

# Adli Amaçlı Kimliklendirmede Mitokondriyal DNA

## Mitochondrial DNA in Forensic Identification: Review

Ayşe SERİN,<sup>a</sup>  
Hüsnüye CANAN,<sup>a</sup>  
Behnan ALPER<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Adli Tıp AD,  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Adana

Geliş Tarihi/Received: 15.08.2012  
Kabul Tarihi/Accepted: 04.02.2013

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Ayşe SERİN  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Adli Tıp AD, Adana,  
TÜRKİYE/TURKEY  
ayserin@yahoo.com

**ÖZET** İnsan hücreleri, hücre sitoplazmasında bulunan mitokondriler içerisinde, nükleer DNA genomuna ilaveten, ekstra kromozomal genetik materyaller taşımaktadır. İnsan mitokondriyal DNA (mtDNA) polimorfizmleri, evlasyon antropoloji ve popülasyon tarihi, tıbbi genetik ve adli amaçlı kimliklendirmeyi içeren birçok alanda tanınan araçlar olarak kullanılmaktadır. mtDNA biyolojik örneklerin kaynağının belirlenmesi veya kimliklendirilmesinde kullanılacak faydalı bilgiler içermektedir. Kodlamayan kontrol bölgesinde bulunan 2 hipervariabl bölgedeki çok sayıda nükleotid polimorfizmi ve dizi varyasyonları ve kodlanan bölgedeki tek nükleotid polimorfizmleri, bireyler arasında ve/veya biyolojik örnekler arasında ayırım yapabilme şansı yaratmaktadır. mtDNA'ların polimorfik doğası ve maternal kalıtım göstermesi nedeniyle kayıp kişiler ile savaşta görev yerinde ölmüş askerlerin ya da kitlesel felaketlerde hayatını kaybetmiş kimliği meçhul vücut parçalarının kimliklendirilmesi ile kriminal olaylara karışmış kişilerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Örnek miktarının çok az olduğu ve/veya aşırı derecede bozulmuş olduğu biyolojik örneklerde mtDNA elde etme olasılığı nükleer DNA'dan daha yüksek olduğundan, bu tip materyallerde mtDNA analizi daha etkin bir araştırma aracıdır. Bu derleme, mtDNA genomunun yapısı, kalıtımı, kopya sayısı, mtDNA genomundaki polimorfizmler ve tanınan metotlar ve bunların adli bilimlerdeki uygulamaları hakkında bilgi sunmaktadır. Bununla birlikte, mtDNA'nın adli amaçlı kimliklendirmedeki yeri ve önemi de vurgulanmaktadır. Ayrıca, bu çalışmada mtDNA mutasyon oranında saptanan heterojenite, delilin gücü, mtDNA profillerinden coğrafik bölge tahmini yapabilme ve ilgili popülasyonlarda tanımlanan polimorfizmlerden güvenilir ve anlamlı referans veri tabanlarının oluşturulması da tartışılmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** DNA, mitokondriyal; adli genetik; polimorfizm, tek nükleotid

**ABSTRACT** Human cells contain extra chromosomal genetic elements within the mitochondria in cell cytoplasm, in addition to the nuclear DNA genome. Human mitochondrial DNA (mtDNA) polymorphisms are widely used as diagnostic tools in many fields, including evolutionary anthropology and population history, medical genetics, and forensic identification. mtDNA contains useful information that can be used to identify or determine the source of biological specimens. The high number of nucleotide polymorphisms or sequence variants in the 2 hypervariable regions of the non-coding control region, and single nucleotide polymorphisms in the coding region facilitate discrimination between individuals and/or biological samples. mtDNA's polymorphic nature and maternal inheritance are characteristics that have enabled its use for identification of body parts of missing persons, soldiers killed in the line of duty, victims of natural disasters and individuals participated in criminal cases. As the probability of recovering mtDNA in small and/or degraded biological samples is greater than that of nuclear DNA, it is a more effective research tool. This review presents a brief overview of the structure of the human mitochondrial genome, polymorphisms in the genome, and diagnostic methods, as well as their application in forensic science. In addition, the importance of the role of mtDNA in forensic science is highlighted. mtDNA mutation-rate heterogeneity and the weight of evidence, inference of the geographic origin of an mtDNA profile, and the creation of reliable and meaningful reference databases were also discussed.

**Key Words:** DNA, mitochondrial; forensic genetics; polymorphism, single nucleotide

İnsanda, nükleer DNA genomuna ek olarak mitokondriler içinde de ilave genetik materyaller bulunmaktadır. Mitokondriyal DNA (mtDNA), adli kimliklendirmeyi, tıbbi genetiği, populasyon çalışmalarını ve antropolojiyi içeren çok çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.<sup>1-7</sup>

Adli amaçlı kimliklendirme çalışmaları ile nesep tayini araştırmalarında nükleer DNA analizi, en etkili ve en güvenli yoldur. Ancak, adli biyologlar bazen nükleer DNA analizi yapılamayan adli biyolojik örneklerle karşı karşıya kalmaktadır. Bu tip örneklerde mtDNA'dan faydalanılmaktadır. Nükleer DNA elde edilemediği için analizi yapılan en yaygın biyolojik örnekler, köksüz kıl, kemik, diş ve feçestir.<sup>1-3,8-10</sup>

### mtDNA'NIN YAPISI

Mitokondriler sitoplazmada bulunan ve oksidatif enerji metabolizmasında rol alan hücre içi organellerdir. Oksidatif fosforilasyon için ihtiyaç duyulan proteinleri kodlayan, endosymbiotik orijin ile uyumlu olan kendi DNA'larına sahiptirler. mtDNA endosymbiotik orijini yansıması bakımından nükleer DNA'dan farklı özelliklere sahiptir. mtDNA'nın nükleer DNA'dan farklılıkları sitoplazma içinde doku tipine bağlı olarak 100'den 10 000'lere ulaşan yüksek kopya sayısına sahip olması, mayotik rekombinasyon özelliğinin olmayışı ve maternal kalıtım göstermesi olarak sınıflandırılabilir.<sup>11-14</sup>

İnsan mtDNA'sının tüm sekansı ilk kez 1981 yılında Anderson ve ark. tarafından bildirilmiştir.<sup>15</sup> İnsanda mtDNA genomu 16 569 baz çifti (base pair; bp)'nden oluşan kapalı sirküler halka şeklindeki çift zincirli bir yapıya sahiptir. Mevcut zincirler, dansiteleri dikkate alınarak ağır zincir (Heavy-chain; H-strand) ve hafif zincir (Light-chain; L-Strand) adını almaktadır. Ağır zincir daha çok Guanin ve Adenin bazı, hafif zincir ise Timin ve Sitozin bazı içermektedir. Replikasyon spesifik orijindeki ağır zincirin öncülüğünde başlar. MtDNA'da bulunan 37 gen 13 protein, 2 ribozomal RNA (rRNA) ve 22 transfer RNA (tRNA)'yı kodlamaktadır. MtDNA genomu prolin (tRNA<sup>pro</sup>) ve fenilalanin (tRNA<sup>phe</sup>) tRNA'ları arasında tek kopya kodlanmayan DNA bölgesi içermektedir.<sup>11,16</sup> mtDNA'nın yaklaşık 1125

bp'lik kodlanmayan bu bölgesi kontrol bölge veya "displacement loop" (veya kısaca D-loop) olarak adlandırılmaktadır.<sup>17,18</sup> Bu bölge ağır zincirin sentezi için replikasyonun orijini kabul edilen regülatör bölge özelliği yanında, her iki zincirin transkripsiyonunda da öncü görevi üstlenmektedir.<sup>14,19-21</sup>

### mtDNA'NIN KALITIMI VE KOPYA SAYISI

mtDNA maternal kalıtım göstermektedir.<sup>12,22,23</sup> Maternal kalıtımın nedeni tam olarak açıklanamakla birlikte, oosit mitokondrilerinin sayısal olarak sperm mitokondrilerinden çok fazla olması nedeni ile embriyogenezin ilk aşamasında (4-8 hücreli aşama) ovum içine girebilen birkaç tane sperm mitokondrisinin 100 000'lerce ovum mitokondrisi arasında dilüe olması ve/veya sperm mitokondrilerinin spesifik bir tanıma mekanizması ile tanınarak elimine edilmesi sonucu oluşabileceği düşünülmektedir.<sup>22-24</sup>

mtDNA'nın bir başka özelliği, kopya sayısının çok yüksek olmasıdır. Her diploid hücrede iki kopya nükleer DNA bulunurken, somatik hücrelerde doku tipine bağlı olarak yaklaşık 200-1700 arasında mtDNA kopyası bulunmaktadır.<sup>9</sup> Bu miktar ovumda 100 000'e kadar ulaşmaktadır.<sup>25,26</sup> mtDNA'nın bu oransal çoğunluğu aşırı derecede parçalanmış DNA örneklerinden mtDNA elde etme şansını önemli ölçüde yükseltmektedir.

### mtDNA'DA POLİMORFİZM

mtDNA'da transisyon, transversiyon, insersiyon veya delesyon tipi mutasyonlar sonucu uzunluk ve sekans polimorfizmleri oluşmaktadır.<sup>18,27</sup> Oluşan polimorfik varyasyonların oranı nükleer DNA'ya oranla çok yüksektir. mtDNA'nın nükleer DNA'ya oranla 10 kat daha hızlı evrim geçirdiği ifade edilmektedir. Bu evrim oranı populasyon genetiği ve filogenetik analizlerde olduğu kadar, adli analizlerde de mtDNA ile araştırma şansı yaratmaktadır.<sup>20,21,28</sup> Bazı çalışmalarda sekans farklılaşmasının her yıl  $20 \times 10^{-9}$  oranında olduğu belirtilirken, bazı farklı çalışmalarda bu oranın çok daha yüksek olduğu ifade edilmektedir.<sup>20,21,24,28,29</sup> Mutasyon oranı tüm mtDNA molekülü boyunca aynı değildir. 1,1 kb'lık D-loop bölgesinin 15,5 kb'lık kodlanan böl-

geye oranla 10 kat daha yüksek mutasyona uğradığı belirtilmektedir.<sup>30,31</sup>

İnsan mtDNA'sının en polimorfik bölgesi D-loop bölgesidir.<sup>20,21,28</sup> mtDNA'nın D-loop bölgesinde tanımlanan varyasyonların genel olarak üç ayrı polimorfik bölgede yoğunlaştığı saptanmıştır. Bunlardan; 16 024-16 365 nükleotid pozisyonları arasında bulunan bölge "Hypervariable region I (HVRI)", 73-340 nükleotid pozisyonları arasında bulunan bölge "Hypervariable region II (HVRII)" ve 438-574 nükleotid pozisyonları arasında bulunan bölge "Hypervariable region III (HVRIII)" olarak tanımlanmıştır.<sup>11,17,27,29</sup>

Toplam 342 bp uzunluğundaki HVRI'nin şimdiki kadar en yüksek polimorfik dansiteye sahip olduğu, bunu sırası ile 268bp'lik HVRII bölgesi ve 137 bp'lik HVRIII bölgesinin takip ettiği belirtilmektedir. Hipervariabl bölgeler arasında bulunan segmentlerde ise polimorfizm oranının daha düşük olduğu ifade edilmektedir.<sup>15</sup> Bu nedenle adli analizlerde genellikle HVRI ve HVRII bölgeleri tercih edilmektedir.<sup>11,17,29</sup>

D-loop bölgesinde insersiyon ve delesyon sayısının az olması nedeniyle insan mtDNA'sının uzunluk varyasyonlarının sınırlı olduğu ifade edilmektedir.<sup>32</sup> Bu bölgede bulunan uzunluk polimorfizmlerinin ise genellikle ardı ardına Sitozin tekrarından oluşan homopolimerik bölgelerde bulunduğu gözlenmiştir. Bu homopolimerik bölgeler 302-309, 573-576 ve 16 183-16 189. nükleotidler arasındadır.

mtDNA'nın kontrol bölgesindeki sekans varyasyonları yanında, son dönemlerde, kodlanan bölgedeki tek nükleotid polimorfizm [single nucleotide polymorphisms (SNP)]'ler de adli amaçlı kullanılmaya başlanmıştır.<sup>33,34</sup> Tüm mtDNA molekülleri üzerinde bulunan spesifik SNP'lerle insanların dünya üzerindeki göç hareketlerinin takibinin yapılabildiği ve ortak maternal atanın belirlenebildiği ifade edilmektedir. Bu bilgiler ışığında günümüz insanının geçmişinin 200 000 yıl öncesine dayandığı ve Afrika'da yaşadığı tahmin edilmektedir.<sup>35,36</sup> İnsan toplulukları, paylaşılan SNP'ler ve farklı SNP'ler dikkate alınarak haplogrup olarak adlandırılan gruplara ayrılmaktadır.

Tüm mtDNA molekülleri üzerinde bulunan ve haplogruplar için spesifik olan SNP'ler, özellikle problemlı adli olguların analizinde dışlayıcı rolü ile yol gösterici olabilmektedir.<sup>4,37</sup>

## ■ MİTOKONDRIYAL DNA POLİMORFİZMLERİNİN ADLANDIRILMASI

mtDNA polimorfizmlerinin adlandırılmasında ilk yayımlanan tüm mtDNA dizisi baz alınmaktadır.<sup>15</sup> Mitokondriyal genomdaki bazların her biri ağır zincirin orijinininden 1 numara ile başlayarak, ardışık sayı ile numaralandırılır ve baz dizisi 16 569. bazla sonlandırılır. Basitçe Anderson dizisi veya "Cambridge Reference Sequence (CRS)" olarak ifade edilir.<sup>11,38-40</sup>

1999 yılında Anderson dizisi yeniden gözden geçirilerek 11 nükleotitte değişiklik yapılmıştır. Günümüzde düzenlenen yeni dizi "revised CRS (rCRS)" adıyla anılmaktadır ve referans olarak bu dizi kullanılmaktadır.<sup>41</sup>

Genel prensip olarak, analiz edilen dizi rCRS'den farklılıklar gösteriyor ise, bu farklılıklar bir liste halinde belirtilmektedir. Daima Sitozin bazı bakımından zengin hafif zincir dikkate alınarak rapor hazırlanmaktadır. Farklılıklar aşağıdaki şekilde listelenmektedir.<sup>39,40</sup>

Örneğin, rCRS'nin 280. pozisyonunda Sitozin bazı bulunmakta iken, yeni yapılan çalışmada belirtilen sırada Timin bazı saptanır ise, o zaman baz farklılığı 280 T olarak belirtilmektedir.<sup>39</sup>

İnsersiyon ve delesyonlarda ise; örneğin 245 ve 247. baz arasındaki baz delesyona uğramış ise, bu delesyonlu pozisyon 246d olarak dizayn edilmektedir. Eğer 245 ve 246. baz arasında ilave bir Adenosin bazı gözlenir ise, bu durumda 245.1A şeklinde dizayn edilir.<sup>39</sup>

Bir homopolimerik alan içinde insersiyon oluşur ise (ardı ardına tekrarlayan Sitozin bazıları gibi), insersiyonun tam lokalizasyonu bilinmemektedir. Bu durumda insersiyonun en uç noktada olduğu varsayılmaktadır. Örneğin; 302 ve 310 nükleotidleri arasına bir Sitozinin ilavesinde, insersiyon 309.1C; iki Sitozin ilavesinde insersiyon 309.1C ve 309.2C olarak belirtilmektedir.<sup>39</sup>

Heteroplazmi varlığında, eğer nokta heteroplazmi gözlenmiş ise ve her iki bazda eşit yoğunlukta bulunuyor ise, uygun "International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)" kodları kullanılabilir. Örneğin, 152. nükleotid pozisyonunda C ve T'nin varlığı 152Y olarak dizayn edilebilir. Alternatif olarak T~C dizaynı kullanılabilir. Eğer heteroplazmi seviyesi karşılaştırılabilir ölçüde birbirinden farklılıklar gösteriyorsa ve örneğin Sitozin Timinden oransal olarak daha yüksekte ise C>T olarak düzenleme yapılabilir. Eğer iki baz da ikinci bir sekans reaksiyonu ile de belirlenemez ise, belirsiz işareti olarak N harfi kullanılır.<sup>39,42</sup>

## ADLI ANALİZ

MtDNA polimorfizmlerinin tanımlanması ilk kez 1980'li yıllarda düşük rezolüsyonlu "Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)" tekniği ile yapılmaya başlanmıştır. 1990'lı yıllara gelindiğinde tanımlanan yeni restriksiyon enzimleri ile kullanılan RFLP tekniğinin rezolüsyonu arttırılmıştır. 1991 yılından itibaren ise polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve dizi analizi metodunun gelişmesi kontrol bölgedeki HVI ve HVII bölgelerinin dizi analizi yapılmasına olanak tanımıştır ve hâlen bu teknik etkin bir şekilde kullanılmaktadır.<sup>11,25</sup>

mtDNA'nın adli amaçlı analizinde geçmişte sadece D-loop bölgesi kullanılırken, günümüzde kodlanan bölge de adli amaçlı kullanıma katılmıştır.<sup>43-45</sup> Her iki bölge için etkili analiz yöntemi birbirinden farklıdır. D-loop bölgede dizi analizi altın anahtar kabul edilirken, kodlanan bölgede, adli örneklerin yapısı dikkate alındığında, dizi analizi teknik olarak mümkün değildir. Kodlanan bölgedeki SNP'ler 15,5 kb'lık bölgede dağılmış halde bulunmaktadır. Bu kadar uzun bir bölge içine dağılmış SNP'lerin dizi analiziyle tanımlanmasının maliyetinin yüksek olması, analiz çok zor, hata yapmaya açık ve zaman alıcı olması yanında, adli örneklerin genellikle degrade örnekler olması bakımından teknik olarak imkânsızdır.

Kodlanan bölgelerdeki SNP'lerin analizinde son dönemlerde "Single Base Extension (SBE)/SNaPshot" tekniği etkin olarak kullanılmaktadır.<sup>44-47</sup> Bu teknikte, primerin 3' ucu direkt olarak hedef nükleo-

tid bazına komşudur. Seçilen oligonükleotid primer nükleik asit boyunca karşı zincirle hibridize olduktan sonra, 4 farklı flüoresan işaretli ddNTP'lerden biri ile (dNTP'siz ortamda) SNP'ye komplementer nükleotid ile tek baz uzatılır. Terminatör (ddNTP) başka nükleotid ilavesini önler. Sonuçta beklenen fragmandan bir baz daha büyük fragman oluşur. Oluşan DNA fragmanları ddNTP'lerden farklı bir flüoresan boya ile işaretli "internal size standard" varlığında büyüklük ve renk bakımından değerlendirilmek üzere otomatik kapiller elektroforezde yürütülür.<sup>48</sup>

Tüm mtDNA molekülü üzerinde bulunan ve haplogruplar için spesifik olan SNP'ler özellikle problemlili adli olguların analizinde dışlayıcı rolü ile yol gösterici olabilmektedir. Böylece ilintili olmayan örneklerin yorucu dizi analizi işlemleri yapılmadan elimine edilmesini sağlamaktadır.

Haplogrup spesifik SNP'lerle dışlanamayan örneklerde, bu kez D-loop bölgesinin dizi analizi yapılarak adli biyolojik örnekten sonuç alabilme şansı değerlendirilmiş olmaktadır.

Dizi analizinde, D-loop bölgesi uygun primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmaktadır. Çoğaltılan bölgedeki nükleotid dizisini belirlemek için alınan yeteri kadar PZR ürünü bir sonraki PZR için kalıp olarak kullanılmaktadır. İkinci PZR'de dNTP, spesifik primer, DNA polimeraz ve kalıp DNA'nın yanında ddNTP'ler de bulunmaktadır. Reaksiyonda kalıp DNA dizisine yeni bir komplementer dizi oluşturulurken, uygun kimyasal koşullarda her biri farklı flüoresan boya ile işaretlenmiş ve 3'-OH grubu olmayan ddNTP'ler her amplifikasyon reaksiyonunda DNA zincirinin sonuna bağlanarak zincirin uzamasını sonlandırmaktadır. Bu şekilde her amplifikasyon reaksiyonunda zincir bir kısalarak reaksiyon devam etmektedir. Oluşan amplifiye PZR ürünlerinin incelenmesinde tipik olarak flüoresan işaretli baz sıralarını tanıyan otomatik dizi analiz cihazı kullanılmaktadır. Dizi analizinden elde edilen bilginin doğrulanması aynı zincirin birkaç kez dizi analizinin yapılması veya forward ve reverse DNA zincirinin her ikisinin analizi ile mümkündür.<sup>2,11,40</sup> Sonuçlar rCRS'den farklılıklarla birlikte rapor edilmektedir.

Son yıllarda geliştirilen yeni nesil dizi analizi teknolojilerinin (Next Generation Sequencing Systems) kullanıldığı ön çalışmalar ise bu teknolojilerin adli mtDNA analizinde yetersiz kaldığını göstermiştir. Bu teknoloji ile yapılan çalışmalarda her örnekte en az beş mutasyonun gözden kaçırıldığı belirtilmektedir. Bu nedenle bu tekniğin rutin adli olgu analizlerinin yüksek standardını karşılamada yetersiz olduğu kabul edilmektedir.<sup>49</sup>

Fluoresanli otomatik dizi analizi pahalı ve zaman alıcı bir işlem olduğundan, birçok adli laboratuvarında mtDNA dizi analizi yapılmamaktadır. Sonuçların karşılaştırılması ve eşleşme olmayan örneklerin dışlanması için geçmişte sekans-spesifik-oligonükleotid-tiplendirme, “mini-sequencing, single-strand conformational polymorphism”, “low stringency single-specific primer PZR” ve RFLP gibi bazı maliyet düşürücü metotlar kullanılmıştır.<sup>1</sup> Ancak günümüzde haplogrup spesifik SNP’lerin SBE tekniği ile tanımlanması hem ön taramada eşleşmeyen örneklerin elimine edilmesi aşamasında hem de D-loop bölgesinin dizi analizi sonuçlarının doğruluğunun kontrolünde tercih edilmektedir. Dizi analizine ihtiyaç duyulan örnek sayısını azaltmak için eşleşmeyen örnekleri elimine etmede bu gibi tarama teknikleri kullanılabilirlikle birlikte, eşleşen örneklerde nihai hedefe ulaşmak için tüm kontrol bölgenin dizi analizinin yapılması gerekmektedir.<sup>11,25,50</sup>

## ADLI ANALİZLERDE ETKİNLİK

### AYIRIM GÜCÜ

mtDNA’nın maternal kalıtım paterni, bir maternal nesilde bütün bireyler aynı mtDNA sekansını paylaştığı için yegane bir tanımlayıcı olarak düşünülemez. Aslında, görünürde akraba olmayan kişiler bile geçmişte herhangi bir noktada bilinmeyen maternal bir akrabalığı paylaşabilirler denmektedir.<sup>1,18,51</sup> mtDNA dizilerinin ayırım gücü sadece tek bir sistem incelemesi mümkün olduğundan nükleer DNA testleri kadar yüksek değildir. Nükleer DNA testleri birçok istatistiksel şansın birlikte değerlendirilmesine izin veren multipl genetik sistemleri içermektedir. Bununla birlikte, birbiriyle ilişkisiz kişilerde her iki hipervariabl

bölgenin aynı baz sırasına sahip olma şansı ortalamaya olarak %1’den daha azdır.<sup>52</sup>

### MUTASYON ORANINDA HETEROJENİTE VE DELİLİN GÜCÜ

Adli mtDNA profilinden delilin ağırlığını ölçme ve yorumlama kompleks bir görevdir.<sup>39</sup> Aynı biyolojik kaynaktan (veya aynı maternal soya ait) olup olmadığı sorgulanan iki mtDNA profilinin karşılaştırılmasında çeşitli biyolojik değerlendirmeler dikkate alınmaktadır. Bunlardan biri mutasyon oranındaki heterojenite, diğeri heteroplazmidir.<sup>43,53,54</sup>

Moleküler stabilite seviyesi mtDNA molekülü boyunca aynı değildir. Bu yüzden, iki adli örnek arasında saptanan tek nükleotid farklılığının değerlendirilmesi mutasyonun bulunduğu noktanın mutasyona uğrama oranına göre değişiklik göstermektedir. Mutasyona uğrama oranı yüksek bir noktada saptanan polimorfizmde delilin gücü azalırken, mutasyona uğrama oranı düşük noktada saptanan polimorfizmde delilin gücü artmaktadır. MtDNA polimorfik noktalarının mutasyona uğrama oranları ile ilgili adli amaçlı yardım alınabilecek listeler mevcuttur.<sup>43,53,54</sup>

Eğer delil ve referans örnekler arasında tek bir nükleotid farklılığı var ve heteroplazmi ile ilgili bir bulgu yok ise referans örneğin dışlanmaması gerektiği belirtilmektedir.<sup>43,53,54</sup>

Delil ve referans örnekler arasında iki veya daha fazla nükleotid farklılığı varlığında genellikle referansın dışlandığı şeklinde yorum yapılmaktadır. Bu ölçütte çok nadir de olsa yanlış dışlama söz konusu olabileceğinden mtDNA mutasyon oranı heterojenitesi dikkate alınarak istatistiksel hesaplama yapılması önerilmektedir. Karşılaştırmada asıl değerlendirmenin iki profili birbirinden farklılaştıran polimorfik nokta sayısından bağımsız olarak istatistiksel olabilirlik oranına [likelihood ratio (LR)] göre yapılması gerektiği belirtilmektedir.<sup>43,53,54</sup>

### HASSASİYET

mtDNA’nın analizi özellikle çok az miktardaki adli örneklerin analizinde ve nükleer DNA’nın hemen hiç bulunmadığı kıl uçlarında, aşırı degradasyona uğramış iskelet kalıntılarında (uzun süre yüksek sıcaklık, nem ve asitli ortamda kalmış),

daha önce nükleer markırlar ile tiplendirme işlemi başarısız olmuş lekelerde, swablarda ve dokularda uygulama alanı bulabilmektedir. Özellikle olay yerinde sıklıkla bulunan kıllarda, nükleer DNA analizi için kıl kökünün yetersiz kaldığı durumlarda kıl uçlarında mtDNA'nın analizi mümkün olabilmektedir. Bu bakımdan nükleer DNA'ya oranla daha hassastır.<sup>25,50,55-57</sup>

### TÜR SPESİFİKLİK

Morley ve ark.nın tür spesifikliğini belirlemek için yaptıkları çalışmalarda; bakteri ve funguslardan yüksek organizmalı hayvanlara kadar uzanan bir seri çalışmada insan mtDNA sekansı için kullanılan primerler ile diğer türlerin DNA sekanslarının çapraz reaksiyon göstermediği ifade edilmektedir.<sup>50</sup> Bununla birlikte, sekans analizine dayalı mtDNA analizinde biyolojik örneğin insan kaynaklı olup olmadığının etraflı değerlendirilmesine gerek olmadığı belirtilmektedir. İnsan spesifik primerlerin başka kaynaklı örneklerle amplifiye olsa bile PZR ürün uzunluğu ve/veya sekans farklılığı ile örneğin insan kaynaklı olup olmadığının açık bir şekilde anlaşılacağı ifade edilmektedir.<sup>58</sup>

### KARIŞIK ÖRNEKLERDE TANIMLANABİLME ŞANSI

Deneyssel olarak hazırlanan karışık örneklerde analizin etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda 1:10 oranındaki karışımlarda minör komponentin değerlendirilemediği belirtilmektedir. Ayrıca karışık örnek analizinde ekstraksiyonda hem üst fazın hem de pelletin incelenmesi gerektiği; özellikle semen ile karışık örneklerde semen mtDNA profilinin çöküntüden ziyade üst fazda bulunduğu belirtilmektedir.<sup>50,55</sup>

### HETEROPLAZMİ

mtDNA analizinde heteroplazmi önemli bir konudur. Bir hücre içindeki bir DNA molekülünün mutasyonu ile normal ve mutant DNA moleküllerinin karışımı heteroplazmi olarak tanımlanmaktadır. Bu da normal ve mutant DNA moleküllerinin mitoz esnasında her kardeş hücreye aktarılması anlamına gelmektedir. Çok sayıda hücre bölünmesi sonucunda normal ve mutant DNA moleküllerinin oranı sadece mutant veya sadece normal DNA moleküllerini bir araya getirebilecektir. Bu durumun

somatik hücrelerin replikasyonu veya kadın germinal hücrelerinin proliferasyonu esnasında olabileceği belirtilmektedir.<sup>9,56-58</sup> Heteroplazmi, bir kişi için genellikle sadece bir noktada gözlenmekle birlikte, çok nadir de olsa iki veya daha fazla noktada da görülebilmektedir.

Yapılan çalışmalarda kodlamada görev almayan kontrol bölgesinde heteroplazmiye rastlanma sıklığının yüksek olduğu bildirilmiştir.<sup>59-63</sup> Bir kişinin farklı dokularında farklı heteroplazmik varyasyonların olduğunu gösteren çalışmaların yanında, aynı kişinin beyin dokusunun farklı bölgelerinde farklı oranlarda heteroplazmi gözleendiği ve hatta tek bir kıl örneğinin iki ayrı parçasında dahi farklılıkların olabileceği ifade edilmektedir.<sup>62,63</sup> Çalışma sonuçlarında görülen heteroplazmik varyasyon bulgularına dayanarak, tek bir kontrol bölgesi farklılığı sonucu oluşan eşleşmezlik olgularında "inclusion" (eşleşme veya dâhil etme) veya "exclusion" (dışlama) için daha ileri dizi analizlerinin yapılması gerektiği ifade edilmektedir.<sup>11,24,40,50</sup>

### MORFOLOJİK ÖZELLİKLER VE CİNSİYET

mtDNA eldesinde kılın morfolojisi (uzunluk, çap, hacim ve renk) ile cinsiyet ve vücut lokalizasyonunun başarı grafiğine olan etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, morfolojik parametrenin ve cinsiyetin başarı şansını etkilemediği gözlenmiştir.<sup>64,65</sup> Bir başka çalışmada, siyah saçların sarışın saçlara oranla daha geniş çapa sahip olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı ifade edilmektedir. Saç uzunluğunun başarı oranına etkisi araştırıldığında, kısa ve uzun saçlar arasında benzer başarı oranları elde edildiği belirtilmektedir.<sup>59</sup>

### MtDNA PROFİLİNDEN COĞRAFİK BÖLGE TAHMİNİ

Otozomal ve gonozomal SNP'ler ile mikrosatellitlerde olduğu gibi mtDNA genomu üzerinde bulunan SNP'lerden coğrafik bölge tahmini yapılabilmektedir. Ancak mtDNA testi tek başına bir örneğin coğrafik orijini hakkında tam olarak bilgi vermez. Bu nedenle sadece araştırmanın daraltılması ve şüpheli sayısının azaltılması amacıyla bu bilgi kullanılabilmektedir.<sup>43</sup> Potansiyel olarak mtDNA ve Y kromozomu genetik işaretlerinden çok daha yüksek oranda coğrafik bölge tahmini yapılabilen otozo-

mal genetik işaretlerle bile belli bir etnik grubun genetik profilini belirlemenin çok zor olabileceği belirtilmektedir.<sup>66,67</sup>

## REFERANS VERİ TABANI

mtDNA'nın rutinde adli amaçlı kullanılmasından önce belirli sayıda örnek ile referans veri tabanı oluşturulması gerekmektedir. İnsan mtDNA'sında rekombinasyon olmadığından, otozomal STR'lerde olduğu gibi mtDNA polimorfizmlerinin komponent frekanslarından kompozit genotip frekansını hesaplama yolu yoktur. Bu nedenle mtDNA'da veri tabanı oluşturmak için kullanılacak örnek sayısı otozomal STR sistemlerine oranla çok daha fazla olmalıdır. Adli laboratuvarlar genellikle 100 veya birkaç 100 örnekten oluşan lokal veri tabanlarını kullanmaktadır. mtDNA çok fazla varyasyon gösterdiğinden, 100 kişiden oluşan örnek sayısı popülasyonun sadece küçük bir kısmını yansıtmaktadır. Bu nedenle nadir haplotiplerin veri tabanında bulunma olasılığı çok düşük veya hiç yoktur.<sup>43</sup>

## MALİYET

Dizi analizinin uygulamaya koyulabilirliği değerlendirildiğinde oldukça pahalı kabul edilmekte, ancak dizi analizinin diğer PZR metotlarına oranla daha hassas olduğu ifade edilmektedir.<sup>56</sup>

Adli amaçlı analizlerde, PZR'ye dayalı mtDNA tiplendirmenin güvenilirliğini arttırmak için çeşitli geçerlilik test çalışmaları gerçekleştirilmesine kar-

şın, adli laboratuvarlar için özellikle eski ve kısmen parçalanmış veya sınırlı miktardaki örneklerde kontaminasyon olasılığı ciddi bir sorundur. Kontaminasyon probleminden sakınmak için mtDNA laboratuvarlarında, özellikle DNA ekstraksiyonu yaparken aşırı dikkatli olunması zorunludur.

## SONUÇ

Dizi analizi maliyetinin yüksek olması ve kontaminasyonu önlemek için aşırı dikkat gerektirmesi adli amaçlı mtDNA analizinin az sayıda laboratuvarında kullanımı ile sınırlı kalmasına neden olmuştur. İleride geliştirilecek alternatif tarama testleri ile hızlı ve güvenli dizi analiz metotlarının oluşturulması, mtDNA dizi analizinin birçok laboratuvarında rutinde kullanılmasını kolaylaştıracaktır.

mtDNA analizine ihtiyaç duyulan adli örnekler dikkate alındığında, kontaminasyon riskinin çok yüksek olması ve heteroplazmi gibi tartışma konusu olan sorunlara rağmen, mtDNA dizi analizi karşılaştırmalarının insan kimliklendirme çalışmalarında güvenilir bir araç olduğu kabul edilmektedir. Mevcut sorunların da aşırı dikkat ve deneyimle aşılabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, belirtilen dezavantajlara rağmen mevcut avantajları nedeniyle, adli analizlerde nükleer DNA markırlarına ek olarak mtDNA polimorfizmlerinin kullanımı adli amaçlı kimliklendirmede önemini korumaktadır.

## KAYNAKLAR

- Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, et al. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet* 1994;6(2):130-5.
- Lee HC, Ladd C, Bourke MT, Pagliaro E, Tirnady F. DNA typing in forensic science. I. Theory and background. *Am J Forensic Med Pathol* 1994;15(4):269-82.
- Duncan GT, Tracey ML. Serology and DNA typing. In: Eckert WG, ed. *Introduction to Forensic Sciences*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Elsevier 1992. p. 233-93.
- van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* 2009;30(2):E386-94.
- Somel M, Sezgin E. Genetic footprints of natural selection and drift in human evolution. *Hacettepe J Biol Chem* 2010;38(3):193-220.
- Kayaaltı Z, Söylemezoğlu T. [The effects of aging and smoking on the deletions of mitochondrial DNA in Turkish population]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010;30(4):1292-8.
- Aşıcioğlu F, Müslümanoğlu Ö, Akyüz F. [Sequence analysis of misconduct DNA and the use of forensic identification]. *Moleküler Tanı Dergisi* 2003;1(1):13-7.
- Wilson MR, Polanskey D, Butler J, DiZinno JA, Roplege J, Budowle B. Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *Biotechniques* 1995;18(4):662-9.
- Hopwood AJ, Mannucci A, Sullivan KM. DNA typing from human faeces. *Int J Legal Med* 1996;108(5):237-43.
- Ginther C, Issel-Tarver L, King MC. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nat Genet* 1992;2(2):135-8.
- Butler JM, Levin BC. Forensic applications of mitochondrial DNA. *Trends Biotechnol* 1998;16(4):158-62.
- Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(11):6715-9.
- 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;249(24):7991-5.
- Rudin N, Inman K. [Procedures for forensic DNA analysis]. *Introduction to Forensic DNA Analysis*. 2<sup>nd</sup> ed. Florida: CRC Press; 2002. p.79-83.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290(5806):457-65.
- Clayton DA. Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Annu Rev Biochem* 1984;53:573-94.
- 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(4):68-77.

18. Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. mtDNA as a tool for identification of human remains. Identification using mtDNA. *Int J Legal Med* 1996;109(4):205-9.
19. Cantatore P, Attardi G. Mapping of nascent light and heavy strand transcripts on the physical map of HeLa cell mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 1980;8(12):2605-25.
20. Howell N, Kubacka I, Mackey DA. How rapidly does the human mitochondrial genome evolve? *Am J Hum Genet* 1996;59(3):501-9.
21. Cann RL, Brown WM, Wilson AC. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics* 1984;106(3):479-99.
22. Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, White SL, Dahl HM, Turnbull DM, et al. The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet* 2000;16(11):500-5.
23. Birky CW Jr. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(25):11331-8.
24. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 1987;325(6099):31-6.
25. Holland MM, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence analysis-validation and use for forensic casework. *Forensic Sci Rev* 1999;11(1):21-50.
26. Chen X, Prosser R, Simonetti S, Sadlock J, Jagiello G, Schon EA. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am J Hum Genet* 1995;57(2):239-47.
27. Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. *Int J Legal Med* 1998;111(2):67-77.
28. Aquadro CF, Greenberg BD. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* 1983;103(2):287-312.
29. Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner R, Wilson MR, et al. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat Genet* 1997;15(4):363-8.
30. Howell N, Elson JL, Howell C, Turnbull DM. Relative rates of evolution in the coding and control regions of African mtDNAs. *Mol Biol Evol* 2007;24(10):2213-21.
31. Pakendorf B, Stoneking M. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005;6:165-83.
32. Bandelt HJ, Parson W. Consistent treatment of length variants in the human mtDNA control region: a reappraisal. *Int J Legal Med* 2008;122(1):11-21.
33. 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.
34. Grignani P, Turchi C, Achilli A, Peloso G, Alù M, Ricci U, et al. Multiplex mtDNA coding region SNP assays for molecular dissection of haplogroups U/K and J/T. *Forensic Sci Int Genet* 2009;4(1):21-5.
35. Behar DM, Villemers R, Soodyall H, Blue-Smith J, Pereira L, Metspalu E, et al.; Genographic Consortium. The dawn of human matrilineal diversity. *Am J Hum Genet* 2008;82(5):1130-40.
36. Macaulay V, Hill C, Achilli A, Rengo C, Clarke D, Meehan W, et al. Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. *Science* 2005;308(5724):1034-6.
37. Ballantyne KN, van Oven M, Ralf A, Stoneking M, Mitchell RJ, van Oorschot RA, et al. Mitochondrial DNA SNP multiplexes for efficient inference of matrilineal genetic ancestry within Oceania. *Forensic Sci Int Genet* 2012;6(4):425-36.
38. Parson W, Bandelt HJ. Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. *Forensic Sci Int Genet* 2007;1(1):13-9.
39. Tully G, Bär W, Brinkmann B, Carracedo A, Gill P, Morling N, et al. Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci Int* 2001;124(1):83-91.
40. Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Holland M, et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Int J Legal Med* 2000;113(4):193-6.
41. 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;23(2):147.
42. 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.
43. Salas A, Bandelt HJ, Macaulay V, Richards MB. Phylogeographic investigations: the role of trees in forensic genetics. *Forensic Sci Int* 2007;168(1):1-13.
44. Alvarez-Iglesias V, Jaime JC, Carracedo A, Salas A. Coding region mitochondrial DNA SNPs: targeting East Asian and Native American haplogroups. *Forensic Sci Int Genet* 2007;1(1):44-55.
45. Rakha A, Shin KJ, Yoon JA, Kim NY, Siddique MH, Yang IS, et al. Forensic and genetic characterization of mtDNA from Pathans of Pakistan. *Int J Legal Med* 2011;125(6):841-8.
46. Quintáns B, Alvarez-Iglesias V, Salas A, Phillips C, Lareu MV, Carracedo A. Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. *Forensic Sci Int* 2004;140(2-3):251-7.
47. Köhnemann S, Pfeiffer H. Application of mtDNA SNP analysis in forensic casework. *Forensic Sci Int Genet* 2011;5(3):216-21.
48. Salas A, Quintáns B, Álvarez-Iglesias V. SNaPshot typing of mitochondrial DNA coding region variants in: Carracedo A, ed. *Forensic DNA Typing Protocols*. 1<sup>st</sup> ed. New Jersey: Humana Press; 2005. p.197-208.
49. Bandelt HJ, Salas A. Current next generation sequencing technology may not meet forensic standards. *Forensic Sci Int Genet* 2012;6(1):143-5.
50. Morley JM, Bark JE, Evans CE, Perry JG, Hewitt CA, Tully G. Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. *Int J Legal Med* 1999;112(4):241-8.
51. Coble MD, Just RS, O'Callaghan JE, Letmanyi IH, Peterson CT, Irwin JA, et al. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int J Legal Med* 2004;118(3):137-46.
52. Piercy R, Sullivan KM, Benson N, Gill P. The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *Int J Legal Med* 1993;106(2):85-90.
53. 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.
54. Salas A, Lareu MV, Carracedo A. Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case report. *Int J Legal Med* 2001;114(3):186-90.
55. Allard MW, Miller K, Wilson M, Monson K, Budowle B. Characterization of the Caucasian haplogroups present in the SWGDAM forensic mtDNA dataset for 1771 human control region sequences. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. *J Forensic Sci* 2002;47(6):1215-23.
56. Wilson MR, DiZinno JA, Polansky D, Replogle J, Budowle B. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int J Legal Med* 1995;108(2):68-74.
57. Holland MM, Fisher DL, Roby DK, Ruderman J, Bryson C, Weedn VW. Mitochondrial DNA sequence analysis of human remains. *Crime Lab Digest* 1995;22(4):109-15.
58. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriguez WC, Canik JJ, Merril CR, et al. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War. *J Forensic Sci* 1993;38(3):542-53.
59. Savolainen P, Rosén B, Holmberg A, Leitner T, Uhlén M, Lundeberg J. Sequence analysis of domestic dog mitochondrial DNA for forensic use. *J Forensic Sci* 1997;42(4):593-600.
60. Hühne J, Pfeiffer H, Waterkamp K, Brinkmann K. Mitochondrial DNA in human hair shafts: existence of intra-individual differences? *Int J Legal Med* 1999;112(3):172-5.
61. Hühne J, Pfeiffer H, Brinkmann B. Heteroplasmic substitutions in the mitochondrial DNA control region in mother and child samples. *Int J Legal Med* 1999;112(1):27-30.
62. Allen M, Engström AS, Meyers S, Handt O, Saldeen T, von Haeseler A, et al. Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. *J Forensic Sci* 1998;43(3):453-64.
63. Jazin EE, Cavelier L, Eriksson I, Orelund L, Gyllensten U. Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(22):12382-7.
64. Sullivan KM, Alliston-Greiner R, Archampong FIA, Piercy R, Tully G, Gill P, et al. A single difference in mtDNA DNA control region sequence observed between hair shaft and reference samples from a single donor. Proceedings from the Seventh International Symposium on Human Identification, September 19-21. Oslo: Scottsdale, AZ; 1996. p.126-9.
65. Pfeiffer H, Hühne J, Ortmann C, Waterkamp K, Brinkmann B. Mitochondrial DNA typing from human axillary, pubic and head hair shafts - success rates and sequence comparisons. *Int J Legal Med* 1999;112(5):287-90.
66. Rosenberg NA, Pritchard JK, Weber JL, Cann HM, Kidd KK, Zhivotovskiy LA, et al. Genetic structure of human populations. *Science* 2002;298(5602):2381-5.
67. Pääbo S. The mosaic that is our genome. *Nature* 2003;421(6921):409-12.