

Application of next generation sequencing in forensic science

Yeni nesil dizilemenin adli bilimlerde kullanımı

Gonul Filoglu,¹ Irmak Sah,² Muhammed Dogan,³ Sila Bulut Nalcaoglu,³ Ilksen Tavaci¹ Ozlem Bulbul,¹ Tugba Unsal¹

¹İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

²Gebze Teknik Üniversitesi, Savunma Teknolojileri Enstitüsü, Kocaeli, Türkiye

³Trabzon Adli Tıp Kurumu, Trabzon, Türkiye

Received 03 July 2016; Accepted 09 August 2016

Available online 18.08.2016 with doi: 10.5455/medscience.2016.05.8518

Abstract

Next Generation Sequencing (NGS) Technology has been emerged and started to use in genetic research since the 2000s. Until today, various methods which are faster, high throughput and low cost have been developed. NGS Technologies have been gradually developed and the quality of sequencing has been reached the high level and forensic genetics labs have moved to this technology for recent years. NGS Technologies provide new opportunities for forensic genetics research. NGS Technologies enable to analysis of many forensic genetic markers (as STRs, SNPs, mRNA) in only one experiment. Besides, NGS technologies are applicable for different practices which are essential in forensic researches. Among these, create of a DNA database, ancestry and phenotype studies, monozygotic twin studies, identification of body fluids and species, forensic microbiology studies can be considered. This review has been written to focus on NGS technologies in forensic genetics applications and to be a reference study for next forensic researchers.

Keywords: Next generation sequencing, forensic genetics, identification

Öz

Yeni nesil dizileme teknolojileri (Next Generation Sequencing; NGS) genetik araştırmalarda 2000'li yıllardan itibaren kullanılmaya başlanmıştır. Günümüze kadar daha hızlı, verimli ve düşük maliyetli çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. NGS yöntemleri ve platformları gelişerek dizilerin kalitesi artmış ve son yıllarda adli genetik laboratuvarları da bu teknolojiye yönelmiştir. NGS teknolojisi adli genetikte kullanılan birçok sistemin (STRs, SNPs, mRNA) aynı anda tek bir analizle çalışılmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca bu teknoloji ile adli alanda DNA veri tabanı oluşturma, soy ve fenotip belirleme, tek yumurta ikizlerinin ayırt edilmesi, vücut sıvısı ve türlerin tanımlanması ve mikrobiyoloji analizleri yapılabilmektedir. Bu derleme NGS teknolojilerinin adli genetikte olası kullanım alanları üzerine dikkat çekmek ve gelecekteki adli çalışmalar için referans sağlamak amacıyla hazırlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yeni nesil dizileme, adli genetik, kimliklendirme

Giriş

DNA dizileme, bir DNA molekülünde bulunan nükleotidlerin (adenin, guanin, sitozin ve timin) tam ve doğru bir şekilde sırasını belirlemede kullanılan yöntemler bütünüdür. Hızlı DNA dizileme yöntemlerinin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi ile medikal ve biyolojik araştırmalar büyük hız kazanmıştır. DNA dizi bilgisi tanısal, biyoteknoloji, adli biyoloji, metagenomik, evrimsel biyoloji, epidemiyoloji, ekoloji, mikrobiyom araştırmaları ve viroloji gibi bir çok alandaki çalışmaların vazgeçilmesi haline gelmiştir [1,2].

İlk DNA dizileme çalışmaları yetmişli yılların başlarında akademik araştırmacılar tarafından, iki boyutlu

kromatografiye (2D kromatografi) dayanan yöntemlerin kullanımıyla başlamıştır. Otomatize analizlerle floresan temelli dizileme yöntemlerinin geliştirilmesi DNA dizilemeyi çok daha kolay ve hızlı hale getirmiştir [1,2]. İnsan Genom Projesiyle birlikte genetik araştırmalar çarpıcı biçimde değişmiş ve moleküler biyolojide post-genomik dönemin başlangıcı olmuştur. Yaşanan teknolojik patlama ile insan genomu ve transkriptomu benzeri görülmemiş bir hızla gelişmiş ve elde edilen verinin işlenmesi ve sorgulanması yöntemleri de geliştirilmiştir [3,4].

DNA dizilemenin adli genetikte kullanımı uzun yıllardan beri devam etmektedir. 80'lerin sonunda ve 90'ların başında Restriksiyon Uzunluk Polimorfizminin (RFLP) keşfi ile başlamış ardından STR'ler (Short Tandem Repeats; Kısa Tekrar Dizileri) ile hız kazanmıştır. Bu teknolojilerin yanında mtDNA (mitokondriyal DNA) dizilemesi gibi ek markırlar geliştirilmiş ve kimliklendirme

*Corresponding Author: Gonul Filoglu, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul, Türkiye
E-mail: gonulfiloglu@yahoo.com.tr

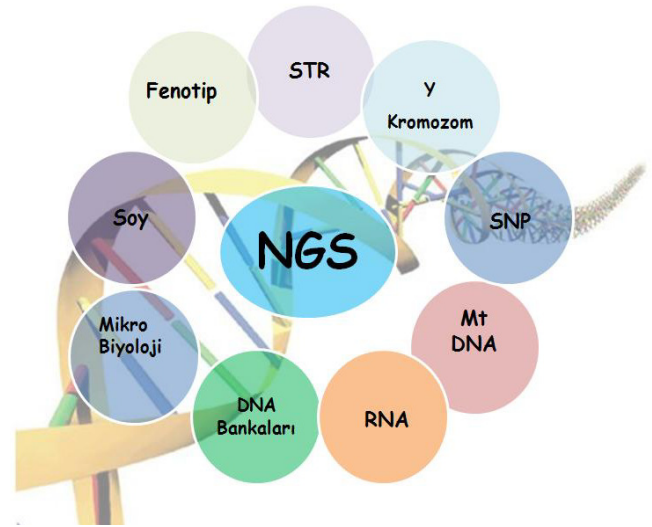
çalışmalarında kullanılmıştır [5]. Adli DNA analizleri için eski nesil dizileme sistemlerinin sınırlamaları araştırmacıları, yeni nesil dizileme teknolojilerinin geliştirilmesine yöneltmiştir. NGS teknolojisi, karışık DNA örneklerinin belirlenmesinde, karmaşık babalık davalarının analizinde önemli ölçüde avantaj sağlamaktadır. Ayrıca NGS teknolojisiyle birçok sistemin tek bir iş akışında analiz edilebilmesi mümkün olabilmektedir [6]. Bu makalede yeni nesil dizileme teknolojilerinin adli bilimlerde kullanımı ve alanlarından söz edilecektir.

Adli Bilimlerde NGS'nin Kullanımı

Adli araştırmalarda DNA teknolojilerinin uygulanması önemli olup sürekli olarak geliştirilmektedir. DNA dizileme çalışmalarının adli olgularda kullanımı 80'lere kadar uzanmaktadır [5]. Adli DNA analizleri sırasında karşılaşılan en büyük sorun düşük kopya sayısı, degrade ve kontamine örneklerle çalışmaktır. Adli analizlerde doğruluğu yüksek, tekrarlanabilirliği olan, zaman ve maliyet açısından avantajlı analizler tercih edilmektedir. Bugün DNA analizlerinde kapiller elektroforezde (KE) kullanılmaktadır [6]. Kapiller elektroforez uygulamaları otomasyonu uygun olması nedeniyle, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Bugün KE yöntemi ile kimliklendirmede kullanılan birçok genetik markır (otozomal-STR, Y-STR, X-STR, indel, mtSNP, otozomal SNP, X-SNP ve Y-SNP, soy belirlemesi -Ancestry Informative Markers; AIMs-, fenotipik markırlar ve mRNA) analiz edilmektedir. Bu markırlar KE yöntemi ile bir gün içinde analiz edilebilir fakat tek bir iş akışında ve tek bir reaksiyonda analiz edilememektedir. Ayrıca degrade örneklerde genomik bilginin kaybı, karışık örneklerde analiz zorluğu ve özellikle karmaşık babalık davalarında mutasyonların varlığı ve analiz zorlukları KE'nin diğer dezavantajları arasında sayılabilir. Yeni nesil dizileme teknolojileri KE sistemlerinin yerine geçebilecek alternatif teknolojiler olarak düşünülmektedir [6].

STR'lerin; polimorfizminin yüksek olması, güvenilir olması, çoklu otomasyona imkan vermesi, maliyetinin düşük olması adli genetikçiler tarafından kabul görmesini sağlamış ve tüm dünyada ortak kullanılan sistemler haline gelmiştir. Bu avantajları nedeniyle STR'ler vazgeçilecek yöntemler olmamakla birlikte, bazı adli olguların aydınlatılmasında bu bölgeler yetersiz kalabilmektedir. Özellikle doğal afet, terör saldırısı, uçak kazası gibi can kaybının çok olduğu, vücut bütünlüğünün bozulduğu ve DNA miktarının az olduğu vakalarda kişilerin kimliklendirilmesinde sorunlar yaşanmaktadır. Bu sebeple araştırmaların yönü DNA üzerinde daha az yer kaplayan ve bozunmuş örneklerde dahi tiplene imkânı veren SNP (Single Nucleotide Polymorphism-Tek Nükleotid Polimorfizmi) genetik işaretleri üzerine yoğunlaşmıştır. Zorlu adli vakalardaki bozunmuş örneklerde, hiç profil elde edilemeyen ya da kısmi profil elde edilen örneklerde, aynı anda ortalama 120 SNP bölgesi çalışılarak ya da mitokondrial DNA'nın tümünü dizinleyerek

kimliklendirme yapmak mümkündür [5,7]. Klasik sanger dizileme metoduna göre bu kadar çok DNA bölgesinin (120 SNP, tüm mitokondrial DNA gibi) hızlı bir şekilde çalışılması ve veri kalitesinin artırılmasını sağlayan daha ileri seviyede analize olanak veren yeni nesil dizileme sistemi – NGS (Next Generation Sequencing System) adli bilimlerde alanında araştırılmaya başlanmıştır. Yeni nesil dizileme teknolojisi ile çok kısa sürede tüm genomu dizilemek mümkündür. Ancak adli genetikte tüm genomun dizilenmesi gereksiz ve masraflıdır. Çünkü adli olgularda başlıca amaç örneğin ait olduğu bireyin kimliğinin belirlenmesi tahmin edilmesidir [5]. Birkaç şirketin bu teknolojiye sahip cihazı ve ona uyumlu ticari kit çıkarmasıyla birlikte adli laboratuvarlarda NGS teknolojisine geçiş süreci başlamış ve birçok alanda uygulanabilmektedir (Şekil 1) [5,7].



Şekil 1. NGS'nin adli bilimlerde kullanım alanlarından bazıları

NGS Teknolojisi ve SNP Analizleri

NGS için yapılan birçok deneysel tasarımın başında SNP lokusları gelmektedir. Adli alanda NGS sistemine uygun çıkarılan ilk hazır ticari kitler de SNP lokuslarıdır. Ticari NGS kitleri ilk defa 2014 yılında Thermo Fisher Scientific tarafından "Ion PGM™" sistemi için tasarlanıp iki tür olarak piyasaya sürülmüştür. Ardından Illumina, "MiSeq FGx Forensic Genomics System" için tasarladığı kiti piyasaya sürülmüştür.

Thermo Fisher Scientific - Ion PGM - HID-Ion AmpliSeq™ Identity Panel

Üç farklı bilimsel yayından derlenen kit; degrade ve eser miktardaki örneklerde kimliklendirme ve nesep tayini amacıyla kullanılmak üzere tasarlanmış olup 100 pg DNA'ya kadar çalışma imkânı sunmaktadır. Bu kit 124 SNP noktası içermekte ve her türlü biyolojik örnekten (kan, tükürük, svab, vücut sıvısı vs.) çalışılabilmektedir. Bu SNP noktaları ile %99, 99 uyumluluk sonucu verilebilmektedir. Kit dizayn edilirken rutinde kullanılan

STR lokuslarının ayırım gücünü yakalayabilmek için 124 SNP seçilerek %99,99' luk ayırım gücü yakalanmıştır. Bu 124 SNP noktası; 90 otozomal SNP, 34Y kromozomuna özgü SNP olup, düşük mutasyon oranına ve küçük ampikon boyutuna sahip (132-141 nükleotit) bölgelerdir. Bu sayede kit degrade ya da eser miktarda örneklerle çalışmaya imkan sunmaktadır [8-10].

Thermo Fisher Scientific- Ion PGM - HID-Ion AmpliSeq™ Ancestry Paneli

Olay yerinden elde edilen şüpheli DNA'sına ait örneğin herhangi bir veri tabanında uyuma rastlanmamışsa, soruşturmaya yön verebilecek ve kişiyi tanımlayabilecek hem fenotipik özelliklerini (saç rengi, göz rengi, ten rengi) hem de soy tayinini yapmak üzere geliştirilmiş bir kittir. Bu kit ile 165 SNP noktasını multipleks olarak çalışmak mümkündür. Degrade ve her türlü biyolojik örnekten (kan, tükürük, svab, vücut sıvısı vs.) çalışılabilir. Kit ile birlikte ALFRED (Allele Frequency Database) software kullanılmaktadır. Bu software tüm kıtasal düzeyde popülasyonlara özgü verilere sahiptir ve analiz edilen her örneğin hangi popülasyona yakın olduğunu tespit ederek harita üzerinde kişinin hangi ırk ve bölgeden olduğunu gösterir. Kitin içerdiği SNP noktaları ile % 99,77 oranında ayırım gücüne ulaşılmaktadır [5,11-14].

Çalışılan markır sayısı arttıkça kimliklendirmede daha yüksek ayırım gücüne ulaşılmaktadır. Bu amaçla da çeşitli ek markırlara yönelik araştırmalar sürdürülmektedir. Grandell ve arkadaşları 140 otozomal SNP'yi kapsayan yeni bir multipleks kit tasarlamaktadırlar. Ancak henüz optimizasyon aşamındadırlar [15].

MiSeq FGx Forensic Genomics System - The Illumina® ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit

Tamamen adli genetik uygulamaları için tasarlanan bu kit hem olay yeri örnekleri hem de referans örneklerde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Adli genetik uygulamalarında STR ve SNP teknolojilerini aynı anda kullanan ilk ve tek validasyonlu kittir. Aynı kit ile 29 otozomal STR, 24 Y-STR ve 9 X-STR lokusları, 86 kimliklendirme SNP noktası, 22 fenotip belirleyen SNP noktası ve 56 biyocoğrafik soya ait SNP noktasını bir arada çalışmak mümkündür. Üstelik bu 200'den fazla markır ile 1 ng DNA kullanarak çalışılabilir. Bu kitle olay yerinden gelen örneklerde sıkça rastlanan alel düşmesi ve kısmi profil sorunları yaşanmamaktadır [16].

NGS Teknolojisi ve STR Analizleri

Bugün tüm dünyada adli DNA ile ilgili oluşturulan veri tabanlarının tamamı STR'yi kapsamaktadır. Bundan dolayı da NGS ile ilgili hazırlanan bir kitin adli bilimlerde kullanılabilir olması için bu kitin dizilediği bölgeler içerisinde STR lokusları olmak zorundadır. Son zamanlarda STR'lerin NGS yöntemiyle çalışılmasına yönelik araştırmalarda artış bulunmaktadır. STR lokuslarının NGS ile analiziyle fragman analizine göre çok daha fazla bilgi elde edilebilmektedir. Bu yönüyle NGS

adli bilimlerde devrim niteliğinde görülmektedir. STR analizlerinin NGS ile yapılmasının; hem otozomal hem cinsiyet kromozomlarında bulunan birçok STR lokusunun aynı anda analiz edilebilmesi ve benzer uzunluktaki alellerin dijital okuma sayısı ile ayırt edilebilmesi gibi birçok avantajı bulunmaktadır [6].

NGS dizileme yöntemleri kapiler elektroforezden farklı olarak STR'lerdeki dizi varyasyonlarını ortaya çıkarabilmektedir. Sadece alel uzunluğu değil aynı zamanda alel dizisini de analiz edilebildiğinden ortaya çıkan bu ek varyasyonlar ile ayırım gücü de artmaktadır [17,18]. Dolayısıyla kapiler elektroforez ile STR analizinde daha önce hiç karşılaşılmamış alellerin veya karşılaşılmış ancak belirlenmemiş varyantlarına NGS analizi ile rastlamak mümkündür [19,20]. Gelardi ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada D12S391 STR lokusunun KE analizi ile 15 farklı alele rastlanırken, aynı bölgenin NGS ile dizilenmesi sonucu 53 farklı aleli tespit edilmiştir. Bu durumun nedeni de yukarıda bahsedildiği gibi aynı tekrar sayısına sahip alellerin farklı dizi kombinasyonlarına sahip olmasından kaynaklanmaktadır. D12S391 lokusunun 21. alelinin dizi kombinasyonu açısından değerlendirildiğinde aslında 8 farklı kombinasyon içerdiği belirlenmiştir (Şekil 2) [20].

D12S391[21]AGAT[11]AGAC[9]AGAT[1]
D12S391[21]AGAT[11]AGAC[10]
D12S391[21]AGAT[12]AGAC[8]AGAT[1]
D12S391[21]AGAT[12]AGAC[9]
D12S391[21]AGAT[13]AGAC[7]AGAT[1]
D12S391[21]AGAT[13]AGAC[8]
D12S391[21]AGAT[13]GGAC[1]AGAC[7]
D12S391[21]AGAT[14]AGAC[6]AGAT[1]

Şekil 2. D12S391 lokusundaki 21 tekrara sahip aleller [20].

NGS analiziyle STR lokus alel sayısının ve varyantların artması polimorfizminin artması anlamına gelmektedir. NGS ile yapılan analizlerde bir vakayı çözmek için ihtiyaç duyulan lokus sayısı, KE ile yapılan analize göre daha düşüktür. Yine Gelardi ve arkadaşlarının D3S1358, D12S391 ve D21S11 STR lokuslarıyla yaptıkları basit bir karşılaştırmada, aynı lokuslarla KE analizi sonrası babalık indeksini 59 olarak hesaplarken, NGS analizi yaptıktan sonra babalık indeksini 415 olarak hesaplamışlardır [20].

Son çalışmalarla birlikte ortaya çıkan alel sayısının artması ve varyant alel durumu STR'lerin isimlendirilmesi noktasında yeni açmazlar doğurmuş ve acilen STR'ler için mevcut isimlendirme sisteminin değişmesi gerektiği ortaya çıkmıştır. Uluslararası adli genetikçiler topluluğu (ISFG-International Society for Forensic Genetics) yeni bir isimlendirme sisteminin oturtulabilmesi için bir çalışma grubu kurmuştur [5].

“Thermo Fisher Scientific” STR lokuslarını da içeren yeni bir NGS kiti üzerinde çalışmaktadır. Yeni kitin bir demosu sayılabilecek Ion Torrent™ HID STR 10-plex isimli

versiyonu bazı adli genetik laboratuvarları tarafından kullanılmaya başlanmıştır [21].

NGS Teknolojisi ve Y Kromozom Analizleri

Y-STR analizleri kadın erkek DNA'sının karışık olduğu cinsel saldırı vakalarında ve erkek tarafından soy bağının, babalık-akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde önemlidir. Ancak aynı soy bağına sahip birden fazla erkeğin dahil olduğu cinsel saldırı vakaları ya da babalık belirlenmesinde aynı aileden gelen erkeklerde Y kromozomu değişmeden aktarıldığı için Y-STR analizleri yetersiz kalmaktadır. Ancak jenerasyonlar arasında meydana gelen mutasyonları saptamak için Y kromozomuna ait STR ve SNP bölgelerinin NGS ile analizi yapılarak nükleotid bazında farklılıklar saptanabilir. Xue Y. ve arkadaşlarının NGS kullanılarak yaptıkları çalışmada; aralarında 13 kuşak önceden soy bağı bulunan 2 erkek bireye ait 10 milyon üzerinde Y kromozomu STR ve SNP lokus dizileri karşılaştırılarak 4 genetik farklılık bulunmuştur [6,22].

NGS Teknolojisi ve Mitokondriyal DNA Analizleri

Adli genetikte mitokondriyal (mt) DNA analizleri ile kayıp kişilerin araştırılması, toplu mezar vakaları, felaket kurbanlarına ait vücut parçalarının kimliklendirilmesi ve soy bağının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Mitokondriyal DNA maternal olarak aktarılır ve akrabalık-soy araştırmalarında kullanılır. Rusya'da 1978 yılında bulunan toplu mezardaki kemik kalıntılarının 1918 Bolşevik ihtilali sırasında öldürülen Romanov ailesine ait olduğunun saptanması ve Kral 3. Richard'ın, bulunan kemiklerden kimliklendirilmesi, bugün yaşayan anne tarafından akrabalarının mitokondriyal DNA'larının çalışmasıyla belirlenmiştir [23-26].

Bugüne kadar mt-DNA analizinde kullanılan Sanger dizileme tekniği ile dizileme uzun zaman gerektirdiğinden ancak bazı bölgeleri (HV1, HV2, HV3 gibi) dizilenebilmektedir (26,27). Ayrıca Sanger dizileme teknolojisi düşük seviyelerdeki heteroplazmik varyantları belirlemede yeterince etkin değildir. Bu nedenle veri tabanları oluşturulurken heteroplazmi çoğunlukla ihmal edilmiştir. Son zamanlarda NGS ile tüm mitokondriyal genomun dizilenmesi ve heteroplazmik mutasyonların saptanması ve miktarlarının belirlenmesi mümkün hale gelmiştir. Magalhaes ve arkadaşları; farklı haplogruplara ait önceden bilinen haplotipleri kullanarak Ion Torrent PGM ve Sanger ile elde edilen dizileri karşılaştırarak her iki teknoloji içinde heteroplazmi saptanmasındaki eşik değerleri belirlemiştir [28,29].

Heteroplazminin belirlenmesi, raporlanması ve ayırım potansiyelinin kullanımı adli olaylarda mtDNA analizlerinin değerini önemli ölçüde arttıracaktır. NGS ile mtDNA dizileme yöntemleri geliştirilmekte ve adli olgularda uygulanmak üzere kolay hale getirilmektedir. Thermo Fisher Scientific tarafından Ion PGM™ için tasarlanan ticari kit (Ion AmpliSeq™ Whole Mt Genome Sequencing) piyasaya sürülmüştür. Kit tüm Mitokondri

DNA'sını MPX1 ve MPX2 olarak iki adet multipleks ile tüm geni dizileyebilmektedir [26,27].

NGS Teknolojisi ve Epigenetik Analizler

Epigenetik markırlar adli olguların çözümünde kullanılmaya başlamıştır. Bu markırlar monozigotik ikizlerin birbirinden ayırt edilmesinde, doku tipinin tahmin edilmesinde ve biyolojik örneğin yaşının belirlenmesinde kullanılabilirler. Epigenetik analizler NGS teknolojisi kullanılarak tüm genomun bisülfite sekans ya da metillenmiş DNA'nın immüno sekans analizi ile yapılmaktadır. Ancak bu yöntemler oldukça yüksek oranda DNA'ya ihtiyaç duymaktadır. Teknolojinin gelişmesi ile daha az miktardaki örnekle çalışılabilir olması adli bilimlere için bir gelecek vaat etmektedir [30].

Olay yerinden gelen örneğin yaşını tahmin edebilmek adli araştırmalarda çok değerlidir. Yaşlılık, hücrede bir insanın ömrü boyunca biriken çeşitli moleküler modifikasyonlara bağlı gelişen karmaşık bir süreçtir. İnsanda yaş ve belli bir lokusun metilasyon seviyesi arasındaki korelasyon varlığına dayanan çalışmalar bulunmaktadır [31]. Yapılan bir çalışmada kandan yaşın tahmin edilmesinde yaşa özgü DNA metilasyon modellerinin kullanımı hedeflenmiştir. Hassas ve doğru bir yaş tahmini için, seçilen 16 CpG bölgesinin metilasyon durumlarını ölçmek için Illumina's MiSeq NGS sistemi kullanılarak geliştirilmiştir. Sonuçlarda tahmin kesinliği düşük olsa da, analizlerin geliştirilebileceği düşünülmektedir [32].

Adli genetik analizlerindeki sorunlardan biri de monozigotik ikizlerinin aynı DNA'ya sahip olmasından dolayı babalık-akrabalık belirlenmesinde ya da olay yerinden gelen örneklerden ikizlerin birbirinden ayırt edilememesidir. Her 1000 doğumdan 3'ünün monozigotik ikiz olduğu düşünüldüğünde adli bilimlere açısından önemli bir sorun oluşturabilmektedir. Bununla birlikte az da olsa monozigotik ikizler arasında epigenetik farklılıklar oluşabilir. Monozigotik ikiz baba adaylarının hangisinin baba olduğunun belirlenmesi için Illumina HiSeq 2000 sistemi kullanarak ikizlerin tüm genomunun %91'ini kapsayacak şekilde 600 giga bazlık genomlarının haritalama yapılmıştır. İkizlerden birinde 292 giga baz çifti bulunurken diğerinde 283 giga baz çifti okunmuştur. Arada oluşmuş farklılığın hangi monozigotik ikizden çocuğa aktarıldığı saptanabilmiş ve bu sayede babalık tayini yapılabilmektedir [33].

NGS Teknolojisi ve miRNA Analizleri

Kriminal araştırmalarda suçlu ya da mağdurdan elde edilen biyolojik örneklerden DNA profili elde edilir ancak olayın koşulları hakkında bilgi vermez. Olay anında meydana gelen biyolojik reaksiyonların aktivite seviyelerinden yararlanarak doku veya sıvının kaynağının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Vücut sıvıları ya da dokularda miRNA profillemeleri yapılarak biyolojik örneğin kaynağı belirlenebilmektedir. miRNA 18-24 nükleotid dizisinden oluşan küçük RNA molekülleri olup adli bilimlerdeki

kullanımı oldukça yenidir ve küçük olmalarından dolayı degradasyona karşı dirençlidir. Dokuya özgü sentezlenmeleri nedeniyle doku türünün belirlenmesi, vücut parçalarının kimliklendirilmesi ve ölüm zamanının belirlenmesinde (PMI, Post mortem interval) kullanılır. Hanson ve arkadaşlarının, biyolojik sıvı ve dokuların (tükürük, kan, semen, vajinal sekresyonlar, menstrual kan, deri v.b.) belirlenmesi için bu örneklerle spesifik çok sayıda gen bölgeleri içeren NGS temelli multipleks miRNA biyomarkör paneli oluşturulmaktadır [34].

NGS Teknolojisi ve Adli Mikrobiyal Analizler

Adli mikrobiyoloji adli bilimler alanında ilk olarak 18 Eylül 2001 yılında Amerika’da gerçekleşen ve Şarbonun biyolojik silah olarak kullanıldığı olaydan sonra FBI tarafından analizlere dahil edilmiştir. Olay yerinden toplanan mikroorganizmaların karakterize edilmesiyle analiz yapılmaktadır [6]. *Bacillus anthracis* ve *Yersinia pestis*’e ait 4 suş hem Illumina’nın HiSeq NGS hem de Thermo Fisher Scientific SOLID NGS sistemleri kullanılarak kimliklendirilmiştir [35]. Yine yapılan çalışmalarla insan deri döküntülerinden ya da derisinden alınan örneklerden kişiye ait mikrobiyal flora, metazoa tayini yapılabileceğini ve adli analizlerde kullanılabileceği gösterilmiştir [36]. Tüm adli mikrobiyoloji çalışmaları NGS teknolojisinin yüksek verimlilikte ve hızda, düşük maliyetle mikrobiyal genomu dizilemeye uygun yöntem olduğunu göstermektedir [6].

Sonuç

NGS teknolojisi klasik sanger dizileme metoduna göre daha fazla DNA bölgesinin hatta tüm genomun hızlı bir şekilde dizilenmesini ve veri kalitesinin artırılmasını sağlayan daha ileri seviyede analize olanak veren sistemlerdir. Klasik sekans diye tanımlanan kapiler elektroforez (KE) teknolojisi ile ayrı ayrı ve uzun sürede çalışılan otozomal STR, Y-STR, X-STR, fenotipik SNP, biyocoğrafik SNP ve mitokondrial DNA analizlerini aynı anda, çok daha kısa sürede ve düşük maliyetle çalışma imkanı sunmaktadır. Adli genetik analizleri için NGS’nin geleneksel KE yöntemine göre birçok avantaja sahip olmasına rağmen, laboratuarlara geçiş süreci ve uygulamalarında bazı zorluklar yaşanmaktadır. Bu zorluklar daha çok valide ve güçlü kitlerin oluşturulama çabaları, ekipman maliyetleri, kütüphanelerin hazırlanması, hata oranı, veri işleme, analistlerin eğitimi, STR lokuslarının yeniden isimlendirilmesi (nomenclature), validasyon ve optimizasyon çalışmaları şeklinde sayılabilir. Yapılacak ar-ge çalışmalarıyla, uzun vadede maliyetin düşmesi, çalışmanın kolaylaşması ve otomasyonun NGS’ye uyarlanması gibi avantajlar sağlarsa, NGS adli bilimler alanında STR hegemonyasını kırması mümkün olacaktır. [17,18,36]. NGS ile STR lokuslarının yanı sıra diğer bilgi verici sistemler de beraber çalışabilecektir. NGS’nin adli bilimler alanında yerleşik bir sistem haline gelmesi hem araştırmacıların hem de ticari firmaların bu konuda yapacakları çalışmalarla olacaktır.

Kaynaklar

1. Olsvik O, Wahlberg J, Petterson B, Uhlen M, Popovic T, Wachsmuth KI, Fields PI. Use of Automated Sequencing of Polymetase Chain Reaction-generated Amplicons To Identify Three Types of Cgolera Toxin Subunit b in *Vibrio cholerae* O1 Strains. *J Clin Microbiol.* 1993;31(1):22-5.
2. Petterson E, Lundeberg J, Ahmadian A. Generations of Sequencing Technologies. *Genomics*, 2009;93(2):105-11.
3. Filho JS. Next-generation Sequencing. *Breast Cancer Research.* 2009;11:12-9.
4. Üstek D, Abacı N, Sırma S, Çakiris A. Yeni Nesil DNA Dizileme. *DETAE.* 2011;1:11-8.
5. Børsting C, Fordyce SL, Olofsson J, Mogensen HS, Morling N. Evaluation of the Ion Torrent™ HID SNP 169-plex: A SNP typing assay developed for human identification by second generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet* 2014;12:144-54.
6. Yang Y, Xie B, Yan J. Application of next-generation sequencing technology in forensic science. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2014;12(5):190-7.
7. Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten Years of Next-Generation Sequencing Technology. *Trends Genet.* 2014;30(9):418-26.
8. 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;18(5):830-8.
9. Pakstis AJ, Speed WC, Fang R, Hyland FC, Furtado MR, Kidd JR, Kidd KK. SNPs for a universal individual identification panel. *Hum Genet.* 2010;127(3):315-24.
10. Phillips C, Fang R, Ballard D, Fondevila M, Harrison C, Hyland F. Evaluation of the Genplex SNP typing system and a 49plex forensic marker panel. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1(2):180-5.
11. Kosoy R, Nassir R, Tian C, White PA, Butler LM, Silva G, Kittles R, Alarcon-Riquelme ME, Gregersen PK, Belmont JW. Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. *Hum Mutat.* 2009;30(1):69-78.
12. Kidd KK, Speed WC, Pakstis AJ, Furtado MR, Fang R, Madbouly A, Maiers M, Middha M, Friedlaender FR, Kidd JR. Progress toward an efficient panel of SNPs for ancestry inference. *Forensic sci Int Genet.* 2014;(10):23-32.
13. Nievergelt, CM, Maihofer AX, Shekhtman T, Libiger O, Wang X, Kidd KK, Kidd JR. Inference of human continental origin and admixture proportions using a highly discriminative ancestry informative 41-SNP panel. *Investig Genet.* 2013(4):13.
14. Seo SB, King J, Warshauer DH, Davis CP, Ge J, Budowle B. Single nucleotide polymorphism typing with massively parallel sequencing for human identification. *Int J Legal Med.* 2013;127(6):1079-86.
15. Grandell I, Samara R, Green H, Tillmar A. A SNP panel for identity and kinship testing using massive parallel sequencing. *J Legal Med.* 2016;130(4):905-14.
16. Churchill J, Schmedes SE, King J, Budowle B. Evaluation of the Illumina® Beta Version ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit for use in genetic profiling. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;20:20-9.
17. Kim H, Erlich HA, Calloway CD. Analysis of mixtures using next generation sequencing of mitochondrial DNA hypervariable regions. *Croat Med J.* 2015;56:208-17.

18. Van der Gaag KJ, de Leeuw RH, Hoogenboom J, Patel J, Storts DR, Laros JF, de Knijff P. Massively parallel sequencing of short tandem repeats-Population data and mixture analysis results for the PowerSeq™ system. *Forensic Sci Int Genet.* 2016;24:86-96.
19. Dalsgaard S, Rockenbauer E, Buchard A, Mogensen HS, Frank-Hansen R, Børsting C, Morling N. Non-Uniform Phenotyping of D12S391 Resolved by Second Generation Sequencing. *Forensic Sci Int Genet.* 2014;8:195-9.
20. Gelardi C, Rockenbauer E, Dalsgaard S, Børsting C, Morling N. Second Generation Sequencing of Three STRs D3S1358, D12S391 and D21S11 in Danes and a New Nomenclature for Sequenced STR Alleles", *Forensic Sci Int Genet.* 2014;12:38-41.
21. Fordyce SL, Mogensen HS, Børsting C, Lagace RE, Chang CW, Rajagopalan N, Morling N. Second-generation sequencing of forensic STRs using the ion torrent HID STR 10-Plex and the ion PGM. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;(14):132-40.
22. Xue Y, Wang Q, Long Q, Ng BL, Swerdlow H, Burton J, Skuce C, Taylor R, Abdellah Z, Zhao Y, Asan, MacArthur DG, Quail MA, Carter NP, Yang H, Tyler-Smith C. Human Y chromosome base-substitution mutation rate measured by direct sequencing in a deep-rooting pedigree. *Curr Biol.* 2009;19(17):1453-7.
23. Coble MD. Mystery solved: The identification of the two missing Romanov children using DNA analysis. *ploS One* 2009;4(3):e4838.
24. Coble M.D. The identification of the Romanovs: Can we (finally) put the controversies to rest? *Investigative Genetics, Coble Investigative Genetics.* 2011;2(20):1-7.
25. Demircan K. Rusya İmparatorluğu'nu 300 Yıl Yöneten Romanov Ailesi'nin 100 Yıllık Efsanesi: ANASTASYA, *Bilim Teknik,* 2013;58:61.
26. Parson W, Strobl C, Huber G, Zimmermann B, Gomes SM, Souto L, Fendt L, Delport R, Langit R, Wooton S, Lagace R, Irwin J. Evaluation of next generation mtGenome sequencing using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM), See comment in PubMed Commons Below *Forensic Sci Int Genet.* 2013;7(5):543-9.
27. Turi E, King et al. Identification of the remains of King Richard III, *Nature Commutations.* 2014;5(5631):1-8.
28. Magalhaes S, Marques SL, Alves C, Amorim A, Alvarez L, Goios A. Evaluation of Heteroplasmy Detection in the Ion Torrent PGM. *Forensic Sci Int Genet Suppl.* 2015;5:e13-e15.
29. McElhoe JA, Holland MM, Makova KD, Shu-Wei Su M, Paul IM, Baker CH, Faith SA, Young B. Development and assessment of an optimized next-generation DNA sequencing approach for the mtgenome using the Illumina MiSeq. *Forensic Sci Int Genet.* 2014;13:20-9.
30. Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schübeler D. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells *Nat Genet.* 2005;37(8):853-62.
31. Hanson E, Ingold S, Haas C, Ballantyne J. Targeted Multiplexed Next Generation RNA Sequencing Assay for Tissue Source Determination of Forensic Samples. *Forensic Sci Int Genet Suppl.* 2015;5:e441-e443.
32. Vidaki A, Ballard D, Barron L, Syndercombe Court D. DNA Methylation-Based Age Prediction Usin Artificial Neural Networks and Next Generation Sequencing. 26th Congress of The International Society for Forensic Genetics. Krakow, Polonya. 31 Ağustos-5 Eylül.2015;80-1.
33. Weber-Lehmann J, Schilling E, Gradl G, Richte DC, Wiehler J, B Rolf. Finding the needle in the haystack: Differentiating "identical" twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing *Forensic Sci Int Genet.* 2014;9:42-6.
34. Cummings C.A, Bormann Chung CA, Fang R, Barker M, Brzoska P, Williamson PC. Accurate, rapid and high-throughput detection of strain-specific polymorphisms in *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* by next-generation sequencing. *Investig Genet.* 2010;1(5):1-14.
35. Fierer N, Lauber CL, Zhou N, McDonald D, Costello EK, Knight R. Forensic identification using skin bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(64):77-81.
36. Børsting C, Morling N. Next generation Sequencing and Its Applications in Forensic Genetics. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;(18):78-9.