

ORİJİNAL ARAŞTIRMA ORIGINAL RESEARCH

DOI: 10.5336/forensic.2024-106910

Degrade Adli Örnekler için Mitokondriyal DNA Amplifikasyon ve Dizileme Stratejisi Geliştirme: Deneysel Çalışma

Developing a Mitochondrial DNA Amplification and Sequencing Strategy for Degraded Forensic Samples: Experimental Research

^{1b} Peter MATOVU^a, ^{1b} Hüsniye CANAN^b, ^{1b} Ayşe SERİN^b

^aÇukurova Üniversitesi Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü, Adana, Türkiye

^bÇukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adli Tıp AD, Adana, Türkiye

Bu çalışma, 17. Adli Bilimler Kongresi'nde (12-15 Kasım 2020, Online) poster olarak sunulmuştur.

ÖZET Amaç: İnsanlarda mitokondriyal DNA (mtDNA) analizi, yüksek stabilitesi ve hücre başına çok sayıda genom kopyası içermesi nedeniyle yüksek oranda bozunmuş iskelet kalıntılarının kimliklendirilmesinde güçlü bir araç olmuştur. Bu çalışmada, ileri derecede bozunmuş iskelet kalıntılarında kısa mtDNA parçaların çoğaltılması ve dizi analizi amacıyla midi ve mini multipleks polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] setleri tasarlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Tasarlanan midi ve mini multipleks PCR setlerinin etkinliğini araştırmak amacıyla toprak altında kalma süreleri 3-68 yıl arasında değişen ve yaşları 22-93 arasında olan toplam 14 kişiye ait diş veya femur kemiğine ait DNA örnekleri kullanılmıştır. Silika temelli DNA ekstraksiyon yöntemi ile 1 gr kemik tozundan izole edilen DNA örneklerinde çeşitli uzunluklarda ampikon üretilebilecek 2 ayrı multipleks PCR seti hazırlanmıştır. Multipleks PCR için seçilen primer setlerinden biri mtDNA'nın ortalama 250 bp uzunluğunda fragmanların amplifikasyonuna izin veren 2 multipleks reaksiyondan oluşan midi primer seti; diğeri ise daha ileri seviyede degrade örneklerde kullanılabilecek olan 100-150 bp uzunlukta fragmanların amplifikasyonuna olanak tanıyan mini primer setidir ki, o da 3 multipleks reaksiyondan oluşmaktadır. **Bulgular:** Mini primer seti ile 68 yıla kadar iskelet kalıntılarında başarılı sonuçlar alınırken, midiplex seti ile 45 yıla kadar olan iskelet kalıntılarında başarılı sonuçlar alınmıştır. **Sonuç:** Multipleks setler ile analiz için kullanılan genomik DNA miktarı azaldığından örnek kaybı en aza inmektedir. Ayrıca kullanılan malzeme ve iş gücü dikkate alındığında, multipleks setlerle hem iş gücü hem de maliyet önemli ölçüde azalmaktadır. Bu primer setleri, başta iskelet kalıntıları olmak üzere ileri derecede bozunmuş DNA örneklerinde kullanılabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Degrade mitokondriyal DNA; dizi analizi; adli; kemik; multipleks polimeraz zincir reaksiyonu; kimliklendirme

ABSTRACT Objective: The analysis of mitochondrial DNA (mtDNA) in humans has been a powerful tool in the identification of highly decomposed skeletal remains for forensic identification due to its high stability and the large number of genome copies per cell. In this study, multiplex polymerase chain reaction (PCR) sets were designed with midi and mini primers for amplification and sequence analysis of very short mtDNA fragments to perform sequence analysis of the mtDNA control region in highly degraded skeletal remains. **Material and Methods:** In order to investigate the effectiveness of the designed midi and mini multiplex PCR sets, DNA samples of teeth or femur bones belonging to a total of 14 people aged between 22-93 and whose duration of underground residence varied between 3-68 years, were used. Two separate multiplex PCR sets were prepared to produce amplicons of various lengths in DNA samples isolated from 1 g of bone powder by silica-based DNA extraction method. One of the primer sets selected for multiplex PCR is the midi primer set consisting of 2 multiplex reactions, which allows the amplification of mtDNA fragments with an average length of 250 bp; The other one is a mini primer set that allows the amplification of 100-150 bp long fragments that can be used in more advanced degraded samples, and it consists of 3 multiplex reactions. **Results:** While successful results were obtained on skeletal remains up to 68 years old with the mini primer set, successful results were obtained on skeletal remains up to 45 years old with the midiplex set. **Conclusion:** With multiplex sets, sample loss is minimized as the amount of genomic DNA used for analysis is reduced. In addition, considering the material and labour used, both labour and cost are significantly reduced with multiplex sets. These primer sets can be used in highly degraded DNA samples, especially skeletal remains.

Keywords: Degraded mitochondrial DNA; sequence analysis; forensic; bone; multiplex PCR; identification

Correspondence: Ayşe SERİN

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adli Tıp AD, Adana, Türkiye

E-mail: ayserin@yahoo.com



Peer review under responsibility of Türkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences.

Received: 26 Nov 2024

Received in revised form: 05 Mar 2025

Accepted: 11 Apr 2025

Available online: 22 May 2025

2619-9459 / Copyright © 2025 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Mitokondriyal DNA (mtDNA), özellikle nükleer DNA analizinin mümkün olmadığı adli olguların kimliklendirilmesinde kullanılabilecek bir araç olarak kabul edilmektedir. Yüksek kopya sayısına sahip olması, rekombinasyonun olmayışı ve maternal kalıtım göstermesi nedeniyle maternal soyun belirlenmesini gerektiren adli olgu örneklerinde tercih edilmektedir.^{1,2}

Adli laboratuvarlarda sıklıkla mtDNA polimorfizminin yüksek olduğu kontrol bölgenin dizi analizi tercih edilmektedir. Degrade olmayan veya kısmen degrade örneklerde standart laboratuvar uygulamalarında tüm mtDNA kontrol bölgenin tek primer çifti ile amplifikasyonu ve dizi analizi yapılabilmektedir. Bununla birlikte, çeşitli adli olgu çalışma örneklerinde açıkça görüldüğü gibi, ileri derece bozunma gerçekleşmiş biyolojik materyallerden elde edilen DNA ekstraktında 250 bp'yi aşan amplikon boyutları bulunmayabilir.^{3,4} Böyle durumlarda küçük DNA fragmanları için uygun primerler tasarlanarak çeşitli sayıda primer çifti ile tüm kontrol bölgenin analizi mümkündür. Ancak yaklaşık 1.112 bp'lik bu bölgenin amplifikasyonunda 250 bp'lik fragmanlar için ortalama 6 primer çifti, 150 bp'lik fragmanlar için ortalama 8 primer çifti kullanılması gerektiği dikkate alındığında, çok büyük bir iş gücü ve maliyet ortaya çıkmaktadır. Bu dezavantajlı durumun üstesinden gelebilmek için kontrol bölge için tasarlanan mini-/midi-amplikon setlerinin multipleks amplifikasyonuna dayalı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, ileri derecede bozunmuş biyolojik örneklerde multipleks mtDNA amplifikasyonunun başarılı olduğu ve bu amplikonların mtDNA kontrol bölgenin dizi analizine olanak tanıdığı belirtilmiştir.^{1,2,5-7}

Bu çalışmada, degradasyon seviyeleri farklı DNA örneklerinde kontrol bölgeye ait mtDNA profili elde edebilmek amacıyla çeşitli uzunluklarda amplikon üretilebilecek 2 ayrı multipleks polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] setinin etkinliği araştırılmıştır. Multipleks primer setlerinden biri mtDNA'nın ortalama 250 bp uzunluktaki fragmanların amplifikasyonuna izin veren multipleks midi primer seti, diğeri ise daha ileri seviyede degrade örneklerde kullanılabilecek olan 100-150 bp uzunluktaki fragmanların amplifikasyonuna izin

veren multipleks mini primer setidir. Bu primer setlerinin kısa tandem tekrarı [short tandem repeat (STR)] lokusları ile analizin kısmen veya tamamen başarısız olduğu, zamana ve olumsuz çevre koşullarına bağlı olarak ileri derece bozunmuş kemik/diş dokularının kimliklendirmesinde kullanılıp kullanılamayacağı araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

BİYOLOJİK ÖRNEKLER/DNA İZOLASYONU

Çalışmada, daha önce kimliklendirmeye esas olmak üzere otozomal STR lokuslarına dayalı DNA analizi yapılmış olan iskelet kalıntılarına ait DNA örnekleri (10 adet femur kemiği ile 4 adet diş örneği) kullanılmıştır. Biyolojik örneklerdeki DNA miktarı Qubit florometrik yöntem ile belirlenmiş olup, DNA degradasyon seviyelerinin belirlenmesinde STR lokusları elektroforez sonuçları ile mtDNA'nın tüm kontrol bölgesinin dizi analizi sonuçları dikkate alınmıştır.

Primerlerin çalışıp çalışmadığının kontrolü ve optimum primer konsantrasyonlarının ayarlanmasında adli genetik laboratuvar çalışanlarından ve daha önceden mtDNA dizi analizleri bilinen ve aydınlatılmış onam alınan kişilerden gönüllülük esasına dayalı olarak alınan 8 adet kan örneği kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak 9947A (Thermo Fisher Scientific) ve negatif kontrol olarak nükleaz içermeyen su (Qiagen) kullanılan bu çalışmada Uluslararası Adli Genetik Derneği DNA Komisyonunun önerdiği mtDNA analizine ilişkin yönergeler takip edilmiştir.⁸ Kemik ve diş örneklerinden DNA ekstraksiyonu öncesi biyolojik materyaller üzerinde bulunan yumuşak dokular ve toprak kalıntıları su altında yıkandıktan sonra dış yüzey bistüri ile kazınmıştır. Ardından %1'lik Safety Data Sheets (Merck) ve %5'lik hipoklorid (Tekkim) solüsyonu ile kimyasal temizlik yapılmıştır. Kemik dokular 1-2 günlük kuruma süresini takiben doku parçalama cihazı ile (Tissue Lyser, Qiagen) toz hâline getirilmiştir. Bu aşamadan sonra, falkon tüplere aktarılan 1gr numuneye 2 mL lizis solüsyonu (0,5 M etilendiamintetraasetik asit [(EDTA)+%1 SDS] ve 100 mg Prot-K (Qiagen)eklenerek çalkalamalı su banyosu (Memmert, Almanya) içinde 56°C'de 2 gece bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda ependorf tüplere aktarılan karışım 20.000 g'de 3 dk santrifüj edildik-

ten sonra üst faz 30 kDa'lık Amicon® Ultra-4 filtreli tüplerde (Merck Millipore) konsantre edilmiştir. Konsantre ekstraktan DNA'nın izolasyonu Qiaquick PCR Purification kiti (Qiagen, Valencia, CA) ile yapılmıştır.⁹ Kontrol olarak gönüllü donörlerden alınan venöz kan örnekleri InstaGene™ Matrix (BIO-RAD) ile ekstrakte edilmiş olup, izolasyonda üretici firmasının önerileri takip edilmiştir.¹⁰

DNA MİKTAR TAYİNİ

Örneklerdeki DNA konsantrasyonu Qubit™ dsDNA HS Assay Kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak Qubit florometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile ölçülmüştür.¹¹

Bu projenin yapılabilmesi için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 5 Temmuz 2019 tarih ve 90 sayılı toplantısında (Karar no: 34) yazılı onay alınmış olup, uygulanan işlemler Helsinki Deklarasyonu'na uygundur.

AMPLİFİKASYON VE DİZİ ANALİZİ

Midi/Mini Multipleks Setler

Midiplex set, uzunlukları 227-267 bp arasında değişen ve birbiriyle örtüşen 6 amplikonu amplifiye etmek için 2 multipleks PCR'den oluşmaktadır. Miniplex set, uzunlukları 142-185 bp arasında değişen ve birbiriyle örtüşen on kısa amplikonu amplifiye

etmek için üç multipleks PCR'den oluşmaktadır. Multipleks ve minipleks primer setleri Tablo 1 ve Tablo 2'de aktarılmıştır.

Single PCR

Multipleks PCR öncesi her bir primer çiftinin optimizasyonunu sağlamak için single PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Single PCR için 0.2ml'lik eppendorf tüpte hazırlanan 20 µL karışıma ileri ve geri primer çiftinin her birinden 0,4 µL (µM), 2 µL (0,01 ng) DNA örneği ve 5,6 µL nükleaz içermeyen su (QIAGEN) koyulmuştur. PCR parametresi Tablo 3'de aktarılmıştır.

PCR sonrası örnekler 4°C saklanmıştır. Multipleks PCR parametreleri için alternatif üretebilme amacıyla primer yapışma sıcaklıkları 55-60°C'ler arasında 5 farklı sıcaklıkta test edilmiştir. Amplifikasyon kontrolleri %1,5'lik agaroz jelde yapılmıştır. Tüm primerler için 58°C sıcaklığın verimli bir amplifikasyon ürünü elde etmek için uygun olduğu sonucuna varılarak multipleks amplifikasyonlar için bu sıcaklığın seçilmesine karar verilmiştir (Resim 1'de minipleks primerlerin agaroz jel görüntüsü verilmiştir).

Multipleks PCR

Single PCR reaksiyonu sonrası midi ve mini primer setlerinden oluşan multipleks PCR reaksiyonu için uygun primer konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu

TABLO 1: Çalışmada kullanılan midiplex primer setleri¹²

Çok katlı set	Amplikon	Primer	Sekans (5'-3')	Sekans uzunluğu (np)	Hedef uzunluk (bp)	Amplikon Uzunluğu (bp)
Midiplex1	P11	F15989	CCCAAAGCTAAGATTCTAAT	16009-16235	267	267
		R16255	CTTTGGAGTTGCAGTTGATG			
	P13	F16347	TCAAATCCCTTCTCGTCCC	16366-16555	229	229
		R006	GTGATCCATCGTGATGTCTT			
	P22	F155m	TATTTATCGCACCTACGTTCA	176-369	235	240
		R389-5t	ta(tta)CTGGTTAGGCTGGTGTAGGa			
Midiplex2	P12	F16159-15t	(tat)CATAAAACCCAATCCACATa	16179-16391	252	267
		R16410m	GAGGATGGTGGTCAAGGGA			
	P21	F015	CACCTATTAACCACTCACG	35-239	247	247
		R261	GCTGTGCAGACATTCAATTGTT			
	P31	F403-15t	(aat)TCTTTGGCGGTATGCACTTTa	424-592	212	227
		R614	TTTCAGTGTATTGCTTTGAGG			

np: Nükleotid pozisyonu; bp: Baz çifti

TABLO 2: Çalışmada kullanılan minipleks primer setleri¹²

Çok katlı Set	Amplikon	Primer	Sekans (5'-3')	Sekans Uzunluğu (np)	Hedef Uzunluk (bp)	Amplikon Uzunluğu (bp)
Miniplex1	M11	F15989-10t	t(tat)CCCAAAGCTAAGATTCTAATa	16009-16131	165	175
		R16153m	CAGGTGGTCAAGTATTATG			
	M13	F16153m	CATAAAACCCAATCCACA	16179-16300	164	164
		R16322m	TGGCTTTATGTACTATGTAC			
	M21	F034m	GGGAGCTCTCCATGCATTT	53-167	154	154
		R187	CGCCTGTAATATTGAACGTA			
Miniplex2	M12	F16088	TGTATTTCGTACATTACTGC	16108-16209	142	142
		R16229	AGTTGAGGGTTGATTGCTGT			
	M14	F16258	ACCCCTCACCCTAGGAT	16278-16391	153	153
		R16410m	GAGGATGGTGGTCAAGGGA			
	M22	F120	CGCAGTATCTGTCTTGATT	142-265	166	166
		R285	GTTATGTATCTGTGTGAA			
Miniplex3	M31	F403-15t	(aat)TCTTTTGGCGGTATGCA	424-548	166	181
		R614	TTTCAGTGATTGCTTTGAGGA			
	M15	F1637	CCTCAGATAGGGGTCCTTG	16399-16528	170	170
		R16548	GGGAACGTGTGGGGCTATTT			
	M32	F456	CCCCTCCCACTCCCACT	475-592	159	159
		R614	TTTCAGTGATTGCTTTGAGGA			

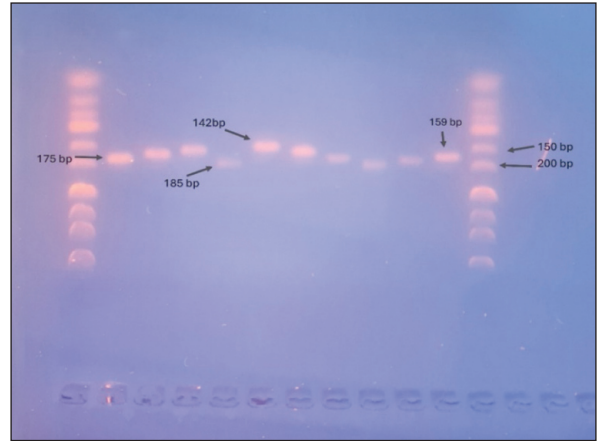
np: Nükleotid pozisyonu; bp: Baz çifti

TABLO 3: PCR parametresi

95°C	15 dk	35 döngü
94°C	30 sn	
58°C	1.30 dk	
72°C	1.30 dk	
72°C	10 dk	
4°C	∞	

aşamada multipleks set optimizasyonuna eşit miktarda primer konsantrasyonu (0,4 µM) ile başlanmıştır. Multipleks set içindeki amplikonların varlığı %5'lik agaroz jellerde incelenmiştir (Resim 2'de minipleks, Resim 3'de minipleks setin jel görüntüsü verilmiştir).

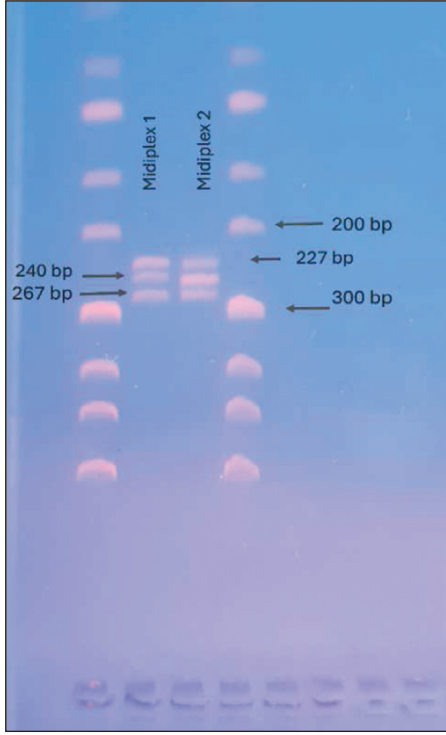
Agaroz jellerde tüm gruplar için yeterli PCR ürünü tespit edilene kadar primer konsantrasyonları (her 2 yönde azaltılarak ve artırılarak) değiştirilmiştir. Jelde olumlu sonuçların alındığı reaksiyon karışımları aşağıda belirtilmiştir.



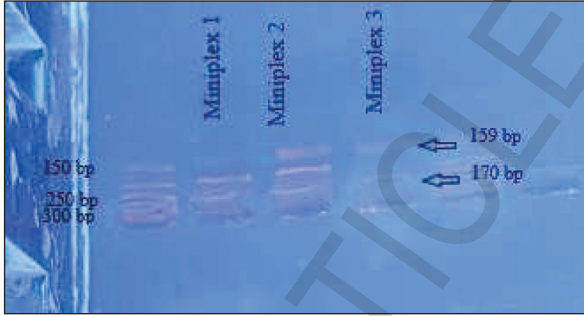
RESİM 1: Agaroz jel görüntüsü (Single)

Minipleks primerler [M11(175 bp), M13 (164 bp), M21 (154 bp), M23 (185 bp), M12 (142 bp), M14(153 bp), M22 (166 bp), M31 (181 bp), M15 (170 bp), M32 (159 bp)]

0,2 ml'lik eppendorf tüplerde gerçekleştirilen PCR reaksiyonunda; Tablo 2'de yer alan setlerden minipleks 1 için 10 µl mastermix, M11, M13 ve M23 primer çiftlerinden 0,4'er µl, M21 primer çiftinden 0,2'şer µl ve 2 µl DNA örneği koyularak karışım saf su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Minipleks 2 için 10 µl



RESİM 2: Agaroz jel görüntüsü (midpleks) (%5'lik jel)
Midpleks I, P11 (267 bp), P22 (240 bp), P13 (229 bp); midpleks II, P12 (267 bp), P21 (247 bp), P31 (227 bp)



RESİM 3: Agaroz jel görüntüsü (minipleks) (%5'lik jel)
Minipleks I, M23 (185 bp), M11 (175 bp), M13 (164 bp), M21 (154 bp); minipleks II, M31 (181 bp), M22 (166 bp), M14 (153 bp), M12 (142 bp); minipleks III, M15 (170 bp), M32 (159 bp)

mastermix, M12, M22 ve M31 primer çiftlerinden 0,4'er µl, M14 primer çiftinden 0,6'şar µl ve 2 µl DNA koyularak karışım saf su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır (Tablo 2). Minipleks 3 için 10 µl mastermix, M15 ve M32 primer çiftlerinden 0,4'er µl ve 2 µl DNA koyularak karışım saf su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Tablo 1'de bulunan setlerden midpleks 1 için 10 µl mastermix, P11 ve P13 primer çiftlerinden 0,8'er µl, P22 primer çiftinden 0,3'er µl

ve 2 µl DNA koyularak karışım saf su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Midpleks 2 için 10 µl mastermix, P12, P21 ve P31 primer çiftlerinden 0,4'er µl ve 2 µl DNA koyularak, karışım saf su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Multipleks amplifikasyon reaksiyonu single PCR ile aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir.

PCR Ürünlerinin Jel Elektrofrezisi ile Değerlendirilmesi: PCR ürünleri 1X Tris Borat EDTA (TBE) tamponu ile hazırlanan ve etidyum bromür içeren %1,5'lik agaroz jellerde 120 V, 80 mA'da 20 dk, multipleks PCR ürünleri %5'lik agaroz jelde 80V, 80 mA'da 1 saat yürütülmüştür. Ardından jelde bantların varlığı UV translüminatörde (Syngene) incelenmiştir.

OTOZOMAL STR LOKUSLARININ ANALİZİ

Otozomal STR lokuslarının tanımlanması için AmpFISTR™ Identifiler™ Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Amplifikasyon reaksiyonları Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystem) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri ABI 3130 otomatik kapiller elektrofrez (Applied Biosystems) cihazında yürütülmüştür.

DİZİ ANALİZİ

PCR ürünlerinin PCR saflaştırma kiti (Qiagen, CA, ABD) ile saflaştırılması sonrası BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ABD) ile dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi parametreleri Tablo 4'de gösterilmektedir. Dizileme reaksiyonu sonrası saflaştırmada Sephadex®G-50 (Sigma Aldrich) kullanılmıştır. Saflaştırma sonrası ürünler 36 cm'lik kapiler ve POP-7 polimeri ile ABI 3130 Genetik Analiz Cihazında (Applied Biosystems, ABD) yürütülmüştür (13,2 kV'da 12 sn'lik enjeksiyon süresi). Yüksek kaliteli veriler sağlamak için, dizileme hem ileri hem de geri reaksiyonlarda gerçekleştirilmiştir. mtDNA dizilerine ait elektrofrogramların bulunduğu ABI dosyaları Sequencher

TABLO 4: Dizi analiz parametresi

96°C	1 dk	
96°C	5 sn	35 döngü
50°C	4 dk	
4°C	∞	

v5.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, ABD) bilgisayar programında mtDNA'nın revize edilmiş Cambridge Referans Dizisi (rCRS) ile karşılaştırılmıştır.¹³

BULGULAR

Referans örneklerde primerlerin optimum yapışma sıcaklıklarını belirleyebilmek amacıyla uygulanan 55, 56, 57, 58 ve 60°C'lerden oluşan 5 ayrı yapışma sıcaklığı test edildiğinde, elektroforez sonuçlarına göre tüm primerler için 58°C sıcaklığın verimli bir amplifikasyon ürünü elde etmek için uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle multipleks amplifikasyonlar için bu yapışma sıcaklığı kullanılmıştır.

Tekli PCR reaksiyonlarının ardından midipleks PCR için 2 set (midipleks I, midipleks II) minipleks PCR için 3 set (minipleks I, minipleks II, minipleks III) olacak şekilde multipleks PCR setleri oluşturulmuştur. Takiben multipleks PCR setleri için optimal amplifikasyon ürünü elde edebilmek için uygun primer konsantrasyonları belirlenmiştir.

Rutin adli laboratuvarlarda kullanılan standart kontrol DNA'dan 9947A'dan (0.1 ng/μL) (Thermo Fisher Scientific, ABD) 0.1 ng'nın referans DNA olarak kullanıldığı multipleks optimizasyon çalışmasında gereç ve yöntemde aktarıldığı şekilde farklı primer konsantrasyonları test edilmiştir.¹⁴ Multipleks amplifikasyon kontrolleri %5'lik agaroz jelde yapılmıştır. Pozitif amplifikasyon ürünü olan örneklerin dizi analizi yapılarak amplifikasyon ürününün doğruluğu kontrol edilmiştir. Amplifikasyon ürünü gözlenen örneklerde dizi analizi aşamasına geçilerek amplifikasyon ürünlerine ait DNA dizilerinin doğruluğu kontrol edilmiştir.

DNA dizilemenin doğruluğunu kontrol etmek için yeni primer setleri ile elde edilen sonuçlar daha önce rutin analizlerde kullanılan primer setiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.¹⁵ Bu amaçla rutin analizlerde çalışılan 8 kan örneğine ait veriler kullanılmıştır. Teste dâhil edilen tüm örneklerde dizi analizi sonucu uyumlu bulunmuştur.

Çalışmada bu aşamada aynı örnek tipi (kontrol DNA 9947A) farklı bir zamanda tekrar analiz edilerek tekrarlanabilirliği test edilmiştir. Her 2 dizi analizi sonucu arasında nitelik açısından farklılık

bulunmamıştır. Tablo 5'te kontrol DNA 9947A'nın rCRS'den farklılıkları sıralanmıştır.¹⁴

Çalışmada, spesifik mtDNA ölçümü yapılamadığından seyreltme deneyleri 9947A ile yapılmış olup total DNA miktarı üzerinden bir tahmini mitokondriyal DNA seyreltme çalışması yapılmıştır. Seyreltme deneylerinde 0,00625 ng total DNA ile yapılan analizlerde 175 RFU üzerinde sonuçlar alınmıştır. Taze örneklerle multipleks setlerin optimizasyonu sağlandıktan sonra, belirlenen multipleks primer setlerinin ileri derecede bozunmuş iskelet kalıntılarına ait DNA örneklerinde etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla 14 iskelet kalıntısına ait 4 diş ve 10 femur kemiğine ait DNA örnekleri kullanılmıştır. Bu örneklerden 8'inde rutin analizlerde kullanılan 15 otozomal STR lokusuna (CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA) ve cinsiyet belirteci Amelogenine ait tüm STR profili tanımlanabilmiş iken, 3 örnekte kısmi başarı, kalan 3 örnekte ise hiçbir STR lokusu tanımlanamamıştır. STR lokusu allelleri tanımlanan tüm örneklerde hem midipleks hem de minipleks primer setleri ile mtDNA dizi analizi sonuçları başarılı olmuştur. STR analizinin kısmen başarılı olduğu 3 örnekte minipleks primer seti ile dizi analizi başarı oranı %100 iken, midipleks sette P22 primeri dışında tüm primerlerle başarı oranı %100'dur. Midipleks sette bulunan P22 primeri ile başarı oranı %66 hesaplanmıştır.

STR lokusu allellerinden hiçbirinin tanımlanamadığı grupta yer alan 3 örnekte ise minipleks primer seti ile elde edilen dizi analizi sonuçlarının midipleks primer seti ile elde edilenden daha başarılı olduğu gözlenmiştir. Bu örneklerde midi set ile bir

TABLO 5: 9947A mtDNA dizi analizi sonucu

(rCRS'den farklılıklar)
16311C
16519C
93G
195C
214G
263G
309,1C
309,2C
315,1C

TABLO 6: Çalışma yapılan biyolojik materyallerin özellikleri

Özellik	STR sonuç (Identifiler Plus kit)	Mini çok katlı set	Midi çok katlı set
1 Ölüm yaşı-85, mezarda kalma süresi: 5 yıllık kemik örneği	+	+	+
2 Ölüm yaşı-87, 3 yıllık diş örneği	+	+	+
3 Ölüm yaşı-80, 45 yıllık diş örneği	+	+	+
4 Ölüm yaşı-74, 9 yıllık kemik örneği	+	+	+
5 Ölüm yaşı-92, 23 yıllık kemik örneği	Sonuç yok	+	P12 sonuç yok
6 Ölüm yaşı-84, 23 yıllık kemik örneği	Sonuç yok	+	+
7 Ölüm yaşı-93, 3 yıllık kemik örneği	+	+	+
8 Ölüm yaşı-81, 6 yıllık kemik örneği	+	+	+
9 Eski kemik örneği	Tanımlanamayan STR lokusları (D7S820,D3S1358, D13S317,D5S818, FGA)	+	P22F sonuç yok
10 Ölüm yaşı-46, 10 yıllık diş örneği	+	+	+
11 Ölüm yaşı-61, 39 yıllık kemik örneği	Tanımlanamayan STR lokusları (D1S1656,D12S391)	+	+
12 Ölüm yaşı-86, 12 yıllık kemik örneği	Tanımlanamayan STR lokusları (D10S1248,D1S1656,D12S391)	+	+
13 Ölüm yaşı-24, 22 yıllık diş örneği	+	+	+
14 Ölüm yaşı-22, 68 yıllık kemik örneği	Sonuç yok	M11, M13, M21, M23, M31, M15 sonuç yok	Sonuç yok

İlgili sette bulunan tüm markırların tanımlanması + olarak belirtilmiştir

örnekte tam sonuç, bir örnekte kısmi sonuç (P12 primeri ile başarısız) alınırken, bir örnekte hiç sonuç alınamamıştır. Minipleks sette ise 2 örnekte tam sonuç alınırken, bir örnekte (68 yıllık iskelet kalıntısından alınan femur kemiği) kısmi başarı elde edilmiştir. Çalışılan 4 diş ve 10 femur kemiğine ait STR lokusu analizi sonuçları, midipleks ve minipleks PCR sonuçları, Tablo 6'da; midipleks ve minipleks setlerinin başarı yüzdeleri Tablo 7'de aktarılmıştır.

TARTIŞMA

Kitlesel felaketler, kayıp olgular, şiddet suçları ve terör eylemleri gibi adli olaylarda yapılan kimliklendirme çalışmalarında STR ve tek nükleotid polimorfizmi analizleri yanında mtDNA'ya dayalı analizler de yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek mutasyon oranı, rekombinasyon özelliğinin olmayışı, stabilite ve hücre başına çok sayıda genom kopyası bulunması gibi özellikleri nedeniyle mtDNA iskelet kalıntıları, mumyalaşmış doku gibi yüksek oranda bozunmuş adli örneklerin identifikasyonunda oldukça değerli olduğunu kanıtlamıştır.⁶

Tüm mtDNA dizi analizinin tanımlandığı 1981 yılından itibaren mtDNA dizisinin analizinde çok çe-

TABLO 7: Minipleks ve midipleks başarı yüzdeleri

Primer Seti	Çalışılan örnek sayısı	mtDNA sekans başarı yüzdesi
M11	14	13 (%92,8)
M13	14	13(%92,8)
M21	14	13 (%92,8)
M23	14	13 (%92,8)
M12	14	14 (%100)
M14	14	14 (%100)
M22	14	14 (%100)
M31	14	13 (%92,8)
M15	14	13 (%92,8)
M32	14	14 (%100)
P11	14	13 (%92,8)
P13	14	13 (%92,8)
P22	14	12 (%85,7)
P12	14	12 (%85,7)
P21	14	13 (%92,8)
P31	14	13 (%92,8)

şitli yöntemler kullanılmıştır.⁵ İkinci ve üçüncü nesil dizileme teknolojileri olarak adlandırılan yeni nesil dizileme teknolojileri ile her geçen gün daha hassas ve yüksek çıktılı sonuçlar alınmaktadır. Bununla birlikte, yeni nesil dizileme teknolojileri günümüz koşullarında en azından ülkemiz için pahalı

uygulamalar olması sebebiyle, adli laboratuvarlarda rutin uygulamalara geçişinin uzun zaman alacağı tahmin edilmektedir. Yeni nesil dizileme teknolojilerinin gelişmiş ve gelişmekte olan tüm adli laboratuvarlarda bulunan otomatik kapiler elektroforez teknolojilerine alternatif olabilmesi için cihaz maliyetinin düşmesi gerekmektedir.

Adli DNA laboratuvarlarında rutinde kullanılan STR belirteçlerine dayalı DNA analizinin başarısız olduğu ileri derecede bozunmuş DNA örneklerinde veri elde edebilmek için adli DNA laboratuvarlarının mevcut alt yapısından yararlanmanın daha işlevsel olacağı düşünülmüştür. Bu çalışmada tercih edilen klasik Sanger yönteminde rutin adli genetik laboratuvarında kullanılan cihazlar kullanıldığından ek bir cihaz alımına gerek yoktur.

Geleneksel protokolle mtDNA analizleri, mtDNA kontrol bölgesinin aşırı değişken segmentleri HV-I, HV-II ve HV-III'ün amplifikasyonunu ve dizi analizini içerir. Primerler ile genellikle her bir bölgede 300-400 bp'lik parça boyutları amplifiye edilir. Bu durum yüksek oranda bozunmuş numunelerde zayıf veya başarısız amplifikasyona neden olabilir. Bu nedenle degradasyon oranı yüksek adli biyolojik örnekler için alternatif primer çiftleri kullanılarak midi ve mini amplikonlar üretilebilir ve bu polimorfik bölgelerin analizi yapılabilir. Ancak bu yaklaşım hem maliyeti hem de iş gücünü önemli ölçüde artırmaktadır. Bu dezavantajın ortadan kaldırılması için multipleks PCR çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde, birbiri ile örtüşen 10 primer çifti ile ileri derecede bozulan örneklerde mtDNA kontrol bölgenin başarı ile analiz edilebildiği, ancak hem maliyetin hem de iş gücünün arttığı belirtilmiştir. Bu nedenle Eichmann ve ark., en azından bozunma seviyesi daha az örnekler için kullanılabileceğini belirttikleri ve 5 primer çifti ile amplikon uzunlukları 250-450 bp arasında olan yeni bir multipleks önermişlerdir.¹⁶ Bu çalışmalardan esinlenerek yapılan bir başka çalışmada da mtDNA'nın en polimorfik bölgesi olan HV-I, HV-II ve HV-III segmentlerini içine alacak şekilde alternatif primer setleri tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler ile de hem midi-primer seti hem de mini-primer seti oluşturulmuştur. Tasarlanan multipleks midi ve mini primer setleri ile hem standart örneklerde hem de ileri derecede bozunmuş iskelet

kalıntılarında başarılı sonuçlar alınabildiği bildirilmektedir.^{17,18} Bu çalışmada, mtDNA'daki polimorfik varyasyonların tanımlanabilmesi ve identifikasyon etkinliğinin artırılması için çok değişken 3 bölgenin amplifikasyonuna dayalı midi ve mini primer setleri tercih edilmiştir.

Multipleks setler oluşturulmadan önce primerlerin çalışıp çalışmadığı, en uygun primer yapışma sıcaklığı gibi parametreleri değerlendirmek amacıyla tekli amplifikasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Tekli PCR ürünlerinin amplifikasyon kontrolleri %1,5'lik agaroz jellerde yapılmıştır. Tekli reaksiyonlarda multipleks amplifikasyona en uygun primer yapışma sıcaklığının 58 °C olduğu saptanmıştır.

Çalışmada kullanılan multipleks primer setleri ile mtDNA HV segmentlerini amplifiye etmek için biyolojik örnek başına 2 veya 3 amplifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Monopleks bir reaksiyonda bu sayı midi-primer seti için 6, mini primer seti için 10'dur.

Multipleks PCR ürünlerinin amplifikasyon kontrolü için yüksek rezolüsyonlu agaroz jeller kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan midipleks amplikon uzunlukları midipleks I için 227 bp ile 267 bp arasında olup, amplikonlar arasındaki uzunluk farkları 20'şer bp, midipleks II için 229 bp ile 267 bp arasında olup, amplikonlar arasındaki uzunluk farkları sırası ile 11 ve 27 bp'dir. 142 bp ile 185 bp arasında baz uzunluğuna sahip minipleks seti içindeki grupların kendi içinde amplikon uzunlukları arasında ortalama 12 bp'lik fark vardır. Bu uzunluk farklılıkları onların normal olarak multipleks PCR reaksiyonu sonrası poliakrilamid jel elektroforezi ile net olarak ayırt edilebilmesine olanak sağlarken, yüksek rezolüsyonlu agaroz jelde kısmi ayırım sağlamıştır. Bu çalışmada multipleks PCR ürünleri laboratuvar olanakları kısıtlı olduğundan %5'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Daha iyi bir rezolüsyon için poliakrilamid jellerin kullanılması daha uygun olacaktır. Midipleks ve minipleks setlerle oluşturulan amplikonların %5'lik agaroz jelde elde edilen görüntüsü sıra ile Resim 2 ve Resim 3'te gösterilmektedir.

Bu çalışmada spesifik mtDNA ölçümü yapılmadığından seyreltme deneyleri 9947A ile yapılmış olup, total DNA miktarı üzerinden bir seyreltme ça-

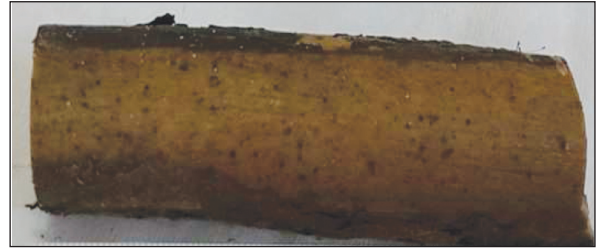
lışması yapılmıştır. 0,1 ng DNA içinde ortalama 2.900 kopya mtDNA varlığı kabul edilmiştir.^{19,20} 0,2ng-0,00625 ng arasında DNA konsantrasyonları ile yapılan deneysel çalışmalarda seyreltme yapılan en düşük seviye olan 0,00625 ng DNA ile ABI3130 genetik analiz cihazı için önerilen 175 RFU üzerinde pik yükseklik seviyesine ulaşılmıştır.

Taze kan örneklerine ait DNA ile optimizasyonu yapılan multipleks reaksiyonların, iskelet kalıntılarından izole edilen degrade DNA örneklerinde etkinliğini araştırmak amacıyla 4'ü dış 10'u femur kemiğine ait genomik DNA örnekleri kullanılmıştır. Bu örneklerden 8'inde rutin analizlerde kullanılan 15 otozomal STR lokusu (CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA ve cinsiyet belirteci amelogenin) ile başarılı bir şekilde analiz edilebilirken, 3 örnekte kısmi başarı elde edilmiştir. Üç örnekte ise hiçbir STR lokusu tanımlanamamıştır. STR lokusu allelleri tanımlanan tüm örneklerde beklenildiği gibi hem midipleks hem de minipleks primer setleri ile yapılan mtDNA dizi analizi sonuçları başarılı olmuştur. STR analizinin kısmen başarılı olduğu 3 örnekte minipleks primer seti ile dizi analizi başarı oranı %100 iken, midipleks sette P22 primeri dışında tüm primerlerle başarı oranı %100'dür. Bu örneklerden birinde P22 ile dizi analizi başarısız olmuştur.

STR lokusu allellerinden hiçbirinin tanımlanamadığı 3 örnekte yapılan analiz sonuçları karşılaştırıldığında; beklenildiği gibi minipleks primer seti ile yapılan analiz sonuçlarının, midipleks primer set ile elde edilen sonuçlara göre daha başarılı olduğu gözlenmiştir. Bir örnekte midipleks primer seti ile hiç sonuç alınamazken, 68 yıllık iskelet kalıntısına ait femur olan bu örnekte minipleks sette kısmi başarı elde edilmiştir. Kemik bütünlüğünün bozunma sürecinde kişinin yaşı yanında zaman ve ortam koşulları da önemli faktörlerdendir. 68 yıllık bu örnekte olgu 22 yaşında olmasına rağmen temizlenen kemik parçası parmak arasında ufalanıp toz hâline gelecek kadar bozunmuştu. Bu çalışma için esinlenen literatürde ise Kore Ulusal Müzesinde saklanan 500 yıllık iskelet kalıntılarında minipleks primer seti ile başarılı sonuç alınabildiği belirtilmiştir.¹⁸ Bu arkeolojik kalıntıların bulundukları ortam koşullarının, büyük ola-

sıkla biyolojik materyallerin korunması için uygun soğuk ve kuru hava koşullarına sahip olabileceği düşünülmüştür. İngiltere'de yapılan bir başka çalışmada da Kral 3. Richard'a ait olduğu belirtilen iskelet kalıntılarında 150-250 bp arasında ampikon üreten multipleks setlerle dizi analizi yapılabilmektedir. Böylece 527 yıllık bu olgu bugüne kadar bilinen en eski DNA tanımlama çalışması olarak kayda geçmiştir.

Ortam sıcaklığı, nem gibi çevresel koşullar kemiğin bozunma hızını etkileyen önemli faktörlerdir. Ortam ısısı topraktaki bakteriyel aktivasyonu arttırarak kemiğin yapısının daha çabuk bozunmasına neden olmaktadır. Soğuk iklimlerde gömülü kemiklerde bu bozunma çok daha yavaş olacaktır. Yine mezarların sık sık sulanması da kemiklerin bozunma hızını artıran bir faktördür. Sık sulama ile sürekli nemli kalan topraktaki bakterilerin aktivasyonu arttığından kemik yapının bozunması da artmaktadır. Resim 4'te soğuk iklimde gömülü 74 yaşında ölmüş, 9 yıllık kemik örneğine ait bir fotoğraf yer alırken, Resim 5'de sıcak ve nemli iklimde gömülü 69 yaşında ölmüş, 7 yıllık kemik örneğine ait bir fotoğraf yer almaktadır.



RESİM 4: Soğuk iklimde gömülü 74 yaşında ölmüş, 9 yıllık kemik örneği



RESİM 5: Sıcak iklimde gömülü 69 yaşında ölmüş, 7 yıllık kemik örneği

SONUÇ

Adli olgularda çoğu zaman istenilen miktarda materyal olmadığından minimum örnekten maksimum verim alabilmenin yolları araştırılmalı ve uygulanmalıdır. Bu çalışmada, monopleks ve multipleks reaksiyonlar için aynı miktarlarda örnek kullanıldığından tasarlanan multipleks amplifikasyon reaksiyonları sınırlı miktarlardaki adli biyolojik örnekler için bir avantaj olacaktır.

Multipleks amplifikasyon reaksiyonları kullanılan örnek miktarını azaltması yanında, örnek başına gereken iş gücünü, işlem süresini ve maliyeti de önemli ölçüde azaltmaktadır. Reaksiyon tüpleri, pipet uçları, kimyasal malzemeler ve cihaz kullanımında da önemli ölçüde tasarruf sağlanmaktadır.

Çalışmada test edilen olgu sayısı nispeten az olmakla birlikte, oluşturulan multipleks setlerin degrade adli biyolojik örneklerin analizinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak rutin DNA analizi yapılan merkezlerde ek bir cihaza gereksinim olmadan mevcut alt yapı

olanakları ile ileri derecede bozunmuş örneklerde, mtDNA dizi analizi için tasarlanan multipleks primer çiftleri ile identifikasyona dayalı veri üretilebilecektir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje no: TYL-2019-12268) desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Peter Matovu, Hüsnüye Canan, Ayşe Serin; **Tasarım:** Peter Matovu, Hüsnüye Canan, Ayşe Serin; **Denetleme/Danışmanlık:** Ayşe Serin; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Peter Matovu, Hüsnüye Canan, Ayşe Serin; **Analiz ve/veya Yorum:** Peter Matovu, Hüsnüye Canan, Ayşe Serin; **Kaynak Taraması:** Peter Matovu, Hüsnüye Canan, Ayşe Serin; **Makalenin Yazımı:** Peter Matovu, Hüsnüye Canan, Ayşe Serin; **Eleştirel İnceleme:** Ayşe Serin.

KAYNAKLAR

1. Wilson MR, Stoneking M, Holland MM, DiZinno JA, Budowle B. Guidelines for the use of mitochondrial DNA sequencing in forensic science. Crime Lab Digest 1993;20:68-77. <https://www.ojp.gov/ncjrs/virtual-library/abstracts/guidelines-use-mitochondrial-dna-sequencing-forensic-science>
2. Sullivan KM, Hopgood R, Gill P. Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. Int J Legal Med. 1992;105(2):83-6. PMID: 1520642.
3. Berger C, Parson W. Mini-midi-mito: adapting the amplification and sequencing strategy of mtDNA to the degradation state of crime scene samples. Forensic Sci Int Genet. 2009;3(3):149-53. PMID: 19414161.
4. Gabriel MN, Huffine EF, Ryan JH, Los CW, Yang NCS, Holland MM, et al. Improved strategies for mtDNA sequence analysis of highly degraded forensic remains. 2000. <https://www.promega.ro/~media/files/resources/conference%20proceedings/ishi%2010/oral%20presentations/36gabriel.pdf>
5. Amorim A, Fernandes T, Taveira N. Mitochondrial DNA in human identification: a review. PeerJ. 2019;7:e7314. PMID: 31428537; PMCID: PMC6697116.
6. Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2003;4:119-41. PMID: 14527299.
7. Guo X, Wang Y, Zhang R, Gu Z. STAMP: a multiplex sequencing method for simultaneous evaluation of mitochondrial DNA heteroplasmies and content. NAR Genom Bioinform. 2020;2(4):lqaa065. PMID: 33134911; PMCID: PMC7573736.
8. Carracedo A, Bär W, Lincoln P, Mayr W, Morling N, Olaisen B, et al. DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. Forensic Sci Int. 2000;110(2):79-85. PMID: 10808096.
9. QIAGEN. QIAquick PCR Purification Kit. 2008.
10. BIO-RAD. InstaGene Matrix.
11. Technologies L. Qubit® dsDNA HS Assay Kits. 2015.
12. Kim NY, Lee HY, Park SJ, Yang WI, Shin KJ. Modified midi- and mini-multiplex PCR systems for mitochondrial DNA control region sequence analysis in degraded samples. J Forensic Sci. 2013;58(3):738-43. PMID: 23406419.
13. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nature Genetics 1999;23(2):147-7. doi: 10.1038/13779.
14. Levin BC, Cheng H, Reeder DJ. A human mitochondrial DNA standard reference material for quality control in forensic identification, medical diagnosis, and mutation detection. Genomics. 1999;55(2):135-46. PMID: 9933560.
15. Serin A, Canan H, Alper B, Korkut Gulmen M, Zimmermann B, Parson W. Mitochondrial DNA control region haplotype and haplogroup diversity in South Eastern Turkey. Forensic Sci Int Genet. 2016;24:176-9. PMID: 27479879.
16. Eichmann C, Parson W. 'Mitominis': multiplex PCR analysis of reduced size amplicons for compound sequence analysis of the entire mtDNA control region in highly degraded samples. Int J Legal Med. 2008;122(5):385-8. PMID: 18369655.

-
17. Berger C, Parson W. Mini-midi-mito: adapting the amplification and sequencing strategy of mtDNA to the degradation state of crime scene samples. *Forensic Sci Int Genet.* 2009;3(3):149-53. PMID: 19414161.
 18. Kim NY, Lee HY, Park SJ, Yang WI, Shin KJ. Modified midi- and mini-multiplex PCR systems for mitochondrial DNA control region sequence analysis in degraded samples. *J Forensic Sci.* 2013;58(3):738-43. PMID: 23406419.
 19. ThermoFisher. Precision ID mtDNA panels with the HID ion S5™/HID ion GeneStudio™ S5 system application guide. 2021. https://assets.thermo-fisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017770_PrecisionID_mtDNA_Panels_S5_UG.pdf
 20. Obal M, Zupanc T, Zupanič Pajnič I. Measure quantity of mitochondrial DNA in aged bones or calculate it from nuclear DNA quantitative PCR results? *Int J Legal Med.* 2023;137(6):1653-9. PMID: 37558822; PMCID: PMC10567894.
 21. King TE, Fortes GG, Balaresque P, Thomas MG, Balding D, Maisano Delser P, et al. Identification of the remains of King Richard III. *Nat Commun.* 2014;5:5631. PMID: 25463651; PMCID: PMC4268703.

ARTICLE IN PRESS