T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP ve ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Özlem Bülbül Ercan

NANOPORE DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE SNP PANELİNİN GELİŞTİRİLMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VEYSEL SAPAN

İSTANBUL, 2022

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP ve ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Özlem Bülbül Ercan

NANOPORE DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE SNP PANELİNİN GELİŞTİRİLMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VEYSEL SAPAN

İSTANBUL, 2020

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, birikim, güler yüz ve desteklerini eksik etmeyen değerli hocalarım ***Doç. Dr. Gönül Filoğlu Tüfek***, ***Doç. Dr. Özlem Bülbül Ercan'***a,

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, fikirlerime önem veren ve zorluklar karşısında pozitif enerjisiyle beni motive eden değerli danışman hocam ***Doç. Dr. Özlem Bülbül Ercan***'a,

Deneylerimde yardım ve desteklerini esirgemeyen ***Sümeyye Zülal Şimşek, Agata Podolańczuk ve Zehra Abik'***e,

Çok sevdiğim dostlarım ***Sadık İlik, SHÇK Halit Güveloğlu ve Gürkan Akgül'e***

Ve ***aileme*** teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Veysel Sapan

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ v

TABLOLAR DİZİNİ vii

KISALTMALAR DİZİNİ viii

Özet ve Anahtar Kelimeler 9

İngilizce Özet (Summary) 10

1. GİRİŞ ve AMAÇ 12

2. GENEL BİLGİLER 17

2.1. DNA Parmak İzinin Adli Bilimlerde Kullanımı 17

2.2. Adli Bilimlerde Kullanılan Genetik Belirteçler 19

2.2.1. STR (Short Tandem Repeats – Kısa Ardışık Tekrar Dizileri) 19

2.2.1.1. Otozomal STR Belirteçleri 20
2.2.1.2. Y Kromozomu STR Belirteçleri 22
2.2.1.3. X Kromozomu STR Belirteçleri 23
2.2.2. Mitokondriyal DNA 24
2.2.3. Tek Nükleotid Polimorfizmleri – SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 26

2.2.3.2. Nesep ile ilgili SNP Belirteçleri (Linage Informative SNPs, LISNPs) 29
2.2.3.3. Soy ile İlgili SNP Belirteçleri (Ancestry Informative SNPs – AISNPs) 29
2.2.3.4. Fenotip ile ilgili SNP Belirteçleri 35
2.2.3.4.1. Göz Rengi Tahmini Yapan SNP Belirteçleri 36
2.2.3.4.2. Saç Rengi Tahmini Yapan SNP Belirteçleri 38
2.2.3.4.3. Ten Rengi Tahmini Yapan SNP Belirteçleri 40
2.3. Adli Bilimler ve DNA Dizilemesi 42

2.3.1. Birinci Nesil Dizileme 45
2.3.2. İkinci Nesil Dizileme 46
2.3.2.1. İkinci Nesil Dizileme Platformları 49
2.3.2.1.1. Roche 454/Life Science Pyrosequencing-Sentezle Dizileme 49
2.3.2.1.2. Applied Biosystem SOLiD® – Ligasyonla Dizileme 51

2.3.2.1.3. Ion Torrent™ Dizileme Teknolojisi – Seztezleme ile Dizileme 53
2.3.2.1.4. Illumina/Solexa Genome Analyzer – Sentezleme ile Dizileme 54
2.3.2.2. İkinci Nesil Dizileme Ticari Kitleri 56
2.3.3. Üçüncü Nesil Dizileme (Tek Molekül Gerçek Zamanlı Dizileme) 56
2.3.3.1. Pacific Biosciences SMRT 57
2.3.3.2. Oxford Nanopore Dizileme (ONT) 59

3. GEREÇ VE YÖNTEM 65

3.1. Deneyde Kullanılan Gereçler 65

3.1.1. Ekipman 65
3.1.2. Ticari Kitler 66
3.1.3. Ticari Kit Haricinde Kullanılan Malzemeler 66
3.2. Deney Aşaması 67

3.2.1. Multipleks PCR 68
3.2.2. DNA Miktar Tayini 68
3.2.3. Ligasyon Yapılacak PCR Ürünlerinin Uç Onarımı 69
3.2.4. Künt Uçlu PCR Amplikonlarının Ligasyonu 70
3.2.5. Ligasyonlu ve Ligasyonsuz PCR Ürünlerinin Uç Onarımı 70
3.2.6. Barkod ligasyonu 70
3.2.7. Adaptör Ligasyonu 71
3.2.8. SpotON Akış Hücresi Hazırlama ve Yükleme 72
3.2.9. Akış Hücresi Yıkama 73
3.2.10. Biyoinformatik Analizler 74
3.2.11. HIrisPlex-S panelinin SNaPshot Yöntemiyle Çalışılması 74

4. BULGULAR 75

4.1. Minidizileme Reaksiyonlarının Sonuçları 75

4.2. MinION Dizileme Sonuçları 81

4.2.1. Nanopore Dizileme Sekans Düzeyinde Sonuçlar 83
4.2.2. Nanopore Dizileme Alel Düşmesi Sonuçları 89
4.2.2.1. Nano Gözenek Miktarının Azalmasının Tüm Örneklerin Toplam Alel Düşmesi Üzerindeki Etkileri 89
4.2.2.2. Nano Gözenek Miktarının Azalmasının Ligasyonlu Örneklerin Alel Düşmesi Üzerindeki Etkileri 91
4.2.2.3. Nano Gözenek Miktarının Azalmasının Ligasyonsuz Örneklerin Alel Düşmesi Üzerindeki Etkileri 92
4.2.2.4. Ligasyon İşleminin Alel Düşmesi Üzerindeki Etkileri 94
4.2.3. Nanopore Dizileme Alel Başına Kapsam Derğerleri 95
4.2.3.1. Nano Gözenek Azalmasının Ortalama Kapsam Değerleri Üzerindeki Etkileri 95

4.2.3.2. Ligasyon İşleminin Alel Başın Kapsam Değeri Üzerindeki Etkileri 96
4.2.4. Nanopore Dizileme Genotip Sonuçları 98

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 100

6. KAYNAKLAR 111

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Örnek popülasyonları (A, B, C) kullanan dört AIM-SNP kategorisini temsil eden pasta grafikler. Üç renk farklı alelleri gösterir (107). 32

Şekil 2 : DNA diz teknolojilerinin en önemli gelişmelerini gösteren zaman çizelgesi (22). 43

Şekil 3: Sanger dizileme metoduna genel bir bakış (22). 46

Şekil 4: Pirodizilemeye genel bir bakış (22). 51

Şekil 5: Applied Biosystem SOLiD® dizileme reaksiyonuna genel bir bakış (22). 52

Şekil 6: Ion TorrentTM dizileme reaksiyonu (22). 54

Şekil 7: Illumina köprü amplifikasyonuna genel bir bakış (22). 55

Şekil 8: Pacific Bioscience SMRT dizileme teknolojisi (182). 58

Şekil 9: Nanopore dizileme çalışma prensibi (192). 60

Şekil 10: R10 akış hücresi proteinleri ile R9.4.1 akış hücresi proteinleri (192). 62

Şekil 11: 2800 M referans örneğinin HIrisPlex (24 SNP saç ve göz rengi) elektroforegram görüntüsü 76

Şekil 12: 2800 M referans örneğinin 17plex (17 SNP ten rengi) elektroforegram görüntüsü 76

Şekil 13: 9947A referans örneğinin HIrisPlex (24 SNP saç ve göz rengi) elektroforegram görüntüsü 77

Şekil 14: 9947A referans örneğinin 17plex (17 SNP ten rengi) elektroforegram görüntüsü 77

Şekil 15: K562 referans örneğinin HIrisPlex (24 SNP saç ve göz rengi) elektroforegram görüntüsü 78

Şekil 16: K562 referans örneğinin 17plex (17 SNP ten rengi) elektroforegram görüntüsü 78

Şekil 17: Taqman referans örneğinin HIrisPlex (24 SNP saç ve göz rengi) elektroforegram görüntüsü 79

Şekil 18: Taqman referans örneğinin 17plex (17 SNP ten rengi) elektroforegram görüntüsü 79

Şekil 19: 2800M örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği 84

Şekil 20: 2800M-L örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği 84
Şekil 21: 9947A örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği 85
Şekil 22: 9947A-L örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği 85
Şekil 23: K562 örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği 86
Şekil 24: K562-L örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği 87
Şekil 25: Taqman örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği 88
Şekil 26: Taqman-L örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği 88
Şekil 27: 9947A ve 2800M örneklerinin 1. yürütme toplam alel düşmesi değerleri 89
Şekil 28: Taqman ve K562 örneklerinin 2. yürütme toplam alel düşmesi değerleri..... 90
Şekil 29: 9947AL ve 2800ML örneklerinin 1. yürütme alel düşmesi değerleri 91
Şekil 30: TaqmanL ve K562L örneklerinin 2. yürütme alel düşmesi değerleri 91
Şekil 31: 9947A ve 2800M örneklerinin 1. yürütme alel düşmesi değerleri 92
Şekil 32: Taqman ve K562 örneklerinin 2. yürütme alel düşmesi değerleri..... 93
Şekil 33: 9947AL, 2800ML, K562L ve TaqmanL örneklerinin toplam alel düşmesi değerleri 94
Şekil 34: 9947A, 2800M, K562 ve Taqman örneklerinin toplam alel düşmesi değerleri..... 94
Şekil 35: 1. yürütme alel başına ortalama kapsam değerleri..... 95
Şekil 36: 2. Yürütme alel başına ortalama kapsam değerleri..... 95
Şekil 37: Ligasyonlu Örneklerinin Alel Başına Ortalama Kapsam Değerleri 97
Şekil 38: Ligasyonsuz Örneklerinin Alel Başına Ortalama Kapsam Değerleri 97

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Farklı dizileme tekniklerinin özellikleri (birinci, ikinci ve üçüncü nesil) (10,130-137). 44

Tablo 2: Multipleks PCR bileşenleri 68

Tablo 3: Hirisplex paneli için PCR döngü koşulları 68

Tablo 4: Hirisplex-S paneli için PCR döngü koşulları 68

Tablo 5: PCR ürünlerinin uç onarımı için gerekli bileşenler 69

Tablo 6: Künt uçlu PCR amplikonlarının ligasyonu için gerekli bileşenler 70

Tablo 7: Birleştirilmiş PCR ürünlerinin uç onarımı için gerekli bileşenler 70

Tablo 8: Barkod ligasyonu için gerekli olan bileşenler 71

Tablo 9: Adaptör ligasyonu için gerekli bileşenler 71

Tablo 10: Akış Hücresi Yıkama Karışımı 73

Tablo 11: Kapiler elektroforez genotipleme sonuçları 80

Tablo 12: Ligasyonlu ve ligasyonsuz örneklerin Nanopore dizileme genotipleri 99

KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
Ark	Arkadaşları
C	Sitozin (Cytosine)
Chr	Kromozom
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonukleotit tri fosfat
ddNTP	Dideoksinükleotid
dsDNA	Çift zincirli DNA (Double stranded DNA)
G	Guanin
ng	Nanogram
NK	Negatif kontrol örneği
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PK	Pozitif kontrol örneği
RFLP	Rastgele fragment uzunluk polimorfizmi (Randomly fragment lentgh polymorphism)
RFU	Rölatif floresan ünitesi
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism)
STR	Kısa tekrar dizileri (Short tandem repeat)
T	Timin
U	Urasil
VNTR	Farklı sayıda ardışık tekrar dizileri (Variable number of tandem repeats)
µL	Mikrolitre

Özet ve Anahtar Kelimeler

Moleküler biyoloji tekniklerinin gelişmesi ve 2001 yılında insan genom projesinin tamamlanması yeni bir dönemin başlamasına yol açmıştır. Adli genetik alanında da insan biyolojisi ile ilgili yeni bilgiler, genetik belirteçler, yeni nesil yüksek verimli genom teknolojiler kullanılmaya başlanmıştır. Adli bilimlerde klasik DNA analizlerinin yanında kanıt DNA'sından failin fiziksel özellikleri hakkında bilgi veren SNP markırları ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Aynı zamanda dizileme teknolojilerinde de ikinci ve üçüncü nesil dizileme teknolojileri geliştirilmiş ve adli genetik uygulamaları mevcuttur. Ancak üçüncü nesil dizileme olan Oxford Nanopore Teknolojisi (ONT) ile ilgili adli genetik çalışmaları oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmada, fenotipe (göz, saç ve ten rengi) ait bilgi veren 41 SNP markırından oluşan HIrisPlex-S panelinin (Walsh ve ark.) ONT MinION dizileme ile test edilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada dört pozitif kontrol örnği (2800M, 9947A, K562 ve Taqman) kullanıldı. Her örnek ligasyonlu ve ligasyon yapılmadan Nanopore dizileme gerçekleştirildi. Nanopore dizileme sonucu elektrik değişim bilgiler Guppy 6.1 programı ile fastq dosyalarına dönüştürüldü. BWA, Samtools, BFCtools ve Python programları ile örneklerin profili elde edildi. Genetik profiller NGS ve kapiler elektroforez sonuçları ile karşılaştırıldı. İstatistiksel analizler için RStudio programı kullanılarak ligasyonlu ve ligasyonsuz örneklerin alel düşmesi ve fragman sayısı incelendi. Ligasyonsuz örneklerden toplam 108.084 fragman dizilendi. Ligasyonlu örneklerde fragman ayrım işleminden sonra toplamda 1.817.076 fragman elde edildi. Bütün örneklerde ortak olarak 2 lokusta alel düşmesi gözlemlendi. ONT dizilemede toplamda %60 doğru genotipleme elde edilebildi. Elde edilen sonuçlara göre, Nanopore ile dizilemenin yüksek hata oranı sorunundan dolayı adli bilimlerde kullanılabilmesi için geliştirilmesi gerektiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: HIrisPlex-S Oxford Nanopore MinION, Adli DNA fenotiplemesi

İngilizce Özet (Summary)

The development of molecular biology techniques and the completion of the human genome project in 2001 led to the beginning of a new era. In the field of forensic genetics, new information about human biology, genetic markers, new generation high-efficiency genome technologies have been started to be used. In forensic sciences, besides classical DNA analysis, many studies have been conducted on SNP markers that provide information about the physical characteristics of the perpetrator from the evidence DNA. At the same time, second and third generation sequencing technologies have been developed and forensic genetic applications are available in sequencing technologies. However, forensic genetic studies on the third generation sequencing, Oxford Nanopore Technology (ONT), are very limited. In this study, it was aimed to test the HIrisPlex-S panel (Walsh et al.) consisting of 41 SNP markers that provide information about the phenotype (eye, hair and skin color) by ONT MinION sequencing. Four positive control samples (2800M, 9947A, K562 and Taqman) were used in this study. Nanopore sequencing was performed for each sample with and without ligation. The electrical exchange information as a result of nanopore sequencing was converted into fastq files with the Guppy 6.1 program. Profiles of the samples were obtained with BWA, Samtools, BFCtools and Python programs. Genetic profiles were compared with NGS and capillary electrophoresis results. For statistical analysis, allele reduction and fragment number of ligated and unligated samples were analyzed using the RStudio program. A total of 108,084 fragments were sequenced from non-ligation samples. A total of 1,817,076 fragments were obtained after fragment separation in ligated samples. Allele reduction was observed in 2 alleles in common in all samples. In ONT sequencing, a total of 60% correct genotyping could be obtained. According to the results obtained, it has been determined that sequencing with Nanopore should be further developed in order to be used in forensic sciences due to the high error rate problem.

Keywords: HIrisPlex-S Oxford Nanopore MinION, Forensic DNA Phenotyping

1. GİRİŞ ve AMAÇ

DNA teknolojisi içinde bulunduğumuz yüzyılın en önemli bilimsel gelişmelerinden biri olarak her alanda günlük hayatımıza girmiştir. Özellikle tıp ve ziraat alanında yoğun olarak kullanılan bu teknoloji adli bilimler için de vazgeçilmez hale gelmiştir (1). Geçmişte bireyler arası farklılıkları gözönüne alınarak kimliklendirmede kullanılan kan grupları ve enzim analizlerinin yerini hem ayırım gücü açısından hem de çevresel faktörlere karşı daha dayanıklı olan ve insana ait her türlü biyolojik kalıntıda kullanılabilen DNA polimorfizmleri almıştır (2). İlk olarak 1980'lerin ortalarında tanıtılan adli DNA testi, bir tecavüz olayının aydınlatılmasında kanıt olarak kullanılarak ceza adaleti sistemine yardımcı olmuştur (3-5).

DNA'nın belli bölgelerindeki polimorfizmlere dayanarak DNA üzerindeki bireysel farklılıkların tespit edildiği yönteme "DNA Parmakizi analizi" denir (6). DNA parmakizi, 90lı yıllardan beri kısa ardışık tekrar dizilerinin (Short Tandem Repeats; STR) tekrar sayılarındaki bireysel farklılıklar tespit edilerek belirlenir (7). STR lokuslarının; polimorfizminin yüksek olması, güvenilir olması, çoklu otomasyona imkân vermesi, maliyetinin düşük olması adli genetikçiler tarafından kabul görmesini sağlamış ve STR'leri tüm dünyada ortak kullanılan sistemler haline getirmiştir (8). STR'ler her ne kadar vazgeçilecek yöntemler olmamakla birlikte, bazı adli olguların aydınlatılmasında bu bölgeler yetersiz kalabilmektedir. Özellikle olay yerinden gelen bozulmuş veya az miktardaki örneklerde tiplendirmede çoğu zaman sorun yaşanabilmektedir. Bu sebeple adli bilimlerciler DNA üzerinde daha az yer kaplayan ve bozunmuş örneklerde dahi tipleme imkânı veren Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) genetik işaretleri üzerine yoğunlaşmıştır (9).

Zorlu adli vakalardaki bozunmuş örneklerde, hiç profil elde edilemeyen ya da kısmi profil elde edilen örneklerde, aynı anda ortalama 40'dan fazla SNP bölgesi çalışılarak

kimliklendirme yapmak mümkündür (9,10). Bunun yanı sıra spesifik SNP lokusları kullanılarak olay yerinde bulunan ve kime ait olduğu bilinmeyen biyolojik örneklerin veya karşılaştırma örneği olmayan delillerin ait olduğu kişinin/failin fiziksel özelliklerinin tahminleri yapılabilir. Bu gözle görülebilen fiziksel karakterlerin (göz, saç, ten rengi, boy uzunluğu vb.) belirlenmesi için fenotipik SNP markırları (Phenotypic-Informative SNPs; PISNPs) kullanılmaktadır. Günümüzde genetik yapısı en iyi bilinen pigmentasyon varyasyonları göz, saç ve ten rengidir. Bu nedenle adli bilimler amaçlı araştırmalar bu üç fenotip ile başlamıştır (11,12). Adli bilimler camiasında yapılan fenotip araştırmaları göz renginin tahmini (Irisplex paneli) ile başlanmış olup, ardından saç rengi (HIrisplex paneli) ve en son olarak da ten renginin de eklenmiştir (HIrisplex-S) (13,14, 197).

Adli analizlerde doğruluğu yüksek, tekrarlanabilirliği olan, zaman ve maliyet açısından avantajlı analizler tercih edilmektedir. Bugün DNA analizlerinde kapiler elektroforez (KE) kullanılmaktadır. KE yöntemi ile kimliklendirmede kullanılan birçok genetik markır (STR, mtDNA, InDel, SNP ve mRNA vb.) analiz edilmektedir (15). Fakat bu markırlar KE yöntemi ile tek bir iş akışında ve tek bir reaksiyonda analiz edilememektedir. Adli DNA analizleri sırasında karşılaşılan en büyük sorun düşük kopya sayısı, degrade ve kontamine örneklerle çalışmaktır. Hem eser miktarda hem de degrade örneklerde genomik bilginin kaybı, karışık örneklerde analiz zorluğu, özellikle karmaşık babalık davalarında mutasyonların varlığı, analiz süresinin uzun olması ve DNA dizi içeriğinden çok sadece DNA fragman uzunluğuna ait bilginin elde edilmesi KE'nin dezavantajlarıdır (15). Adli DNA analizleri için KE dizileme sisteminin sınırlamaları araştırmacıları, yeni nesil dizileme teknolojilerinin kullanılmasına yöneltmiştir.

Yüksek verimli, hızlı, düşük maliyetli ve doğru bir dizileme platformu arayışı, çok sayıda yeni nesil dizileme (Next generation sequnecing; NGS) teknolojilerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Adli bilimlerde diğer alanlara nazaran daha yeni olan bu

teknoloji nesep tayini, olay yerinde bulunan biyolojik örneklerin kimliklendirilmesi, fenotip ve biyocoğrafik soy tahmini gibi çeşitli amaçlarla uygulanmaya başlanmıştır (12). NGS'nin en önemli avantajlarından biri; aynı anda çok sayıda ve farklı markır sistemlerinin (STR, SNP, InDel gibi) analizinin yapılabilmesidir. Böylece yeterli DNA örneği bulunmadığında, sadece STR ile çözümü mümkün olmayan ve ek markırların çalışılması gerektiği vakalarda NGS sistemi ile çok fazla DNA kullanmadan hızlı ve etkili bir şekilde analiz yapılabilir (16). Aynı zamanda tek bir iş akışında birden fazla sistem çalışılabildiği için kontaminasyon riski de en aza indirgenmiştir. NGS platformları, adli örneklerden elde edilebilecek genetik bilgi miktarını artırma yeteneğine sahiptir. Örneğin, KE STR analizlerinde STR alelleri dizilemeden ziyade amplikon büyüklüğüne göre ayrılır. Sonuç olarak, aynı uzunluktaki fakat nükleotid dizisi farklılık gösteren aleller tanınmaz. NGS teknolojisinde ise STR bölgeleri dizilendiği için elde edilen aleller aynı uzunluklarda olsalar bile, sekans düzeyindeki varyasyonlar veya STR bölgesi öncesi ve sonrasındaki mutasyonlar görülebilir. Bu bilgiler ayrım gücünün arttırılmasına yardımcı olur (17).

Adli bilimlerde en yaygın kullanılan NGS platformları Illumina ve Thermo Fisher Scientific firmaları tarafından üretilen ikinci nesil dizileme teknolojisi platformlardır. MiSeq FGx™ (Illumina) floresan boya ile etiketlenmiş nükleotidlerin zincire eklenmesinden sonra serbest bırakılan floresan ışığın tespiti ile dizileme yapar (18,19). Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific) ise, emülsiyon PCR ile salınan protonların tespitine dayalı olarak DNA dizisini verir (20). Her iki platform da büyük ölçüde benzer olup yüksek kapsam (coverage) değerine sahiptir. Bu da, bir çalışmadaki her bir okumanın yüksek oranda doğru olabileceği anlamına gelir. 2014 yılında Thermo Fisher Scientific tarafından "Ion PGM™" cihazı için tasarlanan ve nesep tayininde kullanılan "HID-Ion AmpliSeq™ Identity Panel" adli genetikte kullanılmak üzere piyasaya sürülen ilk SNP NGS tabanlı ticari kittir. Daha sonra Illumina, "MiSeq FGx Forensic Genomics System" için tasarladığı "The Illumina®

ForenSeq™ DNA Signature Prep" kiti piyasaya sürmüştür. Bununla birlikte, bu sistemler nispeten kısa okumalar (50-600 bç) ürettiğinden, genom dizisinde daha uzun bitişik parçaların birleştirilmesini zorlaştıran boşluklara neden olabilmektedir. Birleştirmede bu tür zorluklar özellikle tekrarlayan dizilerin bulunduğu bölgelerde bulunur. Bu nedenle, üçüncü nesil dizilme olarak adlandırılan ve daha uzun okumalar yapabilen yeni teknolojiler geliştirilmiştir (21). İkinci nesil dizileme teknolojisi platformlarının diğer bir önemli dezavantajı ise okuma uzunluklarının kısa olması ve dizileme yapılmadan önce kütüphane hazırlama sürecinin zahmetli olmasıdır (22). Gerçek zamanlı okuma yapılabilen üçüncü nesil dizileme teknolojisi, ikinci nesil dizileme teknolojisine kıyasla daha hızlı dizileme yapabilmektedir. Ayrıca PCR amplifikasyonuna ihtiyaç duymadan daha uzun DNA parçalarını daha az hata ile okuyabilmektedir (22,23).

Üçüncü nesil dizileme teknolojileri, önceki platformlara göre çok daha uzun okumalar üretir ve amplifikasyon olmadan gerçek zamanlı olarak dizileme yeteneğine sahiptir. PCR aşamasının atlanması ile belirli genomik dizilerin yetersiz temsil edilmesine yol açabilecek farklı tipte hataların ve baz-bileşim yanlışlarının ortaya çıkmasını önler. Pacific Biosciences, tek moleküllü gerçek zamanlı olarak (SMRT) uzun okumalar üretebilen bir teknolojiye sahiptir (24). Fakat sistemin çalışma prensibi doğal DNA replikasyonuna dayandığı için dizileme sentez ile olur. Başka bir yaklaşım, Oxford Nanopore MinION olarak bilinen nanopore bazlı bir dizileyicidir. Sentetik bir polimerden yapılmış elektriksel olarak dirençli bir zar içine gömülen bir nanopora (tasarlanmış bir protein), bir çözelti içinde voltaj uygulanır. Akımdaki karakteristik değişikliklerin kodunu çözme (dalgalı çizgiler), iyonik akımı bozan bireysel bazları tanımlamayı sağlar. Aynı zamanda Oxford Nanopore Technologies'in ayrıntılı analiz yazılımı, bir akıllı telefonun bilgi işlem gücü ve internet bağlantısı ile anında analiz yapılmasını sağlar. Bu, biyolojik numunelerin laboratuvar olanaklarına erişimin sınırlı olduğu yerlerde de dizilenmesini mümkün kılar (25). Nanopore

teknolojisi ile dizilemenin diğer bir avantajı da cihaz maliyetinin diğer platformlara göre çok daha düşük ve sistemin enzime olan ihtiyacının çok aza indirilmiş olmasıdır (21). Nanopore dizileme teknolojisi kullanılarak yapılan adli çalışmalardan elde edilen deneyimler sonucunda bu teknolojinin adli bilimlerde uygulanabilir olduğu belirtilmiştir (26).

Adli bilimlerde pek çok avantajına rağmen NGS kullanımı henüz yaygın olarak uygulanmamaktadır. NGS sistemini satın almamanın nedenleri fon eksikliği, araçların genel maliyeti ve eski sistemlere olan alışkanlıklar ile ilişkilendirilmiştir. Oxford Nanopore Technologies MinION ve diğer platformlar arasındaki en büyük fark, enstrüman maliyetinin çok düşük olmasıdır (21).

Bu çalışmanın amacı, fenotipe (göz, saç ve ten rengi) ait bilgi veren 41 SNP markırından oluşan HIrisPlex-S panelinin (Walsh ve ark.) Oxford Nanopore MinION dizileme teknolojisi (ONT) ile test edilmesidir. Oluşturulan NGS kütüphanesinin test edilmesi DNA konsantrasyonu bilinen referans örneklerle yapıldı. Bu çalışmada Oxford Nanopore MinION dizileme teknolojisinin adli bilimlerde uygulanabilirliğini test edilmesi ve bu üçüncü nesil dizileme sistemi ile daha önceki NGS platformlarıyla karşılaştırarak dizileme sistemleri arasındaki farkların ortaya koyulması hedeflenmiştir.

Nihai hedefimiz ise kişi/faile ait göz, saç ve ten rengi gibi fiziksel özellikler tek analizde belirlenerek çeşitli adli olguların (faile ulaşılamayan olgularda veya kayıp kişilerin) ve toplu felaket kurbanlarının hızlı bir şekilde kimliklendirilmesine katkı sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DNA Parmak İzinin Adli Bilimlerde Kullanımı

DNA profillemenin adli vakalarda kullanılmaya başlanması, adli kimliklendirme sürecinde bir devrim yaratmıştır. Alec Jeffreys, RFLP yöntemi yardımıyla yaygın polimorfizmleri ilk tanımlayan kişi olmuştur (27,31). DNA parmak izi ilk olarak 1985'te Alec Jeffreys tarafından bir göçmenlik anlaşmazlığını çözmek için kullanılmıştır (27). Olay, yerel bir polis gücünün Jeffreys'i İngiltere'nin Leicestershire kentinde çözülmemiş bir cinsel saldırı ve iki genç kızın öldürülmesine yardım etmesi için görevlendirmesi ile başlamıştır. DNA parmak izi, başlangıçta iki cinayetin aynı faille ilişkilendirilmesine, ardından genç bir adamın aklanmasına ve nihayet Colin Pitchfork'un 1988'deki suçlardan mahkûm edilmesine yardım etmiştir (28). Jeffreys tarafından DNA tiplemesi yoluyla bir bireyi tanımlamak için gerçekleştirilen bu test, günümüz DNA testinden çok farklıdır; tek ortak nokta "DNA" kelimesidir. Bu uygulanan test tekniği restriksiyon enzimine ve ardından Southern blot analizine dayanıyordu. Southern blot tekniği zahmetliydi ve ileri analizler için iyi kalitede DNA gerektiriyordu. Bu yöntem ile fark edilen şey, DNA bölümlerinin insanlar arasında aşırı değişken olduğu, ancak bir bireyin hücreleri boyunca korunduğuydu. DNA parmak izi, orijinal olarak, bir barkod görünümü ile bir jel üzerinde çoklu bantlara yol açan tüm genom boyunca birçok lokustaki varyasyonun incelenmesiydi ve herkesin barkodu farklı göründüğü için, "DNA parmak izi" terimi ortaya çıktı (29). Jeffreys tarafından geliştirilen orijinal teknoloji artık adli tıpta kullanılmamaktadır ve temel teknoloji büyük ve sürekli bir dönüşüme uğramıştır (32).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), adli bilimde DNA profilleme tekniklerinin kullanışlılığını büyük ölçüde artırmıştır. PCR, dizisinin daha önce ortaya çıkarılması koşuluyla, seçilmiş kısa genomik DNA bölümlerinin hedeflenen in vitro amplifikasyonuna izin verir. Prensip, hücrelerin doğal bölünmesi sırasında DNA kopyalama sürecine dayanır.

PCR tabanlı DNA tipleme sistemleri yalnızca birkaç hücreden elde edilen DNA'nın yanı sıra oldukça bozulmuş insan kalıntılarından elde edilen DNA'yı analiz etmeyi mümkün kılmıştır (33,34) .

1994'ten beri, DNA profillemede ayırım gücü daha yüksek olan STR tekrar birimleri kullanılmaktadır (30). Standart DNA profillemede kullanılan STR lokuslarının tümü Mendel kurallarına göre kalıtılır. Bu lokuslar genetik olarak bağlantılı değildir ve bu nedenle bağımsız olarak miras alınır. En önemlisi, STR lokuslarının bir hastalık durumu ile bilinen hiçbir ilişkisinin olmadığı düşünülmektedir (29). Günümüzde STR ile DNA profili oluşturma, yüksek ayrım gücü nedeniyle adli genetikte standart analizler olarak kullanılmaktadır (29). Ancak çevresel bozulmanın dolayısıyla degredasyonun olduğu örneklerde alel kayıpları gözlenebilir ve bu durumlarda STR analizleri zorludur (36). Bu sorunun üstesinden gelmek için, kısa PCR amplikonları (<150 bç) ile karakterize edilen mini-STR markıları geliştirilmiştir. Mini-STR lokuslarının tasarımında primer bağlama bölgeleri kısaltılarak, bozulmuş örneklerin amplifiye edilmesinin başarı oranını artırmak hedeflenmiştir (37-40).

Benzer şekilde, bozulmuş örnekleri analiz etmek için kısa ikili veya bi-alelik (yani basit nükleotid polimorfizmi) markırları kullanılabilir (41). Bu markırlar, iki ve bazen üç veya daha fazla alelik varyantın varlığı ile karakterize edilir ve küçük ölçekli insersiyon/delesyon polimorfizmlerini (InDels) ve SNP markırlarını içerir (42-46). Otozomal ve cinsiyet kromozomları üzerinde karakterize edilen ikili markırlar, KE'de stutter göstermezler, STR'lerden daha düşük mutasyon oranına ve kısa amplikon boyutu sahiptirler. Bu SNP veya InDel markılarıyla, bozulmuş biyolojik örneklerin analizi, kimliklendirme, nesep tayini, biyocoğrafik soy ve görünür insan fenotipik özelliklerinin tahminini yapılabilir (12, 33,47-64,65).

Herhangi bir ceza davasında DNA kanıtının önemi nedeniyle, testlerin güvenilirliği ve tekrarlanabilirliğini mümkün olduğunca kapsamlı bir şekilde göstermek için doğrulama çalışmaları ve laboratuvarlar arası yeterlilik testleri yapılmaktadır (29). Mevcut durum, birçok yargı alanındaki kapsamlı doğrulama çalışmaları ve mahkemelerdeki zorluklar nedeniyle, DNA'nın artık adli tıpta altın bir standart olarak kabul edilmesidir (35).

2.2. Adli Bilimlerde Kullanılan Genetik Belirteçler

Biyolojik numunelerdeki DNA miktarı ve kalitesi, adli soruşturmalar sırasında hangi DNA profili çıkarma yaklaşımının kullanılacağını belirlemede kritik faktörlerdir. Biyolojik deliller, yalnızca bir kişiden DNA veya birden fazla kişiden DNA karışımı içerebilir. Karışımlar, aynı veya farklı cinsiyetteki bireylerden oluşabilir. Biyolojik deliller çeşitli yüzeylerde (toprak, metal yüzey, sigara, giysi gibi) bulunabilir ve bulundukları ortama bağlı olarak çeşitli PCR inhibitörlerine (indigo, hem grubu, hematin gibi) mağruz kalabilirler. Benzer şekilde, biyolojik materyallerin hava koşullarına, mikrobiyal etkiye, ultraviyole radyasyona veya diğer çevresel saldırılara maruz kalması, DNA'nın kısmen veya ile derecede bozulsına neden olabilir. Kullanılacak adli örneğin tipine, durumuna ve istenilen analize bağlı olarak analistler, farklı genetik belirteçler kullanan DNA tipleme sistemleri arasından seçim yapabilir.

2.2.1. STR (Short Tandem Repeats – Kısa Ardışık Tekrar Dizileri)

STR'ler özellikle adli uygulamalar için en sıklıkla kullanılan genetik markırlardır. Bu markırlar, genellikle 5 ila 50 kez tekrarlanan 2-6 baz çiftli DNA motiflerinden oluşur (66). STR'ler, hem insan hem de insan olmayan genomlar boyunca binlerce yerde meydana gelirler. Bu belirteçler oldukça polimorfiktir, öyle ki ardışık tekrar birimlerinin sayısı hemen hemen tüm popülasyonlarda bireyler arasında geniş ölçüde değişir. SNP ve InDellere göre nispeten yüksek mutasyon oranlarına sahiptirler. Küçük boyutları ve yüksek oranda

polimorfik yapıları, veri bankaları ve otomotize sistemleriyle STR'ler, adli kimliklendirmede kullanılan birincil genetik markırlardır (67).

2.2.1.1.Otozomal STR Belirteçleri

İnsan genomunda binlerce STR lokusu karakterize edilmiştir (68-70). Bu yüksek sayıda STR lokusunun varlığı, adli laboratuvarlar tarafından kullanılmak üzere üretilmiş kitlere dahil edilmek için geniş bir seçenek sunmaktadır. Ancak adli genetikte kullanılmak üzere seçilen STR lokuslar bireyler arasında yüksek varyasyona sahip olanlardır. Böylece birden fazla STR lokusu birleştirildiğinde yüksek bir ayırt etme gücüne erişilebilir. KE'de STR analizi, floresanla etiketlenmiş PCR ürünlerinin renk ve büyüklüklerine göre ayrıştırılarak tiplendirilmesine dayanır (67). Biyolojik delillerden oluşturulan DNA profilleri daha sonra referans örneklerle karşılaştırılır. Sonuçlar eşleşme, dışlama veya sonuçsuz olarak yorumlanabilir.

STR'leri genetik belirteçler olarak kullanmanın önemli bir sınırlaması, stutter olarak bilinen bir fenomenin değişen miktarlarının zorluk çıkarmasıdır (71). Stutter, iplik kaymasının bir sonucu olarak PCR işlemi sırasında oluşturulan bir amplifikasyon artefaktıdır. Bu, DNA polimerazın ya bir veya daha fazla tekrar eden birimi kopyalayamamasına ya da aynı tekrar eden birimi bir kereden fazla kopyalamasına neden olur. İlki, gerçek genomik alelden boyut olarak bir veya daha fazla tekrar birimi daha küçük olan bir amplifikasyon ürünü (n-1) ile sonuçlanırken, ikincisi, gerçek genomik alelden tipik olarak bir tekrar daha büyük olan bir amplifikasyon ürünü (n+1) ile sonuçlanır (71). Daha kısa dizi motif uzunlukları ile (yani, di- ve trinükleotid tekrarları) üretilen gerçek alel miktarına göre üretilen stuter amplikon miktarı (yani stutter yüzdesi) dörtlü tetranükleotid tekraralarından daha yüksektir. Dört baz çiftinden oluşan bir dizi motif uzunluğuna sahip STR'ler nispeten düşük stutter yüzdeleri ile ilişkilidir ve bu nedenle kimliklendirme için en yaygın olarak kullanılan belirteçler haline gelmiştir (69,72). Ek olarak, tetranükleotid tekrar

lokusları, elektroforetik ayırma sırasında alellerin daha iyi çözülmesine izin verir, bu da genellikle toplam uzunluğu 500 bç altında olan parçalar arasında tek baz çözünürlüğüne izin verir. Biraz daha büyük penta- ve heksanükleotid tekrarları da genetik belirteçler olarak kullanımları açısından değerlendirilmiştir. Bu belirteçler çok az stutter artefaktı ile ilişkili olma avantajına sahip olsalar da, insan genomunda daha az yaygındırlar ve amplifikasyonları daha kısa STR'lerden daha az sağlamdır (73,74). Sonuç olarak, çevresel ve/veya kimyasal hasara bağlı DNA bozulmasının sıklıkla daha büyük boyutlu genetik belirteçleri daha çok etkileyeceğinden ve genetik profilin verimli bir şekilde amplifiye edilmesi için adli genetikte genellikle tetranükleotid tekrarları kullanılmaktadır.

STR lokuslarının adli genetikte kullanılmaya başlanması ile birlikte farklı laboratuvarlar arasında DNA profillerinin karşılaştırılmasını kolaylaştırmak için standartlaştırılmış STR lokusları setine ihtiyaç duyulmuştur. 1997 yılında, ABD Federal Soruşturma Bürosu (FBI) Laboratuvarı, 13 STR lokusunu (CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 ve D21S11) adli bilimlerde kullanmak için seçmiştir. Bu 13 lokusun kombinasyonu, toplumda rastgele seçilmiş iki ilgisiz bireyin DNA profillerinin rastgele rastgele eşleşme olasılığını (Random Match Probability; RMP) en az trilyonda bir olabileceğinini gösterir ve yüksek bir ayrım gücü sağlar. Bu 13 lokus, CODIS (Combined DNA Index System) veri bankasına bağlı federal, eyalet ve yerel katılımcı adli laboratuvarların katkıda bulunduğu DNA profillerinin veri tabanlarınnın temelini oluşturur. CODIS, FBI'ın ceza adaleti DNA veri tabanlarına destek programı ve bu veri tabanlarını yönetmek için geliştirilmiş yazılımdır (75). Güncel olarak da CODI 13 STR lokusuna yeni mini-STR lokusları (D12S391, D2S1338, D19S433, D2S441, D22S1045, D1S1656 and D10S1248) eklenerek 20 CODIS lokusuna çıkartılmıştır (215). Benzer STR lokus kümeleri, Birleşik Devletler dışında kullanılmak üzere devlet kurumları tarafından seçilmiştir. Bunlar arasında Avrupa Standart Seti (FGA, TH01, VWA,

D1S1656, D2S441, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D18S51, D21S11 ve D22S1045); Birleşik Krallık STR lokusları (FGA, TH01, VWA, D2S1338, D3S1358, D8S1179, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11); Alman STR lokusları (FGA, TH01, SE33, VWA, D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11); ve Interpol Standart Seti (FGA, TH01, VWA, D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11). Ek olarak, STR olmayan lokus Amelogenin tipik olarak bir cinsiyet-tip belirteci olarak STR lokusları ile birlikte amplifiye edilir. Bunun yanında Y-STR veya Y-InDel lokusları da günümüzde cinsiyet belirteci olarak kitlerde yer almaktadır.

DNA miktarının ciddi şekilde sınırlı olduğu (genellikle 100 pg'den az) veya DNA'nın bütünlüğünün önemli ölçüde bozulduğu (degrede) durumlarda, standart STR analizi genellikle daha büyük STR lokuslarında alel ve lokus düşüşü ile karakterize edilen sadece kısmi bir DNA profilinin saptanmasıyla sonuçlan DNA profilleri üretir. Kısmi DNA profillerinin yorumlanması tipik olarak daha zordur ve genellikle potansiyel katkıda bulunanları dahil etmek veya hariç tutmak için yüksek bir güvenle gerekli ayrım gücünü sağlamaz. Mini-STR amplikonlarının kullanımı, birçok durumda bu zorlukların üstesinden gelmeyi mümkün kılar. Mini-STR kitleri, daha küçük bir PCR ürünü ile sonuçlanan, tekrarlayan elemana bitişik daha az yan diziyi kapsayan bölgeleri ile tercihen daha büyük STR lokuslarını hedefleyen primer çiftlerini kullanır. STR'lerin daha küçük boyutu, verimli DNA amplifikasyonunu destekler ve standart STR kitlerine göre daha iyi hassasiyet sağlar. Genel olarak, mini-STR kitleri, tehlikede ve bozulmuş numunelerin daha başarılı bir şekilde analiz edilmesini sağlar(7).

2.2.1.2.Y Kromozomu STR Belirteçleri

Otozomal STR kitleri ile, kadın ve erkekten oluşan karışım örneklerden (oral, vajinal ve rektal smear ve/veya swablar gibi) kadın DNA’sının baskın olduğunda seçici ve yorumlanabilir bir erkek DNA profili elde etmek zordur. Çünkü, özellikle cinsel saldırı

suçlarında kadından alınan örneklerde kadın DNA'sının erkek DNAsına oranla çok daha fazla olabilir ve bu durumda erkek DNA'sı PCR sırasında maskelenebilmesidir. Bu tür örnekler için, Y kromozomu belirteçlerinden yararlanılır.

Y kromozomu, insan kromozomlarının en küçüğüdür ve yaklaşık 60 milyon baz çifti içerir. Standart STR belirteçlerinde olduğu gibi Y kromozomu DNA'sı çekirdekte bulunur; bununla birlikte, otozomal STR lokuslarına göre Y kromozomu üzerinde bulunan belirteçler arasında bazı dikkate değer farklılıklar vardır (76). Her şeyden önce, Y kromozomu baba tarafından kalıtılır ve Y kromozomundaki DNA'nın neredeyse tamamı, Y kromozomunun en uzak kısımları dışında rekombinant değildir (77). Bu nedenle, Y kromozom belirteçlerinden oluşturulan profiller, bir nesilden diğerine stabil bir haplotip olarak aktarılır. Sonuç olarak, bir Y haplotipi, belirli bir baba aile soyunun tüm erkek akrabaları arasında tipik olarak aynıdır (göreceli olarak nadir görülen mayotik mutasyon örnekleri dışında). Bu gerçek, Y kromozom belirteçlerini insan kimliği ve babalık vakalarında faydalı kılar, ancak otozomal STR lokuslarına göre elde edilebilen ayrım gücünü büyük ölçüde azaltır.

Y kromozomu STR belirteçleri 200'den fazla karakterize edilmiş multiallelik STR (Y-STR) markırını içerir. 1997'de Uluslararası Y-STR Kullanıcı Grubu, Y-STR'nin Avrupa minimal haplotip seti olarak dokuz Y-STR lokusunun (DYS19, DYS385a, DYS385b, DYS3891, DYS38911, DYS390, DYS391, DYS392 ve DYS393) kullanılmasını tavsiye etmiştir (78,79). 2003 yılında, SWGDAM (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods), Amerika Birleşik Devletleri'ndeki adli uygulamalar için Y-STR lokusları olarak iki ek lokusun (DYS438 ve DYS439) dâhil edilmesini önermiştir (80).

2.2.1.3.X Kromozomu STR Belirteçleri

X kromozomundaki STR lokusları diğerlerine göre kullanımı daha yenidir ve sınırlı ama değerli bir nişleri vardır. En çok babalık testlerinde veya bireylerin ebeveynlerinin bulunmadığı toplu bir felaketin kurbanlarının belirlenmesinde faydalıdırlar. Bir kadın, X

kromozomunu oğluna aktaracak, o da aynı X kromozomunu kızına geçirecektir. Dolayısıyla bir torun, babaanneninkiyle aynı X kromozomuna sahiptir. Böyle bir bağlantı, ensest vakalarını çözümlemek ve yalnızca X kromozomunun özel kalıtımı nedeniyle çözülebilecek vakalarda önceden bilinmeyen bireylerin belirlenmesine yardımcı olmak için kullanılmıştır (81). On dört X-kromozom STR'si, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Silahlı Kuvvetler DNA Laboratuvarı tarafından, hem Y-STR tiplendirmesini hem de mitokondriyal belirteçleri tamamlamak üzere merhumun tanımlanması için potansiyele sahip, adli kullanım için karakterize edilmiştir (82,83). Üzerinde en çok çalışılan 15 X STR lokusu DXS6789, DXS7130, DXS9902, GATA31E08, DXS7424, GATA165B12, DXS101, DXS6795, GATA172D05, DXS10147, DXS8378, DXS7132, DXS6803, HPRTB ve DXS7423'dir (82).

2.2.2. Mitokondriyal DNA

Tipik olarak, polimorfik nükleer DNA testi (yani, otozomal veya Y-STR), adli araştırmalarda karşılaştırmalı amaçlar için kullanılır. Ancak bu yaklaşım, bozunmuş kemikler ve dişler veya çok az kök dokusu olan veya hiç kök dokusu olmayan dökülen/kırık saç telleri gibi numunelerde genellikle başarısız olur. Bunun nedeni, bu tür numuneleri karakterize eden yüksek moleküler ağırlıklı nükleer DNA'nın sınırlı miktarları veya DNA'nın büyük ölçüde bozunmasıdır. Bu tür zorlu örneklerle, hücrede çok fazla miktarda bulunan mtDNA'dan faydalanılabilir (67).

mtDNA genomu 16.5 kilobazdan oluşur. mtDNA genomunun iki dizisi ağır ve hafif olarak adlandırılır ve baz bileşimlerinde önemli ölçüde farklılık gösterir. Ağır iplik guanin açısından zengindir ve hafif iplik sitozin açısından zengindir. Mitokondriyal genom, yaklaşık %97'sinin kodlama yapmadığı nükleer genomun aksine, çok az kodlamayan dizi (%7) içerir. 37 gen (22 mitokondriyal tRNA, 2 mitokondriyal rRNA ve 13 mitokondriyal solunum kompleksi alt birimi), mtDNA dizisinin yaklaşık %93'ünü oluşturur. Bu genler

intronlardan yoksundur, birbirleriyle neredeyse bitişiktir ve hatta bazı durumlarda örtüşür. Komşu genler arasında sıklıkla bulunan bir veya iki kodlamayan baz dışında, mitokondriyal genomun kodlama dizisi içermeyen tek önemli bölgesi, D-bölgesi olarak da bilinen yer değiştirme döngüsü bölgesidir. Ağır zincirin kopyalanmış bir uzantısı, bağımsız bir parça (7S DNA) olarak bulunur. Bu parça, ağır iplik için replikasyon orijinini ve baskın transkripsiyonel promotörleri içeren "kontrol bölgesi" olarak bilinen üçlü sarmal DNA yapısının oluşumuna katıldığı D-döngüsüne bağlanır (84). mtDNA rekombinasyona uğramaz. Böylece mutasyon yoluyla genetik çeşitlilik oluşturulur. Bazı tahminlere göre, mutasyonlar ortaya çıkar ve mitokondriyal genomda nükleer genomlardaki eşdeğer dizilerin 10 katına yaklaşan bir oranda sabitlenir. DNA onarımı için verimsiz bir sistem, oksidatif hasar ve hücre büyümesi ve gelişimi sırasında nükleer DNA'ya göre mtDNA'nın maruz kaldığı daha fazla sayıda replikatif döngü de dahil olmak üzere, bu dizi kararsızlığını açıklamak için bir dizi faktör önerilmiştir.

Mitokondriyal genomun çeşitli özellikleri, onu adli analiz için çekici bir hedef haline getirir. İlk olarak, mitokondri içindeki mtDNA'nın hücre içi sekestrasyonu ve dairesel doğası, stabilitesine katkıda bulunur. İkincisi, hücre tipine bağlı olarak her bir mitokondrinin sitoplazmasında ve hücre başına yüzlerce mitokondride bulunan mtDNA genomunun dört ila beş kopyası olabilir (85). Birçok dokuda bu, diploid nükleer genomun sadece bir kopyasının aksine, hücre başına yüksek bir mtDNA kopya sayısı (yani, hücre başına mtDNA genomunun yüzlerce ila binlerce kopyası) ile sonuçlanır (86). Bu özellik, oldukça bozulmuş ve/veya çok sınırlı miktarlarda başlangıç materyalinin başarılı analizini kolaylaştırır (87,88). Üçüncüsü, mitokondriyal genom hem erkekler hem de dişiler tarafından maternal olarak kalıtılır ve bu nedenle bir bireyin mtDNA haplotipi, döllenme sırasında oositte bulunan 100.000 kopyaya kadar mitokondriyal genomun tamamının bir kopyasıdır. Bu, mtDNA haplotipini Y-STR haplotipinin dişi soy eşdeğeri yapar. mtDNA haplotiplerinin anneden

çocuğa aktarılması, ebeveynlik testi, kayıp şahıs araştırmaları, insan göçü ve evrim çalışmaları, tarihsel ve soybilimsel araştırmalara uygulanabilen aile soyunun takip edilmesine izin verir.

Nükleer DNA'daki STR lokuslarındaki uzunluk varyantlarının tanımlanmasına dayanan adli DNA profilleme yöntemlerinin çoğunun aksine, mtDNA profili, Revize Cambridge Referans Dizisine göre DNA dizisi varyantlarının doğrudan incelenmesine dayanır (89). Hiperdeğişken bölge 1 (HV-1) ve hiperdeğişken bölge 2 (HV-2) olarak adlandırılan D-loop bölgesinin bölümleri, insan popülasyonları içinde sergiledikleri yüksek derecede dizi varyantları nedeniyle özellikle adli kullanımdadır. Günümüzde ise mtDNA'nın tamamının dizilenmesi de mümkün olup adli analizlerde kullanılmaktadır.

2.2.3. Tek Nükleotid Polimorfizmleri – SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

STR'lerin adli kullanımıyla ilgili teknik zorlukların çoğu, SNP'ler için mevcut değildir. Çok kısa PCR amplikonlarının (<150 bç) kullanılması, düşük miktarlarda yüksek düzeyde bozunmuş DNA'nın başarılı analizi için esastır. Bu, tekrarlayan dizileri ve uzun PCR ürünleri nedeniyle STR'lerde zordur. Ancak, SNP'ler tek baz değişikliklerini yansıttığından, çok kısa PCR amplikonları kullanılabilir, bu da STR profillerinin elde edilemediği örneklerde bozulmuş DNA'dan başarılı SNP profili oluşturmayı mümkün kılar (50,92). Ayrıca, SNP varyasyonu tekrarlayan dizileri içermediğinden, SNP profili oluşturma, özellikle düşük miktarlarda DNA analiz edildiğinde, STR profil yorumunu karmaşıklaştıran stutter artefaktlarını önler.

Genellikle doğada bialelik olan bu tek nükleotid varyantları, genomun herhangi bir noktasında ortaya çıkabilir. Başlangıçta kendiliğinden bir nokta mutasyonu yoluyla ortaya çıkan bazı SNP lokusları, evrimsel etkiler ve genetik sürüklenme nedeniyle belirli popülasyonlarda sabit hale gelmiştir. SNPler genomda oldukça sık ortalama her 1000 bç'de bir oluşur. dbSNP veri bankasının 2017 yılı verilerine göre insan genomunda 335 milyon

(335,215,764) valide edilmiş SNP keşfedilmiştir (225). SNP'ler tipik olarak, 150 bç'den kısa küçük amplikonlar olarak tasarlanabilir. Bu, onları bozulmuş DNA örnekleri için ideal belirteçler yapar. SNPler kimliklendirmenin mtDNA genomu veya Y kromozomu üzerindeki konumlarına göre akrabalık ilişkilerini, bir bireyin biyocoğrafik kökenini gösteren soy bilgisini ve ten, saç ve göz rengi gibi fenotip bilgileri elde etmek için kullanılır. Adli uygulamalar için kullanılan SNP'ler dört kategoriye ayrılabilir: kimliklendirme ile ilgili SNP markırları, nesep tayini ile ilgili SNP markırları, biyocoğrafik soy ile ilgili SNP markırları ve fenotip ile ilgili SNP markırları (46, 94).

2.2.3.1. Kimliklendirme ile ilgili SNP Belirteçleri (Identity Informative SNPs, IISNPs)

Kimlik testi için SNP karakterizasyonunda erken dönemde alana öncülük eden iki araştırma grubu, Dr. Kenneth Kidd'in Yale Üniversitesi'ndeki araştırma grubu ve Avrupa'daki SNPforID Konsorsiyumu'dur (53,90,91). Her iki gruptan yapılan araştırmalar, her bir SNP'den toplanan bilgi miktarını en üst düzeye çıkarmak için yüksek heterozigotluğa sahip SNP belirteçlerini ve popülasyonlar arasındaki farklılıklarını azaltmak için düşük bir sabitleme indeksini belirlemeye odaklanmıştır. Adli araştırmalarda kimliklendirme için otozomal SNP'ler genellikle bialleliktir ve çoklu-allelik STR'lerden daha az polimorfiktir. Bu nedenle, STR'lere göre daha fazla sayıda SNP'nin kullanılması ve/veya belki de multipleks genotipleme teknolojileriyle birleştirilmiş tri-alelik SNP'lerin kullanılmaktadır (50,92,93). Belirlenmiş 30-50 otozomal SNP'nin, 10-15 adli olarak kullanılan STR'lerle elde edilenlere benzer ayırım gücüne ulaşabilir (50,92,8).

Kimliklendirme için SNP'ler seçilirken, tercih edilen SNP'lerin dünya çapındaki popülasyonlarda benzer şekilde yüksek derecede alelik çeşitliliğe sahip olması ve dünya çapındaki popülasyonlar arasında düşük derecelerde popülasyon farklılaşmasına sahip olması gerekir (51). İlk özellik, farklı biyocoğrafik soylardan gelen insanlar arasında benzer şekilde yüksek eşleşme olasılıklarına ulaşmak için önemlidir; ikincisi, eşleşme olasılıklarını

tahmin ederken popülasyon altyapısının etkilerinden kaçınmak için çok önemlidir. Uluslararası HapMap Projesi gibi kamuya açık insan genomik kaynakları, birden fazla popülasyondan SNP'leri tespit etmek için faydalıdır, ancak dünya çapında yeterli veri kapsamı sağlamaz (12).

Her ne kadar SNPler STR'e göre avantajları olmalarına rağmen rutin analizlerde ilk sırada tercih edilemezler. Çünkü, mevcut tüm ulusal adli DNA veri tabanları STR tabanlıdır (12). Ayrıca, birçok ülkedeki mevzuat, hüküm giymiş suçlulardan DNA örneklerinin tutulmasını engellemektedir. Bu nedenle, rutin adli vaka çalışmaları için STR analizlerine gerekli durumlarda ek veya tamamlayıcı olarak SNP analizleri yapılmaktadır (12).

Toplu ölüm vakalarında kimliklendirme dahil olmak üzere kayıp kişilerin tanımlanmasında, kurbanların antemortem örneklerinden alınan DNA profilleri veya kurbanların akrabalarından alınan referans örnekleri, de novo toplanır ve kurbanların kalıntılarıyla birlikte genotiplendirilir (95). Bu gibi durumlarda DNA genellikle yüksek oranda bozulur ve STR yerine SNP markırları ile çalışılabilir. Toplu ölüm vakalarında kimliklendirme için SNP markırları, örneğin 11 Eylül 2001'de New York City'deki Dünya Ticaret Merkezi'ne yapılan terörist saldırılardan sonra da dahil olmak üzere çeşitli durumlarda uygulanmıştır (96).

İnsan kimliklendirme için birkaç SNP kimliklendirme kiti geliştirilmiştir. Bu geliştirilen kitlerden bazıları: Lou ve ekibi tarafından 2011 yılında Çin'de 44 SNP lokusundan oluşan hassas, spesifik ve etkili bir multipleks mini dizileme testi geliştirmiştir, 2010 yılında Güney Kore'de Kim ve ekibi, cinsiyeti belirlemek ve kimliklendirme için tasarlanmış bir multipleks kit geliştirmiştir, 2005 yılında Dixon ve ekibi 21 polimorfik SNP içeren multipleks kit geliştirmiştir. Kidd ve arkadaşları (2006) tarafından geliştirilen 44plex paneli, Avrupalı Afrikalılar, Afrikalı Amerikalılar ve Çin/Japon popülasyonları arasındaki uzaklık ve heterozigotluk (yüksek heterozigotluk ve düşük Fst) göz önüne alınarak

oluşturulmuştur ve günümüzde NGS kitlerinde de yer alın en sıklıkla kullanılan panellerden biridir (51). Diğer sıklıkla kullanılan panel ise SNPforID tarafından geliştirilen Asya, Avrupa ve Afrika popülasyonlarında polimorfik olduğu bildirilen 52-pleks SNP kitidir (50,92,97,98).

2.2.3.2. Nesep ile ilgili SNP Belirteçleri (Linage Informative SNPs, LISNPs)

mtDNA genomunda ve Y kromozomunda bulunan nesep ile ilgili SNP'ler tanımlanmıştır. Rekombinasyon eksikliği ve düşük mutasyon oranı nedeniyle, bu SNP'ler, özellikle referans örneklerin ve kanıt örneğinin birkaç nesil tarafından ayrıldığı durumlarda, evrimsel çalışmalar ve akrabalık analizleri için oldukça bilgilendirici olmuştur. Bugüne kadar, adli vaka çalışması için az sayıda doğrulanmış SNP testi geliştirilmiştir (11). Örnek olarak Coble ve ekibi tarafından ortak mtDNA haplotiplerini daha fazla çözmek için 18 spesifik ortak Kafkas HVI/HVII tipini hedefleyen 8 farklı multipleks panel halinde organize edilmiş 59 SNP geliştirilmiştir (99).

Soy SNP'lerinin en olası adli kullanımı, kayıp kişi vakaları veya toplu afet tanımlamaları içindir. Akrabalık analizi kullanılarak yapılan genetik testlerle başarılı tanımlama, analiz için mevcut DNA miktarı, karşılaştırma için aile üyelerinin sayısı ve mevcut genetik belirteçler ile sınırlıdır. Mevcut soy belirteçleri, yani mtDNA ve Y kromozom lokusları, sınırlı bir ayrım gücüne sahiptir. Bununla birlikte, HapMap projesi, adli amaçlar için otozomlardaki SNP'ler olan ve toplu olarak soy temelli belirteçler olarak hizmet edebilen haploblokları tanımlamıştır (100-102).

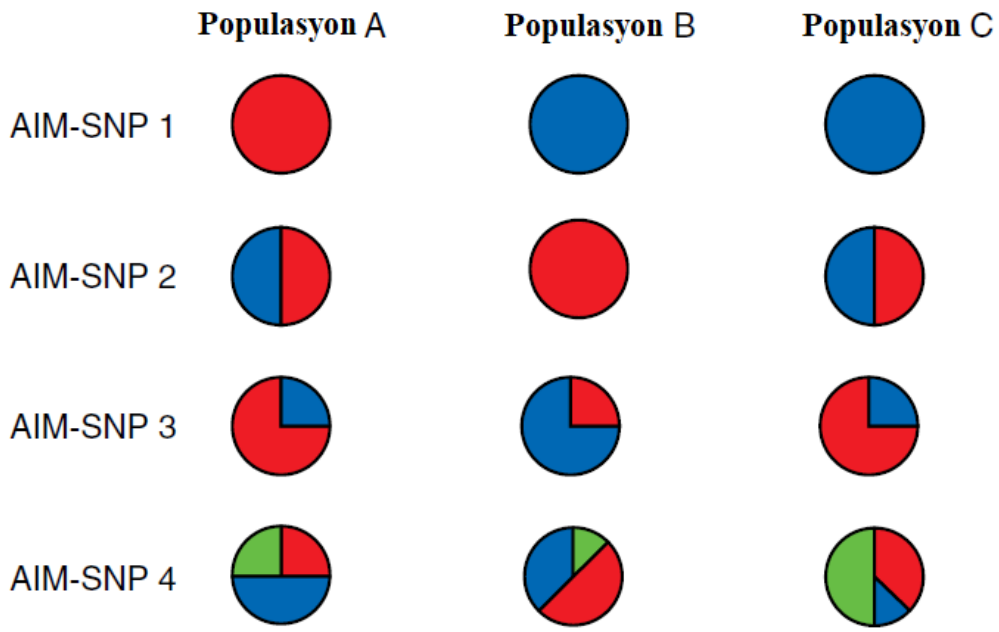
2.2.3.3. Soy ile İlgili SNP Belirteçleri (Ancestry Informative SNPs – AISNPs)

Bir kişinin biyocoğrafik soyu, atalarından aktarılan genetik olarak markırlar ile belirlenebilir. Adli genetikte, biyocoğrafik soyun belirlenmesinde ilk önce tek ebeveynin soyuna ilişkin bilgi veren markırlar - anneden aktarılan mitokondriyal DNA ve babadan aktarılan Y-kromozom lokusları- kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu markırların tek

ebeveynli kalıtımı, genetik rekombinasyon eksikliği ile birleştiğinde, ebeveynleri veya daha uzak akrabaları farklı atalara sahip olan karıştırılmış (admixed) bireylerde biyocoğrafik soyun belirlenmesini zorlaştırır. Bu kısıtlamaların üstesinden gelmek için, soy bilgilendirici markırlar (Ancestry Informative Markers, AIMs) mevcut adli tıp uygulamalarında giderek daha fazla kullanılmaktadır (103). AIMs'ler, otozomal kromozomlar üzerinde bulunan ve yeniden birleşen ve böylece önceki nesillerden miras kalan tüm atasal mozaiği yakalamaya başlayabilen genetik işaretlerdir. AIMs işaretleyici markırlarını tipleri nin spektrumu, uzunluk polimorfizmlerinden (ör.STR'ler), dizi varyantlarına (ör.SNP'ler veya InDels) kadar uzanan genetik lokusları kapsar. Rosenberg ve ark. tarafından yapılan ilk olarak yapılan çalışmada, biyocoğrafik soyun belirlenmesi için AIMs STR kullanılarak AIM'leri biyocoğrafik kökenin çıkarımı için DNA istihbarat araçları olarak kullanmanın mantığı, ilk olarak 2002'de Rosenberg ve meslektaşları tarafından tanımlanan insan popülasyonlarının birbirinde ayrılmıştır (104). 52 popülasyondan 1064 kişiden oluşan bu çalışmada toplam 377 STR değerlendirilmiştir (104). Bu popülasyonlar arasında tespit edilen genetik kümeleşmeler (clusters) beş ana popülasyon grubunu göstermiştir: Afrika, Avrasya, Asya, Okyanusya ve Amerika (104).

AIMs markırlarının adli genetikte kullanımında, yalnızca seçilen markırların ayrım gücü değil, aynı zamanda degrade veya az miktarda DNA'yı içeren örnekleri başarıyla tespit edilecek markırlar da dikkate alınmalıdır. STR markırlarının (10-3) yüksek mutasyon oranı nedeniyle, çoklu alelik varyasyonları ile birlikte, ana popülasyon grupları arasında oldukça tek tip alel frekans dağılımları gösterme eğilimindedirler ve bu nedenle popülasyon tabakalaşmasını daraltırlar. Bu, insan genomunda nadir görülen güçlü popülasyon farklılıklarına sahip spesifik STR'ler tanımlanmadıkça biyocoğrafik soy çıkarımı için STR markırlarının kullanımlarını azaltır (105,106).

STR markırlarının aksine, SNP ve InDels markırları, genellikle bi-alelik varyasyona sahip oldukça kararlı genetik belirteçlerdir (ortalama mutasyon oranı: 10-9). SNP'lerin küçük ama önemli bir kısmı, AIM'ler olarak kullanım için uygun polimorfizmlerdir. AISNPs markırları aşağıda açıklanan dört kategoride sınıflandırılabilir. İlk kategori, sabit değişkenli AISNPs ile temsil edilir (Şekil 1'deki AISNPs 1). Bu SNP'ler, yalnızca bir popülasyonda (popülasyon A) fikse olmuş ve tespit edilen bir alel sunar, ikincisi ise yalnızca diğer popülasyonlarda (B ve C) bulunur (107). İkinci kategori, popülasyona özgü varyantları olan SNP'leri temsil eder (Şekil 1'de AIM-SNP 2). Bu belirteçler, popülasyon B'de tespit edilmeyen bir popülasyon (popülasyon A ve C) için spesifik bir alele sahiptir. Üçüncü kategori, çarpık frekanslı AIM-SNP'leri içerir (Şekil 1'de AIM-SNP 3). Bu polimorfizmlerden her iki alel de her popülasyonda tespit edilebilir, ancak karşılık gelen alel frekansları, popülasyon grupları arasında zıt alel frekans dağılımlarına sahiptir (107). Son olarak, biyocoğrafik soy çıkarımı için tri-allelik AISNPs markırları da kullanılabilir (Şekil 1'de AIM-SNP 4). SNP'ler ağırlıklı olarak bi-alelik olmasına rağmen, genomda küçük bir oranda tri-alelik ve hatta tetra-alelik SNP'ler de bulunabilir. Bu SNP'lerin özelliği, üç allelin her birinin herhangi bir popülasyonda sık görülmesidir (107).



Şekil 1: Örnek popülasyonları (A, B, C) kullanan dört AIM-SNP kategorisini temsil eden pasta grafikler. Üç renk farklı alelleri gösterir (107).

AISNPs markırları biyocoğrafik soyun tahmini için en uygun belirteçlerdir, çünkü ister sabit, ister spesifik veya çarpık olsun, popülasyon belirleyici alellerin tespiti, biyolojik örneğin biyocoğrafik soyunu tahmin etmek için gerekli bilgileri sağlar (107). Tek bir SNP'nin tek başına çok az güce sahip olduğu doğru olsa da, yeterli sayıda AIM-SNPs markırlarının eşzamanlı analizi ile soy tahmini doğru bir şekilde yapılabilir (107). Günümüzde, ana popülasyon gruplarını ayırt edebilen 34-128 polimorfizmi kapsayan bir çok AISNPs seti geliştirilmiştir (60,108-110).

Biyocoğrafik soyun tahmini için AISNPs markırlarını seçerken ve hatalı tahminlerden kaçınmak için, yalnızca hedef popülasyonlar arasında farklılıklar gösteren markırları belirlemek değil, aynı zamanda dünya çapındaki ana nüfus grupları arasındaki farklılığı dengelemek de önemlidir. Bu konu özellikle karma soyudan gelen bireyleri (admixed) değerlendirirken önemlidir. Ana popülasyonlar, altta yatan biyocoğrafik soylarına göre genetik olarak tek tip kümeler olarak bölünse bile, diğer bazı popülasyonlar heterojen bir genetik arka plan ile karakterize edilir. Tarihsel demografik olaylar nedeniyle, bu tür

popülasyon gruplarına ait bireyler bir genetik karışım süreci yaşamıştır (111). Örneğin, Orta ve Güney Amerika nüfus grupları genellikle, Kızılderili (yerli kıta nüfusu), Afrikalı (köle ticaretinden) ve Avrupa bileşenlerinin (Avrupa kolonizasyonundan) Amerikalı bireylerin büyük bir kısmında çoklu oranlarda ve kombinasyonlarda katmanlara ayrıldığı üç atadan kalma bir model sergiler (111). Genetik karışımın başka bir örneği, bazı Avrasya popülasyonlarında, özellikle de kıtanın ortasında bulunanlarda gözlenir. Güçlü fiziksel engellerin yokluğu, genetik farklılaşmanın kapsamını azaltmıştır ve bu, dünyanın bu tür bölgelerinde popülasyona özgü polimorfizmlerin daha düşük bir oranına neden olmuştur (107). Coğrafi olarak kıtanın uçlarında yer alan Avrasya bölgeleri iyi bir şekilde ayırt edilebilse de (örn. Avrupa'ya karşı Güneydoğu Asya), ve bu durum daha büyük fiziksel mesafelerin daha büyük genetik mesafelerle doğrudan ilişkili olduğu hipotezini desteklerken, çoğu alel frekansları ara bölgelerde (örn. Orta Doğu ve Kuzey Afrika) genetik olarak örtüşmektedir (112).

Biyocoğrafik soy çıkarımı için optimal AISM-SNPs markırları seçildikten sonra, elde edilen genotipleri yorumlamak için türetilmiş genotipleri idare edebilen uygun istatistiksel araçların yöntemin seçimi kullanımı, elde edilen genotipleri yorumlamak için gerekli analizlerin önemli bir bölümünü oluşturur (107). Böyle bir amaç için genellikle üç ana istatistiksel yaklaşım kullanılır: Bayes analizi (örn. Snipper Forensic Classifier veya FROG-kb); temel bileşen analizi (PCA) ve STRUCTURE (64). Bu istatistiksel yaklaşımların hepsinde ortak olan, bilinmeyen örneğin menşe popülasyonunu atamak için adli bir örneğin işaretleyici profilinin önceden tanımlanmış bir referans popülasyonlar kümesindeki aynı işaretleyicilerle aynı anda karşılaştırılmasıdır (107). Halihazırda referans veri olarak kullanılan genotiplerin çoğu, iki genel veri tabanından indirilebilir: HGDP-CEPH paneli (CEPH insan genom çeşitliliği paneli) ve 1000 Genom Projesi popülasyon veri tabanı.

HGDP-CEPH paneli (CEPH insan genom çeşitliliği paneli) veri tabanı, Afrika, Avrupa, Kuzey Afrika, Orta Doğu, Orta/Güney Asya, Doğu Asya, Okyanusya ve yerli Amerika'dan dünya çapında 1064 bireyden yaklaşık 650.000 SNP genotipinden oluşmaktadır (113). 1000 Genom Projesi, Afrika, Avrupa, Doğu Asya, Güney Asya ve karıştırılmış yerli Amerikalılardan (bazı karıştırılmamış Perulular dahil) 2504 bireyin tüm genom dizilimini kapsar (114). Her iki veritabanı da birbirini tamamlayıcı niteliktedir. CEPH paneli dünya çapındaki popülasyon çeşitliliği açısından daha fazla temsil edici olsa da, 1000 Genom Projesi tüm markırları ve popülasyon başına daha fazla sayıda örneği içerir. Bu veri tabanları daha önce birçok çalışma tarafından araştırılmış, örnek kümeleri için tutarlı biyocoğrafik kökenleri kaydetmiştir ve bu nedenle yukarıda belirtilen istatistiksel yöntemler için referans materyal olarak kullanılmak üzere iyi kurulmuş veri kümeleri haline gelmiştir (104,115). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Uzak Batı Asya ve Akdeniz popülasyonlarını diğer popülasyonlardan ayırt etmek için kullanılabilecek yeni 86 AISNP belirteci belirlenmiştir. Bu çalışmada, Kidd ve ekibi ilk analizde suç mahallerinden elde edilen kanıtları 55 AISNPs panelinde test etmiştir. Eğer gerekli ise (yani Avrasya ve Kuzey Afrika'yı işaret etmek için biyocoğrafik soy tahminleri elde edildiyse), doğru biyocoğrafik soy tahmini için bu bölgeler için özel olarak geliştirilmiş paneller ile test edilerek Uzak Batı Asya ve Akdeniz popülasyonlarını diğer popülasyonlardan ayırt etmek mümkün olmuştur. 86 AISNP'den oluşan panel kullanılarak bir kişinin biyocoğrafik soyunu daha yüksek doğrulukla belirlemek mümkün olmuştur (193).

Özetle; biyolojik bir numunenin donörünün kıtalararası biyocoğrafik soyu, mevcut belirteçler ve araçlar kullanılarak çıkarılabilir. Daha yüksek bir çözünürlüğün elde edilip edilemeyeceğini keşfetmek, keşfedilecek bir sonraki zorluk olacaktır: yani kıta içi veya kıta içi farklılaşma. Böyle bir amaç için, genomdaki yüzlerce fragmanı eşzamanlı olarak sıralayan teknolojiler gerekli olacaktır. AIM belirteçlerinin bir bireyin biyocoğrafik soyunu,

yani genomlarının bölümlerinin altında yatan içsel bilgiler hakkında ayrıntılar sağladığını vurgulamak önemlidir.

2.2.3.4. Fenotip ile ilgili SNP Belirteçleri

Dışarıdan görülebilen özellikler (Externally Visible Characteristics, EVCs), bir insanın fiziksel görünümüyle ilişkili görsel olarak fark edilebilir karakterlerle temsil edilir. Adli vakalarda genellikle mağdur veya görgü tanığı ifadelerinden şüphelinin dış görünüşüne dair bilgi edinilir. Örneğin, bir görgü tanığının bir kişinin göz rengini görüp görmediğine dair yaygın olarak sorulan sorudur. Eğer görgü tanığı bunu hatırlanmadıysa veya gözlemlenmediyse yahut emin olmadan yanıltıcı bir cevap verebilir. Bu gibi durumlarda elde edilen bilgi güvenilir olmayabilir. Günümüzde genetik testler ile bu gibi fiziksel özellikler daha yüksek doğrulukla belirlenebilmektedir (107).

Adli bir vakada biyolojik örneğin sahibinin cinsiyeti, tüm STR genotipleme kitlerinde bulunan amelogenin lokusu ile belirlenmektedir (116). Cinsiyet, amelogenin kullanılarak kolayca tanımlanabilmesine rağmen, genellikle fiziksel özellikler, birden fazla genin dahil olduğu karmaşık genetiğe sahiptir ve bu genler, çevresel faktörlerle karmaşık etkileşimlere sahiptir (107).

İnsan pigmentasyonu, diğer birçok fiziksel özellik ile karşılaştırıldığında nispeten düşük bir karmaşıklık düzeyine sahiptir yani belirli bir fenotipin altında az sayıda gen bulunur. Pigmentasyon varyasyonuyla bağlantılı ana molekül, iki pigment tipiyle melanindir: ömelanin (eumelanin) ve feomelanin. Ömelanin koyu tonlar (kahverengiden siyaha) üretir ve feomelanin daha açık tonlar (kırmızıdan sarıya) üretir. Dokudaki her iki pigmentin oranlarındaki farklılıklar göz, saç ve ten rengi varyasyonu yaratır (117). Adli bakış açısından, insan pigmentasyonu için SNP tabanlı testlerin geliştirilmesi, adli EVC tahmininde atılan ilk adımlardır.

2.2.3.4.1. Göz Rengi Tahmini Yapan SNP Belirteçleri

Göz pigmentasyonu, açık maviden koyu kahverengiye kadar geniş bir iris rengine sahiptir. Bununla birlikte, tonaliteler ve yoğunluklardaki kademeli değişim genellikle daha basit bir şekilde mavi ve kahverengi olarak sınıflandırılır. İris rengiyle en yakından ilişkili lokus, HERC2 geninde bulunan promotor SNP rs12913832'dir (118). rs12913832 tarafından sağlanan yüksek tahmin değerine rağmen, çoğu adli göz rengi testi, fenotip tahminini iyileştirmek için ek SNP'leri eş zamanlı olarak analiz eder (107).

IrisPlex adlı ilk adli göz rengi tahmin sistemi, özellikle mavi ve kahverengi gözleri ayırt etmek için tasarlanmıştır (119). IrisPlex sistemi, biyolojik numunelerden insan göz renginin tahmini için DNA tabanlı bir test sistemidir ve binlerce kişiden alınan genotiplere ve fenotiplere dayanan istatistiksel bir tahmin modeli (multinominal lojistik regresyon) ile birlikte adli olarak doğrulanmış tek bir multipleks genotipleme testinden oluşur (194). IrisPlex, altı farklı gende bulunan 6 SNP markırıyla (HERC2 rs12913832, OCA2 rs1800407, SLC24A4 rs12896399, SLC45A2 (MATP) rs16891982, TYR rs1393350 ve IRF4 rs12203592) göz renklerini tahmin etmek için kullanır (194). IrisPlex sistemini uluslararası düzeyde güçlü bir şekilde değerlendirmek amacıyla Uluslararası Adli Genetik Derneği'nin (ISFG) Avrupa DNA Profili (EDNAP) Grubu tarafından düzenlenen ve üç göreve ayrılan ortak bir çalışmada 21 laboratuvar tarafından test edilmiştir (194). 1. görevde düzenleme laboratuvarı tarafından FTA kartlarında sağlanan 10 kan ve tükürük örneğinin göz rengi fenotipleri ile birlikte değerlendirilmesi yapılmıştır (194). Genotiplerin %99,4'ü doğru olarak rapor edilmiş ve göz rengi fenotiplerinin %99'u doğru tahmin edilmiştir. 2. görevde ev sahibi laboratuvar tarafından simüle edilmiş vaka örneklerinden çıkarılan, yapay olarak degredasyona uğratılan ve katılımcılardan değişen DNA konsantrasyonlarında sağlanan 5 DNA örneği değerlendirilmiştir (194). Bu görev için genotiplerin %98,7'si doğru bir şekilde belirlenmiş ve göz rengi fenotiplerinin %96,2'si doğru şekilde çıkarılmıştır (194). Görev 1

ve 2 birlikte, 1890 genotipin %99,2'sini (1875) doğru şekilde oluşturmuş ve 15 (%0,8) yanlış genotiplemeden yalnızca 2'sini (%0,1) yanlış göz rengi fenotipleriyle sonuçlandırmıştır (194). Görev 3'te, katılımcıların IrisPlex genotipleme ve göz rengi fenotip çıkarımı için kendi test deneklerini seçmelerini içerirken, göz fotoğrafları laboratuvarca sağlanmış ve çalışılmıştır; 100 numune ve 19 laboratuvarda göz rengi fenotiplerinin %96'sı doğru bir şekilde çıkarılmıştır (194). Genotipleme ve göz rengi fenotiplemesindeki yüksek başarı oranları, IrisPlex testinin tekrarlanabilirliğini ve sağlamlığını ve ayrıca IrisPlex modelinin DNA'dan mavi ve kahverengi göz rengini tahmin etme doğruluğunu açıkça göstermiştir (194). Ek olarak, bu çalışma, IrisPlex sisteminin, önceden var olan çeşitli deneyimlerle dünya çapındaki adli tıp laboratuvarlarında ne kadar kolay uygulanabilir olduğunu göstermektedir (194). IrisPlex sistemi NGS platformları olan Illumina ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit'inde ve HID Ion AmpliSeq Identity Panelinde de kullanılmaktadır.

Ruiz ve ekibi toplam 13 SNP'yi kapsayan bir test geliştirerek, altı Irisplex'e yedi SNP ekleyerek, bu sınırlamanın üstesinden gelmeye çalışmıştır. Ek belirteçler, yeşil ela gibi ara göz renklerinin daha iyi çıkarımına katkıda bulunan SNP rs1129038'i içermektedir (120).

Göz rengi değişkenliği kalıplarının büyük ölçüde Avrupa popülasyonlarının özelliği olduğunu belirtmek önemlidir. Avrupa dışında, Orta Doğu gibi küçük bir oranda mavi ve/veya ara göz renginin nüfus karışımı yoluyla meydana geldiği komşu popülasyonlar haricinde, baskın göz rengi koyu kahverengidir. Bu nedenle, iris pigmentasyonunu araştıran çoğu çalışma, Avrupa örneklerine dayanan tahmin modelleri geliştirmiş ve doğrulanmıştır. IrisPlex paneli, Türkiye'den bir popülasyon örneğinden 100 bireyde çalışılmıştır (195). Bu çalışmada 0,7 olasılık eşiğine sahip IrisPlex tahminleri, 72 doğru sınıflandırma, 19 yanlış sınıflandırma ve dokuz gruplandırlılamamış sınıflandırma ile sonuçlanmıştır (195). Bu çalışmada IrisPlex paneli, mavi için %100 ve kahverengi göz renkleri için %95,77'lik bir başarı oranı sağlanmıştır (195). Kahverengi göz rengine sahip sadece üç kişi

sınıflandırılamamıştır (195). Sonuç olarak, bu belirteçlerin, karışımın meydana geldiği ve Güney Amerika popülasyonlarında yaygın olduğu gibi, Avrupa ortak atalarının kısmi modellerini taşıyan Avrupa dışı popülasyonlarda nasıl davrandığını ayrıntılı olarak incelenmesi gerekli olacaktır (121).

2.2.3.4.2. Saç Rengi Tahmini Yapan SNP Belirteçleri

İris rengine benzer şekilde, saç pigmentasyonu, saç rengi açıklamaları için basit bir sınıflandırma sistemi sürdürmek adına dört kategoriye ayrılabilen geniş bir saç rengi yelpazesi sunar: kırmızı, sarı, kahverengi ve siyah. Başarılı saç rengi tahminleri için göz rengine kıyasla daha büyük bir gen kümesi gereklidir, ancak kızıl saçın tek gen MC1R'deki varyantlar tarafından tanımlandığına dikkat edilmelidir (122). Kızıl saçlı deneklerde bu genin erken dizileme çalışmaları, MC1R'de bulunan beş SNP'ye dayalı olarak kızıl saç için ilk adli testin ortaya çıkmasını sağlamıştır (123). Bu ilk SNP testi geliştirildiğinden beri, pigmentasyon tahmin sistemleri artık tüm göz ve saç rengi varyasyonlarını kapsamaktadır. Hem göz hem de saç rengi için temel adli test, adından da anlaşılacağı gibi, IrisPlex'te kullanılan SNP'lerin uzantısından geliştirilen HIrisPlex'tir (13). HIrisPlex, 6 IrisPlex SNP'nin tümünü içeren 24 göz ve saç rengi DNA varyantını hedefleyen (MC1R rs312262906, MC1R rs11547464, MC1R rs885479, MC1R rs1805008, MC1R rs1805005, MC1R rs1805006, MC1R rs1805007, TUBB3 rs1805009, MC1R rs201326893, MC1R rs2228479, MC1R rs1110400, SLC45A2 rs28777, SLC45A2 rs16891982, KITLG rs12821256, LOC105374875 rs4959270, IRF4 rs12203592, TYR rs1042602, OCA2 rs1800407, SLC24A4 rs2402130, HERC2 rs12913832, PIGU rs2378249, LOC105370627 rs12896399, TYR rs1393350, TYRP1 rs683) tek bir multipleksin yanı sıra iki tahmin modeli, saç rengi kategorileri ve koyulukları için yeni geliştirilmiş bir model ve göz rengi için önceden geliştirilmiş IrisPlex modelinden oluşur (13). HIrisPlex test, az miktardaki DNA'nın yanı sıra bozulmuş DNA analizleri için tasarlanmıştır (13). HIrisPlex testi, DNA

Analiz Yöntemleri Bilimsel Çalışma Grubu (SWGDAM) kılavuzları ile tam uyum içinde çalıştığı ve uygulamalarının adli vaka çalışmasına önemli bir ön koşul sağladığı gösterilmiştir (14). HIrisPlex testi, yalnızca 63 pg miktardaki DNA'ya kadar eksiksiz profiller üretmiştir (14). HIrisPlex sisteminin saç rengini tahmin etme gücü, Avrupa'nın üç farklı bölgesinden farklı saç rengi frekansları gösteren 1551 kişide değerlendirilmiştir (13). Tahmine dayalı bir yaklaşım kullanan kişiye dayalı tahmin doğrulukları sarışın için %69,5, kahverengi için %78,5, kızıl için %80 ve siyah saç için %87,5 olmuştur (13). Dünya çapındaki DNA örnekleri üzerinde HIrisPlex analizinden elde edilen sonuçlar, HIrisPlex saç rengi tahmininin biyo-coğrafi atadan bağımsız olarak güvenilir olduğunu göstermiştir (13). Ayrıca, kahverengi gözlü, siyah saçlı bir bireyin Avrupa dışı (Avrupa'ya yakın bölgeler hariç) ve yalnızca Avrupa (yakın bölgeler dahil) biyocoğrafik kökenli olması durumunda >%86'lık bir tahmin doğruluğu ile sonuç çıkarmanın mümkün olduğu gösterilmiştir (13). Tür testleri, tam bir HIrisPlex profili için insan özgüllüğünü ortaya çıkarırken, test edilen tüm hayvanlarda yalnızca insan olmayan primatlar, 24 DNA belirtecinden 20'sinde en yakın tam profili göstermiştir (14). Kan, meni, tükürük lekeleri, köklü kıllar ve son derece düşük miktarda iz (touch) DNA örnekleri gibi simüle edilmiş adli vaka örneklerinin testlerinde vakaların %88'inde tam profiller üretmiştir (14). Beş bağımsız adli tıp laboratuvarı arasında gerçekleştirilen uyumluluk testi, değişen DNA numunesi türleri üzerinde tutarlı, tekrarlanabilir sonuçlar göstermiştir. Birkaç yüz yıllık insan kalıntılarından alınan DNA örneklerinde de profil üretmiştir (14). HIrisPlex panelinin Türkiye'de yapılan optimizasyon ve validasyon çalışmasında saç ve göz rengi tahmininde vakalrın %90'ında doğru tahmin yapılmıştır (196).

Göz rengine kıyasla saç rengi tahmini için daha düşük başarı oranları elde edilmiştir. Bu özellikler arasındaki bir fark, saç renginin yaşa bağlı bir özellik olabilmesidir (yıllar içinde beyazlaşırken), göz rengi desenleri değişmeden kalır. Pigmentasyon tahmin

testlerinin geliştirilmesi için kullanılan örneklerin çoğu yetişkin bireyleri kullandığından, hangi deneklerin çocukluktan ergenliğe kadar saç renginde değişiklik yaşadığını değerlendirmek mümkün değildir (107). Bu konunun daha iyi anlaşılması için yakın zamanda erken saç rengi kayıtları bilinen çocuklardan alınan örnekler araştırılmış ve saç rengi tahminlerindeki önceki hataların saç rengindeki yaşa bağlı değişikliklerle açıklandığı gösterilmiştir (125). Bu nedenle, gelecekte adli tahmin sistemlerinin iyileştirilmesi için, donörün bireysel yaşının eş zamanlı olarak değerlendirilmesi dikkate alınmalıdır. Ek fenotip analizi, erken (yaşa bağlı olmayan) saç beyazlaması gibi daha fazla incelik sağlayabilir (107).

2.2.3.4.3. Ten Rengi Tahmini Yapan SNP Belirteçleri

Ten pigmentasyon testleri, büyük ölçüde Avrupalı deneklerle sınırlı olan göz ve saç varyasyonunun aksine, tüm popülasyonlardan bireylere uygulandığı için adli analiz için önemlidir. Ek olarak, pigmentasyon seviyelerinin ultraviyole (UV) radyasyona maruz kalma gibi çevresel faktörlerden etkilenmesi, kalıtsal olduğu kadar adaptif olabilen cilt pigmentasyon yollarında yer alan genleri tanımlamayı da zorlaştırır. Ten rengi pigmentasyonuna potansiyel olarak dahil olan ilgili genler tanımlansa bile, bazı ten tonalitelerinin belirli coğrafi bölgelerle korele olduğu gerçeği, biyocoğrafik soya bağlı varyasyonun ten rengini birleştirebileceğinden, belirli genlerin tenrengine ne ölçüde katkıda bulunduğunu anlamamızı engeller. Bu uyarıların dışında, adli kullanım için ten rengi tahmin kitleri geliştirilmiştir. İlk olarak, 10 SNP kullanan ve üç geniş fenotipik kategoriye dayanan bir tahmin testi geliştirilmiştir: açık, orta ve koyu ten rengi (126). Kit her iki uç kategoriyi de açıkça ayırmıştır.

Son yıllarda, 17'si ten pigmentasyon yollarına özgü olan 41 SNP'den oluşan bir adli DNA fenotipleme sistemi geliştirilmiştir (127). HIrisPlex-S olarak bilinen bu test, HIrisPlex'in genişletilmiş bir versiyonudur ve üç pigmentasyon özelliğinin hepsinin aynı

anda tahminini sağlar. Göz rengi tahmini için IrisPlex DNA test sistemi ve kombine göz ve saç rengi tahmini için HIrisPlex sistemini daha önce geliştirilmiş ve adli olarak doğrulanmıştır (197). Bunlara ek olarak, eser miktardaki DNA'dan göz, saç ve ten renginin eş zamanlı tahmini için HIrisPlex-S DNA test sistemini (ten (skin) için S) geliştirilmiştir(197). Bu adli DNA fenotipleme sistemi, 17 ten rengi öngörücü SNP (ANKRD11 rs3114908, OCA2 rs1800414, BNC2 rs10756819, HERC2 rs2238289, SLC24A4 rs17128291, HERC2 rs6497292, HERC2 rs1129038, HERC2 rs1667394, TYR rs1126809, OCA2 rs1470608, SLC24A5 rs1426654, ASIP rs6119471, OCA2 rs1545397, RALY rs6059655, OCA2 rs12441727, MC1R rs3212355, DEF8 rs8051733) için yeni bir multipleks test yoluyla toplam 41 SNP'yi hedefleyen iki SNaPshot tabanlı multipleks testinden oluşmaktadır (197). HIrisPlex-S sistemi üç istatistiksel tahmin modelini içerir: 6 SNP'ye dayalı göz rengi tahmini için önceden geliştirilmiş IrisPlex modeli, 22 SNP'ye dayalı saç rengi tahmini için önceki HIrisPlex modeli ve ten rengi için 36 SNP'ye dayalı HIrisPlex-S modeli (197). Bu panelin validasyon, daha önce 24-pleks testi için gösterildiği gibi, DNA Analiz Yöntemleri Bilimsel Çalışma Grubu (SWGDAM) kılavuzlarıyla tam uyum içinde gerçekleştirilmiştir (197). 17-pleks testin duyarlılık testi, 63 pg kadar küçük giriş DNA'sından tam SNP profilleri ortaya çıkarmıştır ve bu, 24-pleks HIrisPlex testinin daha önce gösterilen duyarlılık eşiğine eşittir (197). Yeni 17-pleks için, kan, meni, tükürük lekeleri gibi simüle edilmiş adli vaka örneklerinin, inhibe edilmiş DNA örneklerinin, düşük miktarda iz DNA örneklerinin ve yapay olarak bozulmuş DNA örneklerinin yanı sıra uyumluluk testi, sağlamlık, verimlilik testleri gerçekleştirilmişir (197). Dünya çapında dağılmış 2025 birey kullanılarak, ten rengi tahmininin güvenilirliği ve ayrıca tahmin edilen kategorilerin sayısı artırılarak DNA tabanlı ten rengi tahmininin ayrıntı düzeyinin iyileştirilmesi, 37 genetik lokustan 77 pigmentasyon SNP'si değerlendirilerek gerçekleştirilmiştir (197). Bu veri setinden, Çok Soluk için 0.75, Soluk için 0.73, Orta için

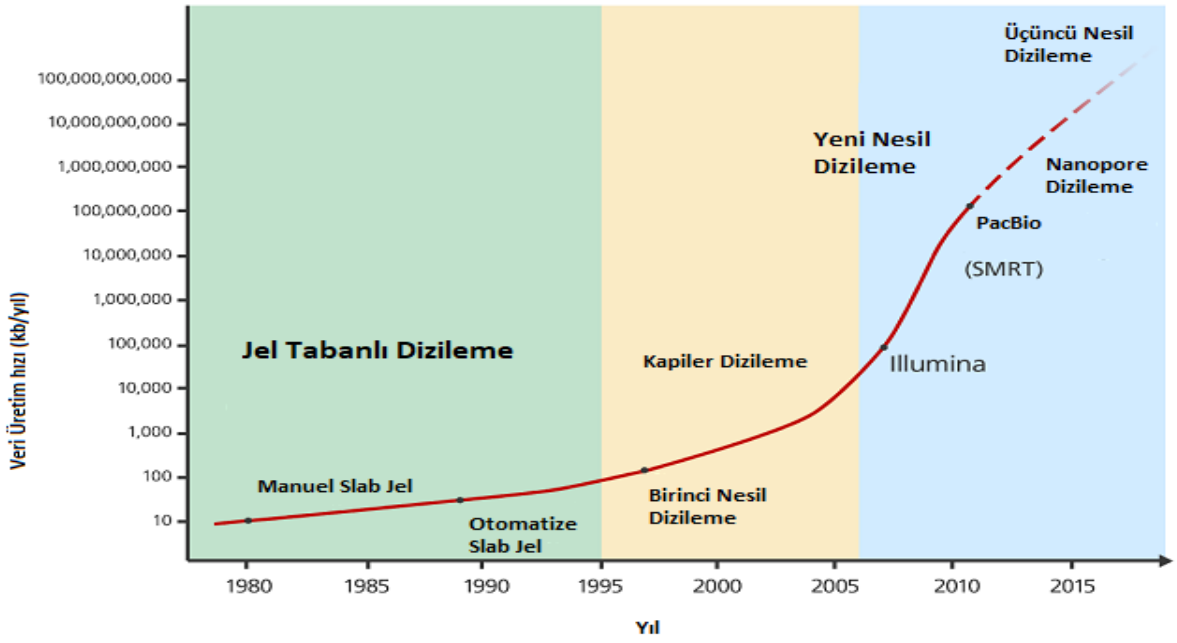
0.75, Koyu için 0.84 ve çok koyu için 0.98 AUC değerlerine ulaşan 16 genden 36 SNP'ye dayalı 5 ten rengi kategorisi için yeni bir tahmin modeli geliştirilmiştir. Önceden tahmin modeli eğitimi veya değerlendirmesine dahil olmayan 17 farklı popülasyondan 194 kişide karşılaştırma yoluyla bu modele dahil edilmiştir ve bu yeni model daha önce önerilen modelden daha iyi performans gösterdiği görülmüştür (197). Son olarak, herkese açık HIrisPlex web sitesi https://hirisplex.erasmusmc.nl/ için bir güncelleme sunulmuş ve HIrisPlex-S giriş genotiplerinden 3 göz, 4 saç ve 5 ten rengi kategorisi için bireysel olasılıkların tahmin edilmesine izin verilmiştir.

2.3. Adli Bilimler ve DNA Dizilemesi

1977'de Sanger'in zincir sonlandırma yöntemiyle başlayan ve günümüzün büyük ölçüde paralel dizileme (Massively Paralel Sequencing, MPS) kullanan yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) tekniklerine dönüşen DNA dizileme, biyoteknoloji, viroloji ve tıbbi teşhis gibi uygulama alanlarında vazgeçilmez hale gelmiştir. Son 5-6 yılda yayınlanan makalelerin sayısının artmasının yansıttığı gibi, bu teknikler adli alanda da dikkat çekmiştir. NGS'nin adli analizle ilgisi, standart STR profillerinin oluşturulmasının yanı sıra, polimorfizmleri aramak için DNA tekrarlarının da dizilenebilmesidir. Ayrıca, soy, babalık veya fenotip hakkında bilgi edinmek için ek SNP'ler dizilenebilir. Mevcut MPS sistemleri, bir suç mahallinden yalnızca sınırlı miktarda DNA veya yüksek oranda bozulmuş DNA'nın korunduğu durumlarda da çok faydalıdır. Yeterli otozomal DNA yoksa, mitokondriyal DNA maternal soy analizi için dizilenebilir. Bu gelişmeler, NGS kullanımının adli bilimler için vazgeçilmez bir araç haline geleceğini açıkça göstermektedir.

MPS, son on yılda büyük ilgi görmüştür. Bir MPS tekniği, Ulusal Kanser Enstitüsü genetik terimler sözlüğü tarafından 'bir bireyin genomunun nükleotid dizisinin bir bölümünü belirlemek için kullanılan yüksek verimli bir yöntem olarak tanımlanır. Bu teknik, birden fazla DNA dizisini paralel olarak işleyebilen DNA dizileme teknolojilerini kullanır (129).

MPS, yeni gelişmeleri önceki DNA dizileme yöntemlerinden ayırt etmek için genellikle yeni nesil dizileme (NGS) olarak adlandırılır. NGS tekniklerinin ilkeleri, performansı, avantajları ve dezavantajları hakkında çok sayıda inceleme bildirilmiştir (10,130-137).



Şekil 2 : DNA diz teknolojilerinin en önemli gelişmelerini gösteren zaman çizelgesi (22).

Birinci, ikinci ve üçüncü nesil dizilemedeki çeşitli önemli gelişmeler Şekil 2'de gösterilmektedir. Birinci nesil dizilemenin, özellikle 1977'de geliştirilen Sanger dizileme ile piyasaya uzun süre hakim olduğu açıktır. 2005-2007 yıllarında Solexa Genome Analyzer ve SOLiD R sistemi gibi birkaç ikinci nesil sistem piyasaya sürülmüştür. Üçüncü nesil dizileyiciler, Pacific Bioscience şirketinin SMRT sisteminin piyasaya sürülmesiyle başlamıştır. Üç nesil MPS tekniğinin dizileme ilkesi, okuma uzunluğu, çıktı ve çalıştırma süresi gibi özelliklere genel bir bakış Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Farklı dizileme tekniklerinin özellikleri (birinci, ikinci ve üçüncü nesil) (10,130-137).

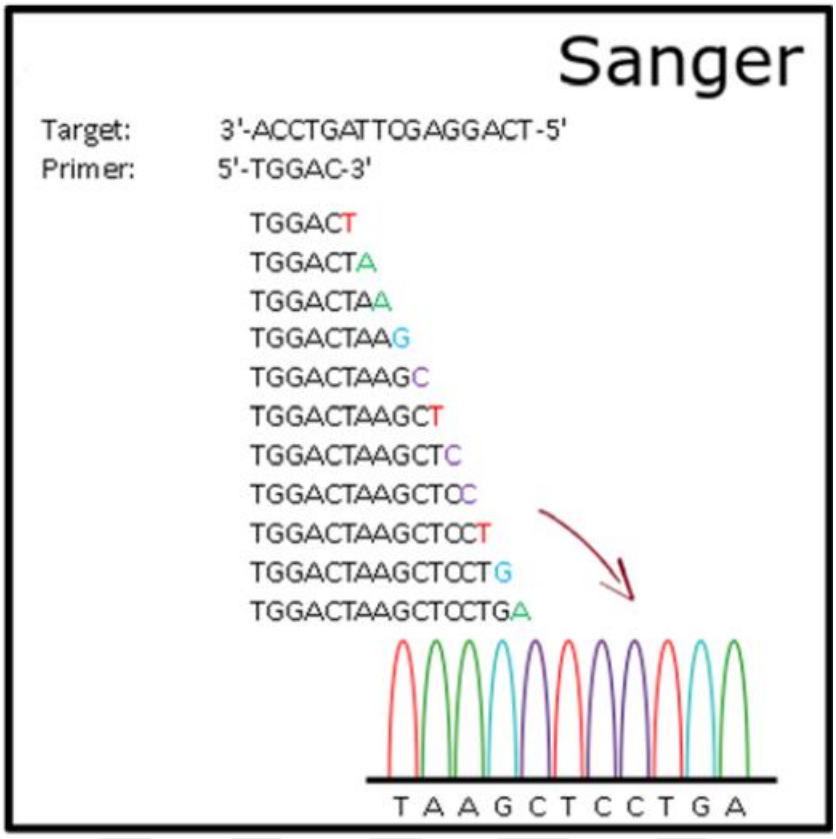
Generasyon	Metod	Çıkış Tarihi	Teknik	Okuma Uzunluğu (nt)	Verim ve çalışma süresi
I	Sanger	1977	Klonlama/Zincir Sonlandırma	25-1200	96, 84 Kb, 2 saat
II	454	2005	EmülsiyonPCR/SBS/pirodizileme	100-1000	1milyon, 0.7 Gb, 24 saat
II	Solexa/HiSeq /MiSeq	2006	KöprüPCR/SBS/Ters Terminasyon	36-300	6 milyar, 1.8 Tb, birkaç gün
II	SOLiD	2007	EmülsiyonPCR/Ligasyon/Prob	35-75	6 milyar, 320 gb, 1-2 hafta
II	Ion Torrent™	2010	EmülsiyonPCR/iyona duyarlı SBS/pH değişimi	200-400	60-80 milyon, 50 Gb, 2 saat
III	Pac Bio	2010	SMRT®/ZMW kuyucukları	8000-20000	350000, 7 Gb, 0.5–6 saat
III	Oxford Nanopore	2014	İyon akımı değişimi	100-200000	100000, 2–4 Tb 48 saat

Farklı dizileme tekniklerinin önemli özellikleri okuma uzunluğu, kapsam alanı (coverage) ve derinliktir. Okuma, tek bir DNA molekülünün baz dizisidir, okuma uzunluğu ise bir çalışmada okunan dizili bazların gerçek sayısıdır. Kapsam (coverage), belirli bir genomik bölge içinde örtüşen kısa okumaların sayısı olarak tanımlanırken, derinlik aynı bölgenin okuma miktarı olarak tanımlanır (22).

İkinci nesil dizileme tekniklerinin çoğu, sentez yoluyla dizilemeye (SBS) dayanır. Bu, bir polimeraz (ör. 454) veya bir ligaz (ör. SOLiD®) olan bir enzim tarafından hazırlanmış bir kalıbın seri uzantısıdır. Dizilemede sıklıkla kullanılan bir başka terim de aslında bir dizi özdeş bileşene sahip bir polimer olan homopolimerdir, MPS terminolojisinde tekrarlayan bir DNA dizisi anlamına gelir (22).

2.3.1. Birinci Nesil Dizileme

Sanger dizilemesi, 1980 yılında Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülen Frederick Sanger tarafından 1977 yılında geliştirilmiştir (130). Şimdi birinci nesil dizileme olarak bilinen bu yöntem, reaksiyonu gerçekleştirmek için tek zincirli kalıp DNA (ssDNA), bir DNA primer, DNA polimeraz ve deoksinükleotidtrifosfatlar (dNTP'ler) gerektiğinden PCR'ye oldukça benzerdir (138). Ayrıca, yeni sentezlenen DNA zincirine normal dNTP'ler gibi dahil edilebilen, ancak sonuç olarak uzama sürecinin sona ermesiyle birlikte di-deoksinükleotidtrifosfatlara (ddNTP'ler) ihtiyaç vardır (138). Bu nedenle bu yöntem zincir sonlandırma yöntemi olarak da bilinir. Reaksiyon dört aşamalı olarak gerçekleştirilir, böylece her tüpte (normal dNTP'lerin yanı sıra) dört etiketli ddNTP'den sadece biri nispeten düşük bir konsantrasyonda eklenir (138). Günümüzde dizi, floresan etiketli ddNTP'ler ve kapiler elektroforezi ile belirlenebilir (Şekil 3) (139-141). Sanger dizileme, kısa okumalar üreten ikinci nesil tekniklerin çoğundan daha uzun okumalar üretebilir.



Şekil 3: Sanger dizileme metoduna genel bir bakış (22).

2.3.2. İkinci Nesil Dizileme

Sanger dizilemenin ayır edici özelliği, her reaksiyonun tek, önceden tanımlanmış bir DNA fragmanını (yaklaşık 1 kb) dizilemesidir. DNA fragmanları etiketlenir ve fragmanlar genellikle KE cihazında tespit edilir. Buna karşılık, ikinci nesil dizilemede, dizileme ve tespit eş zamanlı olarak gerçekleşirken aynı anda binlerce ile milyonlarca dizileme reaksiyonu meydana gelir. İkinci nesil dizileme topluca yeni nesil dizileme (NGS) veya büyük ölçekli paralel dizileme (MPS) olarak adlandırılır (142).

NGS'de, parçalanmış DNA katı bir yüzey üzerinde komplementi tarafından hibrit hale getirilir, öyle ki tek bir hedef molekül, yüzeydeki milyonlarca veya milyarlarca uzamsal olarak tanımlanabilir konum veya özellikten birini tutar. Bu tür yüzeylere örnek olarak Illumina dizileyicileri tarafından kullanılan akış hücreleri veya Ion Torrent dizileyicileri

tarafından kullanılan yarı iletken çipler dâhildir (142). NGS'de, birden fazla hedefin dizilenmesi, tek bir çalışmada döngüsel olarak ve paralel olarak veya aynı anda gerçekleştirilir. Bu, Sanger dizilimine kıyasla reaksiyon başına verimde önemli bir artışa ve maliyette düşüşe olanak tanıyan büyük ölçekte dizilemeye yol açmıştır. Ayrıca, Sanger ile karşılaştırıldığında, NGS teknolojileri DNA parçalarının bakteriyel klonlanmasını gerektirmez. Kütüphane hazırlama olarak bilinen dizileme için DNA parçalarının hazırlanması, hücresiz bir sistemde gerçekleşir ve dizileme çıktısı, elektroforeze gerek kalmadan doğrudan tespit edilir. Sanger dizilimi ile elde edilen 1000-1200 bç okuma uzunluklarıyla karşılaştırıldığında, NGS, kullanılan özel teknolojiye bağlı olarak 35 ile 500 bç arasında nispeten kısa parçalar üretir. NGS'nin nispeten kısa okumaları, genom birleştirmesi için zorluklar ve yeni hizalama algoritmalarının geliştirilmesini gerekli kılmıştır (10,142).

NGS'nin artan duyarlılığı, mozaik varyasyon dâhil olmak üzere düşük sayıda hücrede bulunan varyantların saptanmasına ve tanımlanmasına izin verir. Sanger dizilimi, yer değiştirme ve küçük eklemelerin ve silinmelerin (indeller) keşfiyle sınırlıydı (143). Uygulamaya bağlı olarak, NGS'nin varyantları algılama hassasiyeti, kapsam derinliği artırılarak ayarlanabilir. Kapsam, belirli bir nükleotidin dizilenme sayısıdır. Doğru veri oluşturmak ve küçük boyuttaki insan varyasyonunu tespit etmek için yüksek kapsam derinliği kullanılır. Yüksek kalite puanları elde edildiğinde, düşük kapsam değeri ile daha yüksek doğruluk elde edilebilir. DNA dizisi hakkında önceden bilgi sahibi olmayı gerektirmekle sınırlı olmayan NGS, de novo dizileme için veya bireysel genlerin veya ilgilenilen bölgelerin dizilenebileceği hedefli bir NGS yaklaşımında kullanılabilir (143).

Uygun bir dizileme metodolojisinin seçimi büyük ölçüde uygulamaya bağlıdır. İncelenecek genomun boyutu (veya beklenen boyutu) ve genomun karmaşıklığı (guanin-sitozin [GC] içeriği, tekrarlayan diziler vb.) gibi faktörler dikkate alınır. Dizileme

platformları genellikle dizileme derinliği, kapsam alanı, okuma uzunluğu, hatalar ve doğruluk gibi performans ölçütleriyle karşılaştırılır. De novo dizileme için daha uzun okuma uzunlukları gerekli olabilirken, hedeflenen amplikon dizileme için daha kısa okuma uzunlukları uygun olabilir. NGS platformlarının kimyaları ve numune hazırlama iş akışlarındaki büyük farklılıklar göz önüne alındığında, taban başına maliyet, çalıştırma başına maliyet, numune hazırlama süresi ve maliyeti, cihaz çalıştırma süresi ve dizileme hata oranları gibi faktörlerin karşılaştırılması daha zordur (144,145). Kapsam derinliği, kapsam ve dizileme derinliği, bir bazın dizilenme sayısını ifade eder. Bu nedenle, 20x derinlik, bir bazın 20 kez dizilendiğini gösterir. Derinlik, genomun karmaşıklığından (yüksek veya düşük GC içeriği dahil) etkilenebilir ve tekrarlayan öğeler, tek biçimli olmayan hedefleme ve amplifikasyon ve dizileme verimliliğini etkileyen değişken GC içeriği nedeniyle tek tip değildir. Derinlik, platformun doğruluğuna, varyant saptama yöntemine, kalıp DNA dizisine ve gerekli duyarlılık veya özgüllüğe bağlı olarak değişebilir. Bu nedenle, uygulamaya bağlı olarak genel kapsamın arttırılması gerekebilir (146).

Sanger dizilemesi, tek baz çağırımları için 10^{-4}–10^{-5} gibi son derece düşük bir hata oranına sahiptir; bununla birlikte, mozaik ve somatik mutasyon gibi düşük seviyeli varyantların tespit limiti yaklaşık %20'dir (minör alel temsiline göre). NGS, tek bir şahısın genomunun dizilenmesini ve popülasyonlar arasında nadir görülen varyantların saptanmasını sağlamıştır. Sanger dizilemenin aksine, NGS kullanılarak düşük seviyeli varyantların tespiti %0,1–%1'dir; bununla birlikte, okuma uzunluğuna bağlı olarak 10^{-2}–10^{-3} gibi daha yüksek ham hata oranları eşlik eder. İstenilen doğruluk, okuma derinliği artırılarak (konsensus doğruluğu) elde edilebilir (142,147).

Amplifikasyon hatalarına ek olarak, rastgele ve sistematik hatalar tüm NGS yöntemleriyle ilişkilidir. Hatalar, bazların eklenmesi ve silinmesinin (InDel) yanı sıra yanlış atanmış bazlar (yanlış baz çağırımları) içerebilir. Baz çağrım hatalarının, bir dizi okumanın

sonunda daha sık meydana geldiği bilinmektedir. Sistematik hatalar, aynı genomik lokasyonda meydana gelen ayrı dizi okumalarından kaynaklanan birçok bireysel baz çağrı hatasıdır (148). Farklı dizileme teknolojileri farklı sistematik hatalara eğilimlidir, örneğin, homopolimerik bölgelerin dizilenmesi, ara floresan sinyal yoğunlukları veya birden fazla aynı nükleotidin dahil edilmesinden kaynaklanan voltaj değişikliklerinin saptanması nedeniyle pirodizileme veya Ion Torrent dizileme kullanılarak zor olabilir (142). Baz ikamesi (substitution) hataları, Illumina ve SOLiD gibi bazı platformlarda daha yaygındır (149).

Dizileme sürecinin ham doğruluğu ve baz tanımlama kalitesi NGS'de önemli faktörlerdir. Kalite puanlaması, her bir baz tanımlama, baz tanımlamasının güven derecesini gösteren bir puan atama sürecidir. Bu Phred skoru olarak bilinir. Phred puanları, temel arama hatası olasılıklarıyla logaritmik olarak ilişkilidir. 10 Phred puanı (Q10), 10'da 1 yanlış arama olasılığını, yani %10 yanlış arama olasılığını ifade eder. Q20, 100'de 1'lik bir hataya eşittir, Q30, 1000'de 1'lik bir hataya eşittir, vb. kalite puanını etkileyen faktörler, reaksiyondaki veya cihaz tarafından üretilen sinyal yoğunluğu ve arka plan kirliliğidir (142,150,151).

2.3.2.1. İkinci Nesil Dizileme Platformları

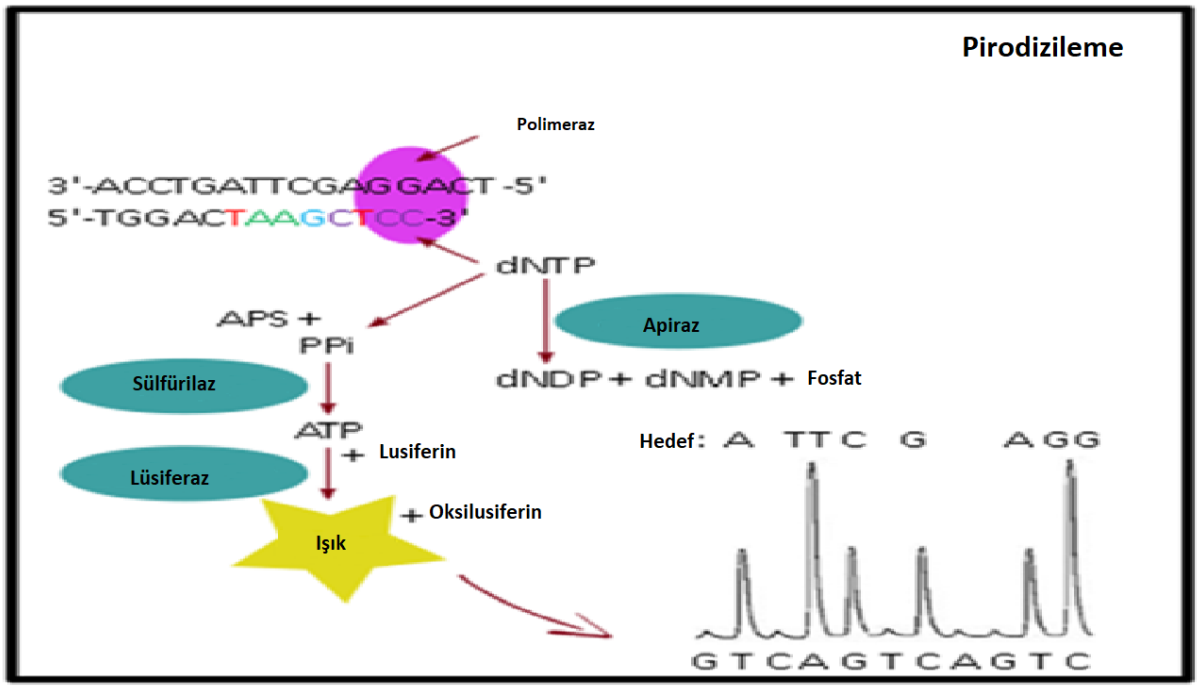
İlk NGS teknolojisi, 2005 yılında piyasaya sürülen 454 Life Sciences tarafından piro-dizileme tabanlı yöntemdir. 2005 ve 2010 yılları arasında, çok farklı dizileme kimyaları ve algılama yöntemleri ile bir dizi NGS teknolojisi hızla ortaya çıkmıştır. Düşük, orta ve yüksek verimli platformlar, 35-1200 bç arasında değişen okuma uzunlukları ile 200.000 okumadan 100 milyon okumaya kadar dizileme çıktılarını etkinleştirmiştir (10).

2.3.2.1.1. Roche 454/Life Science Pyrosequencing-Sentezle Dizileme

DNA dizilemesinde pirofosfatın tespiti ilk olarak Hyman tarafından 1988'de tanımlanmıştır (152). Piro-dizileme, tamamlayıcı bir dNTP'nin dahil edilmesinin ardından pirofosfat salındığında ışığın saptanmasına dayanır. Salınan pirofosfat, lusiferazın lusiferini

oksitleyerek ışık üretmesi için enerji sağlar. Nükleotitler sırayla eklenir ve reaksiyondan çıkarılır ve ışık yalnızca bir nükleotit dahil edildiğinde üretilir. İki pirodizileme stratejisi kullanılabilir. DNA'nın dizileneceği katı fazda pirodizileme katı bir destek üzerinde hareketsiz hale getirilir ve reaksiyonlar arasında yıkama gerektirir (153,154). Sıvı fazda pirodizileme, her adım arasında nükleotitleri parçalamak için bir enzimin (apiraz) aktivitesine dayanır (155).

454 Life Sciences Genome Sequencer FLX cihazı (Roche), 2005'te açıklanan ilkelere dayanan ilk yüksek verimli mikroakışkan tabanlı cihazdır (156). Bu yöntem, güvenilir ışık algılaması için özdeş dizilerin yeterli kopyalarını elde etmek üzere kütüphane hazırlama için DNA kaplı boncuklar üzerinde emülsiyon PCR'yi kullanan ilk yöntemdir. Kişiye ait numuneleri bir araya toplamak için barkodlama kullanılır ve mikrotitre plaka formatında 96 numuneye kadar dizileme sağlanır. Hem 454 cihazı hem de masaüstü versiyonu olan GS Junior, STR'lerin dizilenmesi dâhil olmak üzere mtDNA kontrol bölgesinin HVI segmenti ve çeşitli yüzeylerde ve insanların cildinde bulunan bakteri topluluklarının 16S rRNA genleri avantajlı olarak görülen uzun okuma uzunlukları (400-1200 bç) ile adli uygulamalar için değerlendirilmiştir (157-160). Bununla birlikte, yaklaşık %1'lik bir hata oranı ve homopolimerik gerilmeler tarafından tehlikeye atılan sinyal tespiti nedeniyle uygulaması sınırlıdır (141).



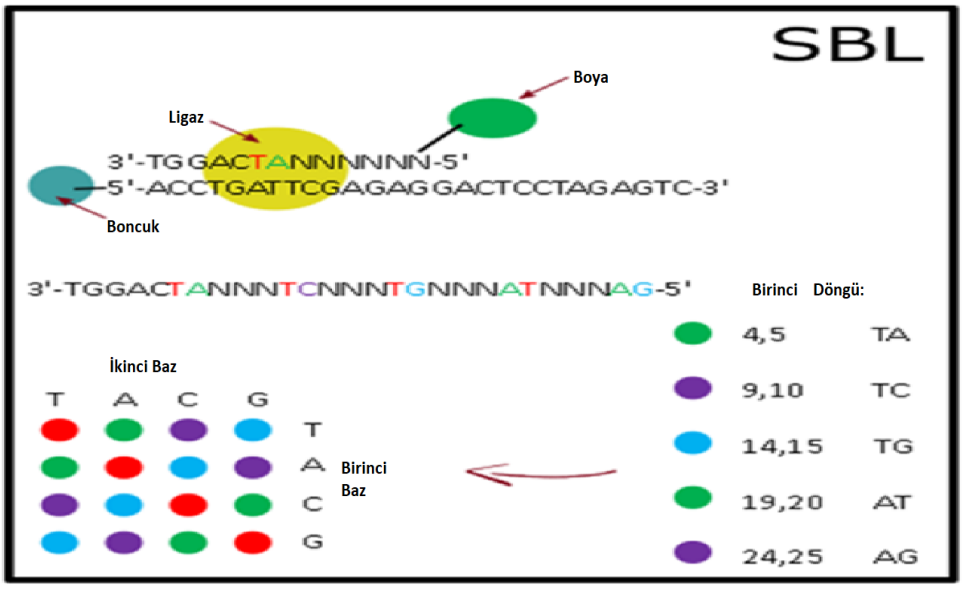
Şekil 4: Pirodizilemeye genel bir bakış (22).

2.3.2.1.2. Applied Biosystem SOLiD® – Ligasyonla Dizileme

2005'te Church grubu tarafından geliştirilen ve 2007'de ticari olarak piyasaya sürülen SOLiD® (Oligonükleotid Ligasyonu ve Tespiti ile Dizileme) tekniği, DNA ligaz tarafından katalize edilen özgün bir dizileme tekniğini kullanır ve multipleks polony dizileme teknolojisine dayanır (161,162). SOLiD®'nin ligasyonla dizileme yaklaşımı, paralel olarak dizileme için DNA fragmanını büyütmek için tamamlayıcı oligonükleotidlerle kaplanmış küçük manyetik boncuklarla 454'e benzer emülsiyon PCR kullanır (163). Boncuklar katı bir yüzeye, yani bir cam sürgüye sabitlenir.

SOLiD® tekniğinde dizileme, bir polimerazdan ziyade bir DNA ligazı tarafından yürütülür (136). Evrensel bir dizileme primeri, boncuklara eklenmiş DNA kalıbından önce gelen SOLiD®'e özgü adaptör dizisine hibritleşir. Her dizileme döngüsü, probun ilk iki nükleotidinin 16 dinükleotit kombinasyonunun (örn., TT, GT, TC, GG) her birini temsil ettiği ve probun kalan altı nükleotidinin dejenere olduğu floresan etiketli 8-mer

oligonükleotit probları içerir (163). Dört floresan etiketten biriyle etiketlenen her prob, dizileme primerine ligasyon için rekabet eder. Bağlama üzerine, yakalanan floresan, bağlanan baza karşılık gelir. Oligonükleotid probu daha sonra floresan etiketi kaldırarak 5 ve 6 nükleotid pozisyonları arasında bölünür. 5' fosfat, ligasyon reaksiyonunun yedi ardışık döngüsünü mümkün kılmak için yeniden üretilir. Yeni sentezlenen iplik, sistemi sıfırlamak için kalıptan denatüre edilir (136). İkinci bir dizileme turu, kalıba birleşmiş ilk dizileme primerine (n – 1) göre bir nükleotit tarafından dengelenen yeni bir dizileme primeri ile başlatılır (163). Primer dengeleme şeması, adaptör-parça birleşiminden bir baz tarafından kaydırılan ve tüm parçanın dizilenmesine izin veren döngü reaksiyonlarında DNA şablonlarına hibridize olan evrensel bir dizileme primerine izin verir. Her ligasyon adımını floresan tespiti ve başka bir ligasyon turu takip eder (134). Ek olarak, 2 tabanlı kodlama, tek bir baz yerine iki bazın etiketle ilişkilendirildiği ve bu nedenle her bazın iki kez sorgulandığı ve yanlış baz çağırımlarının kolayca tanımlanabildiği bir hata düzeltme mekanizmasıdır (163). SOLiD® dizileme, %99,94 temel doğrulukla 50 bç'ye kadar okuma uzunlukları üretir. SOLiD® cihazı 4 Gb dizileme verisi üretme kapasitesine sahip olsa da, bu, beş ila altı günlük bir çalışmadan sonra elde edilebilir (163).



Şekil 5: Applied Biosystem SOLiD® dizileme reaksiyonuna genel bir bakış (22).

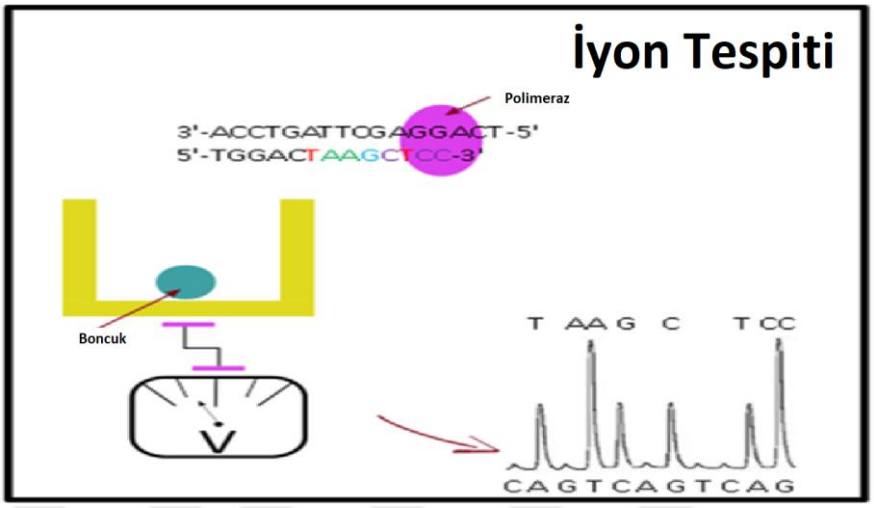
2.3.2.1.3. Ion Torrent™ Dizileme Teknolojisi – Seztezleme ile Dizileme

Jonathan Rothberg (aynı zamanda 454 Life Sciences'ın kurucusu) ve meslektaşları, 2006'da özel tamamlayıcı metal oksit yarı iletken (CMOS) yongası ile büyük ölçekli paralel dizileme cihazını icat etmiştir (164,165). 2007'de Ion Torrent™ kuruldu ve ardından yarı iletken çip tabanlı DNA dizileme teknolojisi geliştirildi. Bu gelişme, DNA dizilemesinde görüntüleme teknolojisi ve özel nükleotidler gereksiniminin sınırlamalarının üstesinden geldi. 2010 yılında, Ion Torrent™, Life Technologies (şimdi Thermo Fisher Scientific) tarafından satın alındı ve ilk enstrüman olan Ion Personal Genome Machine™ (PGM) (Thermo Fisher Scientific) piyasaya sürüldü. PGM, floresan veya kamera taraması gerektirmeyen, daha yüksek hız, daha düşük maliyet, daha küçük cihaz boyutu ve taşınabilirlik sağlayan ilk ticari dizileme cihazıdır (130).

Pirodizilemeden farklı olarak, Ion Torrent™ yarı iletken dizileme teknolojisi, sentezlenen stand üzerindeki 3' OH birleşme bölgesinden bir hidrojen iyonunun (H+) veya bir protonun salınmasından kaynaklanan pH değişikliklerini ölçer (165). Bu, DNA dizilimine iki benzersiz özellik kazandırmıştır. İlk olarak, doğal, etiketlenmemiş nükleotitler kullanılarak DNA dizilimi sırasında pH değişikliklerinin saptanmasına dayanan basit bir dizileme kimyası, bu nedenle DNA dizisi floresan, optik veya ışık kullanılarak belirlenmez. İkinci olarak, dizileme, CMOS sensör dizisi çipindeki milyonlarca kuyuda meydana gelir ve sensör yüzeyi çip üzerindeki her bir kuyunun altında bulunur. Entegre devrelerin yapımında yaygın olarak kullanılan CMOS süreçleri, cihazın daha yüksek yoğunluklara ve daha büyük dizilere ölçeklenmesine de izin verir (20).

İyon çipi üzerindeki her kuyu, H+ salınımından kaynaklanan pH değişikliklerini tespit eden her kuyunun altındaki iyona duyarlı alan etkili transistör (ISFET) ile elde edilen ayrı bir pH ölçer görevi görür. Değişiklik, iyon-sensör tabakası tarafından nükleotid

birleşmesini gösteren bir voltaj değişikliği olarak kaydedilir. Bu nedenle, bu teknoloji, optik tabanlı dizileme platformları ile ilişkili sınırlamaların ve daha hızlı dizilemeye izin veren etiketli nükleotid görüntüleme teknolojisi gereksiniminin üstesinden gelir (20,166).



Şekil 6: Ion TorrentTM dizileme reaksiyonu (22).

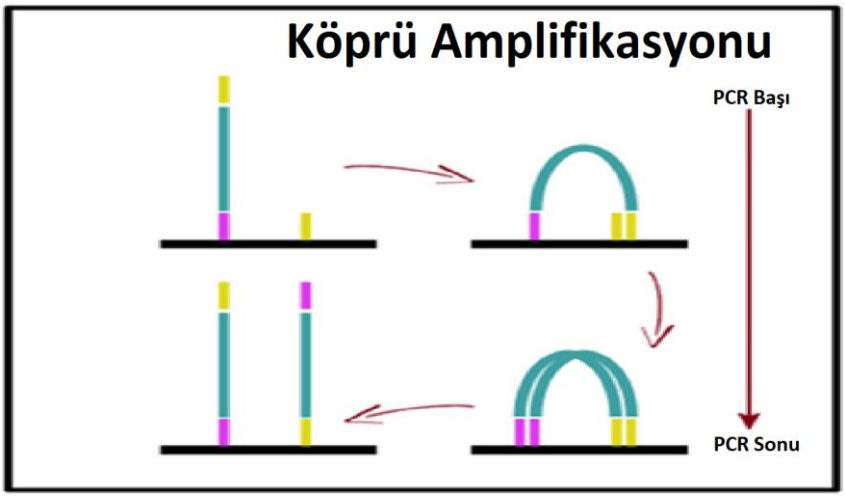
2.3.2.1.4. Illumina/Solexa Genome Analyzer – Sentezleme ile Dizileme

2006 yılında Solexa Ltd. tarafından piyasaya sürülen Genome Analyzer (GA), geniş kapsamlı uygulamalara sahip düşük maliyetli bir DNA dizileyici olarak, çalışma başına çok sayıda kısa okuma ve 1 Gb veri üreten bir cihaz olarak geliştirildi (167). 2007 yılında, Solexa'yı satın aldıktan sonra, GA, Illumina (San Diego, CA, ABD) tarafından Illumina Genome Analyzer (Illumina) olarak daha da geliştirildi. Bu cihazların dizileme kimyası, HiSeq2500 ve HiSeq X, masaüstü cihazlar olan MiSeq ve MiSeq FGx ve her biri kendi özelliklerine ve performansa sahip yeni piyasaya sürülen iSeq 100 Dizileme Sistemi dâhil olmak üzere mevcut Illumina cihazlarının temelidir. Anahtar teknolojik gelişmeler, cam ve silikon bazlı bir akış hücresi yüzeyinde (şuan akrilamid kaplı cam kullanılıyor) yakalanan DNA parçalarının klonal amplifikasyonunu ve tersinir uç bağlama sonlandırıcısı kimyasını içerir (19,168,169). Şarj bağlantılı bir cihaz kamerası, akış hücresi üzerindeki her konum için her birleştirme adımında floresan etiketli, tersinir sonlandırıcı bazların görüntülerini

kaydeder. Boya ve terminal 3' bloker DNA'dan çıkarılır (koruması kaldırılır), böylece sonraki döngünün ilerlemesine izin verilir (19,168,169).

Dizileme, tek uçtan okuma, eşleştirilmiş uç (PE) okumaları veya eş çiftli dizileme ile elde edilebilir. Sadece bir uçtan tek uçlu okumalar küçük RNA molekülleri için tercih edilir. PE, DNA fragmanlarının her iki ucunu diziler ve ileri ve geri okumaları okuma çiftleri olarak hizalayarak, güvenilir ve doğru hizalama ve varyantların saptanmasını sağlar. Eş çiftli dizileme, de novo dizileme ve yapısal varyasyonun değerlendirilmesi için kullanılır ve adli analizde yaygın olarak kullanılmaz. Eş çiftli dizilimi genellikle PE dizilimi ile birlikte kullanılır.

ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit'i (Verogen) kullanan MiSeq FGx™ Forensic Genomics Solution, adli amaçlar için geliştirilmiş ve doğrulanmıştır (18). Enstrümanı araştırma modunda çalıştırma seçeneği, mtDNA dizilemesi için yaygın olarak kullanılan Nextera kütüphaneleri gibi diğer uyumlu kütüphanelerin dizilenmesini sağlar (Davis ve diğerleri, 2015).



Şekil 7: Illumina köprü amplifikasyonuna genel bir bakış (22).

2.3.2.2.İkinci Nesil Dizileme Ticari Kitleri

Şu anda, çeşitli MPS platformları için çeşitli ticari kitler geliştirilmiştir. ForenSeq DNA Signature Prep Kiti (Illumina, şimdi Verogen olarak bilinir), MiSeq MPS platformunda kimliklendirme, fenotipik ve biyocoğrafik soy için 58 STR ve 173 SNP'yi analiz eder (18). Kimlik ve soy için 124 SNP içeren HID Ion AmpliSeq Identity Paneli ve Precision ID GlobalFiler MPS STR Paneli, Ion Torrent MPS platformunda (ThermoFisher) analiz edilir (18).

2.3.3. Üçüncü Nesil Dizileme (Tek Molekül Gerçek Zamanlı Dizileme)

İkinci nesil dizileme teknolojileri DNA analizinde devrim yaratmıştır ve birinci nesil dizileme teknolojilerine kıyasla yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak, yeni nesil dizileme teknolojileri genellikle yürütme süresi açısından uzun bir prosedür olan PCR amplifikasyonu aşamasını gerektirir ve dizileme fiyatı açısından pahalıdır. Ayrıca, genomların, yeni nesil dizileme teknolojilerinin onları çözemediği birçok tekrarlayan dizi ile çok karmaşık olduğu ve nispeten kısa okumaların genom birleştirmesini daha zor hale getirdiği açıktır (133). Yeni nesil dizileme teknolojilerinin neden olduğu sorunları gidermek için bilim adamları, "üçüncü nesil dizileme" adı verilen bir yeni nesil dizileme geliştirmişlerdir. Bu üçüncü nesil dizileme, yeni nesil dizileme teknolojilerinden önemli ölçüde daha hızlı bir yürütme süresinde PCR amplifikasyonuna ihtiyaç duymadan düşük bir dizileme maliyeti ve kolay örnek hazırlama sunma yeteneğine sahiptir (133). Ek olarak, üçüncü nesil dizileme, genom montajı probleminin ve karmaşık genomların tekrarlayan bölgelerinin çözümü için birkaç kilobazdan 100 kilobazı aşan uzun okumalar üretebilir (133).

Üçüncü nesil dizilemeyi karakterize eden iki ana yaklaşım vardır: Quake laboratuvarı tarafından geliştirilen tek moleküllü gerçek zamanlı dizileme yaklaşımı (SMRT) ve uzun okumalar oluşturmak için Illumina (Moleculo) ve 10xGenomics tarafından kullanılan mevcut kısa okuma teknolojilerine dayanan sentetik yaklaşım (19,171-174). En yaygın

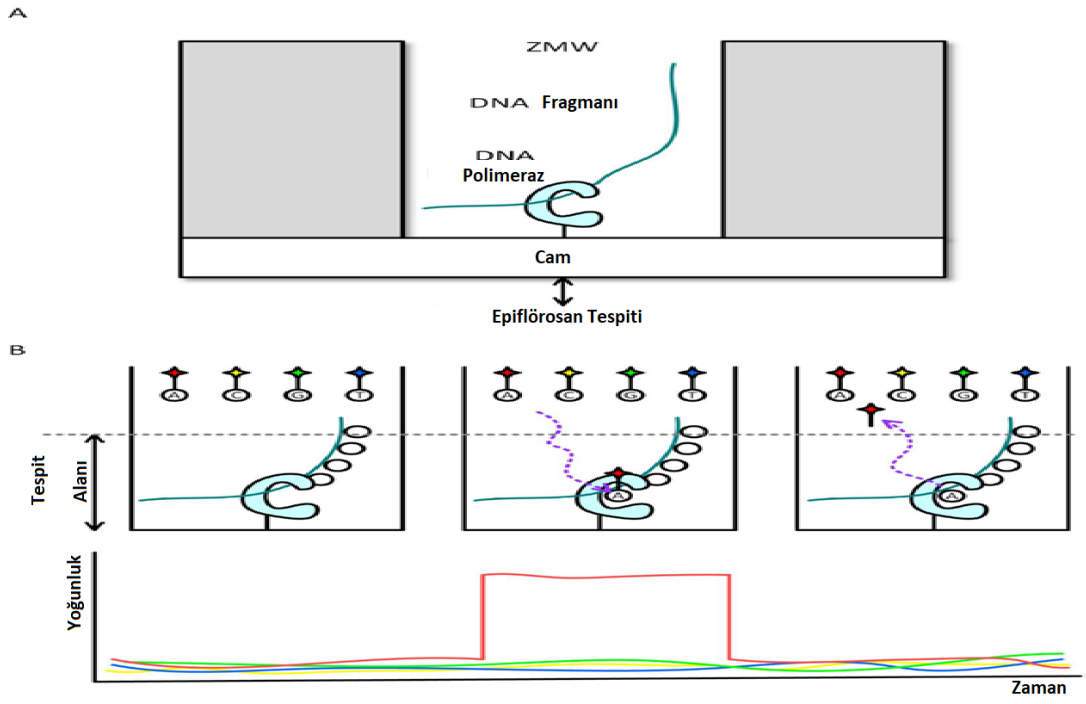
olarak kullanılan üçüncü nesil dizileme teknolojisi yaklaşımı SMRT'dir ve bu yaklaşımı kullanan dizileyiciler Pacific Biosciences ve Oxford Nanopore dizileyicidir.

2.3.3.1.Pacific Biosciences SMRT

Pacific Biosciences, SMRT yaklaşımını kullanarak ilk genomik dizileyiciyi geliştirmiştir ve bu, en yaygın kullanılan üçüncü nesil dizileme teknolojisidir. Pacific Biosciences, diğer teknolojilerle aynı floresan etiketlemeyi kullanır, ancak amplifikasyon nükleotid döngülerini yürütmek yerine, birleşmeler meydana geldiğinde yayıldığı gibi sinyalleri gerçek zamanlı olarak algılar (133). Birçok SMRT hücresinden oluşan bir yapı kullanılır, her hücre, bir metal film içinde mikrofabrike edilmiş ve bir cam substrat üzerine çökeltilmiş, onlarca nanometre çapındaki kuyucuklar olan sıfır mod dalga kılavuzları (ZMW'ler) olarak adlandırılan mikrofabrikasyon nanoyapıları içerir (24,175). Bu ZMW'ler, dalga boyundan daha küçük çaplı açıklıklardan geçen ışığın özelliklerinden yararlanır, bu nedenle ışık yayılamaz. Küçük çaplarından dolayı kuyular boyunca ışık şiddeti azalır ve kuyuların dibi aydınlatılır (Şekil 8A). Her ZMW, tabanlarına eklenmiş bir DNA polimerazı ve dizileme için hedef DNA fragmanını içerir. Dizileme reaksiyonu sırasında, DNA fragmanı, floresan etiketli nükleotitlerle (farklı renklerle) DNA polimeraz tarafından dahil edilir. Bir nükleotid dahil edildiğinde, sensörler tarafından kaydedilen bir ışık sinyali yayar (şekil 8B). Etiketli nükleotidlerin saptanması, DNA dizisinin belirlenmesini mümkün kılar (133).

İkinci nesil dizileme ile karşılaştırıldığında, Pacific Bioscience teknolojisinin birçok avantajı vardır. Numunenin hazırlanması çok hızlıdır, günler yerine 4 ila 6 saat sürer (130). Ek olarak, şu anda ortalama ~10 kbç olan uzun okumalar ile herhangi bir SGS teknolojisinden daha uzundur (176). Pacific Biosciences dizileme platformları, ekleme ve silme hatalarının baskın olduğu yaklaşık %13'lük yüksek bir hata oranına sahiptir (177). Bu hatalar uzun okuma boyunca rastgele dağıtılır (176).

Hızlı, gerçek zamanlı dizileme, ortalama 3000 bç ve 20.000 bç veya daha uzun uzun okuma uzunlukları üretir, homopolimer bölgeleri veya GC açısından zengin veya GC fakir bölgeler gibi birleştirilmesi zor bölgelerin üstesinden gelerek genomların birleştirilmesine yardımcı olur, (178). Epigenetik modifikasyonlar, modifikasyon reaksiyon kinetiğinde bir değişikliğe neden olduğu için bisülfit dönüşümüne ihtiyaç duymadan doğrudan tespit edilebilir. Benzer şekilde, RNA modifikasyonları, DNA polimeraz yerine bir RNA transkriptaz kullanılarak tespit edilebilir (179). Diğer teknolojilerle karşılaştırıldığında, SMRT dizileme kullanılarak oluşturulan bireysel okumalar daha yüksek hata oranlarına sahiptir, ancak bu hatalar rastgele dağıtılır ve artan dizileme derinliği ile kurtarılabilir (178,180). Aynı rastgele hatanın bir dizide birden fazla gözlemlenmesi olası değildir. Bugüne kadar, SMRT teknolojisinin adli uygulamaları mikrobiyal adli tıpla sınırlı kalmıştır (181).



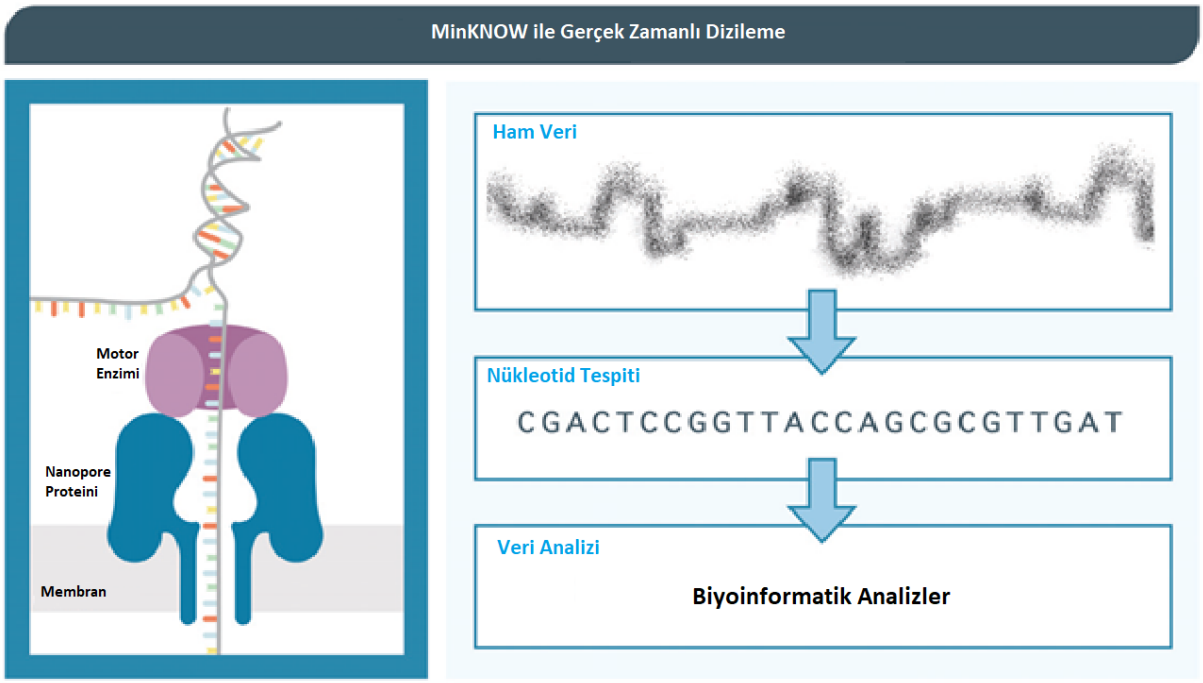
Şekil 8: Pacific Bioscience SMRT dizileme teknolojisi (182).

2.3.3.2.Oxford Nanopore Dizileme (ONT)

Nano gözenek algılama kavramı, David Deamer'ın nanoskopik bir gözenekten tek iplikli bir molekülü çekmek için voltaj yanlılığına dayanan bir DNA dizileme yöntemini çizdiği 1989 tarihli bir defter girişine kadar uzanabilir (183). Resmi bir 1996 yayınında, Deamer - John Kasianowicz, Eric Brandin ve Daniel Branton ile birlikte - elektrik yüklü bir lipid çift tabakası içinde oluşturulan küçük bir delikten molekül translokasyonunun uygulanabilirliğini göstermiştir ve bu yöntemin tek zincirli DNA veya RNA'yı doğrudan dizileyebildiğini öne sürmüştür (184). Çok sayıda araştırmacının özverili çabalarıyla yaklaşık 25 yıl sonra ONT, ilk nanopore tabanlı dizileme cihazı olarak taşınabilir Minion cihazını piyasaya sürmüştür (183). Bir dizi nanogözenek üzerinde DNA dizilimi, uzun okunan derin dizileme verilerinin gerçek zamanlı olarak üretilmesini sağlar. Bu teknoloji tamamen ölçeklenebilirdir ve nispeten düşük bir maliyetle kullanılabilir, derin dizileme verilerine çeşitli finansman seviyelerinde ve çevresel koşullarda erişilebilme mümkün hale gelmiştir. Deamer'ın defterinin sayfalarındaki mütevazı kökenlerinden nanopor dizileme, bugüne kadarki en devrimci derin dizileme platformlarından biri haline gelmiştir (192).

ONT dizileme platformlarının çekirdek birimi, elektriksel olarak dirençli bir zar içinde oluşturulmuş nanoskopik bir delikten oluşur (Şekil 9). Lipid çift tabakası boyunca bir voltajın uygulanması, delikten sabit bir iyonik akımın akışıyla sonuçlanır (185). Nano gözenek algılama, gözenek oluşturan protein ile temas eden ve bu temel akımı bozan moleküllerin saptanmasını ifade eder (186). Kütüphane hazırlama sırasında eklenen bir motor proteinin sarmal aktivitesi, çift sarmallı molekülü çözerken, nükleotidleri küçük gözeneklerden belirli bir hızda geçirir. Nükleotid iplikçiğinin yer değiştirmesi, bir dizi akım ölçümü üreten proteinde konformasyonel bir değişikliğe neden olur (186). Herhangi bir zamanda gözenek içindeki nükleotidlerin kombinasyonu, bir k-mer olarak anılır, benzersiz

bir akım bozulmasına neden olur ve bu, Guppy baz çağrıcısı kullanılarak alttaki diziyi üretmek için kodu çözülebilir (Şekil 9) (171,186,187).

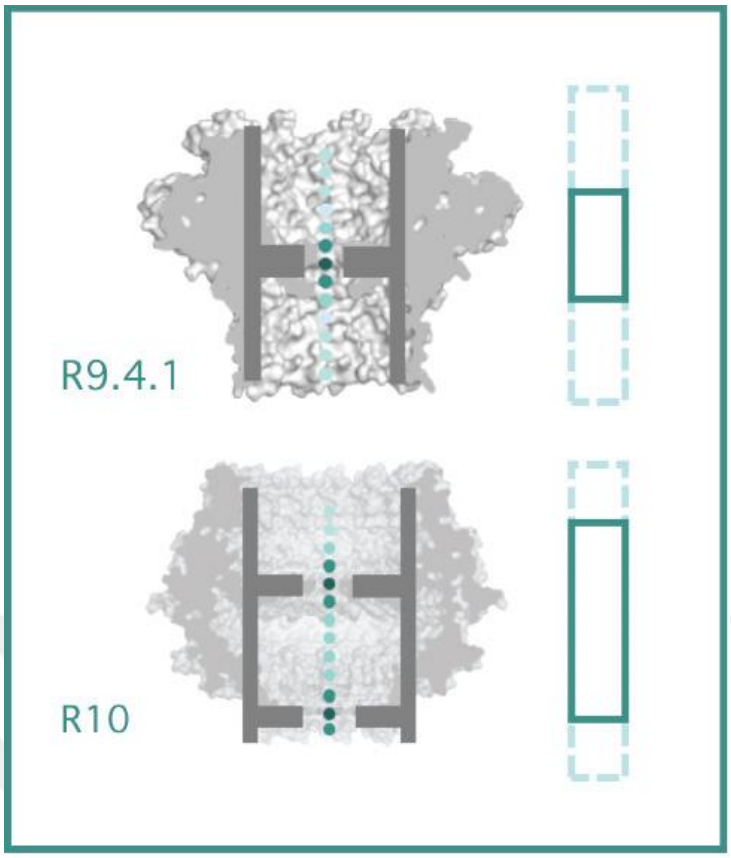


Şekil 9: Nanopore dizileme çalışma prensibi (192).

İlk nesil nanogözenek algılama cihazları, zarı delmek ve yaklaşık 1 nm çapında bir delik oluşturmak için doğal olarak oluşan proteinleri kullanır (183,188). ONT, nispeten düşük bir maliyetle hızlı, büyük ölçekli üretim sağlayan programlanmış bakteriler aracılığıyla biyolojik nanogözenekler oluşturmak için uygun yöntemler kullanır. Biyolojik nano gözenekler hem sağlamdır hem de çeşitli dizileme uygulamaları için değiştirilebilir, bu da yerleşik proteinlerin adaptasyonunu ve işlenebilirliği ve doğruluğu artırmak için yeni proteinlerin oluşturulmasını sağlar (192). ONT ayrıca, üretim maliyetini düşürürken nanoporların esnekliğini ve ölçeklenebilirliğini daha da artırmak için gelecek nesil cihazlarda alternatif malzemelerden oluşan sentetik olarak üretilmiş katı hal gözenekleri ve membranların kullanımını araştırmaktadır (188).

Katı hal ve hibrit platformlara olan ilginin devam etmesine rağmen, şu anda mevcut akış hücreleri, yalnızca R9 veya R10 serisi biyolojik nanogözeneklerden oluşur. R9 gözenek ailesi sırasıyla 1D ve 1D2 dizilişini kolaylaştırmak için uyarlanmış R9.4.1 ve R9.5.1 olmak üzere iki sürümden oluşur. ONT, %95'lik bir ham okuma doğruluğu ve R9.4.1 gözenekleri tarafından oluşturulan ve yakın zamanda geliştirilmiş baz çağırım algoritması ile işlenen 1 boyutlu dizileme verileri için 10.000 nükleotit başına 1'den az hata belirtmiştir (189). R9.5.1 gözenekleri ile daha düşük verim 1D2 dizilimi, daha yüksek bir ham okuma doğruluğu sağlasa da, fikir birliği doğruluğu, 1D okumalarla elde edilene kabaca eşittir (192).

1D dizileme, yeni R10 serisi kullanılarak da gerçekleştirilebilir. R9 ile karşılaştırıldığında, R10 nanogözenekli proteinler, ek bir "okuyucu kafasına" sahip olan uzun bir gözeneğe sahiptir (Şekil 10) (190,191). Nükleotid tanıma bölgesi olarak da adlandırılan bu kilit yapısal özellik, yer değiştiren ipliğin gözenekten akan akım üzerinde en büyük etkiye sahip olduğu konumdur (183,186). Sonuç olarak, okuyucu kafasının uzunluğu, akımı aynı anda etkileyen nükleotidlerin sayısını tanımlar. R9 ailesindeki gözenekler, k-mer'deki üç merkezi nükleotit, sinyalin birincil belirleyicileri olarak görev yaptığı yaklaşık beş nükleotit uzunluğunda bölgeleri kapsar (171,186). Karmaşık genomik diziler için yeterli olmasına rağmen, R9 serisinin tek okuyucu kafası özelliği, azaltılmış bir translokasyon hızı kullanıldığında bile, daha uzun homopolimerik uzantılar içindeki özdeş k-merleri güvenilir bir şekilde ayırt edemez (186). R10 nanopor proteinlerinde birbiriyle yakından etkileşime giren iki nükleotid tanıma bölgesinin varlığı, homopolimerik uzantıların farklılaşmasını önemli ölçüde iyileştirir, bu da 100.000 nükleotit başına 1'den daha az hata ile bir konsensüs doğruluğu ile sonuçlanır (189). Bununla birlikte, R10 ham okuma doğruluğu, R9.4.1 gözenekleri ile elde edilenin %1 altına düşer (189). Yakın gelecekte piyasaya sürülecek olan PromethION ve Flongle birlikte yalnızca R10 MinION akış hücreleri mevcuttur (192).



Şekil 10: R10 akış hücresi proteinleri ile R9.4.1 akış hücresi proteinleri (192).

Yüzlerce ila binlerce biyolojik nano gözenekli protein, elektriksel olarak dirençli bir zar boyunca gömülüdür. Her protein-membran kompleksi, tescilli bir sensör dizisi çipi içindeki belirli bir elektrota karşılık gelen bir mikro yapı iskelesi tarafından desteklenir. Bu ayrı ayrı adreslenebilen nanogözenekli kanallar, uygulamaya özel bir entegre devre (ASIC) tarafından eşzamanlı olarak ölçülebilir ve sonuçta birden fazla dizinin paralel olarak dizilenmesine izin verir (183). Hazırlanan kütüphaneleri dizilemek için gerekli reaktiflerle birlikte sensör dizisi çipi, akış hücresi olarak bilinen tek kullanımlık bir kartuş içinde bulunur. Ana dayanak MinION akış hücresi, ASIC tarafından 512'lik gruplar halinde kontrol edilen 2.048 nanopore proteini içerir. Tek bir akış hücresi şu anda 72 saatlik bir dizileme çalışması sırasında 30 Gb'ye kadar DNA okuma verisi üretebilir (190). Sürekli artan MinION verimleri, ONT'yi daha küçük ölçekli nano gözenek deneyleri için bir akış hücresi

oluşturmaya yönlendirmiştir. Flongle, 126 ayrı ayrı adreslenebilir nano gözenek içeren tek kullanımlık bir akış hücresi dongle'ıdır. Tek kullanımlık akış hücresine ek olarak, bu cihaz, MinION akış hücresinin tabanını taklit eden yeniden kullanılabilir bir adaptör içerir. Flongle adaptörü yalnızca her kanaldaki mevcut değişiklikleri işlemekle kalmaz, aynı zamanda veri toplama süreci boyunca sağlam bağlantı sağlamak için bir arayüz görevi görür. Mevcut gözeneklerin kabaca dörtte biri ve maliyetin onda biri ile Flongle, şu anda mevcut olan en hızlı ve en erişilebilir Nanopore dizileme sistemidir (192).

Hazırlamanın ardından, kütüphane doğrudan sensör dizisi çipine yüklenir ve akış hücresi, dizileme ve müteakip veri toplama için bir cihaza yerleştirilir. ONT dört cihaz tasarlamıştır: SmidgION, MiniION, GridION ve PromethION. Bu cihazlar, sırasıyla minyatürden yüksek verimli kurulumlara kadar değişen nanopore dizileme çözümlerinin ölçeklenebilirliğini yansıtır. MinION, piyasaya sürülen ilk nanopore tabanlı dizileme cihazıdır ve satın alınabilecek tek taşınabilir cihaz olmaya devam etmektedir. Bu cep boyutundaki cihaz 100 g'dan daha hafiftir ve USB bağlantı noktası aracılığıyla bağlanabilir ve bir PC veya dizüstü bilgisayardan kontrol edilebilir (187). Dizilemeye adanmış bir bilgisayara duyulan ihtiyaç, veri toplama ve ham okuma verilerini işleme için gerekli tüm yazılımlarla birlikte yüklenen bir MinION yardımcı cihazı olan MinIT tarafından tamamen ortadan kaldırılmıştır. ONT, cihazı ve hesaplama birimini MinION Mk1C olarak bilinen tek bir cihazda birleştirerek dizileme ve veri analizini daha da kolaylaştırmıştır (192).

MinION'un piyasaya sürülmesinden sonraki ilk çabalar, nanopore algılama cihazlarının verimini artıracak ve ana NGS platformlarıyla karşılaştırılabilir verim elde edecek cihazların geliştirilmesine odaklanmıştır. GridION ve PromethION, Minion cihazıyla aynı temel teknolojiye ve tescilli elektroniklere dayanır, ancak belirli bir dizileme çalışması sırasında önemli ölçüde daha fazla okuma verisi üretebilir. GridION Mk1, beş akış hücresi konumunun yanı sıra gerçek zamanlı baz çağırımı ve ham veri analizi için payplayn içeren

bir bilgisayar birimi içerir. Bu esnek cihaz, her biri tek bir deneye veya ayrı deneylere tahsis edilebilen hem Minion hem de Flongle akış hücreleriyle uyumludur. Beş MinION akış hücresinin tümünün mevcut kimya ve yazılım sürümünü kullanarak çalıştırılması, 150 Gb'ye kadar veri üretir (190). MinION ve GridION platformlarının aksine PromethION, yoğun şekilde paketlenmiş 3.000 nanopore kanalından oluşan benzersiz bir akış hücresi kullanır. Bu cihaz, sırasıyla çalıştırma başına 4.800 veya 9.600 Gb'ye kadar veri üretebilen 24 veya 48 akış hücresi konumuyla mevcuttur (190).

Daha yakın zamanlarda, dikkat, yüksek verimden nanopor algılama teknolojisinin minyatürleştirilmesine kaymıştır. ONT şu anda el tipi Minion cihazından daha küçük bir cihaz geliştiriyor. SmidgION, doğrudan bir akıllı telefona takılabilir ve bir akıllı telefon tarafından kontrol edilebilir, bu da DNA ve RNA'nın saha tabanlı analizini mümkün kılar. Numune hazırlamadan veri analizine kadar giderek daha basitleştirilmiş işleme ile birlikte cihaz, çok çeşitli çevresel koşullarda daha fazla araştırmacının nanogözenek tabanlı dizilemeye erişmesini sağlayacaktır.

Üçüncü nesil dizileme teknolojileri ile yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur. Adli genetik alanında ise ONT çalışmaları oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalardan birinde sadece 14 STR lokusu çalışılmış, diğer bir çalışmada tri-allelik SNP bölgeleri tespit edilmeye çalışılmıştır (16,26). Araştırma grubunun diğer bir çalışmasında ise kimliklendirme ile ilgili bilgi veren 52 SNP bölgesinin analizi yapılmıştır (26). Bu çalışmalarda elde edilen deneyimler sonucunda bu teknolojisinin adli bilimlerde uygulanabilir olduğu belirtilmiştir (26). Başka bir çalışmada ise 58 STR ve 94 SNP lokusu bir R10.3 akış hücresi kullanılarak dizilemesi yapılmıştır (198). Vasiljevic ve ekibinin yaptığı bir çalışmada ise NGSpeciesID ile tür tanımlama çalışması adli bilimler alanında yapılmıştır (199).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında Walsh tarafından geliştirilen HIrisPlex-S paneli kullanılarak, referans DNA örnekleri ile Nanopore kütüphanesi oluşturularak saç, göz ve ten rengi genotipleri analiz edildi. Kullanılan DNA örnekleri ticari olarak satın alınmış olup saf DNA halinde gelmiştir. Bu nedenle herhangi bir DNA izolasyon uygulamasına ihtiyaç duyulmamıştır. Kullanılan örnekleden 41 SNP hedefi için 34 amplikon Oxford Nanopore MiniION cihazında ligasyonlu ve ligasyonsuz olarak iki farklı yöntem ile çoğaltıldı. Aynı zamanda örneklerin diğer bir yöntemle karşılaştırılması için minidizileme (SNaPshot kit) yöntemiyle de HIrisPlex-S paneli çalışılarak genotipler karşılaştırıldı. Çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü AR-GE Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1. Deneyde Kullanılan Gereçler

3.1.1. Ekipman

- Eppendorf / Brand otomatik pipetleri (2,5 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)
- Vorteks (Weightlab Instruments)
- Kuru ısıtıcı blok (Bio TDB100-Biosan)
- Florometre (Qubit 4-Thermo Fisher)
- Mikrosantrifüj (Unicfuges-5)
- Thermal döngü cihazı (SimpliAmp™ Thermal Cycler-Applied Biosystems™)
- DNA/RNA UV biyogüvenlik kabini (Kabin UVT/T-MAR-Grand Bio)
- Buzdolabı (Vestel)
- Derin dondurucu (Delta)
- Bilgisayar kontrollü genetik analizör 310(ABI PRISM® 310)

3.1.2. Ticari Kitler

- Quant-it™ dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen)
- Qiagen Multipleks Master Miks (Applied Biosystem)
- SNaPshot ® Multiplex Kit (Applied Biosystem™)
- Exo-Sap-it Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (Thermo Fisher Scientific)
- R9.4.1 Flow Cell (R9.4.1)
- R10.3 Flow Cell (R10.3)
- Native Barcoding Expansion 1-12 (EXPNBD104)
- Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109)
- Flow Cell Priming Kit (EXP-FLP002)
- Agencourt AMPure XP beads
- NEBNext® End Repair Module (E6050)
- NEBNext® Blunt/TA Ligase Master Mix (M0367)
- NEBNext® Ultra II End repair / dA-tailing Module (E7546)
- NEBNext® Quick Ligation Module

3.1.3. Ticari Kit Haricinde Kullanılan Malzemeler

- Etil alkol (%99) (Tekkim)
- Zefiran (Dermosept)

3.2. Deney Aşaması

Çalışmamızda Oxford Nanopore MiniIon cihazı ile HIrisPlex-S panelinde yer alan 41 SNP bölgesinin çoğaltılması ve dizilenmesi için iki farklı yöntem izlenmiştir. Bu yöntemlerden biri Ligasyonlu yöntem olup, PCR aşamasıdan sonra ürünlerin uç onarımından künt uçlu DNA elde edilir, daha sonra DNA fragmanları ligaz enzimi ile birbirlerine rastgele eklenir ve Nanopore kütüphane hazırlama reaksiyonlarına geçilir. Diğer yöntemde ise elde edilen PCR ürünleri doğrudan kütüphane hazırlama reaksiyonlarına dahil edilir.

Çalışma sürecindeki Ligasyonlu ve Ligasyonsuz yöntem basamakları aşağıdaki aşamalarından oluşmaktadır. Kırmızı/koyu ile işaretlenmiş basamaklar sadece Ligasyonlu protokol için geçerlidir.

I. Multipleks PCR
II. DNA miktar tayini
III. AMPure boncuk ile saflaştırma
IV. Ligasyon yapılacak PCR ürünlerinin uç onarımı
V. Künt uçlu PCR amplikonlarının ligasyonu
VI. Ligasyonlu ve Ligasyonsuz PCR ürünlerinin uç onarımı
VII. Barkod ligasyonu
VIII. Adaptör ligasyonu
IX. SpotON akış hücresini hazırlama ve yükleme
X. Akış hücresi yıkama

3.2.1. Multipleks PCR

HIrisPlex-S paneli 41 SNP'den oluşup 24 ve 17 olmak üzere iki farklı PCR multipleksi olarak geliştirimiştir (197). Çalışmamızda Referans DNA örnekleri Tablo 2'de gösteren bileşenler ile Tablo 3 ve Tablo 4'teki reaksiyon koşullarına göre çoğaltıldı.

Tablo 2: Multipleks PCR bileşenleri

Bileşen	**1X**
QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	10 µl
Primer mix	7,1 µl
Kalıp DNA	7,9 µl
Total Hacim	25 µl

Tablo 3: Hirisplex paneli için PCR döngü koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
95°C	10 dk	1
95 °C	30 sn	45
61°C	30 sn	
61°C	5 dk	1
4°C	sonsuz	

Tablo 4: Hirisplex-S paneli için PCR döngü koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
95°C	10 dk	1
95 °C	30 sn	45
62°C	30 sn	
61°C	5 dk	1
4°C	sonsuz	

3.2.2. DNA Miktar Tayini

PCR sonrası çoğaltılan PCR ürünlerinin miktarı, florometrik yöntem ile Qubit® 4.0 Florometre (Invitrogen) cihazında Quant-iT™ dsDNA HS (High Sensitive) kit protokolüne uygun olarak ölçüldü. Nanopore dizileme için 1-5 µg PCR ürünü miktar aralığı olacak şekilde örnekler seyreltildi.

3.2.3. Ligasyon Yapılacak PCR Ürünlerinin Uç Onarımı

Bu basamak ligasyonlu yöntemde uygulanan bir basamaktır

1. PCR ürünlerinin uç onarımı için Tablo 5'teki bileşenler steril bir mikrofüj tüpünde karıştırıldı.

Tablo 5: PCR ürünlerinin uç onarımı için gerekli bileşenler

Bileşen	Miktar
☐ PCR ürünleri (1-5 µg)	40 µl
☐ NEBNext End Repair Reaction Buffer (10X)	10 µl
☐ NEBNext End Repair Enzyme Mix	5 µl
☐ Nükleaz içermeyen su	45 µl

2. Kapak sıcaklığı 30°C'ye ayarlanmış termocycler içinde 20°C'de 30 dakika inkübe edildi.
3. Yeniden süspanse etmek için AMPure XP boncukları vortekslendi.
4. Künt uçlu amplikonları içeren tüpe 180 µl (1.8X) yeniden süspanse edilmiş AMPure XP Beads eklendi.
5. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Tüpler manyetik spor üzerine koyuldu.
6. Çözelti berraklaştıktan sonra (~5 dakika), süpernatant atıldı.
7. Manyetik standdayken tüpe 280 µl %80 taze hazırlanmış etanol eklendi.
8. 30 saniye sonra bir pipet kullanarak etanol atıldı.
9. Manyetik standdayken tüpe 280 µl %80 taze hazırlanmış etanol eklendi.
10. 30 saniye sonra bir pipet kullanarak etanol atıldı.
11. Hızlı spin atıldı ve artık etanol uzaklaştırıldı.
12. Tüp kapak açık ve manyetik stand üzerindeyken boncuklar 30 saniye havayla kurutuldu.
13. Tüp mıknatıs standdan çıkarılır. 47 ul eluat ekleyerek boncuklardan DNA hedefi ayrıştırıldı.
14. Hızlı spin atılarak oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
15. Çözelti berraklaşana kadar tüp manyetik standda bekletildi.

16. Boncuk peletini bozmadan, 42 µl süpernatant dikkatli bir şekilde taze, steril bir mikrofüj tüpüne aktarıldı.

3.2.4. Künt Uçlu PCR Amplikonlarının Ligasyonu

Bu basamak ligasyonlu yöntemde uygulanan bir basamaktır. Tablo 6'da verilen bileşenler kullanılarak karışım hazırlandı. Hazırlanan karışım oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ligasyon yapılmış örnekler AMPure XP ile saflaştırıldı.

Tablo 6: Künt uçlu PCR amplikonlarının ligasyonu için gerekli bileşenler

Bileşen	Miktar
Bir önceki basamakta hazırlanan PCR amplikonları	42 µl
Blunt/TA Ligase Master Mix	42 µl
Toplam	84 µl

3.2.5. Ligasyonlu ve Ligasyonsuz PCR Ürünlerinin Uç Onarımı

Tablo 7'de verilen bileşenler kullanılarak karışım hazırlandı. Bir termal döngüleyicide 20°C'de 5 dakika ve 65°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası PCR ürünleri temiz bir 1.5 ml eppendorf tüpe aktarıldı. Hazırlanan örnekler AMPure XP ile saflaştırıldı.

Tablo 7: Birleştirilmiş PCR ürünlerinin uç onarımı için gerekli bileşenler

Bileşen	Miktar
DNA	48 µl
Ultra II End-prep reaction buffer	3,5 µl
Ultra II End-prep enzyme mix	3 µl

3.2.6. Barkod ligasyonu

Aynı akış hücresinde birlikte çalıştırılacak her numune için tek bir barkod (NBD01 NBD02, NBD03, NBD04, NBD05, NBD06, NBD07, NBD08,NBD09, NBD10, NBD11, NBD12) seçildi. Tablo 8'de verilen bileşenler ile her bir örnek için barkodlama

gerçekleştirildi. Hazırlanan karışım oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra AMPure XP ile saflaştırma gerçekleştirildi.

Tablo 8: Barkod ligasyonu için gerekli bileşenler

Bileşen	Miktar
500 ng uç onarımı yapılmış DNA	22,5 µl
Native Barcode	2,5 µl
Blunt/TA Ligase Master Mix	**3** l

3.2.7. Adaptör Ligasyonu

Karıştırılmış ve barkodlanmış numune alınarak, her ardışık ekleme arasında tüpe hafifçe vurularak karıştırılıp adaptör ligasyonu bir eppendorf tüpünde hazırlandı. Bunun için Tablo 9'da belirtilen bileşenler kullanıldı. Hazırlanan karışım oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

Tablo 9: Adaptör ligasyonu için gerekli bileşenler

Bileşen	Miktar
700 ng karıştırılmış barkodlu numune	65 µl
Adaptör Mix II (AMII)	5 µl
NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer (5X)	20 µl
Quick T4 DNA Ligaz	20 µl

1. Adaptör ligasyonu tamamlanmış örnekler için AMPure XP ile saflaştırma gerçekleştirildi. 50 µl AMPure boncuk kullanılarak örnek ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
2. Tüp manyetik spora konularak boncukların tüp çeperinde toplanması sağlandı. Tüpe 250 µl Short Fragment Buffer (SFB) eklenerek hızlı spin atıldı.
3. Tüp manyetik spora geri konularak boncukların toplanması sağlanır. Pipet ile süpernatant alınarak atıldı.

4. Tüpe 250 µl Short Fragment Buffer (SFB) eklenerek hızlı spin atıldı ve tüp tekrar mıknatısın üzerine yerleştirildi.
5. Kalan süpernatant pipetle alınarak 30 saniye kurumaya bırakıldı.
6. Tüp manyetik spordam çıkarılır ve pelet 15 µl Elüsyon Tamponu (EB) içinde yeniden süspanse edildi.
7. Hızlı spin atılırak ve 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.
8. Eluat berrak ve renksiz olana kadar boncuklar bir mıknatıs üzerinde bekletildi.
9. DNA kütüphanesini içeren 15 µl elüat temiz bir 1.5 ml Eppendorf tüpüne alındı.
10. Qubit florometre kullanılarak 1 µl adaptör bağlanmış ve barkodlanmış DNA ölçüldü.

3.2.8. SpotON Akış Hücresi Hazırlama ve Yükleme

1. Sequencing Buffer (SQB), Flush Tether (FLT) ve Flush Buffer (FB) tüpleri vortekslenerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında hızlı spin atıldı
2. MinION kapağı açıldı ve akış hücresi klipsin altına kaydırıldı. Priming port kapağını açmak için priming port kapağı saat yönünde kaydırıldı.
3. Doldurma portunu (priming port) açtıktan sonra kapağın altında küçük bir havakabarcığı olup olmadığı kontrol edildi.
4. Akış hücresi hazırlama karışımını hazırlamak için, çözülmüş ve karıştırılmış Flush Buffer (FB) tüpüne doğrudan 30 µl çözülmüş ve karıştırılmış Flush Tether (FLT) eklendi ve oda sıcaklığında vortekslenerek karıştırıldı.
5. Hava kabarcıklarının girmesi önlenerek, hazırlama portu aracılığıyla akış hücresine 800 µl priming mix yüklendi ve 5 dakika beklendi.
6. Yeni bir tüpte kütüphaneyi yüklemek için: 37,5 µl Sequencing Buffer (SQB), 25,5 µl Loading Beads (LB) ve 12 ul DNA kütüphanesi ile karışım hazırlandı
7. Hazırlanan kütüphane yüklemeden hemen önce yukarı ve aşağı pipetlenerek hafifçe karıştırıldı.

8. SpotON sample portu aracılığıyla akış hücresine damla damla 75 µl numune eklendi.
9. SpotON sample portu kapağı ve priming portu kapatıldı. MinION kapağı kapatılarak analiz başlatıldı

3.2.9. Akış Hücresi Yıkama

1- Yıkama Karışımı (WMX) tüpü buz üzerine yerleştirildi.

2- Bir tüp Yıkama Seyrelticisini (DIL) oda sıcaklığında eritildi.

3- Wash Diluent (DIL) içeriği vortekslenerek iyice karıştırılıp üzerine yerleştirildi.

4- 1.5 ml'lik temiz bir Eppendorf tüpünde aşağıdaki Flow Cell Wash Mix'i hazırlandı:

Tablo 10: Akış Hücresi Yıkama Karışımı

Bileşim	Hacim
Wash Mix (WMX)	2 µl
Wash Diluent	398 µl
Total	400 µl

5- Pipetleme ile iyice karıştırılıp buz üzerine yerleştirildi. Tüpü vortekslemeyin.

6- MinKNOW'da dizileme deneyini durduruldu ve akış hücresini cihazda bırakıldı.

7- Bir P1000 kullanarak, Atık portu 1 aracılığıyla atık kanalındaki tüm sıvıyı çıkarıldı.

8- Akış hücresi hazırlama bağlantı noktası kapağını (priming port kapağı), hazırlama bağlantı noktasının görülebilmesi için saat yönünde çevirilip açıldı.

9- Doldurma portu ile sensör dizisi arasında hava olup olmadığını kontrol edildi.

10- Hazırlanan Akış Hücresi Yıkama Karışımından 400 µl, hava girişini önleyerek, hazırlama portu aracılığıyla akış hücresine yüklendi.

11- 60 dakika sıonra bir P1000 kullanarak, Atık portu 1 aracılığıyla atık kanalındaki tüm sıvıyı çıkarıldı.

12- SpotON Akış hücresini hazırlama ve yükleme adımı ile sonraki kütüphane yüklendi.

3.2.10. Biyoinformatik Analizler

Deney sonucu elde edilen elektrik akım değişimi bilgisi içeren fast5 uzantılı dosyalar Guppy 6.1 programı ile analiz edilerek nükleotid dizilim ve kailte bilgisi içeren fastq dosyaları elde edildi. Elde edilen fastq dosyaları daha sonra galaxy platformuna (https://usegalaxy.org/) yüklenip buradan groomer, fastqc ve filterfastq araçları ile gerekli filtreleme işlemleri yapıldı. Daha sonra, Python 3.9 programlama dilinin Regex kütüphanesi kullanılarak ligasyon işlemine tabi tutulmuş DNA fragmanları birbirinden ayrıldı. Sonraki adımda, BWA yazılımı kullanılarak elde edilen dizileme dosyaları referans dosyasına haritalandı. Samtools, Bamtools ve VCFtools programları ile haritalama sonucu elde edilen bam uzantılı dosyalardan VCF dosyası elde edildi. Python 3.9 programlama dili ile VCF dosyası taranıp profil elde edildi. Profil sonrasında elde edilen csv uzantılı dosyalar excel dosyasına aktarıldı. Daha sonraki istatistiksel analizde RStudio programı kullanıldı.

3.2.11. HIrisPlex-S panelinin SNaPshot Yöntemiyle Çalışılması

Çalışmamızda yöntem karşılaştırması için Referans DNA örnekleri aynı zamanda minidizileme yöntemine dayalı SNaPshot kit yöntemiyle yapıldı. HIrisPlex-S paneli 24 ve 17 olmak üzere iki farklı mültipleksten oluşmaktadır (197). Panelin ilk kısmı olan göz ve saç rengi SNP markılarını içeren HIrisplex paneli Tavaci ve ark. laboratuvarımızda valide ettiği yöntem ile çalışıldı (196). HIrisPlex-S panelinin ikinci multipleks kısmı olan ten rengi SNP markırlarının primerleri ise bu projede temin edilip Walsh ve ark. belirlediği protokole uygun olarak genotipler belirlendi (197). SNaPshot ürünlerinin görüntülenmesi ve analizleri AB310 cihazında yapıldı.

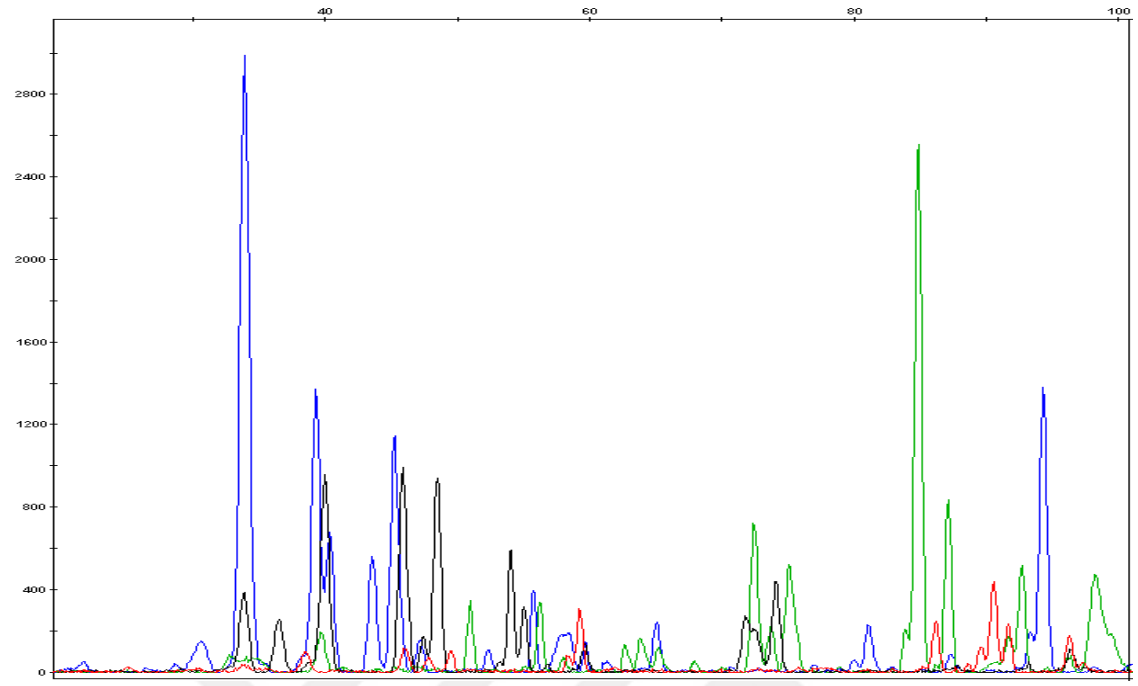
4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında Walsh tarafından geliştirilen HIrisPlex-S paneli kullanılarak, referans DNA örnekleri (9947A, 2800M, Taqman ve K562) ile Nanopore kütüphanesi oluşturularak saç, göz ve ten rengi analiz edildi. Oxford Nanopore dizileme sonucu elde edilen verilerin genotip tayini için Guppy v6.1, BWA, SamTools, BamTools, VCFtools ve Python 3.9 programları kullanıldı. İstatistiksel analizler için RStudio kullanıldı.

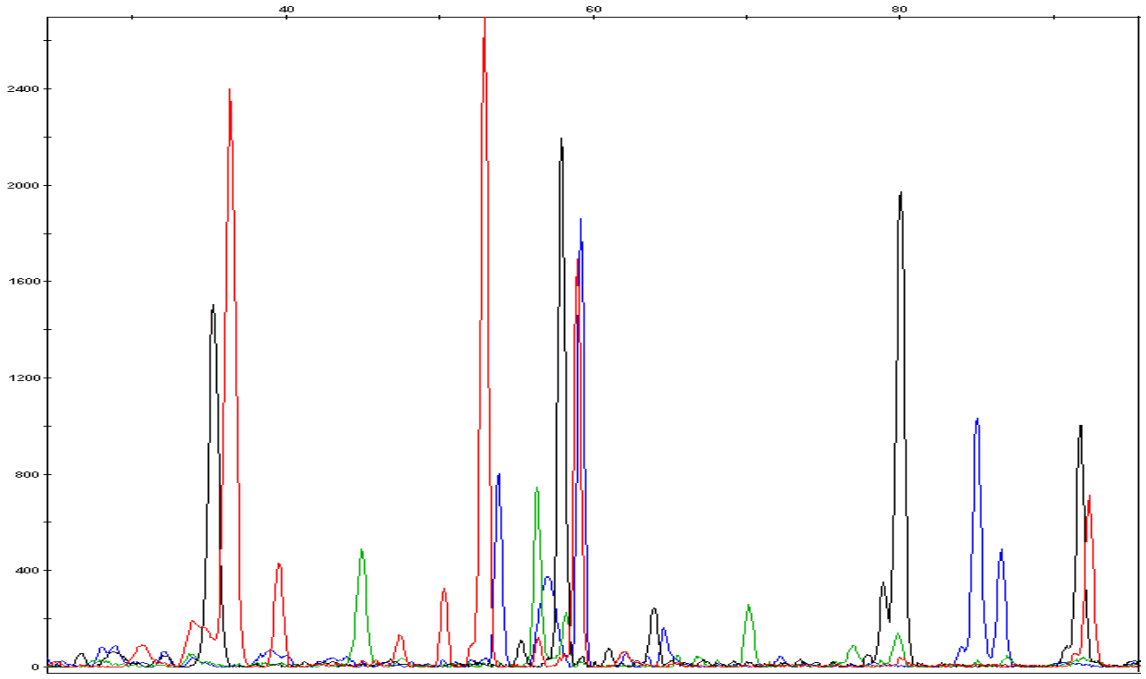
Minidizileme yöntemiyle elde edilen veriler ise kapiler elektroforez cihazında GeneMapper v3.2 (Thermo Fischer Scientific) analiz programı ile analiz edildi.

4.1. Minidizileme Reaksiyonlarının Sonuçları

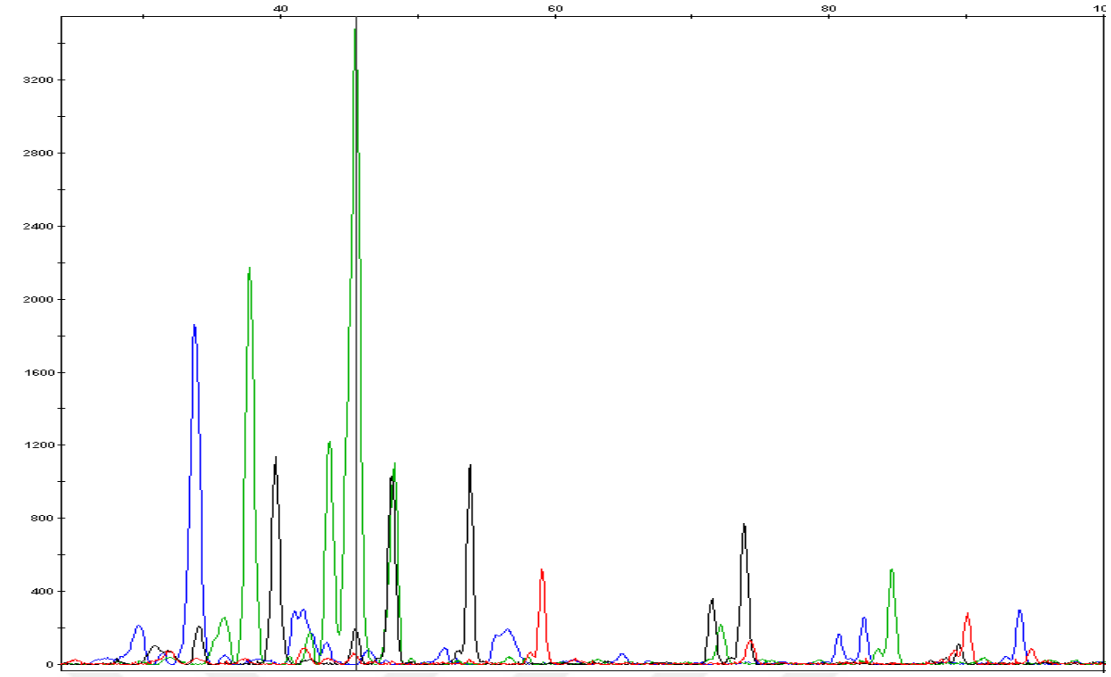
Çalışmamızda HIrisplex-S panelinin SNaPshot yöntemiyle çalışılan minidizileme sonuçları verilmiştir. Şekillerdeki her pikin rengi farklı bir bazı temsil etmektedir. Her pikin yüksekliği ise ilgili SNP hedefinin kapsam değeri hakkında diğer SNP hedeflerine göre göreceli olarak bilgi vermektedir. Şekil 11A ve Şekil 11B 2800M kontrol örneğinin HIrisplex-S (HIrisPlex (saç ve göz rengi) ve 17-plex (ten rengi)) panelinin minidizileme sonuçlarını göstermektedir. Şekil 12A ve Şekil 12B 9947A kontrol örneğinin HIrisplex-S (HIrisPlex (saç ve göz rengi) ve 17-plex (ten rengi)) panelinin minidizileme sonuçlarını göstermektedir. Şekil 13A ve Şekil 13B K562 kontrol örneğinin HIrisplex-S (HIrisPlex (saç ve göz rengi) ve 17-plex (ten rengi)) panelinin minidizileme sonuçlarını göstermektedir. Şekil 14A ve Şekil 14B Taqman kontrol örneğinin HIrisplex-S (HIrisPlex (saç ve göz rengi) ve 17-plex (ten rengi)) panelinin minidizileme sonuçlarını göstermektedir. Tablo 11'de ise minidizileme sonucunda kapiler elektroforezden elde edilen genotip sonuçları görülmektedir.



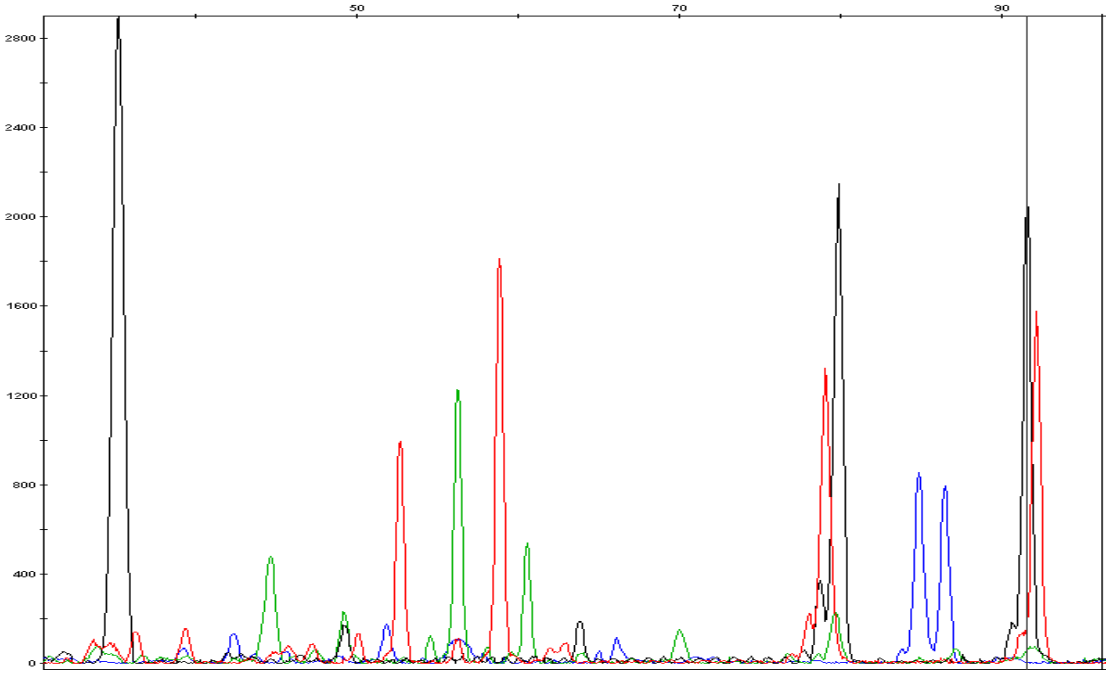
Şekil 11: 2800 M referans örneğinin HIrisPlex (24 SNP saç ve göz rengi) elektroforegram görüntüsü



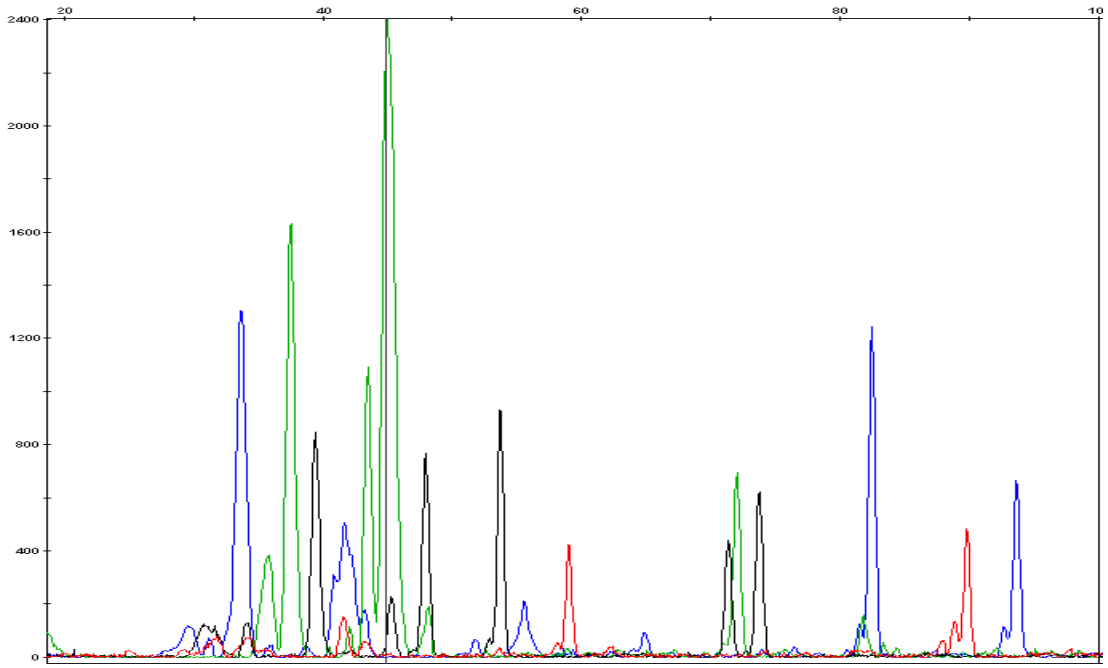
Şekil 12: 2800 M referans örneğinin 17plex (17 SNP ten rengi) elektroforegram görüntüsü



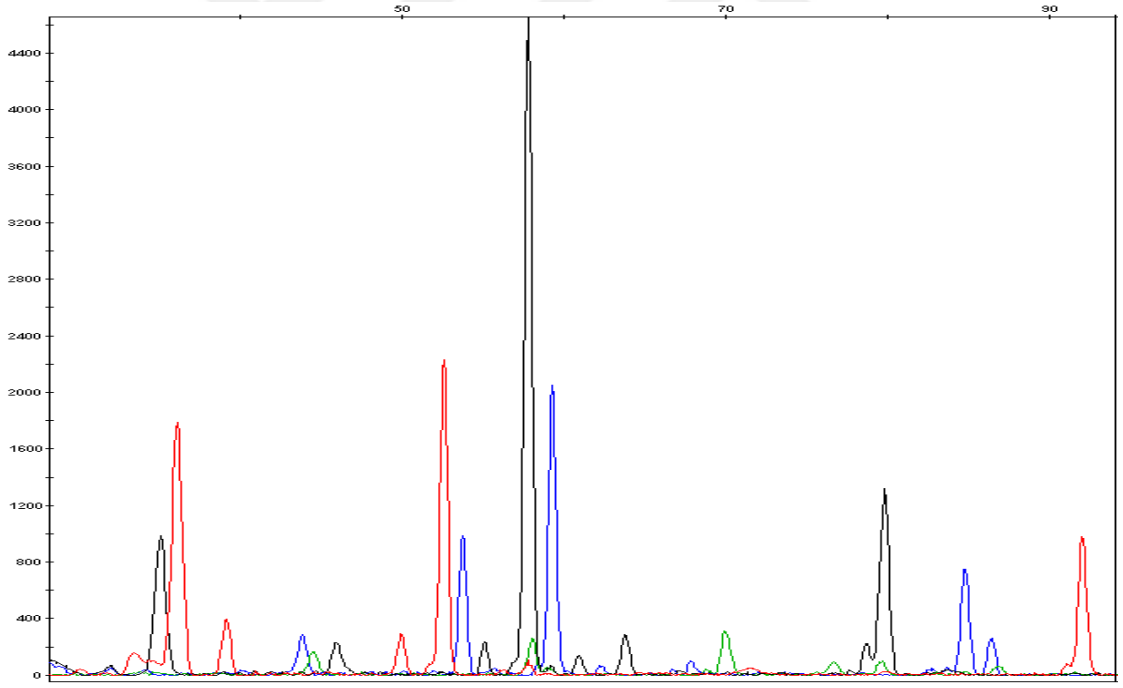
Şekil 13: 9947A referans örneğinin HIrisPlex (24 SNP saç ve göz rengi) elektroforegram görüntüsü



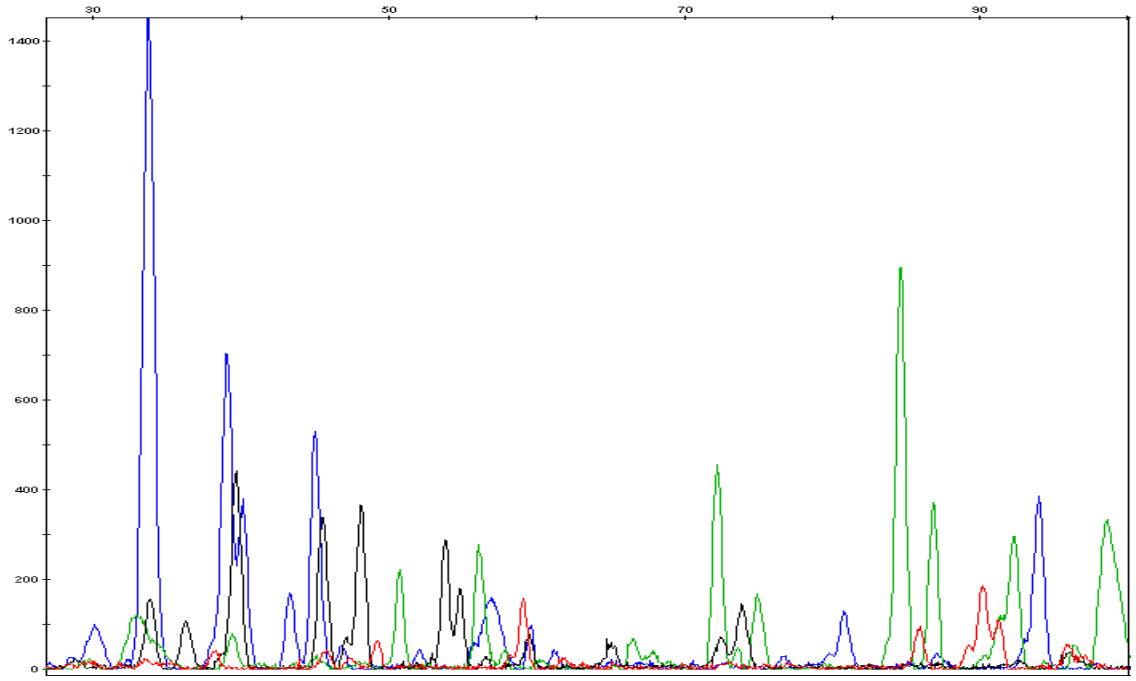
Şekil 14: 9947A referans örneğinin 17plex (17 SNP ten rengi) elektroforegram görüntüsü



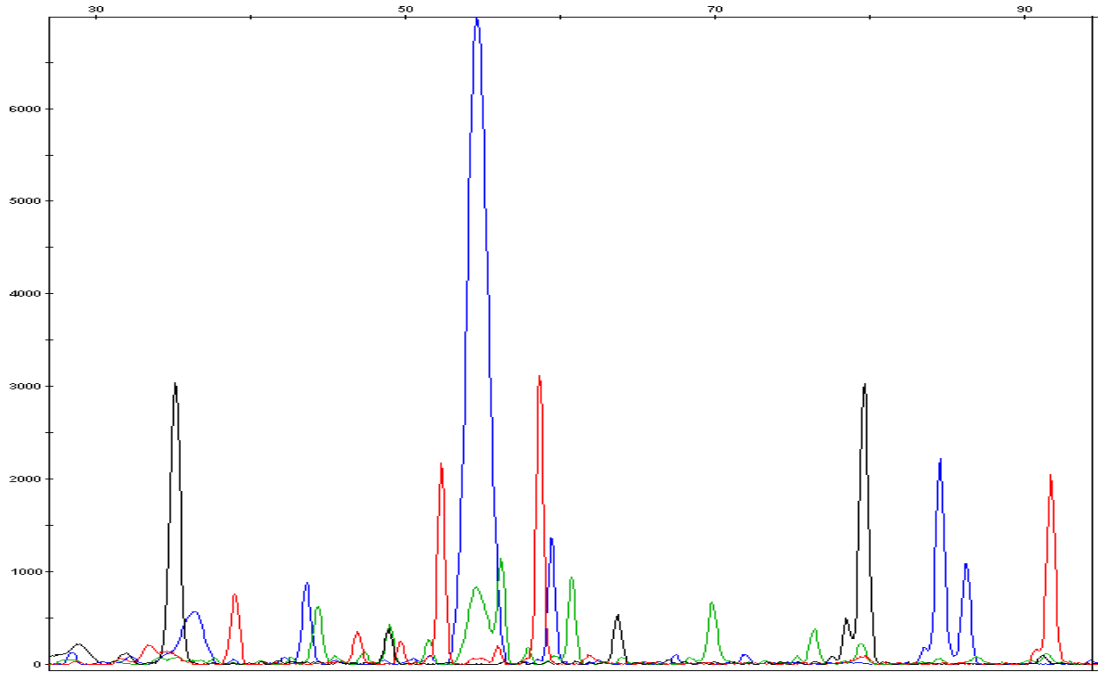
Şekil 15: K562 referans örneğinin HIrisPlex (24 SNP saç ve göz rengi) elektroforegram görüntüsü



Şekil 16: K562 referans örneğinin 17plex (17 SNP ten rengi) elektroforegram görüntüsü



Şekil 17: Taqman referans örneğinin HIrisPlex (24 SNP saç ve göz rengi) elektroforegram görüntüsü



Şekil 18: Taqman referans örneğinin 17plex (17 SNP ten rengi) elektroforegram görüntüsü

Tablo 11: Kapiler elektroforez genotipleme sonuçları

SNP	Taqman	K562	9947A	2800M
rs1042602	C/C	A/A	C/C	C/A
rs10756819	G/G	A/A	A/A	A/A
rs1110400	T/T	T/T	T/T	T/T
rs1126809	G/G	G/G	A/A	G/G
rs1129038	C/C	T/T	T/T	C/T
rs11547464	G/G	G/G	G/G	G/G
rs12203592	C/C	C/C	C/T	C/C
rs12441727	G/G	G/G	G/G	G/G
rs12821256	T/T	T/T	T/T	T/C
rs12896399	G/G	G/G	T/T	G/G
rs12913832	A/A	G/G	G/G	A/G
rs1393350	G/G	G/G	A/A	G/G
rs1426654	G/G	A/A	A/A	A/A
rs1470608	T/T	G/G	G/G	G/G
rs1545397	A/A	A/A	A/A	A/A
rs1667394	C/C	T/T	T/T	C/T
rs16891982	C/C	G/G	G/G	G/G
rs17128291	A/A	A/A	A/G	A/A
rs1800407	C/C	C/C	C/C	C/C
rs1800414	T/T	T/T	T/T	T/T
rs1805005	NN	NN	GG	GG
rs1805006	C/C	C/C	C/C	C/C
rs1805007	C/C	C/T	C/C	C/C
rs1805008	C/C	C/C	C/C	C/C
rs1805009	G/G	G/C	G/G	G/G
rs20132689	C/C	C/C	C/C	C/C
rs2228479	G/G	G/G	G/G	G/G
rs2238289	A/G	A/A	A/A	A/A
rs2378249	A/A	A/A	G/A	A/A
rs2402130	G/G	A/A	A/A	A/A
rs28777	C/C	A/A	A/A	A/A
rs3114908	T/C	T/T	C/C	C/T
rs31226290	C/C	C/C	C/C	C/C
rs3212355	C/C	C/C	C/C	C/C
rs4959270	C/A	C/C	C/A	C/A
rs6059655	G/G	G/G	A/G	G/G
rs6119471	G/G	C/C	C/C	C/C
rs6497292	A/G	A/A	A/A	A/A
rs683	C/C	A/A	A/A	C/A
rs8051733	A/A	G/G	A/G	A/G
rs885479	G/G	G/G	G/G	G/G

Tablo 11'deki genotipleme sonuçları minidizileme ile kapiler elektroforez ile yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlardır.

4.2. MinION Dizileme Sonuçları

Bu çalışmada 4 adet pozitif kontrol (9947A, 2800M, Taqman ve K562) DNA'sı kullanıldı. Pozitif kontrol DNA'ları ikisi (9947A ve 2800M) 1. yürütme ve diğer ikisi (Taqman ve K562) 2. yürütme olmak üzere aynı akış hücresinde ligasyonlu ve ligasyonsuz olarak farklı deneylerde yürütülmüştür.

SNaPshot yöntemi ile Kapiler elektroforez kullanılarak elde edilen genotipler Tablo 11'de verilmiştir. Tablo 12'de ise Nanopore dizileme ile elde edilen genotipler verilmiştir. Tablo 11 ile tablo 12 karşılaştırılarak Nanopore dizileme ile elde edilen genotipleme verileri doğrulanmıştır.

Bu doğrulama sonuçlarına göre, ligasyonsuz 2800M örneğinde 19 alel doğru ve 2 alel yanlış olarak genotiplendirilmiş 22 alelde ise 20'den düşük kapsam değerine sahip oldukları için alel düşmesi olarak sonuçlandırılmıştır. 22 alel düşmesinden düşük kapsam değerine sahip olanlardan 16 tane ise doğru genotip değerine sahiptir. 2800M örneği nanopore dizileme ile %46, alel düşmesi olarak gösterilen hedeflerden düşük kapsam değerine sahip olanlar dâhil edilirse %85 oranında doğru tespit edildiği görülür.

Ligasyonlu 2800M-L örneğinde 32 alel doğru ve 3 alel yanlış olarak genotiplendirilmiş 6 alelde ise 20'den düşük kapsam değerine sahip oldukları için alel düşmesi olarak sonuçlandırılmıştır. 6 alel düşmesinden düşük kapsam değerine sahip olanlardan 1 tane ise doğru genotip değerine sahiptir. 2800M-L örneği nanopore dizileme ile %78, alel düşmesi

olarak gösterilen hedeflerden düşük kapsam değerine sahip olan dâhil edilirse %80 oranında doğru tespit edildiği görülür.

Ligasyonsuz 9947A örneğinde 12 alel doğru ve 1 alel yanlış olarak genotiplendirilmiş 28 alelde ise 20'den düşük kapsam değerine sahip oldukları için alel düşmesi olarak sonuçlandırılmıştır. 28 alel düşmesinden düşük kapsam değerine sahip olanlardan 8 tane ise doğru genotip değerine sahiptir. 9947A örneği nanopore dizileme ile %29, alel düşmesi olarak gösterilen hedeflerden düşük kapsam değerine sahip olan dâhil edilirse %48 oranında doğru tespit edildiği görülür.

Ligasyonlu 9947A-L örneğinde 33 alel doğru ve 6 alel yanlış olarak genotiplendirilmiş 2 alelde ise 20'den düşük kapsam değerine sahip oldukları için alel düşmesi olarak sonuçlandırılmıştır. 9947A-L örneği nanopore dizileme ile %83 oranında doğru tespit edilmiştir.

Ligasyonsuz K562 örneğinde 21 alel doğru ve 3 alel yanlış olarak genotiplendirilmiş 17 alelde ise 20'den düşük kapsam değerine sahip oldukları için alel düşmesi olarak sonuçlandırılmıştır. 17 alel düşmesinden düşük kapsam değerine sahip olanlardan 8 tane ise doğru genotip değerine sahiptir. K562 örneği nanopore dizileme ile %51, alel düşmesi olarak gösterilen hedeflerden düşük kapsam değerine sahip olan dâhil edilirse %70 oranında doğru tespit edildiği görülür.

Ligasyonlu K562-L örneğinde 22 alel doğru ve 7 alel yanlış olarak genotiplendirilmiş 12 alelde ise 20'den düşük kapsam değerine sahip oldukları için alel düşmesi olarak sonuçlandırılmıştır. 12 alel düşmesinden düşük kapsam değerine sahip olanlardan 9 tane ise doğru genotip değerine sahiptir. K562-L örneği nanopore dizileme ile %53, alel düşmesi

olarak gösterilen hedeflerden düşük kapsam değerine sahip olan dâhil edilirse %75 oranında doğru tespit edildiği görülür.

Ligasyonsuz Taqman örneğinde 23 alel doğru ve 1 alel yanlış olarak genotiplendirilmiş 17 alelde ise 20'den düşük kapsam değerine sahip oldukları için alel düşmesi olarak sonuçlandırılmıştır. 17 alel düşmesinden düşük kapsam değerine sahip olanlardan 11 tane ise doğru genotip değerine sahiptir. Taqman örneği nanopore dizileme ile %56, alel düşmesi olarak gösterilen hedeflerden düşük kapsam değerine sahip olan dâhil edilirse %83 oranında doğru tespit edildiği görülür.

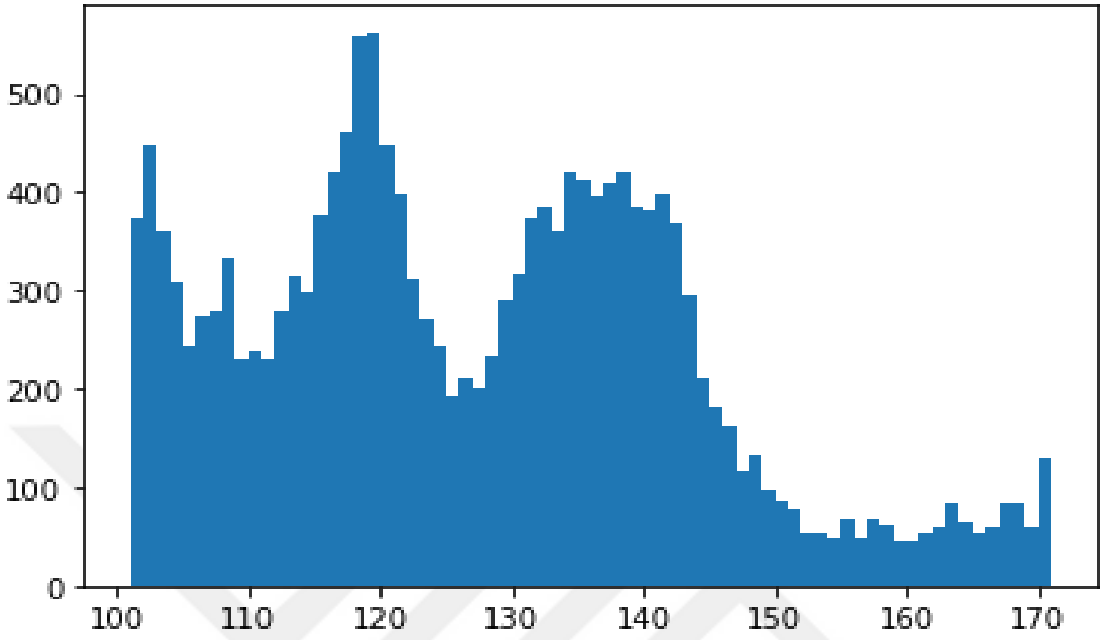
Ligasyonlu Taqman-L örneğinde 32 alel doğru ve 2 alel yanlış olarak genotiplendirilmiş 7 alelde ise 20'den düşük kapsam değerine sahip oldukları için alel düşmesi olarak sonuçlandırılmıştır. 7 alel düşmesinden düşük kapsam değerine sahip olanlardan 4 tane ise doğru genotip değerine sahiptir. Taqman-L örneği nanopore dizileme ile %78, alel düşmesi olarak gösterilen hedeflerden düşük kapsam değerine sahip olan dâhil edilirse %88 oranında doğru tespit edildiği görülür.

Yapılan istatistik analizler sekans düzeyinde istatistik analizler, alel düşmesi ve ortalama kapsam değeri olmak üzere temelde 3 kısma ayrılmıştır.

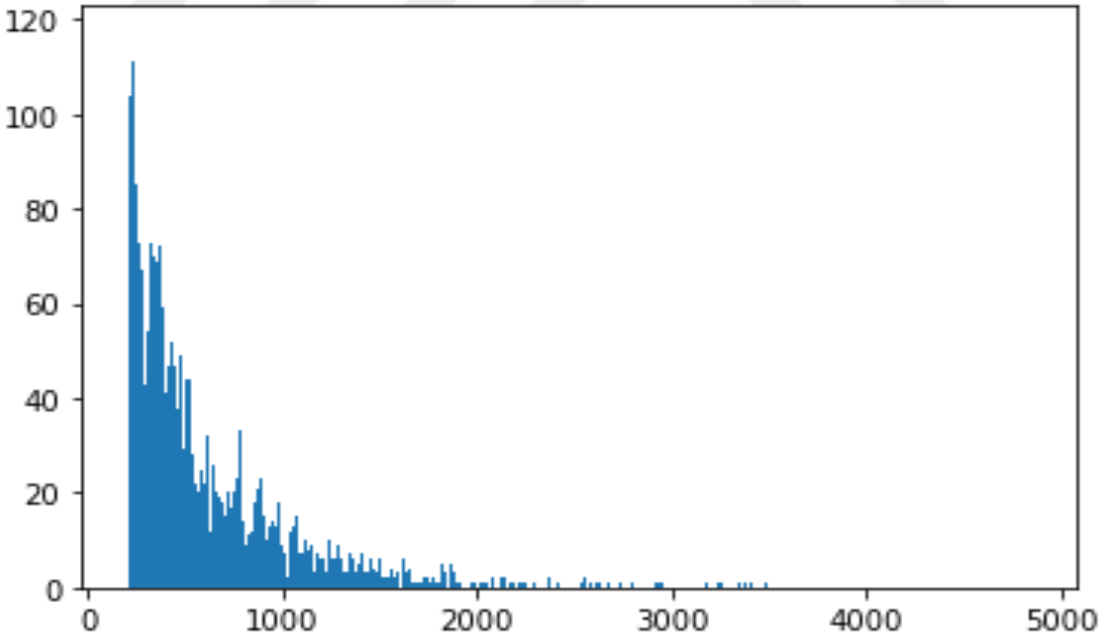
4.2.1. Nanopore Dizileme Sekans Düzeyinde Sonuçlar

Bu tez çalışmada Walsh tarafından geliştirilen HIrisPlex-S paneli kullanılarak, referans DNA örnekleri (9947A, 2800M, Taqman ve K562) ile Nanopore kütüphanesinin her bir örneğinin DNA fragmanları, hem uç uca rasgele eklenerek (ligasyonlu) hemde uç uca eklenmeyerek (ligasyonsuz) Oxford Nanopore MinIon dizileme cihazında yürütüldü.

Dizileme sonucu elde edilen istatistikler aşağıda paylaşılmıştır. Örnek ismine eklenen “L” harfi, örneğe ligasyon işlemi uygulandığını belirtmek içindir.



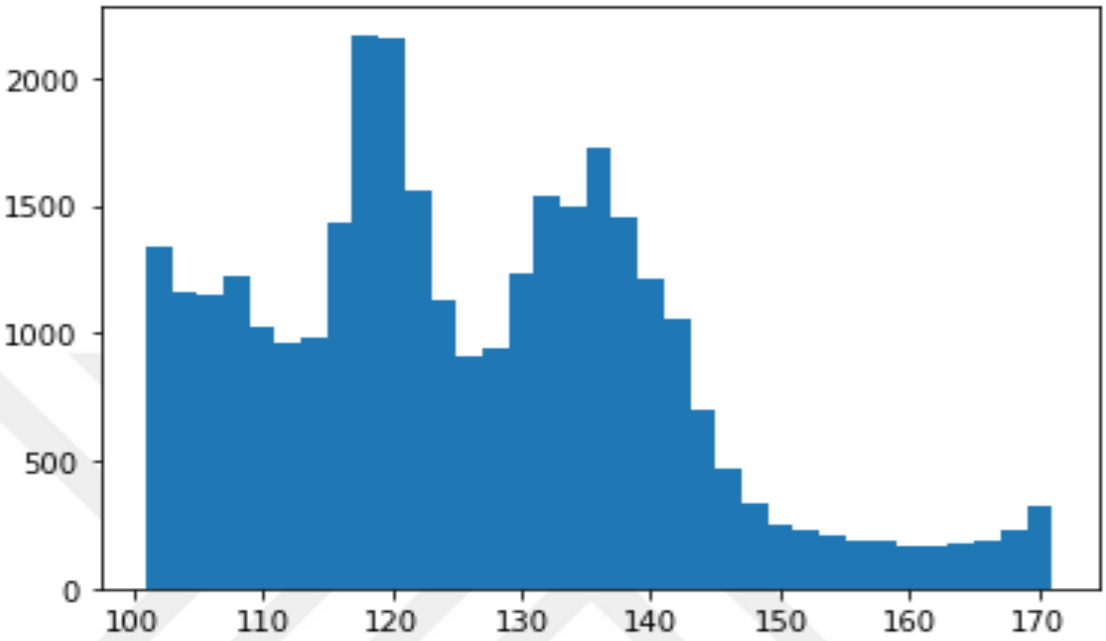
Şekil 19: 2800M örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği



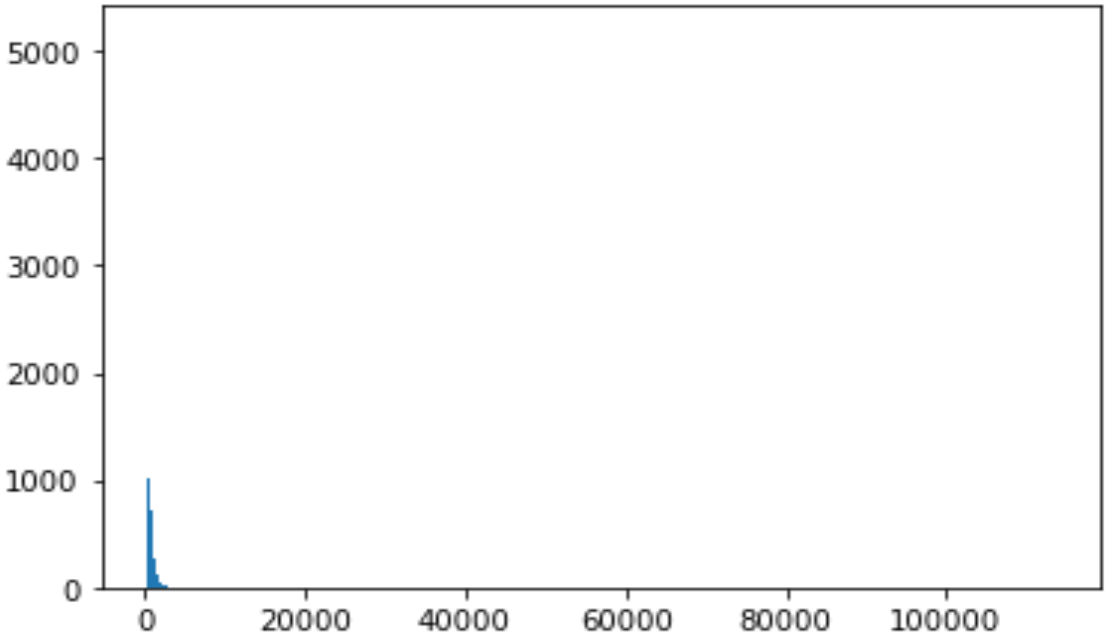
Şekil 20: 2800M-L örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği

2800M referans örneğinden toplam 16989 fragman dizilenmiş (Şekil 13). Ortalama fragman uzunluğu 125,9 olarak tespit edilip standart sapması da 16,4 olarak tespit edilmiştir. 2800M-L örneğinin Python ile fragmanlarının ayrımından önce 7282 fragman tespit edilmiş,

ortalama fragman uzunluğu 605,9, standart sapmasıda 450,2 olarak tespit edilmiştir (Şekil 14). Ligasyon sonucu elde edilen en uzun fragman 4850 bç uzunluğundadır. Pyhton ile fragman ayrımından sonra, 2800M-L örneğinin fragman sayısı 30642'e çıkmıştır.

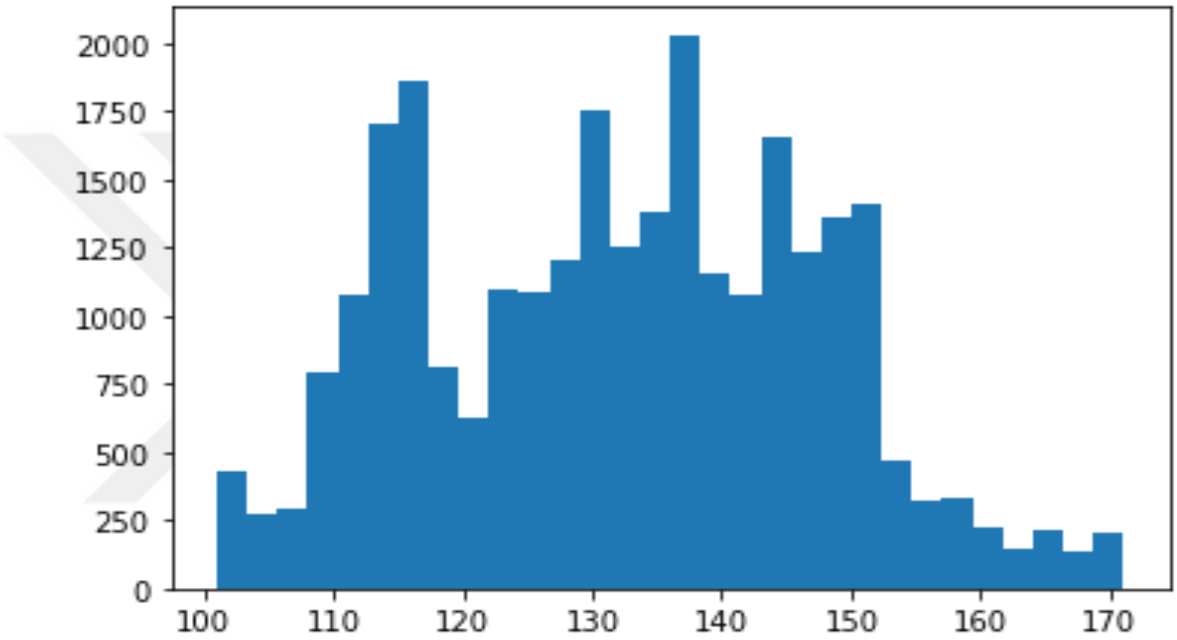


Şekil 21: 9947A örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği

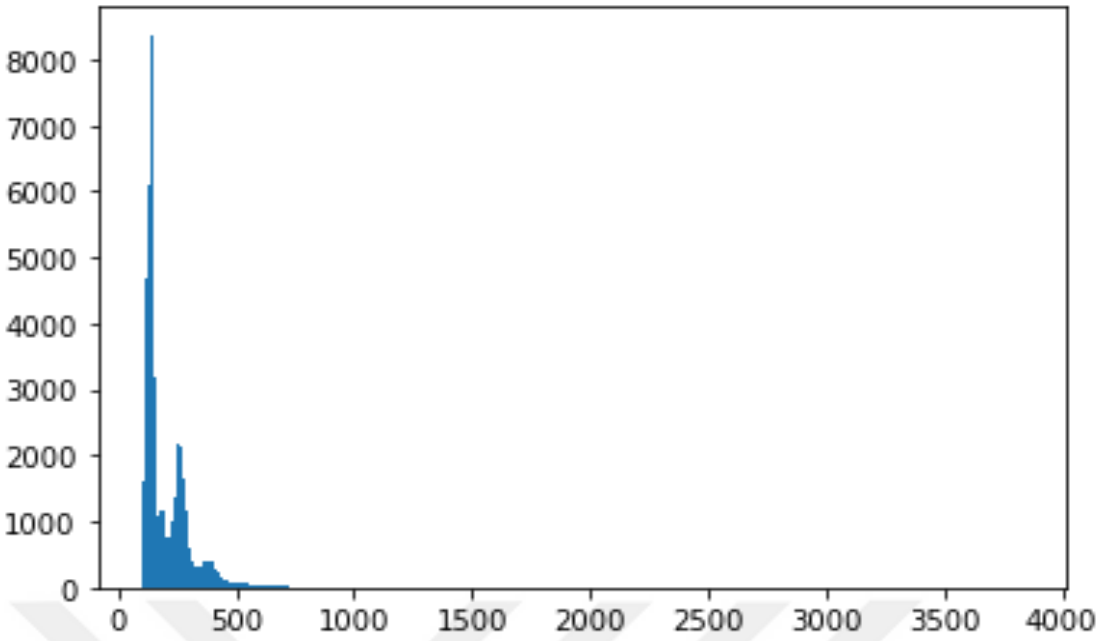


Şekil 22: 9947A-L örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği

9947A referans örneğinden toplam 31644 fragman dizilenmiş. Ortalama fragman uzunluğu 124,7 olarak tespit edilip standart sapması 15,5 olarak tespit edilmiştir. 9947A-L örneğinin Python ile fragmanlarının ayrımından önce 206619 fragman tespit edilmiş, ortalama fragman uzunluğu 629,3, standart sapmasıda 519 olarak tespit edilmiştir. Ligasyon sonucu elde edilen en uzun fragman 113315 bç uzunluğundadır. Pyhton ile fragman ayrımından sonra, 9947A-L örneğinin fragman sayısı 1493763'e çıkmıştır.

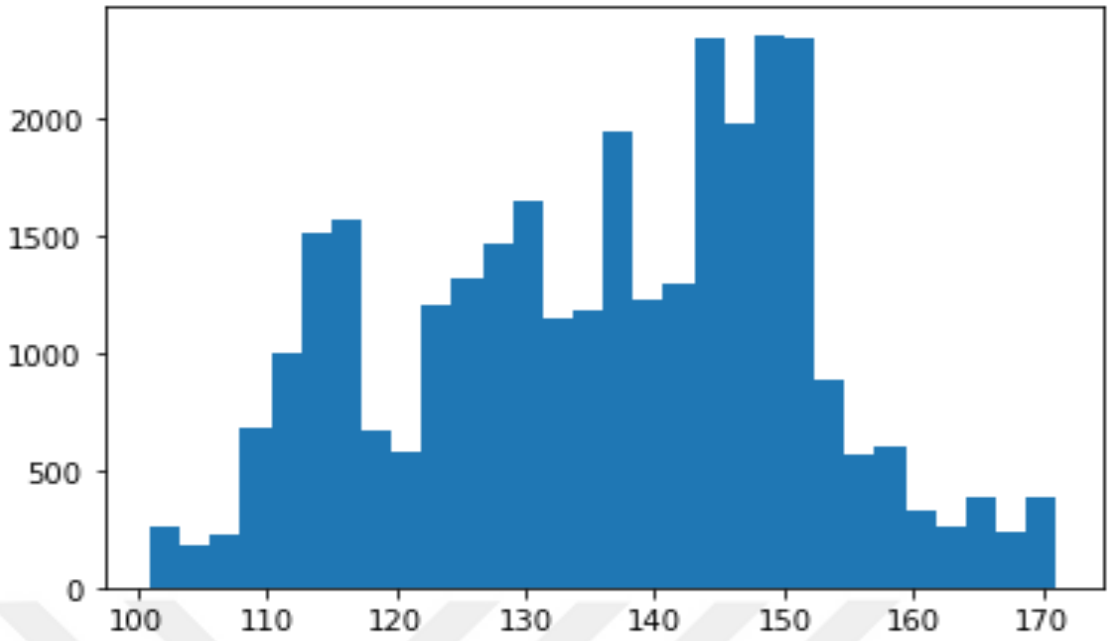


Şekil 23: K562 örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği

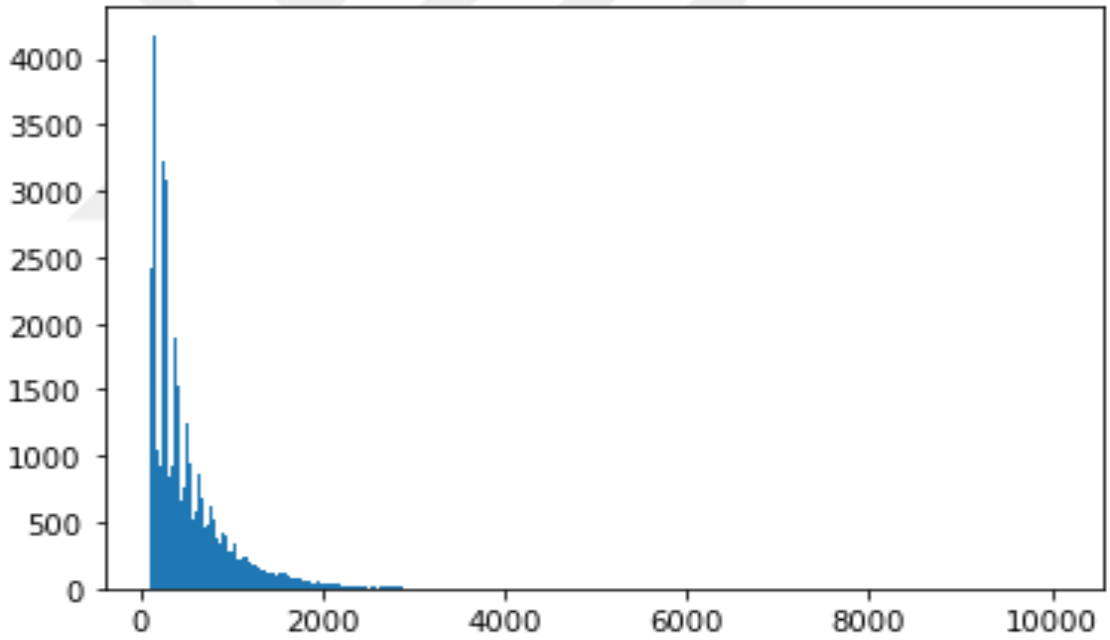


Şekil 24: K562-L örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği

K562 referans örneğinden toplam 27629 fragman dizilenmiş. Ortalama fragman uzunluğu 131,1 olarak tespit edilip standart sapması 15,2 olarak tespit edilmiştir. K562-L örneğinin Python ile fragmanlarının ayrımından önce 43866 fragman tespit edilmiş, ortalama fragman uzunluğu 206,9, standart sapmasıda 127,7 olarak tespit edilmiştir. Ligasyon sonucu elde edilen en uzun fragman 3824 bç uzunluğundadır. Pyhton ile fragman ayrımından sonra, K562-L örneğinin fragman sayısı 92995'e çıkmıştır.



Şekil 25: Taqman örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği



Şekil 26: Taqman-L örneğinin fragman uzunluk dağılım grafiği

Taqman referans örneğinden toplam 31822 fragman dizilenmiş. Ortalama fragman uzunluğu 134,9 olarak tespit edilip standart sapması 15,4 olarak tespit edilmiştir. Taqman-L örneğinin Python ile fragmanlarının ayrımından önce 34699 fragman tespit edilmiş, ortalama fragman uzunluğu 531,9, standart sapmasıda 476,9 olarak tespit edilmiştir.

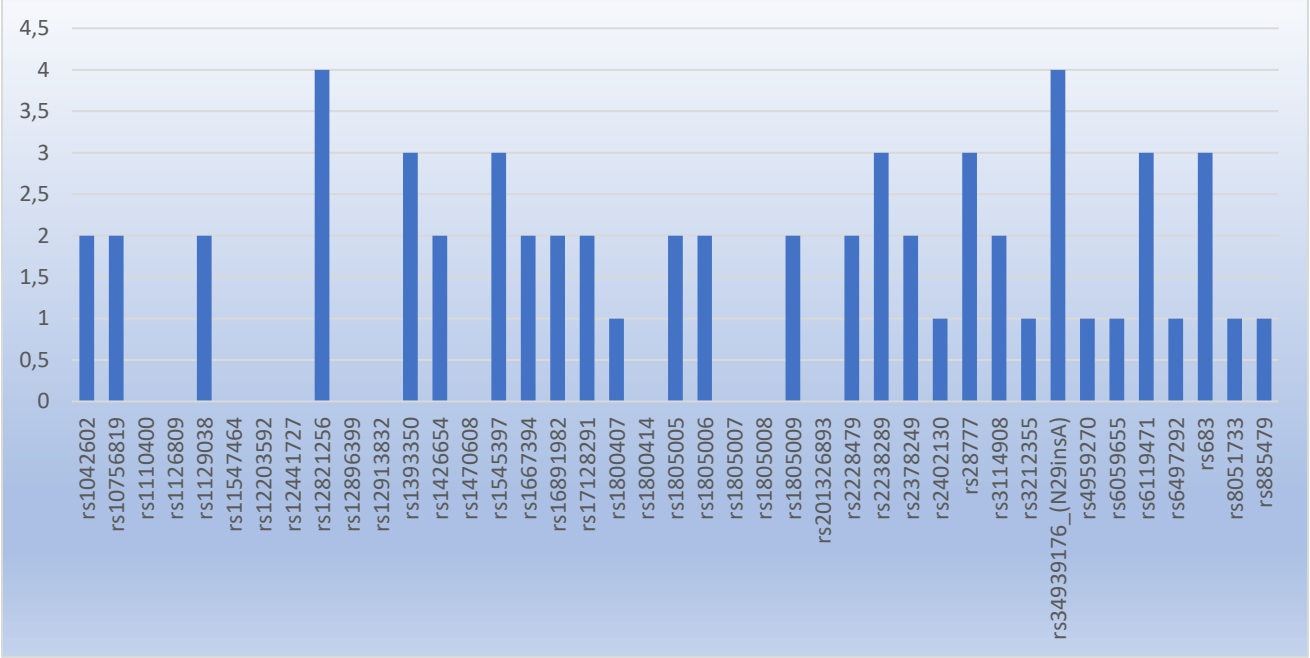
Ligasyon sonucu elde edilen en uzun fragman 10053 bç uzunluğundadır. Pyhton ile fragman ayrımından sonra, Taqman-L örneğinin fragman sayısı 199676'e çıkmıştır.

4.2.2. Nanopore Dizileme Alel Düşmesi Sonuçları

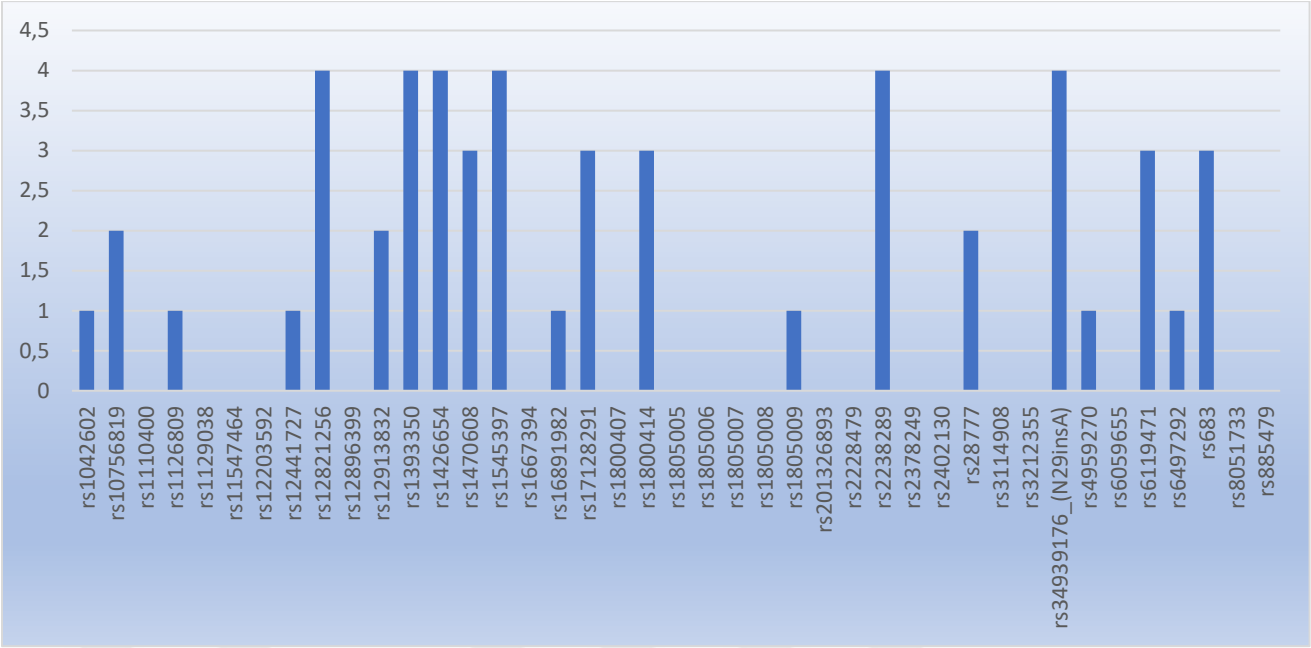
Nanopore Dizileme MinION Flowcellleri 2048 nano gözenekten oluşup, bu gözenekler her yürütme sonrasında azalmaktadır. Ancak firma FlowCellerin yıkama ile birden faz kez kullanılabileceğini belirtilmektedir (216)

Çalışmamızda 1. yürütümeden önce 1051 nano gözenek tespit edilmiştir. 2. yürütmede bu değer 362'ye düşmüştür. Alel düşmesi üzerinde nano gözenek sayısının ve ligasyon işleminin etkileri birbirinden bağımsız olarak incenlenmiştir.

4.2.2.1. Nano Gözenek Miktarının Azalmasının Tüm Örneklerin Toplam Alel Düşmesi Üzerindeki Etkileri



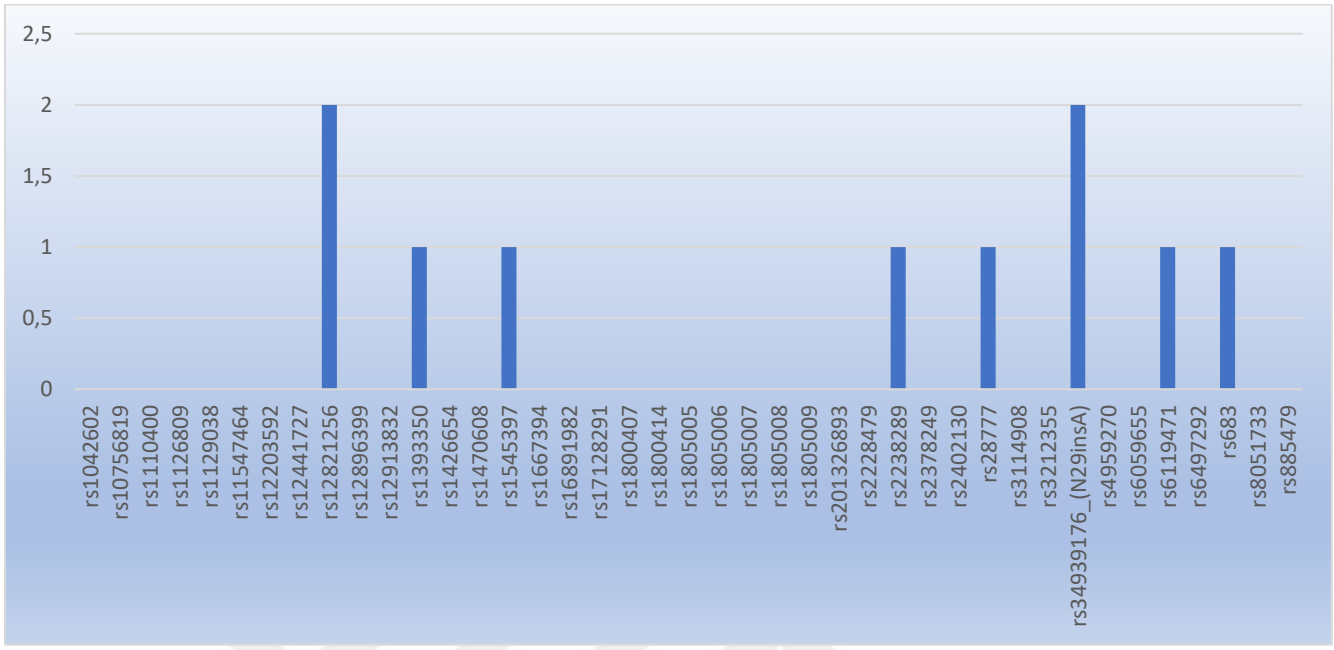
Şekil 27: 9947A ve 2800M örneklerinin 1. yürütme toplam alel düşmesi değerleri



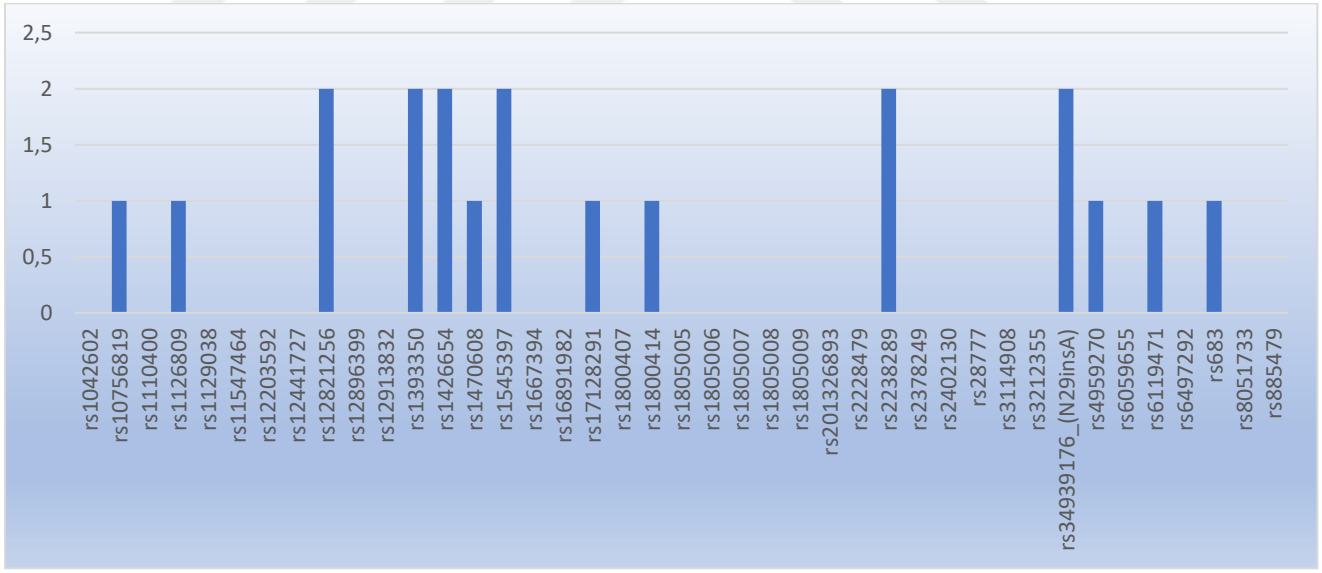
Şekil 28: Taqman ve K562 örneklerinin 2. yürütme toplam alel düşmesi değerleri

Nano gözenek değerinin alel düşmesi üzerinde anlamlı bir etkisinin olup olmadığını anlamak için ligasyon işlemi uygulanmış ve ligasyon işlemi uygulanmamış örneklerin toplam alel düşmesi değerlerine istatistiksel analizler yapıldı. İlk olarak, sonuçların dağılımının normal olup olmadığını anlamak için Shapiro-Wilk testi uygulandı. Her iki yürütmeinin toplam alel düşmesi sonuçlarına yapılan Shapiro-Wilk testinin sonucuna göre alel düşmesi değerleri ($p = 0.0006542 < 0,05$, $p = 1,138e\text{-}06 < 0,05$) normal dağılım göstermemektedir. Bu nedenle, akış hücresinin 1. ve 2. defa kullanımı arasında istatistiksel bir fark olup olmadığını anlamak için The Mann–Whitney testi uygulandı. Test sonucunda ($p = 0,2951 > 0,05$) 95 % güvenle 327 nano gözenek farkının alel düşmesi üzerinde etkisinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

4.2.2.2. Nano Gözenek Miktarının Azalmasının Ligasyonlu Örneklerin Alel Düşmesi Üzerindeki Etkileri



Şekil 29: 9947AL ve 2800ML örneklerinin 1. yürütme alel düşmesi değerleri

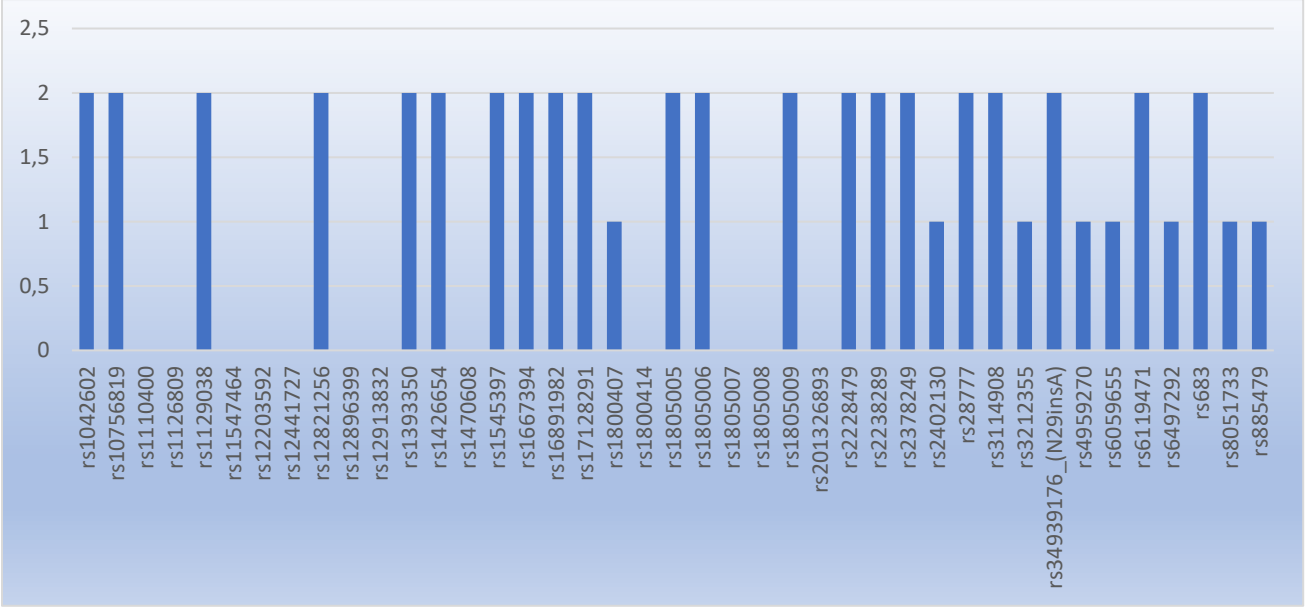


Şekil 30: TaqmanL ve K562L örneklerinin 2. yürütme alel düşmesi değerleri

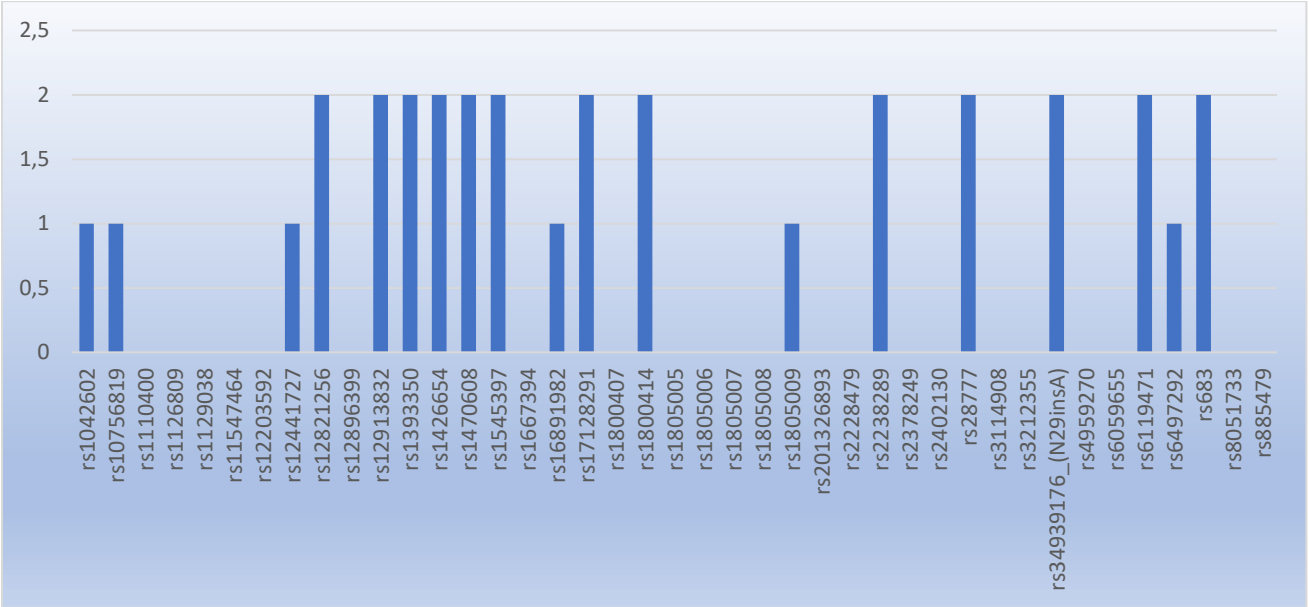
Sadece ligasyon işlemine tabi tutulan örnekler üzerinde nano gözenek farkının alel düşmesi üzerinde etkisinin olduğunu anlamak için istatistiksel analizler yapıldı. Alel düşmesi sonuçlarına yapılan Shapiro-Wilk testinin sonucuna göre ligasyonlu örneklerin alel düşmesi değerleri ($p = 1.538e\text{-}10 < 0,05$, $p = 1.551e\text{-}08 < 0,05$) normal dağılım

göstermemektedir. Bu nedenle, akış hücresinin 2. defa kullanımından kaynaklanan 327 nano gözenek farkının alel düşmesi üzerinde istatistiksel bir etkisi olup olmadığını anlamak için The Mann-Whitney testi uygulandı. Test sonucunda ($p = 0.1134 > 0,05$) 95 % güvenle 2. yürütmenin 327 nano gözenek daha az kullanmış olmasının ligasyon işlemine tabi tutulmuş örnekler üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

4.2.2.3. Nano Gözenek Miktarının Azalmasının Ligasyonsuz Örneklerin Alel Düşmesi Üzerindeki Etkileri



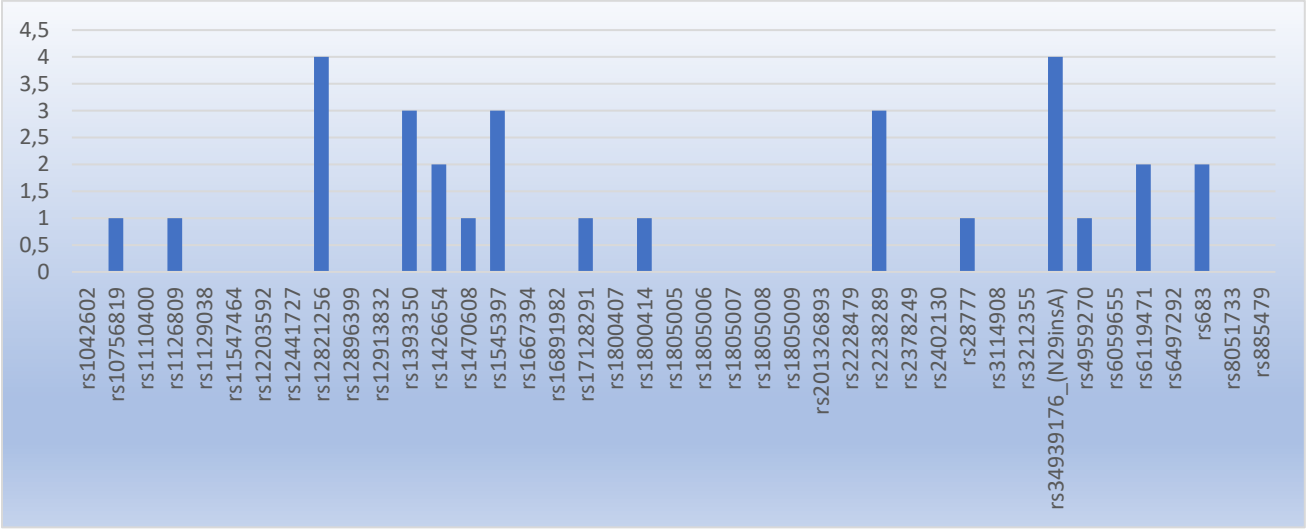
Şekil 31: 9947A ve 2800M örneklerinin 1. yürütme alel düşmesi değerleri



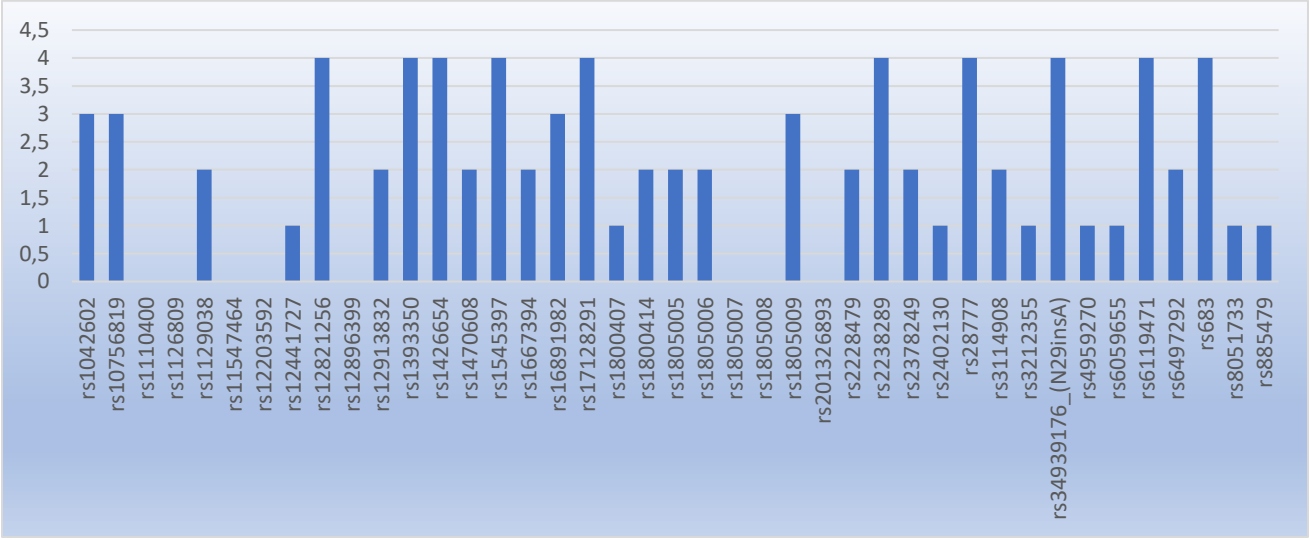
Şekil 32: Taqman ve K562 örneklerinin 2. yürütme alel düşmesi değerleri

Sadece ligasyon işlemi uygulanmayan örnekler üzerinde nano gözenek farkının alel düşmesi üzerinde etkisinin olduğunu anlamak için istatistiksel analizler yapıldı. Alel düşmesi sonuçlarına yapılan Shapiro-Wilk testinin sonucuna göre ligasyon işlemi uygulanmamış örneklerin alel düşmesi değerleri ($p = 2.39e\text{-}07 < 0,05$, $p = 9.304e\text{-}08 < 0,05$) normal dağılım göstermemektedir. Bu nedenle, akış hücresinin 2. defa kullanımından kaynaklanan 327 nano gözenek farkının alel düşmesi üzerinde istatistiksel bir etkisi olup olmadığını anlamak için The Mann-Whitney testi uygulandı. Test sonucunda ($p = 0,03043 < 0,05$) 95 % güvenle 2. yürütmenin 327 nano gözenek daha az kullanmış olmasının ligasyon işlemi uygulanmamış örnekler üzerinde anlamlı bir etkisinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

4.2.2.4. Ligasyon İşleminin Alel Düşmesi Üzerindeki Etkileri



Şekil 33: 9947AL, 2800ML, K562L ve TaqmanL örneklerinin toplam alel düşmesi değerleri



Şekil 34: 9947A, 2800M, K562 ve Taqman örneklerinin toplam alel düşmesi değerleri

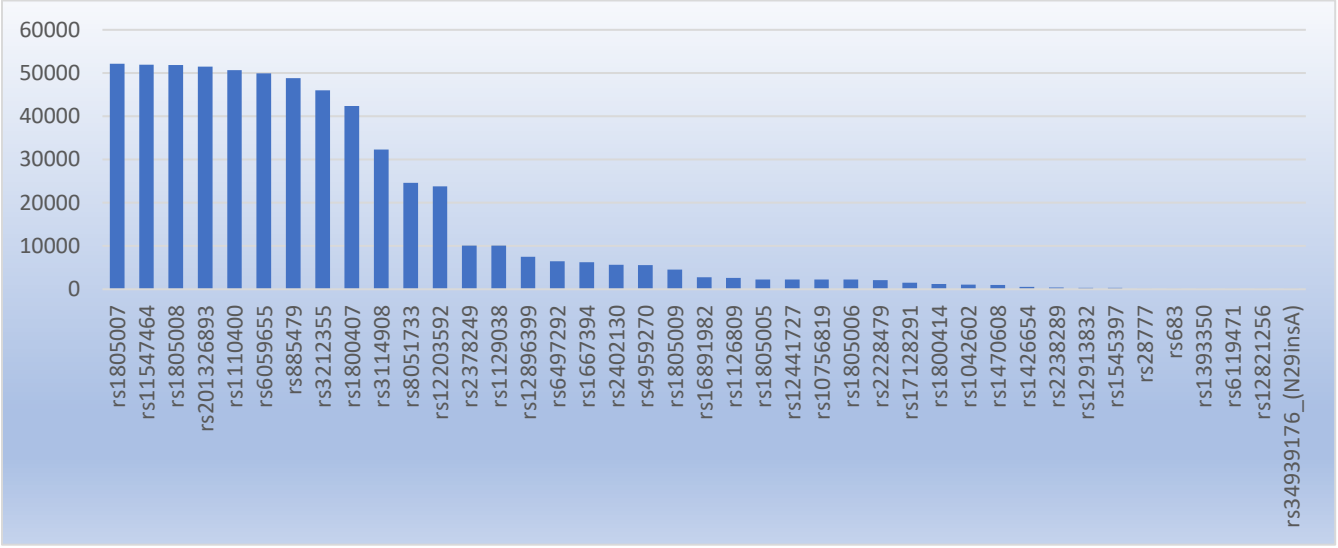
Ligasyon işleminin toplam alel düşmesi üzerindeki etkilerini incelemek için ligasyonlu örneklerin toplmam alel düşmesi değerleri ile ligasyonsuz örneklerin toplam alel düşmesi değerleri karşılaştırıldı. Ligasyonlu ve ligasyonsuz örneklerin alel düşmesi sonuçlarına yapılan Shapiro-Wilk testinin sonucuna göre alel düşmesi değerleri ($p = 2{,}553e\text{-}08 < 0{,}05$, $p = 0{,}0003913 < 0{,}05$) normal dağılım göstermemektedir. Bu nedenle, Ligasyon işleminin alel düşmesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olup olmadığını

anlamak için The Mann-Whitney testi uygulandı. Test sonucunda (p = 3,229e-05 < 0,05) 95 % güvenle ligasyon işleminin örneklerin alel düşmesi üzerinde etkisinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

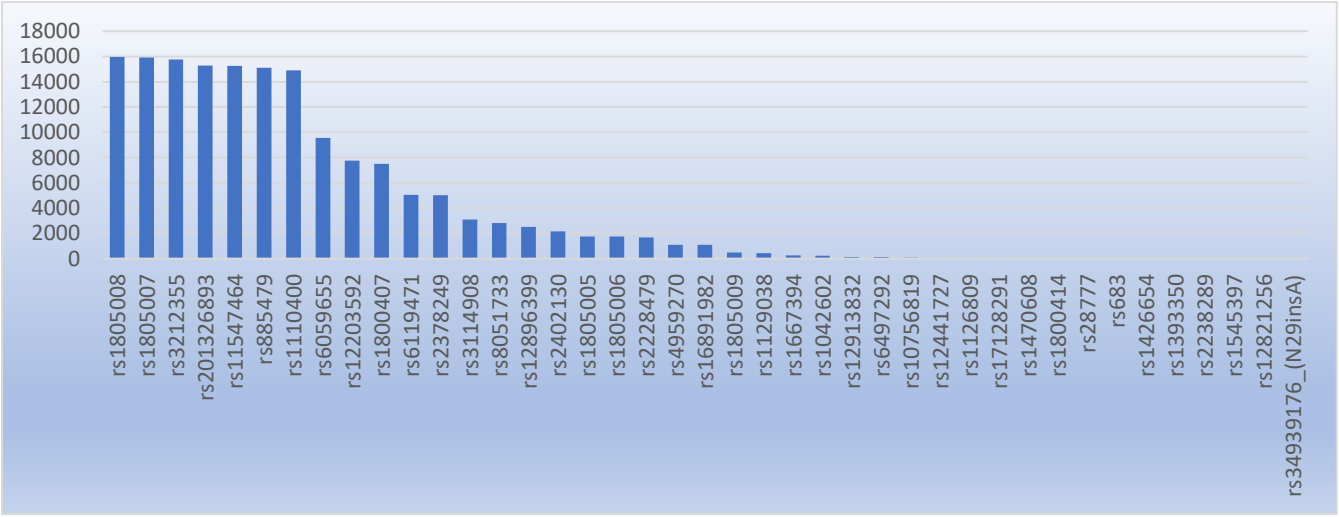
4.2.3. Nanopore Dizileme Alel Başına Kapsam Derğerleri

Kapsam değerleri analizleri iki kısma ayrılmıştır. Birinci kısmda nano gözenek farkının kapsam değeri üzerindeki etkileri incelenmiştir. İkinci kısımda ise ligasyon işleminin kapsam değerleri üzerindeki etkileri incelenmiştir.

4.2.3.1.Nano Gözenek Azalmasının Ortalama Kapsam Değerleri Üzerindeki Etkileri



Şekil 35: 1. yürütme alel başına ortalama kapsam değerleri

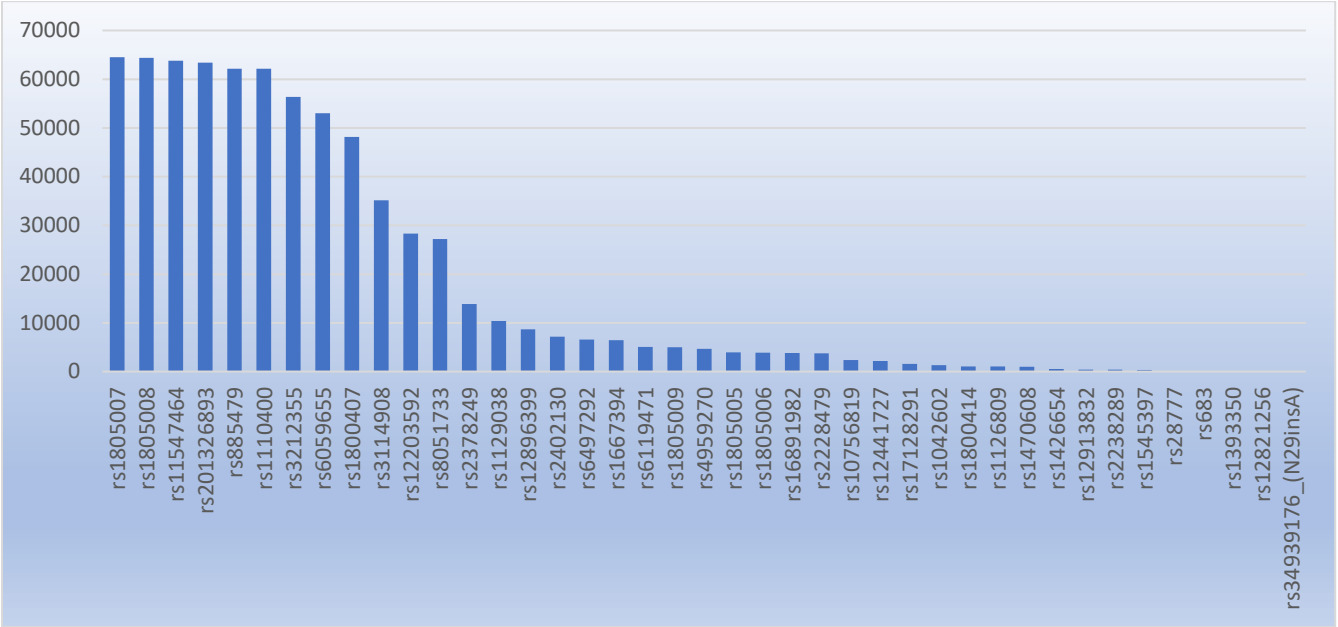


Şekil 36: 2. Yürütme alel başına ortalama kapsam değerleri

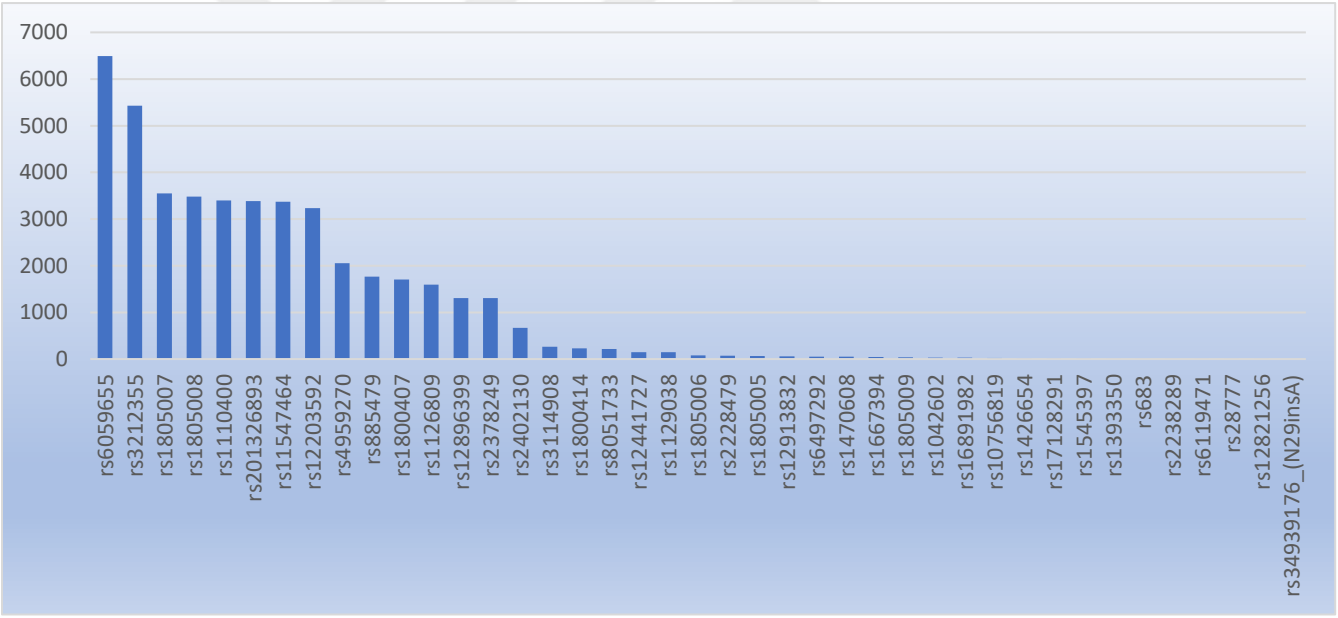
Nano gözenek miktarının azalmasının alel başına ortalama kapsam değerini istatistiksel olarak anlamlı etkileyip etkelemediği incelenmiştir. 1. yürütmede elde edilen ortalama kapsam değeri 14766 olup, değer 0-97868 aralığında değişmektedir. 2. yürütmede elde edilen ortalama kapsam değeri 3975 olup, değer 0-20245 aralığında değişmektedir. Ortalama kapsam sonuçlarına yapılan Shapiro-Wilk testinin sonucuna göre alel başına kapsam değerleri ($p = 7.403e\text{-}08 < 0,05$, $p = 5.419e\text{-}08 < 0,05$) normal dağılım göstermemektedir. Bu nedenle, nano gözenek miktarının azalmasının kapsam değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olup olmadığını anlamak için The Mann–Whitney testi uygulandı. Test sonucunda ($p = 0,007256 < 0,05$) 95 % güvenle akış hücresinin kullanılmış olmasının yani 2. yürütmede 327 nano gözenek daha az kullanılmasının kapsam değerleri üzerinde anlamlı etkisinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Akış hücresinin kullanılmış olması veya akış hücresi üzerinde kullanılabilir nano gözenek sayısının azalması deney sonucunda elde edilen kapsam değerini düşürür.

4.2.3.2. Ligasyon İşleminin Alel Başın Kapsam Değeri Üzerindeki Etkileri

Bu çalışmada bütün örnekelerin PCR sonucunda elde edilen ürünleri 2 kısıma ayrılmıştır. Bir kısmıyla ligasyon işlemi uygulandıktan sonra kütüphane hazırlama reaksiyonlarına devam edilirken diğer kısmı ise kütüphane hazırlama reaksiyonlarına doğrudan eklenmiştir.



Şekil 37: Ligasyonlu Örneklerinin Alel Başına Ortalama Kapsam Değerleri



Şekil 38: Ligasyonsuz Örneklerinin Alel Başına Ortalama Kapsam Değerleri

Ligasyon işleminin ortalama kapsam değerlerini istatistiksel olarak etkileyip etkilemediği incelendi. Ligasyonlu işlemde elde edilen ortalama kapsam değeri 17661 olup, değer 0-97868 aralığında değişmektedir. Ligasyonsuz işlemde elde edilen ortalama kapsam değeri 1080 olup, değer 0-5755 aralığında değişmektedir. Ortalama kapsam sonuçlarına yapılan Shapiro-Wilk testinin sonucuna göre alel başına kapsam değerleri ($p = 7.894e-08 <$

0,05, p = 7.616e-08 < 0,05) normal dağılım göstermemektedir. Bu nedenle, ligasyon işleminin kapsam değerleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olup olmadığını anlamak için The Mann–Whitney testi uygulandı. Test sonucunda (p = 5.761e-07 < 0,05) 95 % güvenle ligasyon işleminin kapsam değerleri üzerinde etkisinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ligasyon işlemi deney sonucunda elde edilen kapsam değerini arttırır.

4.2.4. Nanopore Dizileme Genotip Sonuçları

Herbir örnek için elde edilen VCF dosyasından Python 3.9 ile profil oluşturuldu. Elde dilen profilde kapsam değeri 20 ve üstü olan aleller genotipleme işlemine dâhil edildi. Genotipi belirlenemeyen aleller yerine “NA“ yazıldı. Tablo 12’deki genotipleme sonuçları Tablo 11’de verilen kapiler elektroforez genotipleme sonuçları ile karşılaştırılıp Nanopore dizilemenin SNP’leri doğru tespit etme oranı toplam %60 bulundu.

Tablo 12: Ligasyonlu ve ligasyonsuz örneklerin Nanopore dizileme genotipleri

snp	2800L	9947AL	K562L	TaqmanL	2800M	9947A	K562	Taqman
rs1042602	CA	CA	AA	CC	NA	NA	NA	CC
rs10756819	GA	AA	NA	GG	NA	NA	AA	GG
rs1110400	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
rs1126809	GG	AA	NA	GG	GG	AA	GG	GG
rs1129038	CT	TT	CT	CC	CT	NA	CT	CC
rs11547464	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
rs12203592	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC
rs12441727	GG	GG	GG	GG	GG	GG	NA	GT
rs12821256	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	TT
rs12896399	GG	GT	GG	GG	GG	GT	GG	GG
rs12913832	AG	AG	AG	AA	AG	AG	NA	NA
rs1393350	NA	GA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rs1426654	AA	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rs1470608	GG	GG	NA	TT	GA	GG	NA	NA
rs1545397	NA	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rs1667394	CT	TT	TT	CC	NA	NA	TT	CT
rs16891982	GG	GG	GG	CC	NA	NA	NA	CC
rs17128291	AA	AG	NA	AA	NA	NA	NA	NA
rs1800407	CT	CC	CC	CC	NA	CC	CC	CC
rs1800414	TT	TT	NA	TT	TT	TT	NA	NA
rs1805005	GG	GG	GG	GG	NA	NA	GG	GG
rs1805006	CC	CC	CC	CC	NA	NA	CC	CC
rs1805007	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805008	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs1805009	GG	GG	GC	GG	NA	NA	GC	GG
rs201326893	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
rs2228479	GG	GG	GG	GG	NA	NA	GG	GG
rs2238289	NA	AA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rs2378249	AA	GA	AA	AA	NA	NA	AA	AA
rs2402130	GA	GA	AA	GG	AA	NA	AA	GG
rs28777	NA	AA	AA	CC	NA	NA	NA	NA
rs3114908	TC	TC	TC	TC	NA	NA	TT	TC
rs312262906	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rs3212355	CC	CC	CC	CC	CC	NA	CC	CC
rs4959270	CA	CA	CC	NA	CA	NA	CC	CA
rs6059655	GG	AG	AG	CA	GG	NA	GG	AG
rs6119471	NA	CC	NA	AG	NA	NA	NA	NA
rs6497292	AG	AG	AA	AG	AG	NA	NA	AG
rs683	NA	CA	NA	CC	NA	NA	NA	NA
rs8051733	AG	AG	AG	AA	AG	NA	AG	AA
rs885479	GG	GG	GG	GG	GG	NA	GG	GG

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kısa ardışık tekrar dizileri (STR) ile veya tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) gibi diğer polimorfik DNA belirteçlerine dayalı standart adli DNA analizi, karşılaştırmalı DNA profili yoluyla bir suç mahallinde bulunan bir insan biyolojik izinin donörünü tanımlayamadığında, yani bilinen herhangi bir şüpheli veya DNA veri tabanıyla eşleşme elde edilemediğinde, alternatif yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Bu tür DNA tabanlı ajanlar, kanıt DNA'sından failin fiziksel özellikleri hakkında bilgi vererek polise yardımcı olabilir ve bu da polis soruşturmasında faillerin bulunmasına katkı sağlayabilir. Bu tür DNA görgü tanıklığı için gözle özelliklerin (External Visible Characteristics, EVC) tahminini içerin Adli DNA Fenotipleme (Forensic DNA Phenotyping, FDP) çalışmaları yapılmaktadır.

Son 14 yılda, aday gen ilişkilendirme çalışmaları ve genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının yanı sıra ardı sıra gelen tahmin analizleri, özellikle insan pigmentasyon özellikleri için çeşitli EVC tahmin edici SNP'ler ve tahmin modelleri oluşturulmuştur (197). Özellikle, SNP genotiplerinden kategorik göz ve saç rengi fenotiplerinin tahmini, adli olarak doğrulanmış, ayrıca test edilmiş ve uygulanmıştır (13, 14, 119, 125, 127, 194). HIrisPlex–S sistemi, iki multipleksden (HIrisPlex ve 17-plex) oluşur ve SNaPshot kimyası kullanılarak tek-bazlı primer uzatma (Single Base Extension, SBE) reaksiyonları ile genotip tayini ve sonrasında multinominal logistik regresyona dayalı fenotip tahminini içerir. HIrisPlex, göz ve saç rengi tahmin edici DNA varyantını hedefleyen toplamda 24 SNP markırının (MC1R rs312262906, MC1R rs11547464, MC1R rs885479, MC1R rs1805008, MC1R rs1805005, MC1R rs1805006, MC1R rs1805007, TUBB3 rs1805009, MC1R rs201326893, MC1R rs2228479, MC1R rs1110400, SLC45A2 rs28777, SLC45A2 rs16891982, KITLG rs12821256, LOC105374875 rs4959270, IRF4 rs12203592, TYR rs1042602, OCA2 rs1800407, SLC24A4 rs2402130, HERC2 rs12913832, PIGU rs2378249, LOC105370627 rs12896399, TYR rs1393350, TYRP1 rs683) tek bir multipleks ile genotiplenmesinin yanı

sıra saç ve göz rengi tahmin modelinden oluşur (13). HIrisPlex-S sistemi ise HIrisplex paneline ek 17 SNP ile toplamda 41 SNP markırından oluşan bir sistem olup, göz, saç ve ten renginin tahmininde kullanılır. Bu sistemde ten rengi tahmini için 5 kategori düzeyinde (Çok Soluk, Soluk, Ara Düzey Koyu, Koyu ve Koyu-Siyah) 36 SNP kullanılmaktadır. Bunlardan 19'u 24-pleks HIrisPlex testi ile hedeflenenlerle örtüşür. İkinci multipleks test ile hedeflenen 17 SNP (ANKRD11 rs3114908, BNC2 rs10756819, SLC24A4 rs17128291, HERC2 rs2238289, HERC2 rs6497292, HERC2 rs1129038, HERC2 rs1667394, TYR rs1126812rs, O17CA rs1126812rs, O17CA rs126812rs, O17CA rs12681209, O17CA RS126812rs rs1426654, ASIP rs6119471, RALY rs6059655, MC1R rs3212355 ve DEF8 rs8051733) ise farklı gen bölgelerinde bulunmaktadır (197). Saç, göz ve ten rengi tahminlerinde yapılan çalışmalar sadece HIrisPlex-S ile sınırlı kalmamıştır. SNP tahmin edicilerinde HIrisPlex-S sistemiyle büyük ölçüde örtüşen göz ve saç rengi DNA tahmini için benzer paneller de oluşturulmuştur (200-206). Ancak HIrisPlex sistemi hem az sayıda SNP içermesi hem de yüksek tahmin başarısı ile adli genetik camiasında en çok tercih edilen ve adli uygulamalarda çalışılan paneldir (217).

Moleküler biyoloji teknikleri son yıllarda hızla ilerlemiştir ve özellikle dizileme alanında şaşırtıcı bir hızla ilerlemeye devam etmektedir. 1977'de Sanger dizilemesi olarak da bilinen zincir sonlandırma yöntemine dayanan DNA dizileme teknolojisi geliştirilmiştir. Sanger dizileme, laboratuvar ve ticari dizileme uygulamalarının "birinci neslinde" birincil teknoloji olarak benimsenmiştir (23). Bu tekniklerdeki iyileştirmelerin çoğu, Yeni Nesil Dizilemenin (NGS) gelişmesini sağlamıştır. 454 sistemi 2005'te 454 tarafından piyasaya sürülmüş ve 2007'de Roche tarafından satın alınmıştır. Solexa, 2006'da daha sonra Illumina tarafından satın alınarak bir Genome Analyzer (GA) yayınlamış, Miseq ve Hiseq platformları Illumina tarafından piyasaya sürülmüş ve ardından Agencourt tarafından sağlanan SOLiD® piyasaya sürülmüştür. 2011 yılında Life Technologies, Ion Torrent Kişisel

Genom Makinesini (Personal Genome Machine, PGM) piyasa sürmüştür. Bunlar, Illumina sistemleri başta olmak üzere, dünya çapında en uygulanabilir NGS platformlarıdır (23). Tüm bu platformlar ikinci nesil olarak adlandırılmış olup Sanger dizilemesine kıyasla daha iyi bir performans, yüksek doğruluk ve daha düşük bir maliyet sağlarlar.

PCR amplifikasyonu olmaksızın tek moleküllü şablonlar kullanan üçüncü nesil platformlara geçiş, Pacific Biosciences'dan PacBio ve Oxford Nanopore Technologies'ten Nanopore dizilemenin piyasaya sürülmesi ile başlamıştır (23). Tüm bu NGS teknikleriyle ortak olan temel şeylerden biri, aynı anda binlerce okumanın üretildiği devasa paralel dizileme stratejisidir. NGS platformlarının temel yenilikleri, büyük paralel kimyasal reaksiyonlar, ultra yüksek çözünürlüklü optikler ve okumaları analiz etmek için hesaplama yöntemleridir (23). Bu devrim niteliğindeki teknolojik gelişmeler, dizileme maliyetini büyük ölçüde azaltmış ve sonuç alma süresini yalnızca birkaç güne indirmiştir.

Şu anda, NGS metodolojisi temel olarak biyomedikal alanlarda uygulanmaktadır ve bu da kanser, genetik bozukluklar ve yaygın/nadir hastalıkların klinik tanısına yönelik araştırmaları geliştirmeyi mümkün kılmıştır (23). Adli tıp alanında NGS ve sonuçlarının kalitesi hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. Bununla birlikte, sınırlı miktarda numune ve yüksek bozulma derecesi, adli alan uygulamasında NGS platformları için hala ana engeldir. Bu nedenle, KE ve yüksek oranda bozulmuş veya sınırlı adli numune örnekleri gibi mevcut teknolojilerin temel teknik sınırlamalarından kaçınırken NGS'nin adli bilimlerde potansiyel kullanımlarını hayal etmek zor değildir. InDeller ve SNP'ler, insan genomunun neredeyse yarısını ve STR'ler yalnızca %15'ini kaplamasına rağmen fazla çalışılmamıştır (23). Bunun nedeni, pyrosequencer'ların adli genetikte kullanılan STR lokuslarını dizilemek için yeterli okuma uzunluğuna sahip tek platform olması ve bugüne kadar NGS STR verileriyle adli çalışmaların çoğunun pyrosequencing teknolojisi ile yapılmış olmasıdır (23).

Adli DNA dizilemesi, 2011 yılına kadar, degrede DNA örneklerde kimliklendirme ve soy bağının incelenmesinde mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) hiperdeğişken bölgesinde kullanılmıştır (207). Son yıllarda NGS kullanılması, adli analizlerde çok sayıda iyileştirme sağlamıştır. Bu iyileştirmelerden biri, STR çekirdek biriminde bulunan hem tekrar sayısını hem de dizi polimorfizmlerini tanımlayabilmesidir. Daha fazla tanımlanabilir aleller, STR araştırmasının daha fazla istatistiksel ayrım gücü anlamına gelir. NGS, örneğin STR'ler, SNP'ler ve InDels markırlarının aynı anda bir bir arada çalışılmasını sağlar. Bazı genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, soy ve EVC özelliklerini tahmin edebilen SNP'leri tanımlamıştır. Ayrıca, NGS ile çok sayıda SNP'nin paralel genotiplenmesi ile az miktarda veya bozulmuş DNA ile başarılı bir şekilde genotip eldesi mümkündür (12).

Oxford Nanopore MinION dizileme teknolojisi ise diğer NGS platformalarından farklı olarak üçüncü nesil yeni nesil dizileme olarak tanımlanmakta hem maliyet hem de hız olarak diğer sistemlere göre büyük avantaj sağlamaktadır. Adli genetik çalışmalarına bakıldığında Oxford Nanopore MinION dizileme teknolojisi ile henüz geliştirilmiş bir ticari kit bulunmamakla beraber yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde sadece 14 STR lokusu çalışılmış, diğer bir çalışmada tri-allelik SNP bölgeleri tespit edilmeye çalışılmıştır (16,26). Aynı araştırma grubunun diğer bir çalışmasında ise kimliklendirme ile ilgili bilgi veren 52 SNP bölgesinin analizi yapılmıştır (26). Bundan başka bir çalışmada ise 58 STR ve 94 SNP lokusu bir R10.3 akış hücresi kullanılarak nanopor dizilemesi yapılmıştır (198). Vasiljevic ve ekibinin yaptığı bir çalışmada ise NGSpeciesID ile tür tanımlama çalışması adli bilimler alanında yapılmıştır (199). Bu çalışmalarda elde edilen deneyimler sonucunda bu teknolojinin adli bilimlerde uygulanabilir olduğu belirtilmiştir (26).

Bu çalışmada tek bir iş akışında fenotipe (göz, saç ve ten rengi) ait bilgi veren 41 SNP markırından oluşan bir NGS panelinin Oxford Nanopore dizileme ile test edilmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmada 4 tane referans DNA örneği (2800M, 9947A, K562 ve

Taqman) kullanılmış ve 34 primer çifti ile 41 SNP hedeflenmiştir. Hedeflenen lokusların PCR ürünlerinin boyutları 100-170 bç aralığında değişmektedir. Baz tanımlama işleminin yapılabilmesi için fragman boyutunun en az 100 bç olması gerekmektedir (26). Aynı zamanda, uzun okumaların daha iyi kalitede sonuçlar verdiği rapor edilmiştir (218-220). Oxford Nanopore Technologies'in yayınladığı bir raporda ise nükleotid varyantlarının (Copy Number Variation, CNV) uzun okumalarda kısa okumalara göre daha kaliteli sonuçlar verdiği rapor edilmiştir (218). En kısa fragman boyutunun sınırda olması, SNP çalışılacağı için kaliteli okumalara ihtiyaç olması, uzun okumaların daha kaliteli sonuçlar vermesi ve daha fazla veri elde edip karşılaştırma sonucu doğru yöntemin tespit edilmesi için örnekler hem ligasyonlu hemde ligasyonsuz çalışılmıştır. Yapılan çalışmadan çıkan sonuçlar KE ile karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda ligasyon işleminin ve nano gözenek sayısının SNP tespiti üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda adaptör bağlanması işleminden önce ligasyonlu ve ligasyonsuz örneklerin DNA miktarı ölçüldü ve herbirinden eşit miktarda DNA alınıp adaptör bağlama işlemine geçildi. Buna rağmen, dizileme sonucu çıkan sonuçlar göz önüne alındığında, ligasyonsuz örneklerden toplamda 108.084 fragman dizilenmiş ve ortalama fragman uzunluğu 130,4 olarak tespit edilmiştir. Ligasyon işlemi uygulanmış örneklerde ise toplamda 292.466 fragman dizilenmiş ve bu örneklerin ortalama fragman uzunluğu 553,8 olarak tespit edilmiştir. Ligasyon işlemi yapılmış örneklerin fragman ayrım işleminden sonra toplamda 1.817.076 dizilenmiş fragman elde edilmiştir. Buradan ligasyon işleminin tek yürütmede nano gözenekten geçen DNA fragman saysını yaklaşık 3 kat (292.466 = 2,7 x 108.084) arttırdığı ve çıktı olarak da elde edilen dizilenmiş DNA fragman sayısını ise yaklaşık 6 kat (1.817.076 = 6,2 x 292.466) daha artırdığı söylenebilir. Aynı zamanda, ligasyon işlemine uğramamış fragman çıktı sayısı ile karşılaştırıldığında, ligasyon işlemi dizileme sonucu elde edilen DNA fragman sayısını yaklaşık 17 kat (1.817.076 = 16,7 x 108.084) artırmıştır.

Ligasyonlu örneklerin dizilenen fragmanların %79,7'si, ligasyonsuz örneklerin %81,9' u referans genoma haritalanmıştır. Buradan Oxford Nanopore ile dizilemenin %80 oranında verim ile okuma yaptığı sonucuna ulaşılabilir. Bundan başka, filtreleme işleminde sadece boyut parametre olarak alınmıştır. Filtreleme işleminde kalite skoru (Phred skoru) minimum 10 (en fazla %10 hata oranına izin verildiğinde) alındığında, 2800M örneğinden 118, 2800M-L örneğinden 5, 9947A örneğinden 190, 9947A-L örneğinden 183, K562 örneğinden 119, K562-L örneğinden 171, Taqman örneğinden 120 ve Taqman-L örneğinden 22 tane kullanılabilir fragman kalmıştır. Oxford Nanopore ile dizilemenin yüksek hatalı okuma çıktısı bu durumun temel nedenidir.

Illumina ile yapılan bir çalışmada 15 kapsam değeri SNP için uygun olarak gösterilmiş başka bir çalışmada ise bu değer Nanopore dizileme için 20 olarak tespit edilmiştir (208,209). Bu çalışamalar göz önüne alınarak genotipleme işleminde 20 kapsam değeri altında kalan değerler alel düşmesi olarak değerlendirilmiştir.

Nanopore dizileme ile elde edilen gentoiplerin kapiler elektroforez sonuçları ile karşılaştırılması sonucunda toplamda tüm örneklerin genotipleri alel düşmesi dâhil edilmeksizin %60 oranında doğru tespit edilmiştir. Kapsam değeri düşüklüğü nedeni ile alel düşmesi olarak sonuçlandırılan lokuslarda eklenirse toplam %77 oranında doğru genotiplendirme Nanopore dizileme sonucu ile elde edilmiştir. Bütün örneklerde ortak iki alelde (rs12821256 ve rs312262906) düşme görülmüştür. Yapılan bir çalışmada rs12821256 için az DNA miktarının düşük PCR verimine ve dolayısyla alel düşmesine sebep olabileceği rapor edilmiştir (210). Başka bir çalışmada ise genotip elde edilmesine rağmen rs12821256 en düşük kapsam değerinde bulumuştur (211). Bu nedenle rs12821256 SNP hedefinin alel düşmesine düşük PCR verimi neden olabilir. Her adım sonunda boncukla saflaştırma yapıldığı için PCR sonrasında elde edilen DNA miktarının yaklaşık %80'i kaybedilmiştir. Bu nedenle düşük PCR verimi ve saflaştırma kayıpları hesaba katıldığında rs12821256

alelinin adaptör bağlanmasından önce veya sonrasındaki saflaştırma işleminde tamamen kaybedildiği sonucuna varılabilir. Bu alelin sonraki çalışmalarda primer yoğunluğu arttırılarak alel düşmesinin önüne geçilebilir.

HIrisPlex panelinin optimizasyonu ve validasyonu çalışmasında ve West Virginia Üniversitesinde HIrisPlex ile yapılan NGS konulu tez çalışmasında N29insA (rs312262906) için alel düşmesi durumlarının sık yaşandığı bunun InDel varyantlarının bir problemi olduğu vurgulanmıştır (212, 213). Tüm örneklerin alel düşmesi PCR verimi düşüklüğü ve çok sayıda saflaştırma işlemi uygulanması ile açıklanabilir.

2800M-L örneğinde Nanopore dizileme ile elde edilen rs2402130 ve rs6497292 alelleri kapiler elektroforez ile elde edilen genotipler ile karşılaştırıldığında yanlış genotiplendirilmiştir. Bu aleller 2800M örneğinde ise doğru genotiplendirilmiştir Bu alellerin kapsam değerleri sırası ile 558 ve 860'tır. 2800M-L örneğinde rs2402130 ve rs6497292 alelinin yanlış genotiplendirilmesinin nedeni yukarıda ifade edildiği gibi, hata oranının yüksek olmasıdır. %10'dan daha yüksek hata oranı ile devam edildiğinde bazı SNP hedeflerinin yanlış tespit edilmesi mümkündür.

Kapiler elektroforez sonuçları ile karşılaştırıldığında 9947A örneğinde 1 tane yanlış genotiplendirme (rs12896399) mevcuttur. rs12896399 alelinin kapsam değeri 508 olarak tespit edilmiştir. Yanlış genotiplendirilmesinin nedeni Nanopore ile dizilemenin yüksek hata oranıdır. 9947A-L örneğinde rs1042602, rs12203592, rs12896399, rs12913832, rs2402130 ve rs6497292 alelleri kapiler elektroforez sonuçlarına göre yanlış genotiplendirilmiştir. Bunların kapsam değerleri sırası ile 2119, 46122, 13469, 495, 10293 ve 12081'dir. rs12203592 ve rs12913832 alelleri 9947A örneğinde doğru tespit edilmiştir ve kapsam değeri sırası ile 409 ve 43'tür. rs12203592 ve rs12913832 alellerinin 9947A örneğinde yanlış tespiti artan kapsam değerinden dolayı daha fazla hatalı okumanın dâhil edilmesidir.

Alellerin 9947A-L örneğinde kapsam değerleri çok yüksektir. Aynı zamanda bu allelerin hepsi diğer örneklerde doğru genotiplendirilmiştir. Dizileme bölgesinde homopolimerik yapı içeren aleller rs12203592, rs12896399'dur. Homopolimerik yapının dizi kalitesini negatif yönde etkilediği rapor edilmiştir (214). rs1042602, rs2402130 ve rs6497292, 99447A örneğinde alel düşmesi nedeni ile genotiplendirilememiştir. Bu 6 alelin yanlış genotiplendirilmesi ne homopolimerik yapı ve yüksek hata oranı neden olmuştur.

K562 örneğinde rs1129038, rs1805007 ve rs8051733 alleleri kapiler elektroforez sonuçları ile karşılaştırıldığında yanlış genotiplendirilmiştir. Bu alelerin kapsam değerleri sırası ile 136, 1079 ve 144'tür. Yanlış genotiplendirme yüksek hata oranı ile açıklanabilir. K562-L örneğinde rs1129038, rs12913832, rs1805007, rs3114908, rs6059655 ve rs8051733 alelleri yanlış genotiplendirilmiştir. Bu alelerin kapsam değerleri sırası ile 309, 104, 8890, 1771, 6051 ve 1069'dur. rs12913832 aleli K562 örneğinde alel düşmesi olduğu için genotiplendirilememiştir. rs3114908 ve rs605965 alelleri ise K562 örneğinde doğru genotiplendirilmiştir. Ligasyon ile artan kapsam değeri ve bunun sonucu olarak Nanopore dizilemenin hata oranın etkisinin artması bu duruma sebep olmuştur.

Taqman örneğinde rs6059655 aleli kapiler elektroforez sonuçlarına göre yanlış genotiplendirilmiştir ve kapsam değeri 5633 olarak tespit edilmiştir. Taqman-L örneğinde ise rs6059655 ve rs6119471 alelleri yanlış genotiplendirilmiştir ve kapsam değerleri sırası ile 1657 ve 10077 olarak tespit edilmiştir. rs6119471 alelli Taqman örneğinde alel düşmesi ile sonuçlanmıştır. Nanopore yüksek hata oranı bu genotiplendirmeye sebep olmuştur. Ligasyonlu örneklerde kapsam değeri arttığı için (ligasyon işleminin kapsam değeri üzerinde istatistiksel olarak etkilidir) ligasyonlu örneklerde ligasyonsuz örneklere nazaran daha fazla hatalı alel vermesi beklenebilir.

Toplam kapsam değerinin ligasyonlu örneklerde çok daha fazla olduğu sonuçlardan açıkça görülür. Yukarıdaki sonuçlardan açıkça görülebileceği gibi ligasyon yapılmış örneklerden 1.817.076 sayıda fragman elde edilirken ligasyon yapılmamış örneklerden 108.084 fragman elde edilmiştir. Ligasyon işlemi dizileme sonucu elde edilen çıktıyı ayrımdan sonra yaklaşık 6 kat daha artırabilir. Daha yüksek kapsam daha güvenilir sonuç anlamına gelsede, Nanopore dizilemenin yüksek hata oranından dolayı ligasyon işlemi daha fazla hatalı okumayı dâhil edeceğinden yanlış genotiplendirmelere neden olabilir. Minimum 20X kapsam değeri genotiplendirme için yeterli olsada, yüksek hata oranı güvenilirliği ciddi bir şekilde etkilemektedir. 41 SNP hedefi için 20X kapsam değeri baz alındığı, elde edilen çıktının %80'i kullanıldığı ve tüm hedeflerin PCR ürünlerinin eşit sayıda olduğu düşünlürse, teorik olarak minimum 984 fragman 41 aleli genotiplendirme için yeterli olacaktır. Yalnız pratikte durum böyle değildir. Örneğin, 2800M örneğinde rs1800407 alelinin kapsam değeri 1170 olmasına rağmen elde edilen genotip yanlıştır. Akış hücresinin yıkanıp tekrar kullanılması elde edilen kapsam değerinin ortalamasını çok aşağı indirmemektedir. Örneğin Taqman-L örneği akış hücresinin yıkanmasından sonra yürütülmesine rağmen alel başına 4491 ortalama kapsam değerine sahiptir ki bu teoride 41 SNP için gerekli fragman sayısının 4 katıdır. Genotiplendirme hatalarının temel nedeni Nanopore dizilemenin yüksek hata oranı ile okuma yapmasıdır. Baz kalitesi 5'e (5 = -10xlog10(P), P = 1/101/2) yani hata oranı her üç bazda bire dahi indirgendiğinde, filtreleme sonucu fragmanların %5-15 arası kalmaktadır. Buradan Nanopore ile dizilemenin hata oranının ne kadar yüksek olduğu görülebilir.

Adli bilimlerde Nanopore dizileme ile SNP genotiplemesi yapılmış 4 çalışma Bulunmaktadır. Bu çalışmaların hiç birinde HIrisPlex-S paneli çalışılmamıştır. HIrisPlex-S paneli ile Nanopore dizileme ilk kez bu tez çalışmasında yapılmıştır.

Bu çalışmalardan birinde SNPforID konsorsiyumu tarafından belirlenmiş ve 52 lokustan oluşan kimliklendirme SNP'leri Nanopore dizileme ile 2D (çift yönlü) dizilenmiş

ve 51 SNP hedefi doğru olarak genotiplenmiştir (26). Öncelikle bahsedilen çalışma ile bu tez çalışmasının en temel farkı, farklı SNP panellerinin kullanılmış olmasıdır. Bundan başka, laboratuvar aşamaları ve biyoinformatik analizleri benzer olmakla beraber bazı ciddi farklılıklar mevcuttur. İlk olarak, dizileme yönteminde 2D (çift yönlü) metod izlenmiştir (26). Bu yöntemde DNA fragmanlarına adaptör bağlama aşamasında aynı zamanda saç tokası yapısıda takılarak DNA'nın her iki zinciri nano gözenekten geçirilir ve sonuç olarak ileri geri okuma ile elde edilen kalite skoru daha yüksek olur (221). Bundan başka, baz tanımlama işlemlerinde Guppy kullanılmamış, bunun yerine Methicore bulut sisteminde 2D baz tanımlama işlemine sahip farklı bir program ile baz tanımlama yapılmıştır (26).

Başka bir çalışmada ise 16 SNP hedefi Nanopore dizileme ile $1D^2$ (çift yönlü) yöntemi ile dizilenmiş ve %98 doğru genotipleme elde edilmiştir (222). Yapılan çalışma ile bu tez çalışması arasında farklı panellerin kullanılması, $1D^2$ (çift yönlü) okuma yapılması ve Guppy yerine Albacore baz tanımlama programının kullanılması temel farklılıklar olarak gösterilebilir (222).

Diğer iki çalışmada ise 58 STR ve 94 SNP lokusuna sahip Verogen's ForenSeq DNA Signature Prep kiti çalışılmış ve %99 doğru genotipleme elde edildiği rapor edilmiştir (198, 223). Her iki çalışmada kullanılan kit içeriğindeki 94 SNP lokusu kimliklendirme için kullanılmaktadır (224). Çalışmalardan biri farklı akış hücresi (R10.3) kullanmıştır (198). Bundan başka, ligasyon işlemi yapılmamış ve farklı biyoinformatik yöntemler izlenmiştir (198, 223).

Yukarıda bahsi geçen çalışmalar ve bu tez çalışması göz önüne alındığında ciddi laboratuvar yöntemleri ve biyoinformatik analiz yöntem farklılığı mevcuttur. Bu farklılıkların ve özellikle farklı SNP panellerinin kullanılması dikkate alındığında doğru genotipleme oranının farklı olması normaldir.

Sonuçlarımız, yüksek hata oranına rağmen, Minion'un son derece uzun okumalar üretebildiğini, yüksek kapsam değeri verdiğini ve tek bir okumada ilgili bölgeleri içerebildiğini gösteriyor. Yüksek hata oranının yanı sıra, Minion'un bu çalışmada hedeflenen alellerle ilgili olası zorluklarının da cihaz yaygın kullanıma sunulmadan önce ele alınması gerekecektir. Yüksek hassasiyet tüm uygulamalar için şart değildir, ancak adli bilimlerde çok önemlidir. Spesifik çalışmalar için, 25 düşük doğruluklu (>%85) tek moleküllü uzun okuma dizisi bir fark yaratmak için yeterli olabilir, ancak alanımızda verilerimizden emin olmak için yüksek doğruluğa ihtiyacımız var. Bu çalışmada sunulan sonuçların dizi okumalarının daha iyi ayarlanması ve düzeltme araçlarında gelecekteki iyileştirmeler için rehberlik sağlayacağını umuyoruz.

6. KAYNAKLAR

1- Petterson E, Lundeberg J, Ahmadian A. Generations of Sequencing Technologies. Genomics, 2009;93(2):105-11.

2- Reilly, P. Legal and public policy issues in DNA forensics. Nature Reviews Genetics 2, 313–317 (2001) doi:10.1038/35066091

3- Gill, P., Jeffreys, A.J., Werrett, D.J., 1985. Forensic application of DNA "fingerprints". Nature 318, 577e579.

4- Jeffreys, A.J., Brookfield, J.F., Semeonoff, R., 1985. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. Nature 317, 818e819.

5- Jeffreys, A., 1985. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. Nature 316, 4.

6- Witkowski JA. Milestones in The Development of DNA Technology. In "Forensic DNA Technology" Ed. Farley MA and Harrington JJ. Lewis Publishers. 1991; p. 10–17.

7- J.M. Butler, 2012 "Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology", http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374513-2.00005-1.

8- Butler, J.M. 2006 "Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing" Journal of Forensic Science, 51, 253-265.

9- Børsting C., Fordyce SL., Olofsson J., Mogensen HS., Morling N. 2014 "Evaluation of the Ion Torrent™ HID SNP 169-plex: A SNP typing assay developed for human identification by second generation sequencing" Forensic Science International Genetics , 12 ,144-54.

10- Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. 2014 "Ten Years of Next-Generation Sequencing Technology" Trends Genet, 30(9), 418-26.

11- Budowle, Bruce, ve Angela van Daal. "Forensically relevant SNP classes". *BioTechniques*, c. 44, sy 5, Nisan 2008, ss. 603-10. *future-science.com (Atypon)*, https://doi.org/10.2144/000112806.

12- Kayser M., de Knijff P. 2011 "Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology" Nature Reviews Genetics, 12, 179.

13- Walsh S., Liu F., Wollstein A., Kovatsi L., Ralf A., Kosiniak-Kamysz A., Branicki W., Kayser M. 2013 "The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA" Forensic Science International: Genetics, 7, 98-115

14- Walsh S., Chaitanya L., Clarisse L., Wirken L, Draus-Barini J., Kovatsi L ve ark. 2014 "Developmental validation of the HIrisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage" Forensic Science International: Genetics, 9, 150-161

15- Yang Y, Xie B, Yan J. Application of next-generation sequencing technology in forensic science. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2014;12(5):190-7.

16- Cornelis S., Willems S., Neste C. V., Tytgat O., Weymaere J., Plaetsen A. V. ve ark., 2018 "Forensic STR profiling using Oxford Nanopore Technologies' MinION sequencer" bioRxiv 433151; doi: https://doi.org/10.1101/433151.

17- Daniel, R., Santos, C., Phillips, C., Fondevila, M., van Oorschot, R.A. ve ark, 2015 "A SNaPshot of next generation sequencing for forensic SNP analysis" Forensic Science International Genetics 14, 50-60.

18- Jäger A. C., Alvarez M. L., Davis C. P., Guzmán E., Han Y., Way L., Bruand J. 2017 "Developmental validation of the MiSeq FGx forensic genomics system for targeted next generation sequencing in forensic DNA casework and database laboratories" Forensic Science International:Genetics, 28, 52–70. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.01.011.

19- Bentley, David & Balasubramanian, Shankar & Swerdlow, Harold & Smith, Geoffrey & Milton, John & Brown ve ark. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. Nature. 456.

20- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M. ve ark. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature, 475(7356), 348–352. https://doi.org/10.1038/nature10242

21- Plesivkova D, Richards R, Harbison S. A review of the potential of the MinION™ singlemolecule sequencing system for forensic applications. WIREs Forensic Sci. 2019;1:e1323. https://doi.org/10.1002/wfs2.1323

22- Bruijns B., Tiggelaar R., Gardeniers H. 2018 "Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review" Electrophoresis, 39, 2642–2654. https://doi.org/10.1002/elps.20180008

23- Alvarez-Cubero M. J., Saiz M., Martínez-García B., Sayalero S. M., Entrala C., Lorente J. A., Martinez-Gonzalez L. J. 2017 "Next generation sequencing: an application in forensic sciences" Annals of Human Biology, 44, 581-592, DOI: 10.1080/03014460.2017.1375155

24- Rhoads, A., & Au, K. F. (2015). PacBio sequencing and its applications. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 13(5), 278–289. https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002

25- Quick, J., Loman, N., Duraffour, S. et al. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. Nature 530, 228–232 (2016). https://doi.org/10.1038/nature16996

26- Cornelis, Senne & Gansemans, Yannick & Deleye, Lieselot & Deforce, Dieter & Nieuwerburgh, Filip. (2017). Forensic SNP Genotyping using Nanopore Sequencing.

27- Jeffreys AJ, Brookfield JFY, Semeonoff R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. Nature. 1985;317(6040):818–819.

28- Seton C. Life for sex killer who sent decoy to take genetic test. The Times. January 23, 1988.

29- Linacre A, Templeton JEL. Forensic DNA profiling: state of the art. Research and Reports in Forensic Medical Science. 2014;4:25-36 https://doi.org/10.2147/RRFMS.S60955

30- Goodwin W, Linacre A, Hadi S. An Introduction to Forensic Genetics. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell; 2011.

31- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985b) Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. Nature 314:67–74

32- Imam J., Shrivastava P., Dixit S., Shrivastava A. (2018) Future of DNA Fingerprinting: Application of NGS in Forensic Science. In: Dash H., Shrivastava P., Mohapatra B., Das S. (eds) DNA Fingerprinting: Advancements and Future Endeavors. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1583-1_15

33- A.J. Jeffreys, M.J. Allen, E. Hagelberg, A. Sonnberg, Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis, Forensic Sci. Int. 56 (1992) 65–76.

34- P. Gill, P.L. Ivanov, C. Kimpton, R. Pierey, N. Benson, G. Tully, I. Evett, E. Hagelberg, K. Sullivan, Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis, Nat. Genet. 6 (1994) 130–135.

35- Academies NRCotN. Strengthening Forensic Science in the United States: A Path Forward. Washington, DC: National Academies Press; 2009.

36- J.M. Butler, Fundamentals of Forensic DNA Typing (2010), 10.1016/B978-0-12-374999-4.00016-3

37- Coble MD, Butler JM. Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. J Forensic Sci. 2005 Jan;50(1):43-53. PMID: 15830996.

38- L.A. Dixon, A.E. Dobbins, H.K. Pulker, J.M. Butler, P.M. Vallone, M.D. Coble ve ark. Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs—results of a collaborative European (EDNAP) exercise, Forensic Science International, Volume 164, Issue 1, 2006, Pages 33-44, ISSN 0379-0738, https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.11.011.

39- Mulero, J.J., Chang, C.W., Lagacé, R.E., Wang, D.Y., Bas, J.L., McMahon, T.P. and Hennessy, L.K. (2008), Development and Validation of the AmpFℓSTR® MiniFilerTM PCR Amplification Kit: A MiniSTR Multiplex for the Analysis of Degraded and/or PCR Inhibited DNA. Journal of Forensic Sciences, 53: 838-852. https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00760.x

40- Luce, C., Montpetit, S., Gangitano, D. and O'Donnell, P. (2009), Validation of the AMPFℓSTR® MiniFilerTM PCR Amplification Kit for Use in Forensic Casework. Journal of Forensic Sciences, 54: 1046-1054. https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01099.x

41- Phillips C. Application of Autosomal SNPs and Indels in Forensic Analysis. Forensic Sci Rev. 2012 Jan;24(1):43-62. PMID: 26231357.

42- J.L. Weber, D. David, J. Heil, Y. Fan, C. Zhao, G. Marth, Human diallelic insertion/deletion polymorphisms, Am. J. Hum. Genet., 71 (2002), pp. 854-862, 10.1086/342727

43- J.J. Sanchez, C. Børsting, K. Balogh, B. Berger, M. Bogus, J.M. Butler ve ark. Forensic typing of autosomal SNPs with a 29 SNP-multiplex--results of a collaborative EDNAP exercise, Forensic Sci. Int. Genet., 2 (2008), pp. 176-183, 10.1016/j.fsigen.2007.12.002

44- Phillips C. Using online databases for developing SNP markers of forensic interest. Methods Mol Biol. 2005;297:83-106. doi: 10.1385/1-59259-867-6:083. PMID: 15570102.

45- Butler, J.M., Coble, M.D. & Vallone, P.M. STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. Forensic Sci Med Pathol 3, 200–205 (2007). https://doi.org/10.1007/s12024-007-0018-1

46- B. Budowle, A. van Daal, Forensically relevant SNP classes, Biotechniques., 44 (2008), pp. 603-608, 10.2144/000112806610

47- Babol-Pokora K, Berent J. SNP-minisequencing as an excellent tool for analysing degraded DNA recovered from archival tissues. Acta Biochim Pol. 2008;55(4):815-9. Epub 2008 Nov 4. PMID: 18985176.

48- A. Freire-Aradas, M. Fondevila, A.-K. Kriegel, C. Phillips, P. Gill, L. Prieto, P.M. Schneider, Á. Carracedo, M.V. Lareu, A new SNP assay for identification of highly degraded human DNA, Forensic Sci. Int. Genet., 6 (2012), pp. 341-349, 10.1016/j.fsigen.2011.07.010

49- H. Brown, R. Thompson, G. Murphy, D. Peters, B. La Rue, J. King ve ark. Development and validation of a novel multiplexed DNA analysis system, InnoTyper® 21, Forensic Sci. Int. Genet., 29 (2017), pp. 80-99, 10.1016/j.fsigen.2017.03.017

50- Sanchez, J.J., Phillips, C., Børsting, C., Balogh, K., Bogus, M., Fondevila ve ark. (2006), A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. ELECTROPHORESIS, 27: 1713-1724. https://doi.org/10.1002/elps.200500671

51- Kenneth K. Kidd, Andrew J. Pakstis, William C. Speed, Elena L. Grigorenko, Sylvester L.B. Kajuna, Nganyirwa J. Karoma ve ark. Developing a SNP panel for forensic identification of individuals, Forensic Science International, Volume 164, Issue 1, 2006, Pages 20-32, ISSN 0379-0738, https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.11.017.

52- Pakstis, A.J., Speed, W.C., Kidd, J.R. et al. Candidate SNPs for a universal individual identification panel. Hum Genet 121, 305–317 (2007). https://doi.org/10.1007/s00439-007-0342-2

53- Pakstis, A.J., Speed, W.C., Fang, R. et al. SNPs for a universal individual identification panel. Hum Genet 127, 315–324 (2010). https://doi.org/10.1007/s00439-009-0771-1

54- LaRue, B.L., Ge, J., King, J.L. et al. A validation study of the Qiagen Investigator DIPplex® kit; an INDEL-based assay for human identification. Int J Legal Med 126, 533–540 (2012). https://doi.org/10.1007/s00414-012-0667-9

55- C. Phillips, M. Fondevila, M. García-Magariños, A. Rodriguez, A. Salas, Á. Carracedo ve ark Resolving relationship tests that show ambiguous STR results using autosomal SNPs as supplementary markers, Forensic Sci. Int. Genet., 2 (2008), pp. 198-204, 10.1016/j.fsigen.2008.02.002

56- C. Børsting, J.J. Sanchez, H.E. Hansen, A.J. Hansen, H.Q. Bruun, N. Morling, Performance of the SNPforID 52 SNP-plex assay in paternity testing, Forensic Sci. Int. Genet., 2 (2008), pp. 292-300, 10.1016/j.fsigen.2008.03.007

57- Børsting, C. and Morling, N. (2012), Reinvestigations of six unusual paternity cases by typing of autosomal single-nucleotide polymorphisms. Transfusion, 52: 425-430. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03260.x

58- Schneider P, M: Beyond STRs: The Role of Diallelic Markers in Forensic Genetics. Transfus Med Hemother 2012;39:176-180. doi: 10.1159/000339139

59- Phillips C, García-Magariños M, Salas A, Carracedo Á, Lareu M, V: SNPs as Supplements in Simple Kinship Analysis or as Core Markers in Distant Pairwise Relationship Tests: When Do SNPs Add Value or Replace Well-Established and Powerful STR Tests? Transfus Med Hemother 2012;39:202-210. doi: 10.1159/000338857

60- Kidd, J.R., Friedlaender, F.R., Speed, W.C. et al. Analyses of a set of 128 ancestry informative single-nucleotide polymorphisms in a global set of 119 population samples. Investig Genet 2, 1 (2011). https://doi.org/10.1186/2041-2223-2-1

61- Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, Santos SEBd, et al. (2012) Straightforward Inference of Ancestry and Admixture Proportions through Ancestry-Informative Insertion Deletion Multiplexing. PLOS ONE 7(1): e29684. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029684

62- Phillips C., Fondevila M., Lareau M.V. (2012) A 34-plex Autosomal SNP Single Base Extension Assay for Ancestry Investigations. In: Alonso A. (eds) DNA Electrophoresis Protocols for Forensic Genetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 830. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-461-2_8

63- K.K. Kidd, W.C. Speed, A.J. Pakstis, M.R. Furtado, R. Fang, A. Madbouly ve ark Progress toward an efficient panel of SNPs for ancestry inference, Forensic Sci. Int. Genet., 10 (2014), pp. 23-32, 10.1016/j.fsigen.2014.01.002

64- Phillips, Chris. "Forensic Genetic Analysis of Bio-Geographical Ancestry". *Forensic Science International. Genetics*, c. 18, Eylül 2015, ss. 49-65. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.012.

65- M. Kayser, Forensic DNA Phenotyping: predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes, Forensic Sci. Int. Genet., 18 (2015), pp. 33-48, 10.1016/j.fsigen.2015.02.003

66- Turnpenny, P.D. and Ellard, S. (2005) Emery's Elements of Medical Genetics (12th Edition). Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, 203-225, 364-366.

67- McKiernan, H. E., ve P. B. Danielson. "Chapter 21 - Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science". Molecular Diagnostics (Third Edition), editör George P. Patrinos, Academic Press, 2017, ss. 371-94. ScienceDirect, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802971-8.00021-3.

68- Collins JR, Stephens RM, Gold B, Long B, Dean M, Burt SK. An exhaustive DNA micro-satellite map of the human genome using high performance computing. Genomics. 2003 Jul;82(1):10-9. doi: 10.1016/s0888-7543(03)00076-4. PMID: 12809672.

69- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A., & Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. American journal of human genetics, 49(4), 746–756.

70- Subramanian, S., Mishra, R.K. & Singh, L. Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. Genome Biol 4, R13 (2003). https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-2-r13

71- Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. Nucleic Acids Res. 1996 Jul 15;24(14):2807-12. doi: 10.1093/nar/24.14.2807. PMID: 8759015; PMCID: PMC146018.

72- Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y, Budowle B. The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems. Electrophoresis. 1999 Jun;20(8):1682-96. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19990101)20:8<1682::AID-ELPS1682>3.0.CO;2-Z. PMID: 10435432.

73- Bacher, J., Hennes, L.F., Gu, T., Tereba, A., Micka, K.A., Sprecher, C.J., Lins ve ark. 1999. Pentanucleotide repeats: highly polymorphic genetic markers displaying minimal stutter artifact. In: Proceedings from the Ninth International Symposium on Human Identification.

74- Bacher, J., vd. Development of Highly Polymorphic Pentanucleotide Tandem Repeat Loci with Low Stutter By. 2001

75- Budowle, B., Moretti, T.R., Niezgoda, S.J., Brown, B.L., 1998. Codis and PCR-based Short Tandem Repeat Loci: Law Enforcement Tools. Second European Symposium on Human Identification. Promega Corporation, Madison, Wisconsin, pp. 73-88.

76- Gill P, Brenner C, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Jobling MA ve ark. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs. Forensic Sci Int. 2001 Dec 15;124(1):5-10. doi: 10.1016/s0379-0738(01)00498-4. PMID: 11741752.

77- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG ve ark. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. Nature. 2003 Jun 19;423(6942):825-37. doi: 10.1038/nature01722. PMID: 12815422.

78- Kayser M. The Human Y-Chromosome - Introduction into Genetics and Applications. Forensic Sci Rev. 2003 Jul;15(2):77-89. PMID: 26256726.

79- Schneider PM, Meuser S, Waiyawuth W, Seo Y, Rittner C. Tandem repeat structure of the duplicated Y-chromosomal STR locus DYS385 and frequency studies in the German and three Asian populations. Forensic Sci Int. 1998 Oct 12;97(1):61-70. doi: 10.1016/s0379-0738(98)00146-7. PMID: 9854841.

80- Ayub Q, Mohyuddin A, Qamar R, Mazhar K, Zerjal T, Mehdi SQ, Tyler-Smith C. Identification and characterisation of novel human Y-chromosomal microsatellites from sequence

database information. Nucleic Acids Res. 2000 Jan 15;28(2):e8. doi: 10.1093/nar/28.2.e8. PMID: 10606676; PMCID: PMC102540.

81- Schmidtke J, Kühnau W, Wand D, Edelmann J, Szibor R, Krawczak M. Prenatal exclusion without involving the putative fathers of an incestuous father-daughter parenthood. Prenat Diagn. 2004 Aug;24(8):662-4. doi: 10.1002/pd.929. PMID: 15305361.

82- Diegoli TM, Coble MD. Development and characterization of two mini-X chromosomal short tandem repeat multiplexes. Forensic Sci Int Genet. 2011 Nov;5(5):415-21. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.08.019. Epub 2010 Oct 13. PMID: 20943451.

83- Diegoli TM, Linacre A, Coble MD. Population genetic data for 15 X chromosomal short tandem repeat markers in three U.S. populations. Forensic Sci Int Genet. 2014 Jan;8(1):64-7. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.07.008. Epub 2013 Sep 7. PMID: 24315590.

84- Greenberg BD, Newbold JE, Sugino A. Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. Gene. 1983 Jan-Feb;21(1-2):33-49. doi: 10.1016/0378-1119(83)90145-2. PMID: 6301949.

85- Satoh M, Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. Exp Cell Res. 1991 Sep;196(1):137-40. doi: 10.1016/0014-4827(91)90467-9. PMID: 1715276.

86- Bogenhagen D, Clayton DA. The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. J Biol Chem. 1974 Dec 25;249(24):7991-5. PMID: 4473454.

87- Allen M, Engström AS, Meyers S, Handt O, Saldeen T, von Haeseler A, Pääbo S, Gyllensten U. Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. J Forensic Sci. 1998 May;43(3):453-64. PMID: 9608683.

88- Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. J Cell Physiol. 1988 Sep;136(3):507-13. doi: 10.1002/jcp.1041360316. PMID: 3170646.

89- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nat Genet. 1999 Oct;23(2):147. doi: 10.1038/13779. PMID: 10508508.

90- Karafet TM, Mendez FL, Meilerman MB, Underhill PA, Zegura SL, Hammer MF. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. Genome Res. 2008 May;18(5):830-8. doi: 10.1101/gr.7172008. Epub 2008 Apr 2. PMID: 18385274; PMCID: PMC2336805.

91- Phillips C, Fang R, Ballard D, Fondevila M, Harrison C, Hyland F ve ark. SNPforID Consortium. Evaluation of the Genplex SNP typing system and a 49plex forensic marker panel. Forensic Sci Int Genet. 2007 Jun;1(2):180-5. doi: 10.1016/j.fsigen.2007.02.007. Epub 2007 Mar 23. PMID: 19083752.

92- 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 Sci Int. 2005 Nov 10;154(1):62-77. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.12.011. Epub 2005 Jan 20. PMID: 16182950.

93- Westen AA, Matai AS, Laros JF, Meiland HC, Jasper M, de Leeuw WJ, de Knijff P, Sijen T. Tri-allelic SNP markers enable analysis of mixed and degraded DNA samples. Forensic Sci Int Genet. 2009 Sep;3(4):233-41. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.02.003. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19647708.

94- Butler, J. M., Budowle, B., Gill, P., Kidd, K. K., Phillips, C., Schneider, P. M., Vallone, P. M., & Morling, N. (2008). Report on ISFG SNP Panel Discussion. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 1(1), 471-472. https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2007.10.159

95- Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, Morling N, Parsons TJ, Sajantila A ve ark. International Society for Forensic Genetics. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). Forensic Sci Int Genet. 2007 Mar;1(1):3-12. doi: 10.1016/j.fsigen.2006.10.003. Epub 2006 Nov 28. PMID: 19083722.

96- Biesecker LG, Bailey-Wilson JE, Ballantyne J, Baum H, Bieber FR, Brenner C ve ark. Epidemiology. DNA identifications after the 9/11 World Trade Center attack. Science. 2005 Nov 18;310(5751):1122-3. doi: 10.1126/science.1116608. PMID: 16293742.

97- Lou C, Cong B, Li S, Fu L, Zhang X, Feng T, Su S, Ma C, Yu F, Ye J, Pei L. A SNaPshot assay for genotyping 44 individual identification single nucleotide polymorphisms. Electrophoresis. 2011 Feb;32(3-4):368-78. doi: 10.1002/elps.201000426. Epub 2010 Dec 30. PMID: 21298663.

98- Lou C, Cong B, Li S, Fu L, Zhang X, Feng T, Su S, Ma C, Yu F, Ye J, Pei L. A SNaPshot assay for genotyping 44 individual identification single nucleotide polymorphisms. Electrophoresis. 2011 Feb;32(3-4):368-78. doi: 10.1002/elps.201000426. Epub 2010 Dec 30. PMID: 21298663.

99- Coble, M.D., Just, R.S., O'Callaghan, J.E. et al. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. Int J Legal Med 118, 137–146 (2004). https://doi.org/10.1007/s00414-004-0427-6

100- Daly, M., Rioux, J., Schaffner, S. *et al.* High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet* **29,** 229–232 (2001). https://doi.org/10.1038/ng1001-229

101- Gabriel, Stacey B., vd. "The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome". *Science*, c. 296, sy 5576, Haziran 2002, ss. 2225-29. *science.org (Atypon)*, https://doi.org/10.1126/science.1069424.

102- Tishkoff, Sarah A., ve Brian C. Verrelli. "Role of Evolutionary History on Haplotype Block Structure in the Human Genome: Implications for Disease Mapping". *Current Opinion in Genetics & Development*, c. 13, sy 6, Aralık 2003, ss. 569-75. *ScienceDirect*, https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.10.010.

103- Phillips C, Santos C, Fondevila M, Carracedo Á, Lareu MV. Inference of Ancestry in Forensic Analysis I: Autosomal Ancestry-Informative Marker Sets. Methods Mol Biol. 2016;1420:233-53. doi: 10.1007/978-1-4939-3597-0_18. PMID: 27259744.

104- Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovsky LA, Feldman MW. Genetic structure of human populations. Science. 2002 Dec 20;298(5602):2381-5. doi: 10.1126/science.1078311. PMID: 12493913.

105- Phillips, Chris, vd. "Development of a Novel Forensic STR Multiplex for Ancestry Analysis and Extended Identity Testing". *Electrophoresis*, c. 34, sy 8, Nisan 2013, ss. 1151-62. *PubMed*, https://doi.org/10.1002/elps.201200621.

106- Philips, C., vd. "Analysis of Global Variability in 15 Established and 5 New European Standard Set (ESS) STRs Using the CEPH Human Genome Diversity Panel". *Forensic Science International: Genetics*, c. 5, sy 3, Haziran 2011, ss. 155-69. *vbn.aau.dk*, https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.02.003.

107- Freire-Aradas, Ana, vd. "Phenotypic Markers for Forensic Purposes". *Forensic Science and Humanitarian Action*, John Wiley & Sons, Ltd, 2020, ss. 457-72. *Wiley Online Library*, https://doi.org/10.1002/9781119482062.ch29.

108- Kosoy, Roman, vd. "Ancestry Informative Marker Sets for Determining Continental Origin and Admixture Proportions in Common Populations in America". *Human Mutation*, c. 30, sy 1, Ocak 2009, ss. 69-78. *PubMed*, https://doi.org/10.1002/humu.20822.

109- Paschou, Peristera, vd. "PCA-Correlated SNPs for Structure Identification in Worldwide Human Populations". *PLOS Genetics*, c. 3, sy 9, Eyl 2007, s. e160. *PLoS Journals*, https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030160.

110- Phillips, C., vd. "Inferring Ancestral Origin Using a Single Multiplex Assay of Ancestry-Informative Marker SNPs". *Forensic Science International. Genetics*, c. 1, sy 3-4, Aralık 2007, ss. 273-80. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.06.008.

111- Galanter, Joshua Mark, vd. "Development of a Panel of Genome-Wide Ancestry Informative Markers to Study Admixture Throughout the Americas". *PLOS Genetics*, c. 8, sy 3, Mart 2012, s. e1002554. *PLoS Journals*, https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002554.

112- Phillips, C., vd. "Eurasiaplex: A Forensic SNP Assay for Differentiating European and South Asian Ancestries". *Forensic Science International. Genetics*, c. 7, sy 3, Mayıs 2013, ss. 359-66. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.02.010.

113- Cann, Howard M., vd. "A Human Genome Diversity Cell Line Panel". *Science (New York, N.Y.)*, c. 296, sy 5566, Nisan 2002, ss. 261-62. *PubMed*, https://doi.org/10.1126/science.296.5566.261b.

114- Auton, Adam, vd. "A Global Reference for Human Genetic Variation". *Nature*, c. 526, sy 7571, Ekim 2015, ss. 68-74. *www.nature.com*, https://doi.org/10.1038/nature15393.

115- Li, Jun Z., vd. "Worldwide Human Relationships Inferred from Genome-Wide Patterns of Variation". *Science (New York, N.Y.)*, c. 319, sy 5866, Şubat 2008, ss. 1100-04. *PubMed*, https://doi.org/10.1126/science.1153717.

116- Mannucci, Armando, vd. "Forensic Application of a Rapid and Quantitative DNA Sex Test by Amplification of the X-Y Homologous Gene Amelogenin". *International Journal of Legal Medicine*, c. 106, sy 4, Temmuz 1994, ss. 190-93. *Springer Link*, https://doi.org/10.1007/BF01371335.

117- Sturm, Richard A., ve Tony N. Frudakis. "Eye Colour: Portals into Pigmentation Genes and Ancestry". *Trends in Genetics: TIG*, c. 20, sy 8, Ağustos 2004, ss. 327-32. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.06.010.

118- Sturm, Richard A., vd. "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*, c. 82, sy 2, Şubat 2008, ss. 424-31. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.11.005.

119- Walsh, Susan, vd. "IrisPlex: A Sensitive DNA Tool for Accurate Prediction of Blue and Brown Eye Colour in the Absence of Ancestry Information". *Forensic Science International. Genetics*, c. 5, sy 3, Haziran 2011, ss. 170-80. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.02.004.

120- Ruiz, Y., vd. "Further Development of Forensic Eye Color Predictive Tests". *Forensic Science International. Genetics*, c. 7, sy 1, Ocak 2013, ss. 28-40. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.05.009.

121- Freire-Aradas, A., vd. "Exploring Iris Colour Prediction and Ancestry Inference in Admixed Populations of South America". *Forensic Science International. Genetics*, c. 13, Kasım 2014, ss. 3-9. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.06.007.

122- Grimes, E. A., vd. "Sequence Polymorphism in the Human Melanocortin 1 Receptor Gene as an Indicator of the Red Hair Phenotype". *Forensic Science International*, c. 122, sy 2-3, Kasım 2001, ss. 124-29. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/s0379-0738(01)00480-7.

123- Branicki, Wojciech, vd. "Determination of Phenotype Associated SNPs in the MC1R Gene*". *Journal of Forensic Sciences*, c. 52, sy 2, 2007, ss. 349-54. *Wiley Online Library*, https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00361.x.

124- Söchtig, Jens, vd. "Exploration of SNP Variants Affecting Hair Colour Prediction in Europeans". *International Journal of Legal Medicine*, c. 129, sy 5, Eylül 2015, ss. 963-75. *PubMed*, https://doi.org/10.1007/s00414-015-1226-y.

125- Kukla-Bartoszek, Magdalena, vd. "Investigating the Impact of Age-Depended Hair Colour Darkening during Childhood on DNA-Based Hair Colour Prediction with the HIrisPlex System". *Forensic Science International. Genetics*, c. 36, Eylül 2018, ss. 26-33. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.06.007.

126- Maroñas, Olalla, vd. "Development of a Forensic Skin Colour Predictive Test". *Forensic Science International. Genetics*, c. 13, Kasım 2014, ss. 34-44. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.06.017.

127- Chaitanya, Lakshmi, vd. "The HIrisPlex-S System for Eye, Hair and Skin Colour Prediction from DNA: Introduction and Forensic Developmental Validation". *Forensic Science International. Genetics*, c. 35, Temmuz 2018, ss. 123-35. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.04.004.

128- Marcińska, Magdalena, vd. "Evaluation of DNA Variants Associated with Androgenetic Alopecia and Their Potential to Predict Male Pattern Baldness". *PLOS ONE*, c. 10, sy 5, Mayıs 2015, s. e0127852. *PLoS Journals*, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127852.

129- https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/expand/M

130- Liu, Lin, vd. "Comparison of Next-Generation Sequencing Systems". Journal of Biomedicine and Biotechnology, c. 2012, Temmuz 2012, s. e251364. www.hindawi.com, https://doi.org/10.1155/2012/251364.

131- Kircher, Martin, ve Janet Kelso. "High-Throughput DNA Sequencing--Concepts and Limitations". BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology, c. 32, sy 6, Haziran 2010, ss. 524-36. PubMed, https://doi.org/10.1002/bies.200900181.

132- Ansorge, Wilhelm J. "Next-Generation DNA Sequencing Techniques". New Biotechnology, c. 25, sy 4, Nisan 2009, ss. 195-203. PubMed, https://doi.org/10.1016/j.nbt.2008.12.009.

133- Kchouk, Mehdi, vd. “Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation”. Biology and Medicine, c. 09, sy 03, 2017. DOI.org (Crossref), https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000395.

134- Zhang, Jun, vd. “The Impact of Next-Generation Sequencing on Genomics”. Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao, c. 38, sy 3, Mart 2011, ss. 95-109. PubMed, https://doi.org/10.1016/j.jgg.2011.02.003.

135- Glenn, Travis C. “Field Guide to Next-Generation DNA Sequencers”. Molecular Ecology Resources, c. 11, sy 5, 2011, ss. 759-69. Wiley Online Library, https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x.

136- Shendure, Jay, ve Hanlee Ji. “Next-Generation DNA Sequencing”. Nature Biotechnology, c. 26, sy 10, Ekim 2008, ss. 1135-45. www.nature.com, https://doi.org/10.1038/nbt1486.

137- Stranneheim, Henrik, ve Joakim Lundeberg. “Stepping Stones in DNA Sequencing”. *Biotechnology Journal*, c. 7, sy 9, Eylül 2012, ss. 1063-73. *PubMed*, https://doi.org/10.1002/biot.201200153.

138- Sanger, F., vd. “DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, c. 74, sy 12, Aralık 1977, ss. 5463-67. *PubMed*, https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463.

139- Rogers, Yu-Hui, ve J. Craig Venter. “Genomics: Massively Parallel Sequencing”. *Nature*, c. 437, sy 7057, Eylül 2005, ss. 326-27. *PubMed*, https://doi.org/10.1038/437326a.

140- Schuster, Stephan C. “Next-Generation Sequencing Transforms Today’s Biology”. *Nature Methods*, c. 5, sy 1, Ocak 2008, ss. 16-18. *PubMed*, https://doi.org/10.1038/nmeth1156.

141- Heather, James M., ve Benjamin Chain. “The Sequence of Sequencers: The History of Sequencing DNA”. *Genomics*, c. 107, sy 1, Ocak 2016, ss. 1-8. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003.

142- Moorthie, Sowmiya, vd. “Review of massively parallel DNA sequencing technologies”. *The HUGO Journal*, c. 5, sy 1-4, Aralık 2011, ss. 1-12. *PubMed Central*, https://doi.org/10.1007/s11568-011-9156-3.

143- Behjati, Sam, ve Patrick S. Tarpey. "What Is next Generation Sequencing?" *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, c. 98, sy 6, Aralık 2013, ss. 236-38. *PubMed*, https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340.

144- Barba, Marina, vd. "Historical Perspective, Development and Applications of next-Generation Sequencing in Plant Virology". *Viruses*, c. 6, sy 1, Ocak 2014, ss. 106-36. *PubMed*, https://doi.org/10.3390/v6010106.

145- Levy, Shawn E., ve Richard M. Myers. "Advancements in Next-Generation Sequencing". *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, c. 17, sy 1, Ağustos 2016, ss. 95-115. *DOI.org (Crossref)*, https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022413.

146- Moorcraft, Sing Yu, vd. "Understanding next Generation Sequencing in Oncology: A Guide for Oncologists". *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, c. 96, sy 3, Aralık 2015, ss. 463-74. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.06.007.

147- Stasik, S., vd. "An Optimized Targeted Next-Generation Sequencing Approach for Sensitive Detection of Single Nucleotide Variants". *Biomolecular Detection and Quantification*, c. 15, Mayıs 2018, ss. 6-12. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.12.001.

148- Meacham, Frazer, vd. "Identification and correction of systematic error in high-throughput sequence data". *BMC Bioinformatics*, c. 12, sy 1, Kasım 2011, s. 451. *BioMed Central*, https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-451.

149- Yang, Xiao, vd. "A Survey of Error-Correction Methods for next-Generation Sequencing". *Briefings in Bioinformatics*, c. 14, sy 1, Ocak 2013, ss. 56-66. *PubMed*, https://doi.org/10.1093/bib/bbs015.

150- Ewing, B., ve P. Green. "Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities". *Genome Research*, c. 8, sy 3, Mart 1998, ss. 186-94.

151- Ewing, B., vd. "Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment". *Genome Research*, c. 8, sy 3, Mart 1998, ss. 175-85. *PubMed*, https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175.

152- Hyman, E. D. "A New Method of Sequencing DNA". *Analytical Biochemistry*, c. 174, sy 2, Kasım 1988, ss. 423-36. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90041-3.

153- Nyrén, P. “Enzymatic Method for Continuous Monitoring of DNA Polymerase Activity”. *Analytical Biochemistry*, c. 167, sy 2, Aralık 1987, ss. 235-38. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90158-8.

154- Nyrén, P., vd. “Solid Phase DNA Minisequencing by an Enzymatic Luminometric Inorganic Pyrophosphate Detection Assay”. *Analytical Biochemistry*, c. 208, sy 1, Ocak 1993, ss. 171-75. *PubMed*, https://doi.org/10.1006/abio.1993.1024.

155- Ronaghi, M., vd. “A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate”. *Science (New York, N.Y.)*, c. 281, sy 5375, Temmuz 1998, ss. 363, 365. *PubMed*, https://doi.org/10.1126/science.281.5375.363.

156- Margulies, Marcel, vd. “Genome Sequencing in Microfabricated High-Density Picolitre Reactors”. *Nature*, c. 437, sy 7057, Eylül 2005, ss. 376-80. *www.nature.com*, https://doi.org/10.1038/nature03959.

157- Holland, Mitchell M., vd. “Second Generation Sequencing Allows for MtDNA Mixture Deconvolution and High Resolution Detection of Heteroplasmy”. *Croatian Medical Journal*, c. 52, sy 3, Haziran 2011, ss. 299-313. *PubMed*, https://doi.org/10.3325/cmj.2011.52.299.

158- Fierer, Noah, vd. “Forensic Identification Using Skin Bacterial Communities”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, c. 107, sy 14, Nisan 2010, ss. 6477-81. *www.pnas.org*, https://doi.org/10.1073/pnas.1000162107.

159- Fordyce, Sarah L., vd. “High-Throughput Sequencing of Core STR Loci for Forensic Genetic Investigations Using the Roche Genome Sequencer FLX Platform”. *BioTechniques*, c. 51, sy 2, Ağustos 2011, ss. 127-33. *PubMed*, https://doi.org/10.2144/000113721.

160- Gelardi, Chiara, vd. “Second Generation Sequencing of Three STRs D3S1358, D12S391 and D21S11 in Danes and a New Nomenclature for Sequenced STR Alleles”. *Forensic Science International. Genetics*, c. 12, Eylül 2014, ss. 38-41. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.04.016.

161- Shendure, Jay, vd. “Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome”. *Science (New York, N.Y.)*, c. 309, sy 5741, Eylül 2005, ss. 1728-32. *PubMed*, https://doi.org/10.1126/science.1117389.

162- Mardis, Elaine R. “The Impact of Next-Generation Sequencing Technology on Genetics”. *Trends in Genetics: TIG*, c. 24, sy 3, Mart 2008, ss. 133-41. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.12.007.

163- Anderson, Matthew W., ve Iris Schrijver. “Next Generation DNA Sequencing and the Future of Genomic Medicine”. *Genes*, c. 1, sy 1, Mayıs 2010, ss. 38-69. *PubMed*, https://doi.org/10.3390/genes1010038.

164- Rothberg, Jonathan M., vd. *Methods and Apparatus for Measuring Analytes Using Large Scale Fet Arrays*. WO2010008480A3, https://patents.google.com/patent/WO2010008480A3/en. Erişim 03 Ekim 2021.

165- Merriman, Barry, vd. “Progress in Ion Torrent Semiconductor Chip Based Sequencing”. *Electrophoresis*, c. 33, sy 23, Aralık 2012, ss. 3397-417. *PubMed*, https://doi.org/10.1002/elps.201200424.

166- Reuter, Jason A., vd. “High-Throughput Sequencing Technologies”. *Molecular Cell*, c. 58, sy 4, Mayıs 2015, ss. 586-97. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004.

167- Bennett, Simon. “Solexa Ltd”. *Pharmacogenomics*, c. 5, sy 4, Haziran 2004, ss. 433-38. *PubMed*, https://doi.org/10.1517/14622416.5.4.433.

168- Kawashima, et al.Method of nucleic acid amplification. Patent U.S.2005/0100900 A1. Mayıs 12 2005.

169- Canard, B., ve R. S. Sarfati. “DNA Polymerase Fluorescent Substrates with Reversible 3’-Tags”. *Gene*, c. 148, sy 1, Ekim 1994, ss. 1-6. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90226-7.

170- Davis, Carey, vd. “Sequencing the Hypervariable Regions of Human Mitochondrial DNA Using Massively Parallel Sequencing: Enhanced Data Acquisition for DNA Samples Encountered in Forensic Testing”. *Legal Medicine (Tokyo, Japan)*, c. 17, sy 2, Mart 2015, ss. 123-27. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2014.10.004.

171- Goodwin, Sara, vd. “Coming of Age: Ten Years of next-Generation Sequencing Technologies”. *Nature Reviews Genetics*, c. 17, sy 6, Haziran 2016, ss. 333-51. *www.nature.com*, https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49.

172- Eid, John, vd. “Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules”. *Science (New York, N.Y.)*, c. 323, sy 5910, Ocak 2009, ss. 133-38. *PubMed*, https://doi.org/10.1126/science.1162986.

173- Braslavsky, Ido, vd. “Sequence Information Can Be Obtained from Single DNA Molecules”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, c. 100, sy 7, Nisan 2003, ss. 3960-64. *www.pnas.org*, https://doi.org/10.1073/pnas.0230489100.

174- Harris, Timothy D., vd. “Single-Molecule DNA Sequencing of a Viral Genome”. *Science (New York, N.Y.)*, c. 320, sy 5872, Nisan 2008, ss. 106-09. *PubMed*, https://doi.org/10.1126/science.1150427.

175- McCoy, Rajiv C., vd. “Illumina TruSeq Synthetic Long-Reads Empower De Novo Assembly and Resolve Complex, Highly-Repetitive Transposable Elements”. *PLOS ONE*, c. 9, sy 9, Eyl 2014, s. e106689. *PLoS Journals*, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106689.

176- Chin, Chen-Shan, vd. “Phased Diploid Genome Assembly with Single-Molecule Real-Time Sequencing”. *Nature Methods*, c. 13, sy 12, Aralık 2016, ss. 1050-54. *PubMed*, https://doi.org/10.1038/nmeth.4035.

177- Kulski, Jerzy K. *Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications*. IntechOpen, 2016. *www.intechopen.com*, https://doi.org/10.5772/61964.

178- Roberts, Richard J., vd. “The advantages of SMRT sequencing”. *Genome Biology*, c. 14, sy 6, Temmuz 2013, s. 405. *BioMed Central*, https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-405.

179- Vilfan, Igor D., vd. “Analysis of RNA base modification and structural rearrangement by single-molecule real-time detection of reverse transcription”. *Journal of Nanobiotechnology*, c. 11, sy 1, Nisan 2013, s. 8. *BioMed Central*, https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-8.

180- Koren, Sergey, vd. “Hybrid error correction and de novo assembly of single-molecule sequencing reads”. *Nature biotechnology*, c. 30, sy 7, Temmuz 2012, ss. 693-700. *PubMed Central*, https://doi.org/10.1038/nbt.2280.

181- Pilli, Elena, ve Andrea Berti, editörler. *Forensic DNA analysis: technological development and innovative applications*. Apple Academic Press, 2021 ss. 147-201.

182- Heo, Y. (2015, August 01). Improving quality of high-throughput sequencing reads. Retrieved from https://www.ideals.illinois.edu/handle/2142/88064

183- Deamer, David, vd. "Three Decades of Nanopore Sequencing". *Nature Biotechnology*, c. 34, sy 5, Mayıs 2016, ss. 518-24. *PubMed*, https://doi.org/10.1038/nbt.3423.

184- Kasianowicz, John J., vd. "Characterization of Individual Polynucleotide Molecules Using a Membrane Channel". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, c. 93, sy 24, Kasım 1996, ss. 13770-73. *www.pnas.org*, https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13770.

185- Ip, Camilla L. C., vd. "MinION Analysis and Reference Consortium: Phase 1 Data Release and Analysis". *F1000Research*, c. 4, 2015, s. 1075. *PubMed*, https://doi.org/10.12688/f1000research.7201.1.

186- Rang, Franka J., vd. "From squiggle to basepair: computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy". *Genome Biology*, c. 19, sy 1, Temmuz 2018, s. 90. *BioMed Central*, https://doi.org/10.1186/s13059-018-1462-9.

187- Jain, Miten, vd. "The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community". *Genome Biology*, c. 17, sy 1, Kasım 2016, s. 239. *BioMed Central*, https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0.

188- Haque, Farzin, vd. "Solid-State and Biological Nanopore for Real-Time Sensing of Single Chemical and Sequencing of DNA". *Nano Today*, c. 8, sy 1, Şubat 2013, ss. 56-74. *PubMed*, https://doi.org/10.1016/j.nantod.2012.12.008.

189- Oxford Nanopore Technologies: "Product Comparison". *Oxford Nanopore Technologies*, http://nanoporetech.com/products/comparison. Erişim 03 Ekim 2021.

190- Oxford Nanopore Technologies: "Product comparison". *https://nanoporetech.com/products/comparison#platform*. Erişim 03 Ekim 2021.

191- Stoddart, David, vd. "Multiple Base-Recognition Sites in a Biological Nanopore: Two Heads Are Better than One". *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, c. 49, sy 3, 2010, ss. 556-59. *PubMed*, https://doi.org/10.1002/anie.200905483.

192- Hall, C. L., vd. "Potential Applications of Nanopore Sequencing for Forensic Analysis". *Forensic Science Review*, c. 32, sy 1, Ocak 2020, ss. 23-54.

193- Bulbul, O., Speed, W. C., Gurkan, C., Soundararajan, U., Rajeevan, H., Pakstis, A. J., & Kidd, K. K. (2018). Improving ancestry distinctions among Southwest Asian populations. *Forensic Science International: Genetics*, *35*, 14–20. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.03.010

194- Chaitanya, L., Walsh, S., Andersen, J. D., Ansell, R., Ballantyne, K., Ballard ve ark. (2014). Collaborative EDNAP exercise on the IrisPlex system for DNA-based prediction of human eye colour. Forensic Science International: Genetics, 11, 241–251. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.04.006

195- Bulbul, O., Zorlu, T., & Filoglu, G. (2018). Prediction of human eye colour using highly informative phenotype SNPs (PISNPs). Australian Journal of Forensic Sciences, 52(1), 27–37. https://doi.org/10.1080/00450618.2018.1484161

196- TAVACI, L., ŞİMŞEK, S. Z., SAPAN, V., ARSLAN, C., AŞICIOĞLU, F., FİLOĞLU, G., & BÜLBÜL, Z. (2021). Optimization and Validation of HIrisPlex Panel for Predicting of the Eye and Hair Color. *Turkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences*, *18*(1), 10–20. https://doi.org/10.5336/forensic.2020-79686

197- Chaitanya, L., Breslin, K., Zuñiga, S., Wirken, L., Pośpiech, E., Kukla-Bartoszek ve ark. (2018). The HIrisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. *Forensic Science International: Genetics*, *35*, 123–135. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.04.004

198- Tytgat, O., ŠKevin, S., Deforce, D., & van Nieuwerburgh, F. (2022). Nanopore sequencing of a forensic combined STR and SNP multiplex. *Forensic Science International: Genetics*, *56*, 102621. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102621

199- Vasiljevic, N., Lim, M., Humble, E., Seah, A., Kratzer, A., Morf, N. V., Prost, S., & Ogden, R. (2021). Developmental validation of Oxford Nanopore Technology MinION sequence data and the NGSpeciesID bioinformatic pipeline for forensic genetic species identification. *Forensic Science International: Genetics*, *53*, 102493. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102493

200- Valenzuela, R. K., Henderson, M. S., Walsh, M. H., Garrison, N. A., Kelch, J. T., Cohen-Barak ve ark. (2010). Predicting Phenotype from Genotype: Normal Pigmentation. Journal of Forensic Sciences, 55(2), 315–322. https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01317.x

201- Hart, K. L., Kimura, S. L., Mushailov, V., Budimlija, Z. M., Prinz, M., & Wurmbach, E. (2013). Improved eye- and skin-color prediction based on 8 SNPs. *Croatian Medical Journal*, *54*(3), 248–256. https://doi.org/10.3325/cmj.2013.54.248

202- Spichenok, O., Budimlija, Z. M., Mitchell, A. A., Jenny, A., Kovacevic, L., Marjanovic, D. ve ark. (2011). Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Science International: Genetics*, *5*(5), 472–478. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.10.005

203- Mushailov V, Rodriguez SA, Budimlija ZM, Prinz M, Wurmbach E. Assay Development and Validation of an 8-SNP Multiplex Test to Predict Eye and Skin Coloration. J Forensic Sci. 2015 Jul;60(4):990-1000. doi: 10.1111/1556-4029.12758. Epub 2015 Mar 17. PMID: 25782558.

204- Allwood JS, Harbison S. SNP model development for the prediction of eye colour in New Zealand. Forensic Sci Int Genet. 2013 Jul;7(4):444-52. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.03.005. Epub 2013 Apr 15. PMID: 23597786.

205- Ruiz Y, Phillips C, Gomez-Tato A, Alvarez-Dios J, Casares de Cal M, Cruz R ve ark. Further development of forensic eye color predictive tests. Forensic Sci Int Genet. 2013 Jan;7(1):28-40. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.05.009. Epub 2012 Jun 17. PMID: 22709892.

206- Söchtig J, Phillips C, Maroñas O, Gómez-Tato A, Cruz R, Alvarez-Dios J ve ark. Exploration of SNP variants affecting hair colour prediction in Europeans. Int J Legal Med. 2015 Sep;129(5):963-75. doi: 10.1007/s00414-015-1226-y. Epub 2015 Jul 11. PMID: 26162598.

207- Berglund EC, Kiialainen A, Syvänen AC. Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics. Investig Genet. 2011 Nov 24;2:23. doi: 10.1186/2041-2223-2-23. PMID: 22115430; PMCID: PMC3267688.

208- Song K, Li L, Zhang G. Coverage recommendation for genotyping analysis of highly heterologous species using next-generation sequencing technology. Sci Rep. 2016 Oct 20;6:35736. doi: 10.1038/srep35736. PMID: 27760996; PMCID: PMC5071758.

209- Radhakrishnan GV, Cook NM, Bueno-Sancho V, Lewis CM, Persoons A, Mitiku AD ve ark. MARPLE, a point-of-care, strain-level disease diagnostics and surveillance tool for complex fungal pathogens. BMC Biol. 2019 Aug 13;17(1):65. doi: 10.1186/s12915-019-0684-y. PMID: 31405370; PMCID: PMC6691556.

210- Breslin K, Wills B, Ralf A, Ventayol Garcia M, Kukla-Bartoszek M, Pospiech E ve ark. HIrisPlex-S system for eye, hair, and skin color prediction from DNA: Massively parallel sequencing solutions for two common forensically used platforms. Forensic Sci Int Genet. 2019 Nov;43:102152. doi: 10.1016/j.fsigen.2019.102152. Epub 2019 Aug 26. PMID: 31518964.

211- Salvo, N. M., Janssen, K., Kirsebom, M. K., Meyer, O. S., Berg, T., & Olsen, G. H. (2022). Predicting eye and hair colour in a Norwegian population using Verogen's ForenSeqTM DNA signature prep kit. Forensic Science International: Genetics, 56, 102620. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102620

212- Walsh, S., Liu, F., Wollstein, A., Kovatsi, L., Ralf, A., Kosiniak-Kamysz ve ark. (2013b). The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. Forensic Science International: Genetics, 7(1), 98–115. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.07.005

213- Emma L. C. American Population Study of Pigmentation Based Genotype Interpretation for Phenotypic Determination of Hair and Eye ColorInterpretation for Phenotypic Determination of Hair and Eye Color using HIrisPlexusing HIrisPlex [MSc Tezi]. Virgina (VA): West Virgina University, 2020

214- Delahaye, C., & Nicolas, J. (2021). Sequencing DNA with nanopores: Troubles and biases. PLOS ONE, 16(10), e0257521. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257521

215- Fan GY, Wang DP, Song DL, Zheng XK, Zhu J, Long B. Developmental validation study of a 32-plex STR direct amplification system for forensic reference samples. Forensic Sci Int. 2021 Oct;327:110977. doi: 10.1016/j.forsciint.2021.110977. Epub 2021 Aug 25. PMID: 34482283.

216- https://store.nanoporetech.com/flow-cell-r9-4-1.html (08.06.2022)

217- https://www.journals.elsevier.com/forensic-science-international-genetics/most-cited-articles (08.06.2022)

218- Oxford Nanopore Technologies. (2017, September). Nanopore sequencing The advantages of long reads for genome assembly. https://nanoporetech.com/sites/default/files/s3/white-papers/WGS_Assembly_white_paper.pdf?submissionGuid=40a7546b-9e51-42e7-bde9-b5ddef3c3512

219- https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/considerations-and-performance-data-for-nanopore-sequencing-of-high-molecular-weight-dna-hmw-dna (08.06.2022)

220- https://bitesizebio.com/44244/get-prepped-nanopore-library-preparation-optimization/ (08.06.2022)

221- Lin, B., Hui, J., & Mao, H. (2021). Nanopore Technology and Its Applications in Gene Sequencing. Biosensors, 11(7), 214. https://doi.org/10.3390/bios11070214

222- Cornelis, S., Gansemans, Y., Vander Plaetsen, A. S., Weymaere, J., Willems, S., Deforce, D., & van Nieuwerburgh, F. (2019). Forensic tri-allelic SNP genotyping using nanopore sequencing. Forensic Science International: Genetics, 38, 204–210. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.11.012

223- Ren, ZL., Zhang, JR., Zhang, XM. et al. Forensic nanopore sequencing of STRs and SNPs using Verogen's ForenSeq DNA Signature Prep Kit and MinION. Int J Legal Med 135, 1685–1693 (2021). https://doi.org/10.1007/s00414-021-02604-0

224- https://verogen.com/products/forenseq-dna-signature-prep-kit/ (09.06.2022)

225- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi?view+summary=view+summary&build_id=151 (08.06.2022)