T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP ve ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Gönül Filoğlu

YAŞ TAYİNİNDE DNA METİLASYON BELİRTEÇLERİNİN KULLANIMI VE OPTİMİZASYONU

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOG SÜMEYYE ZÜLAL ŞİMŞEK

İSTANBUL, 2020

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP ve ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Gönül Filoğlu

YAŞ TAYİNİNDE DNA METİLASYON BELİRTEÇLERİNİN KULLANIMI VE OPTİMİZASYONU

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOG SÜMEYYE ZÜLAL ŞİMŞEK

İSTANBUL, 2020

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, birikim, güler yüz ve desteklerini eksik etmeyen değerli hocalarım ***Prof. Dr. Faruk Aşıcıoğlu***, ***Prof. Dr. Münevver Açıkkol***, ***Doç. Dr. Gönül Filoğlu Tüfek***, ***Dr.Öğr.Üyesi Özlem Bülbül Ercan***, ***Dr. Öğr. Üyesi Selda Mercan***, ***Doç. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu***, ***Doç.Dr. Hüseyin Çakan***, ***Prof. Dr. Bülent Üner****'e*

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, özverisi ve hoşgörüsünü esirgemeyen, yol gösterici olan ve zorluklar karşısında pozitif enerjisiyle desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam ***Doç. Dr. Gönül Filoğlu Tüfek***'e,

Yaşadığım zorluklar karşında akademik tecrübesini paylaşan, bana sağladığı destek ve moral için değerli hocam ***Dr.Öğr.Üyesi Selda Mercan***'a,

Çalışmalarım boyunca her türlü yardım ve manevi desteklerini hissettiğim ***Selen Özyer***, ***İlksen Tavacı***, ***Zülal Seval Uslu***, ***Sebahat Polat***, ***Beyza Kula***, ***Merve Çil***, ***Çağdaş Adıören***, ***Tuğba Tekin***, ***Murat Yayla*** ve ***Merve Kuloğlu***'na,

Beni laboratuvarlarına kabul eden ve desteklerini esirgemeyen Santiago de Compostela Üniversitesi, Adli Genetik Bölümü'nden değerli hocalarım ***Prof.Dr. Maria V. Lareu***, ***Dr.Christopher Phillips***, ***Dr.Ana Freire-Aradas*** ve arkadaşlarım ***Lorena Giron-Santamaria***, ***Nerea Rodal***, ***Adrian Ambroa-Conde*** ve ***Jorge Ruiz Ramirez****'e,*

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

Bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan ***tüm gönüllülere***,

Ve bugünlere gelmemi sağlayan, hayatımın her anında koşulsuz yanımda olan sevgili ***Babam***, ***Annem***, ***Kardeşlerim*** ve tüm ***AİLEME*** teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Sümeyye Zülal Şimşek

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER ve DENKLEMLER DİZİNİ v

TABLOLAR DİZİNİ vii

KISALTMALAR DİZİNİ viii

Özet ve Anahtar Kelimeler 1

İngilizce Özet (Summary) 3

1. Giriş ve Amaç 5

2. Genel Bilgiler 8

2.1. DNA'nın Keşfi ve Genetik Bilimi 8

2.2. Adli Bilimlerde Genetik Kimliklendirme 9

2.3. Epigenetik 12

2.3.1. DNA metilasyonu 14

2.4. Yaşlanma 18

2.5. Adli Bilimlerde Epigenetik Yaklaşımlar 19

2.5.1. Monozigotik ikizlerin ayrımı 20

2.5.2. Vücut sıvılarının tanımlanması 22

2.6. Adli Bilimlerde Yaş Tahmini 24

2.6.1. Geleneksel yaklaşımlar 24

2.6.2. Güncel yaklaşımlar 25

2.6.3. DNA metilasyonu ve yaş tahmini 28

2.6.3.1. Metilasyona dayalı yaş tahmininde kullanılan yöntemler 31

2.6.3.2. Bisülfit dönüşümü 34

3. Gereç ve Yöntem 36

3.1. Deneyde Kullanılan Gereçler 36
3.1.1. Ekipman 36
3.1.2. Ticari kitler 37
3.1.3. Ticari kit haricinde kullanılan malzemeler 37
3.1.4. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan malzemeler 38
3.1.5. Kapiler elektroforez için kullanılan malzemeler 38
3.2. Deney Aşaması 38
3.2.1. Örneklerin toplanması 39
3.2.2. DNA izolasyonu ve miktar tayini 40
3.2.2.1. QIAamp® Mini Kit ile kan örneklerinden DNA izolasyonu 41
3.2.2.2. Quant-it™ dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen) ile miktar tayini 42
3.2.3. MethylEdge™ Bisulfite Conversion System Kit ile bisülfit dönüşümü 42
3.2.4. PCR 44
3.2.4.1. PCR bileşenlerinin hazırlanması 45
3.2.4.2. PCR koşulları 46
3.2.5. Agaroz jel elektroforezi 46
3.2.5.1. Agaroz jel elektroforezinin hazırlanması 47
3.2.6. PCR ürünlerinin saflaştırılması 47
3.2.6.1. PCR ürünlerinin hazırlanması 47
3.2.6.2. PCR koşulları 48
3.2.7. SNaPshot reaksiyonu (minidizileme) ve SNaPshot ürünlerinin saflaştırılması . 49
3.2.7.1. SNaPshot reaksiyonu için örneklerin hazırlanması 49
3.2.7.2. SNaPshot reaksiyonu için Termal Döngü koşulları 50
3.2.8. SNaPshot ürünlerinin saflaştırılması 51

3.2.9. PCR ürünlerinin ABI PRISM® 310/3130*xl* cihazı ile analizi 51

3.2.9.1. Örneklerin hazırlanması 51

3.2.9.2. Örneklerin elektroforezi 52

3.2.9.3. Örneklerin analizi 53

3.2.10. Verilerin analizi ve yaş hesaplanması 53

4. Bulgular 55

4.1. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu, DNA Miktarının Belirlenmesi ve Bisülfit Dönüşümü 55

4.2. 9 CpG Bölgesine Ait Metilasyon Profillerinin Belirlenmesi 57

4.2.1. Bisülfit dönüşümü ve PCR aşaması 57

4.2.2. Elektroforez aşaması 58

4.2.3. İstatistiksel değerlendirme 64

5. Tartışma ve Sonuç 71

6. Kaynaklar 79

EKLER 91

ÖZGEÇMİŞ 95

ŞEKİLLER ve DENKLEMLER DİZİNİ

Şekil 1 : DNA'nın yapısı 8

Şekil 2 : Çift sarmallı DNA'nın gösterimi 9

Şekil 3 : Adli biyolojinin tarihsel gelişimi 10

Şekil 4 : Epigenetik mekanizmalar 13

Şekil 5: DNA metilasyon mekanizması 15

Şekil 6: DNMT 3a ve DNMT 3b (a) ile DNMT 1 (b)'in DNA metilasyon yolakları 16

Şekil 7: CpG adacıklarında hipometilasyon ve hipermetilasyon mekanizması 17

Şekil 8 : Monozigotik ikizler arası yaşam koşullarına bağlı epigenetik farklılıklar 22

Şekil 9 : Yaş tahmini biyobelirteçleri ve dezavantajları 26

Şekil 10 : Genomik DNA'da sodyum bisülfit uygulaması sonucu sitozinin urasile dönüşümü 35

Şekil 11(a): Gönüllülerin günlük sigara ve alkol tüketimi alışkanlıklarına ait grafikler 39

Şekil 11(b): Gönüllülerin beslenme ve egzersiz alışkanlıklarına ait grafikler……..40

Şekil 12 : SNaPshot Teknolojisinin şematik gösterimi 49

Şekil 13 : LIZ120'nin elektroforegram görüntüsü 53

Şekil 14 : Bisülfit dönüşümü ve PCR sonrası elde edilen agaroz jel görüntüsü (a) Bisülfit dönüşümü tamamlanmamış örneklerin agaroz jel görüntüsü (b) Yeniden bisülfit dönüşümü ve PCR uygulanmış örneklerin agaroz jel görüntüsü 57

Şekil 15 : (a) PCR aşamasında (b) SNaPshot reaksiyonuna ait negatif kontrol örneklerinin elektroforegram görüntüsü 59

Şekil 16 : Pozitif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü 59

Şekil 17 : Bir örneğe ait elektroforegram görüntüsü 59

Şekil 18 : ELOVL2 genindeki CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 65

Şekil 19 : ASPA genindeki CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 65

Şekil 20 : PDE4C genindeki CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 66

Şekil 21 : FHL2 genindeki CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği..... 66

Şekil 22 : CCDC102B genindeki CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği..... 67

Şekil 23 : C1orf132 genindeki CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 67

Şekil 24 : CR_23 CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği..... 68

Şekil 25 : EDARADD CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 68

Şekil 26 : KCNAB3 CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 69

Şekil 27 : 7 CpG noktasının tahmini yaş değerlerine ait lineer regresyon grafiği 70

Denklem 1 : Metilasyon oranlarının hesaplanması 54

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo I: Yaşayan bireylerde yaş belirleme talepleri 24

Tablo II : Kandan DNA metilasyon belirteçlerine dayalı modellerin özeti 33

Tablo III : Bisülfit dönüşümü için termal döngü cihazı koşulları 43

Tablo IV: Yaş tahmiminde kullanılan hedef gen bölgeleri ve CpG bölgelerini 44

Tablo V : PCR bileşenlerinin optimum değerleri 45

Tablo VI : Optimum PCR koşulları 46

Tablo VII: PCR ürünleri saflaştırma bileşenleri 48

Tablo VIII : PCR ürünlerini saflaştırma için optimum termal döngü cihazı koşulları 48

Tablo IX : SNaPshot reaksiyonu için PCR bileşenleri 50

Tablo X : SNaPshot reaksiyonu PCR programı 50

Tablo XI : Elektroforez için gerekli olan bileşenlerin hazırlanması 51

Tablo XII : Elektroforez koşulları 52

Tablo XIII : ABI PRISM® 310/3130*xl* 'da boyaların temsil ettiği renkler 52

Tablo XIV : Kandan elde edilen 50 kişiye ait DNA miktarları 55

Tablo XV : 50 kişiye ait metilasyon değerleri ve yaş tahmini sonuçları 60

Tablo XVI : 9 CpG noktasına ait korelasyon değerleri 64

KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
ABI	Applied Biosystems, Inc
AGEs	İleri glikasyon son ürünleri (Advanced glycation end-products)
Ark	Arkadaşları
AFLP	Çoğaltılmış fragment uzunluk polimorfizmi (amplified fragment length polymorphisms)
BSA	Bovine serum albumin
Buffer AE	Elüsyon Tamponu (Elution Buffer)
Buffer AL	Lizis Tamponu (Lysis Buffer)
Buffer AW1	Yıkama Tamponu 1 (Wash Buffer 1)
Buffer AW2	Yıkama Tamponu 2 (Wash Buffer 2)
C	Sitozin (Cytosine)
cAMP	Siklik-Adenozin monofosfat
Chr	Kromozom
CpG	Sitozin-Fosfat-Guanine (Cytosine-Phosphate-Guanine)
CNV	Kopya sayısı varyasyonları
DNA	Deoksiribonükleik asit
Dnmt	DNA metiltransferaz enzimi
dNTP	Deoksiribonukleotit tri fosfat
ddNTP	Dideoksinükleotid
dsDNA	Çift zincirli DNA (Double stranded DNA)
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit

G	Guanin
HK	Housekeeping
mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	Mikro RNA
mtDNA	Mitokondriyal DNA
MZ	Monozigotik ikiz
ncRNA	Kodlanmayan RNA (Non-coding RNA)
ng	Nanogram
NK	Negatif kontrol örneği
MAE	Ortalama mutlak hata (Mean absolute error)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
piRNA	Piwi etkileşimli RNA
PK	Pozitif kontrol örneği
RFLP	Rastgele fragment uzunluk polimorfizmi (Randomly fragment lentgh polymorphism)
RFU	Rölatif floresan ünitesi
Rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
Rs	Spearman korelasyon katsayısı
SAH	S-Adenozilhomosistein
SAM	S-Adenozil Metiyonin
siRNA	Küçük interferans RNA
sjTRECs	Sinyal-birleşimli T-hücre reseptör eksizyon çemberleri (Signal-joint T-cell receptor excision circles)
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism)
STR	Kısa tekrar dizileri (Short tandem repeat)

SUMO	Küçük ubikitin ile ilişkili değiştirici (Small Ubiquitin-like Modifier)
T	Timin
TBE	Tris-Borat-EDTA
tDMRs	Dokuya özgü metilasyon profilleri
U	Urasil
UV	Ultraviyole
VNTR	Farklı sayıda ardışık tekrar dizileri (Variable number of tandem repeats)
µL	Mikrolitre
5mC	5-metil sitozin

Özet ve Anahtar Kelimeler

Adli bilimlerde olay yerinden elde edilen biyolojik materyallerde STR, SNP, mtDNA ve InDel gibi sistemler kullanılarak elde edilen DNA profilinden suçluya ulaşılmaya çalışılır. Son yıllarda konvasiyonel polimorfik sistemlerin yanında dış görünüşe ait (saç rengi, göz rengi gibi) özelliklerin belirlenmesi soruşturmada polise ve yargıya yardımcı olmaktadır. Bu özelliklerin yanında biyolojik delilden yaş tahmininin de yapılması DNA veri bankası bulunmayan ülkeler için daha fazla önem arz etmektedir. Son yıllarda yaş belirlenmesinde epigenetik mekanizmaların belirteç olarak kullanılabileceği ortaya konmuştur. Bu mekanizmalardan DNA metilasyon belirteçleri ile geleneksel yöntemlere kıyasla daha yüksek doğrulukta yaş tahmini yapılabilmektedir.

Bu çalışmada, büyüme ve gelişmede etkili genlerin promotör bölgelerindeki CpG adacıklarında bulunan ve yaşa bağlı olarak gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynayan DNA metilasyon belirteçlerinin hipermetilasyon ve hipometilasyon profillerinin yararlanarak kişilerin yaş tahmini yapılması amaçlanmıştır. Bunun için yaş ile ilişkili olduğu belirlenen, Freire-Aradas ve ark. (2016)'nın oluşturmuş olduğu 9 CpG lokuslu multipleks panel kullanıldı. Yaş aralıkları 22-78 olan 50 gönüllüye ait kan örneklerinin multipleks panel ile metilasyon seviyeleri tespit edilerek yaş tahmini yapıldı. DNA metilasyon analizi için altın standart olan bisülfit dönüşümü işleminin ardından SNaPshot yöntemi ile metilasyon profilleri belirlendi. Elde edilen metilasyon değerleri RStudio v.1.1.463 programı ile korelasyon değerleri hesaplanarak The Snipper 2.5 programı ile tahmini yaş değerleri saptandı. Panelin 50 kişiden elde edilen tahmini yaş ortalamalarının mutlak hata değeri ±3,01 yıl olduğu tespit edildi. Seçilen lokusların kronolojik yaş ile yüksek korelasyon gösterdiği belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre, kandan yaş tahmini için epigenetik belirteçlerin kullanımının yararlı ve bilgi verici bir yöntem olduğu tespit edildi. Sonuç olarak bu çalışma DNA metilasyonu kullanılarak yapılan

yaş tahmini için bir ön çalışma niteliğinde olup daha çok kişide ve farklı biyolojik örneklerle çalışılması gerekir.

Anahtar Kelimeler: Adli epigenetik, Yaş tayini, DNA metilasyonu, Yaşlanma, SNaPshot

İngilizce Özet (Summary)

In forensic sciences, the biological materials obtained from the crime scene are tried to be reached from the DNA profile obtained by using systems such as STR, SNP, mtDNA and InDel. In recent years, besides the conventional polymorphic systems, determining the features of the outer appearance (such as hair color, eye color) helps the police and the judiciary in the investigation. In addition to these features, estimating age from biological evidence is more important for countries without DNA databases. In recent years, it has been revealed that epigenetic mechanisms can be used as markers in age determination. Among these mechanisms, higher accuracy age estimation can be made with DNA methylation markers compared to traditional methods.

In this study, it was aimed to estimate the age of individuals by using the hypermethylation and hypomethylation profiles of DNA methylation markers, which are located on CpG islands in the promoter regions of genes that are effective in growth and development and play a role in the regulation of gene expression based on age. For this purpose, a multiplex panel with 9 CpG loci, which was determined to be age related, was created by Freire-Aradas et al. (2016). The blood samples of 50 volunteers, whose age ranges are 22-78, were determined with the multiplex panel and methylation levels were determined. Following the bisulfite conversion process, which is the gold standard for DNA methylation analysis, methylation profiles were determined by SNaPshot method. The obtained methylation values were calculated with the RStudio v.1.1.463 program and the estimated age values were determined with The Snipper 2.5 program. The absolute error value of the panel's estimated average age obtained from 50 people was found to be ± 3.01 years. It was determined that the selected loci showed high correlation with chronological age. According to the results obtained, the use of epigenetic markers for blood age estimation was found to be a useful and informative

method. In conclusion, this study is a preliminary study for age estimation using DNA methylation, and it should be studied with more biological samples.

Keywords: Forensic epigenetic, Age estimation, DNA methylation, Aging, SNaPshot

1. Giriş ve Amaç

Yirminci yüzyılın sonlarına doğru moleküler genetik alanda gerçekleşen ilerlemeler, polimorfik özelliklerin direkt olarak DNA düzeyinde incelenmesine olanak tanımıştır. Bu da adli amaçlı DNA analizlerinin temelini oluşturmuştur (1).

Bir biyolojik örnekten kişinin biyocoğrafik soyunun ve dış görünüşüne ait özelliklerinin belirlenmesi adli kimliklendirmede son yıllardaki en güçlü araçlardan biridir. Olay yerinden gelen biyolojik materyalden yararlanarak bir suçun failinin, felaket kurbanlarının ve kimliği belirsiz cesetlerin kimliklendirilmesi için o kişiyi tanımlayabilen her bir veri önemlidir. Günümüzde kullanılan DNA profilleme yöntemleri genellikle olay yerinden elde edilen DNA verilerinin şüpheliler ile karşılaştırılması sonucunda bir dışlama/dâhil etme şeklinde sonuca ulaşılır. Şüpheli bulunmadığında ise karşılaştırma yapılamayacağı için kişiyi tanımlayacak, dış görünüşe dair bilgi verecek son yıllarda geliştirilen yeni sistemlere başvurulur. Son yıllarda DNA örneğinden kişinin saç, göz, ten rengi, yüz yapısı, kel olup olmadığı gibi kişiyi fenotipik olarak tanımlamaya yönelik araştırmalar yapılmaktadır. Bu bilgilere ek olarak yaş tahmini yapılması hem kolluk kuvvetlerine araştırma sırasında hem de yaşlanmaya bağlı olarak değişen fenotipik özelliklerin belirlenmesine yardımcı olacaktır.

Adli bilimlerde yaş tayininin geleneksel yolu kemik analizlerine dayanır. Fakat bu metot yalnızca kemik içeren olaylarda ve deneyimli uzman tarafından yapılabilir (2). Son on yılda yapılan çalışmalar ve teknolojik gelişmeler sayesinde bu kısıtlamaların önüne geçilmiştir. Yaşlanma sürecinin bir sonucu olarak yaşam döngüsü boyunca biyomoleküllerde kademeli olarak değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişimler yaş tahminde bir biyomarkır olarak kullanılabilmektedir.

Epigenetik mekanizmaların bireyin tanımlanmasında yararlı olabileceğinin belirlenmesi adli bilimlere yeni bir yaklaşım getirmiştir. Bu belirteçlerin tanımlaması ve uygulanabilirliği, çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (3). Epigenetik mekanizmalardan genomda

en iyi tanımlanmış olan DNA metilasyonu, DNA'nın in vitro stabilitesi, daha az miktarda biyolojik materyal ile çalışmaya olanak sağlaması gibi avantajlarından dolayı adli bilimlerde uygulanmaya başlanmıştır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan CpG bölgelerindeki metilasyon seviyesi belirlenerek yaş tahmini, vücut doku/sıvılarının tiplendirilmesi ve monozigotik ikizler arasındaki farklılıkların tespit edilmesinde belirteç olarak kullanılabileceği belirlenmiştir (3,4).

Epigenetik, DNA dizisinde değişim olmadan gen anlatımında meydana gelen değişiklikler olarak tanımlanır (4). Epigenetik modeller, gelişim ve yaşlanma sürecinde değişime uğrar. Yaşlanma, bir dizi çoklu biyolojik fonksiyonun zamana bağlı bir düşüşü olarak tanımlanabilir. Yaşlanma süreci organizmalarda gen ekspresyonun azalmasına veya artmasına neden olabilmektedir (5). Günümüzde, epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyonu kronolojik yaş tahmininde kullanılabilen en iyi yöntem olarak görülmektedir.

Epigenetik mekanizmalardan genomda en iyi tanımlanmış olan DNA metilasyonu, DNA'nın in vitro stabilitesi, daha az miktarda çalışmaya olanak sağlaması gibi avantajlarından dolayı adli bilimlerde uygulanmaya başlanmıştır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan CpG bölgelerindeki metilasyon seviyesi belirlenerek yaş tahmini, vücut doku/sıvılarının tiplendirilmesi ve monozigotik ikizler arasındaki farklılıkların tespit edilmesinde belirteç olarak kullanılabileceği belirlenmiştir (6). Günümüzde epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyon analizi kronolojik yaş tahmininde kullanılabilen en iyi yöntemdir (7).

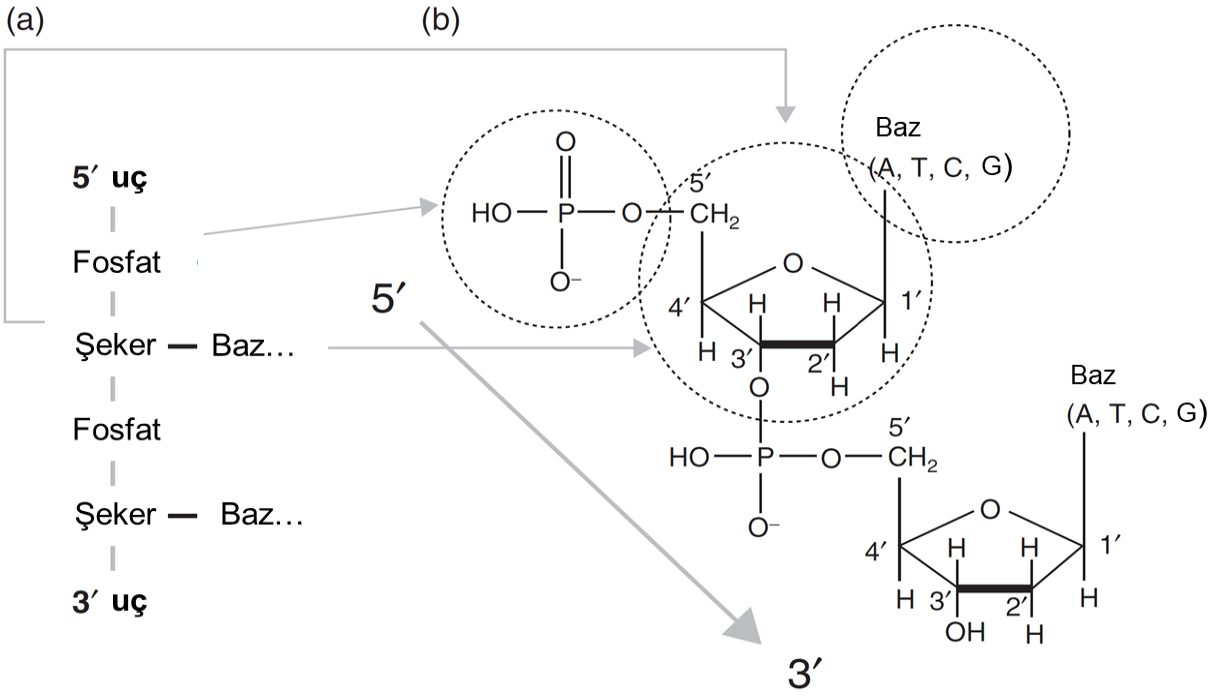
Bu çalışmada, büyüme ve gelişmede etkili genlerin promotör bölgelerindeki CpG adacıklarında bulunan ve yaşa bağlı olarak gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynayan hipermetilasyon ve hipometilasyon profillerinin yararlanarak kişilerin yaş tahmini yapılması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak Freire-Aradas ve ark.(2016) tarafından geliştirilen (8) panel ile çeşitli yaşlardaki bireylerden alınan kan örneklerinde ELOVL2, FHL2, ASPA, C1orf132, CCDC102B, CR_23, PDE4C, KCNAB3 ve EDARADD genlerinde

metillenmiş/metillenmemiş sitozin seviyeleri tespit edilerek kişilerin gerçek yaşlarının tahmini yapılmıştır. Böylece, suç faillerinin/kayıp kişilerin tanımlanmasında DNA metilasyonun bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesi yaygınlaştırılması sağlanacaktır.

2. Genel Bilgiler

2.1. DNA'nın Keşfi ve Genetik Bilimi

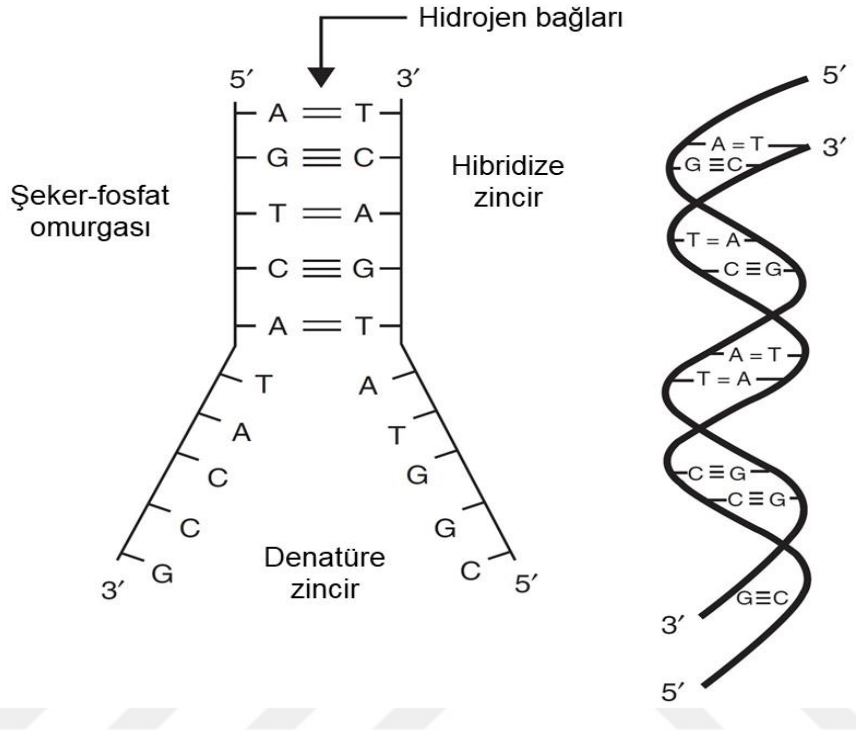
Deoksiribonükleik asit (DNA), genleri oluşturan ve kalıtsal bilgiyi taşıyan, vücutta tüm somatik hücrelerde bulunan çift zincirli bir moleküldür (9). 1950'li yılların başlarında ilk olarak, Rosalind Franklin ve öğrencisi R.G. Gosling tarafından X-Ray kristalografisi yöntemi kullanılarak çift sarmallı moleküler yapısı aydınlatıldı (10). Daha sonra James Watson ve Francis Crick tarafından DNA'nın çift iplikli ve sarmal yapısı olduğu ortaya kondu (11).



Şekil 1 : DNA'nın yapısı (12)

DNA, temel olarak bir baz (Adenin; A, Timin; T, Guanin; G, Sitozin; C), bir şeker (deoksiriboz) ve fosfat grubundan oluşur (Şekil 1). Deoksiriboz ve fosfat grubu bir araya gelerek şeker-fosfat omurgasını oluşturur (Şekil 1-a). Bazlar ise pürin (A, G) ve pirimidin (C,

T, U) olarak 2 gruba ayrılır. A- T bazlarını iki hidrojen bağı ve C-G bazlarının üç hidrojen bağı ile karşılıklı olarak bir araya gelmesi sonucu çift zincirli DNA sarmalı meydana gelir (Şekil 2) (12).



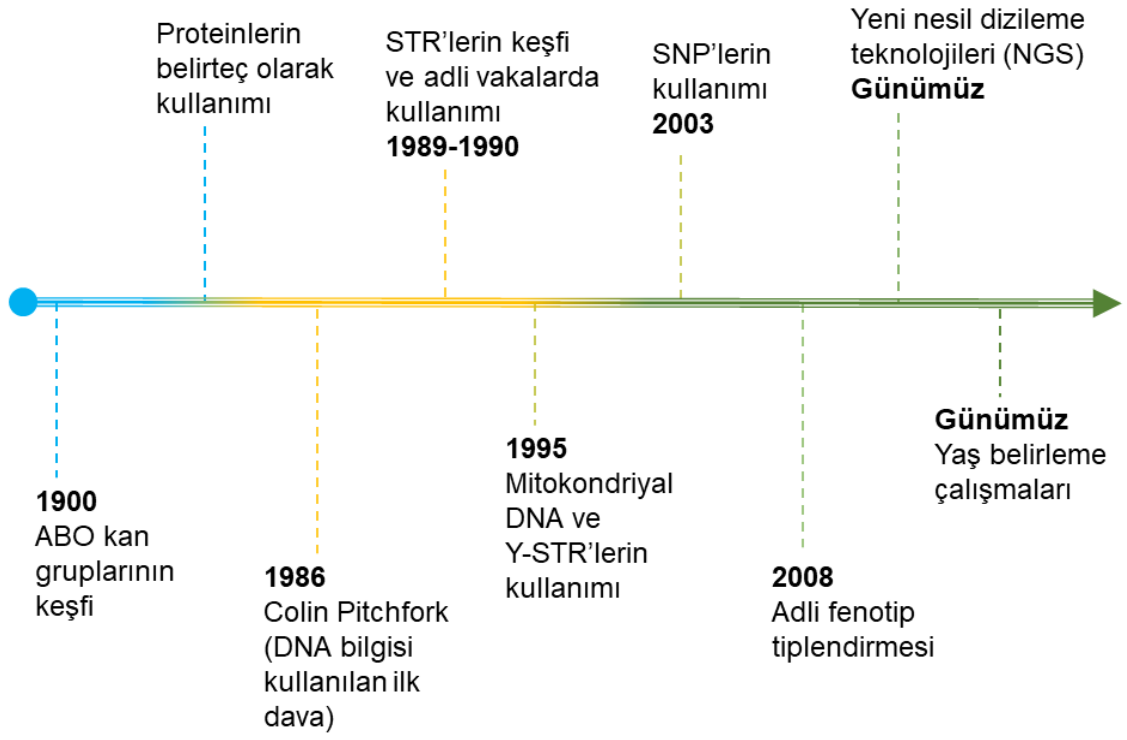
Şekil 2 : Çift sarmallı DNA'nın gösterimi (12)

Genetik, bilimsel olarak 1859'da Charles Darwin'nin ardından 1865'te Gregory Mendel'in kalıtımın kanunlarını yayınlaması ile başlamıştır. 1950'li yıllardan sonraki çalışmalar ve 2000'li yıllarda İnsan Genom Projesi'nin ardından her geçen gün genetik bilimi gelişmektedir (13).

2.2. Adli Bilimlerde Genetik Kimliklendirme

Adli bilimlerde kimliklendirmede 1800'lerin başında parmak izi kullanılmaya başlanmış ve 1890 yılında Edward Henry tarafından parmak izi sınıflandırması yapılmıştır (14). Modern adli biyolojinin tarihsel gelişimi 3 aşamadan oluşmaktadır. Bunlardan ilki 1900 yılında,

Landsteiner tarafından ABO kan gruplarının keşfedilmesiyle birlikte kan grupları kimliklendirme amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. İkincisi, antijen polimorfizmine alternatif kullanılan protein polimorfizmidir. Üçüncüsü, 1990'larda kısa ardışık tekrarların (Short Tandem Repeats, STR) markır olarak kullanıldığı DNA polimorfizmidir (Şekil 3) (12,15–17).



Şekil 3 : Adli biyolojinin tarihsel gelişimi

Adli bilimlerde DNA'nın kullanımı ilk olarak Alec Jeffrey ve ark. (1984) tarafından DNA parmak izinin keşfedilmesiyle ortaya çıkmıştır (18). Jeffrey DNA'da kişiler arasında değişkenlik gösteren ve farklı sayıda ardışık tekrar dizileri (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) içeren dizilerin varlığını keşfetmiştir. VNTR polimorfizminin analizi, o dönemde henüz PCR (polymerase cahin reaction) keşfedilmediğinden uzunluk parça polimorfizmi (Randomly Fragment lentgh polymorphism, RFLP) yöntemiyle analiz ediliyordu (19,20). Adli bilimlerde ilk kez VNTR'lerin RFLP kullanılarak Colin Pitchfork vakası (1986)

çözülmüştür (21). Böylece DNA'nın kanıt olarak kullanıldığı ilk dava olarak adli bilimler tarihine geçmiştir.

1986 yılında Kary Mullis ve ark. tarafından polimeraz zincir reaksiyonu tekniğini geliştirerek adli genetikte DNA analizinde yeni bir dönemin başlanmasına neden olmuştur. Böylece az miktardaki DNA örnekleri PCR ile milyarlarca (~10^9) kopyası elde edilebildiğinden analize elverişli olmayan örneklerden DNA profili oluşturmak mümkün hale gelmiştir. VNTR lokusu olan D1S80, PCR kullanılarak çoğaltılmış uzunluk parça polimorfizmi (amplified fragment length polymorphisms, AFLPs) yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu yöntem başarılı olmasına karşın PCR'ye geçiş olarak kullanılmış ve 1990'larda PCR yöntemi ile kısa ardışık tekrar dizileri (short tandem repeat, STR) analizine başlanmıştır. 1995 yılında STR dizilerinin yer aldığı ilk DNA veri bankası oluşturulmuştur (17,22,23).

Y-kromozomu polimorfizmi babalık davalarında ve çeşitli özel vakalarda adli bilimlerde 1995 yılından beri kullanılmaktadır. Özellikle cinsel saldırı vakalarında kadından elde edilen karışık DNA örneklerinde çok düşük miktarda olsa bile fail tespit edilebilmektedir. Daha sonra mitokondriyal DNA (mtDNA) adli DNA analizinde kullanılmaya başlanmıştır. mtDNA'nın en büyük avantajı yüksek miktarda kopya içerdiğinden, eser miktardaki nükleer DNA örneklerinde, insana ait kalıntılarda, köksüz saç kıllarında, felaket kurbanlarının kimliklendirilmesinde ve yüksek derecede degrade olmuş çok eski kalıntılarda çalışılmaktadır. Y-kromozomu ve mtDNA analizi ile aynı zamanda insanların köken araştırmaları ve biyocoğrafik soy tanalizleri yapılabilmektedir (20–22).

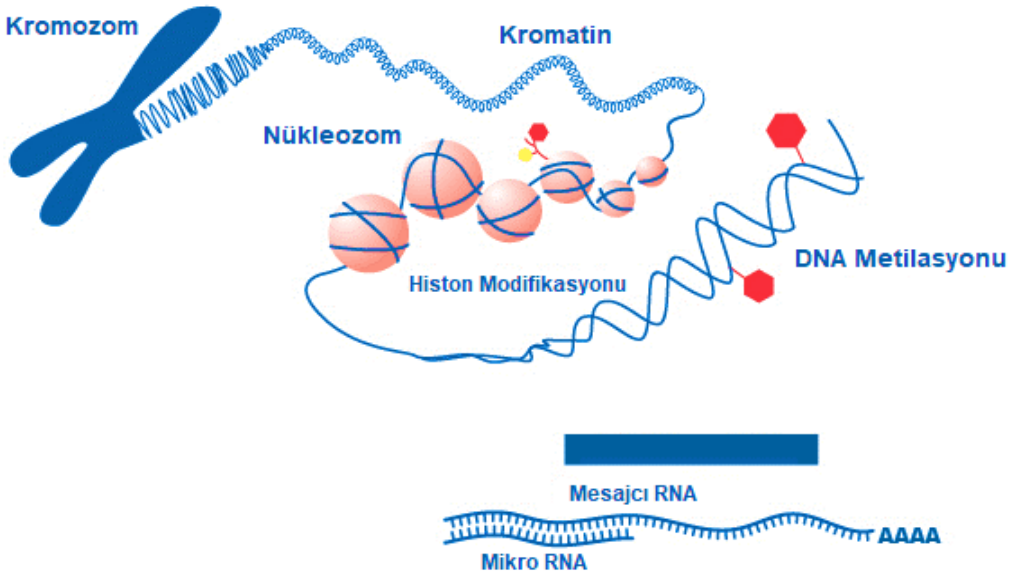
Gelişen teknoloji ve insan genom projesinin tamamlanmasıyla yeni polimorfik belirteçler (markırlar) tanımlanmıştır. Bu markırlardan tek nükleotit polimorfizmi (single nucleotide polymorphism, SNP), STR'lere göre daha düşük mutasyon oranına sahip ve çok küçük olmaları sebebiyle degrade örneklerde başarıyla analiz edilebilmektedirler. Bu belirteçler biyocoğrafik soy tayini, saç, göz ve ten rengi gibi fenotipik özelliklerin belirlenmesinde

kullanılmaktadır. Son yıllarda fenotipik markırlarla birlikte epigenetik markırlar da kullanılarak kişilerin kimliklendirilmesinde büyük bir gelişme sağlanmıştır (20,21,24,25).

2.3. Epigenetik

Epigenetik terimi ilk olarak 1940'ların başında Conrad Waddington tarafından "genler ve fenotip arasındaki etkileşimleri inceleyen bir biyoloji dalı" olarak tanımlamıştır (3). Günümüzde ise DNA dizisinde değişiklik olmadan gen anlatımında meydana gelen ve hücresel fenotipte oluşan kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanabilir (4,26). Bu kalıtsal değişiklikler epigenetik kalıplar olarak nesilden nesile aktarılırken, kişinin yaşamı boyunca beslenme alışkanlığı, sigara kullanımı gibi çevresel etmenler nedeniyle değişebilmektedir. Epigenetik mekanizmalar; histon modifikasyonu, kromatinin yeniden modellenmesi, kodlanmayan RNA'lar ve DNA metilasyonu olarak sıralanabilir (Şekil 4) (4).

Histon modifikasyonları genellikle bir histon proteininin post-translasyonel modifikasyonudur. Histon proteinlerinin N-terminal uçlarında bulunan kuyruklarına asetil gruplarının eklenmesiyle *asetilasyon*, asetil gruplarının uzaklaştırılmasıyla *deasetilasyon*, metil grubunun eklenmesiyle *metilasyon*, fosfat grubunun eklenmesiyle *fosforilasyon*, Küçük ubikitin ile ilişkili değiştirici (SUMO, Small Ubiquitin-like Modifier) proteinlerinin bağlanmasıyla *sumolasyon* ve ubikitin proteinlerinin eklenmesiyle *ubikitinasyon* meydana gelir (27,28).



Şekil 4 : Epigenetik mekanizmalar (29)

Kromatinin yeniden (modellenmesi) düzenlenmesi, düzenleyici moleküller aracılığıyla kromatinlerin modifiye edildiği bir mekanizmadır. Kromatinlerin ulaşılabilirlikleri DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin düzenleyicileri ile kontrol edilirken diğer yandan da üç boyutlu kromatinin düzenlenmesi sağlanır. ATP moleküllerinin hidrolizi sonucu oluşan enerji kullanılarak çoklu protein kompleksi olan nükleozomlar harekete geçirilerek yeniden şekillenir. Bu mekanizma, kromatinin yeniden düzenlenmesi olarak adlandırılır ve sinyal moleküllerinin hedef DNA bölgesine ulaşmasını sağlar (30,31).

Kodlanmayan RNA'lar (ncRNAs) bir diğer epigenetik mekanizma olup genin susturulmasını sağlar. ncRNA'lar DNA'dan transkripte edilir ancak translasyon ile proteine dönüştürülmeyen fonksiyonel RNA molekülleridir. Bu moleküller gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel seviyede düzenlenmesini sağlar. ncRNA'lar kısa ncRNA (30 nükleotidden küçük) ve uzun ncRNA (200 nükleotidden büyük) olarak ana iki gruba ayrılır. Kısa kodlanmayan RNA'lar mikro RNA (miRNA), küçük interferans RNA (siRNA) ve piwi etkileşimli RNA (piRNA) olarak üç sınıfta toplanır. Her bir grup temelde histon modifikasyonu, DNA metilasyonu ve gen sessizleştirilmesinde rol oynar (27,32).

DNA metilasyonu, sitozin nükleotidine bir metil grubunun (CH3) bağlanması sonucu oluşan bir reaksiyondur. Gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynayan ve normal gelişim süreci için gerekli olan bir epigenetik belirteçtir. Metilasyon, gen aktivitesinin değişmesine yol açmaktadır (3,33).

Organizmadaki tüm hücreler aynı genetik yapıya sahip olmalarına karşın epigenetik mekanizmalar sayesinde farklı doku ve hücrelerde çeşitli gen ekspresyon profillerinin oluşmasına neden olur. Bu mekanizmalar ile genin susturulması, anlatımı ve aktivasyonu düzenlenerek hücre için sadece gerekli olan genler ifade edilir. Epigenetik mekanizmalar, imprinting, gen susturulması, X kromozomu inaktivasyonu ve karsinogenez gibi önemli olaylarda rol oynar (3,4,34).

2.3.1. DNA metilasyonu

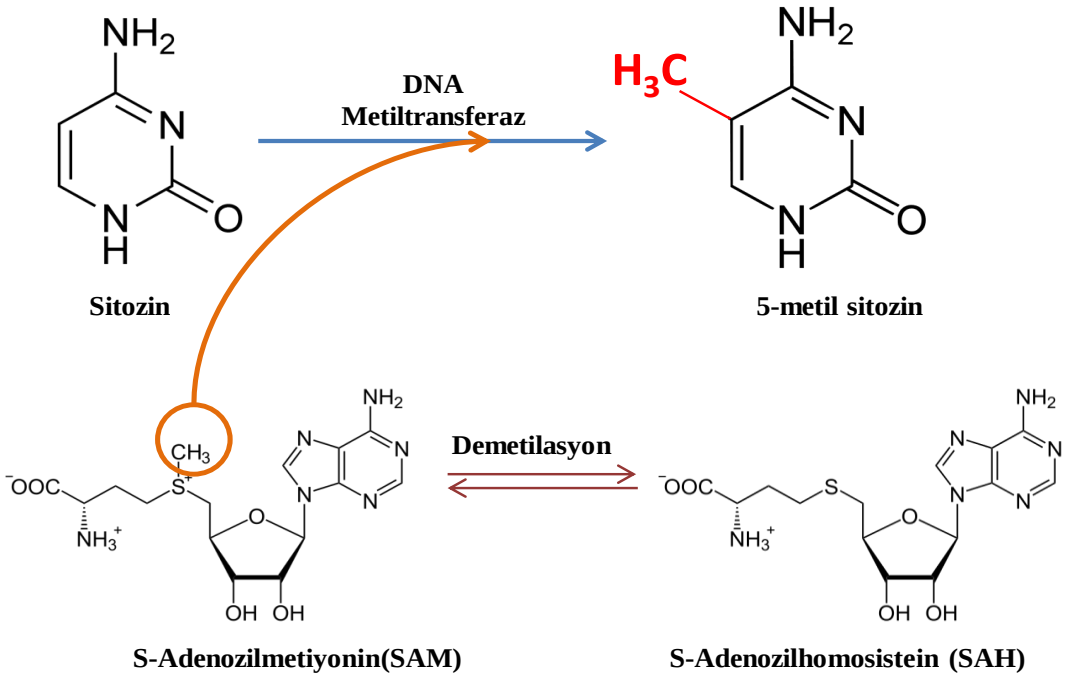
Tarihsel olarak memelilerde DNA metilasyonu, DNA'nın genetik materyal olarak tanımlanması kadar erken zamanda keşfedilmiştir (33,35). 1948 yılında Rollin Hotchkiss, kâğıt kromatografisi kullanarak dana timusundan modifiye sitozini keşfetmiştir. Hotchkiss kromatografide meydana gelen farklı fraksiyonun sitozin ve urasilden farklı olan 5-metil sitozin (5mC) olduğunu ve bu metillenmiş sitozinin DNA'da doğal olarak bulunduğunu ileri sürmüştür. Birçok araştırmacı, DNA metilasyonunun gen ekspresyonunu düzenlediğini savunsa da 1980'lere kadar bunun gen düzenlenmesinde rol oynadığını kanıtlayamamışlardır. Bugün ise DNA metilasyonunun diğer düzenleyici sistemler ile birlikte gen aktivitelerini etkileyen başlıca epigenetik faktörlerden biri olduğu bilinmektedir (34). Sitozin bazının metilasyonu memelilerde DNA'nın endojen modifikasyonu olarak bilinmektedir.

CpG adacıkları, omurgalı genomunda genin promotör bölgelerinde bulunan yaklaşık olarak 1000 baz çifti uzunluğunda olan DNA dizileridir. Genin yaklaşık %50-60'ı CpG adacıklarından oluşur. Bu adacıklar genin anlatımı için bağlanacak moleküllere tanınma bölgesi

oluşturur (36,37). Özellikle "Housekeeping genleri (HK)"ne özgü promotörler CpG adacıklarına gömülüdür. HK genleri tüm doku ve hücrelerde bulunan ve temel hücresel fonksiyonlarının gerçekleştirilmesini sağlayan genlerdir (38).

DNA metilasyonunun gen anlatımındaki en önemli görevi, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşmasını engelleyecek mekanik değişiklikler yaratmasıdır. Bu değişiklikler geri dönüşümlü olduğu için DNA mutasyonlarından farklılıklar gösterir (39).

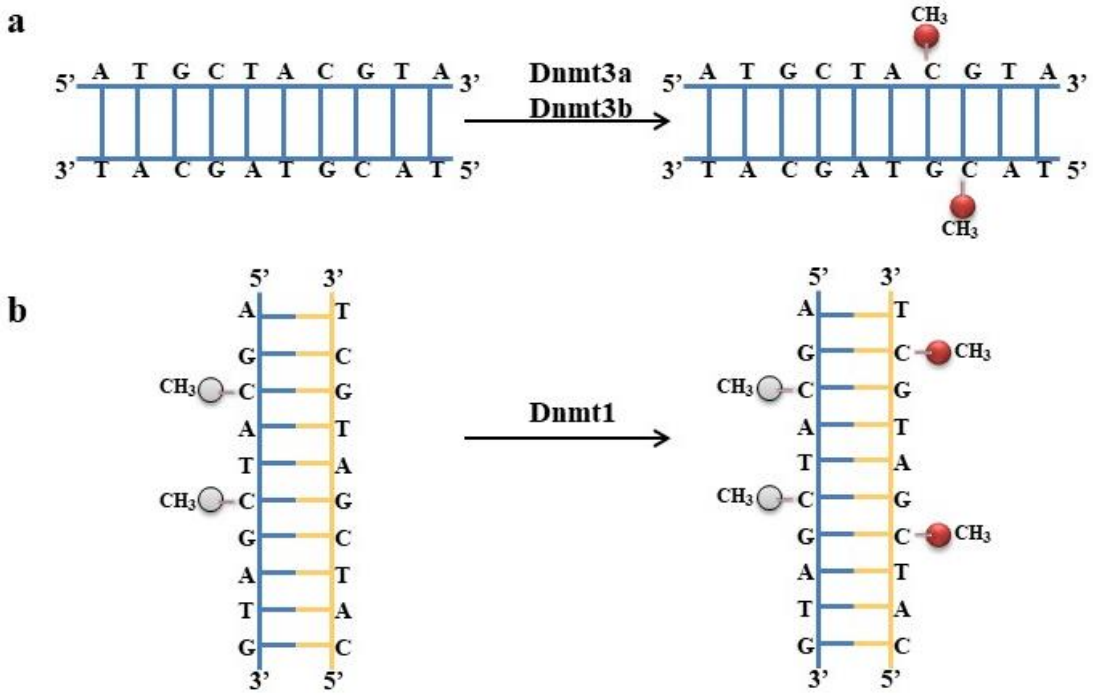
DNA metilasyonu, CpG bölgelerine DNA metiltransferaz enzimi ile sitozin bazındaki pirimidin halkasının 5.karbonuna bir metil grubunun bağlanması sonucu gerçekleşir. Bu mekanizmada esas rol oynayan moleküller, DNA metil transferaz (DNMT) enzimi ve S-Adenozil Metiyonin (SAM)'dir (40). DNMT, CpG adalarına metil grubu ekleyen enzimdir. SAM ise metil vericisi olarak görev yapan moleküldür (Şekil 5).



Şekil 5: DNA metilasyon mekanizması

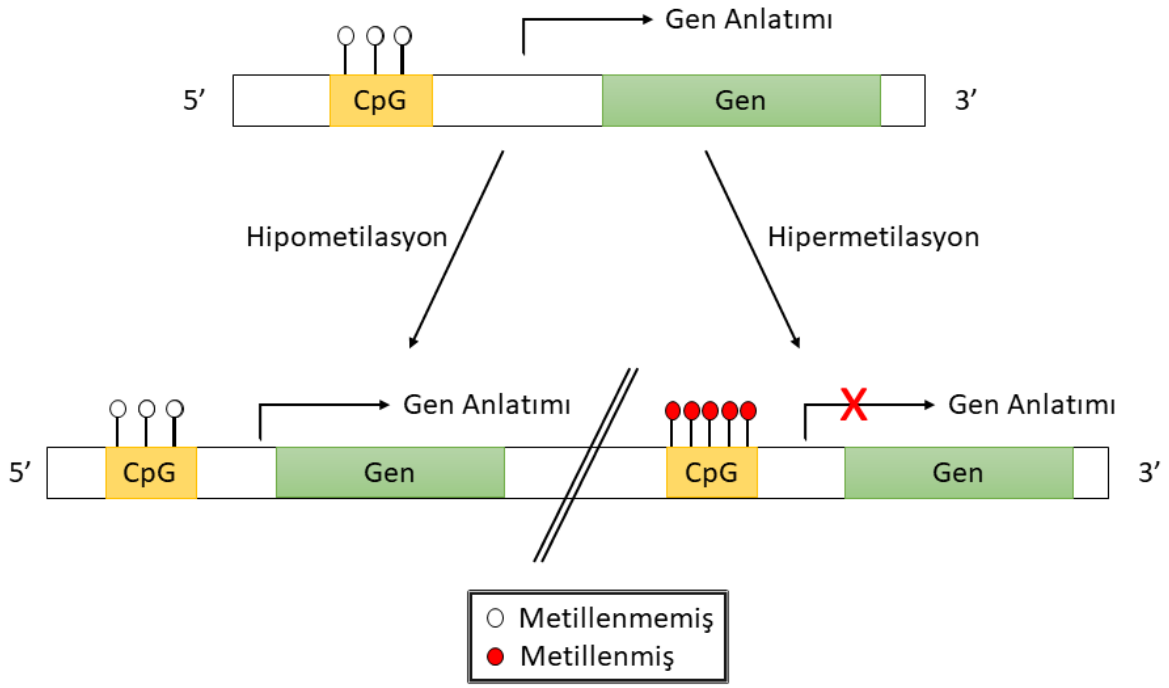
DNMT enzim ailesi üyesi olan DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b enzimleri temel olarak birbirine benzer yapıda olmalarına rağmen kendilerine özgü fonksiyonları ve ekspresyon modelleri ile birbirinden ayrılırlar. DNMT1 enzimi, memeli dokularında replikasyon sırasında kalıp DNA'daki metilasyon modelini yeni sentezlenmiş zincire kopyalayan enzimdir (Şekil 6a). Böylece DNA metilasyonu nesiller boyu kalıtılarak epigenetik işaret olarak yeni nesillere aktarılır.

DNMT3a ve DNMT3b, "de novo metiltransferazlar" olarak adlandırılır ve metillenmemiş DNA'yı substrat olarak kullanır ve metil grubunu ekler (Şekil 6b). DNMT3a ve DNMT3b, temel olarak aynı fonksiyonu gerçekleştirmesine rağmen dokular arasındaki anlatım farklılıkları nedeniyle birbirlerinden ayrılırlar. DNMT3a, her dokuda ifade edilse de DNMT3b, tiroit, testis ve kemik iliği hariç diğer dokularda daha az ifade edilir (34,37).



Şekil 6: DNMT 3a ve DNMT 3b (a) ile DNMT 1 (b)'in DNA metilasyon yolakları

Promotör bölgedeki metilasyon sıklığına göre hipometilasyon ve hipermetilasyon terimleri kullanılmaktadır (Şekil 7). Hipometilasyon, gen ekspresyonunda veya genomik kararsızlıkta bozulmalara neden olan düşük metillenme miktarı olarak tanımlanır. Hipermetilasyon ise promotörlerde bir genin susturulması olarak tanımlanır. Genin susturulması ve normal fonksiyonlarını gerçekleştirememesi sonucunda bazı hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olur. Sağlıklı bir genomda çoğu CpG bölgesi gen ekspresyonu ile ilişkili olarak metillenmemiştir (hipometilasyon). Fakat normal gelişim sürecinde germ-line spesifik genlerinde, dokuya özgü genlerde, X kromozomun sessizleştirilmesi gibi durumlarda metillenme gerçekleşir. Ayrıca yaşa bağlı olarak bazı CpG bölgelerinde metillenme oranı artmaktadır (39,41,42).



Şekil 7: CpG adacıklarında hipometilasyon ve hipermetilasyon mekanizması (43)

2.4. Yaşlanma

Yaşlanma, tüm işlevlerde azalmaya neden olan, organizmada doğal ve önlenemez olarak ilerleyen, moleküler, hücresel, organ ve sistem düzeyinde ortaya çıkan karmaşık bir süreçtir. Bu süreç kalıtım, çevre, yaşam tarzı ve hastalıklardan etkilenir. Bunun sonucunda yaşa bağlı olarak bazı hastalıklar meydana gelir. Hayvan modelleri ve hücre kültürü çalışmaları ile yaşlanmaya bağlı olarak hücre ve moleküllerde meydana gelen değişiklikler incelenmiştir (44). Primer yaşlanma, yapı ve fonksiyonlardaki bozulmaların yaşlanma sürecine bağlı olarak meydana gelmesidir. Sekonder yaşlanma ise hastalıklar ve çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkmaktadır (45).

Biyolojik yaşlanmanın birçok etkeni ve mekanizması vardır. Yaşlanma sürecinde rol oynayan faktörler protein sentezinin azalması; DNA hasarlarının oluşumu ve bunun sonucunda apoptozun tetiklenmesi; proteinlere şeker bağlanmasıyla hücrenin normal işlevlerinin inhibe edildiği glikozilasyon; fiziksel ve kimyasal etkenlerin hücrelere hasar vermesi; mitokondriyal disfonksiyon; değişmiş hücresel iletişim; kök hücrelerin tükenmesi; telomer kısalması; epigenetik değişiklikler; lipit peroksidasyonu gibi mekanizmalar biyolojik yaşlanma sürecinde rol oynar (46,47).

Bireyin yaşamı boyunca hücresel boyutta meydana gelen hasarların birikimi sonucu hücrenin büyümesi durdurulur veya apoptoz tetiklenir. Meydana gelen ve ilerleyici fizyolojik bütünlük kaybı ile karakterize olan bu sürecin sonunda zamanla kanser, diyabet, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi yaşlanmaya bağlı olarak hastalıklar gelişir (48). Yaşlanmayla beraber saçlarda pigmentasyon değişimi nedeniyle oluşan grileşme, kollagen kayıpları, kasların esnekliğinin azalması gibi fenotipte de gözlemlenebilen etkiler oluşur (49).

2.5. Adli Bilimlerde Epigenetik Yaklaşımlar

Adli bilimlerde DNA'nın kullanımı ile bireyin tanımlanması, etnik kökeni ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi genetik kimliklendirmede güçlü araçlardan biridir. Kaynağı bilinmeyen biyolojik materyal tanımlanarak faile dair bilgiye ulaşılmaya çalışılır. Günümüzde kullanılan kimliklendirme yöntemleri DNA profillerinin şüpheli kişilerle karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Şüpheli bulunmadığında var olan DNA verileri kullanılarak şüpheliye ait bilgi elde etmek amacıyla son yıllarda InDel, SNP belirteçleri kullanılarak biyocoğrafik soy tayini, özellikle SNP'ler ile saç, göz ve ten rengi gibi fenotipik karakterler belirlenebilmektedir (4,50,51).

Son yıllarda, özellikle insan genom projesinin tamamlanmasının ardından artan epigenom çalışmaları sonucunda epigenetik işaretlerin kimliklendirmeye büyük katkılar sağlayabileceği ve adli öneme sahip olduğu ortaya konmuştur (3). Epigenetik mekanizmalardan en iyi tanımlanmış, in vitro stabiliteye sahip, düşük DNA miktarlarıyla daha yüksek hassasiyetle analize elverişli olduğundan DNA metilasyonu adli bilimlerde bir belirteç olarak kullanılmaya başlanmıştır (5). Sınırlı sayıdaki DNA metilasyon belirteçleri adli amaçlı kullanılabilmektedir. CpG bölgelerindeki DNA metilasyon miktarlarından yola çıkarak yaş tahmini, vücut doku/sıvılarının tiplendirilmesi ve monozigotik ikizler arasındaki farklılıkların tespit edilmesinde kullanılabileceği belirlenmiştir (3,4). Bununla birlikte ilerde yapılacak çalışmalarla şüphelinin yaşadığı yer, alkol, sigara veya uyuşturucu kullanım durumu, vücut yapısı hakkında bilgi sahibi olunabileceği öngörülmektedir (6).

Epigenetik çalışmalarında temel olarak, hedef genin anlatım yapabilme yeteneğinin olup olmadığı değil, bu noktada meydana gelen DNA metilasyon miktarıdır. Çalışmanın sonucunda elde edilen veriler CpG bölgesindeki metilasyon profilini temsil eder (52). Fenotip tayini, biyocoğrafik soy tayini gibi güncel genetik tahmin yöntemlerine ek olarak epigenetik bilginin kullanılmasıyla karakteristik özelliklere dair daha fazla bilgi elde edilebilecektir (5).

2.5.1. Monozigotik ikizlerin ayrımı

Monozigotik ikizlerin (MZ) birbirlerinden ayırt edilmesi, özellikle ikizlerden masum olan ve suça karışanın tespit edilmesi açısından oldukça önemlidir. Kardeşler arası eşleşme ihtimali 10000'de bir iken rastgele iki bireyin DNA profillerinin eşleşme oranı yaklaşık 1 milyarda bir gibi çok düşük bir ihtimaldir. STR profilleme yöntemi en güçlü DNA profilleme sistemlerinden olmasına rağmen MZ'lerin bire bir aynı DNA dizisine sahip olmalarından dolayı birbirlerinden ayırt edilememektedir (50). Bunun için parmak izi tespiti yapılarak ikizlerin birbirlerinden ayırt edilmesi sağlanır Ancak parmak izinin bulunmadığı durumlarda bu yöntem kullanılamamaktadır (6).

Tek yumurta ikizlerinde SNP, kopya sayısı varyasyonları (CNV), Y-kromozom satellit DNA ve B lenfositlerinin DNA dizilerinde çok düşük miktarda da olsa farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (52,53). Fakat yöntemlerin teknik zorlukları ve daha nadir bulunmaları sebebiyle adli bilimlerde pratik olarak tercih edilecek yöntemler değillerdir. Tüm genom analizi ise yüksek miktarda ve kaliteli DNA gerektirmesi ve maliyetinin yüksek olması nedeniyle tercih edilmemektedir (54).

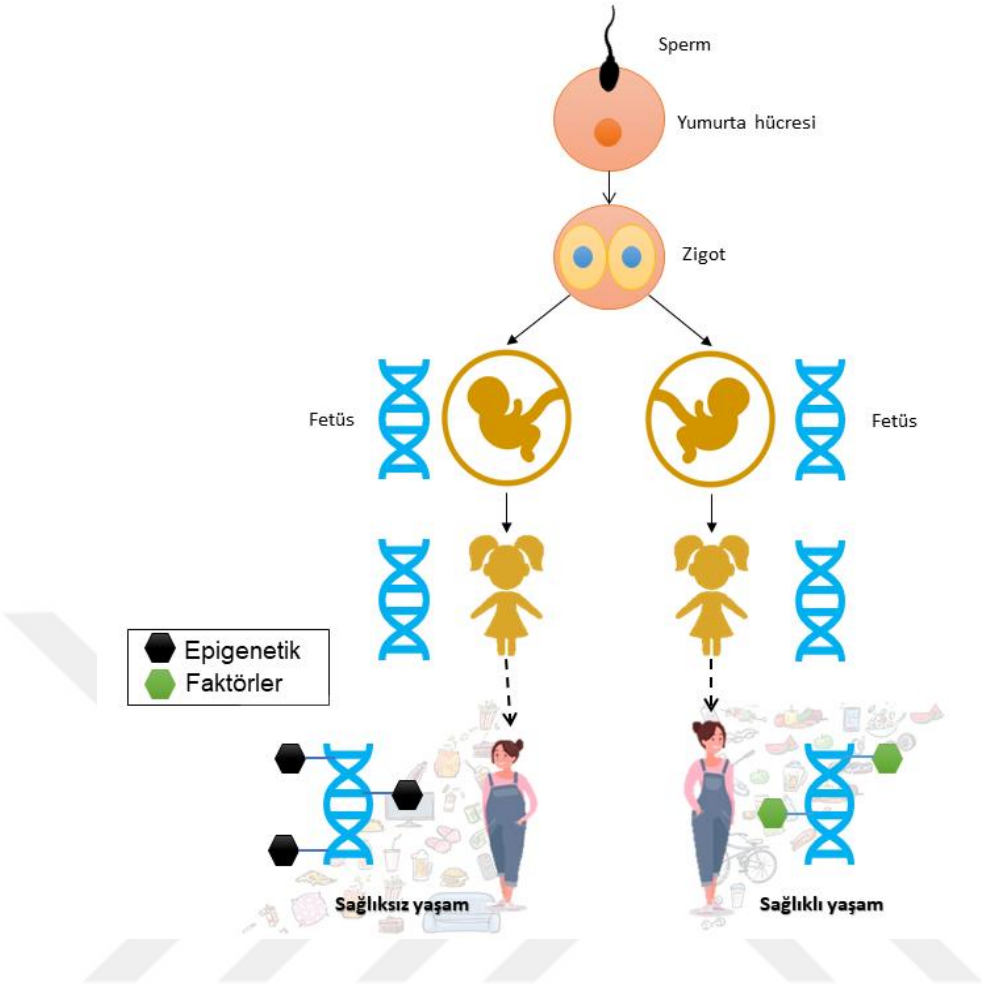
DNA dizisi stabil olmasına karşın epigenetik bilgiler dinamik yapıdadır ve yaşam boyunca çeşitli faktörlerden etkilenir. İkizlerle yapılan bir çok çalışmada, ikizler arasında bazı fenotipik farklılıklar tespit edilmiştir. Bunlara sebep olan mekanizmaların epigenetik değişiklikler olduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir. Genetik bilgileri aynı olan monozigotik ikizler arasında ilerleyen yaş ile birlikte yaşam tarzlarında meydana gelen değişiklikler sonucunda farklı epigenetik profiller oluşur (Şekil 8) (54,55).

Li ve ark. (2011) tarafından ilk defa adli bilimlerde tek yumurta ikizleri arasındaki farklılıkları tespit etmek için 5mC'nin genom çapında analizini yapmışlardır. Çalışmada 22 çift yetişkin monozigotik ikizin DNA örnekleri 27,000 CpG bölgesini Illumina Human Methylation 27 Beadchip ile analiz etmişlerdir (56). Li ve ark. (2013) Illumina Human Methylation27

Beadchip ile 27,578 CpG bölgesini analiz etti. Bunlardan önemli derecede metilasyon durumu farklılıkları gösteren 92 CpG noktasını seçerek bir pilot çalışma yaptılar (57).

Stewart ve ark. (2015) bisülfit dönüşümünü takiben yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizini kullanarak MZ arasındaki farklıları incelemiştir. 5 çift monozigotik ikize ait ağız içi sürüntü örnekleri kullanılarak *Alu* noktalarının analiziyle MZ ikizler arasında ayrım yapılabileceğini gösterdiler (54). Xu ve ark. (2015) ise MZ ikizler arasındaki global DNA metilasyon farklılıklarını incelemek için tekrar dizisi olan LINE-1 bölgesini kullanarak, 119 çift MZ ve 57 çift dizigotik ikize ait kan ve ağız içi epitel hücrelerinden bisülfit pirodizileme ile MZ ikizlerde global DNA metilasyon farklılıklarını gözlemlediler (58).

Vidaki ve ark. (2017) 10 MZ ikize ait kan örneklerinden genom çapında metilasyon analizi yaparak, 19-111 arası metilasyon noktası (tDMSs, twin-differantially methylated sites) inceledi. Bu inceleme sonucunda belirledikleri 34 CpG noktasını Real-time PCR (qPCR) ile analiz ettiler. Bu CpG noktalarının bilgilendirici olmasına karşın genom çapında metilasyon analizi veya qPCR çalışmaları için düşük miktar ve kalitede DNA'nın uygun olmaması nedeniyle adli bilimlerde rutin analizlerde teknik sorunlar oluşturacağını tespit ettiler (59). Tüm bu çalışmalarla birlikte CpG metilasyonunun stabilitesi yaşa, dokuya veya popülasyona özgü daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.



Şekil 8 : Monozigotik ikizler arası yaşam koşullarına bağlı epigenetik farklılıklar

2.5.2. Vücut sıvılarının tanımlanması

Olay yerinden elde edilen biyolojik örneklerin spesifik olarak hangi doku kaynaklı olduğunu tespit etmek olayın seyrini ve suçun türünü belirlemek için önemlidir. Vücut sıvılarının tespit edilmesinde kullanılan güncel yöntemlerin büyük bir kısmı yanlış pozitif sonuç olasılığı yüksek veya delile zarar veren veya örneğin geri kazanımı zor olan yöntemlerdir. Uygulanacak yöntemin biyolojik delile zarar vermemesi, pratik ve doğru sonuç vermesi önemlidir (4).

Vücut sıvılarının tanımlanmasında güncel olarak kullanılan yöntemler antijen-antikor etkileşimine dayanan immünolojik yöntemlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda dokuya özgü

sentezlenen mRNA'nın da vücut sıvılarının tiplendirilmesinde kullanılabileceği tespit edilmiştir. Ancak mRNA'nın olay yerinde uzun süre kalmış örneklerde DNA kadar stabil olmadığından sonuç alınayabilmektedir (60). Epigenetik mekanizmalardan miRNA'ların dokuya özgü olarak üretilmesi, mRNA'dan daha küçük ve degradasyon ihtimalinin daha düşük olması sebebiyle vücut sıvılarının tiplendirilmesinde kullanılabileceği tespit edilmiştir. Fakat tüm miRNA'ların tanımlanması, analiz yöntemlerinin daha da geliştirilmesi nedeniyle daha fazla çalışma yapılması gerekir (61). Bu nedenle araştırmacılar alternatif yöntemler için epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyonunun vücut sıvılarının tiplendirilmesinde yeni bir belirteç olarak önermişlerdir (62).

Dokuya özgü DNA metilasyon profillerinden (tDMRs) yararlanılarak vücut sıvılarının tiplendirilmesi, bazı bölgelerinin bir dokuda metillenirken bir başka dokuda metillenmemiş olması veya farklı bir metilasyon profili oluşturması sonucunda ortaya çıkan farklılıklar dokular arasında ayırt edici bir özellik oluşturur (3). Bu amaçla ilk olarak metilasyona duyarlı restriksiyon enzimi yöntemi kullanılarak kan, tükürük, semen ve deri epiteli örnekleri ile çalışma yapılmıştır (63).

Madi ve ark. (2012) bisülfit modifikasyonu ve pirodizileme ile yeni tDMRs bölgeleri bulmayı hedeflemişlerdir. Bu amaçla ZC3H12D, FGF7, C20orf117 ve BCAS4 genlerinde kan, semen, tükürük ve deri örneklerinde çeşitli CpG bölgelerini analiz etmişlerdir. Semeni diğer vücut sıvılarından başarıyla ayırt edebilmişlerdir. Ayrıca kanda C20orf117 lokusunun hipermetilasyon profili gösterdiğini rapor etmişlerdir (64).

Vücut sıvısına özgü hipometilasyon veya hipermetilasyon durumu, karışık örneklerde kullanıldığında bazı sorunlara sebep olmaktadır. Genel olarak, semene spesifik CpG markırlarının kullanımı ile somatik ve germ hücreleri arasındaki DNA metilasyonundaki önemli fark nedeniyle kolaylıkla ayırt edilebilir. Ancak çoğu somatik doku ve vücut sıvıları benzer DNA metilasyon modelleri gösterdiğinden kan, tükürük, vajinal sıvı ve menstrual kana

özgü olduğu düşünülen CpG bölgelerinin rutinde kullanılabilmesi için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (52).

2.6. Adli Bilimlerde Yaş Tahmini

2.6.1. Geleneksel yaklaşımlar

Adli bilimlerde bireyin yaş tahmini en önemli konulardan biridir. Adli tıpta yaş tayinin istendiği yaş aralıkları genellikle 12, 15, 18, 21, 25 yaş aralıklarında arasında yoğunlaşmaktadır. Özellikle nüfus kayıtlarının doğru ve zamanında yapılmaması nedeniyle (Tablo I) cezai sorumluluk ve hukuki ehliyetin tespiti için kronolojik yaşın belirlenmesi oldukça önemlidir (65–67).

Tablo I: Yaşayan bireylerde yaş belirleme talepleri (67)

Yaş tahmini için belirlenmesi gerekli durumlar	
• Kimliksiz olan mülteci ve sığınmacılar	• Doğum kaydı olmayan evlat edinilen çocuklar
• Kimliksiz yasadışı mülteciler	• Çocuk pornografisi
• İnsan kaçakçılığı	• Spor müsabakaları (örn. Olimpiyatlar)
• Fuhuş	• Çocuk suçlular
• Çocuk evlilikler	• Askerlik yaşı

Her bir birey biyolojik ve kronolojik yaşa sahiptir. Doğumdan itibaren gün, ay ve yılların geçmesi kronolojik (takvim) yaş, vücudun fizyolojik özelliklerinin yansıması ise biyolojik yaş olarak tanımlanır. Biyolojik yaş yaşam koşulları, mesleki deneyim ve beslenme gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (68).

Adli yaş tahmini için kemik ve dişlerin incelenmesine dayalı konvansiyonel yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla dental ve osteolojik metotlar geliştirilmiştir. İskeletten yaş belirleme, gençlerde yetişkinlere göre daha kolay ve güvenilir bir şekilde yapılmaktadır. Çünkü büyüme ve gelişme süreci düzenli ve programlı bir şekilde ilerler (67,68). Yetişkinlerde ise dental analiz, kafatası süturlarının kaynaşması, epifiz kaynaşma aşamaları, "İşcan Metodu" olarak adlandırılan kaburga kemiklerinin sternal uçlarının analizi gibi yöntemlerden yararlanılır (69).

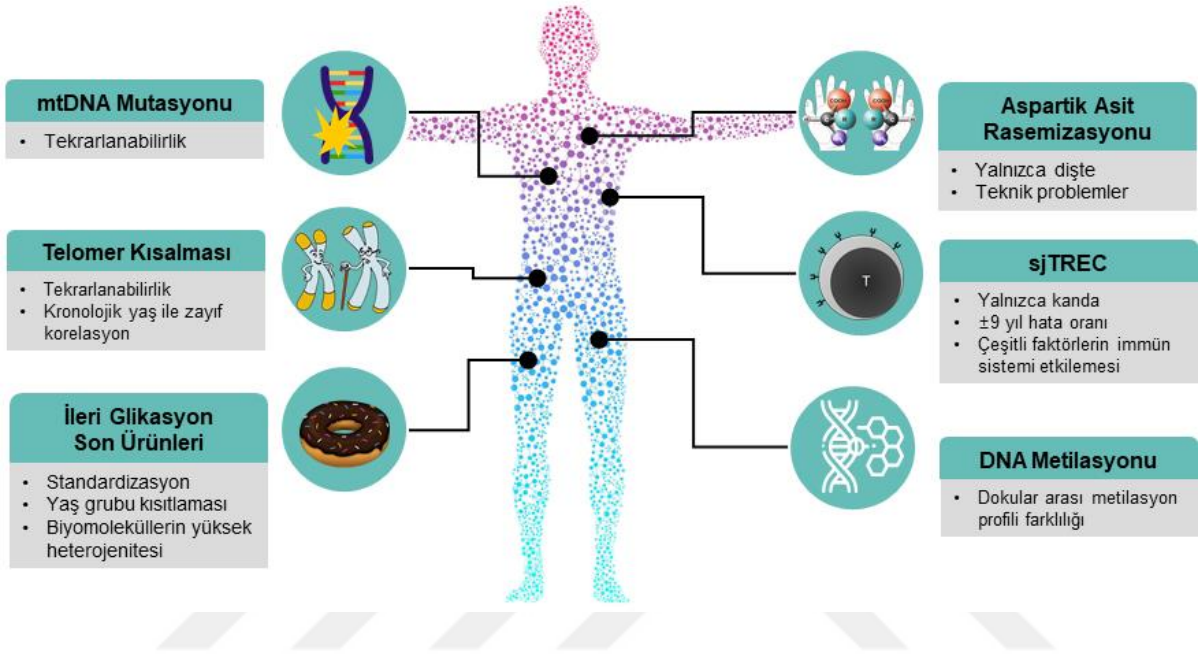
Temel olarak iskelet çalışmaları canlı bireylerde radyografi (X-Ray) veya bilgisayarlı tomografi (CT) ile yapılır. X-Ray analizleri X radyasyonunun verdiği zararlar nedeniyle bir dezavantajdır. Bu nedenle son yıllarda alternatif olarak manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi non-iyonize yöntemler tercih edilmektedir. Histolojik incelemeler ise uzun kemiklerden kesit alınarak mikroskop ile incelenerek yapılır (50,67).

2.6.2. Güncel yaklaşımlar

Yaş tahmini çalışmalarında geleneksel metotlar geçmişten günümüze kadar kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemler yalnızca kemik örneklerini içeren olgularda ve deneyimli bir uzman tarafından yapılması gerekir (2). Olay yerinden elde edilen biyolojik örneklerden yararlanılarak STR, SNP, mtDNA analizi gibi birçok çalışma yapılabilmektedir (20). Tüm bu bilgilerin yanında failin yaşının tahmin edilebilmesi oldukça önemlidir. Kayıp vakalarında ve büyük felaket kurbanlarının kimliklendirilmesinde, arkeolojik kalıntıların ölüm yaşlarının tahmin edilebilmesi ve hukuki ehliyetin belirlenebilmesinde yaş tahmini oldukça önemlidir (2,50).

Son yıllarda yapılan çalışmalar ve teknolojik gelişmeler sayesinde biyolojik yaş tahmini için yeni belirteçler keşfedilmiştir. Bunlar yaşlanma sürecinin bir sonucu olarak bir bireyin yaşam döngüsü boyunca meydana gelen biyomoleküllerdeki kademeli değişikliklere

dayanmaktadır (46,47). Moleküler yaklaşımlarla yaş tahmini mtDNA delesyonları, telomer kısalması, ileri glikasyon son ürünleri (advanced glycation end-product, AGEs), aspartik asit rasemizasyonu ve sinyal-birleşimli T-hücre reseptör eksizyon çemberleri (signal-joint T-cell receptor excision circles, sjTRECs) olarak 5 mekanizmada incelenmiştir (Şekil 9) (4,50).



Şekil 9 : Yaş tahmini biyobelirteçleri ve dezavantajları

Yarı otonom bir organel olan mitokondri, enerji üretiminden sorumlu olduğundan bol miktarda oksijen radikallerine maruz kalmaktadır. Oksidatif hasara maruz kalan mtDNA'da delesyonlar meydana gelir. Yaşla birlikte delesyonlarda farklı dokularda artış görülmektedir (70). Meissner ve ark. (1999) iskelet kasında mtDNA'nın 4977 bç (baz çifti) delesyonunu belirleyerek ölüm yaşını tahmin etmeye çalışmıştır. Ancak tekrarlanabilirliği ile ilgili sorunlar yaşandığından adli vakalarda uygulanmamıştır (71).

Kromozomların uçlarında bulunan ve kromozomları koruyan TTAGGG dizisinin binlerce tekrarından oluşan telomer dizileri, her hücre bölünmesinde kısalır. Telomerlerin kısalma özelliğinden faydalanılarak yaş tahmini çalışmaları yapılmıştır. Yine bu yöntemde de

tekrarlanabilirlik sorunları ve gerçek yaşlarla zayıf korelasyon göstermelerinden dolayı adli olgularda kullanılabilir bir yöntem olmamıştır (70,72,73).

İleri glikasyon son ürünleri (AGEs), enzimatik olmayan reaksiyonlarla indirgeyici şeker gruplarının serbest amino asit grupları, lipit ve nükleik asit molekülleriyle etkileşimi sonucu oluşur (74). AGEs, birikimi birçok dokuda hasarlara yol açar. Yaşam boyu bireyin farklı dokularında bu moleküllerin birikimi sonucunda sarıdan kahverengiye doğru bir renk değişimi gözlenmektedir. Kalorimetre ve spektrofotometre ile belirlenen renk değişiminin derecesine bağlı olarak yaş tahmini yapılacağı tespit edilmiştir. Fakat yöntemin standardize edilememesi, biyomoleküllerin yüksek heterojenite göstermesi ve 45 yaş üzerindeki kişilerde etkili olmamasından dolayı kullanılmamıştır (50,70,75).

Aspartik asit rasemizasyonu (AAR) analizi ile yaş tahmini diğer yöntemler içinde ±3 yıl sapma oranıyla en doğru yaş tahmini yöntemidir. Rasemizasyon, aktif izomerin aktif olmayan türüne dönüşümü (L- veya D-) olarak tanımlanan kimyasal bir reaksiyondur. Memelilerde protein sentezi sırasında yalnızca L-aminoasitler üretilir. D-aminoasitler ise aktif olmayan formdur ve bu enantiyomerler yaşlanmayla beraber L-aminoasitlerin yerini alır. D-aspartik asitlerinin artışı diş numunelerinde kromatografik yöntemlerle analiz edilir. Yöntemin yüksek doğruluk oranına rağmen geniş ölçekli olarak uygulanamaz (50,70,76).

sjTREC seviyelerinin analizi, kandaki belirli bir DNA türünün varlığına dayanarak en uygun moleküler yaş tahmini tekniğidir. sjTREC'ler timusta olgun T-lenfositlerinin üretimi sırasında yeniden düzenleme mekanizması sonucu meydana gelen belirteçlerdir (77). Bu teknik yaklaşık olarak ±9 yıl doğruluk oranına sahiptir. Bununla birlikte yalnızca kan örneklerinde analiz edilmesi, AIDS, Epstein-Barr gibi hastalıklar ve sıcaklık, UV radyasyonu gibi çevresel faktörlerin immün sistemini etkilemesi nedeniyle çeşitli kısıtlamalardan dolayı adli olgularda kullanımı sınırlı olmuştur (77–79).

2010 yılına kadar yapılan tüm moleküler genetik çalışmalar, adli yaş tahmini için bir temel oluşturmuştur. Gelişen teknoloji ve yöntemlerle biyolojik örneklerden DNA analizi ile yaş tahmininde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Özellikle epigenetik çalışmalar yeni bir odak noktası oluşturmuş olup, yaş tahmini modelleri oluşturma ve geliştirme çalışmaları devam etmektedir.

2.6.3. DNA metilasyonu ve yaş tahmini

Epigenetik modellerin oluşumu, fetal dönemde başlayarak yaşam boyunca devam eden dinamik bir yapıdır. Epigenetik modeller genomu şekillendirir ve gen ekspresyonunu düzenler. Bu süreçler birbirinden bağımsız olarak değil kombinasyon halinde meydana gelir. Bu nedenle epigenetik değişimlerin yaşlanma süreci üzerinde büyük etkisi vardır (3,80). Yaş ile ilişkili DNA metilasyon değişiklikleri genomda en iyi tanımlanmış belirteç olarak global ve spesifik bölgeler olarak çalışılmaktadır (50).

DNA metilasyonu bireyin yaşamı boyunca bulunduğu çevreyle etkileşimine bağlıdır (81). Yaş ile bağlantılı DNA metilasyon değişimleri iki temel fenomen ile tanımlanmaktadır. Bunlar epigenetik drift (kayma) ve epigenetik saattir. Epigenetik drift, bir insanın yaşadığı çevre, yaşam koşulları ve alışkanlıkları aynı yaştaki kişiler arasında farklı epigenomun oluşmasına neden olur. Bu sayede kişiler arasında farklılıklar oluşur (52). Her ne kadar epigenetik driftin temel moleküler yolakları hala kesinlik kazanmamasına rağmen sigara içme alışkanlıkları, alkol alımı, fiziksel aktivite ve diyet gibi farklı yaşam tarzı özelliklerinden kaynaklandığı bilinmektedir (50). Epigenetik saat ise yaşa bağlı DNA metilasyon modelleridir (82). DNA metilasyonunda bireyler arası varyasyonun belirli bir CpG bölgesindeki DNA metilasyon profili hem genetik hem de çevresel faktörlerle düzenlenmektedir (52).

Hiper ve hipo- metilasyon modelleri yaşlanma sürecinde metilasyon noktalarında belirli bir düzende dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir (81). Ortalamanın üstünde veya altındaki

metilasyon seviyelerini ifade eden hipermetilasyon ile hipometilasyon profilleri embriyonik gelişim sırasında oluşur ve yaşam boyunca devam eder. Östrojen reseptörünü kodlayan genin yaşlanmayla birlikte hipermetile olduğu gösterilen ilk gen olup, genom çapında metilasyon modellerinin yaş tahmininde kullanılıp kullanılamayacağı sorusunu ele alan genomik çalışmalara yol açmıştır (83).

Artan yaş ile embriyonik dönemde oluşan DNA modelleri yavaş yavaş değişerek global hipometilasyon ve hipermetilasyona dönüşür (50). Genellikle DNA hipermetilasyonu CpG bölgelerinde spesifik olarak promotörle bulunurken, yaşlanmakta olan kişilerde hipometilasyon promotörler, ekzon, intron ve intergenik bölgelerde genom genelinde artış gösterir (81). Global hipometilasyon olaylarının yaşlanma sürecinde tekrarlayan dizilerde ve retrotranspozonlarda kanser oluşumuna yol açan bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Lokal hipermetilasyon değişikliklerinin ise mekanizması karmaşıktır. Ancak bazılarının hücre transformasyon olaylarına bağlı olası fonksiyonel etkilerle birlikte ortaya çıktığı tespit edilmiştir (83).

Yaşlanma ve DNA metilasyonunun ilişkisine dair diğer çalışmalar *Oncorhynchus gorbuscha*'nda organlarının ve yaşam evrelerinin incelenmesi sırasında embriyolarında yüksek miktarda 5-metilsitozin (5-mC) görülürken büyümeyle birlikte miktarında azalmalar tespit edilmiştir (83). Kemirgenlerde ise 5-mC miktarındaki azalmanın canlının yaşı ile ters orantılı olduğu ve modifiye sitozinin yaşlanmayla beraber atış gösterdiği ortaya konmuştur (84).

DNA metilasyonu ile yaş tahmini çalışmalarında Weidner ve ark. (2014) tarafından kandan ASPA (cg02228185), ITGA2B (cg25809905) ve PDE4C (cg17861230) genlerinden 3 CpG noktasını bisülfit pirodizileme yöntemi ile analiz ederek ±5,43 yıl sapma oranıyla bir model oluşturdular (85). Eipel ve ark. (2016) buccal svap örneklerinde aynı model ve yöntemi uygulayarak benzer sapma oranıyla sonuç elde etmişlerdir (86).

Zbiec-Piekarska ve ark. (2014) kan örneklerinde tek bir gen üzerinde (ELOVL2) birden fazla CpG analiz ederek yaş ile korelasyon gösteren iki CpG noktası belirlediler (87). Bunu takip eden çalışmada ELOVL2, KLF14, C1orf132, FHL2 ve TRIM59 genlerini kullanarak 5 CpG bölgesini analiz ederek oluşturulan modelde ±3,40 yıl sapmayla ortalama yaş tahmininde bulundular (88).

Park ve ark. (2016) ZNF423, ELOVL2 ve CCDC102B genlerini analiz ederek 3 CpG noktasını kan örneklerinde ±3,16 yıl sapmayla bir model oluşturdular (60). Freire-Aradas ve ark. (2016) ELOVL2, ASPA, PDE4C, FHL2, CCDC102B, C1orf132 ve chr16:85395429 genlerinden 7 CpG noktası çalışarak ±3,07 yıl ortalama hata oranı ile bir model oluşturdular (8). Vidaki ve ark. (2017) 16 CpG noktası kullanarak oluşturduğu modelde lineer regresyon analizi ile ±7,45 yıl MAE değeri tespit ettiler (89).

Hong ve ark. (2017) SST (cg00481951), CNGA3 (cg19671120), KLF14 (cg14361627), TSSK6 (cg08928145), TBR1 (cg12757011) ve SLC12A5 (cg07547549) genlerinden oluşan 6 CpG noktasını içeren multipleks paneli ile SNaPshot yöntemi kullanarak tükürük örneklerini analiz ederek oluşturdukları model ile ±3,13 yıl ortalama hata oranı ve düşük miktarda DNA kullanarak adli laboratuvarlarda da uygulanabilecek bir sistem geliştirdiler (90).

Jung ve ark. (2019) ELOVL2, FHL2, KLF14, C1orf132 ve TRIM59 lokuslarını kan, ağız içi epitel ve tükürük örneklerinde SNaPshot yöntemi ile analiz ederek oluşturdukları modelde kanda ±3,48 yıl, tükürükte ±3,55 yıl ve ağız içi epitelde ±4,29 yıl hata oranı ile tahmini yaş değerlerini tespit ettiler (91).

Xie ve ark. (2019) pirodizileme yöntemini kullanarak 0-101 yaş arası 4577 gönüllüye ait kan örneklerinde yaptıkları analizde yaş tahmininde kullanmak üzere Methbank veri bankasından yararlanarak yaş ile ilişki yeni CpG noktaları analiz ettiler. Çin popülasyonunda

yaptıkları çalışmada yaş ile yüksek korelasyon gösteren 4 CpG bölgesi (cg08128734, cg18826637, cg22454769, cg10501210) belirlediler (92).

Adli amaçlı DNA metilasyon analizinde, belirli doku veya vücut sıvısına özgü yaş tahmin modeli için gerekli olan DNA miktarı ve kalitesi, uygulanan yöntemin doğruluğu, güvenilirliği, istatistiklerin gücü ve gerekli donanım ve maliyet önemlidir. Yöntemin rutin olarak kullanılabilmesi için tüm özelliklerin bir arada uyumlu olması gerekir (82). DNA metilasyon analizi günümüzde kronolojik yaşı tahmin etmekte güçlü bir araç olup yaşlanma sırasındaki metilasyon değişiklikleri arasında doğrudan bir ilişki sergilemekte hem yetişkinlerde hem de çocuklarda kronolojik yaşı tahmin etmekte bilgilendirici bir sistem olarak kullanılabilmektedir.

2.6.3.1. Metilasyona dayalı yaş tahmininde kullanılan yöntemler

Kan örnekleri için günümüze kadar çalışılmış ve uygulanmış yöntemler Tablo II'de özetlenmiştir. DNA metilasyon analizi için metilasyona duyarlı restriksiyon enzim uygulaması, protein-antikor etkileşimine dayalı yöntem ve sodyum bisülfit dönüşümü olarak 3 ana yöntem bulunmaktadır. Metilasyona duyarlı restriksiyon enzimleri CpG bölgelerindeki DNA metilasyon bölgesini tanır ve o noktalardan DNA'yı keser. Bu yöntem basittir ancak enzim aktivitesindeki farklılıklar yorumlamayı etkileyebilmektedir. En büyük dezavantajı ise metilasyona duyarlı restriksiyon enzimlerinin tanıma dizileri ve kesim bölgelerinin sınırlı olmasıdır (4,93).

Protein-antikor etkileşimine dayalı immünoassay metotta, 5-metilsitozinin spesifik antikorlarla etkileşimine dayanır. Bunun için 5-metilsitozine karşı duyarlı antikorlar kullanılır. Karmaşık yapılı genomda DNA metilasyonunun geniş kapsamlı analizine olanak sağlar. Ancak antikorlar ile çapraz reaksiyon olasılığının olması ve duyarlılığının az olması nedeniyle düşük çözünürlüklü analiz yöntemi olduğundan adli bilimlerde tercih edilmemektedir (4).

Sodyum bisülfit dönüşümü yönteminde CpG bölgelerinin kalitatif ve kantitatif analizi yapılabilmektedir. Metillenmiş ve metillenmemiş sitozinler PCR sırasında DNA polimeraz tarafından ayırt edilememektedir. Bunun için sodyum bisülfit işlemiyle metillenmemiş sitozinler urasile dönüştürülür. Metillenmiş sitozinler sitozin olarak kalır. PCR'de de buna göre amplifiye olur. Bisülfit dönüşümü sonrasında mikroarray, pirodizileme ve tek nükleotid uzama (Single base extension, SBE) yöntemleri ile metilasyon seviyeleri belirlenir (4,50,52). Tüm genom bisülfit dizilemesi (Whole genome bisulfite sequencing, WGBS), Illumina Infinium HumanMethylation analizi gibi DNA dizileme temelli yöntemlerle de DNA metilasyon modellerinin genom boyutunda analizi mümkündür (50,94).

Tablo II : Kandan DNA metilasyon belirteçlerine dayalı modellerin özeti

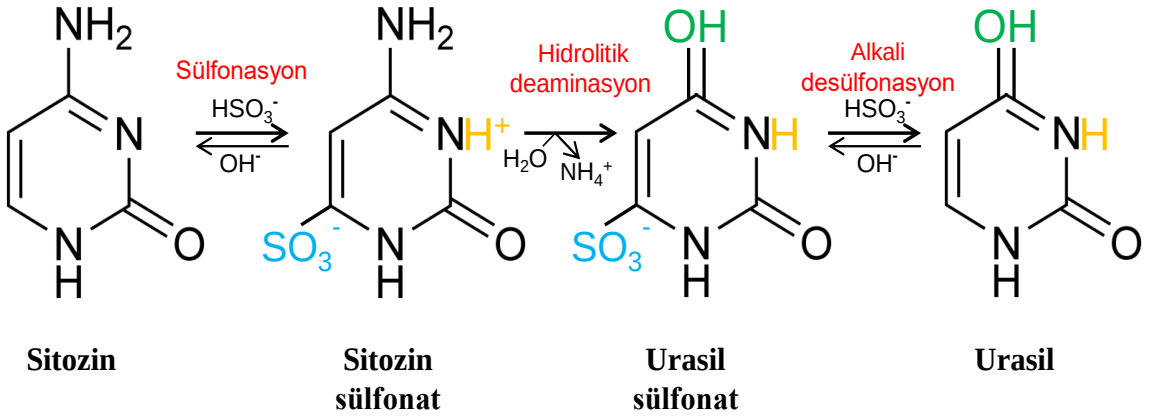
Yıl	Örneklem	Yaş	gDNA	Teknik	Gen Adı	CpG ID	GRCh38 kromozom	MAE	Kaynaklar
2014	82	20-75	500 ng	Pirodizileme	ASPA	cg02228185	chr17:3476273	±5,43	(85)
					ITGA2B	cg25809905	chr17:44390360		
					PDE4C	None	chr19:18233105		
2015	303	2-75	2 µg	Pirodizileme	ELOVL2	None	chr6:11044642	±5,03	(87)
						None	chr6:11044634		
2015	300	2-75	2 µg	Pirodizileme	ELOVL2	None	chr6:11044634	±3,40	(88)
					C1orf132	None	chr1:207823681		
					TRIM59	None	chr3:160450199		
					KLF14	cg14361627	chr7:130734355		
					FHL2	None	chr2:105399288		
2015	206	0-91	200 ng	Pirodizileme	ASPA	cg02228185	chr17:3476273	±3,75	(95)
					PDE4C	None	chr19:18233078		
					ELOVL2	None	chr6:11044407		
					EDARADD	cg09809672	chr1:236394382		
2016	725	18-104	300 ng	EpiTYPER	ASPA	cg02228185	chr17:3476273	±3,07	(8)
					ELOVL2	cg21572722	chr6:11044661		
					PDE4C	None	chr19:18233127/31/33		
					FHL2	cg06639320	chr2:105399282		
					CCDC102B	cg19283806	chr18:68722183		
					C1orf132	None	chr1:207823715		
					Chr16:85395429	cg07082267	chr16:85395429		
2018	180	2-18	300 ng	EpiTYPER	KCNAB3	cg27162435	chr17:7929845		(81)
					EDARADD	None	chr1:236394441		
					ELOVL2	None/None/None	chr6:11044634/31/28		
					CCDC102B	None	chr18:68722210		
					MIR29B2CHG	None	chr1:207823702/05		
					Chr16:85395429	cg07082267	chr16:85395429		

2.6.3.2. Bisülfit dönüşümü

Bisülfit dönüşümü 1990'lı yıllarda keşfedilerek DNA metilasyonunun tespiti ve analizi için kullanılmıştır. Bisülfit dönüşümü DNA metilasyon analizi için "altın standarttır" ve tek nükleotid hassasiyetinde DNA metilasyonununm miktarını belirler (96). Sodyum bisülfit modifikasyonu, metillenmemiş sitozinleri (C) urasillere deamine ederek PCR'de timin (T) olarak, metillenmiş sitozinleri (5mC) ise sitozin olarak çoğaltılır. Sonuçta, metillenmemiş sitozin ve orijinal metillenmiş sitozin seviyeleri ile C/T polimorfizmi oranıyla elde edilir (97,98).

Sodyum bisülfit işlemi uygun koşullar altında yapıldığında, metillenmemiş sitozinlerin urasillere dönüşüm oranı yaklaşık olarak %99'dur. Fakat bu yüksek dönüşüm oranına rağmen bazı promotör bölgelerinde aynı performans görülmeyebilir. Bu oran DNA'nın kalitesine de bağlıdır (98). Bisülfit işlemi, denatüre hale getirilmiş tek iplikli DNA'nın düşük pH ve yüksek sıcaklıklarda sodyum bisülfit (HSO_3-) ile kimyasal reaksiyonuyla gerçekleşir. İlk aşamada sitozinde sülfonasyon meydana gelir. Daha sonra urasil sülfonat üretilmesi için geri dönüşümsüz hidrolitik deaminasyon ve son olarak da urasil oluşturmak için alkali koşullarda desülfonasyon meydana gelir (Şekil 10) (96,98).

Bisülfit uygulaması DNA bütünlüğünün korunması ve ihtiyaç duyulan başlangıç DNA miktarı açısından en uygun yöntemdir. Son teknolojik gelişmeler ve çalışmalarla metilasyon seviyelerinin 1 ng'dan daha düşük DNA ile belirlenebilmektedir (4,50).



Şekil 10 : Genomik DNA'da sodyum bisülfit uygulaması sonucu sitozinin urasile dönüşümü

3. Gereç ve Yöntem

Bu tez çalışmasında, genlerin promotör bölgesindeki CpG adacıklarında bulunan ve kan örneklerinde yaş tahmininde yüksek korelasyon gösterdiği tespit edilen, Freire-Aradas ve arkadaşları tarafından geliştirilen ELOVL2 (chr6:11044661), ASPA (chr17:3476273), C1orf132 (chr1:207823715), CR_23 (chr16:85395429), FHL2 (chr2:105399282), PDE4C (chr19:18233131), CCDC102B (chr18:68722183), EDARADD (chr1:236394441) ve KCNAB3 (chr17:7929845) DNA metilasyon paneli kullanılarak bisülfit dönüşümü ve SNaPshot minidizileme yöntemi kullanılarak kullanılarak 50 kişide yaş tahmini yapıldı (8,99). Çalışmada, üç yaş grubunu (1. grup: 22-38 yaş aralığı; 2. grup: 39-57 yaş aralığı; 3. grup: 58-78 yaş aralığı) kapsayacak şekilde, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan, sağlıklı ve çalışmaya rıza gösteren 50 kişinin (23 kadın ve 27 erkek) kan örnekleri kullanıldı. Yaş grupları, diğer çalışmalar ile karşılaştırma yapılabilmesi için 3 gruba ayrılarak oluşturuldu (8,88). Kan örnekleri 2 ml'lik EDTA'lı tüplerde alınarak -20°C'de muhafaza edildi.

Metilasyon değerlerinin belirlenmesi Microsoft Excel (Microsoft 365 ProPlus) ve yaş tahmini istatistiksel karşılaştırmalar için RStudio v.1.1.463 (RStudio, Inc) programı kullanıldı. Çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü AR-GE Laboratuvarı ve İspanya Santiago de Compostela Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, Adli Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Tez çalışması sırasında kullanılan ekipman, malzeme ve kitlerin listesi aşağıda verilmiştir.

3.1. Deneyde Kullanılan Gereçler

3.1.1. Ekipman

- Eppendorf / Brand otomatik pipetleri (2,5 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)
- Vorteks (Weightlab Instruments)
- Kuru ısıtıcı blok (Bio TDB100-Biosan)

- Florometre (Qubit 4-Thermo Fisher)
- Mikrosantrifüj (Unicfuges-5)
- Thermal döngü cihazı (SimpliAmp™ Thermal Cycler-Applied Biosystems™)
- DNA/RNA UV biyogüvenlik kabini (Kabin UVT/T-MAR-Grand Bio)
- Buzdolabı (Vestel)
- Derin dondurucu (Delta)
- Bilgisayar kontrollü genetik analizör 310/3130*xl* (ABI PRISM® 310/3130*xl*)

3.1.2. Ticari kitler

- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
- Quant-it™ dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen)
- EZ DNA-Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research)
- AmpliTaq Gold DNA Polymerase with buffer II and MgCl2
- SNaPshot ® Multiplex Kit (Applied Biosystem™)
- Exo-Sap-it Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (Thermo Fisher Scientific)
- dNTPs (GeneAmp dNTP mix with dTTP / Applied Biosystem™)

3.1.3. Ticari kit haricinde kullanılan malzemeler

- Bovine serum albümin (Thermo Fisher Scientific)
- PBS (Phosphate Buffered Saline) Tamponu
- Etil alkol (%96) (Tekkim)
- Zefiran (Dermosept)

3.1.4. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan malzemeler

- (1X) TBE Buffer
- Agaroz (Invitrogen™)
- RedSafe Nucleic acid staining solüsyon (iNtRON Biotechnology Inc.)
- Loading buffer (Bromophenol blue / Thermo Fisher Scientific)
- DNA Ladder (100 bp) (Invitrogen™)

3.1.5. Kapiler elektroforez için kullanılan malzemeler

- 10X EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) tamponu (Thermo Fisher Scientific)
- Hi-Di™ (Highly deionized) Formamide (Thermo Fisher Scientific)
- GeneScan™ LIZ 120 dye Size Standard (Thermo Fisher Scientific)
- POP-4 Polimer (Performance Optimized Polymer 4) (Thermo Fisher Scientific)

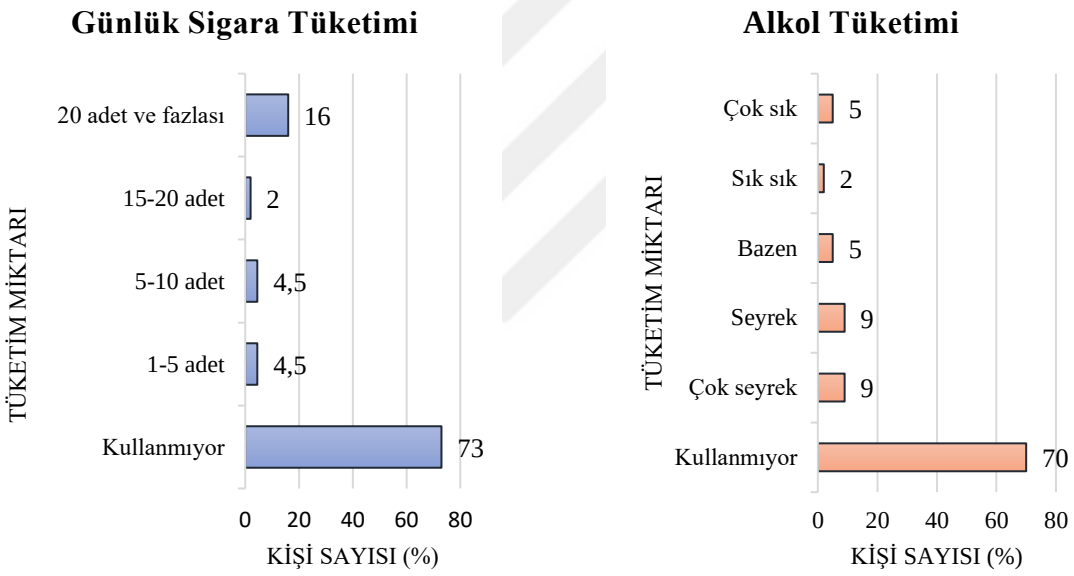
3.2. Deney Aşaması

Çalışma süreci aşağıdaki aşamalarından oluşmaktadır.

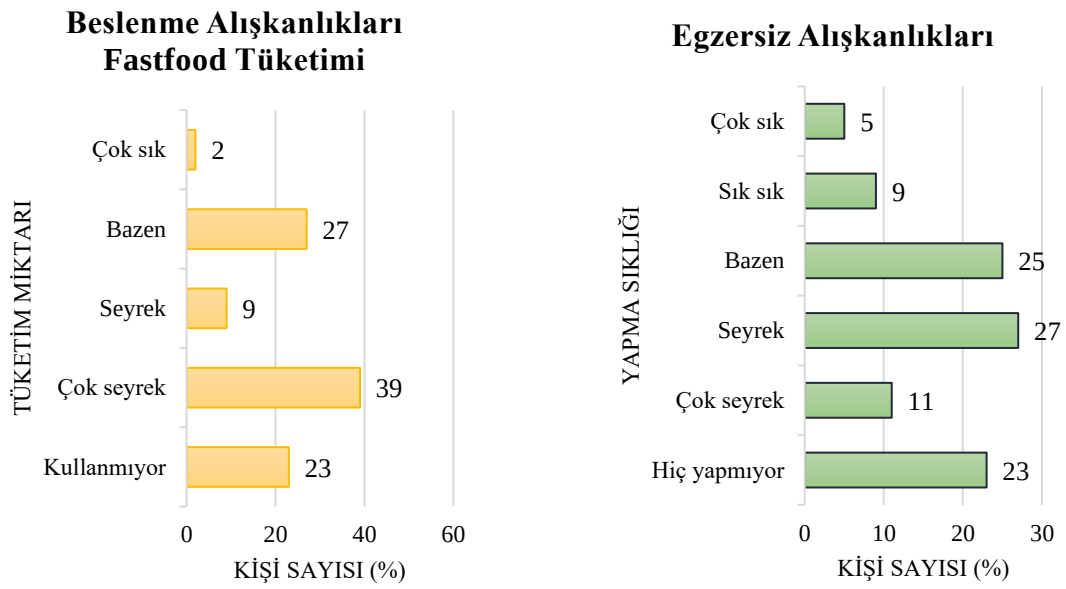
- Örneklerin toplanması
- DNA izolasyonu
- DNA miktar tayini
- Bisülfit dönüşümü
- PCR
- Agaroz jel elektroforezi
- PCR ürünlerinin saflaştırılması
- SNaPshot reaksiyonu (mini dizileme) ve SNaPshot ürünlerinin saflaştırılması
- PCR ürünlerinin ABI PRISM® 310/3130*xl* cihazı ile analizi
- Verilerin analizi ve yaş hesaplaması

3.2.1. Örneklerin toplanması

Bu çalışma, 03.10.2019 tarihli ve 151142 sayılı İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Etik Kurulu kararı (EK-1) ile "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (EK-2)"nu imzalayan, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan, farklı yaş aralıklarına sahip grupları temsil edecek şekilde 50 kişiden kan örnekleri toplandı. Çalışmaya katılan gönüllüler İ.Ü.C. Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü öğrencileri, personeli ve gönüllülerden oluşmaktadır. Çalışma için 3 farklı yaş grubu (Grup 1: 22-38 yaş aralığı; Grup 2: 39-57 yaş aralığı; Grup 3: 58-78 yaş aralığı) oluşturuldu. Gönüllülerin yaşam alışkanlıklarına ait bilgiler Şekil 11 a ve b'de yer almaktadır.



Şekil 11(a): Gönüllülerin günlük sigara ve alkol tüketimi alışkanlıklarına ait grafikler



Şekil 11(b): Gönüllülerin beslenme ve egzersiz alışkanlıklarına ait grafikler

3.2.2. DNA izolasyonu ve miktar tayini

DNA izolasyonu için QIAamp® Mini Kit (Qiagen) kullanıldı. Katı faz ekstraksiyonu olarak adlandırılan ve silika temelli olan bu yöntemde biyolojik materyaldeki DNA'nın spin kolona bağlanarak DNA dışındaki maddelerden uzaklaştırılması temeline dayanır. Yıkama işlemiyle hücresel kalıntılar ve kontaminantlar ortamdan uzaklaştırılır. Spin kolona bağlanmış olan DNA molekülü elüsyon slikada filtreden geri kazanılır.

Miktar tayini Qubit 4 cihazında (Thermo Fisher) florometrik bir yöntem olan ve Quant-it™ dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen) kiti kullanıldı. Florometrik miktar tayini 260 nm dalga boyunda ölçüm yaparak yüksek hassasiyet ve doğrulukla DNA miktarı belirlenebilmektedir.

3.2.2.1. QIAamp® Mini Kit ile kan örneklerinden DNA izolasyonu

1. 20 µL Proteinaz K 1,5 mL'lik eppendorf tüplerine konuldu.
2. Üzerine kan örneklerinden 200 µL alınarak eklendi, total hacmi 200 µL'den düşükse PBS ile 200 µL'ye tamamlandı.
3. Ardından 200 µL Buffer AL eklendi.
4. Kapakları kapatılarak 15 saniye vortekslendi.
5. 10 dakika kuru blokta 56 °C'de inkübe edildi.
6. Örneklere 200 µL (%96) etil alkol eklenerek vortekslendi.
7. 1,5 mL'lik eppendorf tüpteki numuneler QIAamp® spin kolona aktarıldı ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj yapıldı.
8. Altındaki toplama tüpü atıldı ve yenisi takıldı.
9. 500 µL Wash Buffer 1 (Buffer AW1) eklenerek 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj yapıldı.
10. Altındaki toplama tüpü atıldı ve yenisi takıldı.
11. 500 µL Wash Buffer 2 (Buffer AW2) eklenerek 3 dakika 14.000 rpm'de santrifüj yapıldı.
12. Altındaki toplama tüpü atıldı ve yenisi takıldı.
13. Kolonlarda Buffer AW2 kalmaması için boş olarak 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
14. Toplama tüpü atıldı, kolonlar temiz 1,5 mL'lik eppendorf tüplere yerleştirildi.
15. 70 µL Buffer AE eklenerek 1 dakika oda ısısında (15-25°C) inkübe edildi.
16. Tüpler 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
17. QIAamp® spin kolonları atıldı, izolatlar -20°C'de saklandı.

3.2.2.2. Quant-it™ dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen) ile miktar tayini

1. Qubit® 4.0 cihazının kalibrasyonunu yapmak amacıyla 2 adet standart kullanıldı.
2. Quant-it™ dsDNA HS Buffer çözeltisinden 199 µL alınarak 1 µL Quant-it™ Reagent eklendi.
3. Hazırlanan karışım çözeltisinden standartlar için 190 µL, S1(Standart 1) ve S2(Standart 2) çözeltilerinden 10 µL alındı.
4. Örneklerin analizi için karışım çözeltisinden 199 µL alındı ve üzerine 1 µL DNA örneği eklendi.
5. Karışım 2-3 saniye vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
6. İlk olarak Standart 1 ve Standart 2'nin ölçümü yapılarak cihazın kalibrasyonu yapıldı.
7. Örnekler cihaza yerleştirilerek ölçüm yapıldı.
8. DNA örneklerini içeren izolatlar bisülfit dönüşümü aşaması için 5 ng/µL'ye seyreltilerek kullanıldı.

3.2.3. MethylEdge™ Bisulfite Conversion System Kit ile bisülfit dönüşümü

Bisülfit dönüşümü, metillenmemiş sitozinlerin urasile dönüştürülmesi işlemidir. Bunun için MethylEdge™ Bisulfite Conversion System kiti kullanılmıştır.

1. Her DNA örneğinden 20 µL alınarak 200 µL PCR tüpüne yerleştirildi.
2. 130 µL Bisulfite ME Conversion Reagent örneklerin üzerine eklenerek pipetaj yapıldı. Karışım tüpün dibinde toplanabilmesi için kısa bir santrifüj yapıldı.
3. Termal döngü cihazında (SimpliAmp™ Thermal Cycler) Tablo III'te belirtilen döngü koşullarında inkübe edildi.

Tablo III : Bisülfit dönüşümü için termal döngü cihazı koşulları

Sıcaklık	**Süre**
98 °C	8 dakika
54 °C	60 dakika
8 °C	∞

4. İşlenmiş olan her örnek ME Spin kolonuna aktarıldı.
5. 600 µL ME Binding Buffer örneklere eklenerek tüpün kapağı kapatıldı. Birkaç kez ters çevrilerek örnek ile ME Binding Buffer'ın karışması sağlandı.
6. 13500 rpm hızda 30 saniye santrifüj edildi.
7. Toplama tüpündeki filtrat dökülerek aynı kolanlara tekrar takıldı.
8. 100 µL 1X ME Wash Buffer (etanol eklenmiş) kolonlara eklendi ve 13.500 rpm hızda 30 saniye santrifüj edildi.
9. 200 µL ME Desulphonation Buffer her ME Spin kolonuna eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
10. 13500 rpm hızda 30 saniye santrifüj edildi.
11. 200 µL 1X ME Wash Buffer (etanol eklenmiş) kolonlara eklendi ve 13500 rpm hızda 30 saniye santrifüj edildi. Bu aşama bir kez daha tekrarlandı.
12. ME Spin kolonları 1,5 mL eppendorf tüpe yerleştirildi.
13. 10 µL ME Elution Buffer eklendi ve 13500 rpm hızda 30 saniye santrifüj edildi.
14. ME Spin kolonları çıkarıldı ve tüplerin kapağı kapatılarak -20°C'de saklandı.

3.2.4. PCR

Bu çalışmada Freire-Aradas ve ark. (2016) tarafından geliştirilen 9 lokuslu multipleks panele ait CpG noktaları çalışılmıştır (Tablo IV) (8). Tabloda DNA metilasyonu ile yaş tahmiminde kullanılan gen bölgeleri ve kodları verilmiştir.

Tablo IV: Yaş tahmiminde kullanılan hedef gen bölgeleri ve CpG bölgelerini

Gen Bölgesi	**CpG ID**	**GRCh38 Kromozom Pozisyonu**	**Çalışmadaki Kodu**
ELOVL2	cg21572722	chr6:11044661	ELOVL2_CpG_1
ASPA	cg02228185	chr17:3476273	ASPA_CpG_2
EDARADD	none	chr1:236394441	EDARADD_CpG_8
C1orf132	none	chr1:207823715	C1orf132_CpG_3
None	cg07082267	chr16:85395429	CR_23_CpG_7
FHL2	cg06639320	chr2:105399282	FHL2_CpG_4
KCNAB3	cg27162435	chr17:7929845	KCNAB3_CpG_9
PDE4C	none	chr19:18233131	PDE4C_CpG_5
CCDC102B	cg19283806	chr18:68722183	CCDC102B_CpG_6

3.2.4.1. PCR bileşenlerinin hazırlanması

Tablo IV'te verilen CpG bölgelerini çoğaltacak olan primerlerden oluşan bir primer karışım hazırlandı. Tablo V'te verilmiş olan PCR bileşenleri kullanılarak bisülfit dönüşümü uygulanmış DNA örneklerindeki hedef bölgeler çoğaltıldı. Her çalışmada pozitif kontrol ve negatif kontrol örneği kullanıldı. PCR sonrası kısa süre içinde kullanılacak ürünler +4˚C'de, uzun süreli saklama için ise -20˚C'ye kaldırıldı.

Bovine serum albümin (BSA), toz halindeki ana stoktan 3,2 g alınıp üzerine 100 mL distile su eklenerek 32 µg/µL çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti eppendorf tüplere bölünerek -20˚C'de saklandı.

Tablo V : PCR bileşenlerinin optimum değerleri

Kullanılan malzemeler	**Miktar (her bir örnek için)**	**Negatif Kontrol**
Buffer	1,5 µL	1,5 µL
BSA	1,5 µL	1,5 µL
$MgCl_2$	3,9 µL	3,9 µL
dNTPs	1 µL	1 µL
Taq Polimeraz	0,3 µL	0,3 µL
Primer Karışımı	1 µL	1 µL
Steril Su	3 µL	3 µL
DNA Örneği	1,5 µL	-
Total Hacim	13,7 µL	12,2 µL

3.2.4.2.PCR koşulları

Çalışma için SimpliAmp™ Thermal Cycler cihazı kullanıldı. Bu reaksiyon, Tablo VI'da verilmiş olan döngü programıyla gerçekleştirildi.

Tablo VI : Optimum PCR koşulları

PCR Koşulları		
Sıcaklık	**Süre**	**Döngü**
95 °C	11 saniye	
94 °C	20 saniye	34 döngü
60 °C	1 dakika	
72 °C	30 saniye	
72 °C	7 dakika	
8 °C	∞	

3.2.5. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi negatif yüklü DNA moleküllerinin katottan anoda doğru göç ederek boyutlarına göre ayrılması temeline dayanmaktadır. Bu çalışmada PCR işleminin başarılı olup olmadığını bir sonraki aşamaya geçmeden önce kontrol etmek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapıldı.

10X TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponu için ana stok olarak hazırlandı. Hassas terazi ile Tris Baz 108 g, Borik asit 55 g, EDTA 7,5 g olarak tartılarak 1 L distile su ile tamamlandı.

Çözeltinin pH'sı 8,3 olacak şekilde ayarlandı. Elektroforez tamponu (1X TBE tamponu) için ana stok çözeltisinden 100 mL 10X TBE alınarak 900 mL distile su ile tamamlandı.

3.2.5.1. Agaroz jel elektroforezinin hazırlanması

1. 0,5 g olarak hassas terazi ile tartılan agaroz üzerine 50 mL (1X) Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu eklenerek karıştırıldı.
2. Mikrodalgada agaroz tamamen çözülene kadar ısıtıldı.
3. 2,5 µL RedSafe Nucleic acid Staining'nden hazırlanan çözeltiye eklendi.
4. Agaroz aparatı hazırlandı, örnek kuyucuğunu oluşturacak tarak yerine yerleştirildi ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. 20 dakika tamamen jelleşmesi için beklendi.
5. Agaroz jel matriksinde tarak çıkarıldı, elektroforez kabına yerleştirildi ve jelin üzerini kaplayacak şekilde (1X) TBE tamponu eklendi.
6. PCR ürünlerinden 1,5 µL alınarak 0,5 µL yükleme boyası (Bromofenol blue) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi.
7. Yürütme sırasında pozitif kontrol için DNA Ladder kullanıldı.
8. Elektroforez, 90 V'ta 20 dakikada gerçekleştirildi.
9. Yürütme tamamlandıktan sonra DNA bantları UV ışık altında gözlendi. DNA bantı görülen örnekler için bir sonraki aşamaya geçildi.

3.2.6. PCR ürünlerinin saflaştırılması

3.2.6.1. PCR ürünlerinin hazırlanması

PCR sırasında kullanılan primer ve bağlanmayan dNTP'lerin bir sonraki basamak olan SNaPshot aşamasında reaksiyonu olumsuz etkilememesi için ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla primerler için Ekzonükleaz I ve dNTP'ler için Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) enzimleri kullanıldı. Tablo VII'de belirtilen bileşenler ile saflaştırma gerçekleştirildi.

Tablo VII: PCR ürünleri saflaştırma bileşenleri

PCR Bileşenleri	
Reaktif	**Miktarı**
PCR Ürünü	1,25 µL
EXO-SAPit	0,5 µL

3.2.6.2. PCR koşulları

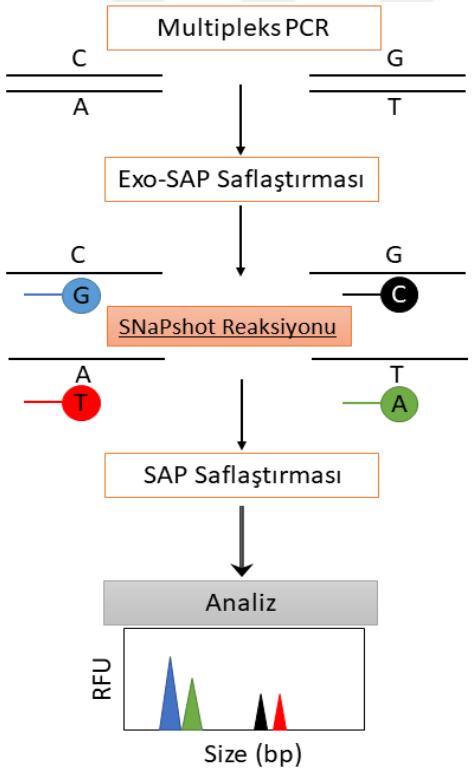
PCR işlemi SimpliAmp™ Thermal Cycler cihazında Tablo VIII'de verilmiş olan sıcaklık ve zaman koşullarında gerçekleştirildi.

Tablo VIII : PCR ürünlerini saflaştırma için optimum termal döngü cihazı koşulları

PCR Koşulları	
Sıcaklık	**Süre**
37 °C	45 dakika
80°C	15 dakika
8 °C	∞

3.2.7. SNaPshot reaksiyonu (minidizileme) ve SNaPshot ürünlerinin saflaştırılması

Tek nükleotit uzaması (SBE, Single Nucleotide Extension) yöntemine dayanan SNaPshot, spesifik nukleotit için tasarlanmış olan primerlerin bağlanmasıyla bu nukleotite karşılık gelen ddNTP'nin bağlanması sonucu ilgili noktanın dizilenmesi yapılır (Şekil 12). SNaPshot reaksiyonu sonrasında bağlanmayan ddNTP'lerin ışıma yapıp yanlış pik oluşturmasını engellemek için ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu işlem için SAP enzimi kullanılarak bağlanmayan ddNTP'ler uzaklaştırılır.



Şekil 12 : SNaPshot Teknolojisinin şematik gösterimi (100)

3.2.7.1. *SNaPshot reaksiyonu için örneklerin hazırlanması*

SNaPshot reaksiyonu için SNaPshot™ Multipleks Kit kullanıldı. Bu aşama için kullanılan bileşenler Tablo IX'da verildiği gibi uygulandı.

Tablo IX : SNaPshot reaksiyonu için PCR bileşenleri

PCR Bileşenleri		
Reaktif	**Miktarı**	**Negatif kontrol**
Saflaştırılmış örnek	Örneğin tamamı	-
SNaPshot Multipleks	2,5 µL	2,5 µL
Primer Mix	1,5 µL	1,5 µL
Toplam Hacim	**5,75 µL**	**4 µL**

3.2.7.2. *SNaPshot reaksiyonu için Termal Döngü koşulları*

Reaksiyon SimpliAmp™ Thermal Cycler cihazında Tablo X'da verilmiş olan sıcaklık ve zaman koşullarında gerçekleştirildi.

Tablo X : SNaPshot reaksiyonu PCR programı

PCR Koşulları		
Sıcaklık	**Süre**	**Döngü**
96 °C	10 saniye	30 döngü
52°C	5 saniye	
60 °C	30 saniye	
8 °C	∞	

3.2.8. SNaPshot ürünlerinin saflaştırılması

SNaPshot reaksiyonu sonrasında bağlanmayan floresan işaretli ddNTP'lerin ışıma yaparak elektroforezde analizi zorlaştırmaması için ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bunun için SAP enzimi kullanılarak ddNTP'ler inaktif hale getirilir. Saflaştırma işlemi için 5,75 µL SNaPshot ürünü üzerine 1 µL SAP (1U/ µL) eklendi. PCR işlemi SimpliAmp™ Thermal Cycler cihazında 37 °C'de 80 dakika ve 85 °C'de 15 dakika inaktive edildi. Örnekler -20°C'ye kaldırıldı.

3.2.9. PCR ürünlerinin ABI PRISM® 310/3130*xl* cihazı ile analizi

PCR ürünlerinin analizi örneklerin hazırlanması, elektroforez ve verilerin değerlendirilmesi aşamalarından oluşmaktadır. Elektroforez işlemi ABI PRISM®310 ve ABI PRISM® 3130*xl* cihazında yapıldı. Elektroforez verilerinin analizi ise GeneMapper v3.2 (Thermo Fischer Scientific) programında yapıldı.

3.2.9.1. Örneklerin hazırlanması

Analiz edilecek her bir örnek için Tablo XI'de verilen bileşenler kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan karışımdan 500 µL'lik cihaza uygun eppendorf tüplere 9,5 µL konularak üzerlerine 1,5 µL PCR örneği eklendi.

Tablo XI : Elektroforez için gerekli olan bileşenlerin hazırlanması

Bileşenler	**Miktarları (µL)** **(Bir örnek için)**
Hi-Di Formamide	10 µL
GS Liz 120	0,1 µL

3.2.9.2. Örneklerin elektroforezi

Örnekler POP-4 polimeri ile 36 cm kapiller kullanılarak, DS-02 matriksi (Thermo Fischer Scientific) ve E5 modülünde Tablo XII'de verilen parametreler göre analiz edildi. DS-02 matriksinde florensans işaretli bazları temsil eden renkler Tablo XIII'te verilmiştir.

Tablo XII : Elektroforez koşulları

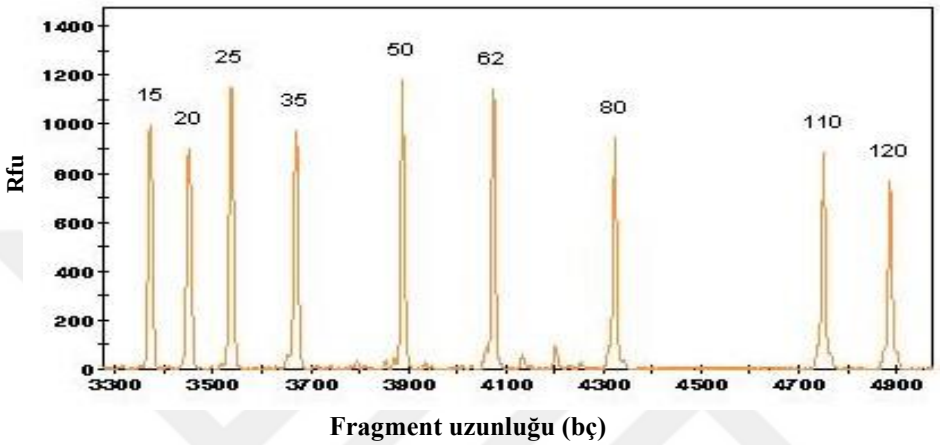
Parametre	**GS POP-4 (1 mL) E5**
Matriks	DS02
İnjeksiyon zamanı	5 saniye
Yürütme voltajı	15 kV
Yürütme zamanı	24 dakika
Yürütme sıcaklığı	60 °C
Şırınga pompalama süresi	150 saniye

Tablo XIII : ABI PRISM® 310/3130*xl* 'da boyaların temsil ettiği renkler

Renk	**Boya seti E5 (DS-02)**
Mavi	dR110
Yeşil	dR6G
Sarı (Siyah)	dTAMRA
Kırmızı	dROX
Turuncu	LIZ™

3.2.9.3. Örneklerin analizi

Elektroforez ile yürütülen örneklerin analizi Genemapper v3.2' de yapıldı. Her örnek için kullanılan iç standart LIZ-120 (15, 20, 25,35, 50, 62,80, 110 ve 120) ile kontrol edildi (Şekil 13). Buna göre her CpG noktasının yeri tespit edilerek sitozin (C) ve timin (T) piklerinin RFU (rölatif floresans ünitesi) değerleri tespit edildi.



Şekil 13 : LIZ120'nin elektroforegram görüntüsü

3.2.10. Verilerin analizi ve yaş hesaplanması

50 kişiye ait elektroforez sonucu elde edilen 9 CpG bölgesinin her bölgeye özgü sitozin ve timin piklerinin RFU değerleri kullanılarak Denklem 1'de belirtilen formül ile metilasyon oranları Microsoft Excel (Microsoft 365 ProPlus) de hesaplandı. Elde edilen metilasyon değerleri Freire-Aradas ve ark. (2016) tarafından çok değişkenli kuantil regresyon temelli oluşturulan, The Snipper 2.5 yazılımı ile analiz edildi (8). Metilasyon oranlarının yaşa bağlı olarak değişimleri RStudio v1.1.463 (RStudio, Inc) programı ile değerlendirildi. 0'a yaklaştıkça değişkenler arasındaki ilişkinin azaldığını gösteren, 1 ile -1 arasında değer alan korelasyon katsayısı belirlenerek metilasyon oranları ve kronolojik yaş arasındaki ilişki incelendi. Linear regresyon grafiği ile değişkenler arasındaki ilişkinin varlığını ve ideal doğruya olan uzaklıkları gözlemlendi.

$$\frac{\text{Sitozin } (RFU)}{\text{Sitozin } (RFU) + (\text{Timin } (RFU) \times 1{,}6)}$$

Denklem 1 : Metilasyon oranlarının hesaplanması

4. Bulgular

Bu tez çalışmasında Freire-Aradas ve arkadaşları tarafından geliştirilen 9 CpG lokusu (ELOVL2, ASPA, C1orf132, CR_23, FHL2, PDE4C, CCDC102B, EDARADD, KCNAB3) lokusu kullanılarak 22-78 yaş aralığındaki 50 gönüllüye ait kan örnekleri kullanılarak metilasyon profilleri belirlendi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri yapılarak kişilerin yaşları tahmin edildi. Genotip tayini için GeneMapper v3.2 (Thermo Fischer Scientific) analiz programı kullanıldı. İstatistiksel analizler için RStudio v.1.1.463 (RStudio, Inc) programı kullanıldı. Yaş tahmini hesaplamaları için The Snipper 2.5 yazılımı kullanıldı.

4.1. Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu, DNA Miktarının Belirlenmesi ve Bisülfit Dönüşümü

50 kişiden (27 erkek, 23 kadın) alınan kan örneklerinin DNA izolasyonu yapılarak miktar tayini yapıldı. Tablo XIV'te kan örneklerinin DNA miktarları verilmiştir.

Tablo XIV : Kandan elde edilen 50 kişiye ait DNA miktarları

Örnek Sırası	Örnek Kodu	DNA Miktarı	Örnek Sırası	Örnek Kodu	DNA Miktarı
1	M-XX-01	41 ng/µl	**26**	M-XY-40	11,3 ng/µl
2	M-XY-02	32 ng/µl	**27**	M-XY-41	54,6 ng/µl
3	M-XY-03	38,6 ng/µl	**28**	M-XY-42	77 ng/µl
4	M-XX-04	51,4 ng/µl	**29**	M-XY-43	32,6 ng/µl
5	M-XX-07	89 ng/µl	**30**	M-XX-44	30,4 ng/µl
6	M-XX-08	48 ng/µl	**31**	M-XY-45	29,6 ng/µl

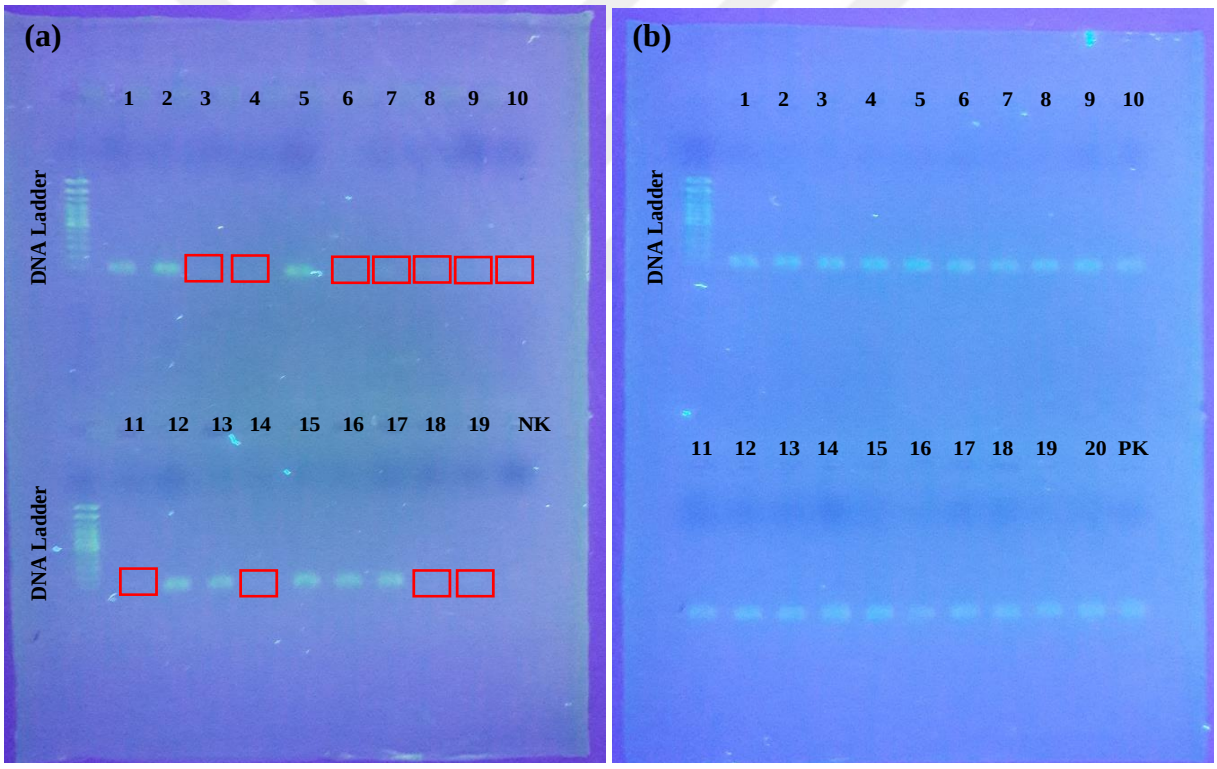
Tablo XIV (devamı) : Kandan elde edilen 50 kişiye ait DNA miktarları

7	M-XY-09	43 ng/µl	**32**	M-XY-47	48,0 ng/µl
8	M-XX-10	84,8 ng/µl	**33**	M-XY-48	47,2 ng/µl
9	M-XX-13	56,4 ng/µl	**34**	M-XY-49	68,6 ng/µl
10	M-XX-14	32,4 ng/µl	**35**	M-XY-50	56,2 ng/µl
11	M-XX-15	19 ng/µl	**36**	M-XY-51	58,2 ng/µl
12	M-XX-17	51,6 ng/µl	**37**	M-XY-52	50,2 ng/µl
13	M-XY-18	18,2 ng/µl	**38**	M-XX-53	63,6 ng/µl
14	M-XX-20	34,6 ng/µl	**39**	M-XY-54	21,2 ng/µl
15	M-XX-22	51,8 ng/µl	**40**	M-XY-55	12,0 ng/µl
16	M-XY-23	76,2 ng/µl	**41**	M-XX-56	18,6 ng/µl
17	M-XX-24	32,4 ng/µl	**42**	M-XY-57	41,8 ng/µl
18	M-XX-25	31,6 ng/µl	**43**	M-XY-58	31,4 ng/µl
19	M-XX-26	51,4 ng/µl	**44**	M-XY-59	42,8 ng/µl
20	M-XX-28	30,4 ng/µl	**45**	M-XY-60	31,8 ng/µl
21	M-XY-29	83,2 ng/µl	**46**	M-XY-61	28,4 ng/µl
22	M-XY-33	64,0 ng/µl	**47**	M-XX-62	56,6 ng/µl
23	M-XX-36	38,8 ng/µl	**48**	M-XY-63	24,6 ng/µl
24	M-XX-37	42,0 ng/µl	**49**	M-XX-64	13,0 ng/µl
25	M-XX-39	36,2 ng/µl	**50**	M-XY-65	31,8 ng/µl

4.2. 9 CpG Bölgesine Ait Metilasyon Profillerinin Belirlenmesi

4.2.1. Bisülfit dönüşümü ve PCR aşaması

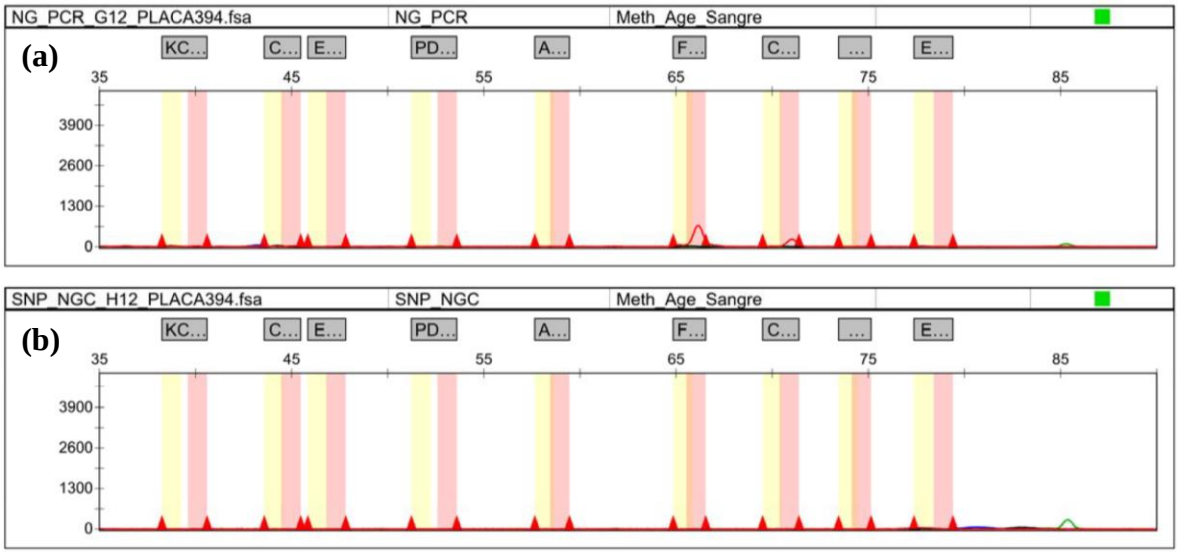
50 kişiye ait DNA örneklerinin bisülfit dönüşümü sonrasında optimize edilmiş 9 CpG primerleri kullanılarak 5 ng/µL DNA ile PCR yapıldı. Bisülfit dönüşümün tamamlanıp tamamlanmadığını, primerlerin etkinliğini kontrol etmek ve SNaPshot reaksiyonuna geçmek için DNA varlığını teyit etmek amacıyla agaroz elektroforez yapıldı. DNA bantı gözlemlenemeyen örnekler tekrarlandı (Şekil 14a ve 14b).



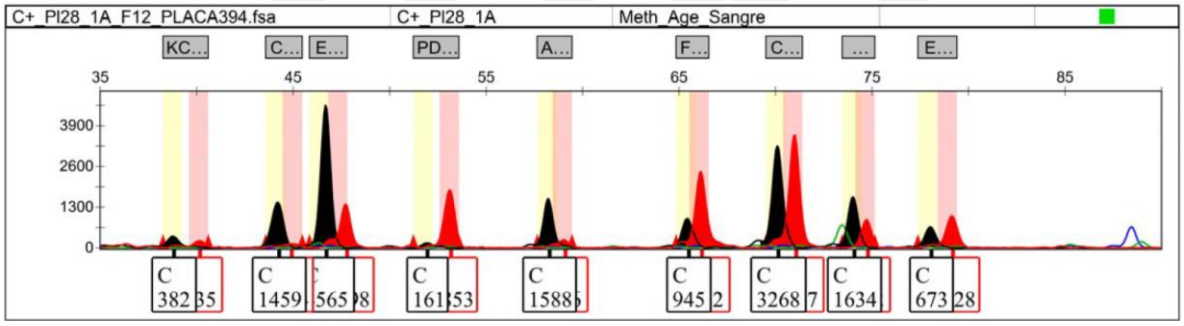
Şekil 14 : Bisülfit dönüşümü ve PCR sonrası elde edilen agaroz jel görüntüsü (a) Bisülfit dönüşümü tamamlanmamış örneklerin agaroz jel görüntüsü (b) Yeniden bisülfit dönüşümü ve PCR uygulanmış örneklerin agaroz jel görüntüsü

4.2.2. Elektroforez aşaması

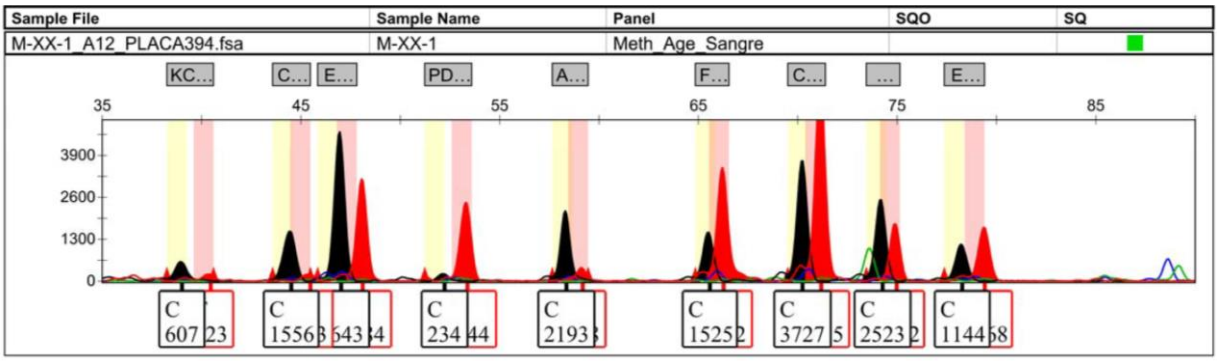
ABI PRISM 310 ve ABI PRISM 3130*xl* genetik analizör cihazında elektroforez yapıldıktan sonra GeneMapper v3.2 programı ile 9 CpG lokusunun 50 kişinin metilasyon değerleri tespit edildi (Tablo XV). Çalışmada kontaminasyonu elimine etmek amacıyla her çalışmada negatif kontrol örnekleri (Şekil 15a ve 15b) ve çalışmanın doğruluğunu teyit etmek için profili bilinen pozitif kontrol örnekleri (Şekil 16) kullanıldı. Analiz eşiği (limit of detection, LOD) 100 RFU olarak tespit edildi. Bir örneğe ait elektroforegram görüntüsü Şekil 17'de verilmiştir.



Şekil 15 : (a) PCR aşamasında (b) SNaPshot reaksiyonuna ait negatif kontrol örneklerinin elektroforegram görüntüsü



Şekil 16 : Pozitif kontrol örneğine ait elektroforegram görüntüsü



Şekil 17 : Bir örneğe ait elektroforegram görüntüsü

Tablo XV : 50 kişiye ait metilasyon değerleri ve yaş tahmini sonuçları

Örnek Kodu	ELOVL2 _CpG_1	ASPA _CpG_2	PDE4C _CpG_5	FHL2 _CpG_4	CCDC102B _CpG_6	C1orf132 _CpG_3	CR_23 _CpG_7	EDARADD _CpG_8	KCNAB3 _CpG_9	Tahmini Yaş	Kronolojik Yaş
M-XX-1	0,300	0,766	0,056	0,213	0,275	0,813	0,471	0,477	0,630	22,92	24
M-XY-2	0,252	0,738	0,081	0,153	0,315	0,818	0,429	0,644	0,549	21,45	27
M-XY-3	0,329	0,778	0,086	0,321	0,223	0,695	0,305	0,455	0,418	38,77	36
M-XX-4	0,316	0,806	0,071	0,225	0,310	0,876	0,530	0,540	0,483	19,81	23
M-XX-7	0,318	0,787	0,065	0,251	0,307	0,839	0,488	0,572	0,414	23,14	23
M-XX-8	0,288	0,723	0,078	0,197	0,249	0,862	0,434	0,520	0,641	24,66	24
M-XY-9	0,395	0,747	0,063	0,239	0,291	0,833	0,437	0,517	0,489	28,73	29
M-XX-10	0,362	0,764	0,049	0,242	0,317	0,870	0,357	0,517	0,577	27,71	25
M-XX-13	0,324	0,731	0,066	0,188	0,315	0,751	0,453	0,565	0	25,42	26
M-XX-14	0,492	0,722	0,158	0,371	0,144	0,563	0,350	0,482	0,606	55,40	55
M-XX-15	0,360	0,646	0,086	0,208	0,264	0,811	0,435	0,371	0,557	30,56	37
M-XX-17	0,298	0,750	0,071	0,223	0,278	0,769	0,493	0,519	0,593	24,51	32

Tablo XV (devamı): 50 kişiye ait metilasyon değerleri ve yaş tahmini sonuçları

M-XY-18	0,284	0,619	0,043	0,188	0,321	0,859	0,461	0,612	0,563	21,58	23
M-XX-20	0,329	0,827	0,056	0,193	0,302	0,774	0,487	0,530	0,684	22,10	25
M-XX-22	0,432	0,737	0,139	0,339	0,177	0,645	0,352	0,360	0,687	47,86	48
M-XY-23	0,300	0,692	0,060	0,201	0,253	0,804	0,405	0,473	0,354	27,01	33
M-XX-24	0,324	0,703	0,076	0,235	0,276	0,808	0,537	0,572	0,535	24,68	27
M-XX-25	0,323	0,835	0,089	0,289	0,236	0,710	0,396	0,546	0,681	32,84	33
M-XX-26	0,324	0,772	0,065	0,229	0,269	0,859	0,531	0,495	0,585	21,80	24
M-XX-28	0,468	0,643	0,126	0,319	0,186	0,733	0,453	0,473	0,567	43,86	49
M-XY-29	0,264	0,820	0,065	0,194	0,227	0,826	0,446	0,301	0,682	21,95	27
M-XY-33	0,326	0,737	0,065	0,226	0,273	0,903	0,471	0,596	0,544	23,38	23
M-XX-36	0,341	0,832	0,061	0,220	0,266	0,877	0,505	0,590	0,562	21,36	22
M-XX-37	0,282	0,745	0,067	0,221	0,307	0,879	0,405	0,556	0,497	23,48	22
M-XX-39	0,293	0,827	0,065	0,251	0,384	0,870	0,500	0,625	0,545	18,62	22
M-XY-40	0,405	0,634	0,146	0,302	0,181	0,636	0,354	0,397	0,392	47,94	54

Tablo XV (devamı): 50 kişiye ait metilasyon değerleri ve yaş tahmini sonuçları

M-XY-41	0,451	0,703	0,125	0,326	0,179	0,624	0,363	0,402	0,708	48,08	47
M-XY-42	0,419	0,537	0,163	0,365	0,201	0,630	0,382	0,428	0,809	51,95	55
M-XY-43	0,463	0,687	0,124	0,293	0,228	0,741	0,390	0,320	0,563	42,96	47
M-XX-44	0,421	0,612	0,122	0,254	0,202	0,758	0,436	0,508	0,582	39,83	41
M-XY-45	0,310	0,745	0,077	0,289	0,233	0,839	0,380	0,557	0,486	35,86	42
M-XY-47	0,593	0,610	0,183	0,359	0,194	0,623	0,179	0,411	0,633	66,00	60
M-XY-48	0,426	0,624	0,099	0,297	0,219	0,623	0,335	0,503	0,496	46,11	51
M-XY-49	0,339	0,827	0,116	0,248	0,169	0,700	0,432	0,512	0,668	34,29	38
M-XY-50	0,397	0,701	0,083	0,278	0,180	0,773	0,276	0,462	0,557	41,43	44
M-XY-51	0,389	0,669	0,084	0,260	0,282	0,843	0,397	0,494	0,520	33,11	32
M-XY-52	0,317	0,703	0,102	0,271	0,205	0,767	0,466	0,435	0,729	36,48	39
M-XX-53	0,348	0,801	0,086	0,278	0,255	0,754	0,432	0,550	0,508	31,25	35
M-XY-54	0,342	0,749	0,053	0,217	0,356	0,888	0,399	0,543	0,419	31,50	36
M-XY-55	0,574	0,591	0,206	0,358	0,081	0,700	0,441	0,467	0,640	58,42	57

Tablo XV (devamı): 50 kişiye ait metilasyon değerleri ve yaş tahmini sonuçları

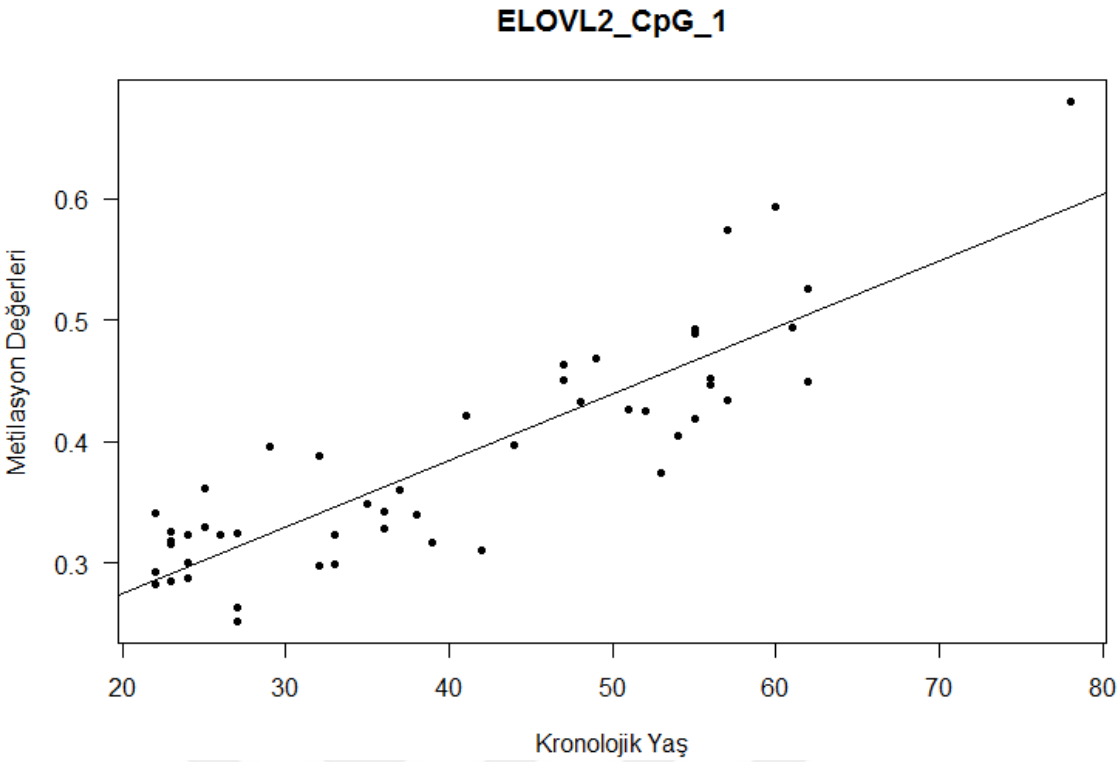
M-XY-56	0,449	0,576	0,166	0,360	0,095	0,586	0,281	0,312	0,531	59,30	62
M-XY-57	0,375	0,578	0,112	0,283	0,244	0,788	0,357	0,352	0,526	45,29	53
M-XY-58	0,433	0,570	0,140	0,361	0	0,740	0,317	0,426	0,614	54,46	57
M-XY-59	0,425	0,610	0,120	0,320	0	0,709	0,374	0,413	0,587	49,68	52
M-XY-60	0,680	0,392	0,081	0,496	0,047	0,519	0,227	0,168	0,819	75,81	78
M-XY-61	0,447	0,580	0,137	0,350	0,171	0,614	0,400	0,487	0,697	50,68	56
M-XX-62	0,493	0,584	0,192	0,386	0,164	0,646	0,410	0,489	0,641	55,93	61
M-XY-63	0,488	0,681	0,184	0,355	0,203	0,709	0,359	0,348	0,594	51,98	55
M-XX-64	0,452	0,626	0,148	0,331	0,154	0,661	0,437	0,471	0,695	51,40	56
M-XY-65	0,525	0,579	0,146	0,380	0	0,586	0,320	0,302	0,631	62,49	62

4.2.3. İstatistiksel değerlendirme

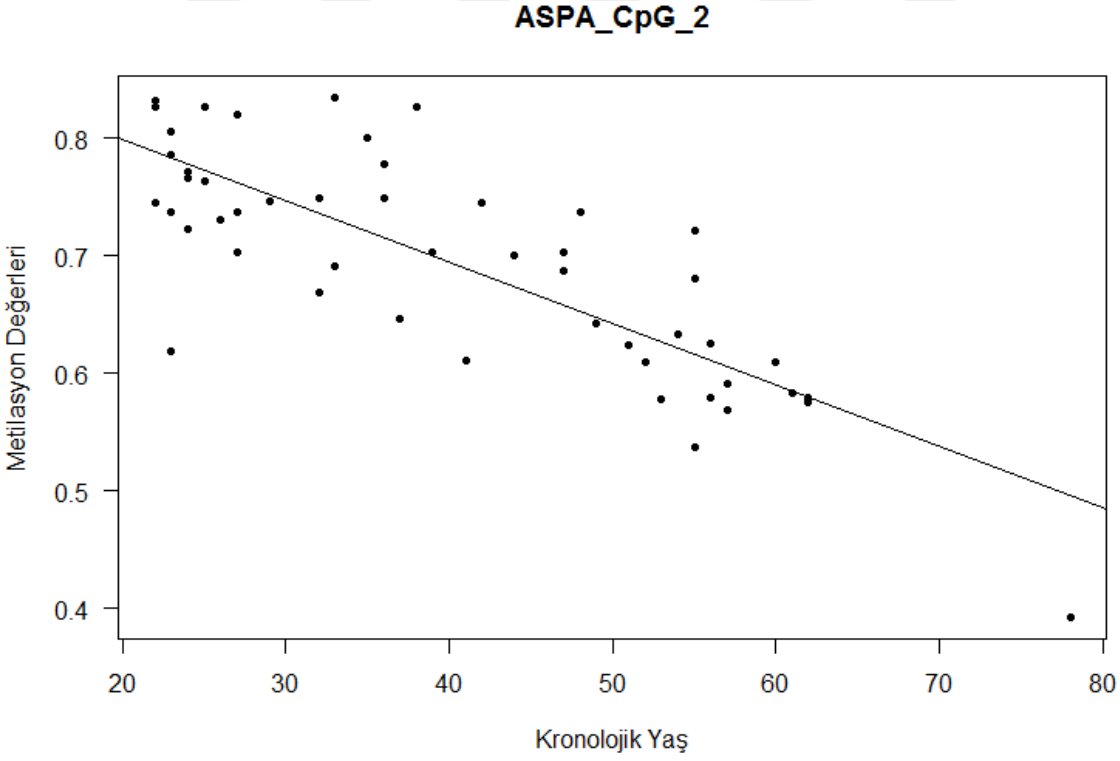
RStudio v.1.1.463 (RStudio, Inc) programında 9 CpG noktasının kronolojik yaş ile Spearman korelasyon değerleri hesaplandı. Bu değerler Tablo XVI'da gösterilmektedir**.** Her bir CpG noktasına ait metilasyon değerleri ile kronolojik yaşın karşılaştırıldığı lineer regresyon grafikleri Şekil 18-26'da verilmiştir.

Tablo XVI : 9 CpG noktasına ait korelasyon değerleri

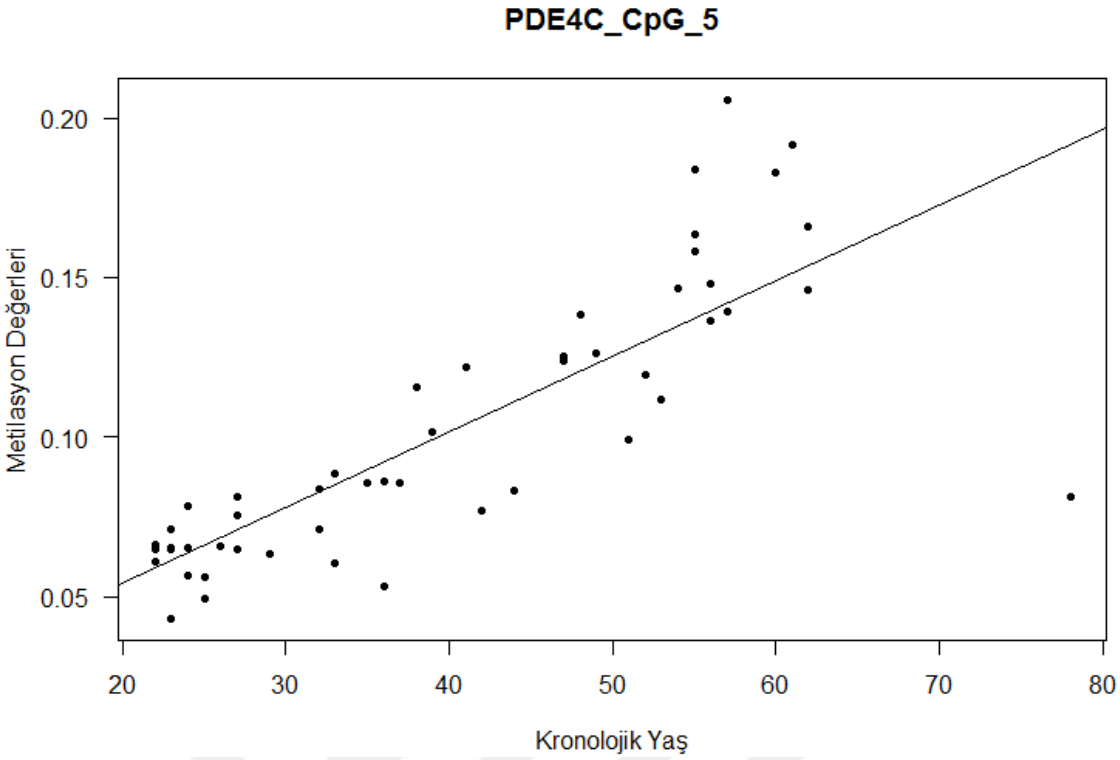
Gen Bölgesi	**GRCh38 Kromozom Pozisyonu**	**CpG Kodu**	**Korelasyon Değeri**	**Metilasyon Profilinin Yaş ile Değişimi**
ELOVL2	chr6:11044661	ELOVL2_CpG_1	0,840	Hipermetilasyon
ASPA	chr17:3476273	ASPA_CpG_2	-0,766	Hipometilasyon
EDARADD	chr1:236394441	EDARADD_CpG_8	-0,730	Hipometilasyon
C1orf132	chr1:207823715	C1orf132_CpG_3	-0,858	Hipometilasyon
None	chr16:85395429	CR_23_CpG_7	-0,694	Hipometilasyon
FHL2	chr2:105399282	FHL2_CpG_4	0,858	Hipermetilasyon
KCNAB3	chr17:7929845	KCNAB3_CpG_9	0,370	Hipermetilasyon
PDE4C	chr19:18233127 /31/33	PDE4C_CpG_5	0,848	Hipermetilasyon
CCDC102B	chr18:68722183	CCDC102B_CpG_6	-0,862	Hipometilasyon



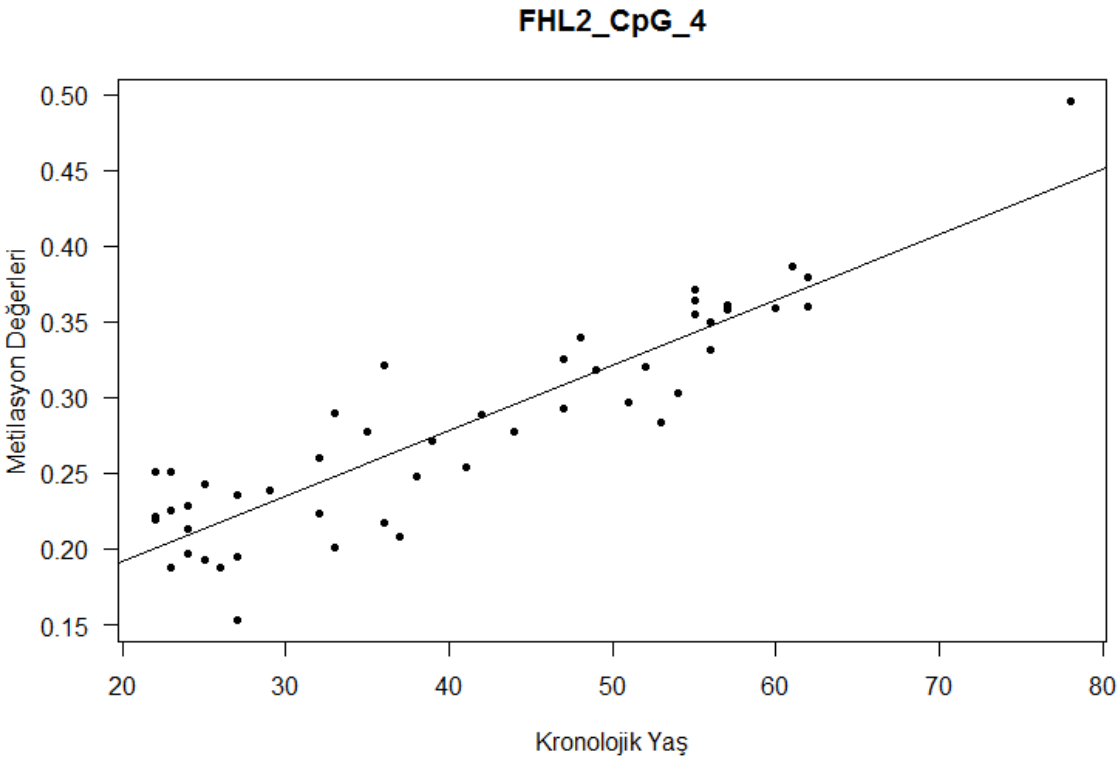
Şekil 18 : ELOVL2 genindeki CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



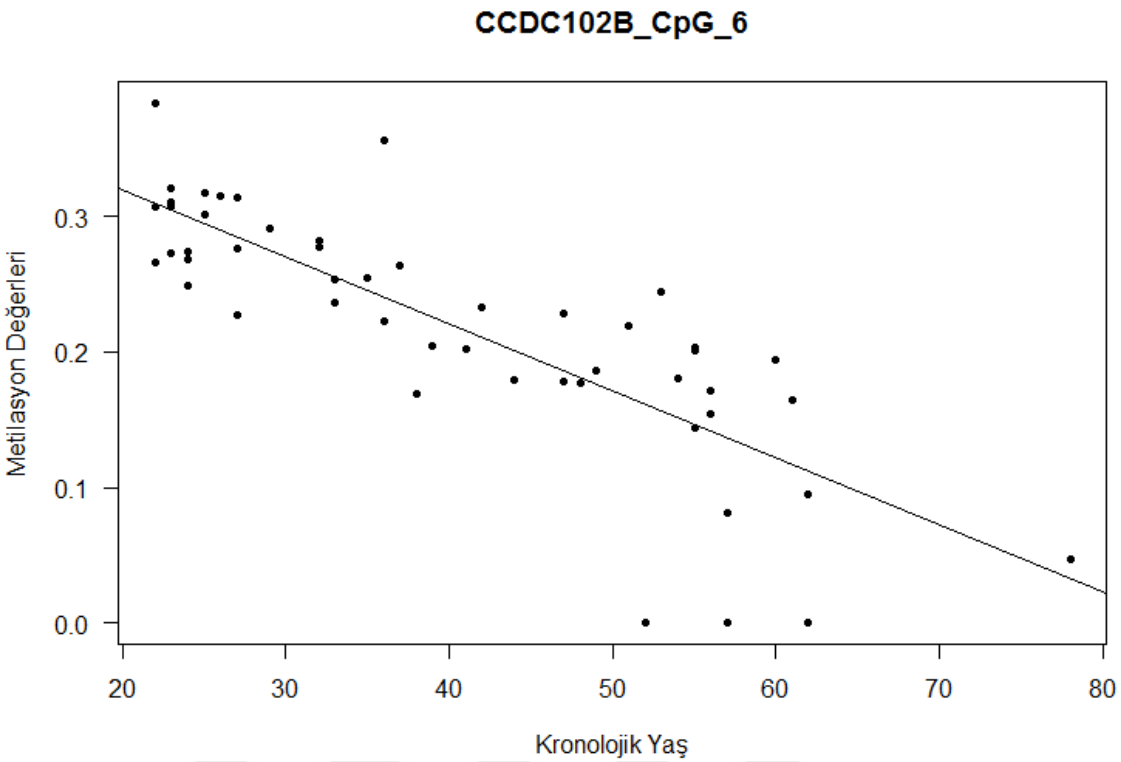
Şekil 19 : ASPA genindeki CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



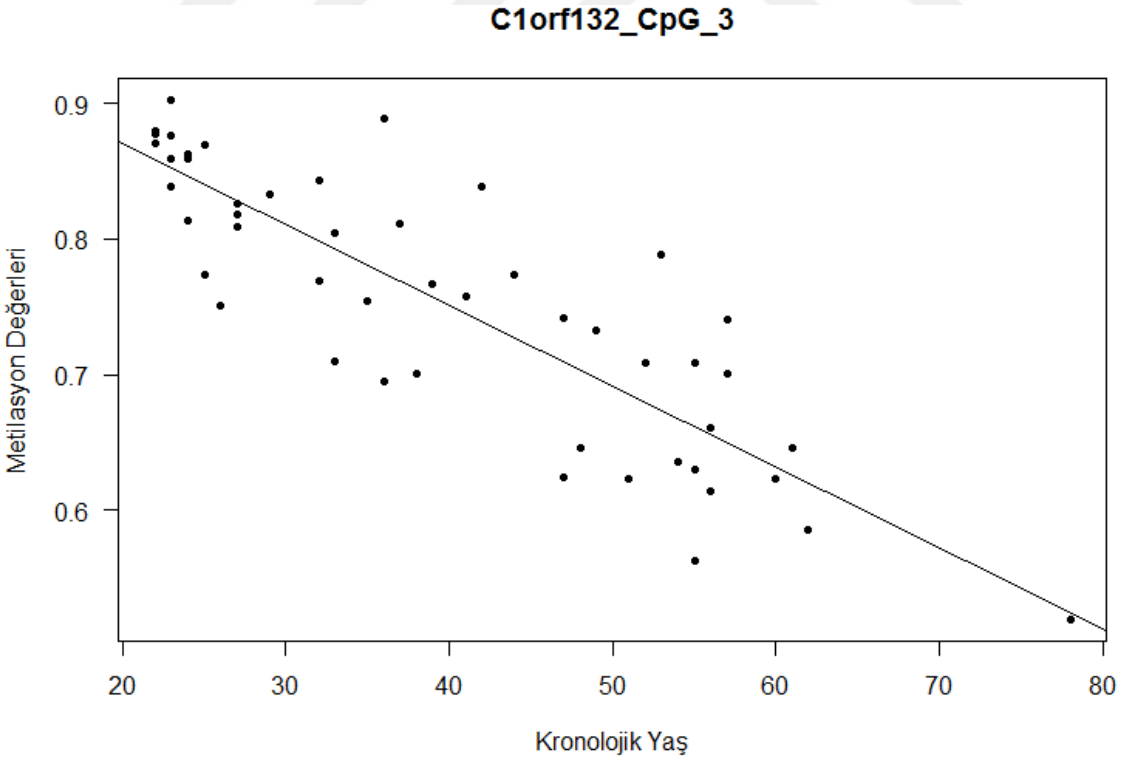
Şekil 20 : PDE4C genindeki CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



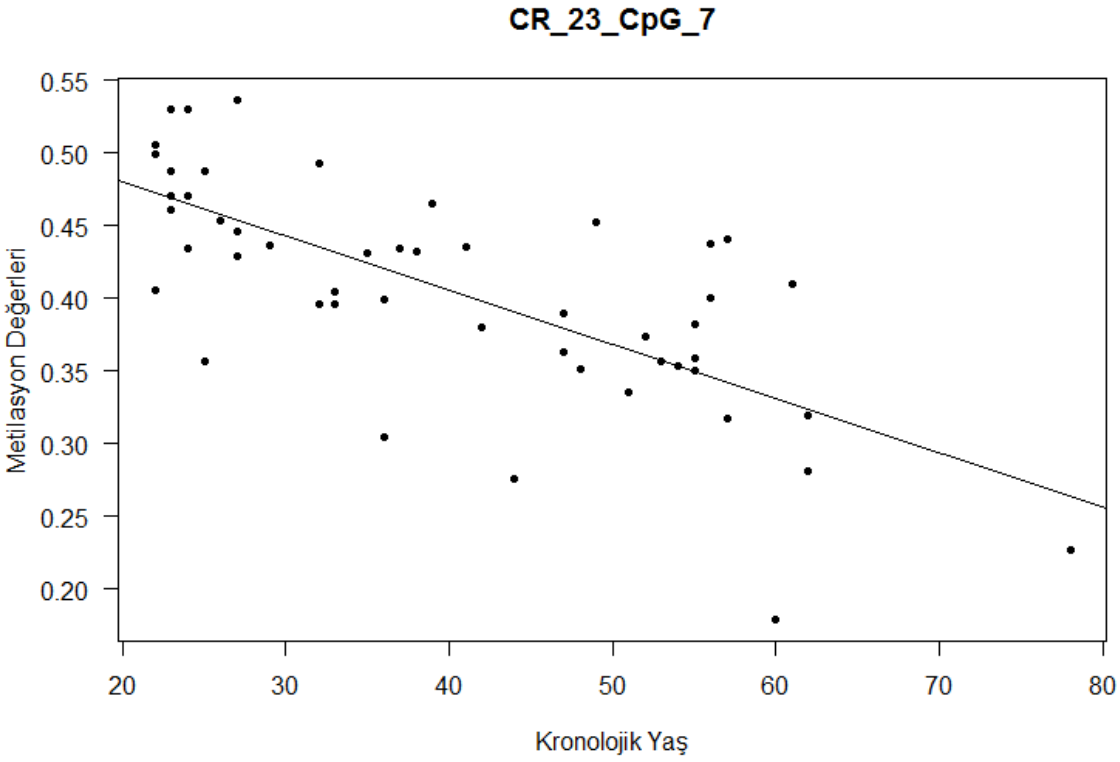
Şekil 21 : FHL2 genindeki CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



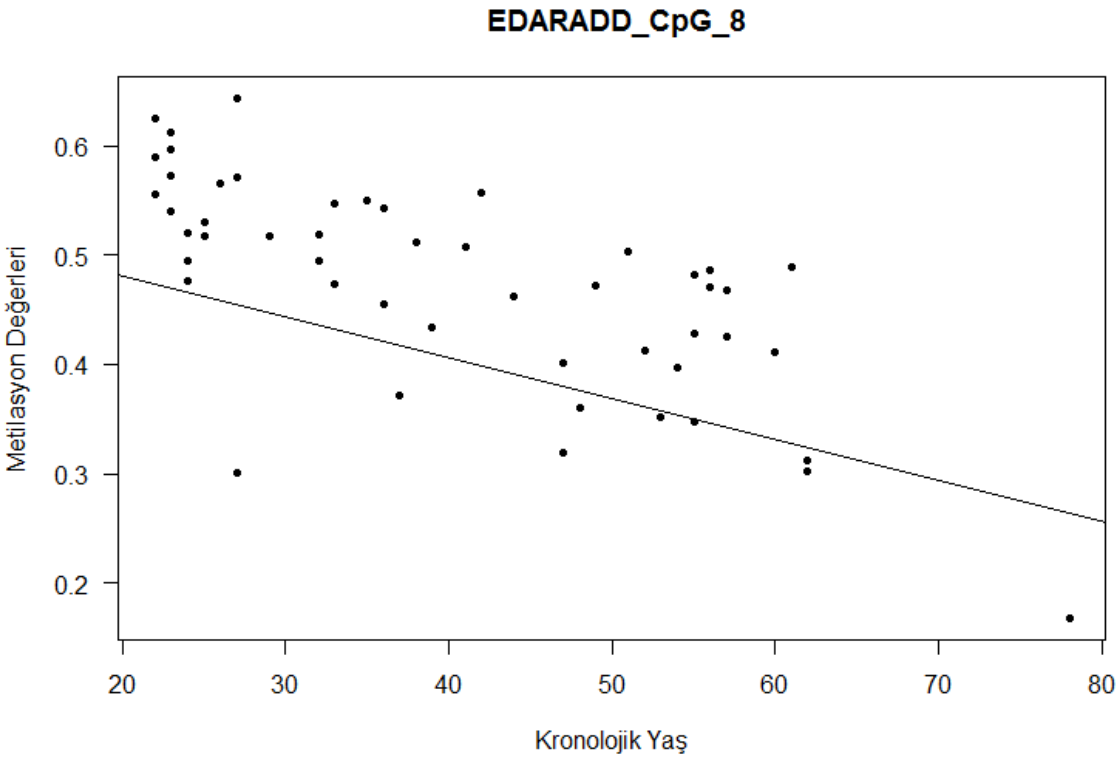
Şekil 22 : CCDC102B genindeki CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



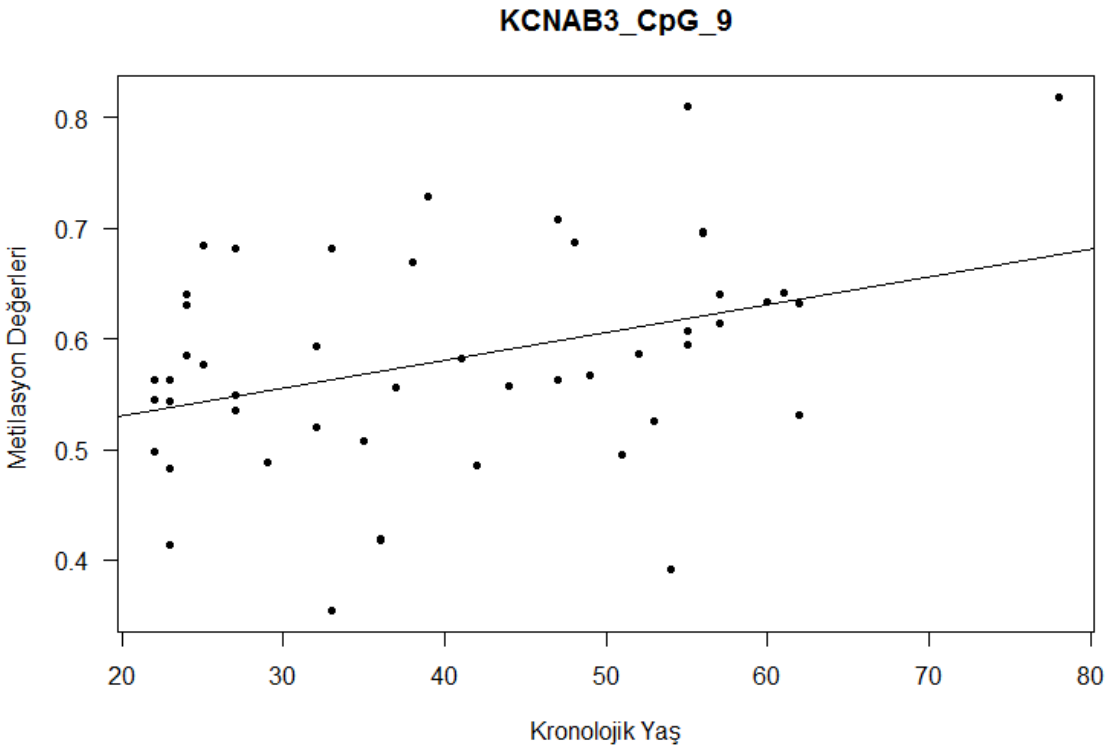
Şekil 23 : C1orf132 genindeki CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



Şekil 24 : CR_23 CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği

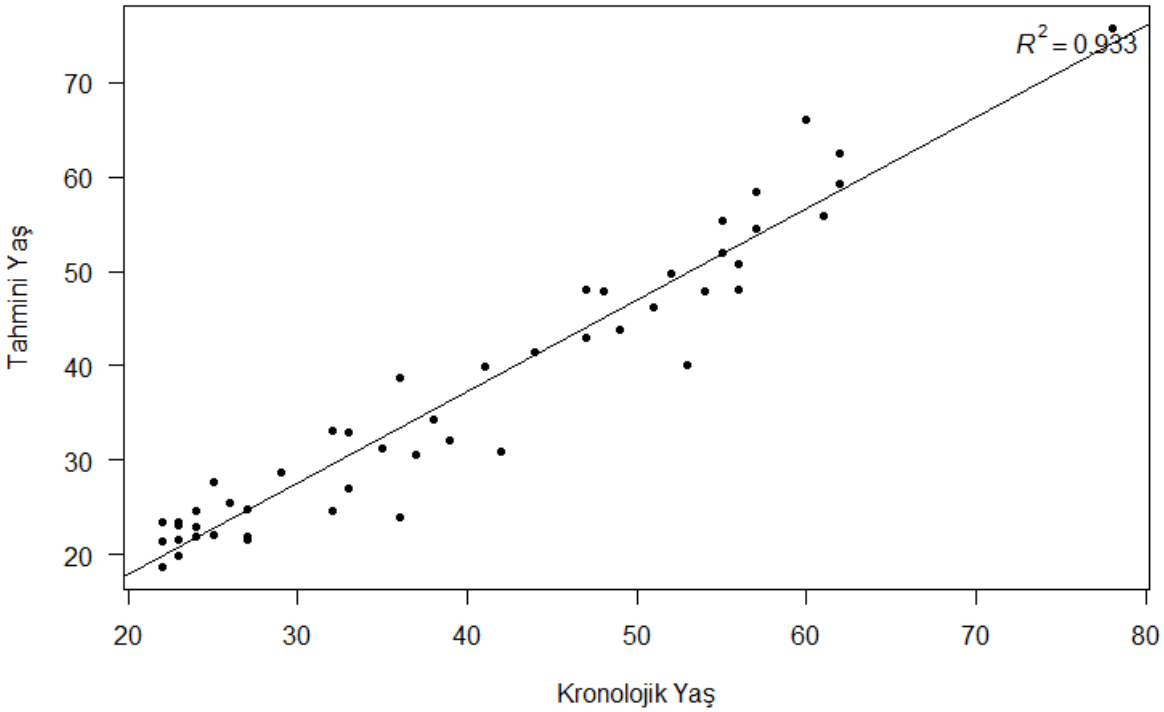


Şekil 25 : EDARADD CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



Şekil 26 : KCNAB3 CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği

Freire-Aradas ve ark. (2016) tarafından çok değişkenli kuantil regresyon temeline dayanarak oluşturulan, ELOVL2 (chr6:11044661), ASPA (chr17:3476273), C1orf132 (chr1:207823715), CR_23 (chr16:85395429), FHL2 (chr2:105399282), PDE4C (chr19:18233131) ve CCDC102B (chr18:68722183) genlerini içeren yaş tahmini modeli kullanılarak elde edilen metilasyon değerleri ile tahmini yaş değerleri hesaplandı (Tablo XV). Elde edilen yaş tahmini sonuçları kronolojik yaş ile karşılaştırılarak lineer regresyon grafiği oluşturuldu (Şekil 27).



Şekil 27 : 7 CpG noktasının tahmini yaş değerlerine ait lineer regresyon grafiği

5. Tartışma ve Sonuç

İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla birlikte epigenetik çalışmalar hız kazanarak adli bilimler alanında birçok çalışma başlatılmıştır. Kişilerin kimliklendirilmesinde STR, InDel, mtDNA ve SNP sistemleri kullanılmaktadır. Bu sistemlerden SNP kişinin dış görünüşüne ait bilgi vermektedir. Faili meçhul olaylarda veya toplu felaketlerde kişilerin fenotipik özellikleri ilgili bilgiye ulaşmak çok değerlidir. Kriminal olaylarda aranacak kişinin fiziksel görüntüsü hakkında bilgi edinildiğinde şüpheli havuzu daraltılarak faile daha kısa sürede ulaşılabilir. SNP ile kişinin göz saç ve ten rengi belirlenebilmektedir (21,24,25). Bu bilgilerin yanında kişinin yaşının da belirlenmesi oldukça değerli olacaktır. Günümüzde yaş tahmininde geleneksel olarak yapılan kemik yaşı tahmini yalnızca olay yerinden kemik bulunması veya canlı kişilerde iskeletin incelemesi ile yapılır. Biyolojik belirteçler kullanılarak bugüne kadar geliştirilen yöntemler ise gerçek yaştan sapma oranları yüksek veya tutarlı olmaması nedeniyle pratikte uygulanamamaktadır (50). DNA metilasyon analizi ise daha yüksek doğrulukta yaş tahmini yapmaya olanak sağlayan bir yöntemdir (7,87).

Bu tez çalışmasında DNA'nın yaşa bağlı olarak genlerin ifade edilme durumundan yola çıkılarak insanların gelişiminde etkili olan ve yaş tahmini için başarılı olduğu bilinen, Freire-Aradas ve arkadaşları tarafından geliştirilen 9 CpG lokuslu (ELOVL2 (chr6:11044661), ASPA (chr17:3476273), C1orf132 (chr1:207823715), CR_23 (chr16:85395429), FHL2 (chr2:105399282), PDE4C (chr19:18233131), CCDC102B (chr18:68722183), EDARADD (chr1:236394441) ve KCNAB3 (chr17:7929845) içeren multipleks panel kullanılarak çeşitli yaş gruplarının yer aldığı 50 kişi ile bir çalışma yapılmıştır. Metilasyon belirteçlerinin analizinde bisülfit dönüşümü ve adli genetik laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan SNaPshot yöntemi ile kullanıldı. Bu yöntem rutin adli genetik laboratuvarlarında bulunan ve ek bir maliyete ihtiyaç duymadan PCR ve

kapiler elektroforez kullanılarak uygulanabilmektedir. Ayrıca az miktarda DNA kullanılarak multipleks kapasitesinin yüksek olması, tek baz çözünürlüğünde, hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesinden dolayı adli analizlerde kullanılmaktadır. Ancak C ve T piklerinin G ve A piklerine göre benzer floresans yoğunluğu göstermesi ve sinyal yüksekliklerinin her zaman dengede olması sebebiyle C/T (siyah/kırmızı) nükleotit kombinasyonları, G/A (mavi/yeşil) nükleotit kombinasyonlarına göre daha çok tercih edilmelidir (50).

Çalışmanın ilk basamağında 50 kişiye (23 kadın, 27 erkek) ait kan örneğinden DNA izolasyonu yapılarak DNA miktar tayini yapıldı. Miktar tayini sonucunda örneklerden en çok 89 ng/µL ve en az 11,3 ng/µL konsantrasyonda DNA tespit edildi (Tablo XIV). İkinci basamak olarak MethylEdge^{TM} Bisulfite Conversion System kitinin çalışma protokolünde önerilen miktar olarak 5 ng/µL'ye seyreltilmiş örneklere bisülfit dönüşümü uygulandı. Daha sonra 9 CpG noktasına ait primer karışımı kullanılarak (Tablo IV ve Tablo V) PCR yapıldı. Saflaştırmanın ardından kontrol amaçlı olarak agaroz jel elektroforezi yapıldı. SNaPshot reaksiyonu Tablo IX ve Tablo X'da belirtilen bileşen ve PCR koşullarında oluşturuldu. SNaPshot ürünleri SAP enzimi ile saflaştırılması yapıldı. PCR ürünlerinin analizi için ABI PRISM® 310 ve ABI PRISM® 3130*xl* cihazında elektroforez yapıldı ve GeneMapper v3.2 programında genotipler belirlendi. Microsoft Excel (Microsoft 365 ProPlus) programı ile metilasyon değerleri hesaplandı (Tablo XV). Her bir lokusa ait metilasyon değerleri ve kronolojik yaş RStudio programı ile korelasyon değerleri hesaplandı.

ELOVL2 geni (ELOVL yağ asidi elongaz 2-ELOVL2) 6.kromozom üzerinde bulunur. ELOVL gen ailesinin bir üyesi olup yağ asitlerinin uzamasından sorumlu olan insan lipit metabolizmasında rol oynayan enzim ailesine aittir. Özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin uzamasında görevli olan endoplazmik retikulumun transmembran enzimini kodlar. Yaş tahmini modellerinde bu gene ait cg16867657(rs: 0.9522), cg21572722 (rs: 0.9121) ve cg24724428 (rs: 0.8857) noktalarının en kullanışlı belirteçler olarak

tanımlanmıştır (8,88). Çalışmamızda ELOVL2_CpG_1 (cg21572722) lokusunun korelasyon değeri 0,840 tespit edilmiş olup kronolojik yaş ile çok yüksek seviyede ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Yaşlanmayla beraber pozitif yönde korelasyon göstererek hipermetilasyon profili gözlemlenmiştir (Şekil 18). Garagnani ve ark. (2012) ELOVL2 geninin promotöründe bulunan CpG noktalarındaki metilasyon seviyelerinin yaş ile güçlü korelasyon gösterdiğini ve metilasyon seviyelerinin yaşa bağlı olarak önemli derecede değişim gösterdiğini ortaya koymuştur (101). Zbieć-Piekarska ve ark. (2014) pirodizileme ile yaptıkları analizde ELOVL2 (cg21572722) lokusu için 0,828 korelasyon değeri tespit etmiştir (87). Freire-Aradas ve ark. (2016) EpiTYPER sistemi ile yaptıkları çalışmada ELOVL2 (cg21572722) CpG noktasına ait korelasyon değerini 0,939 olarak belirledi (8). Cho ve ark. (2017) ise Kore popülasyonunda 0,860 korelasyon değeri ile cg21572722 noktasını tespit etmiştir (49).

ASPA geni (Aspartosilaz), 17. kromozom üzerinde bulunur ve peptitlerin katabolizmasında rol oynar. N-asetil-L-aspartik asitin aspartat ve asetata dönüşümünü katalizleyen enzimi kodlar. Gende tespit edilen 10 CpG noktasından cg02228185 (rs:-0,7658) noktası yaş tahmini için kullanılmaktadır (41). Çalışmamızda cg02228185 CpG noktası için -0,766 korelasyon değeri ile kronolojik yaş ile negatif yönde yüksek korelasyon değeri saptanarak yaşlanmaya bağlı hipometilasyon profili gösterdiği tespit edildi (Şekil 19). Freire-Aradas ve ark. (2016) cg02228185 CpG noktası için yetişkinlerle (19-101 yaş) yaptıkları çalışmada -0,775 korelasyon değeri tespit etmelerine karşın 2018'de çocuk ve gençlerle (0-18 yaş) yaptıkları çalışmada -0,503 korelasyon değeri saptanmıştır (8,81). Buna göre ASPA geninin büyüme çağını tamamlamış olan yetişkinlerde (19-101 yaş) daha fazla bilgi verici olduğu söylenebilir.

PDE4C (fosfodiesteraz 4C) geni 19.kromozomun üzerinde yer alır ve cAMP'nin hücresel konsantrasyonunun düzenlenmesinde görevli olan proteini kodlar. Gen üzerinde

birden fazla CpG noktası tespit edilmiş olmasına rağmen yaş ile ilişkili en yüksek korelasyonu cg17861230 (rs: 0,7084) noktasının olduğu tespit edilmiştir (50). Çalışmamızda 0,848 korelasyon değeriyle PDE4C_CpG_5 lokusunun kronolojik yaş ile çok yüksek korelasyon göstermiştir. cg17861230 CpG noktası pozitif yönde bir korelasyon göstererek yaşlanmaya bağlı olarak hipermetilasyon profili gösterdiği ortaya konmuştur (Şekil 20). Weidner ve ark. (2014) bisülfit pirodizileme yöntemini kullanarak kan örnekleri ile yaptıkları analizde DNA metilasyonu ile yaş tahmininde bilgi verici bir belirteç olduğunu rapor etmiştir (85). Xu ve ark. (2015) 8 çift MZ ikiz ve 50 sağlıklı gönüllüden aldıkları kan örnekleri ile çalışma yaparak PDE4C lokusunun yaş tahmini modeli için korelasyon gösterdiğini tespit etmiştir (2). Eipel ve ark. (2016) kan ve ağız içi epitel örneklerini yaş tahmini modelleri oluşturarak karşılaştırmış ve PDE4C (cg17861230) CpG noktasının hem kan hem de ağız içi epitel örneklerinde metilasyon seviyelerinin oldukça benzer olduğunu ortaya koymuştur (86).

FHL2 (four-and-a-half-LIM domains 2), 2. kromozom üzerinde bulunur ve LIM domain proteinini kodlar. LIM domainleri hücre çoğalmasını, apoptozu ve gen ekspresyonunu düzenleyen bölgelerdir. FHL2 proteininin hücre dışı zarların birleştirilmesinde görevli olduğu düşünülmektedir. Bu gen üzerinde 34 CpG noktası tespit edilmiş ve bunlardan cg06639320 (rs: 0.9362), cg22454769 (rs: 0.9339) ve cg24079702 (rs: 0.8999) bölgelerinin yaş ile yüksek korelasyonda olduğu bildirilmiştir (50,88). Çalışmamızda cg06639320 CpG noktasının analizi sonucu 0,858 değeri ile kronolojik yaşla çok yüksek korelasyon göstermiştir (Şekil 21). Park ve ark. (2016) bisülfit pirodizileme yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada cg06639320 noktasına ait korelasyon değerini 0,752 olarak tespit etmişlerdir (60). Jung ve ark. (2019) SNaPshot yöntemi ile kan, tükürük ve ağız içi epitel örneklerinden yaş tahmini modelinde FHL2 lokusu (cg06639320) için kanda 0,893 korelasyon değeri tespit etmişlerdir (91).

CCDC102B (coiled-coil domain containing protein 102B) lokusu da yaş ile yüksek korelasyon seviyesi gösterdiği ortaya konmuştur (8,60,102). Çalışmamızda CCDC102B lokusu için -0,862 korelasyon değeri tespit edilerek kronolojik yaş ile negatif olarak çok yüksek ilişkide olduğu saptanmıştır (Şekil 22). Freire-Aradas ve ark. (2016) yaptıkları analiz sonucunda CCDC102B lokusunun kronolojik yaş arasındaki korelasyon değerini -0,899 olarak tespit etmişlerdir (8). Park ve ark. (2016) pirodizileme yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada CCDC102B lokusuna ait korelasyon değerini -0,723 olarak gözlemlemiş ve yaş ile güçlü bir korelasyon gösterdiğini rapor etmişlerdir (60). Freire-Aradas ve ark. (2018) 18 yaş altı çocuk ve gençlerle yaptıkları çalışmada CCDC102B lokusunun gençlerde en yüksek korelasyon (−0,775) gösteren belirteç olduğunu tespit ettiler. Daunay ve ark. (2019) pirodizileme yöntemiyle CCDC102B genine ait 2 CpG noktasını inceleyerek cg19283806 noktası için -0,672 korelasyon değeri gözlemlediler (103).

C1orf132 (chromosome 1 open reading frame, MIR29B2CHG) geni 1.kromozomda bulunur. İnsan yaşlanması üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (88). Çalışmamızda C1orf132 lokusu için -0,858 korelasyon değeri tespit edilerek kronolojik yaş ile negatif olarak çok yüksek ilişkide olduğu ve yaşlanmayla beraber hipometilasyon profili gösterdiği saptanmıştır (Şekil 23). Zbieć-Piekarska ve ark. (2015) oluşturdukları yaş tahmini modelinde C1orf132 lokusunun yaş ile korelasyon gösterdiği ve artan yaşla beraber bu lokusun kodladığı protein miktarının artmasıyla hipometilasyon profili gösterdiği ortaya konmuştur (88). Freire-Aradas ve ark. (2016) EpiTYPER yöntemi ile yaptıkları çalışmada -0,908 korelasyon değeri tespit ettiler (8). Spólnicka ve ark. (2018) sağlıklı kontrol grubu, Alzheimer hastaları ve Graves hastalarından oluşan araştırma gruplarında yaptıkları yaş tahmini çalışmasında C1orf132 lokusunun güçlü bir yaş tahmini belirteci olduğunu tespit ettiler (104). Jung ve ark. (2019) ise kan (-0,637), ağız içi sürüntü (-0,314) ve tükürük

(-0,699) örneklerinde SNaPshot yöntemi ile yaptıkları çalışmada C1orf132 lokusuna ait korelasyon değerlerini belirlemişlerdir (91).

CR_23 lokusu (cg07082267) RP11-680G10.1 lokusu yakınında bulunan ve 1000 Genom Projesi'nde henüz karakterize edilmemiş bir protein ürününe sahip olan bir noktadır (8). Çalışmamızda CR_23 lokusu için kronolojik yaş ile -0,694 korelasyon değeri tespit edildi. Yaşın ilerlemesiyle hipometilasyon profili gösterdiği gözlenlendi (Şekil 24). Freire-Aradas ve ark. (2016) EpiTYPER yöntemiyle yaptıkları çalışmada yetişkinlerde (19-101 yaş) CR_23 lokusu için-0,855 korelasyon değeri elde ettiler. 2018'de çocuk ve gençlerle (0-18 yaş) yaptıkları çalışmada ise -0,740 korelasyon değeri tespit etmişlerdir (8,81).

EDARADD lokusunda meydana gelen mutasyonların saç dökülmelerine, ter bezlerinin azalması ve diş kayıplarına neden olabildiği, yara iyileşme hızını ise azaltabildiği gözlemlenmiştir (105). Çalışmamızda EDARADD lokusu için kronolojik yaş ile -0,730 korelasyon değeri elde edildi. EDARADD lokusu artan yaş ile hipometilasyon profili göstermiştir (Şekil 25). Bocklandt ve ark. (2011) yaş tahmini için epigenetik belirteçlerin kullandıkları çalışmada EDARADD lokusunun MZ ikizlerde -0,81 erkeklerde -0,73 ve kadınlarda ise -0,75 korelasyon değeri elde etmişlerdir (105). Bekaert ve ark. (2015) kan ve diş örnekleri ile yaptıkları çalışmada EDARADD lokusunun yaş ile ilişkili olduğunu saptamışlardır (95). Freire-Aradas ve ark. (2018) çocuk ve gençlerle (0-18 yaş) yaptıkları çalışmada EDARADD lokusuna ait korelasyon değerini -0,713 olarak tespit ettiler (81).

KCNAB3 lokusu için çalışmamızda 0,370 korelasyon değeri tespit edildi ve yaş ile artan hipermetilasyon profili tespit edildi (Şekil 26). Freire-Aradas ve ark. (2018) 0-18 yaş arası gençlerle yaptıkları çalışmada 0,752 korelasyon değeri elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu nedenle özellikle çocukluk ve gençlik çağı bireylerin yaş tahmini için yüksek özgünlük

gösterdiği ortaya konmuştur (81). Çalışmamıza katılan gönüllülerin 22-78 yaş aralığında olması ve daha genç bireylerin bulunmaması nedeniyle zayıf ilişki tespit edilmiştir.

ELOVL2_CpG_1, ASPA_CpG_2, C1orf132_CpG_3, CR_23_CpG_7, FHL2_CpG_4, PDE4C_CpG_5 ve CCDC102B_CpG_6 lokuslarına ait metilasyon oranı değerlerinin The Snipper 2.5 programı ile hesaplanması sonucu gönüllülerin tahmini yaşları belirlendi. Lokuslara ait metilasyon değerlerinden yararlanılarak elde edilen tahmini yaşlar ±3,01 yıl MAE (ortalama mutlak hata) bulundu. Yaş tahmini için en bilgi verici olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından kabul edilen ELOVL2, FHL2, ASPA, C1orf132, CCDC102B, PDE4C ve chr16:85395429 (8,49,86,87,91,106) DNA metilasyon belirteçleri kullanılarak yapılan tahmini yaş değerleri ile kronolojik yaş arasında (R^2: 0,933) yüksek eşleşme gözlemlenmiştir (Şekil 27).

Elde edilen tahmini yaş değerleri kronolojik yaş ile karşılaştırıldığında özellikle 20'li yaşlarda ortalama %5,41 oranında hata gözlemlenmesine karşın artan yaşla beraber 30'lu yaşlardan itibaren sapma miktarında artışlar (%7,8) gözlenmiştir. Ortalama hata oranı olarak %5,89 değeri tespit edilmiştir. Her bir lokusun korelasyon katsayıları incelenerek en yüksek korelasyon gösteren lokusların ELOVL2, C1orf132, FHL2, CCDC102B, PDE4C ve ASPA noktaları olduğu tespit edildi. Bu noktaların linear regresyon grafiklerinde ise (Şekil 18-23) metilasyon oranları ve kronolojik yaş arasında pozitif veya negatif yönelim gösteren doğrusal bir ilişki olduğu saptandı. EDARADD ve CR_23 noktaları ise yüksek korelasyon göstermesine karşın KCNAB3 lokusunda kronolojik yaşla zayıf ilişki gözlenmiştir (Tablo XVI). EDARADD ve CR_23 lokuslarının lineer regresyon grafikleri (Şekil 24 ve 25) incelendiğinde ise bazı sapmalar görülmesine karşın doğrusal bir ilişki olduğu ancak KCNAB3 lokusunda anlamlı bir doğrusallık tespit edilemedi (Şekil 26).

Sonuç olarak yaşlanmayla ilişkili olan 9 CpG noktasının (ELOVL2_CpG_1, FHL2_CpG_4, KCNAB3_CpG_9, PDE4C_CpG_5, ASPA_CpG_2, EDARADD_CpG_8, C1orf132_CpG_3, CR_23_CpG_7 ve CCDC102B_CpG_6) minidizileme yöntemine dayalı olan SNaPshot kullanılarak kronolojik yaş ile korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Yaş tahmininde epigenetik belirteçlerin kullanımı yararlı ve bilgi verici olduğu tespit edilmiştir. Bu yöntemin şüphelilerin yaş aralığının belirlenmesinde geleneksel yaklaşımların dezavantajlarına karşın daha pratik ve daha az hata oranıyla sonuç alınabilmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız DNA metilasyon belirteçlerinin tüm yaşları kapsayacak şekilde daha geniş yaş aralığında ve daha fazla kişi ile çalışılması gerekir. Olay yerinden sıklıkla elde edilen semen, tükürük gibi çeşitli doku ve sıvılar için farklı metilasyon profilleri bulunduğundan (82) diğer vücut sıvılarının da çalışılması gerekir. Bu çalışma, ülkemizde yaş tahmininde epigenetik belirteçlerin kullanıldığı ilk çalışma olup yeni çalışmalarla gönüllü sayısının arttırılarak desteklenmesi ve gelecekte, adli genetik laboratuvarlarında rutin olarak uygulanabileceği düşünülmektedir.

6. Kaynaklar

1. Jeffreys AJ. Genetic fingerprinting. Nat Med. 2005 Oct;11(10):1035–9.

2. Xu C, Qu H, Wang G, Xie B, Shi Y, Yang Y, et al. A novel strategy for forensic age prediction by DNA methylation and support vector regression model. Sci Rep. 2015 Dec 4;5(1):17788.

3. Kader F, Ghai M. DNA methylation and application in forensic sciences. Forensic Sci Int. 2015;249:255–65.

4. Vidaki A, Daniel B, Court DS. Forensic DNA methylation profiling - Potential opportunities and challenges. Forensic Sci Int Genet. 2013;7(5):499–507.

5. Vidaki A, Kayser M. From forensic epigenetics to forensic epigenomics: Broadening DNA investigative intelligence. Genome Biol. 2017;18(1):1–13.

6. Vidaki A, Kayser M. Recent progress, methods and perspectives in forensic epigenetics. Forensic Sci Int Genet. 2018 Nov 1;37(July):180–95.

7. Unnikrishnan A, Freeman WM, Jackson J, Wren JD, Porter H, Richardson A. The role of DNA methylation in epigenetics of aging. Pharmacol Ther. 2019;195(June 2019):172–85.

8. Freire-Aradas A, Phillips C, Mosquera-Miguel A, Girón-Santamaría L, Gómez-Tato A, Casares de Cal M, et al. Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system. Forensic Sci Int Genet. 2016 Sep;24:65–74.

9. Presečki Ž, Brkić H, Primorac D, Drmić I. Methods of Preparing the Tooth for DNA Isolation. Acta Stomatol Croat. 2000;34(1):21–4.

10. Klug A. Rosalind Franklin and the Discovery of the Structure of DNA. Nature. 1968 Aug 1;219(5156):808–10.

11. Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature. 1953;171(4356):737–8.

12. John M. Butler. Fundamentals of Forensic DNA Typing. Vol. 84. Elsevier; 2010. 452 p.

13. Durmaz AA, Karaca E, Demkow U, Toruner G, Schoumans J, Cogulu O. Evolution of Genetic Techniques: Past, Present, and Beyond. Biomed Res Int. 2015;2015:1–7.

14. Henry E. Classification and uses of finger prints. HM Station Off. 1905;

15. Hautzinger Z. The present and the future of forensic identification. Jurisprudencija. 2005;66(58):99–105.

16. Li C. Forensic genetics. Forensic Sci Res. 2018 Apr 3;3(2):103–4.

17. Li R. Forensic Biology, Second Edition. Forensic Biology, Second Edition. CRC Press; 2015. 1–534 p.

18. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA ‘fingerprints.’ Nature. 1985 Dec 1;318(6046):577–9.

19. Dumache R, Enache A. Molecular Genetics and its Applications in Forensic Sciences. In: Forensic Analysis- From Death to Justice. InTech; 2016.

20. Carracedo A. Forensic Genetics: History. In: Encyclopedia of Forensic Sciences: Second Edition. Elsevier Inc.; 2013. p. 206–10.

21. Roewer L. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. Investig Genet.

2013;4(1):22.

22. Mcdonald J, Lehman DC. Focus: Forensic Science-Forensic DNA Analysis. Vol. 25, Clinical Laboratory Science. 2012.

23. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986 Jan 1;51(1):263–73.

24. Bulbul O, Filoglu G. Development of a SNP panel for predicting biogeographical ancestry and phenotype using massively parallel sequencing. Electrophoresis. 2018 Nov;39(21):2743–51.

25. Freire-Aradas A, Phillips C, Huidobro VL, Carracedo Á, Aradas AF, Phillips C, et al. Phenotypic markers for forensic purposes. Forensic Science and Humanitarian Action. Wiley; 2020. 457–472 p.

26. Lieb JD, Beck S, Bulyk ML, Farnham P, Hattori N, Henikoff S, et al. Applying whole-genome studies of epigenetic regulation to study human disease. Cytogenet Genome Res. 2006;114(1):1–15.

27. Al Aboud NM, Jialal I. Genetics, Epigenetic Mechanism [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2018 [cited 2020 Mar 28]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30422591

28. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res. 2011 Mar 15;21(3):381–95.

29. Epigenetics: Novus Biologicals [Internet]. [cited 2020 Mar 28]. Available from: https://www.novusbio.com/research-areas/epigenetics

30. Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006 Jun;7(6):437–47.

31. Carlberg C, Molnár F. Human Epigenomics. 2018;(February):1–120.

32. Arrigoni A, Ranzani V, Rossetti G, Panzeri I, Abrignani S, Bonnal RJP, et al. Analysis RNA-seq and Noncoding RNA. Lanzuolo C, Bodega B, editors. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York; 2016. 223–241 p. (Methods in Molecular Biology; vol. 1480).

33. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J Exp Med. 1944 Feb 1;79(2):137–58.

34. Moore LD, Le T, Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. Neuropsychopharmacology. 2013 Jan 11;38(1):23–38.

35. McCarty M, Avery OT. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pmeumococcal typeseffect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance. J Exp Med. 1946;83(2):97.

36. İzmirli M, Tufan T, Alptekin D. DNA Methylation. Arşiv Kaynak Tarama Derg. 2014 Oct 30;21(4):274–82.

37. Costello JF. Methylation matters. J Med Genet. 2001 May 1;38(5):285–303.

38. Zhu J, He F, Hu S, Yu J. On the nature of human housekeeping genes. Trends Genet. 2008 Oct;24(10):481–4.

39. Sayin DB. Metilasyon ve kanser. Turkiye Klin J Med Sci. 2008;28(4):513–24.

40. Singal R, Ginder GD. DNA Methylation. Blood. 1999;93(12):4059–70.

41. Pfeifer G. Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer. Int J Mol Sci. 2018 Apr 12;19(4):1166.

42. Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. Biochim Biophys Acta - Rev Cancer. 2007;1775(1):138–62.

43. Cheuk IWY, Shin VY, Kwong A. Detection of Methylated Circulating DNA as Noninvasive Biomarkers for Breast Cancer Diagnosis. J Breast Cancer. 2017;20(1):12.

44. Cho M, Suh Y. Genetics of Human Aging. In: Handbook of the Biology of Aging. Elsevier; 2016. p. 327–58.

45. Cankurtaran M. Yaşlılık, yaşlanma mekanizmaları, antiaging ve yaşam tarzı değişiklikleri. 7 Ulus İç Hast Kongresi. 2015;1–5.

46. Öksüzokyar MM, Eryiğit SÇ, Düzen KÖ, Mergen BE, Sökmen ÜN, Öğüt S. Biyolojik Yaşlanma Nedenleri ve Etkileri. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü Derg. 2016;4(1):34–41.

47. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. Cell. 2013 Jun;153(6):1194–217.

48. Karasu Ç. Biyolojik Yaşlanma Teorileri: Oksidatif Stresin Rolü. Turkiye Klin J Med Sci. 2008;28(6):1–11.

49. Cho S, Jung S-E, Hong SR, Lee EH, Lee JH, Lee SD, et al. Independent validation of DNA-based approaches for age prediction in blood. Forensic Sci Int Genet. 2017 Jul;29(2):250–6.

50. Freire-Aradas A, Phillips CP, Lareu M V. Forensic individual age estimation with DNA: From initial approaches to methylation tests. Forensic Sci Rev. 2017 Jul;29(2):121–44.

51. Marano LA, Fridman C. DNA phenotyping: current application in forensic science. Res Reports Forensic Med Sci. 2019 Feb;Volume 9:1–8.

52. Lee HY, Lee SD, Shin K-J. Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads. BMB Rep. 2016 Jul 31;49(7):359–69.

53. Weber-Lehmann J, Schilling E, Gradl G, Richter DC, Wiehler J, Rolf B. 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 Mar;9(1):42–6.

54. Stewart L, Evans N, Bexon KJ, van der Meer DJ, Williams GA. Differentiating between monozygotic twins through DNA methylation-specific high-resolution melt curve analysis. Anal Biochem. 2015;476:36–9.

55. Sahin K, Yilmaz S, Temel A, Gozukirmizi N. DNA methylation analyses of monozygotic twins. Curr Opin Biotechnol [Internet]. 2011 Sep [cited 2019 Dec 11];22:S105. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166911004216

56. Li C, Zhang S, Que T, Li L, Zhao S. Identical but not the same: The value of DNA methylation profiling in forensic discrimination within monozygotic twins. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser. 2011 Dec;3(1):e337–8.

57. Li C, Zhao S, Zhang N, Zhang S, Hou Y. Differences of DNA methylation profiles between monozygotic twins’ blood samples. Mol Biol Rep. 2013 Sep 7;40(9):5275–

80.

58. Xu J, Fu G, Yan L, Craig JM, Zhang X, Fu L, et al. LINE-1 DNA methylation: A potential forensic marker for discriminating monozygotic twins. Forensic Sci Int Genet. 2015 Nov 27;19:136–45.

59. Vidaki A, Díez López C, Carnero-Montoro E, Ralf A, Ward K, Spector T, et al. Epigenetic discrimination of identical twins from blood under the forensic scenario. Forensic Sci Int Genet. 2017 Nov;31:67–80.

60. Park J-L, Kim JH, Seo E, Bae DH, Kim S-Y, Lee H-C, et al. Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use. Forensic Sci Int Genet. 2016 Jul;23:64–70.

61. Zubakov D, Boersma AWM, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EAC, Kayser M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. Int J Legal Med. 2010 May 10;124(3):217–26.

62. An JH, Choi A, Shin K-J, Yang WI, Lee HY. DNA methylation-specific multiplex assays for body fluid identification. Int J Legal Med. 2013 Jan 1;127(1):35–43.

63. Frumkin D, Wasserstrom A, Budowle B, Davidson A. DNA methylation-based forensic tissue identification. Forensic Sci Int Genet. 2011 Nov;5(5):517–24.

64. Madi T, Balamurugan K, Bombardi R, Duncan G, Mccord B. The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfite modification and pyrosequencing. Electrophoresis. 2012;33(12):1736–45.

65. Yıldırım A, Çetin İ, Özer E, Gümüş B. Adli Tıp Anabilim Dalına 2006-2010 Yılları

Arasında Yaş Tayini İçin Başvuran Olguların Değerlendirilmesi. Çağdaş Tıp Derg. 2011;1(2):56–61.

66. Isir Baransel A. Adli Hekimlikte Yaş Tayini. Klin Gelişim Dergisi(Adli Tıp Özel Sayısı). 2009;22:114–21.

67. Márquez-Grant N. An overview of age estimation in forensic anthropology: perspectives and practical considerations. Ann Hum Biol. 2015 Jul 4;42(4):308–22.

68. Çeker D. Adli antropolojide yaş tahmini metodlari. Ankara Üniversitesi, Antropoloji Derg. 2018;35(Haziran):35–54.

69. Priya E. Methods of Skeletal Age Estimation used by Forensic Anthropologists in Adults: A Review. Foresic Res Criminol Int J. 2017 Feb 20;4(2):41–51.

70. Meissner C, Ritz-Timme S. Molecular pathology and age estimation. Forensic Sci Int. 2010 Dec;203(1–3):34–43.

71. Meissner C, Von Wurmb N, Schimansky B, Oehmichen M. Estimation of age at death based on quantitation of the 4977-bp deletion of human mitochondrial DNA in skeletal muscle. Forensic Sci Int. 1999;105(2):115–24.

72. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. Physiol Rev. 2008;88(2):557–79.

73. Gülüm N. Biyolojik Örneklerin Telomer Kısalmasına Bağlı Yaş Tayini. İstanbul Üniversitesi; 2013.

74. Ari N. Yaşlanmada Crosslinkage Teorisi: İlerlemiş Glikasyon Son Ürünlerinin (AGEs) Rolü. Turkiye Klin J Med Sci. 2008;28:12–5.

75. Pilin A, Pudil F, Bencko V. Changes in colour of different human tissues as a marker of age. Int J Legal Med. 2007;121(2):158–62.

76. Ohtani S, Yamamoto T. Age Estimation by Amino Acid Racemization in Human Teeth. J Forensic Sci. 2010 Nov;55(6):1630–3.

77. Ou X, Zhao H, Sun H, Yang Z, Xie B, Shi Y, et al. Detection and quantification of the age-related sjTREC decline in human peripheral blood. Int J Legal Med. 2011 Jul 25;125(4):603–8.

78. Ou X, Gao J, Wang H, Wang H, Lu H, Sun H. Predicting Human Age with Bloodstains by sjTREC Quantification. Lafrenie R, editor. PLoS One. 2012 Aug 3;7(8):e42412.

79. Zubakov D, Liu F, Van Zelm MC, Vermeulen J, Oostra BA, Van Duijn CM, et al. Estimating human age from T-cell DNA rearrangements. Curr Biol. 2010;20(22):R970–1.

80. Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. DNA methylation and healthy human aging. Aging Cell. 2015;14(6):924–32.

81. Freire-Aradas A, Phillips C, Girón-Santamaría L, Mosquera-Miguel A, Gómez-Tato A, Casares de Cal MÁ, et al. Tracking age-correlated DNA methylation markers in the young. Forensic Sci Int Genet. 2018 Sep;36(April):50–9.

82. Jung SE, Shin KJ, Lee HY. DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids. BMB Rep. 2017;50(11):546–53.

83. Jung M, Pfeifer GP. Aging and DNA methylation. BMC Biol. 2015;13(1):1–8.

84. Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. J Biol Chem. 1987 Jul 25;262(21):9948–51.

85. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, et al. Aging of blood can

be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. Genome Biol. 2014;15(2).

86. Eipel M, Mayer F, Arent T, Ferreira MRP, Birkhofer C, Gerstenmaier U, et al. Epigenetic age predictions based on buccal swabs are more precise in combination with cell type-specific DNA methylation signatures. Aging (Albany NY). 2016;8(5):1034–48.

87. Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, Makowska Z, Spas A, Parys-Proszek A, et al. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. Forensic Sci Int Genet. 2014;14:161–7.

88. Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, Parys-Proszek A, Makowska Z, Pałeczka A, et al. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. Forensic Sci Int Genet. 2015;17:173–9.

89. Vidaki A, Ballard D, Aliferi A, Miller TH, Barron LP, Syndercombe Court D. DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing. Forensic Sci Int Genet. 2017;28:225–36.

90. Hong SR, Jung SE, Lee EH, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. DNA methylation-based age prediction from saliva: High age predictability by combination of 7 CpG markers. Forensic Sci Int Genet. 2017;29:118–25.

91. Jung S-EE, Lim SM, Hong SR, Lee EH, Shin K-JJ, Lee HY. DNA methylation of the ELOVL2, FHL2, KLF14, C1orf132/MIR29B2C, and TRIM59 genes for age prediction from blood, saliva, and buccal swab samples. Forensic Sci Int Genet. 2019 Jan;38(September 2018):1–8.

92. Xie B, Wang S, Xie M, Luo H, Zhang K, Zhao H, et al. Exploring of new age-related

CpGs using Methbank database and the pyrosequencing. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser. 2019;7(1):266–7.

93. Harrison A, Parle-McDermott A. DNA Methylation: A Timeline of Methods and Applications. Front Genet. 2011;2(OCT).

94. Rana AK. Crime investigation through DNA methylation analysis: methods and applications in forensics. Egypt J Forensic Sci. 2018 Dec 24;8(1):7.

95. Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, Van de Voorde W, Decorte R. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. Epigenetics. 2015;10(10):922–30.

96. Patterson K, Molloy L, Qu W, Clark S. DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. J Vis Exp [Internet]. 2011 Oct 21;1(56). Available from: http://www.jove.com/details.php?id=3170

97. Kaminsky Z, Petronis A. Methylation SNaPshot: A Method for the Quantification of Site-Specific DNA Methylation Levels. In Humana Press; 2009. p. 241–55.

98. Kristensen LS, Hansen LL. PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics, Prognostics, and Response to Treatment. Clin Chem. 2009;55(8):1471–83.

99. Freire-Aradas A. A comparison of DNA methylation technologies and performance of age prediction models. In: ISFG, editor. The 28th Congress of the International Society for Forensic Genetics. Prague; 2019. p. 53.

100. Phillips CP, Carracedo A. Forensic SNP genotyping with SNaPshot: Technical considerations for the development and optimization of multiplexed SNP assays.

Forensic Sci Rev. 2017;29(May):58–76.

101. Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Gori D, Giuliani C, Mari D, et al. Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. Aging Cell. 2012;11(6):1132–4.

102. Fleckhaus J, Schneider PM. Novel multiplex strategy for DNA methylation-based age prediction from small amounts of DNA via Pyrosequencing. Forensic Sci Int Genet. 2020 Jan;44(October 2019):102189.

103. Daunay A, Baudrin LG, Deleuze J-F, How-Kit A. Evaluation of six blood-based age prediction models using DNA methylation analysis by pyrosequencing. Sci Rep. 2019;9(1):8862.

104. Spólnicka M, Pośpiech E, Pepłońska B, Zbieć-Piekarska R, Makowska Ż, Pięta A, et al. DNA methylation in ELOVL2 and C1orf132 correctly predicted chronological age of individuals from three disease groups. Int J Legal Med. 2018;132(1):1–11.

105. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, et al. Epigenetic predictor of age. PLoS One. 2011;6(6):e14821.

106. Gentile F, Castoldi E, Serventi P, Colloca D, Ciccotelli R, Marino A. Early evaluation of five age-correlated DNA methylation markers in an Italian population sample. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser. 2019;7(1):424–6.

EKLER

EK-1 Etik Kurul Onay Formu

İÜC Tarih ve Sayı: 03/10/2019-151142

* B E A 9 E U L 1 4 *

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı :59491012-604.01.02-
Konu :Dr.Öğretim Üyesi Gönül FİLOĞLU'nun etik kurul kararı A-43

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi :20.09.2019 tarih, 86669574-604.01.04-143185 sayılı yazı

Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı **Dr.Öğretim Üyesi Gönül FİLOĞLU'nun** yürütücülüğünde **Mol.Bio.Sümeyye Zülal ŞİMŞEK** ve **Dr.Öğretim Üyesi Özlem BÜLBÜL'ün** yardımcılıklarında **"Yaş Tayininde DNA Metilasyon Belirteçlerinin Kullanımı ve Optimizasyonu"** başlıklı çalışma hakkında ilgi yazınız ve ekleri **01 Ekim 2019** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla; etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

e-İmzalı
Prof. Dr. Muhlis Cem AR
Dekan a.
Dekan Yardımcısı

NOT:Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun ve Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Desteği onay belgesinin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

EK-2 Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

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

1. "Yaş Tayininde DNA Metilasyon Belirteçlerinin Kullanımı ve Optimizasyonu" adlı bu çalışma bir araştırma olup, akademik amaçla yapılmaktadır.

2. Araştırmanın amacı:

Soruşturma aşamasında şüphelinin olmadığı durumlarda faile ait olduğu düşünülen herhangi bir biyolojik delilden (kan lekesi, semen, tükürük gibi) kişiye dair fikir verebilecek herhangi bir bilginin DNA yoluyla bulunması soruşturmanın aydınlatılması için oldukça önemlidir. Böylece Polis, Jandarma ve Savcılık birimlerince şüphelinin yaş aralığı belirlenerek şüpheliye daha kolay ulaşılabilecektir. Söz konusu olguların çözümünü sağlayacak gen bölgelerinde yaş ile ilişkisi olduğu tespit edilen metilasyon belirteçleri kişilerin yaş aralığının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, çeşitli yaş gruplarından oluşan gönüllülerden alınan kan ve tükürük örneklerinde genin CpG bölgelerinde bulunan metillenmiş sitozinler analiz edilerek kişilerin gerçek yaşlarıyla karşılaştırılması ve kişilerin gerçek yaş aralıklarının tahmin edilmesi amaçlanmaktadır.

3. Araştırmada uygulanacak tedaviler:

Araştırmanın deneysel kısmında, gönüllülerden alınacak kan ve ağız içi sürüntü örneklerinin çalışılması planlanmaktadır. Gönüllülerden kan ve ağız içi sürüntü örneği almak dışında hiçbir müdahale yapılmayacak veya tedavide bulunulmayacaktır.

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

Gönüllülere herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.

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

Araştırma sırasında gönüllülere invaziv yöntemler uygulanmayacaktır. Araştırmada, çalışmaya rıza gösteren yaklaşık kişilerden hemşire tarafından EDTA'lı tüplere 2 ml periferik kan örneği ve ağız içi sürüntü örneği alınacaktır.

6. Gönüllünün sorumlulukları:

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

7. Araştırmanın deneysel kısımları:

Bu çalışmada, çalışmaya rıza gösteren gönüllülerden alınan kan ve ağız içi sürüntü örnekleri kullanılacaktır. Araştırmanın laboratuvar aşamasında ise DNA analizi yöntemiyle, biyolojik örneklerden DNA profilleri elde edilecektir.

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

Gönüllüden kan ve ağız içi sürüntü örneği alınacaktır. Kan ve ağız içi sürüntü örneği alınmasının hiçbir riski yoktur.

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

Gönüllü açısından hedeflenen bölgeler ile ilgili herhangi bir klinik yarar yoktur.

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

Gönüllüye herhangi bir girişim ya da tedavide bulunulmayacaktır.

11. İlgi mevzuat gereğince gerekiyorsa, gönüllüye verilecek tazminat veya sağlanacak tedaviler:
Gönüllülere yapılacak işlem ağız içi sürüntü örneği ve kan örnekleri almak olup bu işlem sırasında katılımcılarda doğabilecek hukuki ve mali riskleri proje yürütücüsü olarak tamamen üstlendiğimi bildiririm.
12. Varsa, gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler hakkındaki bilgiler:
Gönüllüler için herhangi bir ulaşım, yemek veya başka bir masraf ödenmeyecektir.
13. Gönüllünün araştırmaya katılımının isteğe bağlı olduğu ve gönüllünün istediği zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkını kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebileceği veya araştırmadan çekilebileceği:
Gönüllünün araştırmaya katılımı isteğe bağlı olup, istediği zaman herhangi bir yaptırıma maruz kalmaksızın araştırmadan çekilebilecektir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcı araştırma dışı bırakılabilir.
14. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimlerinin bulunabileceği, ancak bu bilgilerin gizli tutulacağı, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla gönüllü veya yasal temsilcisinin söz konusu erişime izin vermiş olacağı:
İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Bakanlık ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimleri olacaktır. Ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.
15. İlgili mevzuat gereğince gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanamayacağı; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliğinin gizli kalacağı:
İlgili mevzuat gereğince gönüllünün kimliği ile ilgili kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanamayacağı; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliği gizli kalacaktır.
16. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya yasal temsilcisinin zamanında bilgilendirileceği:
Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya yasal temsilcisinin zamanında bilgilendirileceğini taahhüt ederim.
17. Gönüllünün araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler ile bunlara günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları:
Gönüllünün araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir bilgi temin edebilmesi için proje yürütücüsü Dr. Öğr. Üyesi Gönül FİLOĞLU'na ait günün 24 saatinde ulaşabileceği e mail: gfoglu@istanbul.edu.tr 'dir.
18. Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:
Gönüllünün biyolojik örneğinden herhangi bir nedenle DNA elde edilememesi durumunda katılım sona erdirilir.
19. Gönüllünün araştırmaya devam etmesi için öngörülen süre:
Gönüllüden kan ve ağız içi sürüntü örneği alındıktan sonra hiçbir sorumluluğu olmayacaktır. Gönüllünün biyolojik örnekleri çalışma süresince (2 yıl) saklanacak olup, çalışma sonuçlanınca imha edilecektir.
20. Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı:

Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı, çalışmaya rıza gösteren yaklaşık 50 kişi olacaktır.

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

Gönüllülerden elde edilecek olan kan ve ağız içi sürüntü örneğinden DNA profili elde etmek amacıyla DNA analizi yapılacak ve yaş tayini yapılacaktır. Araştırmacı tarafından gönüllülerden tıbbi personel yönetiminde ve denetiminde gerekli örnekler alınacaktır. Çalışma, İ.Ü Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Genetik Ar-ge laboratuvarında yapılacaktır. Gönüllülerden alınacak biyolojik materyal araştırma konusu olan çalışmanın optimizasyonu için kullanılacaktır.

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

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

24. Gönüllünün adı / soyadı / imzası / tarih

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

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

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

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

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

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

*"**"Yaş Tayininde DNA Metilasyon Belirteçlerinin Kullanımı ve Optimizasyonu"**" adlı araştırma kapsamında alınan kan ve ağız içi sürüntünün (Gönüllü tarafından uygun olan şık işaretlenmelidir)*

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

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

☐ *Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum."*

Gönüllünün Adı: **Yetkin Araştırmacının Adı ve Soyadı**

Gönüllünün Soyadı:

Gönüllünün Doğum Tarihi: **Yetkin Araştırmacının İmzası:**

Sigara Kullanımı ☐ Alkol Kullanımı ☐

Gönüllünün İmzası:

Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Sümeyye Zülal ŞİMŞEK

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul / 19.09.1995

E-posta : sumeyye.zulal@gmail.com

Eğitim Bilgileri

2018-2020	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü (Tezli Yüksek Lisans Programı)
2013-2018	İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (Çift Anadal-Lisans Programı)
2013-2017	İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Lisans Programı)

Sunum & Poster

Ekim 2019	Testing the Waters-4th International Conference on Wastewater Analysis, Foshan, Çin, (Sunum) Illicit drug consumption of Istanbul from 14 WWTPs in the city
Ekim 2019	Testing the Waters-4th International Conference on Wastewater Analysis, Foshan, Çin, (Poster) Monitoring the life habits of Istanbul:Caffeine, nicotine and alcohol
Nisan 2019	16. Adli Bilimler Kongresi, İzmir, Türkiye (Sunum) Saç ve göz rengini belirleyen panel ile tiplendirme
Nisan 2019	16. Adli Bilimler Kongresi, İzmir, Türkiye (Poster) Adli epigenetik yaklaşımlar ve DNA metilasyonu