

Geliştirilen ilk STR multiplekslerden biri, TH01, FES / FPS, VWA ve F13A1 lokuslarından oluşan dörtlü multiplekstir. İngiltere Adli Bilimler Servisi tarafından oluşturulan bu kit 'birinci nesil multipleks' olarak da adlandırılır. 1995'te İngiltere'de kurulan ulusal DNA veritabanı bu dört STR lokusu ile oluşturmuştur. İkinci nesil multipleks ise altı STR lokusundan (TH01, VWA, FGA, D8S1179, D18S51 ve D21S11) oluşan SGM (Second Generation Multiplex) ile devam etmiştir. 2000 yılında dört lokus daha eklenerek SGM Plus olmuştur (24). 1997'de Amerika Birleşik Devletleri'nde Federal Soruşturma Bürosu (Federal Bureau of Investigation-FBI) öncülüğünde oluşturulan 13 STR lokusu (D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, CSF1PO, THO1, TPOX, D16S539) Ulusal DNA veritabanı olan Birleşik DNA İndeks Sistemi'nde (Combined DNA Index System - CODIS) yerini almıştır (25). Tablo I'de Adli DNA analizlerin gelişimsel süreci gösterilmektedir.

Bazı örneklerin analizinde STR markırları yetersiz kalmaktadır. Bu durumlarda alternatif markırlar kullanılmaktadır. Eski ve degrede olmuş örneklerde STR markırlarını analiz edecek kadar nükleer DNA elde edilemeyebilmektedir. Bu nedenle bir hücrede 1000'den fazla kopyası bulunan mtDNA (mitokondrial DNA) kullanılır (26). Maternal kalıtım gösteren mtDNA sirküler yapıda olup 16569 bp (base pair- baz çiftti) içerir. Oksidatif fosforilasyondan sorumlu proteinleri kodlayan 37 gene sahiptir. Adli çalışmalarda mtDNA'nın D-loop (1122 bç) kontrol bölgesinde

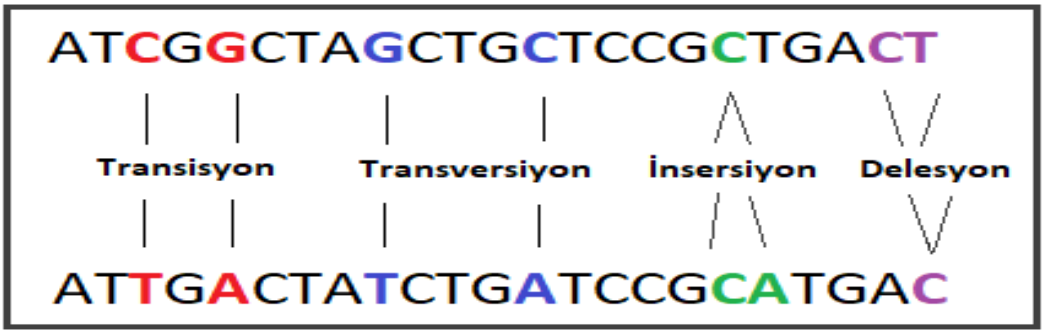
bulunan HVI (hypervariable region I) (342 bp) ve HVII (hypervariable region II) (268 bp) bölgeleri çalışılmıştır. Bu bölgeler kodlama yapmayan ve yüksek değişkenlik gösteren bölgelerdir (28,27).

Tablo I. Adli DNA analiz aşamaları ve faaliyetleri (21)

Aşama	**Zaman aralığı**	**Faliyetlerin tanımı**
Keşif	1985-1995	Başlangıçlar ve ilk yayınlar; RFLP yöntemi ile VNTR'lerin tek ve çoklu lokuslarının çalışılması, ilk PCR çalışmaları DQA ve tek lokus STR markırlarıyla başlanması, DNA analizlerinin EDNAP ve SWGDAM standardında çalışılma ihtiyacının doğması.
Stabilizasyon ve Standardizasyon	1995-2005	İngiltere (1995), ABD (1998) ve birçok Avrupa ülkesi için başlatılan ulusal veri tabanları, multipleks STR kitleri ve elektroforez yöntemi için standardizasyon çalışmalarının yapılması; ilk ticari kitler otozomal STR ve Y-STR kitleri, Birleşik Devletler ve Avrupa için bilgi verici lokusların seçimi, ABD'de FBI'ın kalite güvence standartlarının uygulanması, ENFSI'nin Avrupa'da standardizasyon ve kalite güvence çalışmalarında rol alması.
Geliştirme	2005-2015	DNA veritabanlarının hızla büyümesi, Avrupa ve ABD'de yeni lokusların bulunmasıyla STR kitlerinin geliştirilmesi, Y-STR kullanımının artması, uygulamaların genişletilmesi (hızlı DNA analiz cihazları, ailesel araştırmalar, STR'lerin NGS (next generation sequencing- yeni nesil dizileme) ile çalışmalarının yapılması.)
İleri teknoloji	2015-2025 ve ötesi	Laboratuvarlar dışında hızlı DNA testi yapabilme özelliği olan araçların kullanımı, alel sekanslama çalışmalarından daha yoğun bilgi elde edilmesi, vaka çalışmalarına uygulanan daha yüksek duyarlılıktaki metodolojiler, DNA karışım örnekleri için geliştirilen olasılıklı yazılım uygulamalarının kullanımı, insan genomu hakkında bilgiler arttıkça kişi mahremiyeti üzerindeki endişelerin oluşması.

Adli DNA analizlerinde ayırım gücünü artırmak ve her bir DNA profilini benzersiz kılmak için başka markırların analizine ihtiyaç duymuştur. Bunlardan biri de tek nükleotid polimorfizmleridir. SNP'ler insan genomunda en çok görülen sekans varyasyonlarından biridir. İnsan genomun-

daki varyasyonlarının %90'ını SNP'ler oluşturur. Bir lokusa SNP diyebilmek için toplumda görülme sıklığı %1'den fazla olmalıdır (29). Bu polimorfizmler, insan genomunun tek bir noktasında meydana gelen baz değişimleridir. SNP'ler, DNA replikasyonu sırasında polimeraz enzimlerinin yanlış nükleotidi ilave etmesi, insersiyon veya delesyonlar sonucu oluşabilmektedir. SNP'lerin üçte ikisi pürin (A,G) ve primidin (C,T) bazlarının kendi aralarında yer değiştirmesi sonucu oluşan transisyon tipi mutasyonlar sonucu oluşurken, diğerleri transversiyon, insersiyon veya delesyon tipi mutasyonlar sonucu oluşmaktadır (Şekil 1). Değişimlerin %25'ni Guanin-Adenin ve Sitozin -Timin transisyonları oluşturmaktadır (31,30). SNP'ler, ortalama 1000 nükleotidde bir tekrar ederler ve mutasyon (10^{-8}) oranı STR'lere göre 100 bin kat (10^{-5} - 10^{-3}) daha düşüktür (33,32). Bu markırlar birçok avantaja sahip olduklarından adli DNA analizlerinde tercih edilmektedir. Bu avantajlardan ilki ve en önemlisi PCR'deki amplikon uzunluğunun 100 bç den daha küçük olmasıdır. STR'lerin amplikon uzunluğu 300-400 bç olması nedeniyle degrede örneklerde daha çok SNP markırları tercih edilir. SNP'ler, otomasyona uygun markırlar olup STR'lerden daha yüksek bir sayıda lokustan oluşan multipleks setler oluşturabilme özelliğine sahiptir. Analiz aşamasında sonuçları yorumlarken stutter piklerinin olmaması avantajları arasındadır. Son olarak; seçilen uygun SNP markırlarıyla kişilerin etnik köken ve gözle görülebilir fiziksel özelliklerini (saç, göz, ten rengi) tahmin etmek mümkün olabilir (34,32).



Şekil 1. Farklı mutasyon tipleri ile oluşan tek nükleotid polimorfizmin yapısı (31).

Yaklaşık 3.2 milyar nükleotid içeren insan genomunda Uluslararası SNP Harita Çalışma Grubu (The International SNP Map Working Group -ISMWG) 2001 yılında 1,42 milyon SNP tanımlamıştır (35). Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information

-NCBI) Ocak 2017 verilerine göre 113 milyondan fazla SNP lokusunu onaylamıştır Bu veritabanı halka açık ve ücretsiz eri-şimin olduğu bir veritabanıdır.

4.2 Adli Bilimlerde SNP Markırlarının Kullanımı

Tek nükleotid polimorfizmleri akrabalık analizlerinin gücünü arttırmak, kayıp kişilerin akrabalık ilişkilerini belirlemek veya şüphelinin olmadığı durumlarda (genetik profilin eşleme sağlanamadığı) biyolojik delillerin kimliklendirmesi gibi zorlu adli olguların çözülmesinde önemli bir rol oynarlar (36). Aynı zamanda biyolojik delillerden kişiyi tanımlayacak olan boy uzunluğu, ten rengi, yüz şekli, yaş, saç ve göz rengi (EVC- External visible characteristics) gibi önemli fiziksel özelliklerin belirlenmesinde kullanılabilir. Bu bilgilerin kullanımıyla kişilerin (mağdur/şüpheli) dış görünüşü hakkında bilgi sahibi olup adli soruşturmaya yön verilebilir (5,4).

Adli analizlerde kullanım alanlarına göre SNP'ler dört kategoriye ayrılır.

- Kimliklendirmede kullanılan SNP'ler (Identity Informative SNPs- IISNPs),
- Yakın soybağını (nesep) belirleyen SNP'ler (Lineage Informative SNPs-LISNPs),
- Atasal soyu (biyocoğrafik soy) birleyen SNP'ler (Ancestry Informative SNPs -AISNPs)
- Fenotipi belirleyen SNP'ler (Phenotypic informative SNPs-PISNPs).

4.2.1 Kimliklendirmede kullanılan SNP'ler (Identity Informative SNPs-IISNPs)

SNP markırları, bireyler arası farklılaşmayı ve dışlamayı sağlayan genetik bilgiyi sahiptir. Bu amaçla kullanılan IISNP markırları, STR markırların kullanıldığı benzer analizlerde kullanılır. Kimliklendirmede kullanılacak SNP markırlarının seçiminde bazı kriterler kullanılır;

- Amplikon uzunluğu en fazla 120 bp üreten primerler tasarlamak,
- Bir lokusun bir popülasyonda minimum % 30 heterozigotluk (0.28 minör alel frekansı) veya minimum % 20 heterozigotluk (0.17 minör alel frekansı) göstermesi,
- Aday SNP'lerin kromozomların p ve q kollarında bulunması ve aralarında minimum 100 kb olması,

- Popülasyonlar arası genetik farklılaşma indeksi olan Fst değerinin düşük olduğu markırlardan seçilir.

Amaç daha az sayıda SNP ile yüksek düzeyde ayrımcılık gücüne ulaşmaktır. Birçok çalışma grupları tarafından kimliklendirme amaçlı çeşitli paneller geliştirilmiştir (Tablo II). Bunlardan en önemlileri Avrupa Büyüme Programı tarafından desteklenen SNPforID (konsorsiyumun geliştirdiği panellerdir (39-45)

SNPforID'nin amacı, geniş popülasyon gruplarında yüksek heterezigotluk gösteren en az 50 otozomal SNP'nin belirlenmesi, bu SNP'lerin tek bir iş akşında eş zamanlı çoğaltılması, otomatik ve yüksek verimlilikte elde edilen profillerin doğru tespiti ve analizinin yapılmasıdır. Bu hedeflerle Shanchez ve ark. tarafından Avrupa, Asya ve Afrika popülasyonları taranarak oluşturulan 52 otozomal SNP panelini geliştirmiştir. Panel Avrupa'daki birçok laboratuvarda kimliklendirme amaçlı yapılan testlerde kullanılmıştır (42).

Yale Üniversitesi tarafından kimlik tespitinde kullanılan daha etkili bir panel geliştirilmiştir. Avrupalı Amerikalı, Afrikalı Amerikalı ve Çin/Japon'dan oluşan üç ana popülasyonda 90.000 aday SNP'den yüksek heterezigotluk gösteren, düşük Fst'ye sahip 19 SNP markırını belirlemişlerdir (36). Daha sonra aynı çalışma grubu tarafından bu SNP markırlarına ek SNP'ler ekleyerek 45 SNP'lik multiplkes set oluşturmuşlardır. Panel, son olarak SNPforID konsorsiyum tarafından geliştirilen 52 SNP seti ile birleştirilerek (52 SNP+44 SNP) evrensel bir kimliklendirme paneli olan 86 SNP markırı ile son halini almıştır (42,39). ALFRED (The ALlele FREquency Database- ve SNPforID SNP alel frekanslarını görüntülenmesini ve sorgulanmasını sağlayan web tarayıcılarıdır. Tablo II'de Kimliklendirmede kullanılan SNP panellerinin listesi gösterilmiştir.

Tablo II. Kullanılan IISNP setleri

Panel	Markır Sayısı	Yöntem	Kaynak
Foren-SNP multiplex kit	21	Amplification Refractory Mutation System (ARMS)	Dixion ve ark. 2005(39)
KiddLab - 45 Unlinked IISNPs	45	TaqMan	Pakstis ve ark. 2010(39) Kidd ve ark. 2012(40),
KiddLab - Interim Panel of 40 IISNPs	40	TaqMan	Pakstis ve ark. 2007(38)
KiddLab - List of 86 IISNPs	86	TaqMan	Pakstis ve ark. 2010(39)
Plex 25 IISNPs	25	TaqMan	Pietrangeli ve ark. 2010(41)
SNPforID 52-plex	52	Singel Base Extansion(SNaPshot®)	Sánchez ve ark. 2006(42)
Plex 70 IISNPs	70	Singel Base Extansion(SNaPshot®)	Vallone ve ark. 2005(43)

4.2.2 Yakın soybağını belirleyen SNP'ler (Lineage Informative SNPs-LISNPs)

Soy bağını belirleyen lineage markırları rekombinasyona uğramamaları, düşük mutasyon oranlarına sahip olmaları nedeniyle evrim çalışmalarında ve akrabalık ilişkilerinin (toplu felaket kurbanlarının ve kayıp kişilerin kimliklendirmesi) belirlenmesinde kullanılır. Özellikle nesep tayinlerinde baba veya anne olduğu düşünülen kişilerin bulunmadığı olguların çözümünde, uzak akrabalık ilişkilerin belirlenmesinde, savaşların ve dünya çapındaki göçler nedeniyle ayrı düşen ailelerin birleşmesi gibi durumlarda oldukça bilgi vericidir (45,44). Yakın soybağını belirleyen SNP lokusları birbirlerine yakın ve genetik olarak birbirine bağlı haplotiplerden oluşur (49,48,47,46).

4.2.2.1 *Mitokondriyal DNA (mtDNA):*

Mitokondriyal DNA histon içermeyen, çift zincirli dairesel bir moleküldür. Bir hücredeki mtDNA molekülünün sayısı yüzler ve hatta binlerce olabilmektedir. Yaklaşık 16,569 baz çifti içerir. MtDNA, çoğunluğu oksidatif fosforilasyon sürecinden sorumlu veya hücresel enerji üretiminde yer alan 37 gen içerir (50).

Mitokondriyal DNA, kişinin anne soyundan haplotip olarak kalıtılır ve bu haplotipler yaklaşık 200.000 yıl önce Afrika'da yaşamış ortak bir ataya kadar izlenebilir (52,51). mtDNA'da bulunan

polimorfizmler soylar boyunca oluşan mutasyonların sıralı birikimi sonucu gelişmiştir ve anne soyundan (maternal) miras alınır (53). Maternal kalıtım göstermiş olmasından dolayı uzaktan akraba olan anne soyundaki kişilerin aynı mtDNA sahip olması gerekir. MtDNA'nın doğası ve yapısından dolayı kemikler, dişler ve saçlar gibi nükleer DNA'nın sınırlı olduğu veya degrede olmuş örneklerde oldukça fazla sayıda bulunur. Özellikle toplu felaket kurbanlarının kimlik tespitinde önemlidir (54,53). Bu amaçla adli analizlerde kullanılmak üzere mitokondriyal SNP'lerden (mtSNP) oluşan bazı setler geliştirilmiştir (60,59,58,57,56,55).

4.2.2.2 *Y Kromozomu:*

Y kromozomu, yaklaşık 60 milyon nükleotid uzunluğunda olup ikinci en küçük insan kromozomudur. Y kromozomunun uçlarında potansiyel olarak genetik işleve sahip yalancı otozomal bölgeler (pseudoautosomal regions, PARs) mevcuttur. Bu bölgeler X kromozomuyla homoloji göstermekte ve sinaps kurup rekombinasyona uğramaktadır. Y kromozomun geri kalan %95'lik kısmı rekombinasyona girmeyen bölge (non-recombining region of the Y, NRY) olarak bilinir. Bir mutasyon oluşmadıkça NRY babadan oğula aynı şekilde değişmeden aktarılır. NRY'de meydana gelen genetik polimorfizmler (Y-STR ve Y-SNP) soylar içinde birikerek erkek genetik soy ağacında bulunur. Y kromozomal çeşitlilik böylelikle insan popülasyonları arasında rastgele olmayan bir şekilde erkeğe özgü haplotipler barındırarak varlığını sürdürür (63,62,61).

Y-STR 'lerin mutasyona uğrama hızı ($1x10^{-3}$) Y-SNP'lerden ($1x10^{-9}$) fazladır (64). Y-STR sonuçları daha fazla değişkenlik gösterir ve bu nedenle adli uygulamalarda daha fazla kullanıma sahiptir. Y-SNP'ler, DNA soy bağını çalışmalarında daha faydalı olabilir (62).

4.2.2.3 *X Kromozomu:*

X kromozomu 156 milyondan fazla baz çifti ve 1,093 adet gen içeren, 155 Mb uzunluğunda bir cinsiyet kromozomudur. Dişi bireylerin toplam DNA'sının %5'ini erkek bireylerin %2.5'ini

oluşturur. Üzerinde 153,146 aday SNP tanımlanmıştır (65). X kromozomuna bağlı lineage markırları en az bir dişi bireyin bulunduğu uzak akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi, kimliklendirme, populasyon genetiği gibi birçok amaç için kullanılabilir.

Tomas ve ark. tarafından 11 Akdeniz popülasyonunda çalışılan ve kıtalar arasında yüksek polimorfik özellik gösteren X kromozomuna bağlı 25 SNP'nin oluşan bir set geliştirmişlerdir. Ülkemizde de bu sette bulunan 15 SNP çalışılmış ve adli bilimlerde özel olgularda tamamlayıcı/ek bilgi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (68,67,66). Steponov ve ark. Sibirya, kuzey asya ve orta asya yerli popülasyonu üzerinde 62 X-SNP lokusunun ayrım gücünü araştırmış ve kimliklendirme ve nesep tayini için bilgi verici olduğunu bildirmişlerdir (69).

4.2.3 Atasal soy (biyocoğrafik soy) ile ilgili bilgi veren SNP'ler (Ancestry Informative Markers AISNPs)

Biyocoğrafik soy hiçbir zaman etnik köken veya 'ırk' gibi kavramlara karşılık gelmez. Bir kişinin biyocoğrafik soyu biyolojik atalarından miras aldığı genetik özelliklerine dolayısıyla köken aldığı coğrafi bölgeye dayanır (70). Popülasyonlar arası görülen genetik çeşitlikten yararlanarak biyocoğrafik soya ait bilgiler elde edilebilir. Genetik çeşitlilik mutasyonlar, göçler, yerel seleksiyon, genetik izolasyon ve diğer birçok etkilerle oluşur (71). Farklı coğrafik bölgelerde bulunan popülasyonlar arasındaki farklı frekansları gösteren markırlara soya ait bilgi verici markırlar (AIMs- Ancestry Informative Markers) denir (73,72).

AIM markırları bir nesilden diğerine üç farklı şekilde aktarılır. Otozomal kromozomlarda bulunan markırlar her iki ebeveynden alınır ve coğrafik köken her ikisini de yansıtır. Buna karşılık mtDNA ve Y kromozomu ile aktarılan DNA belirteçleri; sadece anne (maternal) veya sadece erkek soyu (parental) ile nesilden nesile değiştirilmeden aktarılır. Bireylerin ataları ile ilgili tek taraflı bir bilgi (mtDNA ve Y kromozomu) yerine her iki atadan gelen karışık coğrafi kalıtıma ait tüm bilgiyi veren otozomal AIM markırları tercih edilir (70).

Dünya üzerindeki popülasyonlarla yapılan genetik çalışmaların sonucunda belirlenen en iyi AIM markırları yüksek Fst değerine sahip, bialellik olan SNP'lerdir (74,72). Bu markırlar adli DNA analizlerinde kullanılmak üzere sayısız kere geliştirilmiş ve valide edilerek bir çok mültipleks setler oluşturulmuştur Tablo III'de farklı teknolojiler kullanılarak geliştirilen AIM setleri gösterilmiştir.

AIM markırları sayesinde olay yerinden gelen ve şüphelisi olmayan örneklerin kıtasal ve bölgesel seviyelerde (Avrupa, Alt Sahra, Afrika, Doğu Asya, Okyanusya ve Amerika) biyocoğrafik soyunu belirlemek mümkündür (74,71,70). Bu amaçla Amerika'da ilk defa 2002 yılında Louisiana seri katilinin kimliğini belirlemek için DNAPrint Genomics şirketi tarafından üretilen DNAWitness ™ AIM multipleks seti kullanılmıştır. Görgü tanıkları, failin Kafkas kökenli olduğunu söyleseler de biyocoğrafik soy test sonucu %85 Alt Sahra Afrika kökenli olduğunu belirlemiştir (75). Avrupa'da ise bu amaçla geliştirilen ilk AIM seti Avrupa, Afrika ve Doğu Asya popülasyonlarına birbirinden ayıran SNPforID 34 plex'tir (76). Bu panel ilk defa 2004 yılında meydana gelen 11-M Madrid tren bombalamaları olarak bilinen, Avrupa'nın en büyük ikinci terör saldırısında kullanılmıştır. Şüphelilerden birinin Kuzey Afrikalı olduğu belirlenmiş ve yapılan çalışmaların sonucunda failin Cezayirli olduğu tespit edilmiştir (77). Bu 34 pleks'le birlikte kullanılmak üzere tasarlanmış Avrupa ve Güney Asya popülasyonlarını birbirinden ayırmak için Eurasiaplex (78), Okyanusya popülasyonlarını ayırmak için ise Pacifiplex (79), Avrupa ve Doğu Asya popülasyonlarını ayırt etmek için EurEAs-Gplex (80) ve Afrika, Avrupa, Doğu Asya, Okyanusya ve Amerikan popülasyonlarını ayırt etmek için Global AIMs Nano AIM setleri SNaPshot yöntemine dayalı geliştirilmiştir (81).

TaqMan yöntemi ile başlayan ancak kitlesel paralel dizileme (Massive Paralell Sequencing-MPS) popülaritesinin artmasıyla küresel ticari MPS soy panelleri geliştirilmiştir. Bunların ilki Yale Üniversitesinin Kidd Laboratuvarında geliştirilen Kidd 55 AISNPs panelidir. ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit (Verogen) olarak piyasada bulunmaktadır (82). Kaliforniya Davis Üni-

versitesi Seldin Laboratuvarında, Amerika popülasyonlarını birbirinden ayıran 128 AISNPs paneli geliştirilmiştir. MPS cihazlarına uygun kit haline getirilip Applied Biosystems Precision ID Ancestry Paneli (Thermo Fisher Scientific) olarak ticarileştirilmiştir (84,83). AIM markırları HGDP-CEPH (Human Genome Diversity Project- Centre d'Etude du Polymorphisme Humain- , Uluslararası Genom Örnek Kaynağı (International Ge-nome Sample Resource – IGSR) önceki adıyla 1000 Genom- https://www.internationalge-nome.org/) ve İnsan Genom Organizasyon (Human Genome Organisation - HUGO) Pan-Asian SNP HUGO-PAPGI) gibi açık erişimli veri tabanlarında bir araya getirilmiş ve kaydedilmiştir.

DNA tabanlı biyocoğrafik soy tahmini FDP içinde de gruplandırılır ancak her zaman coğrafi konum kişinin görünüşünü yansıtmayabilir. Buna rağmen; farklı görünüme sahip insanları barın-dıran Avrupa gibi genetik soyun coğrafik bölgeye bağlı olarak insanlar üzerinde en az bir özelli-ğin yansıdığı görülür. Orta Doğu gibi birçok bölgede ise coğrafi bölgenin dış görünüşe etkileri az olduğu görülür. Alt -Sahra Afrika ve Okyanusyanın bazı bölgelerinde insanlar arasında gözle görünür fiziksel özellikleri gittikçe birbirine benzediği görülür (70)

Tablo III. Adli genetik alanında geliştirilen başlıca AISNPs panelleri (85)

Panel	**Markır Sayısı**	**Yöntem**	**Kaynak**
46 Plex-Indels	46	Fluorescent Dye Terminator Sequencing (BigDye™)	Santos ve ark. 2015, Pereria ve ark.2012
33 plex	33	Singel Base Extansion (SNaPshot®)	Bülbül ve ark. 2011
55 AISNPs	55	TaqMan	Kidd ve ark. 2014, Pakstis ve ark. 2015
128 AISNPs	128	TaqMan	Kosoy ve ark. 2009
SNPforID 34 plex	34	Singel Base Extansion (SNaPshot®)	Phillips ve ark. 2007
50 SNPs	50	Singel Base Extansion (SNaPshot®)	Gettings ve ark. 2014
EUROFORGEN Global AIM SNPs	128	Sequenom iPLEX® (MPS)	Phillips ve ark. 2014, Eduardoff ve ark.2016
Eurasiaplex	23	Singel Base Extansion (SNaPshot®)	Bülbül ve ark. 2011, Phillips ve ark. 2013
55 AISNPs	55	TaqMan	Kidd ve ark. 2014, Pakstis ve ark. 2015
EurEas_Gplex	14	Singel Base Extansion (SNaPshot®)	Daca-Roszak ve ark. 2016 (34)
27 ASINSPs	27	Singel Base Extansion (SNaPshot®)	Wei ve ark. 2015
Global AIMs Nano	31	Singel Base Extansion (SNaPshot®)	de la Puente ve ark. 2016
Pacifiplex	29	Singel Base Extansion (SNaPshot®)	Santos ve ark. 2016
86 AISNPs plex	86	Taqman, MPS	Bülbül ve ark. 2018
74 AIMS	74	Taqman	Li ve ark. 2016
Precision ID Ancestry Panel	165	MPS	(Thermo Fisher Scien-tific)
ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit	56	MPS	Verogen

4.2.4 Fenotipi belirleyen SNP'ler (Phenotypic Informative SNPs -PISNPs)

Genomun kodlama yapan (ekzonlar) veya kontrol bölgesinde (regülatör) bulunan çeşitli varyasyonlar (InDel ve SNP gibi) amino asit sübstitisyonlarına yol açabilir (29). Bu da kodlanan proteinin fonksiyonel özelliklerini değiştirir ve sonuç olarak bireylerin gözle görülür fiziksel özelliklerinde farklı fenotiplerin oluşmasına neden olur. Dolayısıyla hem çevresel hemde genetik özellikler sayesinde bireyler birbirinden fenotipik olarak benzersizdir. Fenotipi etkileyen lokusların keşfiyle (göz, saç ve ten rengi, kellik, boy uzunluğu, yüzün yapısı, yaş tahmini vb.) adli soruşturmalarda önemli bir gelişme sağlanmıştır. Özellikle karşılaştırma örneğinin bulunmadığı olgularda adli genetik analizlerine yeni bir boyut kazandırmıştır (87,86).

Bugüne kadar fenotipi belirleyen SNP'lerle yapılan çalışmaların çoğu göz, saç, ten rengi varyasyonlarıdır. En doğru tahmin oranı bu özellikler üzerinden elde edilmiştir (86). Adli çalışmalarda kullanılmak üzere fenotipi belirlemek amacı ile geliştirilen setler Tablo IV'te gösterilmiştir. Bununla birlikte biyolojik yaş, yüz morfolojisi, çil, boy, saç şekli, erkeklerde kellik ve saç dökülmesi ve genetik hastalık gibi birçok özelliğin tahmini bellir bir doğrulukta elde edilebilir (88). Yaygın olarak test edilen EVC'ler için doğru tahmin oranları; cinsiyet 100%, popülasyonlara göre ten rengi Kafkas %90, Asya %88, Afrika %71, Göz rengi (kahverengi-mavi) %76-99, saç rengi (sarı, kahverengi ve kızıl) %90, boy uzunluğu %65, yaş tahmini (2-19 yaş) %86.7- (60-75 yaş) %50'dir (3).

Pigment varyasyonu ile ilişkili gösterilen ilk insan geni Melanokortin 1 reseptörü (Melanocortin 1 Receptor-MC1R) genidir. Bu genin üzerinde sayısız SNP'nin kızıl saç ve açık ten renginden sorumlu olduğu belirlenmiştir (89). MC1R geninde bulunan 12 SNP markırı ile yaptıkları çalışmada kırmızı saç renginin ayırt edilip edilemeyeceğini test etmişlerdir. Bu panelle kızıl saçlı bireyleri %84 başarı oranında tahmin edilebileceği gösterilmiştir. Ancak Avrupa popülasyonu ve diğer popülasyonlardaki kırmızı saç rengi sıklığı oldukça düşüktür. Bu yüzden saç rengi ile ilgili bilgi vereceği düşünülen diğer gen bölgeleri de (SLC24A4, SLC45A2 gibi) çalışılmaya başlanmıştır (92,91,90,13)

Genetik yapısı en iyi bilinen fiziksel özellik olan göz rengi ile ilgili birçok adli amaçlı analiz ve tahmin yöntemi geliştirilmiştir. Özelikle OCA2 genin promotor bölgesinde bulunan HERC2 geninde yer alan rs 12913832 SNP markı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu markırın açık göz renginden sorumlu olduğu bulunmuştur (6-10).

Göz rengi ile yapılan en önemli çalışmalardan birini Liu ve ark nın sekiz gen bölgesinde bulunan 37 SNP markırının Hollanda popülasyonunda (6168 kişide) incelenmesidir. Bu çalışma multinominal regresyon analizi istatistiğine dayanan bir tahmin yöntemi geliştirilmiştir. 24 SNP markırı ile kahverengi göz renginde %93, mavi göz renginde %91 ve yeşil göz renginde %73 tahmin başarısı elde edilmiştir (9). Walsh ve ark tarafından mavi ve kahverengi göz tahmini yapabilen Irısplex paneli geliştirilmiştir. Panel, Liu ve ark'nın göz rengi ile ilgili bilgi veren en güçlü altı SNP markırı seçilerek bir multipleks oluşturulmuştur. Tahmin modeli olarak önceki çalışmada gerçekleştirilen MLR model istatistiği yöntemini kullanmışlardır. Bu yöntemle altı SNP markırı ile mavi ve kahverengi göz rengi tahmini %91.6 ve %87,5 başarıyla tahmin edilebilmektedir. Ancak yeşil gözle ilgili güvenilir sonuç vermemektedir (10,9). Türkiye popülasyonu ile ilgili göz rengi tahmini ile ilgili bu 6 SNP bölgesi Bülbül tarafından çalışmıştır. Çalışma sonuçlarına göre mavi ve kahverengi göz rengi tahmin başarısı %90'nın üzerinde bulunmuştur (93).

Tablo IV. Göz, saç ve ten rengini belirleyen adli DNA test sistemleri (70)

Panel	Özellik	Lokus Sayısı	Yöntem/ Validasyonu	İstatistiksel Model	Testin Doğruluğu
			Ticari Olmayan Paneller		
IrisPleks	Göz rengi	6 SNP	1x PCR+SBE+KE / Var	MLR n=1878 https://hirisplex.era-musmc.nl	Mavi göz; 0,94 Kahverengi göz;0,95 Yeşil; 0,74
SHEP	Göz rengi	23 SNP	2x PCR+SBE+KE / Yok	Snipper,n=416 http://mathgene.usc.es/snip-per/	Mavi göz; 0,99 Kahverengi göz;0,99 Yeşil; 0,82
HIrisPlex	Göz, Saç rengi	24 SNP	1x PCR+SBE+KE / Var	MLR n=1878 https://hirisplex.era-musmc.nl	Kızıl saç; 0,92 Siyah saç; 0,83 Kahverengi saç;0,80 Sarı saç; 0,72
SHEP	Saç Rengi	12 SNP	2x PCR+SBE+KE / Yok	Snipper,n=605 http://mathgene.usc.es/snip-per/	Kızıl saç; 0,94 Siyah saç; 0,84 Kahverengi saç;0,64 Sarı saç; 0,86
SHEP	Ten rengi	29 SNP	3x PCR+SBE+KE / Yok	Snipper,n=118 http://mathgene.usc.es/snip-per/	Beyaz; 0,99 Siyah; 0,97 Orta; 0,80
HIrisPlex-S	Göz, Saç, Ten rengi	41 SNP	2X PCR+SBE+KE ya da MPS/Var	MLR n=1423 https://hirisplex.era-musmc.nl	Çok Açık;0,74 Açık; 0,72 Orta; 0,73 Koyu; 0,88 Siyah; 0,96
			Ticari Paneller		
Foren-Seq™ DNA Signature Prep Kit (Verogen, USA)	Göz, Saç rengi	24 SNP	MPS/Evet	Bilinmiyor, Muhtemelen IrisPleks ve HIrisPlex'in ilk versiyonları; ForenSeqTM Universal Analysis Software (Verogen) aracılığıyla ticarileştirilmiştir.	Mavi göz; 0,91 Kahverengi göz;0,93 Yeşil göz; 0,73 Kızıl saç; 0,9 Siyah saç; 0,78 Kahverengi saç;0,72 Sarı saç; 0,75
IDentiy (Idential USA)	Göz, Saç Rengi	Bilgisi Saklı	1XSNP microarray	Bilgisi Saklı	Bilgisi Saklı
Parabon™ SNaphot™	Göz, Saç, Ten rengi	Bilgisi Saklı	1XSNP microarray	Bilgisi Saklı	Bilgisi Saklı

4.3 İnsan Pigmentasyonu Biyolojisi ve Genetiği

Pigmentasyon insanlarda görülen en değişken fenotiplerden biridir. İnsan pigmentasyonu hayvan modelleriyle yapılan çalışmalar ve insanda görülen pigmentasyon bozukluklarının incelenmesiyle, farklı türdeki gen-gen etkileşimleriyle şekillenen poligenetik bir özellik olduğu anlaşılmıştır (95,94)

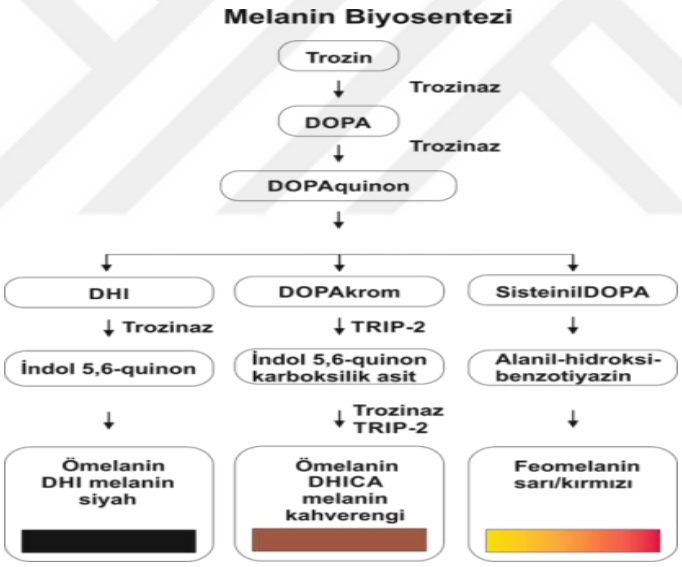
Göz, saç ve ten pigmentasyonu özellikle batı ve kuzey Avrupa popülasyonlarında oldukça değişkenlik gösterir. Bu coğrafi bölgenin dışında renk çeşitliliği azalır çoğunlukla göz rengi kahverengi, saç rengi ise siyah olarak tekdüzehale gelir. Ten rengi farklılıkları, Avrupa veya Doğu Asya popülasyonları ile karşılaştırıldığında Alt-Sahra Afrika popülasyonu arasında belirgindir. Popülasyonlar arasında görülen göz, saç ve ten rengi varyasyonlarının SLC24A5, OCA2, SLC45A2, MC1R, TYR ve ASIP genleri bulunan SNP markırları ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (96). Bu çeşitlilik, seleksiyon ve adaptasyon olmak üzere iki evrimsel süreçle açıklanmaktadır. Kıtasal ölçeğe bağlı UV (Ultraviyole) ışınlarına maruz kalınması ile ten rengi üzerinde güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Bu da pozitif yönde adaptasyon sağlar (97) İnsan pigmentasyonunu etkileyen faktörler şu şekildedir:

- UV ışınlarına maruz kalma nedeniyle melanin üretimindeki artışın cildi koyulaştırması,
- Farklı vücut bölgeleri önceden programlanmış olması nedeniyle melanosit sayısı ve melanin üretimi bakımından farklılık göstermesi,
- Melanin üretiminin miktarı ve türünün, yaşa ve yerleşim yerine göre farklılık göstermesi,
- Çocukların yetişkinlere göre, kadınların ise erkeklere göre daha soluk tenli olması (99,98)

4.3.1 Melanositler ve Melanogenez

Melanin pigmenti, epidermisin bazal tabakasında, saç kökü ve irisin içinde bulunan melanosit hücreleri tarafından sentezlenir. Bu hücrelerin içinde melanozom denen lizozom benzeri organeller mevcuttur. Melanozomlarda melanin üretimi gerçekleşir ve bu sürece melanogenez (melanin sentezi) denir (98).

Melanogenezdeki anahtar enzim tirozinazdır (TRY) ve melanin sentezinin ilk basamağını başlatır. Bir amino asit olan tirozin, hidroksilasyon ile DOPA ya (dihidroksifenilalanine) dönüşür. DOPA oksidasyonla DOPAkinona dönüşür. DOPAkinon iki farklı biyokimyasal yolun başındaki önemli bir ara bileşiktir. Sistein amino asidi yokluğunda DOPAkinon ömelanine (kahverengi-siyah), sistein varlığında ise feomelanine (sarı- kızıl) dönüşür. Böylelikle melanin iki farklı biyopolimerle temsil edilir. Şekil 2'de melanin pigmentinin oluşum aşamaları gösterilmiştir. Ömelaninin, feomelanine oranı arasındaki farklılık insanlar arasındaki göz, saç ve ten rengi çeşitliliğini sağlar (100). Her insan yaklaşık olarak aynı melanosit miktarına sahiptir ancak; melanositlerdeki melaninin miktarı bireyler arasında farklılık gösterir. Popülasyonlar arasındaki pigmantasyon çeşitliliği; üretilen melanin pigmentinin bu dokulardaki miktarına, türüne ve dağılımına bağlıdır (97, 99).

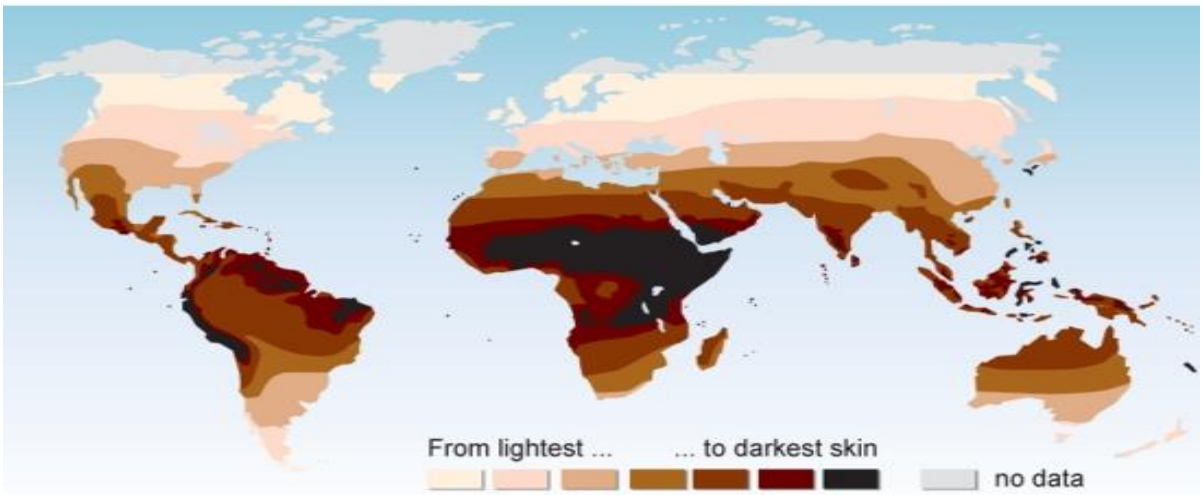


Şekil 2. Melanin pigmentinin oluşumu (101)

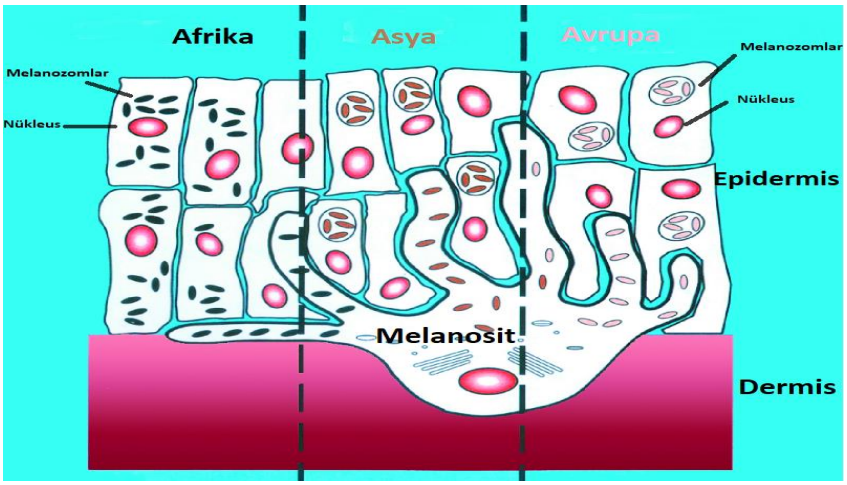
4.3.2 Ten Rengi

Ten rengi, nadir görülen patolojik durumlar dışında, üç pigmentin veya kromoforların sonucunda oluşur. Bunlardan biri kahverengi / siyah veya kırmızı / sarı polimerden oluşan melaninlerin, melanositler tarafından üretilmesi diğeri yüzeysel damar sisteminde bulunan kırmızı kan hücrelerindeki hemoglobin ve çok daha az görülen, karoten içeren besinlerin aşırı tüketilmesi sonucu

avuç içinin sarı renkte olmasıyla görülebilecek renklerdir (100). Dünya çapında ten rengindeki sistematik farklılıklar temelde cildin melanin içeriğindeki farklılıkların bir sonucudur (102). İnsan ten rengi koyu kahverengi/siyah'tan en açık beyaz ten rengine doğru sıralanan bir pigmentasyon özelliği vardır. Kurucu ve fakültatif olmak üzere iki farklı ten rengi tanımlanabilir. Kurucu ten rengi; UV ışığına maruz kalmayan, hormonlar tarafından etkilenen, doğal, genetik olarak belirlenmiş ten rengidir. Vücutta görünen küçük alanlarda veya UV'ye maruz kalmayan, üst kolun iç kısmı gibi bölgelerde kurucu ten rengine rastlanır. Fakültatif cilt rengi is UV ışığına ve diğer çevresel faktörlere maruziyetten kaynaklanır. Örneğin bronzlaşma olayı derideki melanin bileşimini değiştirir ve melanositlerin ürettiği melanin miktarını arttırır, geçici olarak cildin rengini değiştirir. İnsanlarda atasal ten renginin koyu olduğu düşünülmektedir. Avrupalının cildi UV ışığına maruz kaldığında koyulaşabilir, aynı zamanda daha az UV ışığına maruz kalan Afrikalının cildi ise soluk hale gelebilir (103,102). Şekil 3'te insan ten renginin dünya üzerinde dağılımı gösterilmiştir. Şekil 4'te popülasyonlara göre ten rengi farklılıkları ve buna bağlı melanozom şekilleri gösterilmiştir



Şekil 3. İnsan ten renginin dünya üzerindeki dağılımı (103)



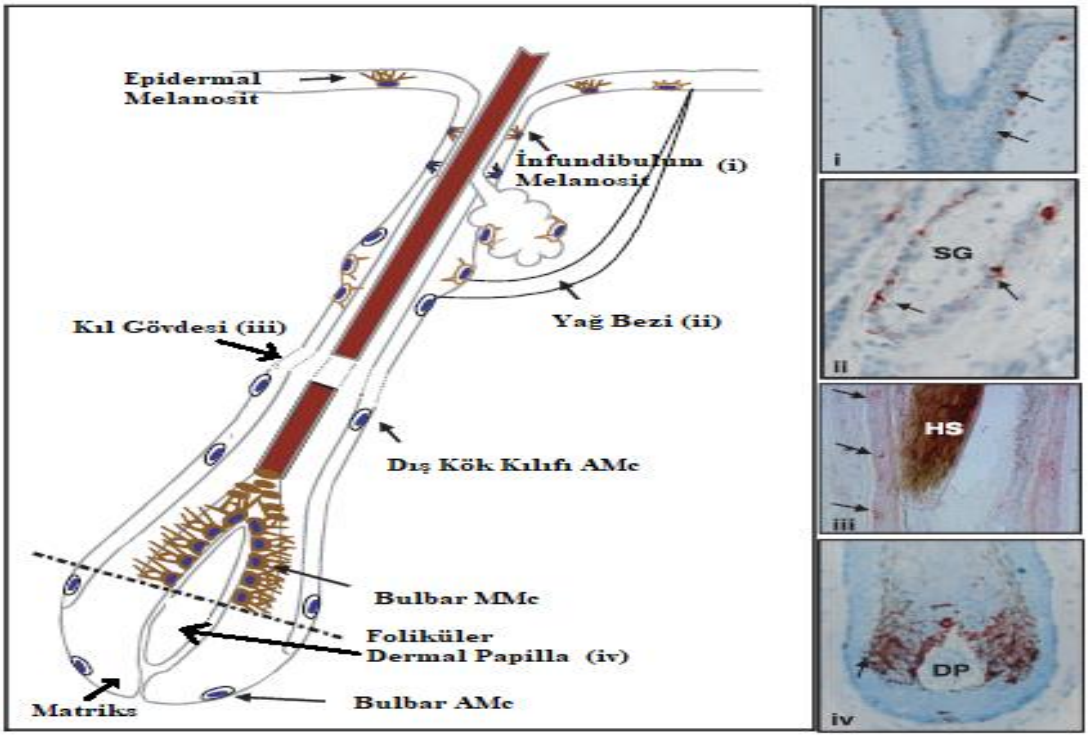
Şekil 4. Popülasyonlara göre ten rengi farklılığı - melanozom şekilleri, boyutu ve dağılımı (104)

4.3.3 Saç Rengi

Doğal insan saçı rengi genellikle kızıl, sarışın, esmer ve siyah olarak tanımlanır. Saç rengini belirleyen en önemli faktör baskın pigmenttir. Bu pigmentasyonu belirleyen ise; ömelanin ve feomelanin karışım oranıdır. Yapılan insan saçı analizlerine göre; renk ve içerik bakımından gruplanabilir (106,105). Şekil 5'da bir kıl yapısının şematik ve immünohistolojik yapısı gösterilmiştir

- *Kızıl ve sarı saç:* Genel olarak kahverengi ve siyah saçtan daha az melanin içerir.
- *Sarı saç:* Kahverengi ve siyah saçla aynı miktarda melanozomlara sahiptir. Ancak melanozomlar daha küçük ve daha yuvarlaktır.
- *Kahverengi saç:* Elipsoid şekinde büyük melanozomlarla çevrilidir ve ömelanin içerir.
- *Siyah saç:* En büyük ve en çok melanozomlara sahiptir. Yoğun şekilde ömelanin içerir (107).

.



Şekil 5. Kıl yapısının şematik ve immünohistolojik gösterimi (107).

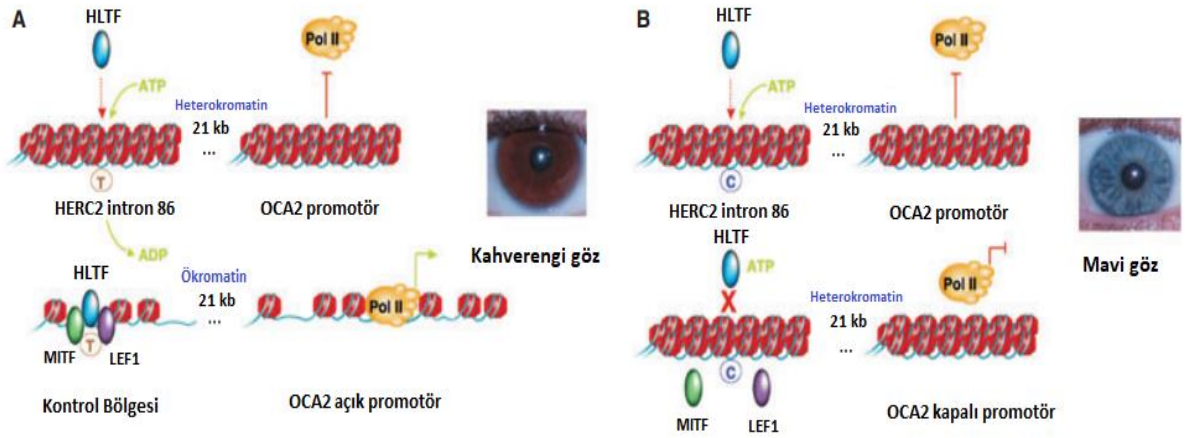
İnsanlarda saç ve ten rengi üzerinde etkisi en çok olan gen Melankortin 1 Reseptör (MC1R) genidir (107). Alfa-melanosit uyarıcı hormon (α-MSH) bu resptör üzerindeki etkisi ömelaninin feomelanine oranının belirlenmesinde önemli bir rol oynar. MC1R geni üzerinde bulunan bazı alellerin feomelanin üretiminde önemli ölçüde sorumludur. Bu da bazı popülasyonlarda kızıl saç ve açık ten ile kendisini gösterir. MC1R genindeki varyasyon özellikle Avrupalılar arasında yüksektir. Bu nedenle alt popülasyonlar arasında önemli bir etkiye sahiptir (107,106). Grimes ve ark. MC1R geni üzerinde 12 SNP bölgesi çalışılmıştır. Bunlardan sekizinin kızıl saç fenotipi ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (89).

Çalışmalar soncunda MC1R geni üzerindeki saç rengini belirlemeden en çok bilgi verici 11 SNP noktası belirlenerek daha önceden geliştirilen IrisPleks setine ilave edilmiş ve HIrisplex seti geliştirilmiştir. Böylelikle eş zamanlı saç ve göz rengini tahmin edebilecek bir panel elde edilmiştir (14).

4.3.4 Göz Rengi

Göz renginin kalıtımı genellikle basit bir Mendel özelliği olarak sınıflandırılır. Ancak araştırma ve gözlemler göstermiştir ki daha karmaşık bir kalıtım modeline sahiptir. Çünkü göz rengi epistaz ve eksik dominantlık gösterir. Göz renginin fiziksel temeli, gözün uveal tabakasındaki melanosit hücrelerinin dağılımı ve içeriği tarafından belirlenir. İris birkaç katmandan oluşur: ön katman ve altında bulunan stromadır. İris rengi en açık mavi tonundan en koyu kahverengi ve siyah renge doğru bir süreklilik gösterir (108,6).

Göz renkleri genellikle kahverengi, ela, yeşil, mavi, gri ve nadir durumlarda kırmızı ve menekşe renklerini içerir (6). Göz renginden sorumlu yaklaşık 16 gen vardır. Avrupa popülasyonları üzerinde yapılan son tüm genom boyu ilişkinledirme çalışmları (genome-wide association study- GWAS) ve aday gen çalışmalarında göz rengi varyasyonlarının iki bitişik gen tarafından karakterize edildiği ortaya konmuştur. Bu genler 15. Kromozom üzerinde bulunan HERC2 (Hect domain ve RCC1-like domain-containing protein 2) ve OCA2 (Oculocutaneus Albinism I) genleridir. HERC2 geni, OCA2 geni üzerinde bulanan promotör bölgesini etkileyen bir intron bölgesi içerir (Şekil 6). İntron 86 olarak bilinen bu bölge HERC2 geninin promotör bölgesi olup burada rs12913832 SNP lokusu bulunur. Bu lokusun gösterdiği tek bir baz değişimi (T/C) ile kahverengi-mavi göz değişimine neden olur. Bu da insan göz rengi varyasyonlarının %74'ünü oluşturur. Bu nedenle bu iki gen bölgesi üzerinde bulunan SNP'ler göz renginde önemli bir role sahiptir (110,109).



Şekil 6. OCA2 gen ekspresyonunun düzenlenmesinde mavi- kahverengi göz renginin belirlenmesi (109).

Adli bilimlerde bir kişinin genotipinden göz rengini en doğru tahmin etmek için tamamlayıcı diğer lokuslar dahil edilerek genişletilmiştir. Bu amaçla yapılan en önemli çalışmalardan biri Liu ve arkadaşlarının sekiz gen bölgesinde bulunan 37 SNP bölgesinin 6168 Hollandalı grup üzerindeki çalışılmasıdır. Bu çalışmada MLR analiz yöntemine dayalı DNA tabanlı göz rengi tahmin modeli geliştirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre sekiz gen üzerinde bulunan 24 SNP bölgesinin göz rengi tahmininde bilgi verici olduğu görülmüştür. Yöntemden elde edilen başarı oranları kahverengi göz için %93, mavi göz için %91 yeşil göz renginde ise %73'tür. Ayrıca çalışmada her bir SNP'nin göz rengi tahmin başarısı hesaplanarak göz rengi tahmininde en yüksek doğruluk oranına sahip bilgi verici en güçlü 6 SNP bölgesi (HERC2 rs12913832, OCA2 rs1800407, SLC24A4 rs12896399, SLC45A2 rs16891982, TRY rs1393350 ve IRF4 rs1220352) belirlenmiştir (10). Walsh ve arkadaşları bu 6 SNP'yi kullanarak adli genetik uygulamalarında (DNA miktarının az ve düşük kalitede olduğu durumlar) kullanılmaya uygun, DNA temelli ilk göz rengi tahmin paneli olan Irisplex multiplex setini geliştirmişlerdir. Bu multiplex mavi göz rengi tahmininde %91,6, kahverengi göz rengi tahmininde %87,5 doğruluk oranında tahmin edilebilmektedir. Ancak yeşil ve ela renkleri içeren ara renk grubunda güvenilir sonuç vermemektedir (9). Şekil 7'de çeşitli renkerle sahip örnek göz renkleri gösterilmiştir.



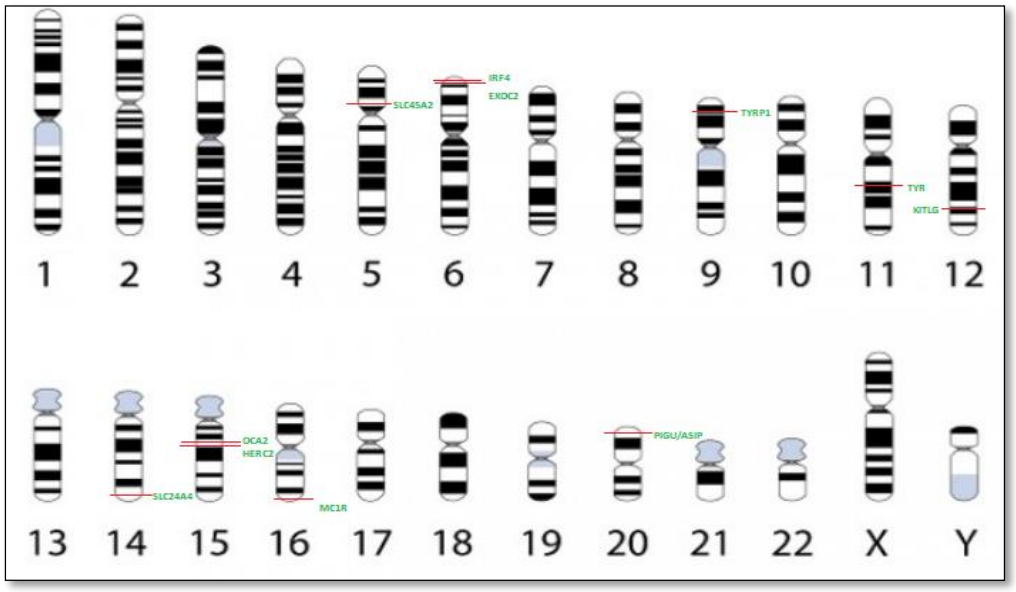
Şekil 7. Mavi, gri, yeşil, ela, açık kahveden koyu kahverengiye değişen temsili göz renkleri (6)

Walsh ve ark. Irisplex panelini EUREYE (European Eye) adını verdikleri çalışmada tüm Avrupa popülasyonunu (yedi bölge) yansıtacak 3840 kişi üzerinde çalışmış ve panelin güvenirliliğini desteklemişlerdir (111). Türkiye popülasyonu ile ilgili bu 6 SNP bölgesi Bülbül tarafından doktora tezinde çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre mavi ve kahverengi göz rengi tahmin başarısı %90'ın üzerinde bulunmuştur (111).

4.4. Adli DNA Fenotiplemede (FDP): Göz ve Saç rengi tahmini

Adli genetikte EVC bilgilerinin tahminine izin veren DNA lokuslarının kullanılması adli DNA fenotiplemesi olarak tanımlanır. DNA'dan elde edilen bu bilgi rutin vaka çalışmaları, toplu felaket kurbanları ve kayıp kişilerin kimliklendirilmesi gibi birçok durum için "biyolojik tanık" olarak kullanılabilir (87).

Göz ve saç renginin genetik temelinin anlaşılmasıyla birlikte aralarında güçlü genetik ilişkinin olduğu görülmüştür. Walsh ve arkadaşları tek bir multipleks setinden göz ve saç rengi tahminine izin veren HIrisPlex panelini geliştirmişlerdir. Bu panel 11 gen bölgesinde bulunan (MC1R, HERC2,OCA2, SLC24A4, SLC45A2, IRF4, EXOC2, TRYP1, TYR, KITLG, ve PIGU/ASIP.) 23 SNP ve 1 INDEL (insersiyon/delesyon) bölgesinden oluşmaktadır (Şekil 8)(14).



Şekil 8. HIrispleks panelindeki genlerin kromozomlar üzerinde bulunduğu bölgeler

4.4.1 Göz renginden sorumlu olan genler

Melanin biyosentezinde rol oynayan faktörleri kodlayan birkaç önemli gen vardır. HERC2 ve OCA2 genleri özellikle mavi ve kahverengi göz renginden sorumlu iki ana gendir (108). Ayrıca göz rengi varyasyonlarından sorumlu daha küçük etkilere sahip SLC45A2 (MATP), TYR, TYRP1, ASIP, IRF4 gibi başka genler de vardır (6).

4.4.1.1. OCA2 geni

OCA2, 24 eksona sahip, 345 kilobazlık (kb) alanı kapsayan büyük bir gendir (112). 15. Kromozomun 15q11.2-q13 bölgesinde bulunur ve 838 aminoasit içeren 12 transmembran domainli bir integral melanozomal membran proteinini kodlar (114,113,110). Bu proteine P-proteini denir ve asidik melanozomların PH'sını nötralize etmekte görevli olduğu düşünülmektedir. Melanin sentezini başlatan tirozinaz enziminin çalıştığı optimum PH'yı (6.8) ayarlarak enzimin aktivasyonunda önemli bir rol oynar (115).

OCA2 geni kahverengi (BEY2 15q11-15) ve ela göz (BEY1) rengini kodlayan temel bir bölge içerir. OCA2 geni üzerinde göz rengi ile ilişkili 300'den fazla SNP lokusu tanımlanmıştır.

(116). Walsh ve arkadaşları tarafından OCA2 genin 13. eksonunda bulunan rs1800407 SNP lokusu göz rengi tahmininde bilgi verici bir lokus olduğunu belirlemişler. Lokus homozigot CC olarak belirlendiğinde kahverengi gözün daha da koyulaşması, GG olması ise kahverengi olmayan gözlerle ilişkili olduğu belirlenmiştir (9). HERC2 geni ve OCA2 geni arasında yeşil ve ela göz rengi varyasyonları üzerinde etkili bir epistatik etki tespit edilmiştir. OCA2 geni üzerinde bulunan rs1800407 lokusunun yeşil göz/ela göz rengi üzerinde önemli bir ilişkisi olduğu görülmüştür (117). Sturm ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada HERC2 geni üzerinde bulunan rs12913832 SNP lokusunda görülen alellerin, rs1800407'deki alellerin kombinasyonu ile ara (yeşil) göz rengiyle olan ilişkisi arasındaki bağlantıyı ortaya koymuştur (118).

4.4.1.2 HERC2 geni

HERC2 geni, 15. Kromozomun 15q13.1 bölgesinde yer alan 211 kb büyüklüğünde 93 ekzonlu bir gendir ve OCA2 geninin 11.7 kb yukarısında yer alır. 4834 aminoasitin oluşturduğu 528 kDa büyüklüğünde protein kodlar (119). HERC2 genin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte spermatogenez, ubikutin aracılı proteoliz ve hücre içi taşımada görevli iyi korunmuş işlevsel proteinleri kodlar (120).

Eiberg ve arkadaşları HERC2 geni üzerinde mavi ve kahverengi göz renginden sorumlu 166kb'lik bir alan belirlediler ve mavi gözle ilişkili 2 SNP lokusu (rs1129038-rs12913832) tanımladılar (121). Özellikle rs12913832 lokusunun bulunduğu 86. intronu OCA2 geninin ifadesini kontrol eden promotör bölgede bulunur. Bu SNP lokusunun 'C' aleli göstermesi iristeki melanosit hücrelerinde OCA2 geninin ekspresyonunun azalmasına ve fenotipte mavi göz renginin görülmesine neden olduğu düşünülmektedir (110).

4.4.1.3 SLC45A2

Çözünür taşıyıcı aile 45, üye 2 (Solute Carrier Family 45 Member 2- SLC45A2) geni 5. kromozomun 5p13.2 bölgesinde bulunan, 40 kb büyüklüğünde, 7 eksona sahip bir gendir. Melanin üre-

timinde görevli 530 aminoasitten oluşan bir 'Membranla İlişkili Taşıyıcı Protein (MATP)' kodlar. MATP, melanozomlar içinde tirozinaz trafiği ve melanozomlara proton taşınmasıyla, pH ve iyonik homeostazı kontrol ederek melanin sentezine aracılık eder (123,122). MATP proteinin mutasyona uğraması sonucu melanozomal lümen asidik hale gelir ve düzgün çalışmadığı için bakır tirozinaza bağlanamaz dolayısıyla aktivasyonu azalır. Bunun sonucunda OCA4 (Okülokütan albinizim tip 4) kalıtsal bozukluğa sebep olur (124). Çeşitli RPE (retinal pigment epithelium-retina pigment epiteli*)* melanizasyon kaybıyla birlikte hastalarda çok soluk cilt, beyaz - sarımsı saç, yaşam boyu pigment eksikliği ve hafif görsel kusurlar görülür (126,125).

SLC45A2 geni üzerinde bulunan en az 2 SNP (rs26722, rs16891982*)* lokusunun insan pigmentasyon varyasyonu üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Özellikle promotör bölgede bulunan rs16891982 lokusu kahverengi gözle ilişkilendirilmiştir. Avrupa bölgesinde homozigot G/G aleli görülmekte iken dünyanın geri kalan popülasyonlarında heterozigot alelinin az görülmesi ile birlikte homozigot C/C aleli yaygındır (127).

4.4.1.4 TYR geni

TYR ve TYRP1, TRYP2 tirozinaz-ilişkili protein ailesine ait genlerdir. TYR geni 11. kromozomun 11q14.3 bölgesinde olup 5 adet ekzona sahiptir. TYR geni melanin pigmentinin üretiminde anahtar enzim olan, substratın oksidasyonu ve DOPA'nın ara maddesi olan DOPAkinona dönüşmesini katalize eden 529 aminoasitten oluşan tirozinaz enziminin üretiminden sorumludur (118).

TYR geni üzerinde aynı LD bloğunda (Linkage Disequilibrium- bağlantı dengesizliği) olmasına rağmen farklı pigmentasyonlar üzerinde etklili iki SNP (rs1393350-rs1042602) lokusu tanımlanmıştır. Liu ve ark. rs1393350 lokusunun homozigot G/G göstermesi kahverengi gözün renginin koyulaşmasına neden olduğunu öne sürmüştür (9). rs 1042602 göz rengi ile ilişkilendirilmesine rağmen çil ile de ilişkili olduğu da görülmüştür (8).

4.4.1.5 IRF4 geni

IRF4 geni (Interferon Regulatory Factor 4-interferon düzenleyici 4), bağışıklık sistemi gelişimi ve işlevinde önemli bir rol oynar. Özellikle lenfositlerde, makrofajlarda, B hücreleri ve dentirik hücrelerde ifade edilir. İnterferonların sinyal akışının düzenlemesinde görevli transkripsiyon faktörlerini kodlar. IRF4 geni başlangıçta insanda çil pigmentasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Daha sonra 4. intronda bulunan rs12203592 SNP lokusunun saç, göz, ten rengi, bronzlaşma ve nevus sayısı ile güçlü ilişkisi olduğu bulunmuştur (128).

Han ve ark. 10.000 Avrupalı üzerinde yaptıkları çalışmada rs12203592 lokusunun T alelinin açık saç rengi ve mavi/açık göz rengiyle ilişkili olduğunu aynı zamanda bu kişilerin bronzlaşma yeteneklerinde de bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir (129). Liu ve ark. genom çapında yaptıkları çalışmada da rs12203592 lokusunun özellikle Avrupadaki popülasyonda açık göz rengine sahip bireylerin göz rengi tahmininde bilgi verici bir lokus olduğunu göstermişlerdir (10,9).

4.4.2 Saç Renginden Sorumlu Genler

İnsan göz rengi tahminindeki gelişmelerden sonra çalışmalar saç rengi gibi diğer pigmentasyon varyasyonlarını belirlemek üzere yoğunlaşmıştır. GWAS çalışmaları, aday gen yaklaşımları ve bağlantı analizleriyle insan saç rengi varyasyonlarından sorumlu birçok gen olduğu tanımlanmıştır (131,130,129).

İnsanlardaki saç rengi ile ilgili çalışmalar ilk önce kızıl saç rengiyle başlamıştır. Kızıl saç renginin MC1R (Melanokortin-1 reseptörü) genindeki polimorfizmlerle ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu bilgi çeşitli popülasyon örnekleriyle yapılan birçok çalışmayla doğrulanmıştır (129,106,8). MC1R geni kızıl saç için oldukça belirleyici bir gen olduğu için adli bilimlerde uzun yıllardır uygulanmaktadır (89,13). İrlandalılar üzerinde yapılan GWAS çalışmasıyla kızıl saç rengiyle ilgili ek veriler elde edilmiş ve ASIP genindeki iki SNP lokusunun kızıl saç rengi ile ilişkili olduğu görülmüştür (130). Avrupa popülasyonu ve diğer popülasyonlardaki kızıl saç rengi sıklığı oldukça düşüktür. Bu yüzden GWAS çalışmaları genişletilerek MC1R ve ASIP genlerine ek olarak

OCA2, HERC2, SLC24A2, KITLG, TYR, TPCN2, TYRP1, IRF4, EXOC2, KIF26A ve OBSC gibi insan saç renk varyasyonlarıyla ilişkili diğer genleri eklenmiştir (132,129).

4.4.2.1 MC1R geni

MC1R geni, 16. Kromozomun 16q24.3 bölgesinde bulunur. Melanokortin reseptör ailesinin 5 üyesi (MC1R, MC2R, MC3R, MC5R)vardır. Bunlardan her birinin 7 transmembran zinciri bulunur ve G protein ilişkili reseptör ailesine aittirler (133).

Melanokortin 1 reseptör geni insanlarda ömelaninin/feomelanine oranında önemli bir rol oynar bu nedenle saç ve ten rengi oluşumunda etkisi çok önemlidir (102). Bu da melanosit hücrelerindeki melanin pigmentinin oluşmasında uyarıcı rolü olan α-MSH (a-Melanocyte stimulating hormone) ile düzenlenir. α-MSH MC1R'e bağlanır ve hücre içindeki adenilat siklaz enzimi aktivasyonundan sonra hücre içi cAMP artar. Sonuçta MITF (microphthalmia transcription factor) transkripsiyonu indüklenir. MITF de melanozomlar içindeki enzimleri arttırır, böylece kahverengi/siyah ömelanin sentezi artar (134).

MCR1 genindeki bazı varyantlar aşırı feomelanin üretiminde etkili olup bazı popülasyonlarda fenotipte kızıl saç ve açık ten olarak görülür. MCR1 genindeki kodlama yapan bölgeler oldukça polimorfiktir. Bunların çoğu Avrupa popülasyonlarında yaygın olan polimorfizmlerdir (106). Yapılan çalışmalarda 70'ten fazla allelik varyant tanımlanmıştır (94, 100, 104, 105,136). MC1R genindeki 3 SNP lokusunun (rs1805007,rs1805008, rs1805009) kızıl saçla güçlü bir ilişkisi olduğu respit edilmiştir (132). rs1805007, rs1805008 lokusları popülasyonların genelinde yaygınken, rs1805009 lokusu Britanya adaları ve Hollanda popülasyonlarında daha polimorfik olduğu görülmüştür (136,135,131).

4.4.2.2 ASIP geni

Agouti sinyal protein geni (Agouti signalling protein gene-ASIP) insan melanogenezindeki rolü yıllarca belirsiz ve tartışmalıydı. ASIP, *a*-MSH antogonisti olarak hareket edebilen bir sinyal

proteini kodlar. *a*-MSH'ın melanokortin 1 reseptörüne bağlanmasını önler bu da cAMP seviyelerinde bir düşüşe neden olur. Bu şekilde ASIP ömelanin üretimini engeller ve feomelanin üretimine yol açar (137). Genin 3' ucundaki translasyon olmayan bölgesinde (3'UTR-untranslated region) g.8818A>G (rs6058017) polimorfizmi tanımlanıştır. Bu varyasyon ömelanin üretimine yol açar ve Avrupa popülasyonlarında koyu saç ve kahverengi göz olarak kendini gösterir (139,138). Homozigot AA genotipi, ASP seviyesinde artışa dolayısıyla MC1R geni ile daha güçlü antogonist ilişkide olmasına neden olur. Kanetsky ve ark. rs6058017 G allelinin RHC fenotipinin yanında kahverengi saç fenotipinin gözlenebilir olduğunu ve Avrupalılarda yapılan çalışmada G alelinin yeterince gözlenmediğini belirlediler (138).

Sulem ve arkadaşları ASIP haplotipi üzerinde iki SNP (rs1015362 and rs4911414) lokusunun kızıl saç rengiyle bağlantılı olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu haplotipteki pigmentasyon varyantları çillenme, güneşe karşı cilt hassasiyeti, sarı saç gibi kızıl saça benzer varyantlarla ilişkilidir (130).

4.5 Gözle Görülebilir Fiziksel Özelliklere (EVC) ait Tahmin Modelleri

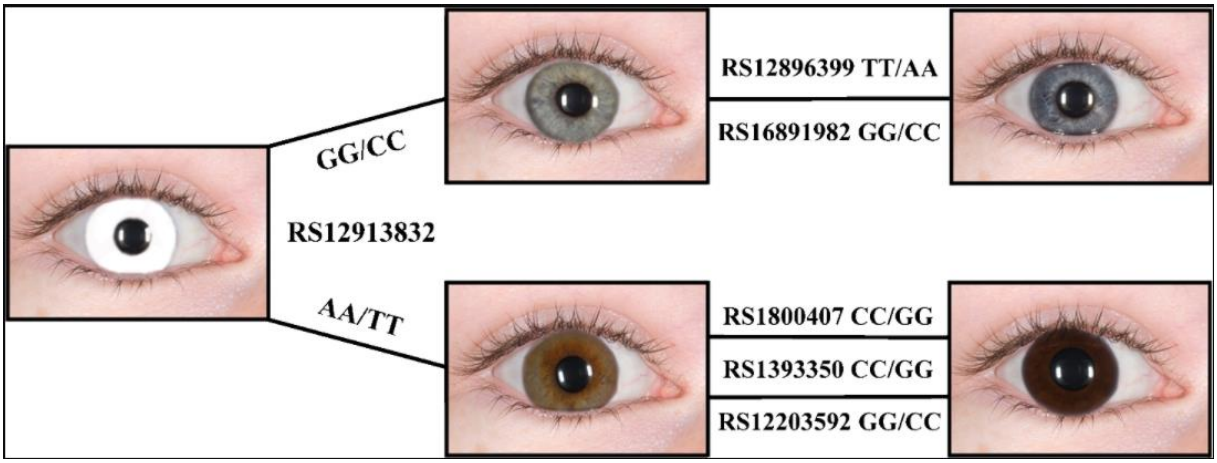
Adli ve paleo antropolojik çalışmalarda fiziksel görünümün tahmininde genetik verilerinin kullanımına olan ilgi artmaktadır (142,141,140). GWAS tarafından göz saç ve ten rengini belirleyen SNP'lerin tanımlanması, araştırmalara güçlü bir ivme kazandırmıştır (130,8). Önce SNP verilerini kullanarak göz rengi tahmin etmenin doğruluğu değerlendirildi. Ardından da saç rengi, ten rengi ve çillenme gibi diğer pigmentasyon özelliklerini kapsayacak şekilde genişletildi. Bu çalışmalar, Avrupa popülasyonunun veri setlerine göre optimize edilmiştir. En yaygın olanı saç, göz ve ten rengini eş zamanlı tahmin edilmesini sağlayan 41 SNP lokusundan oluşan HIrisPlex-S'tir. Ayrıca bu tahmin modellerinin doğruluğunun değerlendirilmesi de Avrupa popülasyon örnekleri üzerinde gerçekleştirilmiştir (145,144,143,111,15,10,9).

Göz, saç ve ten renginin kategorik tahmini genellikle belirli genetik markırları kullanarak oluşturulan panellere ve MLR istatistiğine dayanmaktadır. Örneğin Irispleks paneli ve modeli göz

rengi tahmini için kullanılan 6 SNP'ye, HIrisplex paneli ve modeli saç ve göz rengi tahmini için kullanılan 24 SNP'ye, HIrisplex-S paneli ve modeli saç, göz ve ten rengini belirleyen 41 SNP'ye dayanmaktadır. Her üç tahmin modeli web aracıyla kullanıma açıktır (145,14,10). Göz rengi tahmininde kullanılan diğer bir araç Bayesci sınıflandırmayı ve olasılık oranlarını kul-lanan Snipper'dır(146). Tüm olası olasılıklar hesaplanır ve azalan düzende sıralanır. Nihai tah-min en büyük iki olasılığın oranıdır. Saç ve ten rengi için de bu tahmin modelinin kullanıldığı alternatif modeller geliştirilmiştir (148,147).

4.5.1 Göz Rengi Tahmin Modeli

Farklı birçok araştırma grubu tarafından çeşitli popülasyonlar üzerinde çalışılmış göz rengi tahmin modelleri vardır ve her biri farklı SNP grubu içerir. Kullanılan istatsistik modelleri ise losijtik regresyon ve bayesci yaklaşımlar gibi farklı istatiksel modellerden oluşur (146,10,9). Modellerin çoğu mavi, kahverengi ve ara göz rengi olmak üzere üç ana fenotip halinde kategorik bir sınıflandırmaya dayanmaktadır. Bu modellerden en popüleri Walsh ve arkadaşları tarafından adli uygulamalarda kullanılmak üzere kalitatif olarak göz renklerini (mavi, yeşil, kahverengi) tahmin edebilen IrisPlex panelidir (10). Liu ve ark. nın yapmış olduğu çalışmada en güçlü 6 SNP (HERC2 rs12913832, OCA2 rs1800407, SLC24A4 rs12896399, SLC45A2 rs16891982, TRY rs1393350 ve IRF4 rs1220352) bölgesi seçilerek oluşturulan multiplekstir. Tahmin modeli olarak MLR model istatistiği yöntemi kullanılmıştır. HGDP-CEPH veritabanından elde edilen 51 popülasyondan 934 kişinin örneği çalışarak Irispleks panelinin dünya çapındaki performansı test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre mavi göz renginin Orta Doğu ve Batı Asya'da nadir de gözlense Avrupa (Batı Rusya'da dahil) popülasyonu üzerine test edilebilirliği görülmüştür (10,9).



Şekil 9. Irisplex panelindeki 6 SNP lokusuyla mavi ve kahverengi göz renklerinin belirlenmesi (10).

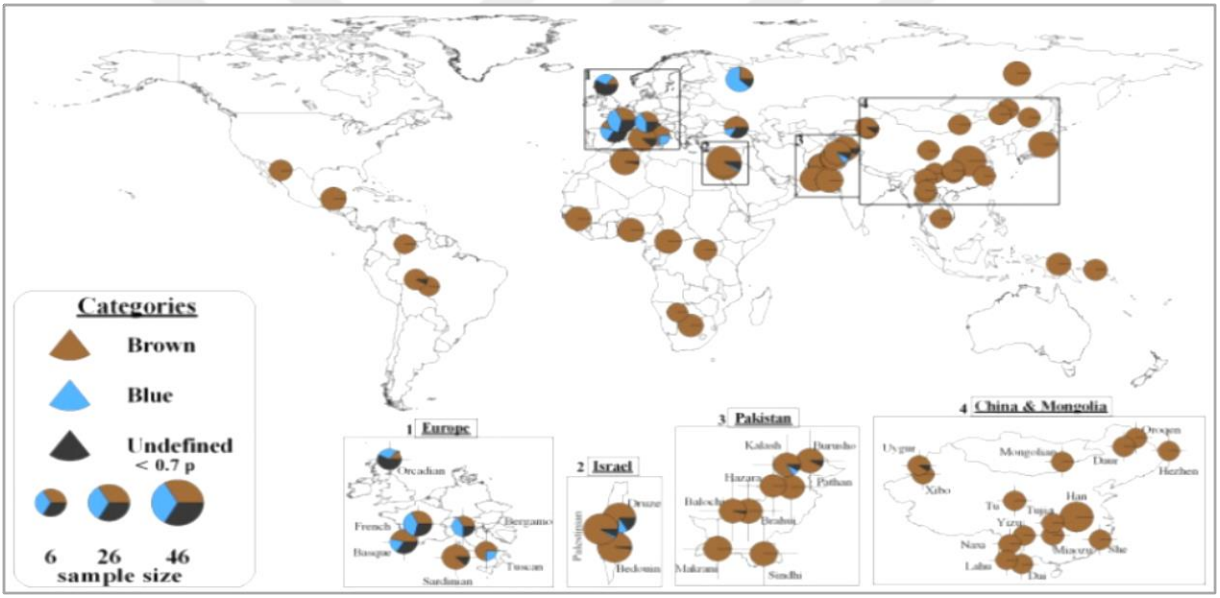
Irispleks paneli tahmin modelinin iki senoryosu vardır. Göz renginden sorumlu olan SNP lokuslarında bulunan aleller göre göz rengi kahverengi veya mavi göz rengi olarak tahmin sonuçları verir. HERC2 geninde bulunan rs12913832 lokusunun AA/TT karşı GG/CC aleli göstermesiyle kahverengiye karşı kahverengi olmayan göz rengi ile başlar. Kahverengi olmayanın daha fazla belirlenmesi için rs12896399 (SLC24A4) TT/AA homozigot göstermesinin yanında rs16891982 (SLC45A2) GG/CC homozigot alellerinin gözlenmesi gerekir. Öte yandan kahverenginin daha fazla koyulaşması için rs1800407 (OCA2) ve rs1393350 (TYR) lokuslarının CC/GG homozigot alellerinin göstermesinin yanında rs12203592 (IRF) GG/CC homozigot genotipini göstermesi beklenir (10) (Şekil 9).

Walsh ve arkadaşlarının geliştirdiği Irsiplex panelinin yanında başka araştırma grupları tarafından da oluşturulan tahmin modelleri de vardır. Ruiz ve arkadaşları tarafından insanlardaki göz rengi pigmentasyonuyla ilişkili 23 SNP lokusu için bir tahmin sistemi geliştirilmiştir. Tahmin algoritması Bayes istatistiğine dayalı Snipper programı tarfından yapılmaktadır. Çalışmada 6 farklı Avrupa popülasyonundan 416 kişi çalışılmış ve 3 ana göz rengi üzerinde tahminler yapılmıştır (Şekil 10). HERC2 genindeki rs1129038 lokusu Irisplekste kullanılan lokuslara eklenerek yeşil göz rengi için tahmin performansını iyileştirmiştir (146).

Diğer bir göz rengi tahmin modelini Allwood ve arkadaşlarının Yeni Zelanda popülasyonu üzerinde çalışarak geliştirmiştir. Bu model dört SNP (rs1129038, rs1800407, rs1393350,

rs12896399) lokusundan oluşur ve her SNP genotipinin bir renk (mavi, kahverengi, ara renk) kategorisine yönelik tahminindeki rolünü gösteren sınıflandırma ağacı modeli kullanılmıştır (149).

Son tahmin algotirması Hart ve arkadaşları tarafından önerilmiş, Spichenok ve arkadaşları tarafından da geliştirilmiştir. Çalışmada Avrupalı, Avrupalı olmayan ve farklı popülasyona ait örnekler kullanılmıştır. Göz rengi tahmini için 5 SNP (rs12913832, rs12203592, rs16891982, rs6119471, rs12896399) lokusu kullanılmıştır. Gen havuzundaki genotip kombinasyon göre beklenen renk tahmini her zaman elde edilemeyeceğini bildrilmişlerdir (150).



Şekil 10. Irispleks panelinin Dünya üzerindeki göz rengi tahmini (10).

4.5.2 Saç Rengi Tahmin Modeli

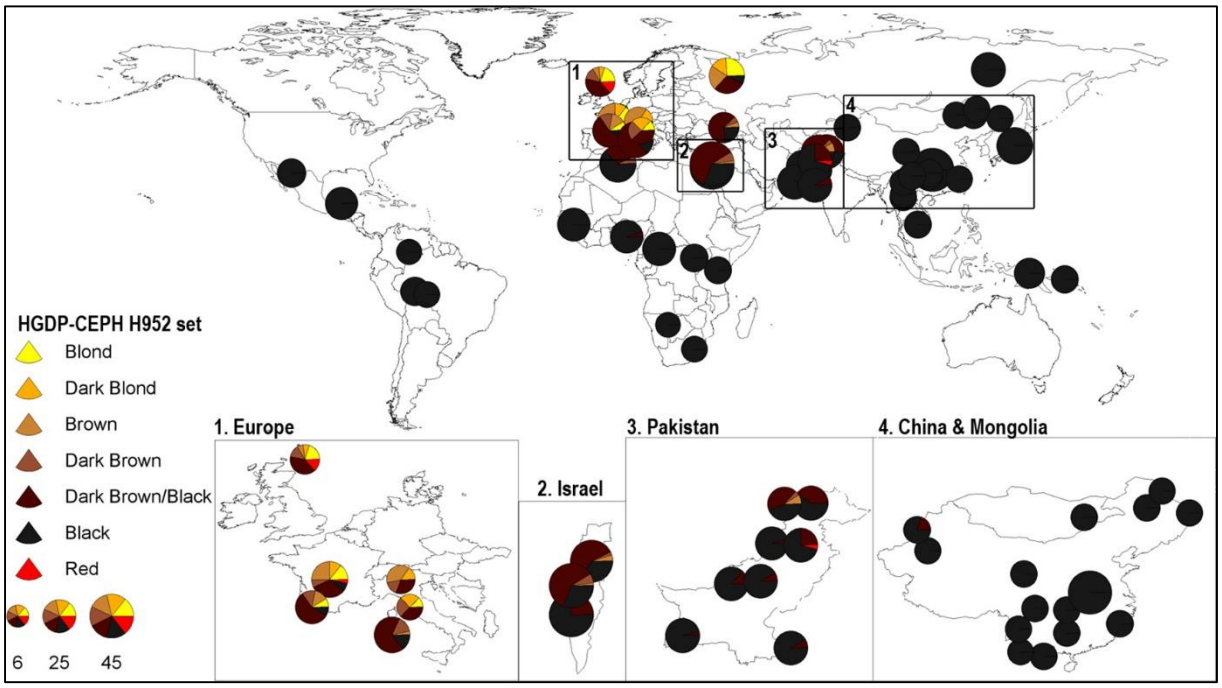
Göz renginin tahmininde kullanılan sistemler ilerledikçe diğer EVC bilgilerinin tahminindeki çalışmalar da ilerlemiştir. Göz ve saç renginin biyolojik ve genetik yolları oldukça benzerdir. Bu nedenle çalışmalar göz renginin ardından saç rengini tahmin edebilmek üzerine yoğunlaşmıştır (134).

Valenzuela ve ark. çeşitli biyocoğrafik soydan olan katılımcılarla 24 gen üzerinde bulunan 75 SNP çalışılmıştır. Açık ve koyu saç rengi için en iyi tahmini veren üçlü bir SNP (HERC2-rs12913832, SLC45A2-16891982, SLC24A5-rs1426654) kombinasyonu bulmuşlardır (90).

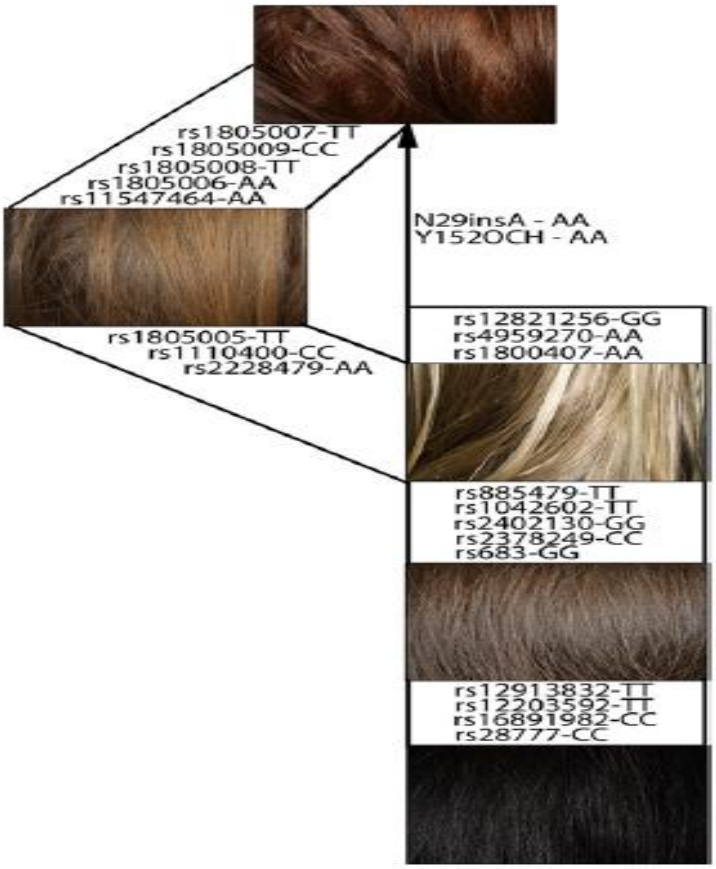
İlk kez dört ana renk kategorisinde (kızıl, sarı, kahverengi, siyah) insan saç rengi tahmini Branicki ve ark. tarafından yapılmıştır. 385 Polonyalı üzerinde 12 gen üzerinde 45 SNP bölgesi çalışılmıştır. Bunlardan 11 gen bölgesinde bulunan 13 SNP'nin saç rengi tahmininde bilgi verici olduğunu ortaya konmuştur (13). Saç rengi tahmin yüzdeleri kızıllarda % 93, Siyah saç renginde % 87, kahverengi saçta % 82, sarı saç renginde % 81 olarak bulunmuştur. Ancak oluşturulan panelin, tek reaksiyonda çalışılamaması ve sadece Avrupa'nın tek bir kısmını (Doğu Avrupa-Polonya) yansıtmış olduğundan geliştirilmeye ihtiyaç duymuştur (13). Bu nedenle Walsh ve ark. Avrupa'nın diğer bölgelerinde yaygın görülen siyah ve kahverengi gibi pigmentasyon varyasyonlarıyla ilgili en fazla bilgi veren SNP bölgelerini seçerek HIrisplex setini geliştirmişlerdir. Bu multiplex setine daha önceden göz rengi ile ilgili geliştirilen Irisplex setine ilaveten 18 lokus daha eklenmiştir. MC1R geninde yer alan bir dizi SNP'nin yanında diğer gen bölgelerinden de SNP markırları seçilmiştir. HIrisplex seti 23'ü SNP ve 1'i InDel olmak üzere toplam 24 polimorfik bölge içerir. Bu lokuslar 11 gen üzerinden seçilmiştir (MC1R, HERC2, OCA2, SLC24A4, SLC45A2, IRF4, EXOC2, TRYP1, TYR, KITLG ve PIGU/ASIP). Adli amaçlı geliştirilen HIrisPlex setindeki 24 lokusla saç ve göz rengi tahmini aynı anda yapılabilmektedir. HIrisplex, saç ve göz rengi tahminini aynı anda yapabilen dolayısıyla iki tahmin modelini içeren bir panelidir. 11 gen üzerinde bulunan 24 lokustan (23 SNP, 1 InDel) oluşmuştur. Bunların 22 SNP lokusu saç rengini belirlemektedir. Yine aynı çalışma grubunun göz rengi tahmini için geliştirdiği Irsiplex panelindeki 6 SNP (bunlardan 4'ü örtüşmektedir) lokusunun eklenmesiyle oluşturulmuştur. Bu lokusların 11'i MC1R geni üzerinde bulanan Y152OCH, N29insA, rs1805006, rs11547464, rs1805007,rs1805008, rs1805009, rs1805005, rs2228479, rs1110400 ve rs885479 lokuslarıdır. Geri kalan lokuslar ise; rs1042602 (TYR), rs4959270 (EXOC2), rs683 (TYRP1), rs28777 (SLC45A2 (MATP)), rs2402130 (SLC24A4), rs12821256 (KITLG), rs2378249 (PIGU/ASIP),

rs12913832 (HERC2), rs1800407 (OCA2), rs16891982 (SLC45A2 (MATP)) ve rs12203592 (IRF4)'tür (14).

Elde edilen sonuçlara göre kişinin saç rengi ile ilgili tahmin yüzdeleri sırasıyla sarışınlara % 69,5 kahverengilerde % 78,5, kızıllarda % 80 ve siyah saç renginde% 87,5 olarak bulunmuştur (14). Ayrıca HGDP-CEPH veritabınındaki genotiplerde kullanılarak dünya üzerindeki tahmin performansı hesaplanmıştır (Şekil 11).



Şekil 11: Saç renklerinin Dünya üzerindeki dağılımı (15).



Şekil 12. Saç rengini belirleyen 22 SNP lokusunun homozigot minör alel girdisine göre tahmin modeli (14).

Walsh ve ark. nın geliştirdiği saç rengi tahmin modeli dört kategoriden oluşur. Sarı, kahverengi, kızıl ve siyah saç renkleri için bir tahmin olasılığı verir. Ayrıca saçın açık ve koyu ton olasılıklarını da hesaplar. Tahmin modeli MLR model istatistiği yöntemine dayanmaktadır. Şekil 12'de saç rengini belirleyen 22 SNP lokusunun homozigot minör alel girdisine göre saç renginin belirlenmesi gösterilmektedir (14).

Walsh ve ark. nın geliştirdiği HIrisPlex panelinin laboratuvarlarda rutinde çalışılmadan önce validasyonun ve populasyon çalışmasının yapılması gerekir. Bu amaçla bu tez çalışmasında da validasyon kapsamında analiz eşiği, hassasiyet, dinamik alan, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik parametreleri belirlenmiştir.

4.6 Optimizasyon ve Validasyon (Geçerlilik)

Adli genetik laboratuvarlarında uygulanan metotların sonuçları tutarlı, güvenilir ve doğru olması gerekir. Metodun uygulabilir olması için ise optimizasyon ve validasyon çalışmalarının akreditasyon kuruluşlar tarafından belirlenen prosedürlere göre gerçekleştirilmesi gerekir. Bu prosedürleri yerine getiren laboratuvarlar, çalıştıkları metot için yetkin hale gelirler (151).

4.6.1 Optimizasyon

Optimizasyon çalışmaları PCR'de kullanılan temel bileşenler; hedef DNA veya RNA, taq DNA polimeraz enzimi, primerler, deoksinükleotitler, tampon, pH ve Mg+2 iyonularından oluşmaktadır. PCR reaksiyonundaki optimal olmayan koşullar sadece kullanılan bileşenlerden değil birçok sebepten kaynaklanabilir. Primerlerin, zaman ve sıcaklık parametrelerinin uygun olmaması (özellikle primerlerin bağlanma sıcaklığı), polimeraz enziminin kalitesi ve Mg^{+2} konsantrasyonu en önemli parametrelerdir. Reaksiyon koşullarının optimize edilmesi ve reaksiyon karışımına koyulan tüm maddelerin için denemeler yapılarak en uygun miktarları belirlenmelidir. Böylelikle en uygun reaksiyon koşullarında inhibe edici faktörler azalabilir. Bu faktörlerin optimizasyonu pozitif kontrol DNA örnekleri kullanılarak yapılmalıdır. Optimizasyon çalışması primerlerin erime noktasına göre farklı sıcaklıklar veya farklı DNA konsantrasyonların denenmesi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılmasıyla sağlanabilmektedir (152).

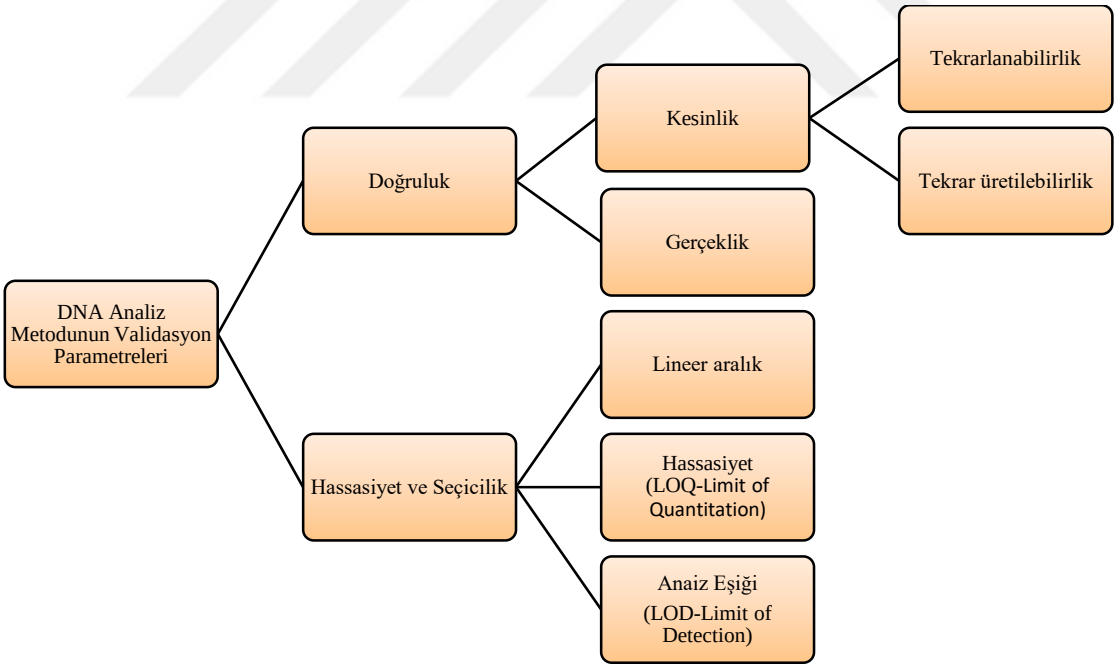
Adli genetik analizlerinde kullanılan SNP lokuslarının optimizasyon çalışmaları kapsamında son ürün uzunluklarını belirlemek gerekir. Bazı SNP lokuslarında özellikle kısa fragmentlerde gözlenen uzunlukların beklenenden uzunluklarından yaklaşık 4-6 baz uzun görünebilmektedirler (153). Bu nedenle çalışılan lokusların uzunluklarının kontrol DNA'lar üzerinden belirlenmesi gerekmektedir.

4.6.2 Validasyon (Geçerlilik)

Adli genetik analizler için kalite güvencesi ve yöntemlerin standardizasyonu 1980'lerin ikinci yarısında önemli hale gelmiştir. Adli DNA incelemeleri yapan laboratuvarların uluslararası standarta olan ISO/EIC 17025'e (International Organization for Standardization-ISO) göre akredite edilmesi tavsiye edilmiştir (151).

Laboratuvarlarda yeni bir metot uygulanacaksa validasyon prosedürlerinin yerine getirilmesi gerekmektedir. ISO/EIC 17025:2017 standartlarıa göre validasyon; belirlenen gerekliliklerin amaçlanan kullanım için yeterli olduğu durumda yapılan doğrulamadır (154).

Validasyon laboratuvar prosedürünün, sağlam, güvenilir ve tekrarlanabilir olduğunu gösteren bir süreçtir. Validasyon ölçüm prosedürü belirlenen hedef ve şartlara uygunluğunun tarafsız olarak tespit edilmesi ve sonuçlarla gösterilmesidir (155). Metotların genel validasyon parametreleri Şekil 13'de gösterilmiştir.



Şekil 13. Genel metot validasyon parametreleri (156)

DNA Analiz Yöntemleri Bilimsel Çalışma Grubu'na göre validayon (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods - SWGDAM) gelişimsel validayon ve iç validasyon (internal) olmak üzere ikiye ayrılır (157).

Gelişimsel Validasyon

Gelişimsel validayon genetik markırların karakterizasyonu, tür özgüllüğü, duyarlılık çalışması, stabilite çalışması, tekrarlanabilirlik, laboratuvarlar arası sonuçların karşılaştırılması, popülasyon çalışmaları, karışım çalışmaları, metodun kesinlik ve doğruluk değerlerinin hesaplanması, PCR tabanlı prodüderler gibi çok basamaklı ve geniş validasyon basamakları içermektdir. Bazı çalışmlar için gelişimsel validasyonun yapılması gerekli olmayabilir (157).

İç Validasyon (İnternal Validasyon)

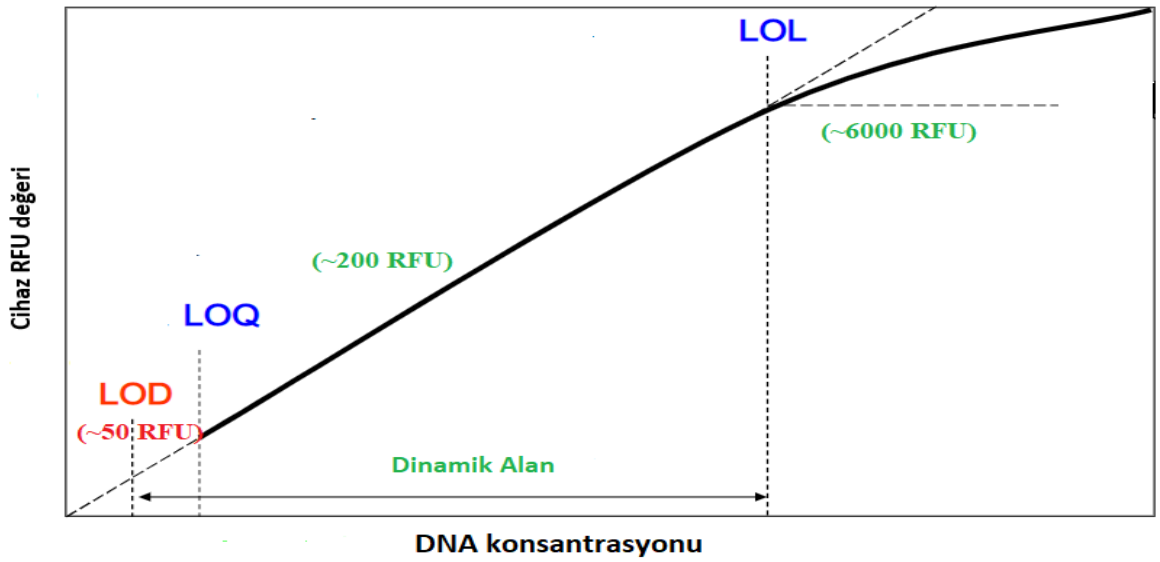
İç validasyon doğruluk, kesinlik, tayin ve stokastik eşik değerlerinin belirlenmesi, karışım çalışmasının yapılması, uygun kontrollerin kullanarak kontaminasyonun en aza indirildiğini gösteren çalışma basamaklarını içeren validasyondur (157).

4.6.3 Validasyon Parametreleri

Adli DNA laboratuvarlarında kullanılacak yönteme ve analiz edilen DNA markırlarına göre validasyon parametreleri değişiklik gösterebilir. SNP analizlerinde kullanılan yöntemin geçerli kılınması için gerekli olan asgari parametreler; analiz eşiğinin tespit edilmesi (Limit of Detection-LOD), hassasiyet (Limit of Quantition-LOQ) belirlenmesi, dinamik alanın belirlenmesi, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik analizleridir (158)

4.6.3.1Analiz Eşiği /Tespit sınırı (LOD-Limit of Detection)

Analiz eşiği temelde belirli şartlarda kalitatif olarak varlığı saptanabilen en düşük madde konsantrasyonudur. Minimum tespit edilen konsantrasyon olarak da adlandırılır. LOD belirlemek için negatif kontroller kullanılabilir. SNP analizlerinde kullanılan gentik analizör cihazında LOD değerini belirlemek için, cihazın kullanım ve yazılım talimatına göre negatif kontrol örneği yürüterek analiz edilebilir. Belirlenen en yüksek pik yükseklikleri tespit edilir. Yürütülen örneklerden elde edilen piklerin RFU değerlerinin ortalaması ve standart sapması hesaplanır. LOD değeri elde edilen standart sapmanın 3 katı olarak kabul edilir (156).



Şekil 14. Kapiller elektroforez cihazında elde edilen sinyallere göre LOD, LOQ, dinamik alanın gösterilmesi (155)

4.6.3.2 Duyarlılık /Tayin sınırı (Limit of Quantition-LOQ)

Bir DNA analizinin performanısının kabul edilebilir olduğunun en düşük konsantrasyon seviyesinin belirlenmesi önemlidir. Bu tayin sınırı belirli şartlar altında güvenilir ve kalitatif olarak ölçülebilen en düşük DNA konsantrasyonudur. Duyarlılık kapiler elkeltroforez cihazı için analiz eşiğinin üzerinde olmak şartı ile tam profil elde edilen en düşük DNA konsantarsyonu ile ifade edilir (Şekil 14) (156). Duyarlılığın berlirlenmesinde yine negatif kontrol yürütme sonuçlarından yararlanılır. Yürütme sonucu elde edilen pik yüksekliklerin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanır. Elde edilen sandart sapmanın on katı alınır.

4.6.3.3 Dinamik Alan

Bu parametre ile genetik analizörün tespit edilebileceği en düşük ve en yüksek DNA miktarı belirlenir. Dinamik alan DNA analizleri için verilen güvenilir sonuçların ve raporlanabilen en küçük ve en yüksek konsantrasyonlarını ifade eder. Bu alanı belirlemek için en az üç farklı konsantrasyon iki kez çalışarak elde edilebilir. Her örneğin en yüksek konsantrasyon seviyesinden başlayarak seyrelterek hazırlanması ve 4 veya 5 farklı konsantrayon ile çalışma önerilir (159,156).

4.6.3.4 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, bir metodun aynı laboratuvarda, aynı cihazla, aynı yöntemle, aynı koşullarda, aynı analist tarafından, aynı bileşenlerle elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür (156).

4.6.3.5 Tekrar Üretilebilirlik (Tutarlılık)

Tekrar üretilebilirlik; farklı kişilerin farklı ölçüm cihazı kullanılarak farklı laboratuvarlarda yapılan analizlerin sonuçlarında farklılık olup olmadığının belirlenmesi için yapılmaktadır. Laboratuvarlar arası ve laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik olarak ikiye ayrılmıştır (160). Gerek laboratuvar içi gerek laboratuvarlar arası tekrar üretilebilirlik önemli bir parametredir. Özellikle olgu çalışmlarında laboratuvarlar arası veri alışverişi sağlanabilmesi için bir eşleşme olması beklenir. Bu da adli genetik laboratuvarların aynı standartta çalışmasına bağlıdır (155).

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu tezde, Walsh ve arkadaşları (2013) tarafından geliştirilen göz ve saç rengine ait bilgi veren HIrisPlex paneli, N29insA, rs11547464, rs885479rs, rs1805008, rs1805005, 1805006, rs1805007, rs1805009, Y152OCH, rs2228479 ve rs1110400 (MC1R geni üzerinde,11 SNP bölgesi), rs28777 (SLC45A2 (MATP)), rs16891982 (SLC45A2 (MATP)), rs12821256 (KITLG), rs4959270 (EXOC2), rs12203592 (IRF4), rs1042602 (TYR), rs1800407 (OCA2), rs2402130 (SLC24A4), rs12913832 (HERC2), rs2378249 (PIGU/ASIP), rs12896399 (SLC24A4), rs1393350 (TRY), rs683 (TYRP1) (24 pleks), minisekslama (SNaPshot) yöntemi kullanılarak. konsantrasyonu bilinen kontrol DNA örneklerinde ve gönüllülerin ağız içi sürüntüsünden elde edilen DNA örneklerinde çalışıldı. Kontrol DNA örneklerinde HIrisPlex panelinin optimizasyonu ve validasyonu yapıldı. Panelin validasyonunda analiz eşiği, hassasiyet, dinamik alan, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik parametreleri DNA Analiz Yöntemleri Bilimsel Çalışma Grubu (SWDGAM-Scientific Working Group on DNA Analysis Methods) yönergesi izlenerek çalışıldı (157). Çalışmamızda yeni nesil sekanslama [next generation sequencing (NGS) ve kapiller elektroforezden elde edilen genotip sonuçları karşılaştırıldı. Çalışmanın son aşamasında popülasyon çalışması yapıldı. Saç ve göz rengi tahmininde, multinominal lojistik regresyon modeli (MLR)(https://hirisplex.erasmusmc.nl/) kullanıldı. Çalışmanın bütün aşamaları İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Genetik Ar-Ge Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışmada uygulanan iş paketleri aşağıdaki gibidir:

- Örneklerin Toplanması
- Örneklerin DNA izolasyonu ve miktar tayinin yapılması
- HIrisPlex panelindeki 24 SNP lokusunun multipleks PCR'de çoğaltılması
- HIrisPlex panelindeki 24 SNP lokusunun SNaPshot yöntemiyle minisekanslanması
- PCR ürünlerinin ABI 310/3130'da yürütülmesi ve analiz edilmesi
- Yöntemin optimizasyonu ve validasyon parametrelerinin yapılması
- İstatistiksel analizler

5.1.Kullanılan Cihazlar

- Vorteks- Harmony Mixer Uzusio- VTX-3000L
- Mikrosantrifuj-BIOSAN Microspin 12
- Isıtıcı blok- BIOSAN Bio TDB-100
- Florimetre cihazı- Qubit (Fluorometre)
- Isı dongu cihazı (PCR)- SimpliAmp™ Thermal Cycler Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific
- Genetik analizator- ABI PRISM 310/3130 Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific

5.2 Kullanılan Kitler

- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
- The Quant-iT™dsDNA HS Assay Kit (İnvitrogen)
- Qiagen Taq PCR Master Mix Kit
- SNaPshot™ Multiplex Kit (Thermo Fisher Scientific)

5.3 Kullanılan Kimyasallar

- TE tampon (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA)
- Kontrol DNA'lar (9947A-Thermo Fisher Scientific, K562-Promega, Taqman-Thermo Fisher Scientific, XY5-Qiagen)
- Multipleks PCR ve tek baz uzama primerleri (Minisekans primerleri)
- Ekzonükleaz I (Exo I-Thermo Fisher Scientific)
- Shrimp alkalen fosfataz (SAP-Thermo Fisher Scientific)
- Genescan- 120 LIZ Size Standart (Applied Biosystems)
- Hi-Di Formamide (Applied Biosystems)
- POP-4, POP-7 polimer (Thermo Fisher Scientific)

5.4 Çalışmada Kullanılan Örnekler

Bu tez çalışmasında; aydınlatılmış onam formu alınan (Aydınlatılmış Onam Formu: EK 1), aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan rastgele seçilmiş Türkiye'nin tüm bölgelerini yansıtacak şekilde 149 gönüllünün ağız içi sürüntü örnekleri (bukkal sıvap- ağız içi mukozasından alınan hücre örneği) kullanıldı. Ayrıca, farklı popülasyonlarda (Afrika, Balkan, Orta Doğu) ait olan 18 gönüllünün örnekleri de çalışıldı. Gönüllülerin saç ve göz renklerine ait beyanları onam formlarına kaydedildi. Aynı zamanda Nikon D5100, 18-55 mm lens ile potre modunda fotoğrafları çekildi. Tutarlı örnekleme için fotoğraflar eşit ışık şiddetinde ve eşit uzaklıkta çekilerek fenotip doğrulaması yapıldı. Çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 08.06.2017 tarih, 217664 sayılı kararı ile uygun görüldü (Etik Kurul Kararı: Ek 2).

Bu çalışmanın optimizasyon aşamasında 9947A (10 ng/µl) (Thermo Fisher Scientific) kontrol DNA örneği kullanıldı. Çalışmamızda yeni nesil sekanslama ve kapiller elektroforezden elde edilen genotip sonuçların karşılaştırılması yapıldı. Ayrıca K562 (10 ng/µL) (Promega), Taqman (Thermo Fisher Scientific) ve XY5 (Qiagen) kodlu pozitif kontrol DNA'ları ve Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi- Genetik Departmanında bulunan Kidd Laboratuvarı'ndan elde edilen 2 DNA örneği (JK5060 ve JK1105) kullanıldı.

5.5 DNA İzolasyonu

1. Isıtıcı bloğu 56° C'ye ayarlandı.
2. Bukkal svabın pamuklu ucu 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 400 µl PBS eklenerek oda sıcaklığında (25° C) 10 dakika bekletildi.
3. Tüpün içinden bukkal svaplar alındı ve 20 µl Proteinaz K ve 400 µl Buffer AL eklendi. 15 saniye vorteks yapıldı.
4. Tüp ısıtıcı bloğa yerleştirilerek 56° C'de 10 dakika inkübe edildi.
5. Üzerine 400 µl Etanol (%96-100) eklendi ve 5 saniye vorteks yapıldı.
6. Mikrosantrifüj tüpündeki lizat QIAamp® mini spin kolonuna dikkatlice transfer edildi.
7. 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem tüpteki lizat bitene kadar tekrar edildi.

8. Filtratla dolan toplama tüpü, yeni toplama tüpüyle değiştirildi.

9. Kolona 500 µl Buffer AW1 (yıkama tamponu) eklendi. 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Altındaki toplama tüpünü atıldı. Yeni toplama tüpü eklendi.

10. Kolona 500 µl Buffer AW2 (yıkama tamponu) eklendi. 14.000 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Altındaki toplama tüpü atıldı. Yeni toplama tüpü eklendi.

11. QIAamp® mini spin kolonu, 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Üzerine 150 µl Buffer AE (elüsyon tamponu) eklendi.

12. 1 dakika oda ısısında (25° C) bekletildi.

13. Tüp 8.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Spin kolonu atıldı. İzolatlar parafilmle sarıldı.

14. DNA izolatların uzun süre saklanması için -20° C'ye kaldırıldı.

5.6 DNA Miktar Tayini

Elde edilen izolatların DNA miktarı Qubit™ dsDNA HS (High Sensitive) Assay Kiti (invitrogen) kullanılarak Qubit® fluorometer cihazı ile ölçüldü. Miktar ölçümü yapılan örnekler distile su 0.5-2ng/µl DNA konsantrasyonunda olacak biçimde sulandırıldı ve PCR'de kullanıldı. Floresans teknolojisine dayalı florometri cihaz ile DNA miktarları 260 nm dalga boyunda, aşağıdaki adımlar izlenerek ölçülmüştür.

1. Her bir örnek için 199 µl kit tamponu ve 1 µl kit reaktif (reagent) ile karışımı hazırlandı.

2. Cihazın kalibrasyonu için; her ölçümde Standart 1 ve Standart 2 kontrolleri kullanıldı. Bunun için tüpe 200 µl'lik tampon-reagent karışımından 190 µl kondu ve üzerine 10 µl standart eklendi.

3. Örnekler için, tüpe 200 µl'lik tampon-reagent karışımından 199 µl kondu ve üzerine 1 µl DNA izolatı eklendi. Tüpler birkaç saniye vortekslendi.

4. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.

5. Standart 1 ve Standart 2 sırasıyla okutularak kalibrasyon yapıldı.

6. Örnek tüpler cihaza yerleştirilerek okuma yapıldı.

7. DNA miktarları cihazda otomatik olarak hesaplandı.

8. DNA miktarı ölçülen örneklerin izolatlarından, PCR'de kullanılmak üzere 0,5-2 ng DNA miktarında seyreltilerek hazır hale getirildi.

5.7 PCR Öncesi Ön Hazırlıklar

5.7.1 Primerlerin Sulandırılması ve Konsantrasyonlarının Ayarlanması

Multipleks PCR ve minisekanslama (Tek Baz Uzama Reaksiyonu-SBE) reaksiyonlarında kullanılan primerlerin her biri 100 pmol/µl ve liyofilize (kurutulmuş) formda sentezletildi. Primerlerin sulandırma işlemi üretici firmanın protokolüne uygun olarak sulandırıldı. Uzun süre depolama sağlamak için distile su yerine TE (Tris-EDTA) tamponunun kullanımı tercih edildi. 100 µM'lık ana stok çözeltileri oluşturuldu. Hazırlanan ana stok -20° C'de saklandı.

5.7.1.1 Multipleks PCR Primerlerinin Konsantrasyonlarının Ayarlanması

100 µM'lık ana stok çözeltilerinden 50 µM'lık ara stok çözeltileri hazırlandı. Multipleks PCR yapabilmek için Tablo V'te belirtilen hacimlerde 50 reaksiyonluk primer karışımı hazırlandı. Kontaminasyonu önlemek amacıyla steril tüplere bölünerek -20° C'de saklandı.

5.7.1.2 SNaPshot (Minisekans) Primerlerin Konsantrasyonlarının Ayarlanması

Minisekans reaksiyonunda kullanılacak olan primler 100 µM'lık ana stok çözeltisinden ara stok hazırlandı. SNP bölgelerine göre farklılık gösteren 3 farklı konsantrasyonda 10 µM, 20 µM ve 50 µM'lık ara stok çözeltileri oluşturuldu. Tablo VI'da belirtilen hacimlerde 50 reaksiyon yapacak kadar primer karışımı hazırlandı. Kontaminasyonu önlemek amacıyla steril tüplere bölünerek -20° C'de saklandı

.

Tablo V. Multipleks PCR primerlerinin reaksiyondaki konsantrasyonu ve hacimleri

SNP	Primer	Set	Ara Stok (µM)	Forward Primer (µl)	Reverse Primer (µl)	Toplam Hacim (µl)	50 reaksiyon (µl)
N29insA	MC1Rset1F	**Set 1**	50	0,1	0,1	0,2	10
rs11547464	MC1Rset1R						
rs885479	MC1Rset2F	**Set 2**	50	0,1	0,1	0,2	10
rs1805008	MC1Rset2R						
rs1805005	MC1Rset3F	**Set 3**	50	0,1	0,1	0,2	10
rs1805006	MC1Rset3R						
rs1805007	MC1Rset4F						
rs1805009	MC1Rset4R	**Set 4**	50	0,08	0,08	0,16	8
Y152OCH	MC1Rset3						
RS2228479	MC1Rset2						
rs1110400	MC1Rset3						
rs28777	rs28777 - 5 F + R	**Set 5**	50	0,08	0,08	0,16	8
rs16891982	rs16891982-6F + R	**Set 6**	50	0,08	0,08	0,16	8
rs12821256	rs12821256-7F + R	**Set 7**	50	0,08	0,08	0,16	8
rs4959270	rs4959270 - 8 F + R	**Set 8**	50	0,08	0,08	0,16	8
rs12203592	rs12203592-9F + R	**Set 9**	50	0,08	0,08	0,16	8
rs1042602	rs1042602-10F + R	**Set 10**	50	0,08	0,08	0,16	8
rs1800407	rs1800407-11F + R	**Set 11**	50	0,08	0,08	0,16	8
rs2402130	rs2402130-12F + R	**Set 12**	50	0,08	0,08	0,16	8
rs12913832	rs12913832-13F+R	**Set 13**	50	0,08	0,08	0,16	8
rs2378249	rs2378249 -14 F + R	**Set 14**	50	0,08	0,08	0,16	8
rs12896399	rs12896399-15 F+R	**Set 15**	50	0,08	0,08	0,16	8
rs1393350	rs1393350 -16 F + R	**Set 16**	50	0,08	0,08	0,16	8
rs683	rs683 - 17 F + R	**Set 17**	50	0,08	0,08	0,16	8
Toplam						**2,84**	**142**

Tablo VI. SNapShot™ (SBE) primerlerinin reaksiyondaki konsantrasyonları ve hacimleri

SNP	SBE Primer Yönü	Ara Stok (µM)	Reaksiyon Konsant-rasyonu	10 (µM)'lık çözelti-1	20 (µM)'lık çözelti-2	50 (µM)'lık çözelti-3	50 reak-siyon (µl)
N29insA	1F	50	1,3			0,13	6,5
rs11547464	2F	50	0,1	0,05			2,5
rs885479	3R	50	1,25			0,125	6,25
rs1805008	4F	50	0,375			0,0375	1,875
rs1805005	5F	50	1			0,1	5
rs1805006	6F	50	0,8			0,08	4
rs1805007	7F	50	1,1			0,11	5,5
rs1805009	8F	50	0,12		0,03		1,5
Y152OCH	9F	50	0,5			0,05	2,5
RS2228479	10F	50	0,375			0,0375	1,875
rs1110400	11F	50	0,1			0,01	0,5
rs28777	12F	50	1,2			0,12	6
rs16891982	13F	50	0,9			0,09	4,5
rs12821256	14R	50	0,12		0,03		1,5
rs4959270	15F	50	0,3			0,03	1,5
rs12203592	16F	50	0,2			0,02	1
rs1042602	17R	50	1,25			0,125	6,25
rs1800407	18F	50	0,1			0,01	0,5
rs2402130	19F	50	0,75			0,075	3,75
rs12913832	20R	50	1			0,1	5
rs2378249	21R	50	0,1			0,01	0,5
rs12896399	22F	50	1			0,1	5
rs1393350	23R	50	1,1			0,11	5,5
rs683	24R	50	0,3			0,03	1,5
Toplam						**1,61**	**80,5**

5.8 Multipleks PCR Aşaması

Örneklere ait izolatlar -20˚C'den çıkarılarak DNA konsantrasyonları 0,5-2 ng olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra bir örnek için Tablo VII'da belirtilen miktarda PCR bileşenleri hazırlandı. PCR bileşenleri hazırlanırken buz tankında kalmasına özen gösterildi. Tüm bileşenler PCR tüpüne konulduktan sonra kısa vorteks yapıldı ve ardından santrifüjlendi. Tüplerde baloncuk olmamasına dikkat edildi. Tüpler PCR cihazına yerleştirildi ve Tablo VIII'de verilen koşullarda gerçekleştirildi. PCR sonrası ürünler kısa sure içinde kullanılacaksa +4˚C'de saklandı. Uzun süreli saklama için ise -20˚C'ye kaldırıldı.

Tablo VII. Multipleks PCR bileşenleri ve miktarı

PCR Bileşenleri	**Hacim/ Reaksiyon (µl)**
Qiagen Master Mix	4 µl
Primer Mix	2, 84 µl
DNA	3 µl
ddH_2O	0,16 µl
Toplam Hacim	10 µl

Tablo VIII. Multipleks PCR koşulları

Sıcaklık	**Zaman**	**Döngü Sayısı**
95ºC	10 dakika	1
95ºC **61ºC**	30 saniye 30 saniye	x 33
61ºC	5 dakika	1
4 ºC	∞	–

5.9 Multipleks PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürünlerinin içerisinde ikinci PCR'yi olumsuz etkileyebilecek ve istenmeyen piklerin oluşmasına neden olabilecek hedef bölge dışında bağlanmamış primerler ve dNTP'ler bulunmaktadır. Bunların parçalanarak uzaklaştırılması için iki farklı enzim kullanıldı. ExoI ve SAP enzimlerinden bir karışımı hazırlandı. Karışım hazırlanırken enzimlerin aktivasyonunu kaybetmemek

için buz tankı kullanıldı. ExoI ortamdaki bağlanmamış primerleri, SAP ise bağlanmamış dNTP'leri inaktif etmek için kullanıldı. Kullanılan miktarlar Tablo IX'da görülmektedir.

Tablo IX. Exo-Sap karışımının hazırlanması

Bileşenler	**Kullanılan miktar (µl)**
ExoI (1U/µl)	0.25
SAP (10U/µl)	0,75
I.PCR ürünü	2,5

ExoI ve SAP'ın aktif olduğu 37°C'de 90 dakika ve enzimlerin inaktivasyonu için 85°C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kısa sürede kullanılacak örnekler +4˚C'de saklanırken, daha sonra kullanılacak örnekler -20˚C'ye kaldırıldı.

5.10 Minisekanslama (Tek Baz Uzama Reaksiyonu -SNaPshot™)

Minisekanslama aşamasında saflaştırılan PCR ürünleri ve tek baz uzama primeleri kullanılarak 24 lokusun PCR'si tek tüpte, ABI PRISM SNaPshot™ Multiplex Kit (Thermo Fisher) tek baz uzama reaksiyonu yöntemi ile gerçekleştirildi. Kit, floresans boya ile işaretli ddNTP, tampon ve polimeraz içermektedir. SNaPshot reaksiyonu için gerekli olan bileşenler ve reaksiyon başına gereken hacimler Tablo X'da gösterilmektedir. Hazırlanan örnekler, SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher) cihazına yerleştirildi. Tablo XI'de görülen PCR koşullarında gerçekleştirildi.

Tablo X. Minisekans reaksiyon karışımı

SNaPshot Reaksiyon Bileşenleri	**Örnek V/R (µl)**	**Pozitif Kontrol V/R (µl)**	**Negatif Kontrol V/R (µl)**
SNaPshot reaksiyon karışımı	1	2,5	2,5
Uzama primer karışımı	1.61	0,5	0,5
Saflaştırılmış PCR ürünü/ Kontrol DNA	2	1	-
ddH2O	0.39	1	2
Toplam	**5 µl**	**5 µl**	**5 µl**

Tablo XI. Minisekanslama reaksiyon koşulları

Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
96ºC	2 dakika	1
96ºC **50ºC** **60ºC**	10 saniye 5 saniye 30 saniye	25
4ºC	∞	–

5.11 Minisekanslama Ürünlerinin Saflaştırılması

Tek baz uzama sonrası, bağlanmayan floresan işaretli ddNTP (dideoksi ribonükleozid trifosfat)' lerinin inaktivasyonunu sağlamak amacıyla SNaPshot ürünlerinin üzerine 1 µl SAP (1u/µl) eklendi ve bileşenlerin tam olarak karışmasını sağlamak için vortekslendi ve kısa santrifüj yapıldı. Karışım 37˚C'de 80 dakika, 85˚C'de 15 dakika inkübe edildi. Hemen kullanılacak örnekler elektroforez öncesinde 24 saate kadar 4 ˚C'de bekletildi. 24 saatten fazla saklanacaklar ise saklama kapları folyo ile sarılarak -20˚C'ye kaldırıldı.

5.12 Minisekans Ürünlerinin ABI 310/3130 ile Elektroforezi

Saflaştırılmış minisekanslama ürünlerinin elektroforetik analizi, ABI PRISM® 310/3130 Genetik Analizör (Thermo Fisher) kapiller elektroforez cihazlarında yapıldı. Cihazın parametreleri Tablo XII'de belirtilen koşullara ayarlandı. Elekroforezde POP 4 Polimer ve GeneScan-120 Liz internal size standart kullanıldı. Her bir örnek için 10 µl Hi-Di formamid içine 0.3 Genescane -120 LIZ Size Standard eklendi ve kısa vorteks yapıldı. ABI 310/3130 için her bir tüpe/plate kuyucuğuna 9,5 µl karışım konuldu ve üzerine SAP ile 1 µl saflaştırılmış minisekanslama PCR ürünü eklendi.

Tablo XII. Elektroforez koşulları

Parametre	**GS POP-4 (1ml) E5 modül**
Matriks	DS-02
İnjeksiyon zamanı	5 saniye
Elektroforez voltajı	15 Kv
Yürütme zamanı	24 dakika
Yürütme sıcaklığı	60˚C
Şırınga pompalama süresi	150 saniye

5.13 Minisekanslama Ürün Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Örneklerin görüntülenmesi, tiplenmesi ve sonuçların değerlendirilmesi Genemapper® Analiz v.3.7, GeneMapper® v.4.0 ve Peak Scanner Software 2.0 analiz programları kullanılarak yapıldı. Programa öncelikle Liz -120 internal size standart aralıkları tanıtıldı. Daha sonra default değerlerinde gerekli ayarlamalar yapılarak örneklerin analizi yapıldı.

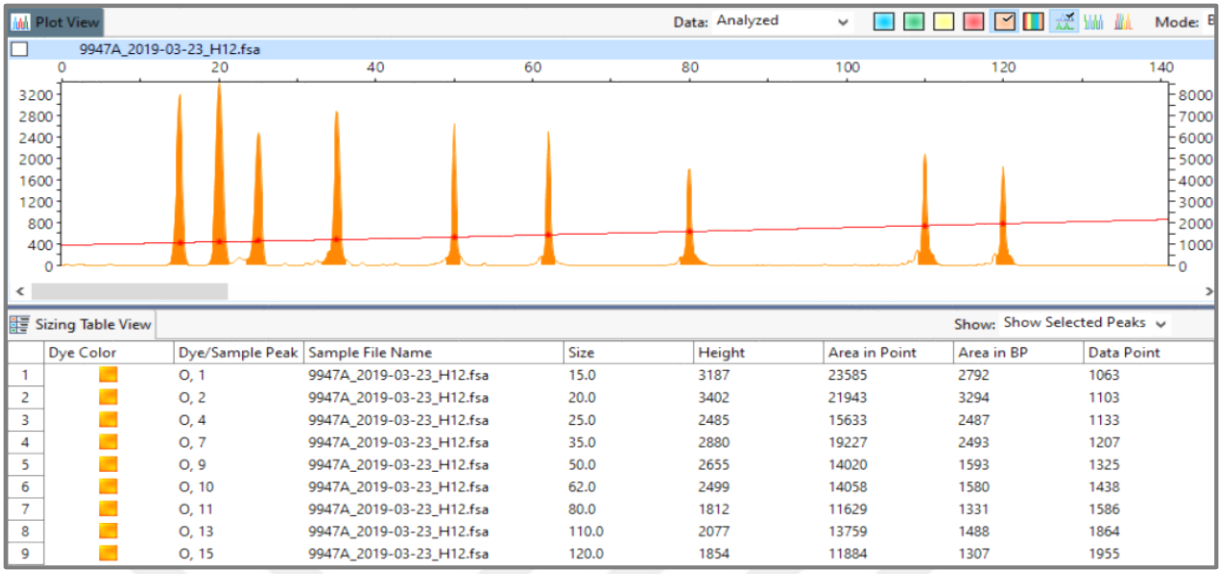
5.14 Verilerin Analizi ve Sonuçların Değerlendirilmesi

5.14.1 Genotipleme

SNP lokuslarını tespit etmek ve yürütme şartlarını kontrol etmek amacıyla GeneScan™ 120 LIZ™ (Thermo Fisher) size standart kullanıldı. Genescan-120 LIZ Size Standard 15-120 nükleotid aralığında 9 adet (15, 20, 25, 35, 50, 62, 80, 110 ve 120) tek zincirli boyalı (LIZ^{TM}) fragmanlardan tasarlanmıştır. Şekil 15'de Genescan-120 LIZ Size Standarda ait elektroforegram gösterilmektedir. Her örnekte size standart kontrol edilerek genotipleme yapıldı.

SNP noktalarının belirlenmesi SNaPshot^{TM} Multipleks kitinin kullanıldığı minisekanslama (tek baz uzama) reaksiyonuyla belirlendi. Bu reaksiyonda, işaretsiz primer 3′ ucu ile SNP bölgesine bağlanır ve DNA polimeraz ile floresan işaretli ddNTP'ler kullanılarak uzama sağlanır. Fakat ddNTP'ler deoksiriboz şekerin 3. karbon atomunda hidroksil (OH) taşımamaları nedeniyle kendisinden sonra yeni bir nükleotid ilave edemez ve sentez sona ererek tek bir baz uzaması gerçekleşir. Kitte bulunan ddNTP'lerin her biri farklı floresan boya ile işaretlenmiştir (Tablo XIII).

Boyalı ddNTP'lerle floresans deteksiyonu sağlanarak elektroforetik yöntemle 24 SNP lokusun alelleri belirlendi.



Sizing Table View — Show: Show Selected Peaks

	Dye Color	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Size	Height	Area in Point	Area in BP	Data Point
1		O, 1	9947A_2019-03-23_H12.fsa	15.0	3187	23585	2792	1063
2		O, 2	9947A_2019-03-23_H12.fsa	20.0	3402	21943	3294	1103
3		O, 4	9947A_2019-03-23_H12.fsa	25.0	2485	15633	2487	1133
4		O, 7	9947A_2019-03-23_H12.fsa	35.0	2880	19227	2493	1207
5		O, 9	9947A_2019-03-23_H12.fsa	50.0	2655	14020	1593	1325
6		O, 10	9947A_2019-03-23_H12.fsa	62.0	2499	14058	1580	1438
7		O, 11	9947A_2019-03-23_H12.fsa	80.0	1812	11629	1331	1586
8		O, 13	9947A_2019-03-23_H12.fsa	110.0	2077	13759	1488	1864
9		O, 15	9947A_2019-03-23_H12.fsa	120.0	1854	11884	1307	1955

Şekil 15. GeneScan-120 Liz internal size standart uzunlukları

SNP analiz sonuçlarını değerlendirirken gözlenen ürün uzunlukları beklenen ürün uzunluklarından farklı olabilir. Yürütme koşullarında herhangi bir değişiklik, örneğin kapillerin uzunluğu ya da kullanılan polimerin tipi DNA parçacıklarının hareketliliğini etkiler. Özellikle 50 baz çiftinden küçük olan diziler için bu farklılık daha belirgin düzeyde olmaktadır. Bu nedenle tek baz uzama primerleri 25 bazdan küçük tasarlanmamalıdır. 30 baz'ın altındaki primerlerin ürünleri 6-8 baz, 30'un üstündeki primerlerin ürünleri 4-6 baz daha uzun görünebilmektedir.

Tablo XIII. Floresan işaretli ddNTP'lerin boyaları

ddNTP	Boya Adı	Veri analizinde saptanan renk
A	dR6G	Yeşil
C	dTAMARA™	Siyah
G	dR110	Mavi
T	dROX™	Kırmızı

5.14.2 Yöntemin Validasyon Parametrelerinin Yapılması

Panelin validasyonunda analiz eşiği, hassasiyet, dinamik alan, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik parametreleri DNA Analiz Yöntemleri Bilimsel Çalışma Grubu (SWDGAM-Scientific Working Group on DNA Analysis Methods) yönergesi izlenerek çalışıldı (157)

5.14.2.1 Analiz Eşiği

Analiz eşiğinin belirlenmesi için 10 negatif kontrol örneği yürütüldü. Negatif kontrol örneklerinde gözlenen en yüksek piklerin RFU değerlerinin ortalaması ve standart sapması hesaplandı.

Analiz Eşiği = 3X NPYOS

NPYOS: Negatif örnekteki pik yüksekliklerinin ortalamalarının standart sapması

5.14.2.2 Dinamik Alan

Dinamik alan için DNA miktarı bilinen kontrol DNA'sından (9947A) 5 adet farklı dilüsyon örnekleri (0,063 ng/µl, 0,125 ng/µl, 0,25ng/µl, 0,5 ng/µl, 1,5 ng/µl) hazırlanmıştır. PCR örnekleri ABI PRISM 310 Genetik analizör cihazında yürütülerek her bir konsantrasyon için elde edilen pik yüksekliklerin ortalamaları alınmıştır. Tam profil elde edilen en düşük DNA konsantrasyonu belirlenmiştir.

5.14.2.3 Hassasiyet (Limit of Quantition-LOQ)

Dinamik alan çalışmasında kullanılan PCR ürünlerinden tam profil elde edilen en düşük DNA konsantrasyonu belirlenmiştir. Elde edilen alellerin pik yüksekliklerinin ortalaması alınarak konsantrasyona bağlı duyarlılık değeri belirlenmiştir.

5.14.2.4 Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

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

5.14.3 İstatistiksel Analiz

24 SNP lokusunun beklenen alel uzunluklarıyla elektroforegramdaki alel pik uzunlukları karşılaştırılarak SNP alellerinin görünen uzunlukları (size) belirlendi. Belirlenen SNP alellerinin uzunluklarının ortalamaları ve standart sapmaları Microsoft Excel 2010 programı ile hesaplandı.

Göz ve saç rengi tahmini, Walsh ve ark. tarafından geliştirilen, multinominal lojistik regresyon model istatistiğine dayalı online yazılım (https://hirisplex.erasmusmc.nl/) kullanılarak yapıldı. 24 SNP genotipi için minör alel sayısı (0, 1 veya 2) olarak programa giriş yapıldı. Göz rengi için 0,7 eşiğinden daha yüksek olasılık kabul eşiği olarak değerlendirildi. Saç rengi için Walsh ve ark.nın belirlemiş olduğu 0,5 olasılık eşiğine göre sınıflandırma yapıldı. Analiz eşiğinin altında kalanlar 'belirsiz' olarak tespit edildi.

ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrilerinin analizi ve ilişkili AUC (Area Under the Curve) değerlerinin hesaplanması Pyton programı kullanarak belirlendi. Duyarlılık (Sensitivity), hassasiyet (Specificity), poiztif tahmin değeri (PPV), negatif tahmin değeri (NPV) modeli Liu ve ark.nın yapmış oldukları analiz yöntemine göre hesaplandı (10).



Şekil 16. Örnek analiz sayfası (https://hirisplex.erasmusmc.nl/) internet sayfasından alınmıştır erişim tarihi 01.05.2021

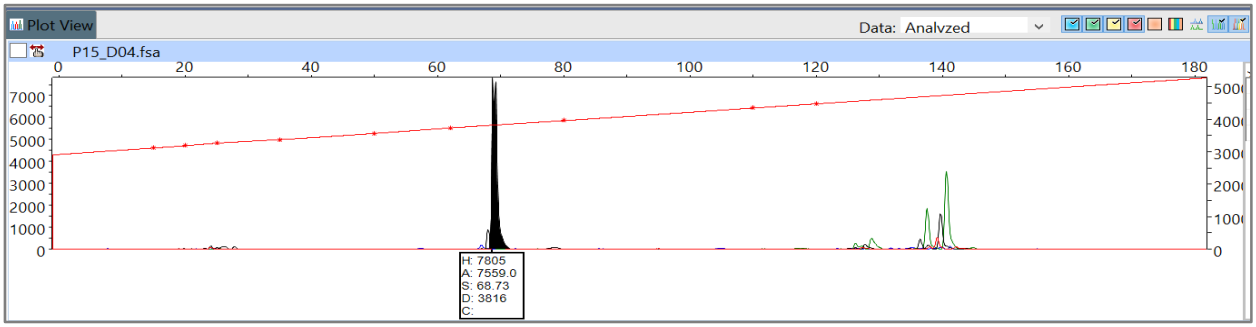
6. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, Walsh ve arkadaşları tarafından geliştirilen saç ve göz rengine ait bilgi veren HIrisplex (23 SNP, 1 InDel) panelinin optimizasyonu, validasyonu ve Türkiye'deki populasyon çalışılması yapıldı. Panel, ticari (9947A, K562, Taqman, XY5) ve ticari olmayan (JK5060, JK1105) konsantrasyonu bilinen kontrol DNA örnekleri, kullanılarak optimize edildi. Validasyon çalışmasında analiz eşiği, hassasiyet, dinamik alan, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirdik parametreleri çalışıldı. Popülasyon çalışması için aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı olan 149 gönüllünün örnekleri ve farklı popülasyonlardan (Afrika, Balkan, Orta Doğu) 18 gönüllünün örnekleri çalışıldı. Popülasyon çalışmasından elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi multinominal lojistik regresyon (MLR) analizi yapılarak saç ve göz rengi tahmin edildi.

Aşağıda sırasıyla uygulanan yönteme ait optimizasyon, validasyon çalışmaları verilmiştir. Son olarak popülasyon çalışmasından elde edilen fenotip bilgilerinin istatistiksel bulguları sunulmaktadır.

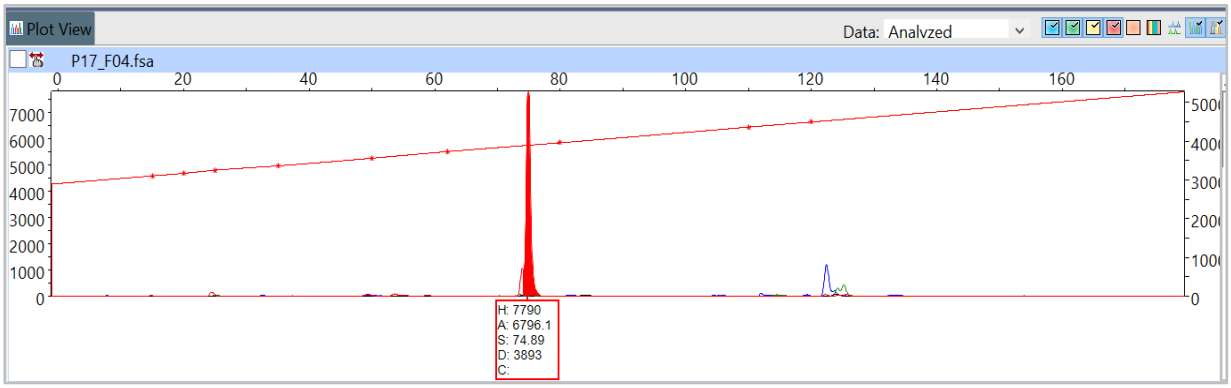
6.1 HIrisPlex Panelinin Optimizasyon Çalışması

Çalışmanın ilk aşamasında HIrisPlex panelindeki 24 lokusun elektrroforegramdaki uzunluklarını saptamak için SNaPshot™ SNaPshot yöntemiyle singelpleks (tek lokuslu) çalışması yapıldı. Yürütmeler ABI 310 cihazında POP4 kullanılarak yapıldı. Lokusların büyüklükleri 9947A kontrol DNA'sı kullanılarak belirlendi. Her bir lokus için gözlenen uzunluklar daha



Şekil 17. P15 (rs4959270) lokusuna ait singelpleks çalışması

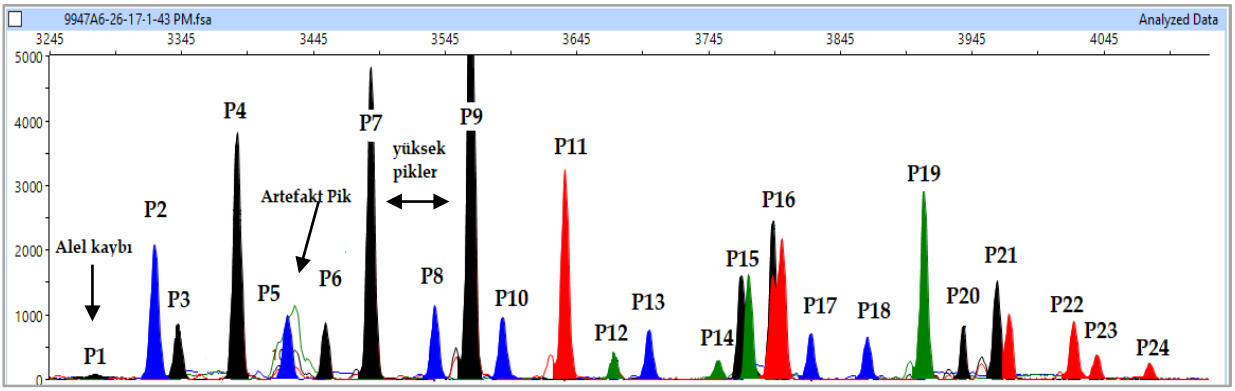
sonra yapılan multipleks çalışmalarında referans olarak kullanıldı. Singelpleks çalışmasına ait örnek elektroforegramlar Şekil 17 ve 18'de gösterilmektedir.



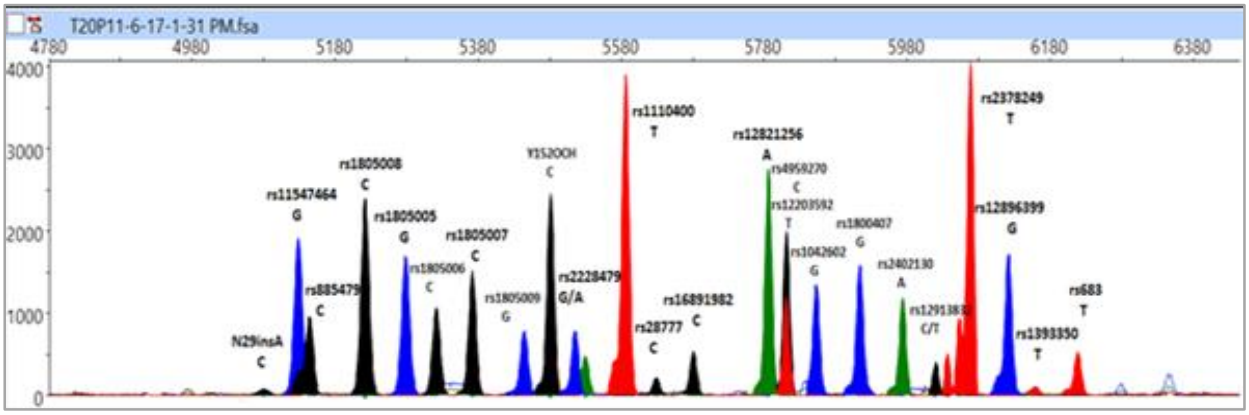
Şekil 18. P17 (rs12203592) lokusuna ait singlepleks çalışması

Lokusların elektroforegramdaki yerleri belirlendikten sonra multipleks çalışılarak tüm lokuslar tek bir reaksiyonda çoğaltıldı. ABI 310 cihazında çalışılan tüm lokusların gözlenen alel uzunluklarının ortalamaları ve standart sapmaları Tablo XIV'de görülmektedir.

Çalışmada, HIrisPlex panelinin multipleks PCR çalışmasında Walsh ve ark. tarafından önerilen primer miktarları kullanıldı. P5 lokusunun adenin bölgesinde (yeşil alan) artefakt pik görüldü. Bu artefakt piklere her yürütmede karşılaşılmıştır. Ancak beklenen piklerin dışında kaldığı için göz ardı edilmiştir. Artekaft pik şekil 19'da gösterilmiştir.

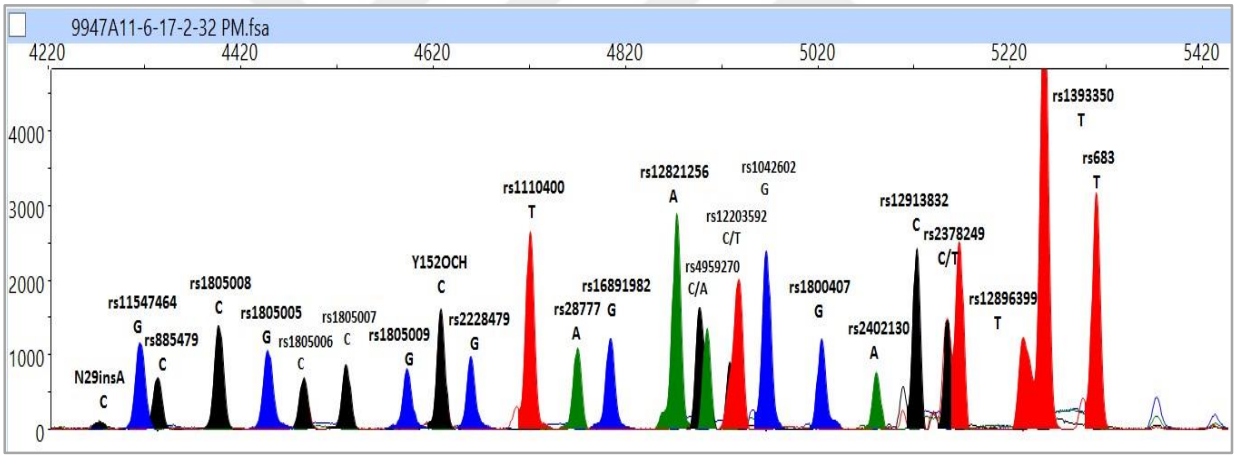


Şekil 19. İlk primer konsantrasyonundan elde edilen elektroforegram



Şekil 20. 24 SNP lokusunun görüldüğü örnek elektroforegram

SNaPshot reaksiyonundan elde edilen elektroforegramda bazı piklerin çok yüksek bazılarının ise analiz eşiğinin altında kaldığı veya hiç görülmediği belirlendi. Yapılan optimizasyon çalışmalarında bazı lokusların primer miktarları değiştirilerek pikler dengelendi. 9947A kodlu pozitif kontrol ile çalışılan HIrisPlex'e ait örnek bir elektroforegram görüntüsü Şekil 21'de verilmiştir.



Şekil 21. HIrisPlex panelinin 9947A kontrol örneğine ait dengelenmiş elektroforegram görüntüsü

Tablo XIV. 9947A kontrol DNA'sına ait HIrisPlex panelinin ABI 310 cihazında gözlenen SNP uzunluklarının ortalamaları ve standart sapmaları.

SNP Kod-ları	SBE primer uzun-luğu	Görülen Polimor-fizm	Görülen Renk	Görülen Renk	Ortalama (T)	Standart Sapma (T)	Ortalama (C)	Standart Sapma (C)	Ortalama (A)	Standart Sapma (A)	Ortalama (G)	Standart Sapma (G)
P1	**23**	**C-insA**					28,860	0,580				
P2	**28**	**G-A**									31,61	0,621
P3	**34**	**C-T**					33,770	0,564				
P4	**33**	**C-T**					38,520	0,298				
P5	**35**	**G-T**									40,982	0,563
P6	**38**	**C-A**					44,694	0,304				
P7	**44**	**C-T**					47,452	0,266				
P8	**48**	**G-C**									51,884	0,409
P9	**51**	**C-A**					53,738	0,301				
P10	**54**	**G-A**									56,662	0,427
P11	**56**	**T-C**			58,912	0,325						
P12	**58**	**A-C**							61,552	0,195		
P13	**62**	**G-C**									64,904	0,551
P14	**66**	**A-G**							69,614	0,349		
P15	**68**	**C-A**					71,880	0,383	72,562	0,378		
P16	**69**	**C-T**			74,452	74,745	73,858	0,206				
P17	**73**	**G-T**									75,876	0,382
P18	**77**	**G-A**									79,936	0,236
P19	**80**	**A-G**							83,890	0,309		
P20	**83**	**C-T**					86,730	0,370				
P21	**86**	**T-C**			89,562	0,204	88,742	0,170				
P22	**88**	**T-G**					93,606	0,287				
P23	**92**	**C-T**					95,706	0,205				
P24	**95**	**T-G**					99,450	0,323				

6.2 HIrisPlex Panelinin Validasyon Çalışması

HIrisplex panelinin validasyon çalışmasında analiz eşiği, dinamik alan, hassasiyet, tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik parametreleri uygulanmıştır.

6.2.1 Analiz Eşiği (Limit of Detection - LOD)

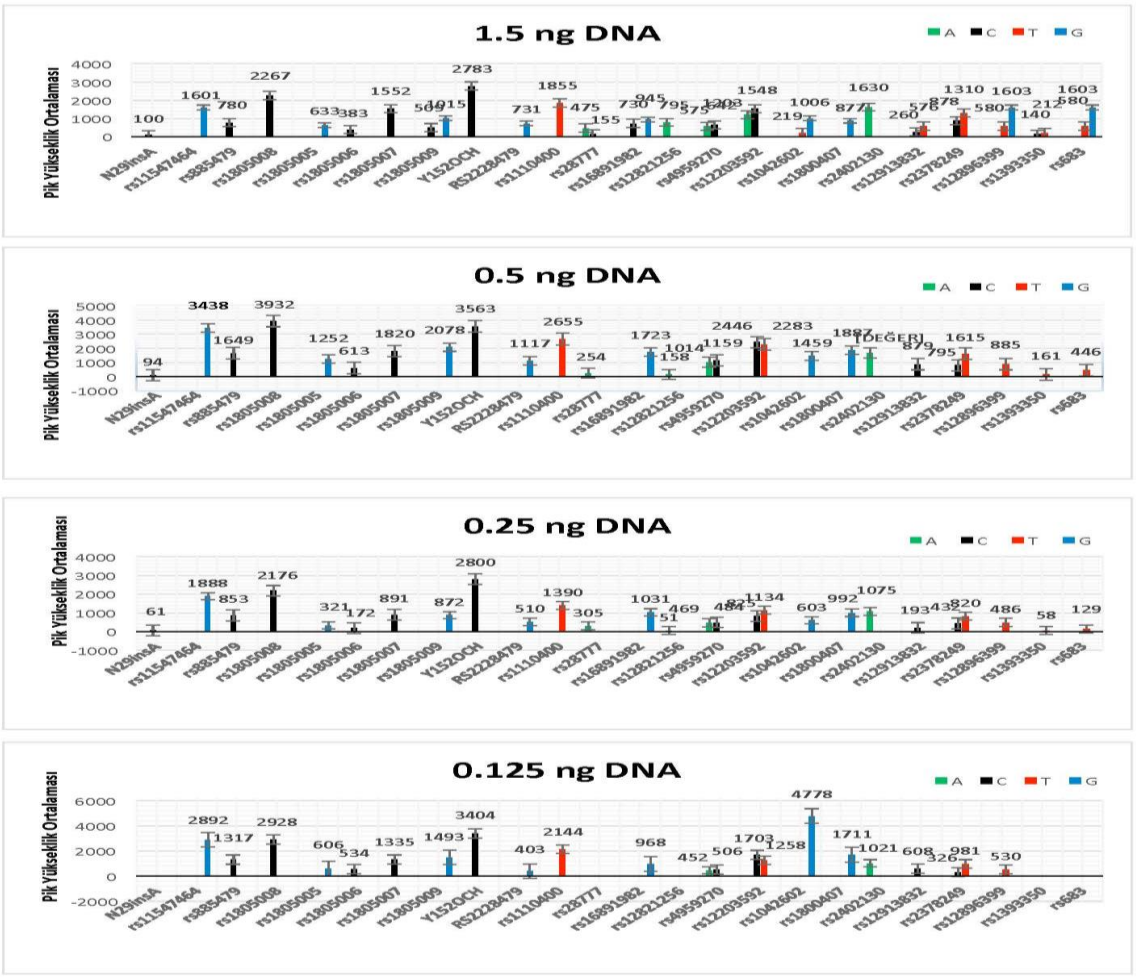
Analiz eşiğini belirlemek için çalışılan 10 negatif kontrol örneğinde elde edilen pik yüksekliklerin ortalamaları ve sandart sapmaları tablo gösterilmiştir. Analiz eşği 110 RFU olarak saptandı. Bu RFU üzerindeki pikler gerçek alel olarak değerlendirildi.

Tablo XV.HIrisplex panelinin ABI 310 genetik analizör cihazındaki analiz eşiği değeri

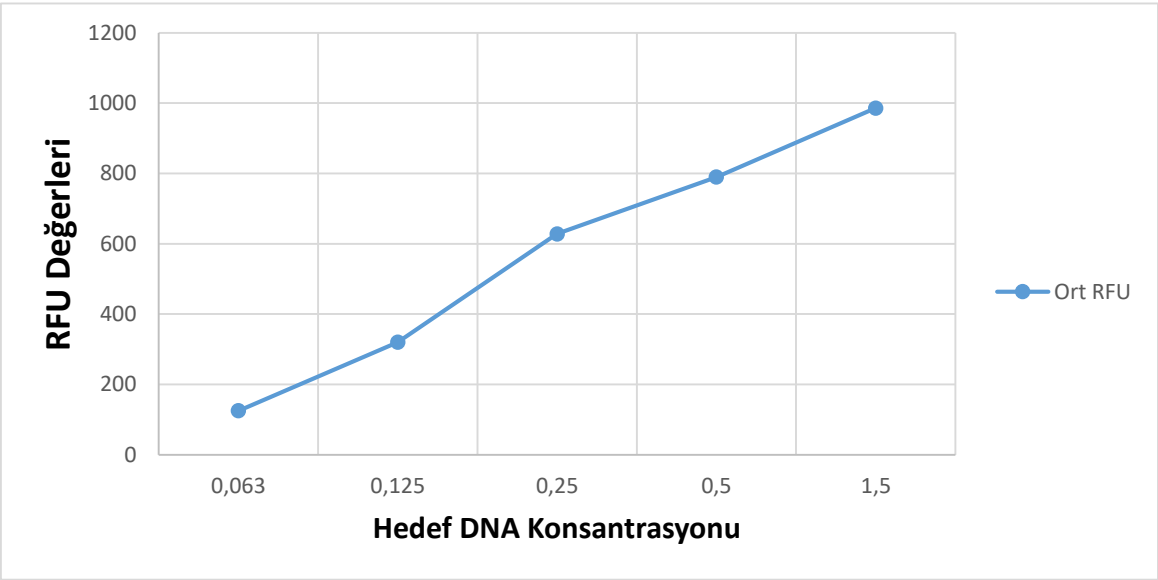
Negatif Kontrollerinden Elde edilen Pik Yükseklikleri (RFU)	Pik Yüksekliklerin Ortalaması	Elde Edilen Pik Yüksekliklerin Standart Sapması	Analiz Eşiği (LOD) (RFU)
168	127,5	36,64	**110**
98			
95			
149			

6.2.2 Dinamik Alan

Şekil 22'de her bir konsantrasyon için elde edilen piklerin ortalama değerleri verilmiştir. Değerlendirilebilir ve tam profilin piklerin elde edildiği DNA miktarı 0,25-1,5 ng arasında olduğu belirlendi. Alel kayıpları 0,125 ng ve altındaki konsantrasyonunda gözlendi. İlk alel kayıpları N29insA (P1), rs28777 (P12), rs1221256 (P14), rs1393350 (P23), rs683 (P24) lokuslarında görüldü ve 0,063 ng/µl'de artarak devam etmiştir. Şekil 23'te Hedef DNA konsantrasyonuna bağlı ortalama RFU değerleri gösterilmiştir.



Şekil 22. Çeşitli miktarlarda (1,5 ng, 0,5 ng, 0,25 ng, 0,125 ng) DNA ile yapılan HIrisplex paneli çalışmasında her bir alele ait pik yüksekliklerinin (RFU) ortalaması.



Şekil 23. Pik yükseklikleri değerlerine bağlı DNA konsantrasyon grafiği

6.2.3 Hassasiyet (LOQ- Limit of Quantitation)

Dinamik alan çalışmasında kullanılan ve tam profil elde edilen en düşük iki konsantrasyon grubunda yer alan 5‘er adet örneğe ait pik yükseklik verileri kullanıldı. Bunun için tespit edilen her bir alelin pik yüksekliklerinin ortalaması ve standart sapması hesaplandı elde edilen değerlerin de ortalaması alındı ve sonuçlar analiz eşiğiyle karşılaştırıldı. Duyarlılık sonucunu ise 0,25 ng/ µl olarak tespit edildi. Sonuçlar tam ve güvenilir DNA profilinin 0,25 ng/µl konsantrasyon ile elde edildiğini göstermektedir.

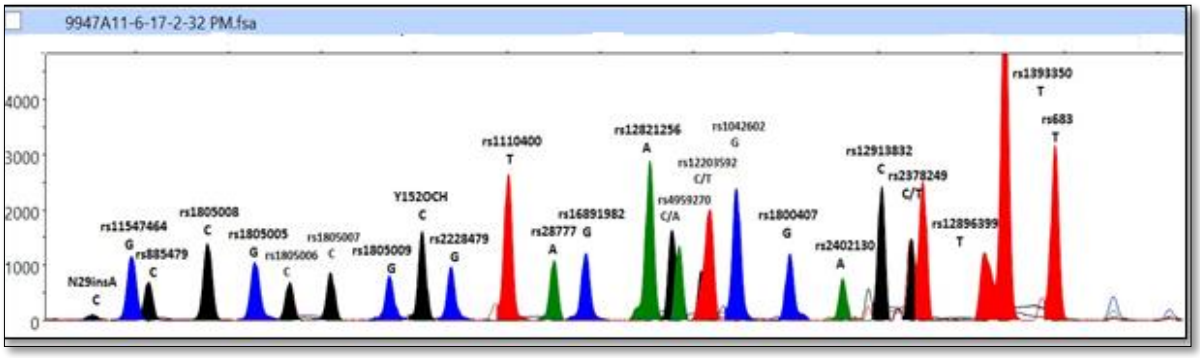
Tablo XVI. HIrisplex panelinin duyarlılık sonucu

DNA Konsantrasyonu	**Hassasiyet Değeri (LOQ) (RFU)**	**Analiz Eşiği Değeri (LOD) (RFU)**	**LOQ**
0,25 ng/ µl	253,42	110	**0,25 ng/ µl**
0,5 ng/ µl	**199,20**		

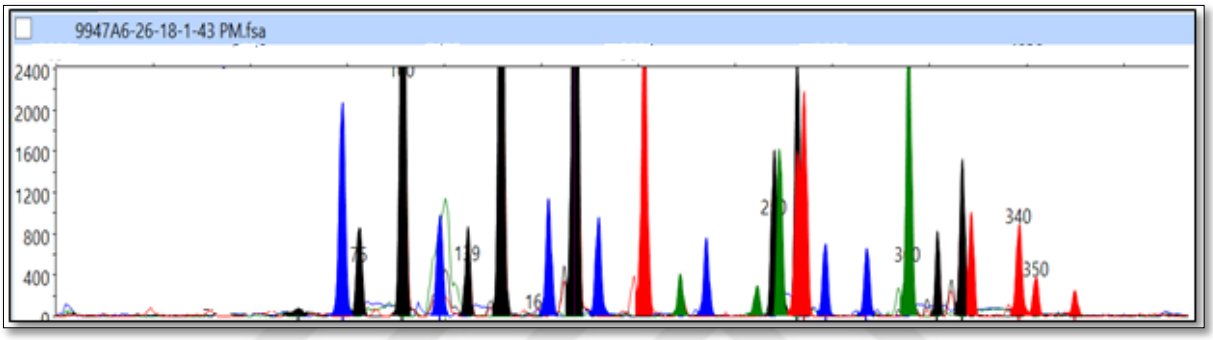
6.2.4 Tekralanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

Tekrarlanabilirlik için; 5 örnek aynı laboratuvarlarda, aynı cihazda farklı zaman dilimlerinde farklı analistler tarafından çalışıldı. Her iki çalışmanın sonucunda aynı genotipler elde edilmiştir (Şekil 24,25).

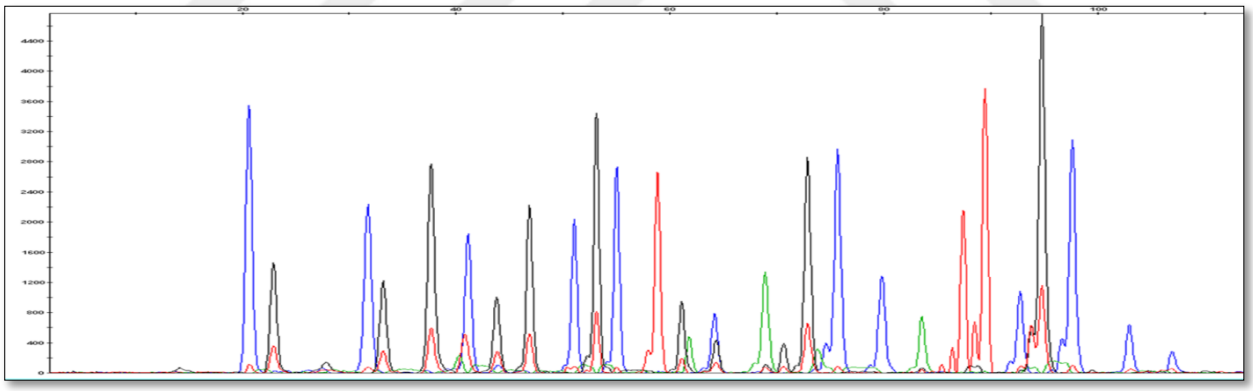
Tekrar üretilebilirlik çalışmasında analizi yapılmış ve genotipleri belirlenmiş olan 5 örnek, farklı laboratuvarda ve farklı cihazlarda, farklı zaman dilimlerinde farklı analistler tarafından çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda da aynı genotipler elde edilmiştir (Şekil 26,27). Aynı zamanda ABI 310 genetik analizör cihazında gönüllülere ait yürütülen örneklerin uzunluk ortalamaları ile ABI 3130 genetik analizör cihazında gözlenen uzunluk ortalamaları ile karşılaştırıldı Gözlenen ortalama en düşük uzunluk 0,009 (R6G, uzunluk: 68) ile ortalama en yüksek uzunluk 4,1 (dTAMRA™, uzunluk:34, Thermo Fisher Scientific, ABD) olarak belirlendi. İki cihaz arasında gözlenen ortalama uzunluk farkı ise 1,34 olarak hesaplandı.



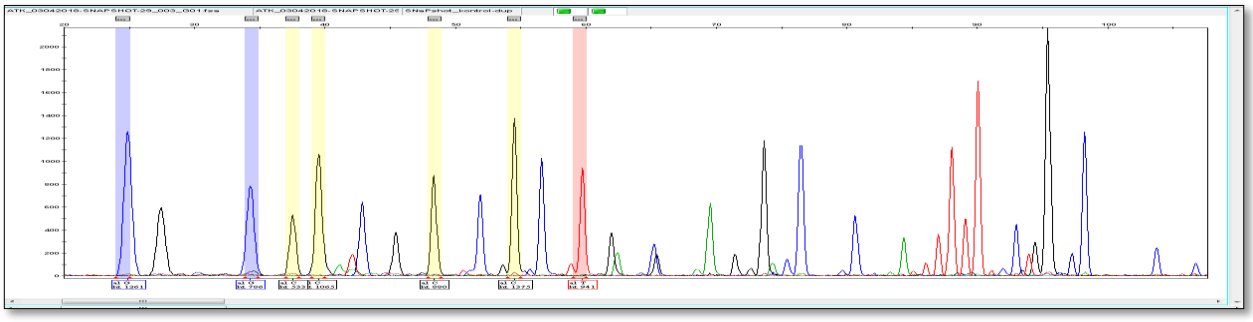
Şekil 24. 1. Analistin çalışmasına ait elektroforegram sonucu



Şekil 25. 2. Analistin çalışmasına ait elektroforegram sonucu



Şekil 26. 1. Analistin ABI 310 genetik analizöre ait yürütme sonucu



Şekil 27. 2. Analistin ABI 3130'a genetik analizöre ait yürütme sonuçları

6.3 HIrisPlex Panelinin Türkiye Populasyona ait örneklerin Analizleri

6.3.1 Göz Rengi Tahmin Değerleri

Göz rengi tahmini değerlendirilirken eşik değer p >0,7 olarak alınmıştır. Türkiye populasyonunda HIrisPlex panelinin göz rengi tahmin başarısı mavi göz rengi için %100, kahverengi göz rengi %95,60. Yeşil gözlü bireylerin göz rengi, yanlış negatif olarak %52,63 kahverengi ve %26,31'i mavi gözlü olarak tahmin edilmiştir. Ayrıca %21'i eşik değerinin altında 'belirsiz' olarak saptanmıştır. Göz rengi kategorilerine göre panelin tamin başarısı Tablo XVII'da gösterilmiştir. Göz rengi tahmin sonuçlarına göre hesaplanan hassasiyet, özgüllük, PPV, NPV ve AUC değerleri Tablo XVIII'de gösterilmektedir. Sırasıyla mavi, yeşil, kahverengi göz renklerine ait ROC ve AUC eğrileri Şekil 28, 29, 30 'da gösterilmiştir. Yeşil gözlü bireylere ait gözlenen fenotipler Şekil 30'da verilmiştir.

Tablo XVII. 149 gönüllünün göz rengi tahmin başarısı

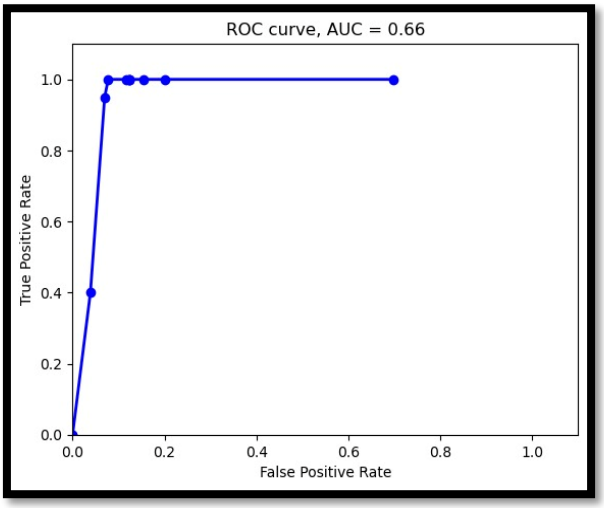
% tahmin edilen (koyu ile işaretli sayılar tahmin başarısını göstermektedir)					
HIrisPlex (Göz rengi)	Mavi	Kahverengi	Yeşil	Belirsiz	Toplam Örnek Sayısı
Mavi	**100**	0	BZ	0	20
Kahverengi	0	**95.60**	BZ	4.39	91
Yeşil	26.31	52.63	**BZ***	21.05	38

BZ: Belirsiz

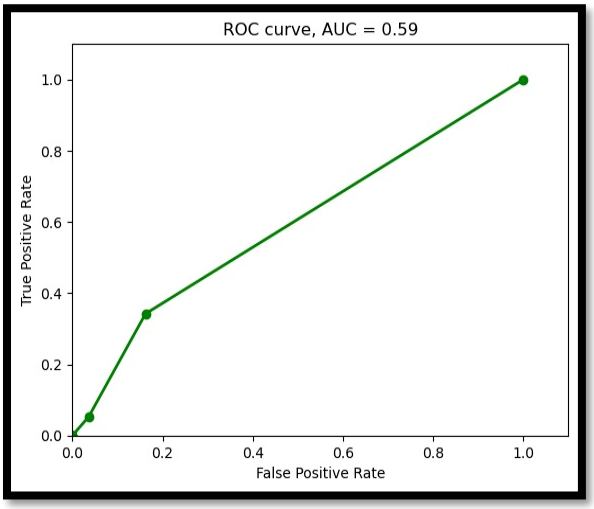
Tablo XVIII. HIrisplex panelinin Türkiye popülasyonundaki göz rengi tahmini için hesaplanan hassasiyet, özgüllük, PPV, NPV ve AUC değerleri.

Göz renkleri	Özet İstatistik				
	AUC[a]	Hassasiyet%	Özgüllük%	PPV%[b]	NPV%[c]
Mavi	0,66	100	92,24	66,66	100
Yeşil	0,59	0	100	ND	74,49
Kahverengi	0,88	95,60	65,51	81,30	90,47

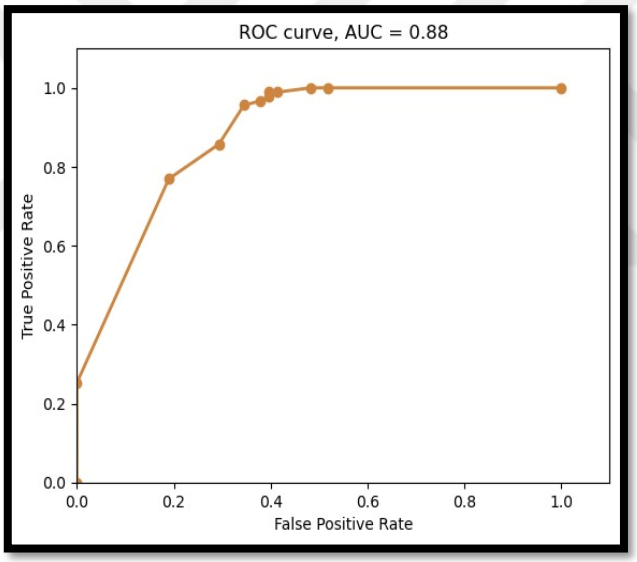
a Area under the curve- Eğrinin altında kalan alan
b Positive predictive value- Pozitif tahmin değeri
c Negative predictive value- Negatif tahmin değeri



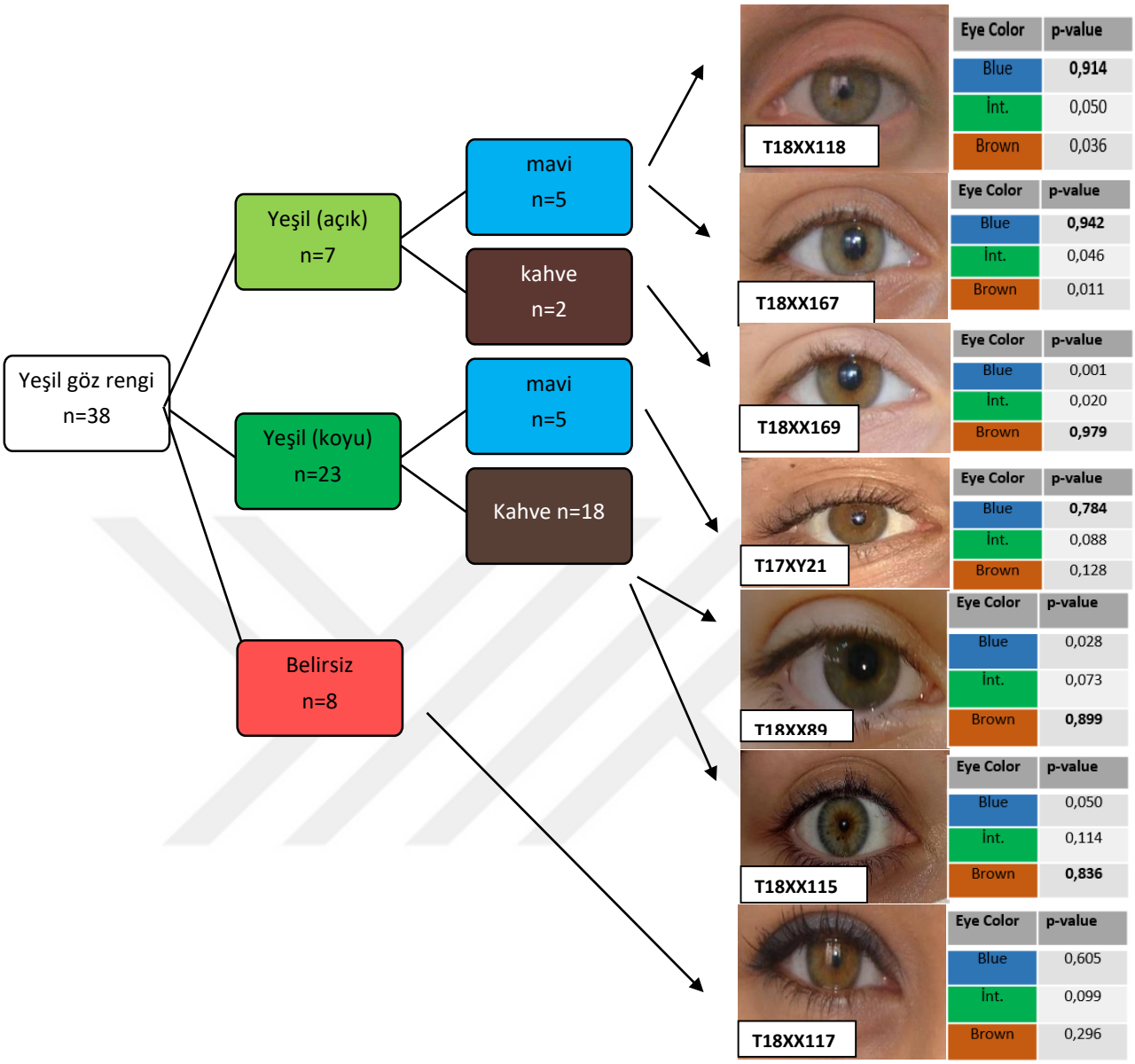
Şekil 28. Mavi göz tahminine ait ROC ve AUC eğrisi



Şekil 29. Yeşil göz tahminine ait ROC ve AUC eğrisi



Şekil 30. Kahvernegi göz tahminine ait ROC ve AUC eğrisi



Şekil 31. Yeşil gözlü bireylerin gözlenen fenotipleri

Tablo XIX. Türkiye populasyonunun HIrisplex paneline ait göz rengi p değerleri sonuçları

Örnek Kodu	Göz Rengi			
	Tahmin Edilen Göz Rengi			Beklenen Göz Rengi
	Pmavi	Pyeşil	Pkahve	
TR-XY-8	0,000	0,014	0,986	Kahve
TR-XX-20	0,004	0,025	0,971	Kahve
TR-XX-30	0,012	0,050	0,938	Kahve
TR-XX-33	0,000	0,006	0,994	Kahve
TR-XY-70	0,050	0,114	0,836	Yeşil
T12-XY-1	0,848	0,088	0,065	Mavi
T12-XY-3	0,911	0,060	0,029	Mavi
T12-XY-5	0,005	0,066	0,929	Kahve
T12-XX-14	0,884	0,073	0,044	Mavi
T12-XX-27	0,141	0,152	0,707	Kahve
T12-XX-29	0,052	0,077	0,871	Kahve
T12-XX-30	0,026	0,063	0,912	Kahve
T12-XY-35	0,000	0,013	0,986	Kahve
T12-XY-37	0,650	0,122	0,228	Yeşil
T17-XX-2	0,000	0,002	0,998	Kahve
T17-XY-3	0,001	0,021	0,978	Kahve
T17-XY-14	0,970	0,023	0,007	Mavi
T17-XY-15	0,911	0,057	0,032	Mavi
T17-XY-20	0,015	0,054	0,931	Kahve
T17-XY-21	0,784	0,088	0,128	Yeşil
T17-XY-22	0,012	0,050	0,938	Kahve
T17-XY-27	0,930	0,040	0,030	Mavi
T17-XY-28	0,848	0,088	0,065	Yeşil
T17-XY-29	0,000	0,007	0,993	Kahve
T17-XY-31	0,012	0,050	0,938	Kahve
T17-XY-32	0,000	0,014	0,986	Kahve
T17-XY-33	0,000	0,015	0,985	Kahve
T17-XY-34	0,050	0,114	0,836	Kahve
T18-XX-3	0,000	0,013	0,986	Yeşil
T18-XX-4	0,921	0,052	0,027	Mavi
T18-XY-7	0,214	0,229	0,557	Kahve
T18-XX-40	0,920	0,061	0,019	Mavi
T18-XY-42	0,510	0,104	0,385	Yeşil
T18-XY-43	0,000	0,013	0,986	Kahve
T18-XY-44	0,000	0,005	0,995	Kahve
T18-XX-45	0,000	0,015	0,985	Kahve
T18-XY-47	0,970	0,023	0,007	Mavi
T18-XY-48	0,016	0,205	0,779	Kahve
T18-XY-49	0,000	0,003	0,997	Kahve
T18-XY-53	0,000	0,015	0,984	Kahve
T18-XY-57	0,864	0,081	0,055	Mavi
T18-XY-60	0,001	0,037	0,961	Kahve
T18-XX-61	0,911	0,060	0,029	Mavi
T18-XX-67	0,834	0,090	0,076	Yeşil
T18-XX-75	0,019	0,061	0,921	Kahve
T18-XY-76	0,001	0,017	0,982	Kahve
T18-XY-77	0,012	0,050	0,938	Yeşil
T18-XY-78	0,000	0,007	0,993	Kahve
T18-XY-80	0,754	0,074	0,172	Mavi
T18-XX-81	0,003	0,054	0,943	Kahve
T18-XX-82	0,000	0,007	0,993	Kahve

Örenk Kodu	Göz Rengi			
	Tahmin Edilen Göz Rengi			Beklenen Göz Rengi
	Pmavi	Pyeşil	Pkahve	
T18-XX-83	0,001	0,022	0,977	Yeşil
T18-XY-84	0,026	0,063	0,912	Yeşil
T18-XY-85	0,000	0,009	0,991	Kahve
T18-XX-86	0,002	0,025	0,974	Kahve
T18-XX-89	0,028	0,073	0,899	Yeşil
T18-XX-91	0,026	0,227	0,746	Kahve
T18-XY-105	0,001	0,026	0,973	Kahve
T18-XX-106	0,000	0,007	0,993	Kahve
T18-XX-107	0,876	0,090	0,035	Mavi
T18-XY-109	0,001	0,017	0,982	Yeşil
T18-XX-111	0,050	0,114	0,836	Yeşil
T18-XX-113	0,001	0,020	0,979	Kahve
T18-XX-114	0,001	0,019	0,980	Yeşil
T18-XX-115	0,050	0,114	0,836	Yeşil
T18-XX-116	0,680	0,116	0,203	Kahve
T18-XX-117	0,605	0,099	0,296	Yeşil
T18-XX-118	0,914	0,050	0,036	Yeşil
T18-XX-119	0,000	0,007	0,993	Kahve
T18-XX-120	0,000	0,005	0,995	Kahve
T18-XX-121	0,000	0,007	0,992	Kahve
T18-XY-122	0,884	0,073	0,044	Mavi
T18-XY-123	0,864	0,081	0,055	Mavi
T18-XX-125	0,000	0,008	0,991	Kahve
T18-XX-127	0,911	0,057	0,032	Yeşil
T18-XX-128	0,848	0,088	0,065	Mavi
T18-XX-129	0,038	0,075	0,887	Kahve
T18-XX-130	0,157	0,211	0,632	Yeşil
T18-XX-131	0,000	0,008	0,991	Kahve
T18-XY-132	0,099	0,134	0,767	Kahve
T18-XY-133	0,000	0,005	0,995	Kahve
T18-XX-134	0,000	0,008	0,992	Kahve
T18-XY-151	0,000	0,016	0,983	Kahve
T18-XY-152	0,002	0,044	0,953	Yeşil
T18-XX-153	0,000	0,016	0,983	Kahve
T18-XX-154	0,103	0,201	0,696	Yeşil
T18-XX-155	0,074	0,133	0,794	Yeşil
T18-XX-157	0,141	0,152	0,707	Kahve
T18-XX-160	0,019	0,061	0,921	Kahve
T18-XX-162	0,877	0,063	0,060	Mavi
T18-XY-163	0,218	0,156	0,626	Kahve
T18-XX-164	0,041	0,119	0,839	Kahve
T18-XX-165	0,012	0,050	0,938	Kahve
T18-XX-167	0,942	0,046	0,011	Yeşil
T18-XY-168	0,099	0,134	0,767	Kahve
T18-XX-169	0,001	0,020	0,979	Yeşil
T18-XX-171	0,848	0,088	0,065	Mavi
T18-XX-172	0,021	0,067	0,912	Kahve
T18-XY-173	0,012	0,050	0,938	Yeşil
T18-XY-174	0,678	0,083	0,239	Yeşil
T18-XX-175	0,251	0,163	0,586	Yeşil
T18-XY-176	0,000	0,005	0,995	Kahve

Tablo XIX'un devamı

Örnek Kodu	Göz Rengi			
	Tahmin Edilen Göz Rengi			Beklenen Göz Rengi
	Pmavi	Pyeşil	Pkahve	
T18-XY-177	0,088	0,162	0,750	Kahve
T18-XY-178	0,000	0,003	0,997	Kahve
T18-XY-179	0,038	0,075	0,887	Yeşil
T18-XX-180	0,120	0,143	0,738	Yeşil
T18-XY-181	0,099	0,134	0,767	Kahve
T19-XX-2	0,000	0,008	0,992	Kahve
T19-XY-3	0,019	0,061	0,921	Kahve
T19-XY-4	0,000	0,002	0,998	Kahve
T19-XX-6	0,000	0,005	0,995	Kahve
T19-XX-7	0,000	0,011	0,989	Kahve
T19-XX-9	0,000	0,018	0,982	Kahve
T19-XY-11	0,012	0,050	0,938	Kahve
T19-XX-12	0,019	0,061	0,921	Yeşil
T19-XY-15	0,062	0,122	0,816	Kahve
T19-XY-20	0,848	0,088	0,065	Mavi
T19-XY-22	0,019	0,061	0,921	Kahve
T19-XY-26	0,038	0,075	0,887	Kahve
T19-XX-27	0,001	0,021	0,978	Kahve
T19-XX-28	0,000	0,008	0,991	Kahve
T19-XX-29	0,003	0,020	0,977	Kahve
T19-XX-30	0,026	0,063	0,912	Kahve
T19-XX-31	0,000	0,013	0,986	Kahve
T19-XX-32	0,050	0,114	0,836	Kahve
T19-XX-33	0,001	0,022	0,977	Kahve

Örnek Kodu	Göz Rengi			
	Tahmin Edilen Göz Rengi			Beklenen Göz Rengi
	Pmavi	Pyeşil	Pkahve	
T19-XX-34	0,001	0,017	0,982	Kahve
T19-XX-44	0,000	0,005	0,995	Kahve
T19-XY-47	0,062	0,122	0,816	Yeşil
T19-XY-49	0,001	0,021	0,978	Kahve
T19-XX-50	0,026	0,063	0,912	Kahve
T19-XY-54	0,650	0,122	0,228	Yeşil
T19-XY-55	0,000	0,015	0,985	Kahve
T19-XX-57	0,062	0,122	0,816	Kahve
T19-XX-59	0,000	0,013	0,986	Kahve
T19-XX-66	0,284	0,242	0,474	Kahve
T19-XX-70	0,836	0,075	0,089	Yeşil
T19-XX-72	0,106	0,153	0,741	Kahve
T19-XY-73	0,864	0,081	0,055	Mavi
T19-XX-83	0,000	0,013	0,986	Kahve
T19-XX-84	0,961	0,029	0,010	Yeşil
T19-XX-91	0,001	0,017	0,982	Kahve
T19-XX-92	0,005	0,056	0,939	Kahve
T19-XY-94	0,002	0,044	0,953	Yeşil
T19-XY-97	0,001	0,017	0,982	Kahve
T19-XX-101	0,864	0,081	0,055	Yeşil
T19-XY-104	0,074	0,133	0,794	Yeşil
T19-XY-106	0,001	0,017	0,982	Kahve
T19-XY-133	0,911	0,057	0,032	Yeşil

6.3.2 Saç Rengi Tahmin Değerleri

Saç rengi, Türkiye populasyonunda HIrisPlex panelinin saç rengi tahmini HIrisPle kılavuzuna göre yapılmıştır. Buna göre; siyah saçlı bireyler %95,2, kahverengi saçlı bireyler %96,90, sarı saçlı bireyler 59,25 ve kızıl saçlı bireyler %75 başarıyla tahmin edilmiştir. HIrisPlex panelinin çalışılan örneklerdeki saç rengi fenotiplerinin tahmin yüzdesi Tablo XX'da gösterilmiştir. Saç rengi tahmin sonuçlarına göre pozitif tahmin değeri (PPV), negatif tahmin değeri (NPV), duyarlılık, özgüllük ve AUC değerleri hesaplanmıştır (Tablo XXI). Hassasiyet değerleri; siyah saç rengi için %95,23 ve kahverengi saç rengi için %96,90 bulunmuştur. Özgüllük değerleri; siyah saç rengi için %98,43 ve sarı saç rengi için %98,36 olarak yüksek bulunmuştur. Tüm saç

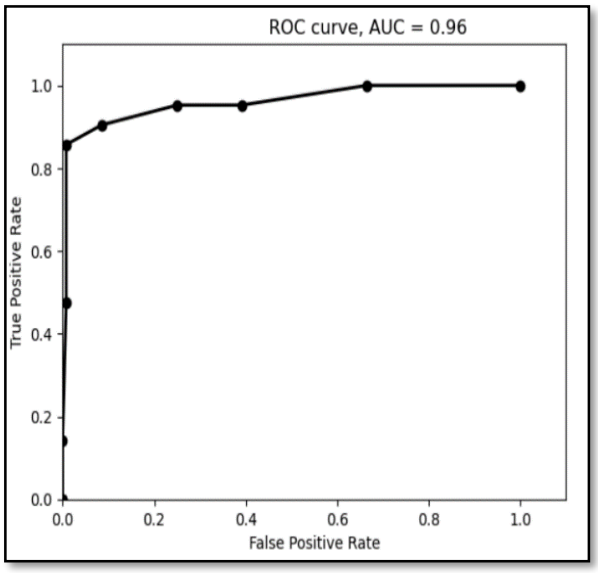
rengi kategorileri için PPV ve NPV değerleri %85'in üzerindedir. Sırasıyla siyah, kahverengi, sarı, kızıl saç renklerine ait ROC ve AUC eğrileri Şekil 32, 33, 34, 35 ‘de gösterilmiştir.

Tablo XX. 149 gönüllünün saç rengi tahmin başarısı

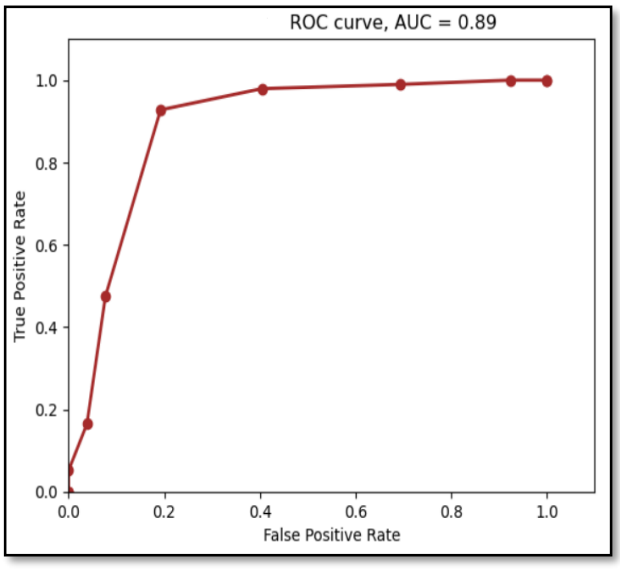
% tahmin başarısı (koyu sayılar tahmin başarısını göstermektedir)					
HIrisPlex (Saç rengi)	Siyah	Kahverengi	Sarı	Kızıl	Toplam Örnek Sayısı
Siyah	**95,23**	4,76	0	0	21
Kahverengi	20,06	**96,90**	1,03	0	97
Sarı	0	40,74	**59,25**	0	27
Kızıl	0	0	25	**75**	4

Tablo XXI. HIrisplex panelinin Türkiye popülasyonundaki saç rengi tahmininde hesaplanan hassasiyet, duyarlılık, PPV, NPV ve AUC değerleri.

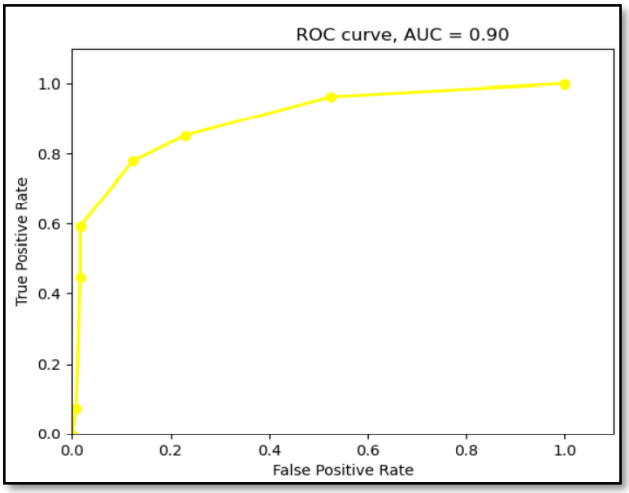
Saç rengi	% Özet İstatsitik Değerleri				
	AUC	Hassasiyet	Özgüllük	PPV	NPV
Siyah	0,96	95,23	98,43	90,90	99,21
Kahverengi	0,89	96,90	76,92	88,67	93,02
Sarı	0,90	59,25	98,36	88,88	91,60
Kızıl	0,55	75	100	100	99,31



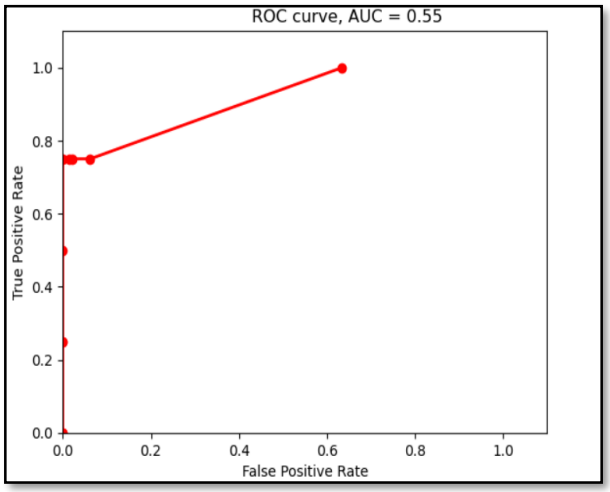
Şekil 32. Siyah saç tahminine ait ROC ve AUC eğrisi



Şekil 33. Kahverengi saç tahminine ait ROC ve AUC eğrisi



Şekil 34. Sarı saç tahminine ait ROC ve AUC eğrisi



Şekil 35. Kızıl saç tahminine ait ROC ve AUC eğrisi

Tablo XXII. Türkiye populasyonunun HIrisplex paneline ait saç rengi p değerleri sonuçları

Örnek Kodu	Saç Rengi						
	Tahmin Edilen Saç Rengi						Beklenen Saç Rengi
	Psarı	Pkahve	Pkızıl	Psiyah	Açık	Koyu	
TR-XY-8	0,032	0,442	0,000	**0,526**	0,111	0,889	Siyah
TR-XX-20	0,031	0,418	0,001	**0,551**	0,062	0,938	Siyah
TR-XX-30	0,096	0,507	0,000	0,397	0,354	0,646	Kahve
TR-XX-33	0,018	0,362	0,000	**0,620**	0,073	0,927	Siyah
TR-XY-70	0,352	0,573	0,006	0,069	0,672	0,328	Kahve
T12-XY-1	0,690	0,278	0,003	0,032	0,953	0,047	Sarı
T12-XY-3	0,679	0,287	0,003	0,031	0,954	0,046	Sarı
T12-XY-5	0,392	0,537	0,001	0,071	0,857	0,143	Kahve
T12-XX-14	0,502	0,186	0,308	0,004	0,993	0,007	Sarı
T12-XX-27	0,195	0,626	0,110	0,069	0,702	0,298	Kahve
T12-XX-29	0,246	0,660	0,000	0,094	0,850	0,150	Kahve
T12-XX-30	0,215	0,675	0,000	0,110	0,633	0,367	Kahve
T12-XY-35	0,186	0,733	0,000	0,080	0,631	0,369	Kahve
T12-XY-37	0,309	0,626	0,012	0,053	0,752	0,248	Kahve
T17-XX-2	0,005	0,531	0,000	0,464	0,044	0,956	Kahve
T17-XY-3	0,088	0,511	0,001	0,400	0,143	0,857	Kahve
T17-XY-14	0,555	0,371	0,049	0,024	0,927	0,073	Sarı
T17-XY-15	0,776	0,217	0,003	0,005	0,989	0,011	Sarı
T17-XY-20	0,085	0,715	0,002	0,198	0,476	0,524	Kahve
T17-XY-21	0,352	0,452	0,181	0,015	0,969	0,031	Kahve
T17-XY-22	0,1580	0,705	0,022	0,114	0,665	0,335	Kahve
T17-XY-27	0,350	0,546	0,001	0,103	0,861	0,139	Kahve
T17-XY-28	0,544	0,404	0,002	0,050	0,891	0,109	Sarı
T17-XY-29	0,017	0,352	0,000	**0,631**	0,053	0,947	Siyah
T17-XY-31	0,107	0,512	0,000	0,381	0,440	0,560	Kahve
T17-XY-32	0,056	0,758	0,011	0,175	0,228	0,772	Kahve
T17-XY-33	0,132	0,596	0,001	0,271	0,244	0,756	Kahve
T17-XY-34	0,329	0,503	0,001	0,166	0,664	0,336	Kahve

Tablo XXII'in devamı

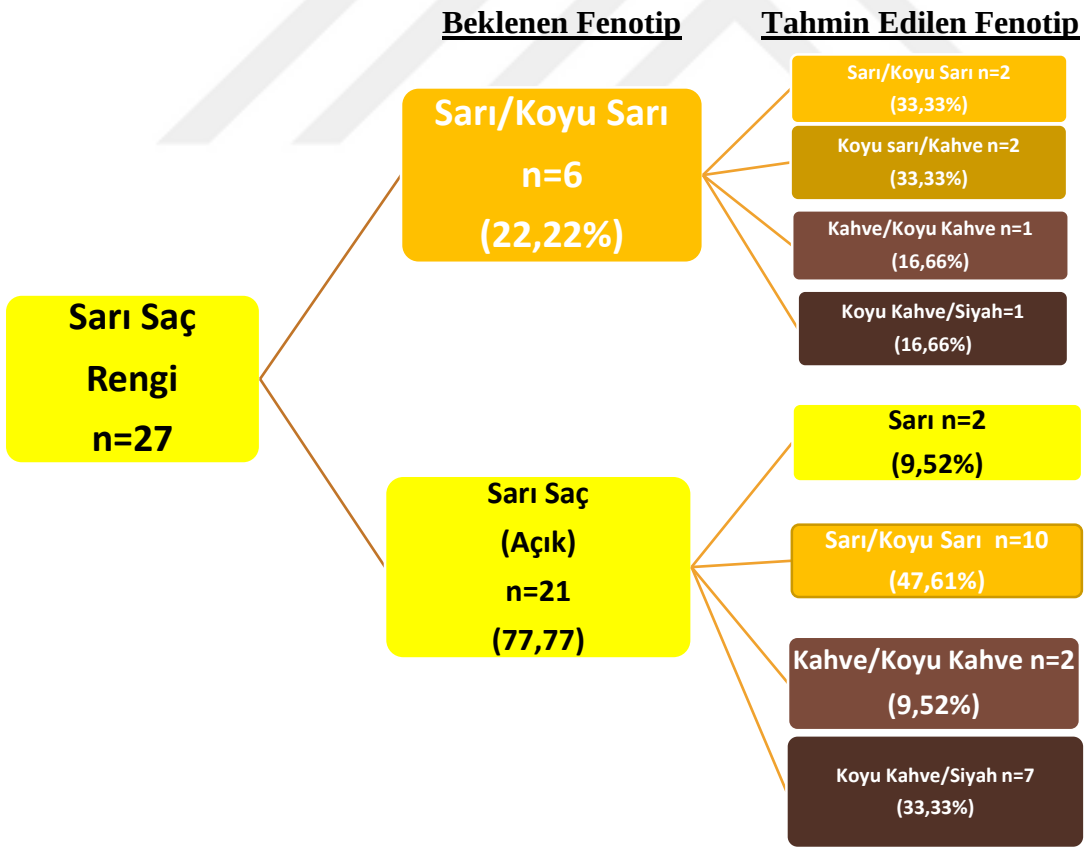
Örnek Kodu	Saç Rengi						
	Tahmin Edilen Saç Rengi						Beklenen Saç Rengi
	Psarı	Pkahve	Pkızıl	Psiyah	Açık	Koyu	
T18-XX-3	0,095	0,685	0,001	0,220	0,237	0,763	Kahve
T18-XX-4	0,623	0,187	0,185	0,005	0,993	0,008	Sarı
T18-XY-7	0,125	0,653	0,025	0,197	0,374	0,626	Kahve
T18-XX-40	0,029	0,800	0,013	0,158	0,381	0,619	Kahve
T18-XY-42	0,122	0,730	0,022	0,126	0,617	0,383	Kahve
T18-XY-43	0,007	0,540	0,000	0,389	0,126	0,874	Kahve
T18-XY-44	0,011	0,354	0,000	**0,634**	0,019	0,981	**Siyah**
T18-XX-45	0,109	0,539	0,000	0,352	0,238	0,762	Kahve
T18-XY-47	0,643	0,314	0,004	0,038	0,922	0,078	Sarı
T18-XY-48	0,112	0,527	0,023	0,339	0,299	0,701	Kahve
T18-XY-49	0,003	0,203	0,000	0,794	0,020	0,980	**Siyah**
T18-XY-53	0,045	0,492	0,000	0,463	0,089	0,911	Kahve
T18-XY-57	0,112	0,760	0,113	0,016	0,911	0,089	Kahve
T18-XY-60	0,004	0,406	0,000	**0,590**	0,007	0,993	**Siyah**
T18-XX-61	0,610	0,351	0,006	0,033	0,886	0,114	Sarı
T18-XX-67	0,108	0,815	0,045	0,033	0,848	0,152	Kahve
T18-XX-75	0,088	0,569	0,000	0,342	0,330	0,670	Kahve
T18-XY-76	0,123	0,696	0,001	0,180	0,261	0,739	Kahve
T18-XY-77	0,061	0,673	0,001	0,265	0,200	0,800	Kahve
T18-XY-78	0,032	0,408	0,000	**0,560**	0,119	0,881	**Siyah**
T18-XY-80	0,048	0,502	0,000	0,450	0,291	0,709	Sarı
T18-XX-81	0,132	0,531	0,000	0,337	0,259	0,741	Kahve
T18-XX-82	0,045	0,650	0,004	0,301	1,000	0,000	Kahve
T18-XX-83	0,102	0,533	0,000	0,365	0,215	0,785	Sarı
T18-XY-84	0,081	0,730	0,003	0,186	0,396	0,604	**Siyah**
T18-XY-85	0,017	0,352	0,000	0,631	0,053	0,947	Kahve
T18-XX-86	0,015	0,865	0,004	0,116	0,123	0,877	Kahve
T18-XX-89	0,120	0,518	0,000	0,362	0,519	0,481	Kahve
T18-XX-91	0,009	0,888	0,006	0,097	0,117	0,883	Kahve
T18-XY-105	0,179	0,637	0,001	0,183	0,480	0,520	Kahve
T18-XX-106	0,042	0,711	0,008	0,238	0,357	0,643	Kahve
T18-XX-107	0,276	0,659	0,006	0,060	0,777	0,223	Kahve
T18-XY-109	0,127	0,594	0,000	0,278	0,281	0,719	Kahve
T18-XX-111	0,303	0,574	0,002	0,121	0,672	0,328	Kahve
T18-XX-113	0,094	0,528	0,000	0,388	0,186	0,814	Kahve
T18-XX-114	0,163	0,661	0,000	0,175	0,439	0,561	Kahve
T18-XX-115	0,335	0,529	0,002	0,135	0,615	0,385	Kahve
T18-XX-116	0,247	0,547	0,001	0,205	0,760	0,240	Kahve
T18-XX-117	0,079	0,635	0,001	0,285	0,176	0,824	Kahve
T18-XX-118	0,162	0,550	0,001	0,288	0,676	0,324	Sarı
T18-XX-119	0,016	0,318	0,000	**0,666**	0,034	0,966	**Siyah**
T18-XX-120	0,020	0,425	0,000	**0,555**	0,057	0,943	**Siyah**
T18-XX-121	0,036	0,539	0,000	0,425	0,059	0,941	Kahve
T18-XY-122	0,667	0,285	0,002	0,046	0,933	0,067	Sarı
T18-XY-123	0,307	0,387	0,269	0,036	0,907	0,093	Sarı
T18-XX-125	0,017	0,382	0,000	**0,601**	0,050	0,950	**Siyah**
T18-XX-127	0,667	0,285	0,002	0,046	0,933	0,067	Kahve
T18-XX-128	0,682	0,281	0,005	0,031	0,940	0,060	Sarı
T18-XX-129	0,153	0,646	0,001	0,200	0,546	0,454	Kahve
T18-XX-130	0,142	0,680	0,004	0,174	0,388	0,612	Kahve

Tablo XXII'in devamı

Örnek Kodu	Saç Rengi						
	Tahmin Edilen Saç Rengi						Beklenen Saç Rengi
	Psarı	Pkahve	Pkızıl	Psiyah	Açık	Koyu	
T18-XX-131	0,016	0,386	0,000	**0,598**	0,051	0,949	Siyah
T18-XY-132	0,266	0,596	0,001	0,137	0,606	0,394	Kahve
T18-XY-133	0,030	0,536	0,000	0,434	0,106	0,894	Kahve
T18-XX-134	0,069	0,823	0,001	0,108	0,191	0,809	Kahve
T18-XY-151	0,266	0,627	0,000	0,107	0,721	0,279	Kahve
T18-XY-152	0,249	0,565	0,015	0,172	0,577	0,423	Sarı
T18-XX-153	0,246	0,518	0,018	0,217	0,561	0,439	Kahve
T18-XX-154	0,135	0,685	0,004	0,175	0,364	0,636	Kahve
T18-XX-155	0,298	0,514	0,001	0,187	0,593	0,407	Kahve
T18-XX-157	0,366	0,513	0,003	0,118	0,685	0,315	Kahve
T18-XX-160	0,096	0,507	0,000	0,397	0,354	0,646	Kahve
T18-XX-162	0,361	0,474	0,001	0,165	0,840	0,160	Sarı
T18-XY-163	0,329	0,503	0,001	0,166	0,664	0,336	Kahve
T18-XX-164	0,096	0,636	0,001	0,267	0,382	0,618	Kahve
T18-XX-165	0,082	0,492	0,000	0,426	0,288	0,712	Kahve
T18-XX-167	0,257	0,651	0,004	0,088	0,705	0,295	Kahve
T18-XY-168	0,366	0,513	0,003	0,118	0,685	0,315	Kahve
T18-XX-169	0,123	0,538	0,000	0,339	0,267	0,733	Kahve
T18-XX-171	0,651	0,312	0,003	0,034	0,951	0,049	Sarı
T18-XX-172	0,092	0,550	0,000	0,358	0,217	0,783	Kahve
T18-XY-173	0,119	0,221	0,630	0,030	0,787	0,213	Kızıl
T18-XY-174	0,105	0,624	0,001	0,271	0,640	0,360	Kahve
T18-XX-175	0,383	0,474	0,001	0,142	0,738	0,262	Sarı
T18-XY-176	0,017	0,376	0,000	**0,607**	0,051	0,949	Siyah
T18-XY-177	0,158	0,665	0,003	0,174	0,280	0,720	Kahve
T18-XY-178	0,002	0,289	0,000	**0,709**	0,002	0,998	Siyah
T18-XY-179	0,082	0,492	0,000	0,426	0,288	0,712	Kahve
T18-XX-180	0,329	0,503	0,001	0,166	0,664	0,336	Sarı
T18-XY-181	0,579	0,345	0,043	0,033	1,000	0,000	Sarı
T19-XX-2	0,020	0,425	0,000	**0,555**	0,057	0,943	Siyah
T19-XY-3	0,069	0,584	0,001	0,347	0,221	0,779	Kahve
T19-XY-4	0,004	0,254	0,000	**0,742**	0,017	0,983	Siyah
T19-XX-6	0,015	0,438	0,000	**0,547**	0,042	0,958	Siyah
T19-XX-7	0,006	0,349	0,000	**0,645**	0,007	0,993	Siyah
T19-XX-9	0,040	0,557	0,000	0,403	0,131	0,869	Kahve
T19-XY-11	0,096	0,507	0,000	0,397	0,354	0,646	Kahve
T19-XX-12	0,106	0,597	0,001	0,297	0,255	0,745	Kahve
T19-XY-15	0,293	0,597	0,004	0,106	0,761	0,239	Kahve
T19-XY-20	0,755	0,214	0,005	0,026	0,972	0,028	Sarı
T19-XY-22	0,074	0,110	0,813	0,004	1,000	0,000	Kızıl
T19-XY-26	0,054	0,849	0,008	0,089	0,312	0,688	Kahve
T19-XX-27	0,099	0,619	0,001	0,282	0,176	0,824	Kahve
T19-XX-28	0,021	0,484	0,000	**0,496**	0,074	0,926	Siyah
T19-XX-29	0,026	0,609	0,004	0,360	0,045	0,955	Siyah
T19-XX-30	0,199	0,672	0,042	0,086	0,898	0,102	Kahve
T19-XX-31	0,113	0,684	0,001	0,202	0,293	0,707	Kahve
T19-XX-32	0,359	0,549	0,002	0,090	0,755	0,245	Kahve
T19-XX-33	0,107	0,592	0,000	0,301	0,227	0,773	Sarı
T19-XX-34	0,127	0,532	0,000	0,340	0,264	0,736	Kahve
T19-XX-44	0,024	0,519	0,000	0,457	0,082	0,918	Kahve
T19-XY-47	0,286	0,605	0,003	0,107	0,766	0,234	Kahve
T19-XY-49	0,101	0,649	0,000	0,249	0,118	0,882	Kahve

Tablo XXII'in devamı

Örnek Kodu	Saç Rengi						
	Tahmin Edilen Saç Rengi						Beklenen Saç Rengi
	Psarı	Pkahve	Pkızıl	Psiyah	Açık	Koyu	
T19-XX-50	0,077	0,652	0,001	0,270	0,260	0,740	Kahve
T19-XY-54	0,208	0,705	0,003	0,084	0,704	0,296	Sarı
T19-XY-55	0,136	0,636	0,002	0,227	0,448	0,552	Kahve
T19-XX-57	0,293	0,597	0,004	0,106	0,761	0,239	Kahve
T19-XX-59	0,082	0,583	0,001	0,334	0,167	0,833	Kahve
T19-XX-66	0,608	0,324	0,035	0,032	1,000	0,000	Sarı
T19-XX-70	0,198	0,711	0,018	0,073	0,753	0,247	Kahve
T19-XX-72	0,229	0,587	0,156	0,029	0,905	0,095	Kahve
T19-XY-73	0,606	0,259	0,130	0,006	0,993	0,007	Sarı
T19-XX-83	0,159	0,736	0,000	0,105	0,527	0,473	Kahve
T19-XX-84	0,346	0,596	0,035	0,023	0,741	0,259	Kahve
T19-XX-91	0,075	0,449	0,000	0,475	0,146	0,854	Kahve
T19-XX-92	0,170	0,601	0,001	0,229	0,413	0,587	Kahve
T19-XY-94	0,119	0,704	0,002	0,175	0,487	0,513	Kahve
T19-XY-97	0,118	0,544	0,000	0,338	0,271	0,729	Kahve
T19-XX-101	0,033	0,644	0,316	0,007	0,826	0,174	Kahve
T19-XY-104	0,316	0,613	0,005	0,066	0,711	0,289	Sarı
T19-XY-106	0,172	0,276	0,520	0,032	0,909	0,091	Kızıl
T19-XY-133	0,735	0,177	0,074	0,014	0,982	0,018	Kızıl



Şekil 36. Sarı saçlı bireylerin saç rengi dağılımı ve tahmin sonuç

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde kriminal laboratuvarlarda yapılan kimliklendirme analizlerinde kullanılan standart STR markırlarıyla fenotipe ait sadece cinsiyete ait bilgiler elde edilmektedir. Bunun yanında kullanılacak diğer fiziksel özellikler şüpheliye ait önemli bilgiler sağlamaktadır. Özellikle soruşturma aşamasında şüphelinin bulunmadığı durumlarda faile ait olduğu düşünülen herhangi bir biyolojik delilden (kan lekesi, semen, tükürük gibi) kişinin dış görünüşüne ait fikir verebilecek herhangi bir bilginin bulunması soruşturmanın aydınlatılması açısından oldukça önemlidir (87). Şüpheli haricinde kayıp kişilerin kimliklendirilmesinde fiziksel görünüme ait bilgi edinilmesi önemlidir. Bu amaçla son yıllarda ise fenotipe ait daha fazla bilgi edinebilmek amacıyla çalışmalar artmıştır (145,161-163).

Yirmi yılı aşkın bir süredir adli bilimciler, adli soruşturmalar için yeni bilimsel ipuçlarının (göz tahmini, saç rengi vb.) üretilmesi kapsamlı araştırmalardan biri olan GWAS'tan yararlanmaktadır. GWAS aracılığıyla, insan fenotipik varyasyonlarında (yani, göz, saç ve ten rengi) yer alan birçok tek nükleotid polimorfizmi (SNP'ler) tanımlanmıştır (164-165). FDP suç mahallinde elde edilen DNA'dan biyocoğrafik soy, dışarıdan görülebilir özellikler (EVC'ler) ve yaşı tahmin ederek bir araştırma aracı olarak tanımlanır. FDP, failin fiziksel görünümünü belirleyerek potansiyel şüpheli grubunu daraltmak için polis soruşturmasına yardımcı olabilir.

FDP çalışmaları sonucunda adli vakalarda kullanılan Irispleks, HIrisplex, HIrisplex-S gibi birçok panel geliştirilmiştir. HIrisplex paneli, saç ve göz rengini eş zamanlı tahmini yapabilmektedir. Avrupa popülasyonun üzerinde geliştirlen bu panelin (15) Avrupalı olmayan populasyonlar da kullanılabilmesi için performansının test edilmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasında da HIrisplex panelinin optimizasyon ve validasyon çalışmasını yapmak ve Türkiye popülasyonunda kullanılabilirliliğini sağlamaktır.

Optimizasyon ve Validasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Optimizasyonun ilk aşamasında SNP lokuslarının elektroforezde son ürün uzunluklarını belirlemek oldu. Bazı SNP lokuslarının gözlenen uzunlukların beklenenden uzunluklarından -1/+5 aralığında değiştiği görüldü. Tablo XIV'da SNP lokuslarının gözlenen uzunluklarının ortalamaları verilmiştir. Bu farklılığın oligonükleotid yapı ve floresans boyaların bağlanması ile elektroforetik yürütme sırasında oluştuğu bilinmekte olup doğal karşılanmaktadır. Özellikle kısa fragmentler kendi uzunluklarından yaklaşık 4-6 baz uzun görünebilmektedirler (153). SNP lokuslarının gözlenen uzunlukları belirlendikten sonra gözlenen artefakt pikler ele alındı. P5 lokusunun adenin bölgesinde (yeşil alan) artefakt pik görüldü (Şekil 19). Bu artefakt pike çoğu yürütmemizde karşılaşılaşmış olmamıza rağmen beklenen piklerin dışında kaldığı için göz ardı edilmiştir. Aynı zamanda HIripleks SNP lokusları 28 bç'den başladığı için 24-25 bç bölgesinde çıkan pikler de göz ardı edilmiştir. Artefakt pikler genellikle pirmerlerin birbirleriyle olan etkileşimleri veya ortamda bağlanmamış ddNTP'lerin varlığıyla oluşan istenmeyen piklerdir. Genellikle PCR veya saflaştırma koşulları değiştirilerek ortadan kaldırılabilmektedir. Çalışmamızda bu tür iyileştirmelere gerek görülmemiştir.

Analiz eşiğinin belirlenmesi için 10 negatif kontrol örneği yürütüldü. Negatif kontrol örneklerinde gözlenen en yüksek piklerin RFU değerlerinin ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Analiz eşiği 110 RFU olarak saptandı. Bu RFU değeri üzerindeki pikler gerçek alel olarak değerlendirildi. HIrisplex'in en zor amplifiye olan N29insA lokusunda analiz eşiğinin üzerine çıkalamamıştır. Walsh ve ark. yapmış oldukları çalışmada da N29insA lokusunun analizinde zorluk yaşadıklarını ve 50 RFU olarak belirledikleri analiz eşiğine N29insA lokusu için çok zor olduğunu bildirmişlerdir (15).

Adli bilimlerde olay yerinden toplanan örnekler genellikle eser miktarda ve bozulmuş durumda olduğundan, DNA miktarları ve kaliteleri düşüktür. Bu tür örneklerde tam profil elde etmek

için kullanılacak SNP analiz yönteminin hassasiyeti yüksek olmalıdır (167). Çalışmamızda HIrisPlex panelinin hassasiyetini belirlemek için 9947A pozitif kontrol DNA örneği (Thermo Fisher Scientific, ABD) farklı miktar aralıklarında (0,125-1,5 ng) sulandırılarak kullanılmıştır. 0,125 ng DNA miktarında alel düşmeleri (allelic drop-out) nedeniyle tam profil elde edilememiştir. Böylece laboratuvarımızda SNaPshot (Thermo Fisher Scientific, ABD) yöntemi ile HIrisPlex panelinin analizi için en düşük DNA miktarı 0,25 ng ve en ideal DNA miktarının 0,25-1,5 ng aralığında olduğu belirlenmiştir. Walsh ve ark., HIrisPlex panelinin hassasiyeti için değişik miktarlarda (500, 250, 125, 63 ve 32 pg) DNA örneği kullanmışlardır. Araştırmaya göre, en az 500 pg DNA örneği kullanıldığında güvenilir bir tipleme yapılabildiğini bildirmişlerdir (15). Ayrıca Walsh ve ark., özellikle düşük miktarda ve kalitede DNA ile çalışıldığında, kırmızı saçı belirleyen N29insA lokusunun belirlenemediğini bildirmişlerdir (168,15). N29insA bir InDel (İnsersiyon/Delesyon) lokusu olup, genel olarak bu lokusların panel tasarımları zordur. Bu nedenle, N29insA lokusu paneldeki en düşük pike sahiptir (15). Aynı zamanda MC1R geni üzerindeki SNP lokuslarının genel olarak pik yükseklikleri çok değildir ve alel düşmeleri en çok bu gen üzerindeki SNP lokuslarında olabileceği bildirilmişitir (15). Çalışmamızda da N29insA lokusu tiplendirmede en çok zorlandığımız bölge olup paneldeki pik yüksekliğinin en düşük olduğu lokustur. 0,125 ng ve daha alt konsantarsyonlarda kullanılan DNA profillerinde bu lokusta alel kayıpları gözlenmiştir.

Dinamik alan çalışmasında 9947A kontrol DNA örneğine ait beş farklı (0,063 ng/µl, 0,125 ng/µl, 0,25 ng/µl, 0,5 ng/µl ve 1,5 ng/µl) konsantrasyonda olan DNA örnekleri kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon 5 kez çalışılmıştır. Şekil 22'da her bir konsantrasyon için elde edilen piklerin ortalama değerleri verilmiştir. Değerlendirilebilir ve tam profilin elde edildiği DNA miktarı 0,25-1,5 ng arasında olduğu belirlendi. Alel kayıpları 0,125 ng ve altındaki konsantrasyonunda gözlendi. İlk alel kayıpları N29insA (P1), rs28777 (P12), rs1221256 (P14), rs1393350 (P23), rs683 (P24) lokuslarında görüldü ve 0,063 ng/µl'de artarak devam etmiştir. Walsh ve ark ise 63 pg'a kadar tam profil elde edebildiklerini bildirmişlerdir (15).

Validasyonun tekrarlanabilirlik parametresi için 9947A kodlu pozitif kontrol (Thermo Fisher Scientific, ABD) örneği farklı zamanlarda 5 kez çalışılmış ve her çalışmada aynı genotip elde edilmiştir. Bu da yöntemin tekrarlanabilir olduğunu ortaya koymuştur.

Tekrar üretilebilirlik parametresinde ise farklı cihaz (ABI 310 ve ABI 3130, Thermo Fisher Scientific, ABD) ve farklı analistlerin çalışması sonucu SNP alel uzunluklarında kaymaların olduğu tespit edilmiştir. Görülen uzunluk kaymaların nedeninin kullanılan cihaza, polimere ve ortam koşullarına bağlı olduğu belirlenmiş ve POP7'nin kullanıldığı ABI 3130'daki alellerin uzunlukları POP4'ün kullanıldığı ABI 310 cihazına göre daha ilerde olduğu gözlenmiştir. Aynı lokuslar arasındaki farkın ise en fazla 4 baza kadar çıktığı görülmüştür. Çeşitli araştırmacıların çalışmalarında da SNaPshot yönteminde bu tür kaymaların olduğu ve elde ettikleri genotpilerde bir farklılık göülmediğini bildirmişlerdir. (170,169).

Bülbül ve ark. çalışmamızda kullandığımız pozitif kontrol örneklerini Ion Torrent S5 (Thermo Fisher Scientific, ABD) NGS cihazında çalışmışlardır. Çalışmamızın sonuçlarını makalenin sonuçlarıyla karşılaştırdığımızda Ion Torrent S5 (Thermo Fisher Scientific, ABD) NGS ile elde edilen genotiplerle ABI 310/3130 (Thermo Fisher Scientific, ABD)'da elde edilen genotiplerin aynı olduğu ve saç-göz rengi tahminlerinin de birbirine çok yakın olduğu görülmüştür. Aradaki fark NGS yönteminde rs1805005 (P5) lokusu analiz edilemediğinden 23 lokus ile hesaplama yapılırken, kapiller elektroforez yönteminde 24 lokus ile tahmin yapılmıştır. İki yöntem sonucunda çalışılan örnekler için genotiplerinin uyuşması hâlen adli laboratuvarlarda kullanılan kapiller elektroforeze dayalı yöntemlerin NGS yöntemi ile aynı güvenilirlikte sonuçlar verdiğini göstermektedir. SNaPshot'a dayalı kapiller elektroforez yönteminin diğer bir avantajı da analiz edilemeyen lokusların (alel düşmesi gibi) ayrı bir şekilde "singleplex" çalışılabilmesidir. Ayrıca SNaPshot yöntemi NGS yöntemine göre daha az maliyetlidir.

Çalışmamızda saç ve göz rengi tahmini için kullanılan HIrisPlex panelinin laboratuvarımızda güvenilir bir şekilde çalışabilmesi için optimizasyonu ve validasyonu yapılmıştır.

Fenotipe Ait Tahmin Sonuçların Değerlendirilmesi

Göz ve saç rengi tahmini, Walsh ve ark. tarafından geliştirilen, multinominal lojistik regresyon model istatistiğine dayalı online yazılım (https://hirisplex.erasmusmc.nl/) kullanılarak yapıldı. 24 SNP genotipi için minör alel sayısı (0, 1 veya 2) olarak programa giriş yapıldı. Göz rengi için Walsh ve ark.nın belirlemiş olduğu 0,7 saç rengi için ise 0,5 olasılık eşiğine göre sınıflandırma yapıldı. Analiz eşiğinin altında kalanlar 'belirsiz' olarak değerlendirildi. Panelden elde edilen sonuçlara göre gerçek pozitif, gerçek negatif, yanlış negatif, yanlış pozitif değerleri belirlenerek; hassasiyet, özgüllük, PPV ve NPV değerleri hesaplandı. Bu oranlar, adli genetik analizlerinde bilinmeyen bir bireyin fenotipini çıkarırken önemlidir; hatalı tahminler verme riskinden ziyade daha oranların daha konservatif olması tercih edilir.

Göz Rengi Tahmini Sonuçların Değerlendirilmesi

Bireylerin gerçek göz renklerinin sınıflandırılması ve tahmini mavi, yeşil ve kahverengi renkler olmak üzere üç kategoride yapılmıştır. 149 gönüllü üzerinde çalışılan HIrisPlex paneliyle mavi göz renginde %100 (n=20) ve kahverengi göz renginde %95,60 (n=91) tahmin başarısı gözlemledik. Yeşil göz sonuçlarımızda ise %78,94 (n=30) yanlış göz rengi tahmini yaparken örneklerin %21,05'i (n=8) eşik değerinin altında kalarak 'belirsiz'olarak değerlendirilmiştir. Ancak bu beklenen bir durumdur. Çünkü göz rengi tahmin modeli modeli, yalnızca mavi ve kahverengi göz rengini tahmin etmek için geliştirilmişitir. Bununla birlikte, yeşil göz rengine sahip bireylerin tahmin sonuçları çoğunlukla mavi veya kahverengi tahmin edilerek yanlış pozitif sonuçlar vermektedir (14).

Çalışmamızda ara renk olan yeşil gözlü bireyleri daha yakından incelemek için açık ve koyu renkler olarak sınıflandırdık. Yeşil göz renklerinin ayrıntılı sınıflandırması, "açık yeşil gözlerin" çoğunun mavi olarak tahmin edildiğini ve benzer şekilde "koyu yeşil gözlerin" çoğunun kahverengi olarak tahmin edildiğini göstermektedir (Şekil 31). Sonuçlarımız Avrupa popülas-

yonu üzerinde yapılan çalışmayla benzer bulunmuştur. Liu ve ark. 6168 Avrupalı üzerinde yapmış olduğu çalışmada mavi ve kahverengi göz rengi %90'ın üzerinde bir doğruluk oranında tahmin edilmiştir (9) . Walsh ve ark. yapmış olduğu çalışma göre Avrupa popülasyonu üzerinde Irispleks paneli ile yeşil (ara renk) göz rengi tahmini yapamadığını bildirmişlerdir. Buna göre ara renk göz rengi tahmin sonuçlarımız benzerlik gösterdiği görülmüştür (111). Bülbül ve ark. biyocoğrafik soy ve fenotipi belirleyen bir panel geliştirmişler ve bu çalışmanın sonucuna göre mavi ve kahverengi göz rengi fenotiplerini yüksek doğrulukla tahmin etmenin mümkün olduğunu ancak yeşil ve ela gibi ara göz renkleri için daha az güvenilir olduğunu bildirmiştir (93). Benzer sonuçlar Norveç popülasyonu üzerinde de gözlenmiştir (171).

Yeşil göz rengi fenotipi diğer göz renklerine göre genetik olarak çok daha kompleks olduğundan daha fazla bilgi verici SNP kullanılarak daha güvenilir sonuçlar elde edilebilir. Salvaro ve ark. 296 Italyalı üzerinde dört farklı göz rengi tahmin modelli çalışmışlar (Irsiplex, Ruiz, Allwood and Harts models) ve Irsiplex panelinin tahmin performansının $p>0,7$ eşik değeri olmadan daha yüksek olduğunu görmüşlerdir (171). HIrisplex panelinin Avrupa dışındaki popülasyonlardaki performansıyla karşılaştırıldığında ara göz rengi tahminiyle benzerlik gösterdiği, mavi ve kahverengi göz rengindeki tahmin başarısı benzerlik gösterdiği görülmüştür (161,171-173). Bir şüphelinin göz rengi mavi veya kahverengi olarak tahmin edilirse, örneğin gerçek göz renginin ara göz rengi (ela yeşili veya yeşil) olma olasılığı olabilir. Ara göz rengi tahmini zordur ve bu onun karmaşık genetik yapısı ile açıklanabilir. Bazı çalışmalar, ara göz renginin genetik yapısını anlamaya ve yeni SNP'ler bulmaya odaklanmıştır. Son yapılan çalışmalarda ara göz rengni tahmin başarısını yükseltmek için diğer genler üzerindeki bazı SNP markırları eklenerek farklı tahmin modelleriyle yeni setler geliştirilmiştir. Bartoszek ve ark. Irisplex panelinin ara renk göz tahminindeki %0 başarısını %39'a kadar yükseltmeyi başarmışlardır (39). Bununla birlikte, mevcut testler ve tahmin modelleri, ara göz rengini yüksek doğrulukla tahmin edemez.

Her bir göz rengi için tahmin doğruluğu AUC değerleri mavi için 0.66, kahverengi için 0.88 ve yeşil göz rengi için 0.59'dur (Tablo XVIII). Elde edilen duyarlılık değerleri kahverengi (%95,6) ve mavi (%100) göz renkleri için çok yüksek bulunmuştur. Analiz edilen yeşil gözlü bireylerin doğru sınıflandırılmaması nedeniyle, ara göz rengi tahmini için duyarlılık hesaplanmamıştır.

Özgüllük, bir testin mevcut her kategorinin gerçek negatiflerini tahmin etme yeteneğini değerlendirmektir. Örneğin, kahverengi gözlü olmayan insanları kahverengi gözlü olmayarak tepsit etmek gerçek negatif değerlerini verir (9) . Özgüllük değerleri mavi göz rengi (%92,24) ve yeşil (%100) göz renkleri için çok yüksekken, kahverengi (%65,51) göz rengi için özgüllük daha düşüktü. Bu, çoğunlukla kahverengi olarak sınıflandırılan yeşil göz rengindeki bireylerin sayısının fazla olması nedeniyle kaynaklanmaktadır (Tablo XVIII).

Pozitif tahmin değeri (PPV) ve negatif tahmin değeri (NPV) Liu ve arkadaşlarına göre hesaplandı (9). PPV ve NPV değerleri mavi için sırasıyla %66.66 ve %100, kahverengi için %81.30 ve %90.47 idi. Ara göz rengi için PPV değeri, doğru tahmin yapılmaması nedeniyle hesaplanmadı ve NPV değeri %74,49 olarak hesaplanmıştır (Tablo XVIII).

HIrisPlex (veya IrisPlex) sisteminin mavi ve kahverengi göz rengi tahminlerinin başarısı, farklı popülasyon örneklerini test eden farklı araştırmacılar tarafından kanıtlanmıştır. Benzer şekilde, yeşil göz rengi için hatalı ve yüksek yanlış tahminler bildirilmiştir. Göz rengi tahminlerine ilişkin sonuçlar önceki çalışmalarla uyumludur (12,83,143,174-177).

Saç rengi tahmini sonuçların değerlendirilmesi

Bireylerin gerçek saç renklerinin sınıflandırılması ve tahmini kızıl, sarı, kahverengi ve siyah renkler olmak üzere dört kategoride yapılmıştır. Saç rengi ve renk tonu (açık ve koyu) tahmin değerleri Walsh ve ark. göre değerlendirildi (15,14). Saç renklerinin tahmin başarısı sırasıyla siyah saç için %95.23 (n=21), kahverengi saç için %96.90 (n=97), sarı saç için %59.25 (n=27)

ve kırmızı saç için %75 (n=4) olarak hesaplandı (Tablo XX). Örneklerin toplam %89.26'sı gerçek saç renklerinde doğru tahmin edilmiştir. En yanlış tahmin ise %40,74 ile sarı saçın kahverengi olarak tahmin edilmesi olarak görülmüştür (Tablo XX).

Kahverengi saç renginde tahmin edilen bir örnek dışında tüm siyah saçlı bireyler doğru tahmin edildi. 97 kahverengi saçlı bireyin ikisinin siyah saç renginde, birinide sarı saç renginde yanlış tahmin edildi. Siyah, kahverengi veya sarı saç rengindeki bireylerin hiçbiri kırmızı olarak sınıflandırılmadı. Ancak, kızıl saçlı bireylerden biri (4 kişiden 1'i) yanlış bir şekilde sarı saçlı olarak tahmin edildi.

Saç tahmin doğruluğu AUC değerleri siyah (0,96), kahverengi (0,89), sarışın (0,90) için yüksek ve kırmızı için (0,55) daha düşük gözlendi (Tablo XXI). Elde edilen duyarlılık değerleri siyah (%95.23) ve kahverengi (%96.90) saç rengi için yüksek, sarı ve kızıl saç için duyarlılık değerleri daha düşük olarak (sırasıyla %59,25 ve %75,00) görüldü. Tüm saç renkleri için PPV ve NPV değerleri (0.88-100) yüksek olarak hesaplandı (Tablo XXI).

Sarı saçlı bireylerin tahmin sonuçları ve hassasiyet değeri %59.25 oranda en düşük hesaplanmıştır (Tablo XX ve Tablo XXI). Sarı saç tahmin fenotipleri, sarı, sarı/koyu sarı, koyu sarı/kahverengi olarak üç sınıfa ayrılır (14). Sarı saçlı bireylerin neredeyse yarısının sarı veya sarı/koyu sarı olduğu doğru bir şekilde tahmin edilmiştir Beklenen saç rengi sarı veya koyu sarı olan 11 kişi için en yüksek p değerleri ile kahverengi sınıfta tespit edildi. Bu nedenle, bu bireylerin kahverengi saç rengine sahip olarak yanlış tahmin edilmiştir (Şekil 35).

Özgüllük değerleri; kırmızı, siyah ve sarı saç renkleri için en yüksek (sırasıyla %100, %98.43 ve %98.36) olarak bulunmuştur. Kahverengi saç renginin özgüllük değeri (%76.92) daha düşük görülmüştür. Bu da bireylerin (çoğunlukla sarışınların) kahverengi olarak yanlış tahmin edil-

mesi nedeniyle daha düşüktük kalmıştır (Tablo XXI). Dolayısıyla bir araştırmada, eğer bilinmeyen örnek kahverengi olarak tahmin edilirse, gerçek saç renginin kahverengi olması yüksektir ama aynı zamanda sarı veya siyah saç rengi olması da mümkün olabileceği görülmektedir.

HIrisPlex panelinde, saç rengi tahmini için 22 SNP lokusu bulunmaktadır (14). HIrisPlex panelinin saç rengi tahmininin gücünü değerlendirmek için Avrupa'nın Doğu (İrlanda), Batı (Polonya) ve Güney (Yunan) bölgelerinden 1500'den fazla kişi üzerinde test edilmiştir. HIrisPlex saç rengi tahmin modeli doğrulukları kızıl saç için için 0.93, siyah saç için için 0.87, kahverengi saç için 0.82 ve sarı saç rengi için 0.81 olarak bildirilmiştir (14). Saç tahmin sonuçlarımız kızıl ve sarı saç rengi tahmin doğruluğu dışında bu bulgulara benzer olduğu görülmüştür. Bu fark, büyük ölçüde çalışmamızdaki küçük örnekleme (sadece 4 kişi) bağlıdır. Türkiye popülasyonuna bakıldığında kızıl saçlı bireylerin sıklığı Avrupa'ya göre çok düşük olduğu söyelenebilir.

Norveç popülasyonu üzerinde yapılan çalışmada kızıl saç renginin tahmin başarısı %97, siyah saçın tahmin başarısı %93, kahverengi saç renginin tahmin başarısı %70 ve sarı saçın tahmin başarısı %72 olduğu bildirilmiştir (171). Brezilya poplülasyonunda yapılan çalışmada ise kızıl saçlı bireylerin bir kısmının kahverengi olarak tespit edildiği bildirilmiştir (178). Bulgularımız, yukarıda açıklanan kızıl saç rengi dışında, yine bu çalışma ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Sarı/kahverengi saç rengi fenotiplerinin, saç rengindeki yaşa bağlı değişiklikler nedeniyle doğru tahmin açısından zorlayıcı olduğu bildirilmiştir. Çocukluk dönemindeki sarı saç fenotipleri genellikle yıllar içinde koyulaşır. Bu değişikliklerin moleküler yapısı hala net değildir (96,14). Kahverengi saç rengi tahmin başarısı, diğer Avrupa popülasyon çalışmalarına kıyasla daha düşüktür (171,162,15). Sarı saç fenotipleri Avrupa'da daha yaygındır. Bu nedenle, yaşa bağlı saç rengi değişiklikleri de daha sık meydana gelebilir ve bu da yanlış tahmin oranının artmasına neden olur. Çalışmamızda sarı saç fenotipi (%14), kahverengi saçtan (%65) çok daha düşüktür. Dolayısıyla kahverengi saç tahmininde yüksek doğruluk sonucu elde edilmiştir. Öte yandan, örnek grubumuzdaki sarı saçlı bireylerin 11'i kahverengi saçlı olarak tahmin edilerek en düşük

tahmin başarısına sahiptir. Benzer yanlış tahminler başka çalışmalarda da görülmektedir (180,179,171). Bu, bireylerin saç rengine ilişkin öznel algısı olarak da açıklanabilir ve bazen koyu sarıyı açık kahverengiden ayırt etmek zordur.

HIrisPlex tahmin modeli, her saç renginin daha iyi sınıflandırılmasına yardımcı olmak için ek olarak saç rengi tonları tahmin değerleri (açık ve koyu) verir. Açık renk tonunun p değeri, sarı saç rengi tahminlerine ek bilgi sağlar (14,164). Bununla birlikte, genetik yapının daha iyi anlaşılması için daha ileri çalışmalara ve daha iyi tahmin için ek SNP'lere ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak Türkiye popülasyonunda saç ve göz rengi tahmini için HIrisPlex sisteminin (SNaPshot yöntemi ve MLR modeli) performansını değerlendirdik. HIrisPlex panelinin duyarlılık, özgüllük, AUC, PPV ve NPV değerlerini hesaplayarak tahmin performansını belirledik. Mavi ve kahverengi göz renkleri ile siyah ve kahverengi saç renkleri için yüksek tahmin doğrulukları (>% 95'in üzerinde) elde edildi. Tahmi başarısındaki düşük oranlar yeşil göz rengi ve sarı saç rengi gibi daha karmaşık fenotiplerde gözlendi. Bu fenotiplerle ilgili zorluklara rağmen, HIrisPlex sistemi Türkiye popülasyonu için güvenilir bir şekilde uygulanabilir. Yeşil göz rengi ve sarı saç rengi tahmin başarısını arttırmaya yönelik bu fenotipten sorumlu diğer gen bölgelerinin de araştırılmasıyla ek SNP markırları belirlenebilir ve tahmin modelleri geliştirilebilir.

8. KAYNAKLAR

1. Butler JM. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. BioTechniques. 2007;43(4).

2. Butler JMJM. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers. 2nd ed. Vol. 1, Chemistry & biodiversity. Boston: Elsevier Academic Press; 2005. 1829–1841 p.

3. Frudakis TN. Molecular Photofitting. Molecular Photofitting. Academic Press; 2008. 599–608 p.

4. Marano LA, Fridman C.DNA phenotyping: current application in forensic science. Research and Reports in Forensic Medical Science. 2019;Volume 9:1–8.

5. Kayser M, De Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. Nature Reviews Genetics. 2011;12(3):179–92.

6. Sturm RA, Frudakis TN. Eye colour: Portals into pigmentation genes and ancestry. Vol. 20, Trends in Genetics. Elsevier Current Trends; 2004. p. 327–32.

7. Sturm RA. Molecular genetics of human pigmentation diversity. Human Molecular Genetics. 2009;18(R1).

8. Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Magnusson KP, et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. Nature Genetics. 2007;39(12):1443–52.

9. Liu F, van Duijn K, Vingerling JR, Hofman A, Uitterlinden AG, Janssens ACJW, et al. Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. Current Biology. 2009 Mar 10;19(5):R192–3.

10. Walsh S, Liu F, Ballantyne KN, van Oven M, Lao O KM. IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. Forensic Sci Int Genet. 2011;Jun;5(3):170–8.

11. Yun L, Gu Y, Rajeevan H, Kidd KK. Application of six IrisPlex SNPs and comparison of two eye color prediction systems in diverse Eurasia populations. International Journal of Legal Medicine. 2014;128(3):447–53.

12. Chaitanya L, Walsh S, Andersen JD, Ansell R, Ballantyne K, Ballard D, et al. Collaborative EDNAP exercise on the IrisPlex system for DNA-based prediction of human eye colour. Forensic Science International: Genetics. 2014 Jul 1;11(1):241–51.

13. Branicki W, Liu F, Van Duijn K, Draus-Barini J, Pośpiech E, Walsh S, et al. Model-based prediction of human hair color using DNA variants. Human Genetics. 2011;129(4):443–54.

14. Walsh S, Liu F, Wollstein A, Kovatsi L, Ralf A, Kosiniak-Kamysz A, et al. The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. Forensic Science International: Genetics. 2013 Jan 1;7(1):98–115.

15. Walsh S, Chaitanya L, Clarisse L, Wirken L, Draus-Barini J, Kovatsi L, et al. Developmental validation of the HIrisPlex system: DNA-based eye and hair colour

prediction for forensic and anthropological usage. Forensic Science International: Genetics. 2014 Mar 1;9(1):150–61.

16. Nurk S, Koren S, Rhie A, Rautiainen M, Bzikadze A V., Mikheenko A, et al. The complete sequence of a human genome. Science. 2022;376(6588):44–53.

17. Jobling MA, Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. Nature Reviews Genetics. 2004;5(10):739–51.

18. Owen R. Karl Landsteiner and the first human marker locus. Genetics. 2000;155(3):995–8.

19. Jeffreys AJ, Wilson V, Theint SL, Lel L. Fingerprints of Dna Alex Jeffreys. Letters to Nature. 1985;6–9.

20. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science. 1987;235(4796):1616–22.

21. Butler JM. The future of forensic DNA analysis. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2015;370(1674).

22. Butler JM. Fundamentals of Forensic DNA Typing. Fundamentals of Forensic DNA Typing. Elsevier Inc.; 2010.

23. Subramanian S, Mishra RK, Singh L. Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. Genome biology. 2003;4(2).

24. Andersen J, Martin P, Carracedo A, Dobosz M, Eriksen B, Johnsson V, et al. Report on the third EDNAP collaborative STR exercise. Forensic Science International. 1996 Apr 2;78(2):83–93.

25. Hares DR. Expanding the CODIS core loci in the United States. Forensic Science International: Genetics. 2012 Jan 1;6(1):e52–4.

26. Amorim A, Fernandes T, Taveira N. Mitochondrial DNA in human identification: A review. PeerJ. 2019;7.

27. Szibor R, Michael M, Spitsyn VA, Plate I, Ginter EK, Krause D. Mitochondrial D-loop 3' (CA)(n) repeat polymorphism: Optimization of analysis and population data. Electrophoresis. 1997;18(15):2857–60.

28. Andréasson H, Asp A, Alderborn A, Gyllensten U, Allen M. Mitochondrial sequence analysis for forensic identification using pyrosequencing technology. BioTechniques. 2002;32(1):124–33.

29. Brookes AJ. The essence of SNPs. Vol. 234, Gene. 1999.

30. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single- nucleotide polymorphisms in the human genome. Science. 1998;280(5366):1077–82.

31. Serin A, Canan H, Ulubay A. Single Nucleotide Polymorphisms in Forensic

Applications Based on Identification: Review. Turkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine. 2016;13(2):47–54.

32. Gill P, Werrett DJ, Budowle B, Guerrieri R. Correspondence | Science & Justice - Volume 44, Issue 1. Science & Justice. 2004 Jan 1;44(1):51–3.

33. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. Erratum: A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation (Genome Research (1998) 8 (1229-1231)). Vol. 9, Genome Research. 1999.

34. Pulker H, Lareu MV, Phillips C, Carracedo A. Finding genes that underlie physical traits of forensic interest using genetic tools. Forensic Science International: Genetics. 2007 Jun 1;1(2):100–4.

35. International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms The International SNP Map Working Group*. Nature. 2001;409(6822):928.

36. Kidd KK, Pakstis AJ, Speed WC, Grigorenko EL, Kajuna SLB, Karoma NJ, et al. Developing a SNP panel for forensic identification of individuals. Forensic Science International. 2006 Dec 1;164(1):20–32.

37. Dixon LA, Murray CM, Archer EJ, Dobbins AE, Koumi P, Gill P. Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes. Forensic Science International. 2005 Nov 10;154(1):62–77.

38. Pakstis AJ, Speed WC, Kidd JR, Kidd KK. Candidate SNPs for a universal individual identification panel. Human Genetics. 2007;121(3–4):305–17.

39. Pakstis AJ, Speed WC, Fang R, Hyland FCL, Furtado MR, Kidd JR, et al. SNPs for a universal individual identification panel. Human Genetics. 2010;127(3):315–24.

40. Kidd KK, Kidd JR, Speed WC, Fang R, Furtado MR, Hyland FCL, et al. Expanding data and resources for forensic use of SNPs in individual identification. Forensic Science International: Genetics. 2012 Sep 1;6(5):646–52.

41. Pietrangeli I, Ottaviani E, Martone C, Gabriele L, Arcudi G, Potenza S, et al. Frequency assessment of 25 SNPs in five different populations. Forensic Science International: Genetics. 2010;4(5):131–3.

42. Sanchez JJ, Phillips C, Børsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevila M, et al. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. Electrophoresis. 2006;27(9):1713–24.

43. Vallone PM, Decker AE, Butler JM. Allele frequencies for 70 autosomal SNP loci with U.S. Caucasian, African-American, and Hispanic samples. Forensic Science International. 2005;149(2–3):279–86.

44. Kayser M. Uni-parental markers in human identity testing including forensic DNA analysis. BioTechniques. 2007;43(6):Sxv-Sxxi.

45. Szibor R. X-chromosomal markers: Past, present and future. Forensic Science International: Genetics. 2007 Jun 1;1(2):93–9.

46. Tishkoff SA, Verrelli BC. Role of evolutionary history on haplotype block structure in the human genome: implications for disease mapping. Current Opinion in Genetics & Development. 2003 Dec 1;13(6):569–75.

47. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. Science. 2002;296(5576):2225–9.

48. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. Vol. 29, Nature Genetics. 2001.

49. Ge J, Budowle B, Planz J V., Chakraborty R. Haplotype block: a new type of forensic DNA markers. International journal of legal medicine. 2010;124(5):353–61.

50. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 1981;290(5806):457–65.

51. Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, Hosseini S, et al. Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. Vol. 100, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003.

52. Butler JM, Levin BC. Forensic applications of mitochondrial DNA. Vol. 16, Trends in Biotechnology. 1998.

53. van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. Human mutation. 2009;30(2).

54. Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. Forensıcs And Mıtochondrıal Dna. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2003;4:119–60.

55. Köhnemann S, Hohoff C, Pfeiffer H. An economical mtDNA SNP assay detecting different mitochondrial haplogroups in identical HVR 1 samples of Caucasian ancestry. Mitochondrion. 2009 Sep 1;9(5):370–5.

56. Nelson TM, Just RS, Loreille O, Schanfield MS, Podini D. Development of a multiplex single base extension assay for mitochondrial DNA haplogroup typing. Vol. 48, Croatian Medical Journal. 2007.

57. Coble MD, Just RS, O'Callaghan JE, Letmanyi IH, Peterson CT, Irwin JA, et al. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. International Journal of Legal Medicine. 2004;118(3):137–46.

58. Vallone PM, Just RS, Coble MD, Butler JM, Parsons TJ. A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. International Journal of Legal Medicine. 2004;118(3):147–57.

59. Quintáns B, Álvarez-Iglesias V, Salas A, Phillips C, Lareu M V., Carracedo A. Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. Forensic Science International. 2004 Mar 10;140(2–3):251–7.

60. Brandstätter A, Parsons TJ, Parson W. Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups. International Journal of

Legal Medicine. 2003;117(5):291–8.

61. Jobling MA, Tyler-Smith C. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. Trends in Genetics. 1995;11(11):449–56.

62. Jobling MA, Tyler-Smith C. The human Y chromosome: An evolutionary marker comes of age. Nature Reviews Genetics. 2003;4(8):598–612.

63. Butler JM. Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis. Forensic science review. 2003;15(2):91–111.

64. Balanovsky O. Toward a consensus on SNP and STR mutation rates on the human Y-chromosome. Hum Genet. 2017;136:575–90.

65. Ross MT, Grafham D V., Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, et al. The DNA sequence of the human X chromosome. Vol. 434, Nature. 2005.

66. Tavacı İ, Bülbül Ö, Filoğlu G, Altunçul H. Polymorphism of 15 X-Chromosome SNPs in the Turkish Population. Turkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences. 2020;17(3):238–44.

67. Tomas C, Sanchez JJ, Barbaro A, Brandt-Casadevall C, Hernandez A, Ben Dhiab M, et al. X-chromosome SNP analyses in 11 human Mediterranean populations show a high overall genetic homogeneity except in North-west Africans (Moroccans). BMC Evolutionary Biology. 2008;8(1).

68. Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, Krause D. Use of X-linked markers for forensic purposes. International Journal of Legal Medicine. 2003;117(2):67–74.

69. Stepanov V, Vagaitseva K, Kharkov V, Cherednichenko A, Bocharova A, Berezina G, et al. Forensic and population genetic characteristics of 62 X chromosome SNPs revealed by multiplex PCR and MALDI-TOF mass spectrometry genotyping in 4 North Eurasian populations. Legal Medicine. 2016;18:66–71.

70. Schneider PM, Prainsack B, Kayser M. The use of forensic DNA phenotyping in predicting appearance and biogeographic ancestry. Deutsches Arzteblatt International 2019;116(51–52):873–80.

71. Phillips C. Forensic genetic analysis of bio-geographical ancestry. Forensic Science International: Genetics. 2015 Sep 1;18:49–65.

72. Rosenberg NA, Li LM, Ward R, Pritchard JK. Informativeness of Genetic Markers for Inference of Ancestry. American Journal of Human Genetics. 2003;73(6):1402–22.

73. Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, et al. Genetic structure of human populations. Science. 2002;298(5602):2381–5.

74. Sampson JN, Kidd KK, Kidd JR, Zhao H. Selecting SNPs to Identify Ancestry. Annals of Human Genetics. 2011;75(4):539–53.

75. Frudakis TN. The First Case Studies of Molecular Photofitting. In: Molecular Photofitting. Academic Press; 2008. p. 599–608.

76. Phillips C, Salas A, Sánchez JJ, Fondevila M, Gómez-Tato A, Álvarez-Dios J, et al. Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. Forensic Science International: Genetics. 2007;1(3–4):273–80.

77. Phillips C, Prieto L, Fondevila M, Salas A, Gómez-Tato A, Álvarez-Dios J, et al. Ancestry analysis in the 11-M Madrid bomb attack investigation. PLoS ONE. 2009;4(8).

78. Phillips C, Aradas AF, Kriegel AK, Fondevila M, Bulbul O, Santos C, et al. Eurasiaplex: A forensic SNP assay for differentiating European and South Asian ancestries. Forensic Science International: Genetics. 2013;7(3):359–66.

79. Santos C, Phillips C, Fondevila M, Daniel R, Van Oorschot RAH, Burchard EG, et al. Pacifiplex: An ancestry-informative SNP panel centred on Australia and the Pacific region. Forensic Science International: Genetics. 2016;20:71–80.

80. Daca-Roszak P, Pfeifer A, Zebracka-Gala J, Jarząb B, Witt M, Ziętkiewicz E. EurEAs-Gplex - A new SNaPshot assay for continental population discrimination and gender identification. Forensic Science International: Genetics. 2016;20:89–100.

81. De La Puente M, Santos C, Fondevila M, Manzo L, Carracedo, Lareu M V., et al. The Global AIMs Nano set: A 31-plex SNaPshot assay of ancestry-informative SNPs. Forensic Science International: Genetics. 2016;22:81–8.

82. Kidd KK, Speed WC, Pakstis AJ, Furtado MR, Fang R, Madbouly A, et al. Progress toward an efficient panel of SNPs for ancestry inference. Forensic Science International: Genetics. 2014;10(1):23–32.

83. Kidd JR, Friedlaender FR, Speed WC, Pakstis AJ, De La Vega FM, Kidd KK. Analyses of a set of 128 ancestry informative single-nucleotide polymorphisms in a global set of 119 population samples. Investigative Genetics. 2011;2(1):1.

84. Kosoy R, Nassir R, Tian C, White PA, Butler LM, Silva G, et al. Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. Human Mutation. 2009;30(1):69–78.

85. Bülbül Ö, Filoğlu G. Biyocoğrafik Soy Tahmini ve Adli Bilimlerde Kullanımı. The Bulletin of Legal Medicine. 2019;24(2):131–40.

86. Budowle B, Van Daal A. Forensically relevant SNP classes. BioTechniques. 2008;44(5):603–10.

87. Kayser M, Schneider PM. DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: Motivations, scientific challenges, and ethical considerations. Forensic Science International: Genetics. 2009;3(3):154–61.

88. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, et al. Epigenetic predictor of age. PLoS ONE. 2011;6(6).

89. Grimes EA, Noake PJ, Dixon L, Urquhart A. Sequence polymorphism in the human melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype. Forensic Science International. 2001;122(2–3):124–9.

90. Valenzuela RK, Henderson MS, Walsh MH, Garrison NA, Kelch JT, Cohen-Barak O, et al. Predicting phenotype from genotype: Normal pigmentation. Journal of Forensic

Sciences. 2010;55(2):315–22.

91. Pośpiech E, Karłowska-Pik J, Marcińska M, Abidi S, Andersen JD, Berge M Van Den, et al. Evaluation of the predictive capacity of DNA variants associated with straight hair in Europeans. Forensic Science International: Genetics. 2015;19:280–8.

92. Ibarrola-Villava M, Hu HH, Guedj M, Fernandez LP, Descamps V, Basset-Seguin N, et al. MC1R, SLC45A2 and TYR genetic variants involved in melanoma susceptibility in Southern European populations: Results from a Meta-analysis. European Journal of Cancer. 2012;48(14):2183–91.

93. Bulbul O, Filoglu G, Altuncul H, Aradas AF, Ruiz Y, Fondevila M, et al. A SNP multiplex for the simultaneous prediction of biogeographic ancestry and pigmentation type. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2011;3(1):e500–1.

94. Branicki W, Brudnik U, Wojas-Pelc A. Interactions Between HERC2, OCA2 and MC1R May Influence Human Pigmentation Phenotype.

95. Parra EJ, Kittles RA, Shriver MD. Implications of correlations between skin color and genetic ancestry for biomedical research. Vol. 36, Nature Genetics. 2004.

96. Parra EJ. Human pigmentation variation: Evolution, genetic basis, and implications for public health. Yearbook of Physical Anthropology. 2007;50:85–105.

97. Jablonski NG, Chaplin G. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;107(SUPPL. 2):8962–8.

98. Ito S, Wakamatsu K, Ozeki H. Chemical Analysis of Melanins and its Application to the Study of the Regulation of Melanogenesis. Pıgment Cell Res. 2000;13:103–9.

99. Sturm RA, Duffy DL. Human pigmentation genes under environmental selection. Genome Biology. 2012;13(9).

100. Quevedo WC, Holstein TJ. General Biology of Mammalian Pigmentation. The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology: Second Edition. 2007;61–90.

101. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A. Heterogeneity of neural crest-derived melanocytes. Central European Journal of Biology. 2013;8(4):315–30.

102. Rees JL. Genetics of Hair and Skin Color. Annual Review of Genetics. 2003;37:67–90.

103. Chaplin G. Geographic Distribution of Environmental Factors Influencing Human Skin Coloration. J Phys Anthropol. 2004;125:292–302.

104. Sturm RA, Box NF, Ramsay M. Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. Vol. 20, BioEssays. John Wiley & Sons, Inc; 1998.

105. Branicki W, Brudnik U, Kupiec T, Wolan P, Wojas-Pelc A. Determination of Phenotype Associated SNPs in the MC1R Gene Ã. 2006;

106. Harding RM, Healy E, Ray AJ, Ellis NS, Flanagan N, Todd C, et al. Evidence for variable selective pressures at MC1R. American Journal of Human Genetics. 2000;66(4):1351–61.

107. Tobin DJ. Human hair pigmentation-biological aspects. International Journal of Cosmatic Science.

108. White D, Rabago-Smith M. Genotype-phenotype associations and human eye color. Vol. 56, Journal of Human Genetics. 2011. p. 5–7.

109. Sturm RA, Larsson M. Genetics of human iris colour and patterns. Pigment Cell and Melanoma Research. 2009;22(5):544–62.

110. Sturm RA, Duffy DL, Zhao ZZ, Leite FPN, Stark MS, Hayward NKK, et al. A Single SNP in an Evolutionary Conserved Region within Intron 86 of the HERC2 Gene Determines Human Blue-Brown Eye Color. American Journal of Human Genetics. 2008;82(2):424–31.

111. Walsh S, Wollstein A, Liu F, Chakravarthy U, Rahu M, Seland JH, et al. DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. Forensic Science International: Genetics. 2012 May 1;6(3):330–40.

112. Lee ST, Nicholls RD, Jong MTC, Fukai K, Spritz RA. Organization and sequence of the human P gene and identification of a new family of transport proteins. Genomics. 1995 Mar 20;26(2):354–63.

113. Brilliant MH. The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. Pigment Cell Research. 2001;14(2):86–93.

114. Frudakis T, Thomas M, Gaskin Z, Venkateswarlu K, Chandra KS, Ginjupalli S, et al. Sequences Associated with Human Iris Pigmentation. Vol. 165, Genetics. 2003.

115. Ancans J, Tobin DJ, Hoogduijn MJ, Smit NP, Wakamatsu K, Thody AJ. Melanosomal pH Controls Rate of Melanogenesis, Eumelanin/Phaeomelanin Ratio and Melanosome Maturation in Melanocytes and Melanoma Cells. Experimental Cell Research. 2001 Aug 1;268(1):26–35.

116. Rosemblat S, Durham-Pierre D, Gardner JM, Nakatsu Y, Brilliant MH, Orlow SJ. Identification of a melanosomal membrane protein encoded by the pink-eyed dilution (type II oculocutaneous albinism) gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994;91(25):12071–5.

117. Branicki W, Szczerbińska A, Brudnik U, Wolańska-Nowak P, Kupiec T. The OCA2 gene as a marker for eye colour prediction. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2008 Aug 1;1(1):536–7.

118. Sturm RA, Teasdale RD, Box NF. Human pigmentation genes: Identification, structure and consequences of polymorphic variation. Vol. 277, Gene. Elsevier; 2001. p. 49–62.

119. Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL. The HERC proteins: Functional and evolutionary insights. Cellular and Molecular Life Sciences. 2005;62(16):1826–38.

120. Ji Y, Rebert NA, Joslin JM, Higgins MJ, Schultz RA, Nicholls RD. Structure of the highly conserved HERC2 gene and of multiple partially duplicated paralogs in human. Vol. 10, Genome Research. 2000.

121. Eiberg H, Troelsen J, Nielsen M, Mikkelsen A, Mengel-From J, Kjaer KW, et al. Blue

eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the HERC2 gene inhibiting OCA2 expression. Hum Genet. 2008;123:177–87.

122. Dooley CM, Schwarz H, Mueller KP, Mongera A, Konantz M, Neuhauss SCF, et al. Slc45a2 and V-ATPase are regulators of melanosomal pH homeostasis in zebrafish, providing a mechanism for human pigment evolution and disease. Pigment Cell and Melanoma Research. 2013;26(2):205–17.

123. Bin BH, Bhin J, Yang SH, Shin M, Nam YJ, Choi DH, et al. Membrane-associated transporter protein (MATP) regulates melanosomal pH and influences tyrosinase activity. PLoS ONE. 2015;10(6).

124. Newton JM, Cohen-Barak O, Hagiwara N, Gardner JM, Davisson MT, King RA, et al. Mutations in the Human Orthologue of the Mouse underwhite Gene (uw) Underlie a New Form of Oculocutaneous Albinism, OCA4. The American Journal of Human Genetics. 2001 Nov 1;69(5):981–8.

125. Rundshagen U, Zühlke C, Opitz S, Schwinger E, Käsmann-Kellner B. Mutations in the MATP Gene in Five German Patients Affected by Oculocutaneous Albinism Type 4. Human Mutation. 2004;23(2):106–10.

126. Sturm RA. A golden age of human pigmentation genetics. Vol. 22, Trends in Genetics. Elsevier Current Trends; 2006. p. 464–8.

127. Graf J, Hodgson R, Van Daal A. Single nucleotide polymorphisms in the MATP gene are associated with normal human pigmentation variation. Human Mutation. 2005;25(3):278–84.

128. Praetorius C, Grill C, Stacey SN, Metcalf AM, Gorkin DU, Robinson KC, et al. XA polymorphism in IRF4 affects human pigmentation through a tyrosinase-dependent MITF/TFAP2A pathway. Cell. 2013;155(5):1022.

129. Han J, Kraft P, Nan H, Guo Q, Chen C, Qureshi A, et al. A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation. PLoS Genetics. 2008;4(5).

130. Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Jakobsdottir M, et al. Two newly identified genetic determinants of pigmentation in Europeans. Nature Genetics. 2008;40(7):835–7.

131. Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte–stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. Nature Genetics. 1995;11(3):328–30.

132. Zorina-Lichtenwalter K, Lichtenwalter RN, Zaykin D V., Parisien M, Gravel S, Bortsov A, et al. A study in scarlet: MC1R as the main predictor of red hair and exemplar of the flip-flop effect. Human Molecular Genetics. 2019;28(12):2093–106.

133. Gantz I, Yamada T, Tashiro T, Konda Y, Shimoto Y, Miwa H, et al. Mapping of the Gene Encoding the Melanocortin-1 (α-Melanocyte Stimulating Hormone) Receptor (MC1R) to Human Chromosome 16q24.3 by Fluorescence in Situ Hybridization. Genomics. 1994 Jan 15;19(2):394–5.

134. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. Nature. 2007;445(7130):843–50.

135. Smith R, Healy E, Siddiqui S, Flanagan N, Steijlen PM, Rosdahl I, et al. Melanocortin 1 Receptor Variants in an Irish Population. Journal of Investigative Dermatology. 1998 Jul 1;111(1):119–22.

136. Mengel-Jørgensen J, Eiberg H, Børsting C, Morling N. Genetic screening of 15 SNPs in the MC1R gene in relation to hair colour in Danes. International Congress Series. 2006;1288:55–7.

137. Voisey J, Box NF, Van Daal A. A polymorphism study of the human Agouti gene and its association with MC1R. Pigment Cell Research. 2001;14(4):264–7.

138. Kanetsky PA, Swoyer J, Panossian S, Holmes R, Guerry DP, Rebbeck TR. A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation. American Journal of Human Genetics. 2002;70(3):770–5.

139. Meziani R, Gérard B, Matichard E, Bertrand G, Grandchamp B, Soufir N, et al. Association study of the g.8818A > G polymorphism of the human agouti gene with melanoma risk and pigmentary characteristics in a French population [1]. Journal of Dermatological Science. 2005;40(2):133–6.

140. King TE, Fortes GG, Balaresque P, Thomas MG, Balding D, Delser PM, et al. ARTICLE Identification of the remains of King Richard III. 2014;

141. Olalde I, Allentoft ME, Sánchez-Quinto F, Santpere G, K Chiang CW, DeGiorgio M, et al. Derived immune and ancestral pigmentation alleles in a 7,000-year-old Mesolithic European. 2014;

142. Lalueza-Fox C, Römpler H, Caramelli D, Stäubert C, Catalano G, Hughes D, et al. A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. Science. 2007;318(5855):1453–5.

143. Purps J, Geppert M, Nagy M, Roewer L. Evaluation of the IrisPlex eye colour prediction tool in a German population sample. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2011;3(1):e202–3.

144. Walsh S, Chaitanya L, Breslin K, Muralidharan C, Agnieszka Bronikowska ·, Pospiech E, et al. Global skin colour prediction from DNA. Hum Genet. 2017;136:847–63.

145. Chaitanya L, Breslin K, Zuñiga S, Wirken L, Pośpiech E, Kukla-Bartoszek M, et al. The HIrisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. Forensic Science International: Genetics. 2018 Jul 1;35:123–35.

146. Ruiz Y, Phillips C, Gomez-Tato A, Alvarez-Dios J, Casares De Cal M, Cruz R, et al. Further development of forensic eye color predictive tests. Forensic Science International: Genetics. 2013 Jan 1;7(1):28–40.

147. Söchtig J, Phillips C, Maroñas O, Gómez-Tato A, Cruz R, Alvarez-Dios J, et al. Exploration of SNP variants affecting hair colour prediction in Europeans.

148. Maroñas O, Phillips C, Söchtig J, Gomez-Tato A, Cruz R, Alvarez-Dios J, et al.

Development of a forensic skin colour predictive test. Forensic Science International: Genetics. 2014 Nov 1;13:34–44.

149. Allwood JS, Harbison SA. SNP model development for the prediction of eye colour in New Zealand. Forensic Science International: Genetics. 2013 Jul 1;7(4):444–52.

150. Wurmbach E, Hart KL, Kimura SL, Mushailov V, Budimlija ZM, Prinz M, et al. Improved eye-and skin-color prediction based on 8 SNPs Forensıc Scıence. J. 2013;54:248–56.

151. Malkoc E, Neuteboom W. The current status of forensic science laboratory accreditation in Europe. Forensic Science International. 2007;167(2–3):121–6.

152. Kahya S, Buyukcangaz E, Carli T, Reaction PC. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2014;32(1):31–8.

153. Applied Biosystem SNaPshot Kit Analysis Getting Started Guide. 2009;

154. TS EN ISO/IEC 17025:2017, Türk Standardları Enstitüsü. 2017;

155. Butler JM. Quality Assurance and Validation.Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Advanced Topics in Forensic DNA Typing. 2012. 167–211 p.

156. Filoğlu G, Altunçöl H, Bülbül Ö. Validasyon (Geçerli Kılma) ve Verifikasyon (Doğrulama). Adli Genetik ve Genetik Kimliklendirme,. 2021. 440 p.

157. Methods A. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods Validation Guidelines for DNA Analysis Methods. 2004;(July):1–13.

158. Raymaekers M, Smets R, Maes B, Cartuyvels R. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2009;23(3):145–51.

159. ENFSI DNA Workıng Group. Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process. 2010;(001):1–11.

160. Yılmaz A. Kimyasal Analizlerde Metot Validasyonu ve Verifikasyonu. Turklab Rehber. 2017;01(0212):54.

161. Balanovska E, Lukianova E, Kagazezheva J, Maurer A, Leybova N, Agdzhoyan A, et al. Optimizing the genetic prediction of the eye and hair color for North Eurasian populations. BMC Genomics. 2020 Sep 10;21.

162. Junker K, Staadig A, Sidstedt M, Tillmar A, Hedman J. Phenotype prediction accuracy – A Swedish perspective. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2019;7(1):384–6.

163. Pośpiech E, Teisseyre P, Mielniczuk J, Branicki W. Predicting Physical Appearance from DNA Data—Towards Genomic Solutions. Genes. 2022;13(1).

164. Beck T, Hastings RK, Gollapudi S, Free RC, Brookes AJ. GWAS Central: A comprehensive resource for the comparison and interrogation of genome-wide association studies. European Journal of Human Genetics. 2014;22(7):949–52.

165. Liu F, Visser M, Duffy DL, Hysi PG, Jacobs LC, Lao O, et al. Genetics of skin color variation in Europeans: genome-wide association studies with functional follow-up. Human Genetics. 2015;134:823–35.

166. Stranger BE, Stahl EA, Raj T. Progress and promise of genome-wide association studies for human complex trait genetics. Genetics. 2011;187(2):367–83.

167. Bülbül Ö, Argaç D, Shahzad MS, Filoğlu G, Altınçul H. Kimliklendirme ve Nesep Tayini İçin Otozomal SNP Lokuslarının Belirlenmesi. Turkiye Klinikleri J Foren Med. 2013;10(1):7–13.

168. Walsh S, Kayser M. A practical guide to the HIrisPlex system: Simultaneous prediction of eye and hair color from DNA. Methods in Molecular Biology. 2016;1420:213–31.

169. Bulbul O, Phillips C, Argac D, Shahzad MS, Fondevilla M, Acar E, et al. Internal validation of 29 autosomal SNP multiplex using a ABI 310 genetic analyser. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2009 Dec 1;2(1):129–30.

170. Sanchez JJ, Børsting C, Hallenberg C, Buchard A, Hernandez A, Morling N. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs - A model with 35 Y chromosome SNPs. Forensic Science International. 2003;137(1):74–84.

171. Salvo NM, Janssen K, Kirsebom MK, Meyer OS, Berg T, Olsen GH. Predicting eye and hair colour in a Norwegian population using Verogen's ForenSeq™ DNA signature prep kit. Forensic Science International: Genetics. 2022;56(September 2021).

172. Al-Rashedi NA, Mousa Mandal A, ALObaidi LA. Eye color prediction using the IrisPlex system: a limited pilot study in the Iraqi population.

173. Kukla-Bartoszek M, Teisseyre P, Pośpiech E, Karłowska-Pik J, Zieliński · Piotr, Woźniak A, et al. Searching for improvements in predicting human eye colour from DNAexome sequencing · Eye colour · DNA phenotyping · Predictive modelling · Machine learning algorithms. International Journal of Legal Medicine. 2021;135(3):2175–87.

174. Freire-Aradas A, Ruiz Y, Phillips C, Maroñas O, Söchtig J, Tato AG, et al. Exploring iris colour prediction and ancestry inference in admixed populations of South America. Forensic Science International: Genetics. 2014 Nov 1;13:3–9.

175. Bulbul O, Zorlu T, Filoglu G. Prediction of human eye colour using highly informative phenotype SNPs (PISNPs). Australian Journal of Forensic Sciences. 2020;52(1):27–37.

176. Dembinski GM, Picard CJ. Evaluation of the IrisPlex DNA-based eye color prediction assay in a United States population. Forensic Science International: Genetics. 2014;9(1):111–7.

177. Kastelic V, Pośpiech E, Draus-Barini J, Branicki W, Drobnič K. Prediction of eye color in the slovenian population using the irisPlex SNPs. Croatian Medical Journal. 2013;54(4):381–6.

178. Carratto TMT, Marcorin L, do Valle-Silva G, de Oliveira MLG, Donadi EA, Simões AL, et al. Prediction of eye and hair pigmentation phenotypes using the HIrisPlex system in a Brazilian admixed population sample. International Journal of Legal Medicine. 2021;135(4):1329–39.

179. Balanovska E, Lukianova E, Kagazezheva J, Maurer A, Leybova N, Agdzhoyan A, et al. Optimizing the genetic prediction of the eye and hair color for North Eurasian populations. BMC Genomics. 2020;21.

180. Singh, J., Kaur, E., Dhiman, S., Kaur, J., Tripathi, H., Sood, A., & Rohatgi S. Eye Optics : A Unique Blink in Forensic Identification. International Journal of Health Sciences. 2022;6(April):4188–200.

EKLER

Ek:1 İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu Kararı

Ek 2: Asgari Bilgiliendirilmiş Gönüllü Olur Formu

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

1. **"Göz ve Saç Rengini Belirleyen SNP Panelinin Optimizasyonu ve Validasyonu"** adlı bu çalışma bir araştırma olup, akademik amaçla yapılmaktadır.
2. **Araştırmanın amacı:**

Adli Bilimlerde bir suçun aydınlatılması için genetik bilgiden yararlanılmaktadır. Özellikle soruşturma aşamasında şüphelinin olmadığı durumlarda faile ait olduğu düşünülen herhangi bir biyolojik delilden (kan lekesi, seman tükürük gibi.) kişinin dış görünüşüne ait fikir verebilecek herhangi bir bilginin DNA yoluyla bulunması soruşturmanın aydınlatılması için oldukça önemlidir. Böylece Polis, Jandarma ve Savcılık birimlerince şüphelinin moleküler robotik görüntüsü elde edilerek aranan şüpheliye daha kolay ulaşılabilecektir Söz konusu olguların çözümünü sağlayacak OCA2, SLC24A4, SLC45A2 gibi pigmentasyonla ilgili gen bölgelerinde yer alan spesifik SNP varyantları kişilerin ten, saç ve göz renginin belirlenmesinde kullanılmaktadır. **Bu nedenle, bu çalışmanın amacı; göz ve saç rengi ile ilgili bilgi veren SNP markırlarını içeren bir SNP multipleksi olan HIRISPLEX paneli kullanılmasıdır. Bu çalışma sonunda olay yerinden gelen örneklerde (saç, kan lekesi, parmak izi…) kişinin fiziksel özellikleri (saç ve göz rengi) hakkında güvenilir bir bilgiye varılması amaçlanmaktadır.**

3. **Araştırmada uygulanacak tedaviler:**

Araştırmanın deneysel kısımları; gönüllüden alınan Göz ve saç rengi bilinen 100 gönüllü alınacak ağız içi sürüntü örneklerinin çalışılması planlanmaktadır. Gönüllülerden ağız içi sürüntü örneği almak dışında hiçbir müdahale ya da tedavide bulunulmayacaktır.

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

Gönüllülere herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.

5. Araştırma sırasında uygulanacak olan invazif yöntemler dahil olmak üzere izlenecek veya gönüllüye uygulanacak yöntemlerin tümü:

Gönüllülerden sadece açız içinden ağız içi sürüntüla sürüntü örneği alınacaktır.

6. Gönüllünün sorumlulukları:

Gönüllünün bu çalışmayla ilgili ağız içi ağız içi sürüntü-sürüntü örneği vermekten başka hiçbir yükümlülüğü yoktur.

7. Araştırmanın deneysel kısımları:

Bu çalışmada, çalışmaya rıza gösteren İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü öğrencilerinden ve gönüllülerden oluşan yaklaşık 100 kişiden alınan ağız içi ağız içi sürüntü örnekleri kullanılacaktır. Araştırmanın laboratuvar aşaması ise altı bölümden oluşmaktadır: DNA izolasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılarak hedef bölgelerin çoğaltılması işlemi gerçekleştirilecektir, PCR ürünlerinin elektroforezi ve analizi yapılacaktır (ABI 310 Genetic Analyzer, GeneMapper Software). Sürüntü örneğinden DNA izole edilecek, miktarı belirlenecek, PCR tekniği ile 24 SNP lokusu (Pigmentasyon ile ilgili gen bölgesi) çoğaltılacak ve PCR ürünlerinin

ABI 310 Genetik Analiz cihazında analizi yapılacaktır. Laboratuar aşaması tamamlandıktan sonra sonuçların değerlendirmesi istatiksel programlar iki farklı yöntemle yapılacaktır. Bayes teoriminin uygulandığı Snipper programı (http://mathgene.usc.es/snipper/hairclassifier.html) sistem içinde yer alan verileri kullanılarak göz rengini mavi, yeşil ve kahverengi olacak şekilde saç rengini ise açık/koyu veya kırmızı, sarı, kahverengi veya siyah olarak tahmin etmektedir. Multinominal regresyon analizinin kullanıldığı ikinci yöntem olan Hirisplex tahmin yönteminde göz rengi mavi veya yeşil saç rengi ise kırmızı, sarı, kahverengi veya siyah olarak tahmin edilmektedir

8. Gönüllünün (araştırma hamilelerde veya loğusalarda yapılacak ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının) maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar:

Gönüllüden sadece ağız içi sürüntü örneği alınacaktır. Bu özel pamuklu bir çubukla alınacağından herhangi bir madde ya da kimyasal içermemektedir. Dolayısıyla pamuklu çubukla örnek alınmasının hiçbir riski yoktur.

9. Araştırmadan makul ölçüde beklenen yararlarla ilgili olarak gönüllü açısından hedeflenen herhangi bir klinik yarar olmadığında gönüllünün bu durum hakkında bilgilendirildiği:

OCA2, SLC24A4, SLC45A2 gibi pigmentasyonla ilgili gen bölgelerinde yer alan spesifik SNP varyantları kişilerin ten, saç ve göz renginin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada göz ve saç rengi ile ilgili bilgi veren SNP markırlarını içeren bir SNP multipleksi olan HIRISPLEX paneli kullanılacaktır. HIRISPLEX panelinde bulunan 24 SNP bölgesi çalışılacaktır. Bu çalışma sonunda olay yerinden gelen örneklerde (saç, kan lekesi, parmak izi…) kişinin fiziksel özellikleri (saç ve göz rengi) hakkında güvenilir bir bilgiye varılması amaçlanmaktadır. Gönüllü açısından hedeflenen bölgeler ile ilgili herhangi bir klinik yarar yoktur.

10. Gönüllüye uygulanabilecek olan alternatif yöntemler veya tedavi şeması ve bunların olası yarar ve riskleri:

Gönüllüye herhangi bir girişim ya da tedavide bulunulmayacaktır.

11. İlgi mevzuat gereğince gerekiyorsa, gönüllüye verilecek tazminat veya sağlanacak tedaviler:

Gönüllülere yapılacak işlem sadece ağız içinden pamuklu çubuk ağız içi sürüntü ile sürüntü örneği almak olup bu işlem sırasında katılımcılarda doğabilecek hukuki ve mali riskleri proje yürütücüsü olarak tamamen üstlendiğimi bildiririm.

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

Gönüllüler için herhangi bir ulaşım, yemek gibi masraf ödenmeyecektir.

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

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

14. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimlerinin bulunabileceği, ancak bu bilgilerin gizli tutulacağı, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla gönüllü veya yasal temsilcisinin söz konusu erişime izin vermiş olacağı:

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

15. İlgili mevzuat gereğince gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanamayacağı; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliğinin gizli kalacağı:

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

16. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya yasal temsilcisinin zamanında bilgilendirileceği:

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

17. Gönüllünün araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler ile bunlara günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları:

Gönüllünün araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir bilgi temin edebilmesi için proje yürütücü İlksen Tavacı'ya ait günün 24 saatinde ulaşabileceği telefon numarası .....'dır.

18. Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:

Gönüllünün araştırma grubundaki diğer gönüllüler ile akrabalık bağı olması ya da ağız içi sürüntü örneğinden herhangi bir nedenle DNA elde edilememesi durumunda katılım sona erdirilir.

19. Gönüllünün araştırmaya devam etmesi için öngörülen süre:

Gönüllüden ağız içi sürüntü örneği alındıktan sonra hiçbir sorumluluğu olmaycaktır. Gönüllünün ağız içi sürüntü örneği çalışma süresince (1 yıl) saklanacak olup, çalışma sonuçlanınca imha edilecektir.

20. Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı:

Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı, çalışmaya rıza gösteren yaklaşık 100 kişi olacaktır.

21. Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyallerin hangi amaçla kullanılacağı,

Gönüllülerden elde edilecek olan ağız içi ağız içi sürüntü-sürüntü örneğinden öncelikle DNA izolasyonu yapılacak, ardından çalışmadaki 24 SNP bölgesi PCR ile çoğaltılıp kapiller elektroforez ile yürütülerek analiz edilecek. DNA örnekleri yardımı ile çalışmadaki 24 SNP bölgesinin adli fenotiplemede kullanılması için gerekli optimizasyon ve validasyon çalışması yapılmış olacaktır.

22. Biyolojik materyallerin analizlerinin yurdışında yapılıp yapılmayacağı hususunun açıklanması,

Biyolojik materyallerin analizleri kesinlikle yurdışında yapılmayacak olup; çalışma, İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü laboratuvarlarında yapılacaktır.

23. **"*Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum*."** İfadesi gönüllünün kendi el yazısı ile yazılacaktır.

24. **"*Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum*."** İfadesi gönüllünün kendi el yazısı ile yazılacaktır.

25. Gönüllünün adı / soyadı / imzası / tarih

26. Araştırma ekibinde yer alan ve yetkin bir araştırmacının adı / soyadı / imzası / tarih

27. Gerekli durumda tanık olan kişinin adı / soyadı / imzası / tarih

28. Gerekli durumda yasal temsilcinin adı / soyadı / imzası / tarih

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

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

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

*"**Göz ve Saç Rengini Belirleyen SNP Panelinin Optimizasyonu ve validasyonu**" adlı araştırma kapsamında alınan ağız içi sürüntünün (Gönüllü tarafından uygun olan şık işaretlenmelidir)*

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

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

☐ *Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum."*

Gönüllünün Adı:
Gönüllünün Soyadı:
Gönüllünün Yaşı:
Gönüllünün Cinsiyeti:
Saç Rengi:
Göz Rengi:
Ten Rengi:
Gönüllünün Annesinin Nereli Olduğu:
Gönüllünün Babasının Nereli Olduğu:
Gönüllünün Boy Uzunluğu:
Gönüllünün Yüz yapısı:
Gönüllünün İmzası:

Araştırmacının Adı: Uzm Bio.İlksen
Araştırmacının Soyadı: Tavacı
Araştırmacının İmzası:

Tarih: **Tarih:**

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

Ek 3: 149 gönüllüye ait genotip sonuçları

SNP	SNP Kodu	Alel	TR_XY_08	TR_X_20	TR_X_03	TR_X_33	TR_Y_70	T12_XY_01	T12_XY_03	T12_XY_05	T12_XY_014	T12-XX-027	T12-XX-029	T12-XY-030	T12-XY-035	T12-XY-037	T17_XX_2	T17-XY-3	T17_XY_14	T17-XY-15	T17_XY_20	T17_XY_21	T17_XY_22	T17_XY_27	T17_XY_28	T17_XY_29	T17_XY_31
N29insA	P1	C-insA	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1154746	P2	G-A	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs885479	P3	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	NA	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805008	P4	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805005	P5	G-T	GG	GG	GG	GG	GG	NA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GT	GG	GT	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs1805006	P6	C-A	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805007	P7	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805009	P8	G-C	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GC	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
Y152OCH	P9	C-A	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
RS2228479	P10	G-A	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GG	AA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs1110400	P11	T-C	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs28777	P12	A-C	AA	CC	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AC	AA	CA	AA	AA	AA	AA	AA	AC	AC	AA	AA	AA	AA
rs1689198	P13	G-C	GC	CC	GC	GC	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GC	GC	GG	GC	CC	GG	GG	GG	GC	GC	GC	CG	GG	GC	GC
rs1282125	P14	A-G	AA	AA	NA	NA	NA	NA	AA	GG	AA	AA	GG	GG	GG	GA	AA	AA	NA	GG	NA	NA	AA	AA	AA	AA	NA
rs4959270	P15	C-A	CA	AA	CA	CC	CA	CC	CA	CA	AA	CC	CA	CC	CC	AA	CA	CA	CA	CC	CA	AA	CC	CC	CC	CC	CC
rs1220359	P16	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1042602	P17	G-T	GG	GG	GG	GG	GT	GG	GT	GG	GT	GT	GT	GG	TT	TT	GG	GG	GT	GT	GT	TT	GG	TT	GT	GG	GG
rs1800407	P18	G-A	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs2402130	P19	A-G	GA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	GA	AA	GA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	GA	AA	AA
rs1291383	P20	C-T	TT	CT	CT	TT	CT	CC	CC	TT	CC	CT	CC	CT	TT	CT	CC	TT	CC	CC	CT	CC	CT	CC	CC	TT	CT
rs2378249	P21	T-C	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	CT	TT	CT	TT	TT	CT	CT	CT	CC	CT	CT	CT	TT	TT	TT	TT	TT
rs1289639	P22	T-G	GG	GG	GG	GG	GG	TT	GG	GT	GG	GT	TT	GT	GG	GG	GG	GT	TT	GT	GG	TT	GG	TT	GG	GT	GG
rs1393350	P23	C-T	CC	TC	NA	NA	CC	CC	TT	TT	CT	TT	CC	CC	CC	TT	CC	CT	TT	CC	NA	TT	CC	TT	CC	CC	CC
rs683	P24	T-G	GT	TT	GG	GG	GT	TT	GT	TT	GG	GG	GT	GT	GG	TT	GG	GT	GG	GT	GG	GT	GT	TT	GG	GG	GT

SNP	SNP Kodu	Alel	T17_XY_32	T17-XY-033	T17-XY-034	T18_XX_003	T18_XX_004	T18_XY_007	T18_XX_040	T18_XY_0 42	T18_XY_0 43	T18_XY_0 44	T18_XX_0 45	T18_XY_0 47	T18_XY_0 48	T18_XY_0 49	T18_XY_0 53	T18_XX_0 57	T18_XY_0 60	T18_XX_0 61	T18_XX_0 67	T18_XX_0 75	T18_XY_0 76	T18_XY_0 77	T18_XY_0 78	T18_XY_0 80	T18_XX_0 81
N29insA	P1	C-insA	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	NA	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1154746	P2	G-A	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs885479	P3	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805008	P4	C-T	TT	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805005	P5	G-T	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	TT	GG	GG	GT	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs1805006	P6	C-A	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CA	CC	CC	CA	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805007	P7	C-T	CT	CC	CC	CC	CT	CC	CT	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805009	P8	G-C	GC	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
Y152OCH	P9	C-A	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
RS2228479	P10	G-A	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs1110400	P11	T-C	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs28777	P12	A-C	CA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	NA	AA	AC	AA	AA	AA	AA	NA	NA	NA	AA	NA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs1689198	P13	G-C	GC	GG	GG	GG	GG	GG	GC	CC	GG	GC	GG	GG	GG	CC	GC	GG	GC	GG	NA	GC	GG	GG	GC	GG	GG
rs1282125	P14	A-G	AA	NA	AA	AA	NA	AA	AA	AA	CC	AA	NA	AG	NA	AA	NA	NA	NA	NA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs4959270	P15	C-A	CC	CA	CA	CA	CA	CA	CC	AA	CC	CC	CA	CA	AA	CC	CC	CC	CA	CC	CC	CA	CC	CA	CA	CC	CC
rs1220359	P16	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CT	TT	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1042602	P17	G-T	GG	GG	GG	TT	GG	GG	GG	GG	GG	GT	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	TT	NA	GG	NA	GG
rs1800407	P18	G-A	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	AA	GG	GA	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA
rs2402130	P19	A-G	AA	AA	AA	GA	AA	GA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	TT	AA	AA	AA	GA	AA	GA	GG	AA	NA	AA	AA	AA
rs1291383	P20	C-T	TT	TT	CT	TT	CC	CT	CC	CC	TT	TT	TT	CC	TT	TT	TT	CC	TT	CC	CC	CT	TT	CC	CC	CC	TT
rs2378249	P21	T-C	CT	CT	TT	TT	CT	TT	TT	CA	TT	TT	TT	CT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	CT	CT	TT	TT	TT
rs1289639	P22	T-G	GG	GG	GG	GG	GT	GT	TT	GG	GG	GG	GG	TT	GT	GG	GG	GG	GT	GG	GG	GG	GT	GG	GG	GG	GT
rs1393350	P23	C-T	TT	NA	CC	CC	NA	CT	CC	TT	NA	CC	NA	TT	NA	CT	NA	NA	TT	CC	CT	CC	CT	CT	CT	CT	CT
rs683	P24	T-G	GG	GT	GG	GT	GT	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GT	TT	GG	GG	GG	GG	TT	TT	GG	TT	GG	GG

SNP	SNP Kodu	Alel	T18_XX_082	T8_XY_083	T8_XY_084	T8_XY_085	T8_XX_086	T18_XX_089	T18_XX_091	T18_XY_105	T18_XX_106	T18_XX_107	T18_XX_109	T18_XX_111	T18_XX_113	T18_XX_114	T18_XX_115	T18_XX_116	T18_XX_117	T18_XX_118	T18_XX_119	T18_XY_120	T18_XX_121	T18_XY_122	T18_XY_123	T18_XX_125	T18_XX_127
N29insA	P1	C-insA	CC	CC	CC	CC	CC	NA	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1154746	P2	G-A	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs885479	P3	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC
rs1805008	P4	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805005	P5	G-T	GG	GG	GT	GT	GT	GG	GT	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs1805006	P6	C-A	CC	CC	CC	CA	AC	CC	CA	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805007	P7	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805009	P8	G-C	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GC	GG	GG
Y152OCH	P9	C-A	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
RS2228479	P10	G-A	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs1110400	P11	T-C	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs28777	P12	A-C	AA	NA	NA	AA	NA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	CC	AA	NA	AA	NA	AA	AA	AA	AA
rs1689198	P13	G-C	GC	GG	GC	GC	GG	GC	GC	GG	GC	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GC	CC	CC	GC	GC	GC	GG	GG	GC	GG
rs1282125	P14	A-G	AA	AA	NA	AA	NA	NA	AA	GA	AA	AA	AA	GA	NA	GA	AA	AA	NA	AA	AA	NA	NA	AA	NA	AA	AA
rs4959270	P15	C-A	CA	CA	CC	CC	CC	CA	CA	CA	CA	CA	CC	CA	CC	CC	CC	CC	CA	CA	CC	CC	CA	CC	CA	CC	CC
rs1220359	P16	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1042602	P17	G-T	GT	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	TT	GT	GT	GG	GT	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs1800407	P18	G-A	GG	GG	GG	AA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs2402130	P19	A-G	GG	AA	AA	AA	AA	AA	AA	GA	GG	GA	AA	AA	AA	AA	AA	GA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	GG	GA	AA
rs1291383	P20	C-T	TT	TT	CC	TT	TT	CT	CC	TT	TT	CC	TT	CT	TT	TT	CT	CT	CT	CC	TT	TT	CC	CC	CC	TT	CC
rs2378249	P21	T-C	TT	TT	TT	TT	TT	TT	CC	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	CT	TT	TT	CT	TT	CT	CT	TT	TT	TT	TT
rs1289639	P22	T-G	GT	TT	NA	TT	TT	GG	TT	GT	GG	GG	GT	GG	GG	GT	GT	GG	GT	TT	GT	GG	NA	GG	GG	GT	GT
rs1393350	P23	C-T	CC	CC	TT	CC	NA	TT	CC	TT	CT	CC	CC	CC	TT	CC	CC	CC	NA	TT	CC	CC	NA	CT	NA	CT	CC
rs683	P24	T-G	GT	GG	NA	TT	GG	NA	GG	TT	TT	TT	TT	GT	GG	GT	GT	GG	GT	GT	TT	GG	TT	GT	GT	GT	GT

SNP	SNP Kodu	Alel	T18_XX_128	T18_XX_129	T18_XX_130	T18_XX_131	T18_XY_132	T18_XY_133	T18_XX_134	T18_XY_151	T18_XX_152	T18_XX_153	T18_XX_154	T18_XX_155	T18_XX_157	T18_XX_160	T18_XX_162	T18_XY_163	T18_XX_164	T18_XX_165	T18_XX_167	T18_XY_168	T18_XX_169	T18_XX_171	T18_XX_172	T18_XY_173	T18_XY_174
N29insA	P1	C-insA	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1154746	P2	G-A	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs885479	P3	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805008	P4	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	TT	CC
rs1805005	P5	G-T	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs1805006	P6	C-A	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805007	P7	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805009	P8	G-C	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
Y152OCH	P9	C-A	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
RS2228479	P10	G-A	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs1110400	P11	T-C	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs28777	P12	A-C	AA	AA	NA	AA	AA	AA	CA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	NA	AC	AA	
rs1689198	P13	G-C	GG	GC	GG	GC	GG	GC	GC	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GC	GC	GG	GC	GC	GG	GG	GG	GG	GC	GC	CC
rs1282125	P14	A-G	AA	AG	AA	AA	AA	AA	GG	GG	AA	AA	NA	AA	NA	AA	AA	AA	AA	NA	AA	AA	NA	NA	AA	AA	
rs4959270	P15	C-A	CA	CA	AA	CA	CA	CC	CC	CA	CA	AC	AA	CC	CA	CA	CA	CA	CA	CC	CA	CA	CA	CA	CC	CA	AA
rs1220359	P16	C-T	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1042602	P17	G-T	GG	GG	GG	GG	GT	TT	GT	GG	GT	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	TT	GG	GG	GG	GG	GT	GG	TT	TT
rs1800407	P18	G-A	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GG	NA	GG	GG
rs2402130	P19	A-G	AA	AA	AA	GA	GA	AA	AA	AA	AA	GA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	GA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs1291383	P20	C-T	CC	CT	CT	TT	CT	TT	TT	TT	TT	TT	CT	CT	CT	CT	CC	CT	CT	CT	CC	CT	TT	CC	CT	CT	CC
rs2378249	P21	T-C	CT	CT	CT	TT	TT	TT	CC	TT	TT	TT	CT	TT	CT	TT	TT	TT	CT	TT	CC	CT	TT	TT	TT	TT	TT
rs1289639	P22	T-G	GG	GT	GG	GT	GT	GG	GT	GG	GT	TT	GG	GG	GG	GG	GT	TT	GG	GG	TT	GT	GG	GG	GG	GG	TT
rs1393350	P23	C-T	CT	CT	CC	CT	CC	CC	NA	CT	CC	CT	NA	CT	TT	GT	TT	NA	CC	CC	TT	CC	TT	CC	NA	CC	CC
rs683	P24	T-G	GT	GG	TT	GG	GG	TT	TT	GT	GG	GG	NA	GG	GG	GG	GT	GG	GT	GG	GT	GT	GT	GG	GG	GT	GG

SNP	SNP Kodu	Alel	T18_XY_175	T18_XY_176	T18_XY_177	T18_XY_178	T18_XY_179	T18_XX_180	T18_XY_181	T19_XY_002	T19_XY_003	T19_XX_004	T19_XX_006	T19_XX_007	T19_XX_009	T19_XY_011	T19_XX_012	T19_XY_015	T19_XY_020	T19_XY_022	T19_XY_026	T19_XX_027	T19_XX_028	T19_XX_029	T19_XX_030	T19_XX_031	T19_XX_032
N29insA	P1	C-insA	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	NA	CC	CC	CC
rs1154746	P2	G-A	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs885479	P3	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805008	P4	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805005	P5	G-T	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GT	GG	TT	TT	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs1805006	P6	C-A	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	GG	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805007	P7	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC
rs1805009	P8	G-C	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
Y152OCH	P9	C-A	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
RS2228479	P10	G-A	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs1110400	P11	T-C	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs28777	P12	A-C	AA	AA	CA	NA	NA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	CC	AA	AA	NA	NA	AA	AA	AA	AA	AA	CC	AA	AA	AA
rs1689198	P13	G-C	GG	GC	GC	CC	GG	GG	GG	GC	GC	CC	GC	CC	GC	GC	GC	GG	GG	GC	GC	GG	GC	GG	GC	GG	GG
rs1282125	P14	A-G	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	NA	AA	AA	AA	AA	NA	AA	AA	NA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
rs4959270	P15	C-A	CA	CC	CA	CC	AA	CA	CA	CC	CA	CA	CC	CA	CC	CA	CA	CA	AA	AA	CA	CA	AA	CC	AA	CA	CC
rs1220359	P16	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1042602	P17	G-T	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GT	GG	GG	GG	GT	GG	GT	GG	GG	GG	GG	GT	GG	GG	GT	GT	GT	TT	TT
rs1800407	P18	G-A	GG	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs2402130	P19	A-G	AA	GA	AA	GG	AA	AA	AA	AA	AA	AA	GA	AA	AA	AA	GA	GA	AA	AA	AA	GA	GA	GA	AA	GA	AA
rs1291383	P20	C-T	CT	TT	CT	TT	TT	CT	CT	TT	CT	CC	TT	TT	TT	CT	CT	CT	CC	CC	CC	TT	TT	CT	CT	TT	CT
rs2378249	P21	T-C	TT	TT	CC	TT	TT	TT	TT	CT	CC	CT	TT	TT	CT	TT	TT	TT	TT	CT	CT	CT	TT	CT	TT	TT	TT
rs1289639	P22	T-G	TT	GG	GG	GG	GT	GT	GT	GT	GG	GG	GG	GT	GT	GG	GG	GG	GG	GG	GT	GT	GT	GG	GT	TT	GG
rs1393350	P23	C-T	CT	CC	TT	CT	CT	NA	CC	NA	CT	CC	CC	TT	CC	CC	CT	NA	CC	NA	CT	CT	CT	CC	CC	NA	CC
rs683	P24	T-G	GT	NA	GT	GG	GG	GG	TT	GG	GG	GG	GG	GG	GT	GG	TT	NA	TT	TT	GG	GT	GG	GG	GT	GG	TT

SNP	SNP Kodu	Alel	T19_XX_033	T19_XX_034	T19_XX_044	T19_XY_047	T19_XY_049	T19_XX_050	T19_XY_054	T19_XY_055	T19_XX_057	T19_XX_059	T19_XX_066	T19_XY_070	T19_XX_072	T19_XY_073	T19_XX_083	T19_XX_084	T19_XX_091	T19_XX_092	T19_XY_094	T19_XY_097	T19_XX_101	T19_XY_104	T19_XY_0106	T19_XY_133
N29insA	P1	C-insA	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1154746	P2	G-A	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs885479	P3	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805008	P4	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805005	P5	G-T	GG	GG	GG	GT	GG	GG	GT	GT	GT	GG	GG	GG	GT	TT	GG	TT	GG	GG	TT	GG	GG	GG	TT	GT
rs1805006	P6	C-A	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	AA	CC	CC	CC
rs1805007	P7	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	TT	CC
rs1805009	P8	G-C	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
Y152OCH	P9	C-A	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
RS2228479	P10	G-A	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs1110400	P11	T-C	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs28777	P12	A-C	AA	AA	AA	NA	CA	AA	NA	NA	NA	AA	AA	NA	NA	AA	AA	CC	AA	AA	NA	AA	AA	AA	AA	AA
rs1689198	P13	G-C	GG	GG	GC	GG	GG	GC	GC	GG	GG	GG	GG	GC	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs1282125	P14	A-G	AA	AA	NA	NA	AA	AA	AA	NA	NA	AA	AA	NA	AA	AA	GG	AA	AA	AA	AA	AA	NA	AA	AA	AG
rs4959270	P15	C-A	CC	CC	CC	CA	CC	CA	CC	AA	CA	CC	CC	CC	CC	CA	CC	CC	CA	AA	CC	AA	CA	CA	CA	CC
rs1220359	P16	C-T	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1042602	P17	G-T	GT	GG	TT	NA	GT	GT	TT	GG	GG	TT	GG	GG	GG	TT	GT	NA	GG	GT	GG	GG	GG	TT	GG	GT
rs1800407	P18	G-A	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GA	GA	GG	GG	GG	GG	GG
rs2402130	P19	A-G	AA	AA	AA	AA	AA	GA	AA	AA	GA	GA	AA	AA	GA	AA	GA	GA	GA	AA	AA	AA	AA	GA	AA	AA
rs1291383	P20	C-T	TT	TT	TT	CT	TT	CT	CC	TT	CT	TT	CT	TT	CT	CC	TT	CC	TT	TT	TT	TT	CC	CT	TT	TT
rs2378249	P21	T-C	TT	TT	TT	TT	TT	CT	TT	TT	TT	TT	CT	TT	CT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	CT	TT	TT
rs1289639	P22	T-G	TT	GT	GG	GG	GT	GT	GG	GG	GG	GG	GT	GG	GG	GG	GG	TT	GT	TT	GT	GT	GG	GG	TT	TT
rs1393350	P23	C-T	CC	CC	CC	NA	CT	CC	CC	NA	NA	CC	NA	NA	TT	NA	CC	CT	CC	CC	CC	CC	NA	CT	CC	CT
rs683	P24	T-G	GT	TT	GT	GG	GT	GG	GG	NA	NA	GT	GT	NA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	NA	GG	NA	TT	GG	GT

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri
Adı Soyadı : İlksen SARI O
Doğum Yeri : İstanbul
e-posta :

Eğitim Bilgileri
Lise : 2003-2005 Küçükçekmece Lisesi, İstanbul
Lisans : 2007-2011 Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi- Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : 2011-2014 İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı
Yabancı Dil : İngilizce

İş Deneyimi : 2021-Halen İstanbul Gelişim Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

Tez ile ilgili tez süresi boyunca sunulan bildiriler ve yayınlar
Yayın:

İlksen Tavacı, Özlem Bülbül, Gönül Filoğlu, Havva Altunçul. Polymorphism of 15 X-Chromosome SNPs in the Turkish Population. Turkiye Klinikleri J Foren Sci Leg Med. 2020;17(3):238-44

İlksen Tavacı, Sümeyye Zülal Şimşek, Veysel Sapan, Cemaleddin Arslan, Faruk Aşıcıoğlu, Gönül Filoğlu, Özlem Bülbül. Optimization and Validation of HIrisPlex Panel for Predicting of the Eye and Hair Color. Turkiye Klinikleri J Foren Sci Leg Med. 2021;18(1):10-20

Dilara Devranoglu, Ilksen Tavaci, Gonul Filoglu and Ozlem Bulbul, Effect of Type of Degraded DNA Samples on Human Eye Color Prediction, Pakistan J. Zool., pp 1-9, 2021.

Bildiri:

İlksen Tavacı Sarı O, Gönül Filoğlu, Faruk Aşıcıoğlu, Özlem Bülbül Ercan, Internal optimization and validation of HIRISPLEX using a ABI 310 genetic analyzer, ITAC Science&Justice 2nd International Congress, 1-4 September, Istanbul Turkey, 2018 Oral Presantation

İlksen Tavacı Sarı O, Zülal Şimşek, Gönül Filoğlu, Faruk Aşıcıoğlu, Özlem Bülbül, Optimization and Validation of the Panel Determining Hair and Eye Color, 16th Congress of Forensic Science, 4-7 April, İzmir Turkey 2019, Oral Presantation

İlksen Tavacı Sarı O, Zülal Şimşek, Gönül Filoğlu, Faruk Aşıcıoğlu, Özlem Bülbül, Prediction of Eye and Hair Pigmentation Phenotypes Using the HIrisPlex System, UTAK 2021 3rd International Turaz Forensic Sciences, Forensic Medicine and Pathology Congress, 8-12 September, Bakü Azerbaijan, 2021 Oral Presantation