T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP ve ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Özlem Bülbül

SEMEN ÖRNEKLERİNDE DNA METİLASYONU İLE YAŞ TAHMİNİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOG SENA ER

İSTANBUL, 2022

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP ve ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Özlem Bülbül

SEMEN ÖRNEKLERİNDE DNA METİLASYONU İLE YAŞ TAHMİNİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOG SENA ER

İSTANBUL, 2022

Bu tez İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 35912

BEYAN

Yukarıda adı belirtilmiş olan tez çalışmamın planlanmasından yazımına kadar olan tüm aşamalarda etik davrandığımı beyan ederim.

ÖNSÖZ

Tezime başladığım günden itibaren bilgi birikimi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve her daim desteğini hissettiğim danışmanım ***Doç. Dr. Özlem Bülbül Ercan***; enerjisi, güler yüzü yüksek bilgi birikimi ile desteğini esirgemeyen hocam ***Doç. Dr. Gönül Filoğlu Tüfek*** ve istatiksel analiz hakkındaki tüm sorularımı sabırla cevaplayan değerli hocam ***Doç. Dr. Gökhan Ersoy***'a

Adli bilimler alanında uzmanlaşmamı tavsiye eden bana bu süreçte yardımcı olan değerli hocam ***Dr. Hızır Aslıyüksek'***e

İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsünde ders aldığım tüm hocalarıma ve tüm enstitü personeline,

Üroloji Kliniğinde materyal alımı konusunda yardımcı olan ve desteklerini esirgemeyen hocam ***Prof. Dr. Hamdi Özkara*** ve ***Biyolog Tayyar Demiryürek'***e,

Çalışmam süresince bana destek olan değerli arkadaşlarım ***Kadriye Can***, ***Agata Veronica Podolanczu***, ***Uz. Biyolog Melek Şenışık***, ***Zehra Abik***, ***Uz. Psikolog Hakkı Halil Babacan***, ***Laborant Hüsamettin Kılıç***, ***Uz. Biyolog Sümeyye Zülal Şimşek*** ve ***İbrahim Gün***'e çok teşekkür ederim.

Her daim yanımda hissettiğim, sabır ve sevgileri sonsuz olan; sahip olduğum her şeyin gerçek sahipleri ***annem Sema ER*** ve ***babam Hüseyin Er****'e sonsuz* teşekkür ederim.

Sena ER

İstanbul, Eylül 2022

İçindekiler

İçindekiler ii
Şekiller Dizini iv
Tablolar Dizini v
Kısaltmalar vi
Özet ve Anahtar Kelimeler 1
Summary 2
1. Giriş ve Amaç 3
2. Genel Bilgiler 5
2.1. Adli Bilimlerde Genetik Kimliklendirme 5
2.2. Adli Bilimlerde Yaş Tayini 8
2.2.1. Geleneksel yöntemler 8
2.2.2. Güncel yöntemler 9
2.3. Epigenetik 12
2.3.1. Epigenetik mekanizmalar 13
2.4. DNA Metilasyonunun Adli Bilimlerde Kullanımı 18
2.4.1. Alellerin parental orijinlerinin belirlenmesi 18
2.4.2. Vücut sıvılarının belirlenmesi 19
2.4.3. Monozigotik ikizlerin ayrımı 20
2.4.4. DNA metilasyonu ile yaş tayini 21
2.5. Adli Bilimlerde Semen Örneklerinin Önemi 23
2.5.1. Erkek üreme sistemi 23
2.5.2. Spermatogenez 27
2.5.3. Sperm yapısı 29
2.5.4. Adli bilimlerde semen tespit yöntemleri 29
3. Gereç ve Yöntem 33
3.1. Örneklerin Toplanması 35
3.2. DNA İzolasyonu 36
3.3. DNA Miktar Tayini 36
3.4. Bisülfit Dönüşümü 37
3.5. PCR 37
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi 39
3.7. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması 39

3.8. SNaPshot Reaksiyonu (Minidizileme) 39
3.9. İkinci PCR Ürünlerinin Saflaştırılması 40
3.10. Saflaştırılan SNaPshot Ürünlerinin ABI PRISM 310 İle Elektroforezi 41
3.11. Korelasyon Değerlerinin Hesaplanması ve CpG Noktalarına Ait Lineer Regresyon Grafiklerinin Çizimi 42
3.12. İstatistik Analizler 42
4. Bulgular 43
4.1. Semen Örneklerinin DNA İzolasyonu, DNA Miktar Tayini 43
4.2. Bisülfit Dönüşümü ve PCR Aşaması 46
4.3. Elektroforez Aşaması 46
4.4. Korelasyon Değerleri ve Lineer Regresyon Grafikleri 60
4.5. İstatistiksel Analiz 67
4.5.1.Aşamalı çok değişkenli doğrusal regresyon analizi 67
4.5.2. Tüm değişkenlerin dahil olduğu çok değişkenli lineer regresyon analizi 71
4.5.3. Farklı yaş gruplarında yaş tahmin başarısının değerlendirilmesi 76
5. Tartışma ve Sonuç 78
6. Kaynakça 84
7. Ekler 91
8. Özgeçmiş 98

Şekiller Dizini

Şekil 1.Histon asetilasyonu 14
Şekil 2. Kromatin yeniden düzenlenmesi 15
Şekil 3 (a) sitozin metilasyonu. (b) CpG adası içeren genlerin şematik gösterimi 17
Şekil 4. DNA metilasyon ve demetilasyonu sırasında oluşan bileşikler ve mekanizmada etkili enzimler 18
Şekil 5.Testis Anatomisi 26
Şekil 6.Spermatogenez. 29
Şekil 7. Sperm Morfolojisi 30
Şekil 8. Metilasyon oranı hesaplama denklemi 42
Şekil 9. PCR Sonucu elde edilen ürünlerin örnek bir jel görüntüsü. 46
Şekil 10. Seçilen CpG noktalarının optimizasyon aşamasındaki elektroforegram görüntüleri. 47
Şekil 11. S1, S3ve S5 bölgelerinin gözlemlenemediği elektroforegram. 49
Şekil 12.Tüm bölgelerin gözlendiği optimize bir elektroforegram örneği. 49
Şekil 13. PARP14 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 61
Şekil 14. C5orf25 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 62
Şekil 15. cg23488376 CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 62
Şekil 16. MXRA5 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 63
Şekil 17. PFKFB3 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 63
Şekil 18. DLL1 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 64
Şekil 19. NOX4 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 64
Şekil 20. cg12837463 CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 65
Şekil 21. TTC7B geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 65
Şekil 22. KCNA geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 66
Şekil 23. NKX2-1 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 66
Şekil 24. SYNE4 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği 67
Şekil 25. Aşamalı çok değişkenli lineer regresyon analizi gerçek yaş tahmin denklemi 68
Şekil 26. Aşamalı çok değişkenli doğrusal regresyonuna ait P-P plot grafiği 69
Şekil 27. Aşamalı çok değişkenli doğrusal regresyonuna ait standardize artık değer saçılım grafiği 70
Şekil 28. Tüm Değişkenlerin Dahil Olduğu çok değişkenli lineer regresyon analizi gerçek yaş tahmin denklemi 72
Şekil 29. Tüm değişkenlerin dahil edildiği çok değişkenli doğrusal regresyona ait P-P plot grafiği 73
Şekil 30. Tüm Değişkenlerin dahil edildiği çok değişkenli doğrusal regresyonuna ait standardize artık değer saçılım grafiği 74

Tablolar Dizini

Tablo I. Yaş tahmininde kullanılan hedef CpG noktaları, gen bölgeleri, kromozomal pozisyonları ve çalışmadaki kodları 37
Tablo II. PCR Bileşenleri 38
Tablo III. PCR Koşulları 38
Tablo IV. PCR Ürünleri Saflaştırma Bileşenleri 39
Tablo V. PCR Ürünü Saflaştırma Aşaması Termal Döngü Koşulları 39
Tablo VI. SNaPshot PCR Bileşenleri 40
Tablo VII. SNaPshot PCR Aşaması Termal Döngü Koşulları 40
Tablo VIII. SNaPshot PCR Ürünleri Saflaştırma Reaktifleri 40
Tablo IX. SNaPshot PCR Ürünleri Saflaştırma Koşulları 41
Tablo X. Elektroforez Reaktifleri 41
Tablo XI. GeneScan E5 modül parametreleri 41
Tablo XII. DNA Miktarları 43
Tablo XIII. CpG noktalarına ait elektroforegramda beklenen ve gözlenen değerler. 48
Tablo XIV. 115 kişiye ait metilasyon değerleri 50
Tablo XV. 12 CpG noktasına ait korelasyon değerleri 60
Tablo XVI. Aşamalı çok değişkenli doğrusal regresyon analizi 68
Tablo XVII. Aşamalı yöntemle elde edilmiş regresyon modeli için eşleştirilmiş örneklem test sonuçları 71
Tablo XVIII. Tüm Değişkenlerin Dahil Olduğu Çok Değişkenli Lineer Regresyon Modeli ... 72
Tablo XIX. TTC7B dahil edilmeden yapılan çoklu doğrusal bağlantı analizinin test değerleri. 75
Tablo XX. Tüm değişkenlerin dahil edildiği yöntemle oluşturulan regresyon modeli için eşleştirilmiş örneklem test sonuçları 75
Tablo XXI. Yaş Gruplarında Tahmin Farklılıkları 76

Kısaltmalar

AAR: Aspartik Asit Rasemizasyonu

CpG: Sitozini Takip eden Guanin (Cytosine-Phosphate-Guanine)

D: Cook’s Uzaklığı (Cook’s Distance)

DNA: Deoksiribonükleik Asit (Deoxyribonucleic Acid)

dsRNA: Çift Zincirli RNA (Double Strand RNA)

FBI: Federal Araştırma Bürosu (Federal Bureau of Investigation)

FSH: Folikül Uyarıcı Hormon (Follicle Stimulating Hormone)

InDels: İnsersiyon Delesyon (Insertion Deletion)

LH: Lüteinize Edici Hormon (Luteinizing Hormone)

MAD: Ortalama Mutlak Sapma (Mean Absolute Deviation)

MiRNA: Mikro RNA (Micro RNA)

MZ: Monozigotik

ncRNAs: Kodlanmayan RNA (Noncoding RNAs)

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

piRNA: Piwi etkileşimli RNA (Piwi İnteracting RNA)

PSA: Prostat Spesifik Antijen (Prostate Spesific Antigen)

RFLP: Rastgele Fragment Uzunluk Polimorfizmi (Randomly Fragment Lentgh Polimorphism)

RMSE: Hata kareler ortalamasının karekökü (Root Mean Square Error)

SAP: Semen Asit fosfataz (Seminal Acid phosphatase)

SAM: S-Adenozil Metiyonin

SNP: Tek Nükleotit Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)

STR: Kısa Ardışık Tekrarlar (Short Tandem Repeats)

tDMRs: Doku Spesifik Farklılaşmış Metilasyon Bölgeleri (Tissue Spesific Differentially Methylated Regions)

VNTR: Farklı sayıdaki ardışık tekrar dizinleri (Variable Number of Tandem Repeats)

Özet ve Anahtar Kelimeler

Yaş, şüpheli/failin dış görünüşüne ait fikir vereceğinden hem adli soruşturmalar hem de ceza hukukunda kişinin alacağı cezanın belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Geleneksel olarak diş ve kemik yapısı kompozisyonunun değerlendirilmesi sonucunda tahmini bir yaş tayini yapılmakla beraber bu materyallerin her suç olgusunda eldesi mümkün olamamaktadır. Son yıllarda yapılan metilasyon çalışmaları ile yüksek doğrulukta yaş tahmini yapılabileceği belirlenmiştir.

Bu çalışmada semen örneğinde metilasyon analizi ile yaş tayini yapılması amacıyla panel geliştirilmiştir. Yüksek korelasyon gösterdiği literatürde belirlenen 12 CpG lokusundaki metilasyon profillerinin analizi için 20-71 yaş aralığındaki 115 gönüllüden (80 model ve 35 test) alınan semen örneklerinde SNaPshot minidizileme yöntemi kullanılarak lokuslarda yaş artışına bağlı olarak meydana gelen değişim hesaplanmıştır. 12 CpG (PARP14(cg14750551), C5orf25(cg16256592), cg23488376, MXRA5(cg00881487), PFKFB3(cg18989491), DLL1(cg13494348), cg12837463, TTC7B(cg06304190), KCNA7(cg03564727), NKX2-1(cg18686206) ve SYNE4(cg18542098) lokusunda artan yaşla metilsyon miktarında azalma meydana gelirken NOX4(cg06979108) lokusunda artış belirlenmiş ve en yüksek korelasyon 0,8002 değeri ile NOX4'te gözlenmiştir. IBM SPSS Windows programında yaş tayininde kullanılmak üzere çok değişkenli lineer regresyon denklemleri oluşturulmuş stepwise ve enter modelleri için ortalama mutlak sapma ve hata kareler ortalaması karekökü sırasıyla 4,05 ve 5 ; 3,81 ve 4,7 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak geliştirilen panelle semen örneklerinden yüksek doğrulukta yaş tayini yapılmasının mümkün olduğuna karar verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Adli Bilimler, DNA Metilasyonu, Semen, Yaş tayini, SNaPshot

Summary

Age is very important with regards to both judical investigation and the determination of the punishment to be taken by the person in criminal law, as it gives an idea about the appearance of the suspect/perpetrator. Traditionally an estimated age is determinated as a result of the evaluation of tooth and bone structure composition but it is not possible to obtain these materials in every crime case. In recent years, it has been determinated that high-accuracy age estimation can be made with methylation studies.

In this study, a panel was developed for age determination by methylation analysis in the semen samples. For the analysis of methylation profiles at 12 CpG loci, which were determined to be highly correlated in the literature, the methylatio change in loci due to the increase in age was calculated using SNaPshot mini sequencing metod in semen samples taken from 115 volunteers (80 models and 35 tests) aged 20-71 years. While the amount of methlation decreased with the increasing age in 12 CpG (PARP14(cg14750551), C5orf25(cg16256592), cg23488376, MXRA5(cg00881487), PFKFB3(cg18989491), DLL1(cg13494348), cg12837463, TTC7B(cg06304190), KCNA7(cg03564727), NKX2-1(cg18686206) and SYNE4(cg18542098) loci, an increase was determinated in the NOX4 locus and the highest correlation was observed in NOX4 with value of 0.8002. Multivariate linear regression equations were created to be used in age determination in IBM SPSS Windows program. For the developed stepwise and enter models, the mean absolute deviation and root of the mean squared error were determinated respectively as 4.05, 5; 3.81, 4.7. Consequently, it was decided that it is possible to determine the age of semen samples with high accuracy with the developed panel.

Keywords:Forensic Science, DNA Methylation, Semen, Age Estimation, SNaPshot

1. Giriş ve Amaç

Adli bilimlerde olay yerinden elde edilen biyolojik deliller ile yapılan genetik incelemeler neticesinde suç, suçlu ve mağdur arasında ilişki kurulmaktadır. Genetik incelemeler delil ile şüphelinin DNA profili eşleşmesine dayanmakta olup şüpheli olmadığı durumda delilden profil eldesinin şüpheliye ulaşmada bir rolü yoktur. Son dönemde adli fenotipleme ya da moleküler görgü tanıklığı olarak adlandırılan çalışmalar ile DNA'dan kişinin dış görünüşü (göz, saç ve ten rengi; boy uzunluğu, kellik gibi) ve biyocoğrafik soyuna dair bilgi edinilmektedir. Söz konusu çalışmalar adli kimliklendirmede alternatif yeni yaklaşımlar olmuştur. Tüm bu fenotipik özellikler gibi kişinin yaşının belirlenmesi de özellikle DNA veri bankası olmayan ülkeler için önem arz etmektedir (1).

Kişinin yaşının belirlenmesi hem şüpheli/failin dış görünüşüne ait fikir vereceğinden hem de kişinin alacağı cezanın belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Geleneksel olarak diş ve kemik yapısı ve kompozisyonunun değerlendirilmesi sonucunda bir yaş tahmini yapılmakla beraber bu materyallerin her suç olgusunda eldesi mümkün olamamaktadır. Olay yerinde sıklıkla bulunan biyolojik örnekler kan, semen, vajinal sekresyon ve tükürüktür. Semen örnekleri özellikle cinsel saldırı olaylarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Bu gibi olgularda saldırganın yaşının belirlenmesi olayın aydınlatılması veya suçlunun alacağı cezanın belirlenmesinde oldukça kritik olabilir (2–4).

İnsan biyolojisine baktığımızda yaşlanma ile organ ve dokularda moleküler düzeyde farklılaşma yaşandığı gerçeğinden yola çıkarak genetik çalışmalarla yaş tahmini yapılabilir. Bu çalışmaların başında epigenetik değişikliklerin araştırılması gelmektedir (1,4–6).

Epigenetik, fenotipi oluşturan ve gen ile fenotip arasındaki nedensel etkileşimi inceleyen biyolojinin bir alt dalıdır. Genomda CpG dinükleotit tekrarlarının yer aldığı bölgeler CpG adaları

olarak adlandırılmakta olup %60-90'ının metile halde bulunduğu tahmin edilmektedir. Yapılan çalışmalar CpG dinükleotid yapısının hayat süresince sistematik değişim geçirdiğini, yaşlanmanın epigenetik değişimlerle ilişkili olduğunu ve metilasyon seviyesinin yaşlanma sürecinde azaldığını veya arttığı ortaya koymuştur (5,7,8).

Bu çalışmanın amacı CpG adacıklarında bulunan ve yaşa bağımlı olarak gen anlatımı düzenlenmesinde etkili olan semene özgü DNA metilasyon belirteçlerinin hipermetilasyon ve hipometilasyon profilllerinden yararlanılarak erkek bireylerin yaş tahmininin yapılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda yaş ile ilişkili olduğu belirlenen semene spesifik farklı gen bölgelerinde yer alan 12 CpG noktası (PARP14-cg14750551, C5orf25-cg16256592, cg23488376, MXRA5-cg00881487, PFKFB3-cg18989491, DLL1-cg13494348, NOX4-cg06979108, cg12837463, TTC7B-cg06304190, KCNA7 -cg03564727, NKX2-1 - cg18686206 ve SYNE4 - cg18542098) içeren bir multipleks panel dizayn edilmiş ve bir yaş tahmin modeli oluşturulmuştur.

2. Genel Bilgiler

2.1. Adli Bilimlerde Genetik Kimliklendirme

Adli bilimlerde kimliklendirme 19. yüzyılın sonlarında başlamıştır. Francis Galton tarafından parmak izinin kişilerin ayrımında kullanılabileceğini bilimsel olarak kanıtlamasıyla parmak izi dünya çapında kullanılır hale gelmiştir. 20. yüzyılın başlarında ise biyoloji alanında yaşanan gelişmeler kan grubu antijenleri ve protein markırlarının oldukça polimorfik olduklarını göstermiştir sonrasında ilk kez kimliklendirmede biyolojik markırlar kullanılmıştır. Ancak kan grubu antijenleri ve protein markırları yüksek ayrım gücüne sahip olmalarına rağmen yüksek miktarda ve degrade (bozulmuş) olmamış materyale ihtiyaç duyması nedeniyle kullanıma uygun olmamıştır (9,10).

Kimliklendirmede ilk deoksiribonükleik asit (DNA, Deoxyribonucleic Acid) profili kullanımı genetikçi Alec Jeffreys tarafından yapılmıştır. Alec Jeffreys 1985 yılında kişiler arasında farklılık gösteren DNA'daki farklı sayıdaki tekrar dizinlerini (VNTR, Variable Number of Tandem Repeat) keşfederek geliştirdiği rastgele fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi ile VNTR markırlarını kişilerin genetik olarak ayrımında kullanmıştır. Bu metot DNA parmak izi olarak adlandırılarak altın standart haline gelmiştir. VNTR analizi kimliklendirme de etkili olmasına rağmen fazla miktarda ve degrade olmamış DNA'ya ihtiyaç duyması nedeniyle adli olgularda kullanımı zordur. Kary Mullis tarafından polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR, polymerase chain reaction) bulunması ile DNA miktar problemi çözülmüştür (10–12).

VNTR'ler gibi tekrar bölgeleri olan kısa ardışık tekrarlar (2-7 bç), (STR, Short Tandem Repeats) ise VNTR'lardan daha kısadır ve olay yerinde bulunan degrade örneklerden çalışılması kolay ve ayrım gücü daha yüksektir. Adli DNA modelleme komitesi STR markırları kullanımını standardize etmiştir. 1997 Kasım ayında Fedaral Araştırma Bürosu (FBI, Federal

Bureau of Investigation) 13 STR bölgesini (CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 ve D21S11) kombine DNA indeks sistemine (CODIS, Combined DNA Index System) eklemiştir. Multipleks PCR yöntemi ile spektral olarak çözünebilir floresan boyalar kullanılarak STR markırlarının kullanımına yönelik çeşitli ticari kitler geliştirilmiştir. PCR temelli STR markırları analizi ile olay yerinden elde edilen materyalin şüpheli ve mağdur ile bağlantısı belirlenebilir hale gelmiştir. Günümüzde STR analizi ile DNA profili eldesi altın standart olarak yerini almıştır (13,14).

STR analizi ile kimliklendirme oldukça ayırt edici olsa da karşılaştırma temelli bir yöntemdir bu nedenle şüpheli veya referans materyal bulunmadığı olaylarda fail veya mağdura ulaşmak mümkün değildir. Aynı zamanda STR markırları yaklaşık 100-300 bç uzunluğunda olduğundan çok degrede örneklerde çalışılamamaktadır. Bu kısıtlama adli genetikte yeni gelişmelere zemin hazırlamıştır. Genotip ve fenotip bağlantısı üzerinde yapılan kapsamlı genomik araştırmalar ile birlikte 2000'lerin başlarında adli bilimlerde DNA'dan tek nükleotit polimorfizmleri (SNP, Single Nucleotide Polymorphisms) ile fenotip eldesi diğer bir değişle moleküler görgü tanıklığı çalışmaları başlamıştır (15,16).

Moleküler görgü tanıklığı ile olay yerinde bulunan kime ait olduğu belirlenemeyen leke veya biyolojik örneklerden, DNA (veya diğer moleküler markırlar) analizi ile dış görünüme ait bilgi edinilmesini amaçlanmaktadır. Moleküler görgü tanıklığı sayesinde görgü tanıklığı yapan kişilerden alınan bilgilere kıyasla daha kesin ve güvenilir sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir. DNA'daki kodlayıcı ve düzenleyici bölgelerde meydana gelen insersiyon-delesyon (InDels, Insertion-Deletion) ve SNP'ler amino asit farklılaşmasına dolayısıyla farklı protein konformasyonuna sebep olur. Farklı formdaki protein farklı işleve sahip olduğundan fenotipte değişime sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda ten, saç ve göz rengi ile yüz şekli, boy, kellikle ilişkili polimorfizmler belirlenmiştir (13,17).

Göz rengi ayrımında kullanılmak üzere Walsh ve ark. (2011) tarafından Irisplex Sistemi geliştirilmiştir. Sistem pigmentasyon farklığının tanımlanması için belirlenmiş altı SNP bölgesi (HERC2, OCA2, SLC24A4, SLC45A2, TYR ve IRF4) içermekle beraber yüksek doğruluk oranı (>%90) ile mavi ve kahverengi göz rengi ayrımı sağlamaktadır. Mavi ve kahverengi ayrımı yüksek doğruluk oranı ile belirlenebilmesine rağmen ara renklerde aynı kesinlik mümkün olmamaktadır. Bunun yanında Pospiech ve ark. tarafından HERC2, OCA2 ve TYRP1 genleri yeşil göz rengi ile ilişkili olarak bulunmuştur (18,19).

Saç rengi belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalar siyah/kahverengi ömelanin ve kırmızı/sarı feomelanin adında iki melanin çeşidinin renk ayrımından sorumlu olduğu belirlenmiştir. Melanogenez reaksiyonunda birçok gen rol almakla beraber, MC1R geninin kırmızı saç, açık ten rengi ve çil fenotipinden sorumlu olduğu bulunmuştur. 2013 yılında Irisplex sisteminde belirlenen 6 SNP bölgesine ek olarak 18 SNP saç rengi markırı daha eklenerek HIrisplex Sistemi geliştirilmiştir. Model %75-%92 doğrulukla kızıl, sarı, kahverengi ve siyah saç rengi tahmin yapabilmektedir. (18,20,21)

Daha sonra geliştirilen HIrisplex-S Sistemi, saç ve göz renginin yanında ten rengi tahmini için geliştirilmiştir. Bu sistemde ten tonu için geliştirilen model üç (açık, koyu, koyu-siyah) veya beş (çok açık, açık, orta, koyu, koyu-siyah) ten tonu dikkate alınarak oluşturuldu ve sırasıyla %83-97 ile %72-97 oranında doğrulukla ten rengi tahmin yapılabilir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda geniş renk skalasıyla sırasıyla 6, 24 ve 41 SNP noktası analiziyle göz, saç ve ten tahmini mümkün olmaktadır (18–24).

Boy uzunluğuna ilişkin yapılan çalışmalarda fibroblast ve doku gelişiminden sorumlu gen yolakları analiz edilmiş ve sonuçta 700 markır elde edilmesine rağmen ancak >%75 doğruluk oranında tahminde bulunmuştur. Yüz şekli analizi için yapılan çalışmalar sonucunda burun, dudak, yüz ve çene yapısına dair bilgiler içeren 24 SNP bölgesi belirlenmiştir. Sonraki

çalışmalarla beraber yüz ve kaş genişliği, gözler arası mesafe, burun köprüsü, burun delik genişliği ve ağız şekline ilişkin bilgiler elde edildi. Erkek tipi kellik ya da androjenik alopesi popülasyonda %80 oranında görülmekle beraber yüksek tahmin potansiyeline sahip olduğu belirlenen AR/EDA2R, EBF1, TARDBP ve HDAC9 genlerinin adrojen ve ektodisplazin reseptör sentezinde rol almaktadır. Etkili olduğu belirlenen 15 SNP markırı ve belirtilen 5 gen bölgesi ile %86.4 kesinlikle tahmin yapılabilmektedir (25–27).

2.2. Adli Bilimlerde Yaş Tayini

2.2.1. Geleneksel yöntemler

Adli bilimlerde yaş tayini cezai, yasal ve antropolojik soruşturmalarda kullanılmakla beraber hem ölü hem de yaşayan kişiler için gereklidir. Ölülerde yaş tayini çalışmalarıyla biyolojik profile dair bilgi edinilmesi ve kayıp kişilerle karşılaştırılması iken yaşayanlarda yapılan yaş tayininde adli ve medeni konuların çözüme kavuşturulması amaçlanır (28,29).

Günümüzde çocuk ve yetişkinlerin yaş tayininde iskelet ve diş gelişiminin morfolojik ve yaşa bağlı radyolojik incelemesine dayalı yöntemler kullanılmakla beraber yetişkinlerde çocuklara göre daha az doğrulukla gerçekleşmektedir. İncelemelerde diş materyali olması durumunda dentin veya diş minesinde aspartik asit rasemizasyonu veya diş minesinin radyokarbon analizi yapılmaktadır (30).

2.2.1.1. Kemik incelemeleri

Yaş tayininde en yüksek doğrulukta sonuç alınan yöntem radyolojik incelemelerdir. Radyolojik incelemede kemiklerin epifiz plaklarına; ileri yaşlarda ise vertebra, kosta ve sternum kemiklerinin uç bölgesinde meydana gelen değişimlere dikkat edilir. Kemik radyolojik olarak incelenmesinin ardından, hazırlanmış atlaslara dayalı olarak yaş tayini yapılır. Şimdiye kadar geliştirilen atlaslar Greulich-Pyle, Tanner Whitehause, Gök ve Thiemann Nitz atlaslarıdır (31).

2.2.1.2. Aspartik asit rasemizasyonu

Aspartik asit rasemizasyonu (AAR) tayini ile dişten yaşın belirlenmesi Helfman ve Bada (1975) tarafından tanımlanmış ve bugün halen kullanılmaktadır. Bu yöntem insanlarda protein sentezlendiği sırada sadece L–enantiyomer yapılı amino asitlerin yer alması ancak artan yaşla birlikte D-enantiyomer oluşmasına dayanır. L-enantiyomer amino asitler zamanla aspartil ve asparaginil rezidülerindeki kararsızlık nedeniyle D-enantiyomer haline gelir. Burada gerçekleşen enantiyomer değişimi rasemizasyon olarak adlandırılır. Yaşa bağımlı olarak D-aspartik asit birikimi vücutta farklı yapılarda görülmektedir (32–35).

Adli uygulamalarda tercih edilen dişin dentin yapısıdır. AAR tayini sonucunda dentin yapısında oluşan D-aspartik asitlerinin miktarı analiz edilmektedir. Dentin analizi için dişin delinmesi ve kesilmesi gerektiğinden yıkıcı bir işlemdir ve yaşayan bireylere uygulanması mümkün değildir (36).

2.2.1.3. İleri glikozilasyon son ürünleri

İleri glikozilasyon son ürünleri (AGEs, Advanced glycatipn end product) protein, lipit ve nükleik asitlerin amino gruplarına indirgeyici şeker ve karbonilik bileşiklerin bağlanması sonucu oluşan heterojen yapıda kompleks moleküllerdir. AGEs yaşlanma süresinde tüm dokularda artmaktadır. Yaşa bağlı olarak meydana gelen değişim AGEs'ni yaş tayininde kullanılabilecek potansiyel markır haline getirmiştir. AGEs floresan özelliğe sahiptir ve meydana gelen kahverengi renk değişimi miktar tayininde kullanılmaktadır (37,38).

2.2.2. Güncel yöntemler

Adli bilimlerde kişilerde yaş tayini oldukça önemlidir ve bunun için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Günümüzde olay yerinde bulunan diş ve kemik örneklerinin morfolojik ve biyokimyasal analizine dayalı yöntemle yaş tayini yapılmaktadır. Ancak her olay yerinde kemik

ve diş eldesi mümkün olmamakla beraber geliştirilen morfolojik analiz ile 10 yıllık sapma, biyokimyasal analiz ile 3 yıl sapma ile yaş tahmini gerçekleşmektedir (30,39).

Bu kısıtlamalar araştırmacıları farklı markır arayışlarına yönlendirmiştir. Yaşlanmaya bağlı olarak doku ve organlarda meydana gelen farklılaşma süreç boyunca birikim meydana getirir ve moleküler genetik yöntemlerle incelenebilir. Yeni yaklaşım çok az miktardaki örnekle ve tüm vücut sıvıları ile yaş tayinini olası kılmaktadır. DNA'nın diğer moleküllere nazaran daha stabil oluşu ve tüm vücut sıvılarında yer alması yaş tayin çalışmalarında DNA'yı ana materyal haline getirmiştir. Bu amaçla geliştirilen başlıca yöntemler; mitokondriyal DNA delesyon analizi, telomer uzunluğu analizi, DNA tekrar bölgelerinin sıklığı, gen ekspresyon farklılığı ve DNA metilasyonun tayinidir. DNA metilasyonu epigenetik değişim olup bu başlık altında anlatılacaktır (40).

2.2.2.1. Mitokondriyal DNA delesyonları

Mitokondri hücre sitoplazmasında yer alan kendi DNA moleküllüne sahip organel olup protein sentezini yapabilmektedir. Mitokondriyal DNA (mtDNA) sayısı hücreden hücreye farklılık göstermekle beraber sperm hücrelerinde 50 ila 800 olarak belirlenmiştir. MtDNA replikasyon mekanizması tam olarak çözülmüş değildir (40,41).

Mitokondri, solunum ve oksidatif fosforilasyon için gerekli olan glikoz ve lipitlerin oksitlenmesinden sorumludur. Oksitlenme sırasında kullanılan oksijen ortama serbest radikaller halinde salınır. Oksidatif hasar mtDNA'da delesyona sebep olmaktadır ve ilerleyen yaşla beraber miktarı artarak dokuya özgü patern oluşturduğu belirlenmiştir. Bunun yanında 80 yaşındaki bir kişide meydana gelen delesyonların çoğunun ilk 30 yılda meydana geldiği saptanmıştır. Şimdiye kadar farklı dokularda belirlenmiş 4977 bp'lik mtDNA delesyonu yaş tayininde ideal bir markır olarak kullanılabilir. Ancak delesyon boyutunun dolayısıyla amplikon uzunluğunun fazla olması

PCR'yi zorlaştırmaktadır. Delesyon paterninde kişiler hatta dokular arasında heterojenlik göstermesi kullanılacak dokunun ya da vücut sıvısının çeşitliliğinde kısıtlamaya neden olmakla beraber doku içerisindeki hücreler arasında dahi delesyonda belirgin farklar mevcuttur. mtDNA analizi elde edilen veriler sınırlı ve korelasyon katsayısı +0.90'nın altında olduğundan güvenilir yaş tahmini yapılması mümkün olmamaktadır (41–46).

2.2.2.2. Telomer kısalması

Telomerler kromozom uçlarında yer alan nükleoprotein yapılarıdır. Yaşla beraber telomer yapısında kısalma meydana geldiği belirlenmiştir. Telomer yapısı yüzlerce TTAGGG tekrarından meydana oluşmaktadır. Ancak DNA polimerazın uç replikasyon problemi nedeniyle her yıl telomer uzunluğunda 20-60 bç'lik azalma meydana gelir. Doğumda telomer uzunluğu 11 kbç iken ilerleyen yaşlarda 4 kbç'e düşmektedir (47,48) .

Telomerden yaş tayini çalışması ilk olarak Tsuji ve ark. (2002) tarafından yapılmıştır. Çalışmada 0-85 yaş arasındaki 60 kişinin kan örneği kullanılmış sonuçta yaş ile telomer uzunluğu arasında korelasyon değeri +0.832 olarak bulunmuştur (49).

Telomer çalışmalarında degrede olmamış fazla miktarda DNA gereklidir ve kurumuş örneklerde yapılan çalışmalar zamanla telomer uzunluğunda kısalma meydana geldiğini göstermiştir. Bunun yanında telomer uzunluğunun çevresel ve bireysel özelliklerden etkilenmesi ile kromozomdan kromozoma ve doku içindeki hücreler arasında dahi heterojenite olması nedeniyle yaş tahmininde kullanılamamıştır (41).

2.2.2.3. DNA tekrar bölgeleri sıklığı

Genom 3 milyar bç'den oluşmakla beraber %1,5'luk kısım protein kodlayan genleri içerir. Genomun geri kalan kısmında düzenleyici, kodlanmayan RNA, tekrarlar, transpozon ve psödogen bölgeleri bulunmaktadır. DNA tekrarları adli bilimlerde kullanılan bir belirteçtir.

T lenfositleri, yabancı antijenlerin tanınmasında etkili T-hücre reseptörleri (TCRs, T-cell receptors) taşımaktadır. Reseptör çeşitliliği, yabancı antijenlerin tanınması için gerekli olmakla beraber bu farklılaşma T lenfsitleri olgunlaşırken, TCRs genlerinin somatik düzenlenmesi ile sağlanır. TCR genlerinde farklılaşma sırasında delesyon meydana gelirken T hücre reseptör eksizyon çemberi (sjTRECs, signal joint T-cell receptor excision) oluşmaktadır. Yaşlanmayla birlikte sjTRECs miktarında azalma meydana gelir. Zubakov ve ark. (2010) kandan elde edilen T-hücresinin kişilerin yaş tayininde ±8.9 yıllık sapma, Qu ve ark. (2010) ise ±10.5 yıllık sapma ile yaş tahmininin yapılabileceğini açıklamıştır (50–52).

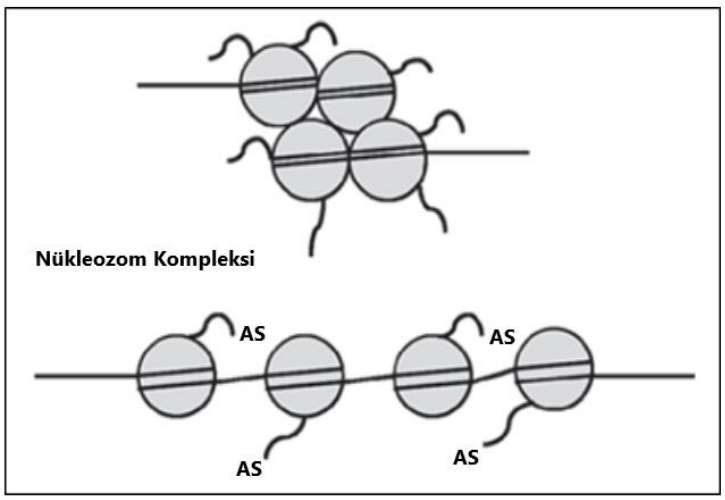
2.3. Epigenetik

Epigenetik kavramı ilk olarak 1942 yılında İngiliz gelişim biyoloğu Conrad Hal Waddington tarafından genotip ve fenotip arasındaki ilişkiyi açıklayan gelişimsel süreç kompleksini açıklamak için kullanılmıştır. Günümüzde epigenetik değişimler gen dizisinde meydana gelmeyen ancak gen ekspresyonunda etkili kalıtılabilir değişiklikleri ifade etmektedir. Gen ekspresyonu üzerinde etkili epigenetik düzenlemeler; DNA (DNA metilasyonu), RNA (kodlanmayan RNA) ve protein düzeyinde (post translasyonel histon modifikasyonu) meydana gelmektedir. En yaygın epigenetik mekanizmalar histon modifikasyonu, kromatin yeniden düzenlenmesi, kodlanmayan RNA'lar ve DNA metilasyonudur. Epigenetik bize aynı genom yapısına sahip olmalarına karşın bireyler arasında nasıl fenotipik farklılık meydana geldiğini açıklar. Epigenetik patern, hücre bölünmesi sırasında değişmeden kalmakla beraber kişinin yaşamı süresince değişim göstermektedir. Yapılan çalışmalar diyet ve çevresel etmenlerin de epigenetik farklılaşmada etkili olabileceğini ortaya koymuştur (53–56).

2.3.1. Epigenetik mekanizmalar

2.3.1.1. Histon modifikasyonu

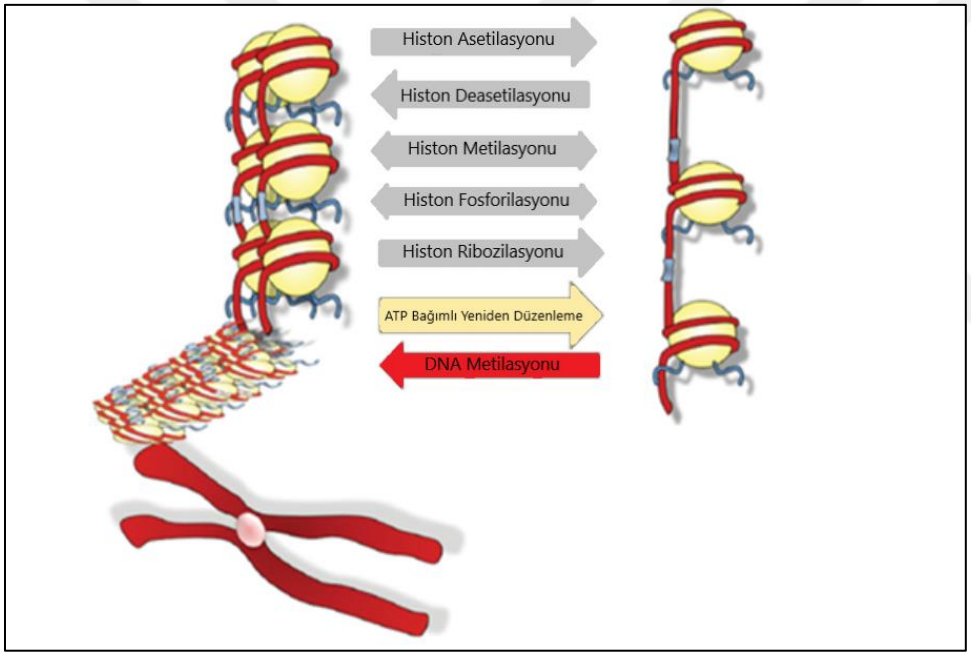
Kromatin, histon proteini ve DNA'dan oluşur. DNA histon proteinlerinin (oktamer) etrafını sararak *nükleozom* denilen yapıyı oluşturur. Nükleozom yapısı dışarıya doğru yapılanmış histon kuyruklarına sahiptir. Histon kuyruklarında meydana gelen translasyon sonrası modifikasyonlar (metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon ve ubikinasyon) DNA histon interaksiyonuna etki ederek gen transkripsiyonu, DNA tamiri, DNA replikasyonu ve kromozom organizasyonunda farklılaşmaya neden olmaktadır. En iyi çalışılan histon modifikasyonlarından biri lizin amino asidinde meydana gelen asetilasyondur. Asetilasyon pozitif yüklü lizin amino asitinde nötralizasyona sebep olarak DNA ve histon kuyruğu arasındaki bağın kuvvetini azaltır. Histon DNA kompleksi açık hale gelir ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanması ile transkripsiyonel aktivasyon sağlanırken deasetilasyon transkripsiyonun baskılanmasına neden olmaktadır (Şekil 1). Bir diğer histon modifikasyonu olan metilasyonun ise transkripsiyona pozitif veya negatif etki edebildiği bilinmektedir (18- 21).



Şekil 1.Histon asetilasyonu (54).

2.3.1.2. Kromatin yeniden düzenlenmesi

Kromatin yapısı yeniden düzenlenmesi; histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve ATP bağımlı yeniden düzenlenme ile sağlanmaktadır. Kromatinin bu dinamik yapısı, transkripsiyonel regülasyonu etkilemektedir (Şekil 2). Transkripsiyon faktörleri ile kromatin arasında meydana gelen değişimler gen ekspresyonunda farklılaşmaya neden olduğundan kromatin yeniden düzenlenmesi hücre işleyişini etkilemektedir (57,58).



Şekil 2. Kromatin yeniden düzenlenmesi (57).

2.3.1.3. Kodlanmayan RNA

Diğer epigenetik modifikasyonlar transkripsiyonda rol alırken kodlanmayan RNA (ncRNAs, noncoding RNAs) molekülleri diğer RNA'ların işlenmesi ve düzenlenmesinde etkili olarak translasyona etki etmektedir. Protein kodlamayan RNA'lar, DNA'dan transkribe olan ancak translasyona uğramayan RNA'lardır (59).

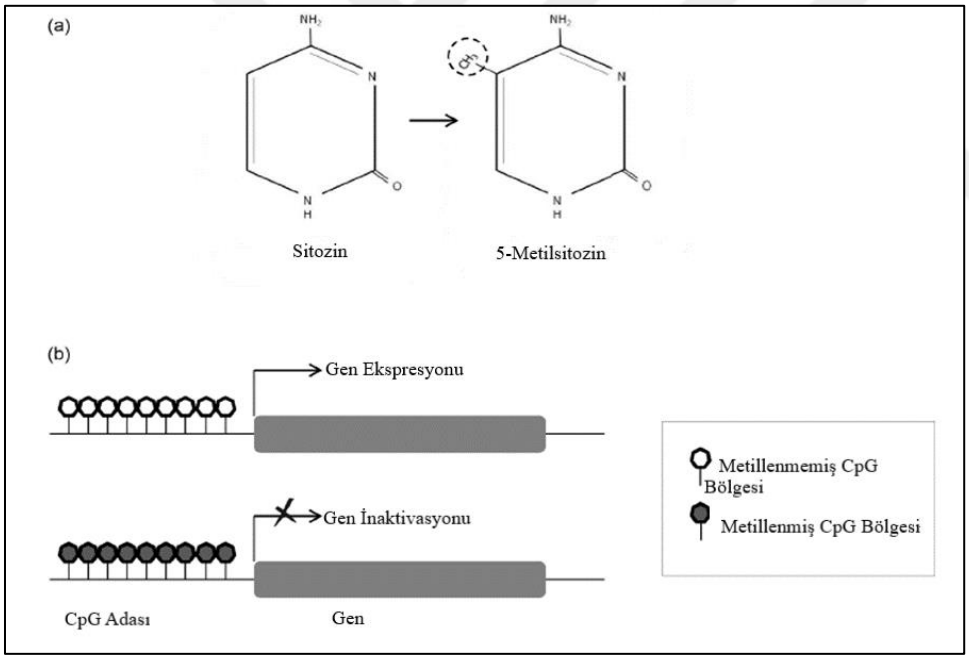
ncRNA'lar kısa (<30 nükleotid) ve uzun (>200 nükleotid) olmak üzere 2 gruptan oluşur. Kısa ncRNAlar kromozom düzenlenmesinden sorumludur. Kısa ncRNAlar; mikro RNA(miRNA, micro RNA), küçük interferans RNA (siRNA, small interfering RNA) ve Piwi etkileşimli RNA (piRNA, piwi interacting RNA) olmak üzere üçe ayrılır. mRNA transkriptlerinin düzenlenmesi RNAi mekanizması ile sağlanmakta olup; çift zincirli RNA'nın (dsRNA, double strand RNA) hücreye girmesi sonrası komplementer mRNA'nın ncRNA'lar ile parçalanması ile transkripsiyon sonrası gen susturulması sağlanmaktadır. mRNA düzenlenmesi kısa ncRNA'ların en iyi bilinen özellikleri olmasına rağmen kromatin bağımlı gen susturulması ve DNA'nın yeniden düzenlenmesinde rol alarak diğer hücresel olaylarda rol aldıkları bilinmektedir (59,60).

Uzun kodlanmayan RNA'lar (lncRNA, long noncoding RNA) kromatinin yeniden yapılandırılması dolayısıyla transkripsiyonun düzenlenmesi, transkripsiyon aktivatör ve inhibitörlerinin DNA'ya bağlanması; mRNA'nın olgunlaştırılması, stabilitesi ve translasyonunun sağlanmasının yanı sıra hücredeki protein-protein etkileşimlerinde rol almaktadır (61).

2.3.1.4. DNA metilasyonu

DNA metilasyonu, metil grubunun sitozin nükleotidine kovalent bağlanması olup ilk olarak 1948 yılında Rollin Hotchkiss tarafından keşfedilmiştir. Keşfin ilk yıllarında 5-metilsitozinin DNA bazı olduğu düşünülmüş ancak 1980'lere gelindiğinde gen regülasyonu ve hücre farklılaşması ile ilişkili olduğu belirlenebilmiştir. Günümüzde DNA metilasyonunun diğer düzenleyiciler gibi gen regülasyonunda etkili olduğu kabul edilmektedir. DNA metilasyonu; genomik imprinting (gen susturulması), X kromozom inaktivasyonu, DNA tamiri, seksüel dimorfizmin başlatılması, genomda yer alan çok sayıdaki yer değiştiren ve retroviral elemanların baskılanması ve hücre bölünmesi sırasındaki kontrol noktalarının ilerlemesinde etkilidir (59,62,63).

Metilasyon, sitozini guanin (CpG, Cytosine-Phosphate-Guanine) yapısında meydana gelir ve yaklaşık olarak 28 milyon CpG bulunmaktadır. Genomda CpG tekrarları bulunan yerler CpG adaları olarak adlandırılır. CpG adalarının en az 500 baz çifti uzunlukta olduğu ve genlerin yaklaşık yarısında promotör bölgesinde yer aldığı bilinmektedir. CpG yapılarının yaklaşık %70'inin metile halde olduğu bilinmekle beraber genlerin düzenleyici bölgelerinde yer aldığı bilinen CpG adaları (300-3000bp uzunlukta, %55'ten fazla GC içeriği) metile değildir. Metile CpG'lerinin %3'ünden azı genin 5' ucunda, %97'si ise gen içi, genler arası ve DNA tekrar bölgelerindedir. Bu durum gen transkripsiyonundan sorumlu CpG'lerin genellikle metile olmadığını gösterir (64,65).

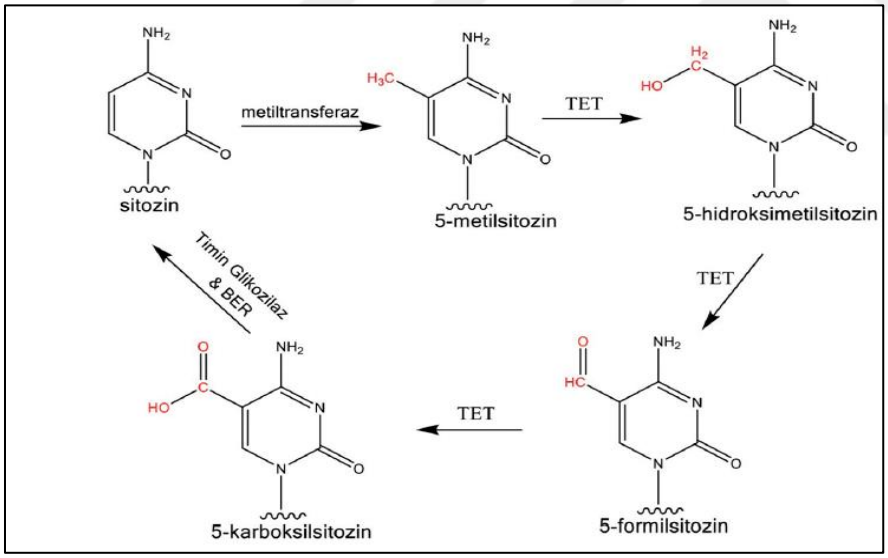


Şekil 3. (a) sitozin metilasyonu. (b) CpG adası içeren genlerin şematik gösterimi (56).

Metilasyon, DNA metil transferaz ailesi (DNMTs) olarak adlandırılan spesifik enzim ailesi tarafından sitozin nükleotidinin primidin halkasına metil grubunun kovalent bağlanmasıdır. İşlemde S-Adenozil Metiyonin (SAM) metil vericisidir ve bağlanma sonucunda 5-metil sitozin oluşur (5mC). DNMT ailesi, yapısal ve fonksiyonel olarak farklı olan DNMT1, 3A ve 3B olmak üzere 3 enzimden meydana gelir. DNMT'ler genomda metilasyonun katalizlenmesi ve

metilasyon paterninin stabilizasyonunu sağlar. DNMT 3A ve 3B de novo metilasyondan sorumlu iken DNMT1 ise replikasyon sırasında yeni sentezlenen zincire, kalıp zincirdeki metilasyon paterninin aktarılması dolayısıyla paternin korunmasında rol almaktadır (66).

Demetilasyon işlemi metilasyona kıyasla daha karmaşık olmakla beraber pasif veya aktif olarak meydana gelebilir. İşlemde on, onbir translokasyon (TET, Ten eleven translocation) enzimi 5mC yapısını okside eder ve lokus spesifik demetilasyon işlemi başlar. Su, oksijen ve a-ketoglutarat varlığında 5mC sırasıyla 5-hidroksimetilsitozin, 5-formilsitozin ve 5-karboksilsitozine okside edilir. 5-karboksisitozinin, timin glikozilaz ve baz eksizyon tamiri (BER, Base Excision Repair) aracılığıyla sitozine dönüşümü sağlanır (67,68).



Şekil 4. DNA metilasyon ve demetilasyonu sırasında oluşan bileşikler ve mekanizmada etkili enzimler (67).

Promoter bölgesinde yer almayan CpG dinükleotid yapılarının yaklaşık %80'ni metile haldedir. Genomda promotör bölgesindeki CpG dinükleotidlerinde meydana gelen metilasyonda azalma (hipometilasyon) mRNA yapısında ya da ekspresyon miktarında farklılaşmaya sebep olmaktadır.

Gen promotör bölgelerinde meydana gelen CpG adalarına metil grubu eklenmesi (hipometilasyon) transkripsiyonun durmasına (gen susturması) sonrasında protein eksikliğine sebep olabilmektedir (54).

2.4. DNA Metilasyonunun Adli Bilimlerde Kullanımı

DNA metilasyonu kromatin yapısını etkileyerek gen ekspresyonunu üzerinde etkili epigenetik modifikasyondur. DNA metilasyonu doku gelişimi ve hücre farklılaşmasında hayati rol oynamaktadır. Genomda yer alan metilasyom farklılıklarının belirlenmesi ile monozigotik ikizlerin ayrımı, vücut sıvı ve dokularının analizi ile biyolojik materyalden yaş tahmini yapılabilmektedir.

2.4.1. Alellerin parental orijinlerinin belirlenmesi

Her otozomal gen, genomda anne (maternal) ve babadan (paternal) olarak kalıtılan 2 alele sahiptir. Çoğu gen için her iki alelde aktif formda olmakla beraber çok az gende paternal ve maternal orijine bağlı olarak inaktivasyon olabilmektedir. Gende meydana gelen inaktivasyon genomik imprinting (baskınlanma) olarak adlandırılır ve monoalelik ekspresyon meydana gelir. Anne veya babadan gelen aleller farklı metile formda olabilmektedir. Bu durumda alelin anneden mi babadan mı kalıtıldığı DNA metilasyon analizi ile belirlenebilir. Zhoa ve ark. (2005) tüm dokularda imprint halde olan rs220028 SNP lokusunun metilasyon durumunu analiz ederek alelin hangi ebeveynden geldiğini belirlemiştir. Diğer bir çalışmada ise kan ve post-mortem dokularda H19 imprinted geninin 5’ ucunda yer alan bir VNTR lokusu analiz edilmiş ve tüm dokularda metilasyon profilinin aynı olduğu saptanmıştır. Nakayashiki ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada imprinted genlerde yer alan çeşitli SNP noktaları analiz edilmiştir. Maternal alel, maternal olarak eksprese edilen H19 geninden belirlenirken, paternal alel analizlerinde HYMA1, SNRPN ve PEG3 genleri çalışılarak analiz yapılmıştır. Sonuç olarak

parental ayrım için, polimorfik aleller taşıyan imprinting genlerde otozomal kalıtım analizleri zorlu paternite testlerinde bir çözüm olarak görülmektedir (56,69,70).

2.4.2. Vücut sıvılarının belirlenmesi

Olay yerinin doğru değerlendirilmesi, olayın aydınlatılması ve karışım örneklerinde doku ve fail arasındaki bağlantının kurulmasında vücut sıvısının türünün belirlenmesi önemlidir. Cinsel saldırılarda olay yerinde semen bulunması gibi bazı vücut sıvıları suçun türünü belirlemektedir. Günümüzde şüpheli vücut sıvılarının belirlenmesinde, sıvıya spesifik protein markırları, serolojik ve immünolojik testler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin hassasiyeti yetersiz olmakla beraber tahmini sonuç elde edilmekte ve analiz sırasında delilde kimyasal bozulmalar meydana gelmektedir (56) .

Biyolojik delilin korunması ve DNA materyalinin bozulmaması için delile zarar vermeyecek yöntemlerle analizin gerçekleştirilmesi oldukça önemlidir. Bu amaç doğrultusunda olay yerinden elde edilecek vücut sıvısına özgü olan protein, mRNA ve miRNA çalışmaları yapılmıştır. Protein ve mRNA'lar laboratuvarda gerçekleştirilen vücut sıvısı ayrım çalışmalarında etkili olsa da olay yerinde fiziksel ve kimyasal şartlardan kolayca etkilenmekte ve degrade olmaktadır. Degrade ve eski örneklerde miRNA, mRNA'ya göre daha stabil olmakla beraber çevresel faktörlerin degredasyon etkisini ortadan kaldırılamamaktadır (71,72).

Güncel metotlardaki kısıtlamalar ve epigenetik alanındaki gelişmeler araştırmacıları daha stabil biyolojik molekül olan DNA'da vücut sıvılarını ayırt edici markırların arayışına yönlendirmiştir. Tüm genom epigenetik analizleri sonucunda farklı hücre türlerinin, farklı metilasyon paternine sahip olduğu belirlenmiştir. Dokular arası farklılık gösteren bu kromozom segmenti, dokuya spesifik farklılaşmış metilasyon bölgeleri (tDMRs, tissue spesific differentially methylated regions) olarak adlandırılmaktadır ve her doku farklı metilasyon profilleri taşımaktadır. Bu

durum metilasyon analizinin vücut sıvılarının ayrımında kullanılabileceğini ortaya koymuştur (73).

Literatüre bakıldığında DNA metilasyon markırları ile vücut sıvılarının ayrımına yönelik yapılan ilk çalışma Frumkin ve ark. (2011) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kan, tükürük, semen, deri, idrar, menstüral kan ve vajinal sıvı kullanılarak sıvılar arasında farklılık gösteren metilasyon paternleri belirlenmiştir. 205 CpG bölgesinin çalışıldığı panelde 15 bölgenin vücut sıvılarının ayrımında kullanıma uygun olduğu saptanmıştır (74).

Alghanim ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada pirodizileme ve real time PCR/yüksek çözünürlüklü erime yöntemleri kullanılarak sperm, burun sürüntüsü, tükürük, kan, menstüral kan, vaginal sıvı ve ter örnekleri analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda NMUR2 ve UBE2U markırlarının sperm hücrelerinde diğer vücut hücrelerine kıyasla önemli derecede düşük metilasyon profili gözlenirken; SA-6 markırının tükürük sıvısında diğer vücut sıvılarına nazaran hipermetile olduğu ve AHRR lokusunun kan örneğinde diğer vücut sıvılarından farklı olarak hipometile olduğu belirlenmiştir (75).

2.4.3. Monozigotik ikizlerin ayrımı

Adli olgularda olay yerinde bulunan biyolojik materyalden kişilerin kimliklendirilmesinde STR markırları oldukça başarılıdır. Monozigotik (MZ) ikizlerin neredeyse aynı DNA dizisine sahip olmaları rutin testler ile kimliklendirmelerini imkansız hale getirmektedir. Yapılan çalışmalarda MZ ikizlere ait DNA dizilerinin STR, SNP, ardışık tekrar bölgeleri ve kopya sayıları açısından farklılık gösterebildiği belirlenmiştir ancak farklılık gösteren bireylerin sınırlı sayıda olması ve ikizlere özgünlük göstermesi MZ ikiz ayrımı için STR, SNP ve ardışık tekrar bölgelerinin analizine dayalı olarak geliştirilen genetik testlerin pratik olmadığını ortaya koymuştur (76).

MZ ikizler karakteristik fenotipik özelliklere, farklı yaşam şekillerine ve hastalıklara sahip olabilmektedir. Yapılan çalışmalar farklılığın epigenetik değişimlerden ileri geldiğini ya da epigenetik olarak farklılık meydana getirdiğini göstermiştir. Bu sebeple belirleyici olduğu önceki çalışmalarla kanıtlanmış çeşitli CpG bölgelerini içeren MZ ikizlerin ayrımı için mikroarrayler geliştirilmiştir. Konu ile ilgili literatüre bakıldığında: 2005 yılında Fraga ve ark. tarafından yapılan çalışmada DNA metilasyon ve histon asetilasyon analizi ile MZ ikizlerin ileri yaşlarda ayrımı sağlanabilirken erken yaşlarda ayrım sağlanamayacağı sonucuna varılmış olmakla beraber sonraki çalışmalarda erken yaşlarda da DNA metilasyon analizi ile ayrımın sağlanabileceği belirlenmiştir. Bu durum DNA metilasyon analizini MZ ikizlerin ayrımı için uygun markır haline getirmektedir (77–79).

Li ve ark.(2011) tarafından 44 MZ ikiz arasında kan örneklerinden DNA metilasyon profil karşılaştırması yapılmıştır. Çalışmada 27.000'den fazla CpG bölgesi Illumina Human Metilation27 Beadchip ile analiz edilerek 377 CpG bölgesinde farklılık tespit edilmiştir. Araştırıcıların 2013 yılında yaptıkları bir diğer çalışmada ise 27.578 CpG bölgesi analiz edilerek 92 CpG bölgesi MZ ikizlerin ayrımında önemli derecede anlamlı olarak bulunmuştur (80,81).

Xu ve ark. (2015) tarafından yapılan 119 çift MZ ve 57 çift dizigotik ikizin yer aldığı çalışmada LINE-1 dizilerindeki DNA metilasyon profilleri karşılaştırılmıştır. 119 çift MZ ikizin 15'i ve 57 çift dizigotik ikizin ise 10 çifti metilasyon analizi ile birbirinden ayrılmıştır (76).

Park ve ark.(2017) tarafından yapılan çalışmada 24 MZ ikizin kan örneğinde tüm genom DNA metilasyon analizi gerçekleştirilmiştir. 480.000 CpG bölgesi analiz edilerek 6 CpG bölgresinin (cg00211609, cg26287080, cg01558909, cg21036194, cg01419577 ve cg04620228) MZ ikizlerin ayrımında markır olarak kullanılabileceği belirlenmiştir (82).

2.4.4. DNA metilasyonu ile yaş tayini

Adli olgularda kişilerin yaşlarının belirlenmesi oldukça önemlidir. Şimdiye kadar yaş tayini için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Adli olgularda iskelet bulunması durumunda kemik ve dişlerin morfolojik analizinden tahmini yaş tayini yapılmaktadır. Yaşlanma süresince doku ve organlarda meydana gelen mitokondriyal DNA delesyonları, telomer kısalması, aspartik asit rasemizasyonunda meydana gelen değişimler moleküler analizlerle belirlenmekle beraber düşük hassasiyette sonuç verdiği için kullanılmamaktadır (41) .

Yaşlanma epigenetik değişimlerle ilişkilidir. Araştırmalar sonucunda DNA metilasyon analizi ile yaş tahmini yapılabileceği anlaşılmıştır. Günümüzde farklı vücut sıvı ve dokularında yapılan metilasyon analizi çalışmaları sonucunda yaşla ilişkili CpG bölgeleri belirlenmiştir. Yaş tahmini yapılması için oluşturulan modeller kullanılarak az sayıda metilasyon noktası pirodizileme, SNaPshot ve EpiTyper teknolojileri kullanılarak yüksek doğrulukta tahmin gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yaş tahmin panelleri ile ±3-5 yıllık sapmayla yaş tayini yapılmıştır (12,83–86).

Literatür incelendiğinde, Bockland ve ark. (2011) 21-55 yaş arasında 34 erkek çift yumurta ikizinden aldığı tükürük örnekleri Human Methylation 27 mikroarray kullanılarak tüm genom metilasyon analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda 88 CpG bölgesinin yaşla ilişkili olduğunu belirlemiştir. NPTX2, EDARADD ve TOM1L1 CpG bölgeleri regresyon analizi ile değerlendirilerek ±5.2 yıllık sapma ile yaş tahmini gerçekleştirilmiştir (87).

Jung ve ark. (2019) literatürde yer alan farklı doku ve vücut sıvılarından yaş tayinine yönelik yapılan çalışmalardan farklı olarak birden fazla doku ya da vücut sıvısının eş zamanlı metilasyon analizi yapmışlardır. Araştırmada kan, tükürük ve burun sürüntüsü örneklerini içeren toplamda 448 örnekten elde edilen DNA materyallerinde *ELOVL2, FHL2, KLF14, CIorf132/MIR29B2C ve TRIM59* genlerinde bulunan 5 metilasyon noktası multipleks metilasyon SNaPshot yöntemi ile analiz edilmiştir. Kan, tükürük ve burun sürüntüsü örneklerinden ayrı ayrı yaş tayini modeli

oluşturulduğunda sırasıyla ±3.478, ±3.552 ve ±4.293 yıl ortalama hata oranıyla tahmini yaş değerleri elde ederken üç farklı örnekten ±3.844 yıllık sapma ile tahmin yapılmıştır (88).

Dias ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada sağlıklı 53 kişiden alınan kan örneklerinde yaşla ilişkili olduğu düşünülen ELOVL2, FHL2, EDARADD ve PDE4C gen bölgelerindeki metilasyon miktarları analiz edilmiş ve ± 5.35 yıl sapmayla yaş tahmini yapılmıştır. 51 ölmüş kişiden alınan örneklerden aynı analiz gerçekleştirildiğinde ise sapma miktarı artarak ±9.72 yıl olmuştur (89).

Zapico ve ark. (2021) tarafından 20 kişiden alınan azı dişlerinin pulpa kısmından DNA izolasyonu sonrası ELOVL2, KLF14, SCGN, NPTX2 ve FHL2 genlerinde lokalize olan 46 CpG bölgesi bisülfit dönüşümü sonrası PCR ile çoğaltılarak pirodizileme ile metilasyon düzey tayini gerçekleştirilmiştir. Çok değişkenli regresyon analizi sonucunda 1.5-2.13 yıl sapma ile yaş tayini gerçekleştirilmiştir (90).

2.5. Adli Bilimlerde Semen Örneklerinin Önemi

İnsan semeni spermatozoa, seminal plazma ve epitel hücrelerden meydana gelmektedir. Söz konusu seminal plazma; epididimis, seminal vezikül, prostat, vazdeferans, bülboüretral ve üretral bezlere ait salgıların karışımıdır. Bu bölümde erkek üreme sistemi, spermatogenez ve sperm anlatılacaktır.

2.5.1. Erkek üreme sistemi

Erkeklerde üreme sistemi üriner sistem ve üretkenlikten sorumlu organları içermektedir. Bu organların işlevleri şu şekildedir: Sperm (erkek üreme hücresi) ve semen (spermleri çevreleyen koruyucu sıvı) üretimi, depolanması ve taşınımı; sperm hücrelerinin kadın üreme kanalına boşaltılması; erkek cinsiyet hormonlarının üretimi ve salınımı. Erkek üreme sistemi organları vücudun iç ve dışında olmak üzere iki kısımdan meydana gelir. Bu organlar birlikte sıvı atık

maddelerin uzaklaşmasından ve üremeden sorumludur. Erkek üreme sisteminin tamamı hormonlara bağımlı olarak işlevini yerine getirmektedir. Folikül uyarıcı hormon (FSH, follicle-stimulating hormone), lüteinize edici hormon (LH, luteinizing hormone) ve testosteron erkek üreme sisteminin birincil hormonlarıdır. FSH ve LH, hipofiz bezi tarafından üretilir. FSH, spermatogenezde sperm üretiminden LH, spermatogenezde testosteron üretiminden sorumlu iken testosteron kas ve kemik kütlesi, yağ dağılımı ve cinsel dürtü gibi erkek özelliklerinin gelişiminden sorumludur (91).

Erkek dış üreme yapıları

Erkek üreme sisteminin çoğu karın boşluğu dışında bulunur. Vücut dışında yer alan penis, skrotum ve testislerdir.

Penis

Penis erkek üreme sistemi içerisinde yer alan bir organdır. Kök, gövde ve penis başı olarak adlandırılan üç kısımdan meydana gelir.

Kök: Kök penisin karın duvarına yapışan kısmıdır.

Gövde (Şaft): Tüp veya silindir şeklinde olan penis gövdesi üretra ve üç iç odadan oluşur. Bu odaların içerisinde cinsel uyarım sonrası kanla dolan binlerce geniş alanı içeren süngerimsi özel erektil doku bulunur. Gövde kısmını kaplayan penis derisi ise gevşek ve elastik olup ereksiyon sırasında penis boyutunda değişime uygundur.

Penis Başı (Glans): Glans penisin uç kısmında yer alan koni şeklindeki yapıdır. Glans sünnet derisi olarak adlandırılan deri ile kaplıdır.

Üretra açıklığı glansın uç kısmında yer alarak semen ve idrarın vücut dışına atılmasını sağlar. Penis hassas sinir uçları içermektedir. Semen atılımı sırasında idrar çıkışının engellenmesi penis ereksiyon halindeyken üretradan idrar çıkışının bloke edilmesi ile sağlanır (92).

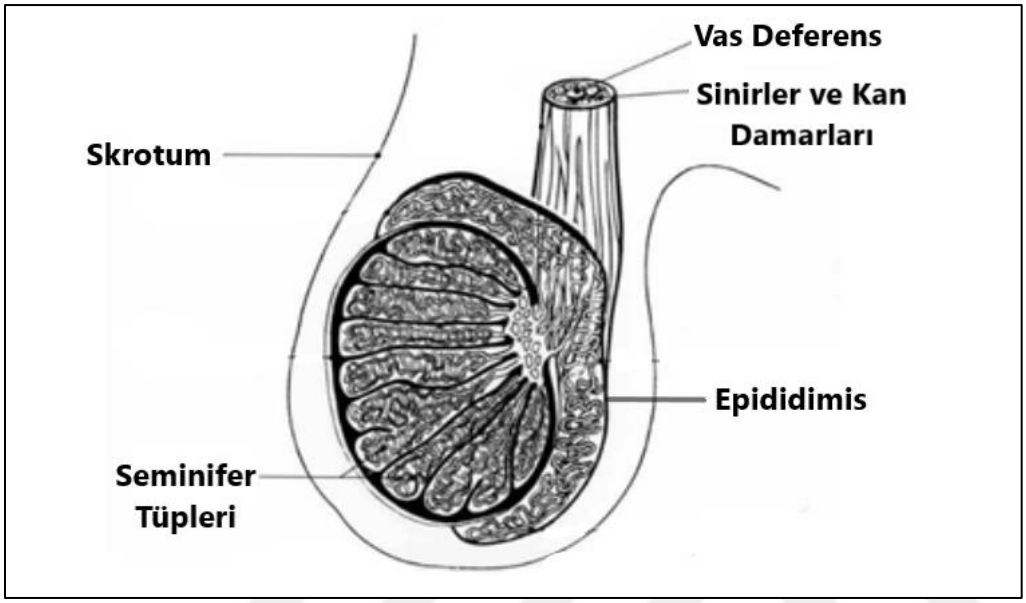
Skrotum ve testisler

Skrotum penis arkasında yer alan gevşek kese benzeri yapıdır. Testisleri ve birçok kan damarı ile sinirleri yapısında bulundurur. Normal sperm gelişimi için testis sıcaklığının vücut sıcaklığından biraz daha soğuk olması gerekmekte olup skrotum yapısındaki özel kaslar ile testislerin vücuda yaklaşıp uzaklaşmasını sağlayarak bu sıcaklık kontrolünü sağlamaktadır. Testisler skrotum içerisinde yer alan sperm ve testosteron üretiminden sorumlu bir çift organdır. Testisler 4-5 cm uzunluk, 2 cm kalınlık ve 3 cm genişlikte ve 30 ml hacimdedir. Testisler sayıları 300-1000 arasında değişen semenifer tübülden meydana gelir. Seminifer tübüller 30-70 cm uzunluğa ve 150-250 μm çapa sahip olmakla beraber bir testiste yer alan tüm tübüller uç uca eklendiğinde toplam uzunluk 250m'dir. Tübüller arası boşlukta lenf ve kan damarları başta olmak üzere makrofajlar ve leydig hücreleri bulunmaktadır. Söz konusu leydig hücreleri testesteron hormonu üretiminden sorumludur. Seminifer tübül, seminifer epitel olarak adlandırılan yapıdan meydana gelir. Seminifer epitel yapısında sertoli ve spermatogenik olarak adlandırılan iki hücre yer almaktadır. Sertoli hücreleri germ hücrelerinin spermatogenez süresince beslenmesini sağlayarak spermatozoa oluşumunu sağlar. Leydig hücreleri ise testesteron üretiminden sorumludur (92–95).

Epididim

Epididim her iki testisin arka tarafında bulunan uzun spermatik kanalların kıvrımlı bir bölümüdür. Epididim anatomik olarak uzatıldığında 3-4 metre uzunluğunda ve baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşan bir yapıdır. Epididim sperm taşınması, depolanması ve

olgunlaşmasından sorumludur. Spermler epididim yapısında meydana gelen kasılma hareketleri ile testisten vas deferans kanalına taşınır bu taşınma sırasında sperm eş zamanlı olarak morfolojik ve fonksiyonel değişime uğrayarak hareket yeteneği kazanır (92).



Şekil 5.Testis Anatomisi (96).

Erkek iç üreme yapıları

Erkek üreme sisteminde yardımcı organlar olarak da adlandırılan iç organları şu şekildedir.

Vas deferans, ejakülasyon kanallarıı üretra

Vas deferans epididimden pelvik boşluğa (mesanenin hemen arkası) giden kaslı bir tüptür. Ejekülasyona hazırlık olarak olgun spermin üretraya taşınmasından sorumludur. Ejakülasyon kanalları vas deferans ve seminal vezikülden gelen kısa bir kanalın birleşiminden oluşmaktadır. Ejakülasyon kanalları üreme ve boşaltım sisteminin dışarıya açıldığı üretraya bağlanmaktadır. Üretra mesanedeki idrarı vücut dışına taşımakla görevli tüptür. Erkeklerde ek olarak üretra meninin dışarı atılmasını sağlamaktadır (92).

Seminal vezikül, prostat ve bülboüretral bezler

Seminal veziküller vas deferansa bağlı kese benzeri yapılardır. Seminal veziküller fruktoz bakımından zengin bir sıvı salgılamaktadır. Şeker içeriği zengin olan bu sıvı spermlerin enerji kaynağıdır ve sperm hareketine yardımcı olmaktadır. Seminal vezikül sıvısı boşalma hacminin (boşalma sıvısı) çoğunu oluşturmaktadır. Prostat bezi idrar kesesinin altında ve rektum önünde yer alan ceviz büyüklüğünde 20 gram ağırlığında bir organdır. Prostat bezi asit fosfataz, sitrik asit ve fibrinolizin içeren alkali sıvı üreterek boşalma sıvısı hacminde artış sağlarken aynı zamanda spermin beslenmesine de yardımcı olmaktadır. Atılacak olan meniyi taşıyan üretra prostat bezinin merkezinden geçer. Bulboüretral bezler veya Cowper bezleri üretra yanında prostat bezinin hemen altında bulunmaktadır. Bulboüretral bezler doğrudan üretraya boşalan berrak ve kaygan bir sıvı üretir. Bu sıvı üretrayı yağlamaya ve üretra içerisinde kalabilecek idrar nedeniyle meydana gelebilecek olan asiditeyi nötralize etmeyi sağlar (97).

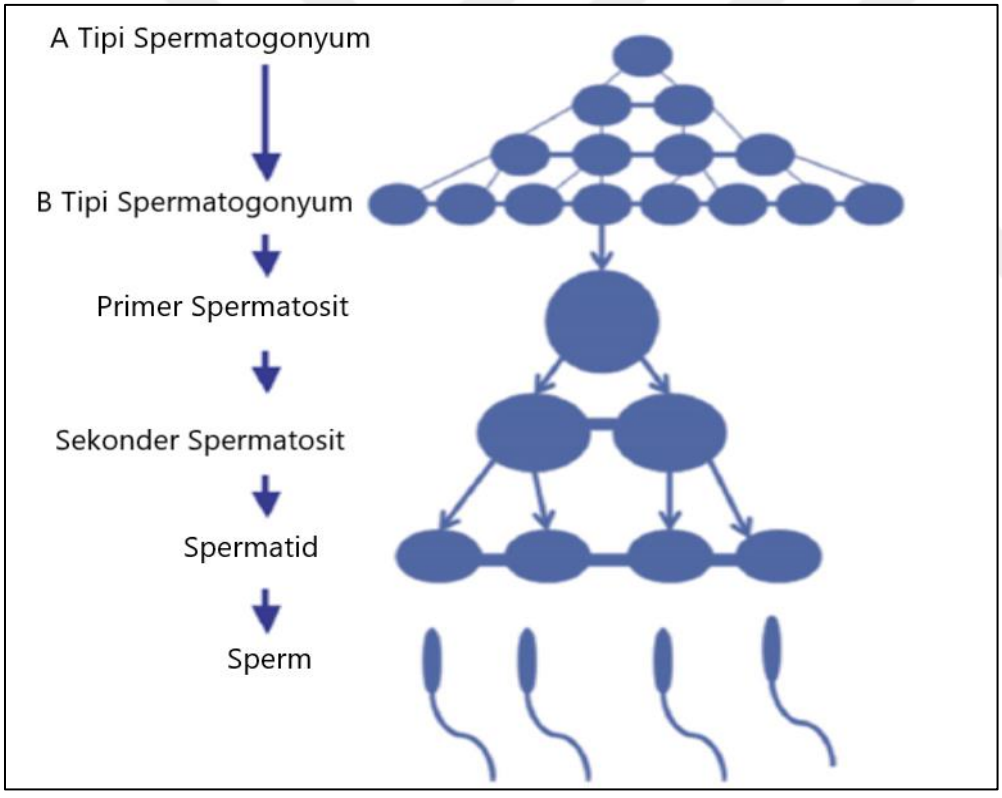
2.5.2. Spermatogenez

Testisler skrotum içerisinde yer alan 3-5 cm uzunluğunda ve 2-3 cm genişliğinde fasulye şeklindeki erkek cinsiyet bezleridir. Testis yapısında seminifer tübülleri olarak adlandırılan ve epididimis ile bağlantılı kanallar mevcuttur. Seminifer tübüller yapılarında spermatogonyum kök hücreleri ile kompleks salgı hücreleri olan sertoli hücrelerini içerir.

Testis hem ekzokrin hem de endokrin bez olup birincil erkek cinsiyet hormonu olan testosteron yapımından ve sperm üretiminden sorumludur. Spermin oluşum ve gelişim süreci olarak adlandırılan spermatogenez testis içerisindeki seminifer tübüllerinde meydana gelmektedir. Spermatogenez erkeklerde sürekli ve yüksek sayılarda meydana gelir. Her gün testislerde seminifer tüp yapısında hücre bölünmesi ve olgunlaşması gerçekleşmektedir. Spermatogenez birden çok adımda ve otokrin, parakrin ve endokrin düzenleyicilerin kontrolü altındadır ve mitoz bölünme ile başlayıp sırasıyla mayoz, genetik materyalde rekombinasyon ve morfolojik

olgunlaşma ile son bulurken; spermatogenezin başlaması ve devamlılığı pitüiter hormonlar olarak adlandırılan FSH ve LH etkisi altında gerçekleşir (98–100).

Sperm oluşumu seminifer tüplerinde bulunan spermatogonyal kök hücrelerinin mitoz bölünmesi ile başlar ve ortalama 74 gün sürer. Spermatogonyal kök hücrelerinin bölünmesi sonucu A tipi hücreler meydana gelir. Hücrelerden bazıları kök hücre yenilenmesi sağlarken bir kısmı da sperm oluşumu için farklılaşarak B tipi spermatogonyum hücresine dönüşür. Oluşan her spermatogonyum hücresi mitoz bölünme geçirerek 16 birincil spermatosit hücresi meydana getirir. Oluşan birincil spermatositler Mayoz I ile iki ikincil spermatosit meydana getirir.



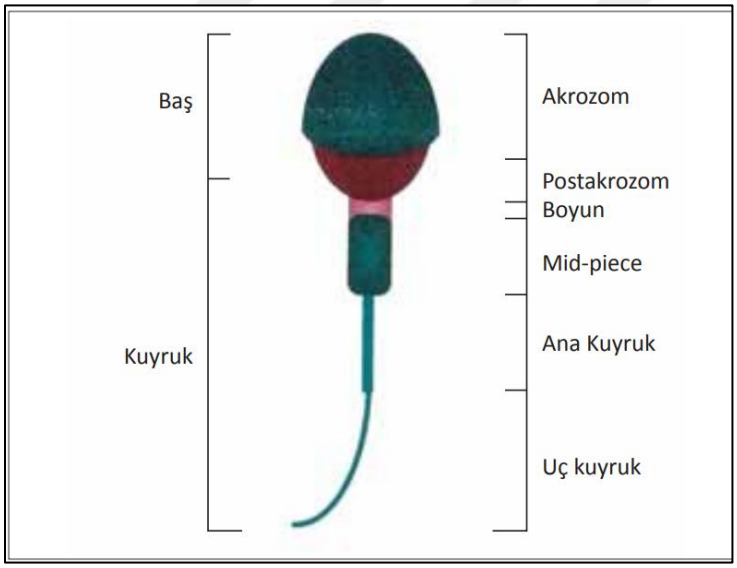
Şekil 6.Spermatogenez (91).

İkincil spermatositlerin her biri ise Mayoz II sonucunda erken spermatid meydana getirmektedir. Oluşan bu erken spermatid yapıları ise spermiyogenesis sürecinde farklılaşarak; sitolojik ve morfolojik değişikliğe uğrar. Sitolojik değişim süresince spermatid hücresinde kromatin yeniden

düzenlenmesi, akrozom gelişimi ve tüm sitoplazma sıvısının uzaklaştırılması gerçekleşir. Söz edilen morfolojik değişim sonunda her spermatid baş, orta kısım ve kuyruk yapısına sahip olur. Spermatid morfolojisinde meydana gelen değişimler sonucunda seminifer tübülün lümenine ince uzun olgun spermatidler salınır (101,102).

2.5.3. Sperm yapısı

İnsan spermi 60 µm uzunluğunda olup baş, boyun ve kuyruk olarak adlandırılan üç kısımdan meydana gelir. Spermde baş kısmı 4 µm boy ve 3 µm genişlikte ve oval formasyondadır. Kalıtım materyali spermin baş kısmında oldukça kompakt ve nükleus içerisindedir. Sperm boynu sperm başı ve sperm kuyruğu arasında yer almaktadır. Sperm kuyruğu 45-50 µm uzunluğunda olmakla beraber kuyruk, boyun, orta bölüm, esas ve son parça olarak adlandırılan 4 kısımdan meydana gelir (103,104).



Şekil 7. Sperm Morfolojisi (105).

2.5.4. Adli bilimlerde semen tespit yöntemleri

Cinsel saldırı olaylarında semenin kesin ve etkili tespiti kritik öneme sahiptir. Söz konusu tespit için semende yer alan biyokimyasal markırlar analiz edilir. Markırlar sırasıyla asit fosfataz,

prostat spesifik antijendir. Cinsel saldırı vakaları incelemelerinde; asit fosfataz ve Prostat spesifik antijen testi semen varlığını işaret etse de mikroskobik incelemede spermin gözlenmesi delildeki sperm varlığını kesin olarak kanıtlamaktadır (106,107).

Asit Fosfataz (AP) Testi

Semen Asit Fosfataz (Seminal Acid phosphatase, SAP) enzimi, glikoprotein yapıda iki alt birimden oluşmakla beraber 10.000 ile 120.000 arasında değişen ağırlıkta ve hidrofilik özelliktedir. AP analizi ile semen varlığı hızlı ve basit şekilde belirlenmektedir. AP seminal sıvıda yüksek miktarda bulunmakla beraber başka vücut sıvılarında da yer aldığından test çok duyarlı ancak özgül değildir (108).

Asit fosfataz brentamin testi, semen varlığının tespit işlemi yüzey üzerinde sorgulanan materyal direk veya indirekt olarak analiz edilmektedir. Direk-doğrudan tespit işleminde ekstrakttan 1 damla filtre kağıdına emdirilir. İndirek tespitte; nemlendirilmiş filtre ya da kurutma kağıdı semen lekesinin üzerine bastırılarak geçişi sağlanır ve ardından tespit kağıdına emdirilir. Sonrasında şüphelenilen materyal eğer semen içeriyorsa asit fosfataz bulunduracağından, asit fosfataz varlığında rengi turuncudan mora değişen bir kimyasal reaktifle test edilir. Bu renk değişimi substrat olarak kullanılan a-naftil fosfatın hidroliz sonucunda a- naftol fosfat oluşturmasından ileri gelmektedir (107).

Prostat Spesifik Antijen

Prostat spesifik antijen (Prostate Spesific Antigen, PSA) prostat epitel hücreleri tarafımdan üretilen glikoprotein yapıda semen belirtecidir. PSA birden çok vücut sıvısında bulunmaktadır ancak en fazla seminal plazmada yer aldığından adli olgularda semen tespitinde kullanılmaktadır (109).

Y Kromozomu

Y kromozomu erkeklere özgü bir kromozomdur, bu özellik Y kromozomunu cinsel saldırı adli vaka çalışmaları, babalık testi, kayıp şahıs soruşturmaları ve tarihsel soy araştırmalarında ön plana çıkarmıştır (110). Baba tarafından akraba tüm erkeklerde Y kromozomu aynı olmakla beraber aradaki fark sadece mutasyondan kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla babadan oğula direk Y kromozomu geçişi olacağından Y kromozomu analizleri yapılmaktadır. Babalık davalarında babadan alınan örnekte analiz gerçekleştirilir. Babanın bulunmadığı olgularda ya da babalanın ölü olduğu durumlarda feth-i kabire gerek olmadan baba soyundan gelen bir erkekten Y-STR analizi yapılması ile baba soyunun bilgisine ulaşılabilmektedir. Günümüzde bu amaçla optimizasyonu sağlanan 17 Y-STR lokusunun analizi yapılmaktadır (111,112).

3. Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada yaşa bağlı olarak gen ekspresyon değişiminden yola çıkılarak semenden yaş tahmini yapılması amacıyla yaşla yüksek korelasyon değerlerine sahip olduğu belirlenen 12 CpG lokusu çalışılmıştır. Söz konusu 12 CpG lokusunu PARP14(chr3:122401343), C5orf25(chr5:175664221), cg23488376(chr19:48367266), MXRA5(chrX:3236105), PFKFB3(chr10:6185502), DLL1(chr6:170596856), NOX4(chr11:89322851), cg12837463(chr7:35300228), TTC7B(chr14:91283606), KCNA7(chr19:49577206), NKX2-1(chr14:36985063) ve SYNE4(chr19:36499326) içeren multipleks panel oluşturulmuştur.

Çalışmanın laboratuvar aşamasına geçilmeden öncesinde gönüllülük esasına dayalı olarak ‘’Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Ek-6)’’nu imzalayan kişilerden örnekleri alınmıştır. 115 kişinin DNA izolasyonu yapılmış ardından miktar tayin adımı tamamlanmıştır. Bisülfit dönüşümü basamağına µL’de 10 ng DNA olacak şekilde başlanmıştır. Bisülfit dönüşüm basamağı sonrasında 12 bölgeye ait primer dizilerini içeren karışım hazırlanmış ve PCR yapılmıştır. PCR adımının kontrolünü sağlamak amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmış ardından birinci saflaştırma gerçekleştirilmiştir. SNaPshot reaksiyonu, ikinci saflaştırma adımları da tamamlanarak PCR ürünlerinin analizi için ABI PRISM 310 cihazında elektroforez gerçekleştirilmiştir. Gene Mapper v3.2. programında genotiplerin belirlenmesinin ardından Microsoft Excel (Microsoft 365 ProPlus)de piklere ait pik yükseklikleri (RFU değerleri) Şekil 8’de yer alan denklemde yerine koyularak, metilasyon oranları ve metilasyon değerleri ile yaş arasındaki korelasyon değerleri hesaplanmıştır. Sonrasında ise IBM SPSS Windows programında iki farklı lineer regresyon yöntemi (stepwise ve enter) kullanılarak yaş tahmini modeli oluşturulmuş ve modellerin validasyonu sağlanmıştır.

Kullanılan Cihazlar

Vorteks (Weightlab Instruments)

Kuru Isıtıcı blok (Bio TDB100-Biosan)

Otomatik Pipet Seti (Eppendorf) (2,5 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)

Mikrosantrifüj (Unicfuge-5)

Florometre (Qubit 4-Thermo Fisher)

Thermal Döngü Cihazı (SimpliAmp™ Thermal Cycler-Applied Biosystems™)

Bilgisayar kontrollü genetik analizör 310/3130*xl* (ABI PRISM 310/3130*xl*

DNA/RNA UV biyogüvenlik kabini (Kabin UVT/T-MAR-Grand Bio)

Buzdolabı (Vestel)

Derin dondurucu (Delta)

Kullanılan Kitler ve Kimyasallar

E.Z.N.A. ® Tissue DNA Kit (Omega)

Quant-it™ dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen)

EZ.® DNA-Methylation- Gold Kit™ (ZymoResearch)

AmpliTaq Gold DNA Polymerase with buffer II ve $MgCl_2$ (

SNaPshot Multipleks Kit (ThermoFisher Scientific)

Exo-Sap-it Kit (Thermo Fisher Scientific)

rAPid Alkaline Phosphatase (rAPid AP) (Thermo Fisher)

dNTPs (GeneAmp dTTP mix with Dttp / Applied Biosystem™)

DDT

Etil Alkol (%96) Tekkim

Zefiran (Dermosept)

(1X) TBE Buffer

Agaroz (Invitrogen™)

RedSafe Nucleic Acid Staining Solüsyon (iNtRON Biotechnology Inc.)

Loading Buffer (Bromophenol Blue) (ThermoFisher Scientific)

DNA Ladder (100bp) (Invitrogen™)

10X EDTA Buffer (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) (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)

3.1. Örneklerin Toplanması

Bu araştırma, 16 Mart 2021 tarihinde toplanan T.C. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca değerlendirilmiş olup *Sayı: E-59491012-604.01.02-54119* (Ek-7) sayılı kararla uygun bulunmuştur. Bu araştırmada örnekler İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Androloji Polikliniğine başvuran infertilite, erken boşalma, kronik prostatit tanılı hastalardan çalışmaya rıza gösteren 20-71 yaş

grubu aralığında olan ve aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan 115 erkek gönüllüden toplanmıştır. Gönüllülere etik kurulda belirlenmiş olan kriterlere uygun olarak hazırlanan bilgilendirilmiş onam formu okutulup imzalatılmıştır. Gönüllülerden elde edilen ejekülat örnekleri steril kaplarda alınmış ve 2,5 ml tüplerde kullanım süresine kadar -20C^{o}'de tutulmuştur.

Araştırmanın laboratuvar aşamaları aşağıda özetlenmiştir.

1. DNA İzolasyonu
2. DNA Miktar Tayini
3. Bisülfit Dönüşümü
4. PCR
5. Agaroz Jel Elektroforezi
6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması
7. SNaPshot Reaksiyonu
8. SNaPshot Reaksiyon ürünlerinin saflaştırılması
9. SNaPshot Reaksiyon ürünlerinin ABI 310 ile elektroforezi ve sonuçların değerlendirilmesi
10. Sonuçların İstatistiksel Analizleri

3.2. DNA İzolasyonu

Çalışmada spermden DNA eldesi için E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega) kullanıldı. Kullanılan kit silika temellidir: DNA spin kolona bağlanırken diğer maddeler yıkama ile ortamdan uzaklaştırılır ardından kolona tutunan DNA elüsyon tamponu ile yıkanarak elde edilir. DNA izolasyonunda kullanılan prosedür Ek 1 'de verilmiştir.

3.3. DNA Miktar Tayini

DNA miktar tayininde florometrik ölçüm yapan Qubit 4 (Thermo Fisher) cihazı kullanıldı. Quant-it™ dsDNA HS (High sensitive/Invitrogen) kiti kullanılarak hazırlanan karışım 260 nm

dalga boyunda cihazda yüksek hassasiyet ve doğrulukta ölçüm gerçekleştirildi. DNA miktar tayininde kullanılan prosedür Ek 2'de verilmiştir.

3.4. Bisülfit Dönüşümü

Bisülfit dönüşümü ile metillenmiş ve metillenmemiş sitozinlerin ayrımı sağlanır. Metile sitozinler aynen kalırken metillenmemiş sitozinler sodyum bisülfit ile reaksiyona girerek urasile dönüşür. Bisülfit dönüşümü için EZ.® DNA-Methylation-Gold Kit™ (ZymoResearch) kullanıldı. Bisülfit dönüşümünde kullanılan prosedür Ek 3'te verilmiştir.

3.5. PCR

Çalışmada yaş ile ilişkili olduğu belirlenen semene spesifik farklı gen bölgelerinde yer alan 12 CpG noktası (Tablo 1) çalışıldı. Minisekanslama SNaPshot yöntemi tespit yöntemi olarak tercih edildi. Bu yöntemde önce bir PCR reaksiyonu ile DNA ürünleri belirli aralıkta çoğaltılırken ardından tek baz uzaması temeline dayanan SNaPshot reaksiyonu uygulandı. Her PCR sonrasında fazla primer ve dNTP'lerin ortamdan uzaklaştırılması için saflaştırma işlemi yapıldı. PCR ve SNaPshot reaksiyonları için primer dizaynı yapılarak multipleks panel oluşturuldu.

Tablo I. Yaş tahmininde kullanılan hedef CpG noktaları, gen bölgeleri, kromozomal pozisyonları ve çalışmadaki kodları

GEN BÖLGESİ	CPG ID	GRCH 37 KROMOZOM POZİSYONU	ÇALIŞMADAKİ KODU
PARP14	Cg14750551	Chr3:122401343	S1
C5ORF25	Cg16256592	Chr5:175664221	S3
NONE	Cg23488376	Chr19:48367266	S4
MXRA5	cg00881487	chrX:3236105	S5
PFKFB3	Cg18989491	Chr10:6185502	S6

DLL1	Cg13494348	Chr6:170596856	S7
NOX4	Cg06979108	Chr11:89322851	S8
NONE	Cg12837463	Chr7:35300228	S9
TTC7B	Cg06304190	Chr14:91283606	S10
KCNA7	Cg03564727	Chr19:49577206	S11
NKX2-1	Cg18686206	Chr14:36985063	S12
SYNE4	Cg18542098	Chr19:36499326	S13

Tablo 1'de belirtilmiş olan CpG noktalarını çoğaltmak üzere tasarlanan primerlerden elde edilen karışım ve Tablo2'de belirtilen PCR bileşenleri kullanılarak Tablo 3'teki koşullarda bisülfit dönüşümü uygulanan DNA örnekleri çoğaltıldı.

Tablo II. PCR Bileşenleri

PCR Bileşenleri	**Hacim/Reaksiyon (µL)**
Master Mix	6,25 µL
$MgCl_2$	1 µL
Primer Mix	1,5 µL
DNA Örneği	2 µL
Total Hacim	10,75 µL

Tablo III. PCR Koşulları

Sıcaklık	**Zaman**	**Döngü Sayısı**
95 °C	11dk	
94°C	20sn	
57°C	1dk	34 Döngü
72°C	30sn	
72°C	7dk	
4	∞	

3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR aşamasının başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla, negatif yüklü DNA molekülünün katottan anoda göç etmesi temeline dayanan jel elektroforez işlemi uygulandı. Agaroz Jel hazırlanışında kullanılan prosedür Ek 4'te verilmiştir.

3.7. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR sonrasında bağlanmayan primerler ve dNTP'lerin uzaklaşması için saflatırma işlemi uygulandı. Primer hidrolizi için DNA'yı hidrolize eden Ekzonükleaz 1 (Ekzo I) ve dNTP uzaklaşmasında ise rAPid alkalin fosfataz (rAPid AP) enzimi kullanıldı. Tablo 4'te belirlenen miktarda oluşturulan karışım Tablo 5'te belirtilen koşullarda termal döngü cihazında reaksiyona sokuldu.

Ekzo-rAPid Karışımı Hazırlanması: Her PCR ürünü için 0,25 µL ExoI ve 0.75 µL rAPid AP olacak şekilde enzim karışımı hazırlandı.

Tablo IV. PCR Ürünleri Saflaştırma Bileşenleri

PCR Ürünleri Saflaştırma Bileşenleri	
Reaktifler	Miktar
PCR Ürünü	2,5 µL
EXO-SAPit	1 µL

Tablo V. PCR Ürünü Saflaştırma Aşaması Termal Döngü Koşulları

PCR Koşulları	Süre
37 °C	45 dakika
80°C	15 dakika
4°C	∞

3.8. SNaPshot Reaksiyonu (Minidizileme)

Tek baz Saflaştırılan DNA örnekleri üzerine SNaPshot tek baz uzama primer karışımı kullanıldı ve reaksiyon tek tüpte gerçekleştirildi.

Tablo VI. SNaPshot PCR Bileşenleri

SNaPshot PCR Bileşenleri	
Reaktif	Miktar
Saflaştırılmış Örnek	2 µL
SNaPshot	1 µL
Primer Mix	1,5 µL
Total Hacim	4,5 µL

Tablo VII. SNaPshot PCR Aşaması Termal Döngü Koşulları

PCR Koşulları	**Süre**	**Döngü Sayısı**
96°C	10sn	
53°C	5sn	30 Döngü
60°C	30sn	
4°C	∞	

3.9. İkinci PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

SNaPshot Reaksiyonu sonrasında ortamda yer alan floresan işaretli ddNTPlerin inaktivasyonu SAP enzimi kullanılan Tablo 8'deki reaktiflerle gerçekleştirildi. Tablo 9'daki koşullarda PCR gerçekleştirildi.

Tablo VIII. SNaPshot PCR Ürünleri Saflaştırma Reaktifleri

SNapShot Ürünleri Saflaştırma Bileşenleri	
Reaktifler	Miktar
SNaPshot Ürünü	Örneğin Tamamı
rAPid AP	1 µL

Tablo IX. SNaPshot PCR Ürünleri Saflaştırma Koşulları

PCR Koşulları	Süre
37°C	80dk
85°C	15dk
4°C	∞

3.10. Saflaştırılan SNaPshot Ürünlerinin ABI PRISM 310 İle Elektroforezi

ABI Prism 310 Genetik Analizör (Applied Biosystems) kapiller elektroforez cihazı ile örnek elektroforezi, görüntüleme, tipleme ve sonuçların değerlendirilmesi yapıldı. SAP uygulanmış olan 1,5 µL PCR ürünleri kapiller elektroforez cihazına yüklenmeden önce 9,5 µL Hi-Di Formamid-Liz 120 ile karıştırıldı.

Hi-Di Formamid- Liz120 Karışımının Hazırlanması: Her PCR ürünü için 10µL Hi-Di Formamid ve 0,3 µL GeneScan-120 Liz internal size standart ile karıştırıldı.

Tablo X. Elektroforez Reaktifleri

Elektroforez Bileşenleri	
Saflaştırılan PCR Ürünü	1,5 µL
Hi-Di Formamid-Liz 120	9,5 µL

Yürütme öncesi Data Collection Software 3.0 kullanılarak örnek listesi oluşturuldu ve GeneScan E5 modül parametreleri ayarlandı. 36 cm kapiller ve POP-4 polimeri kullanılarak Tablo 11'de yer alan parametrelerde yürütüldü.

Tablo XI. GeneScan E5 modül parametreleri

Parametre	GS POP-4 (1ml) E5 modül
Metriks	DS02
Injeksiyon zamanı	5sn
Elektroforez voltajı	15 kV
Yürütme zamanı	24 dk
Yürütme sıcaklığı	60 °C

Şırınga pompalama süresi 150 sn

Kapiller elektroforezde yürütülen örnek analizi Genemapper v3.2'de yapıldı. Örnekler LIZ-120 (15, 20, 25, 35, 50, 62, 80, 110, ve 120) iç standart ile kontrol edildi. CpG noktalarının yeri tespit edilerek sitozin ve timin piklerinin RFU (rölatif floresans ünitesi) değerleri tespit edildi.

3.11. Korelasyon Değerlerinin Hesaplanması ve CpG Noktalarına Ait Lineer Regresyon Grafiklerinin Çizimi

115 kişiye ait örneklerin elektroforezi sonucunda 12 CpG bölgesinin sitozin ve urasil RFU değerleri ile Şekil 8'de yer alan formül kullanılarak metilasyon oranları hesaplandı.

115 kişiye ait metilasyon oranı ile yaşları arasındaki ilişki incelenerek korelasyon katsayıları (0-1) Microsoft Excel (Microsoft 365 ProPlus) programında hesaplandı ve kişilerin lineer regresyon grafikleri çizildi.

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

Şekil 8. Metilasyon oranı hesaplama denklemi

3.12. İstatistik Analizler

Her bir belirtecin gerçek yaşla korelasyonu Pearson Korelasyon Testi ile araştırıldı. Belirteçlerin gerçek yaşla olan bağlantısını sağlayacak model araştırması için gerçek yaş bağımlı değişken olarak kabul edilerek, aşamalı (stepwise) ve tüm değişkenlerin dahil olduğu (enter) çoklu regresyon analizleri ayrı ayrı uygulandı. Analiz sonucunda elde edilen yaş tahmin modellerinin validasyonu için, model formülasyonlarının bu grup örnekleri üzerine uygulanmasıyla tahmini yaş değerleri elde edildi. Tahmini yaş değerlerinin gerçek yaş değerleri ile olan farklılığı, bağımsız örnekler için iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi ile araştırıldı. Tüm analizler IBM SPSS 21.0 programında gerçekleştirildi.

4. Bulgular

Çalışmada 12 CpG noktası (PARP14, C5orf25, cg23488376, MXRA5, PFKFB3, DLL1, NOX4, cg12837463, TTC7B, KCNA7, NKX2-1 ve SYNE4) kullanılarak 20-71 yaş aralığındaki 115 gönüllüye ait sperm örnekleri kullanılarak metilasyon profilleri belirlendi. Veriler Excel ve SPSS programları kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi.

4.1. Semen Örneklerinin DNA İzolasyonu, DNA Miktar Tayini

115 erkeğe ait semen örneğinin DNA izolasyonu sonrası yapılan miktar tayini sonuçları Tablo 12'de verilmekle beraber örneklerden en fazla 844 ng/ µL, en az ise 1,48 ng/ µL DNA eldesi sağlanmıştır.

Tablo XII. DNA Miktarları

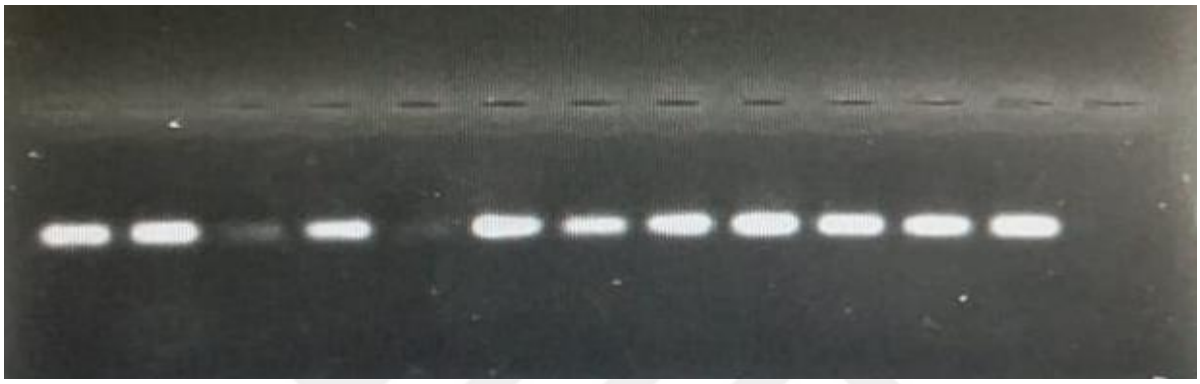
ÖRNEK SIRASI	ÖRNEK KODU	DNA MİKTARI	ÖRNEK SIRASI	ÖRNEK KODU	DNA MİKTARI
1	**T21-XY-010**	113 ng/ µL	**59**	**T21-XY-089**	40,6 ng/ µL
2	**T21-XY-011**	190 ng/ µL	**60**	**T21-XY-092**	9,1 ng/ µL
3	**T21-XY-013**	99,2 ng/ µL	**61**	**T21-XY-093**	36,6 ng/ µL
4	**T21-XY-014**	148 ng/ µL	**62**	**T21-XY-094**	64 ng/ µL
5	**T21-XY-015**	69,8 ng/ µL	**63**	**T21-XY-095**	3,44 ng/ µL
6	**T21-XY-016**	83.6 ng/ µL	**64**	**T21-XY-096**	246 ng/ul
7	**T21-XY-017**	50,6 ng/ µL	**65**	**T21-XY-201**	240 ng/ µL
8	**T21-XY-018**	48,2 ng/ µL	**66**	**T21-XY-202**	31,6 ng/ µL
9	**T21-XY-019**	16 ng/ µL	**67**	**T21-XY-203**	84,6 ng/ µL
10	**T21-XY-020**	292 ng/ µL	**68**	**T21-XY-208**	506 ng/ µL
11	**T21-XY-022**	187 ng/ µL	**69**	**T21-XY-209**	75,8 ng/ µL
12	**T21-XY-023**	15.6 ng/ µL	**70**	**T21-XY-210**	99,2 ng/ µL

13	**T21-XY-024**	242 ng/ µL	**71**	**T21-XY-212**	286 ng/ µL
14	**T21-XY-025**	107 ng/ µL	**72**	**T21-XY-213**	107 ng/ µL
15	**T21-XY-026**	112 ng/ µL	**73**	**T21-XY-215**	79,8 ng/ µL
16	**T21-XY-027**	7,34 ng/ µL	**74**	**T21-XY-218**	322 ng/ µL
17	**T21-XY-028**	300 ng/ µL	**75**	**T21-XY-219**	54,2 ng/ µL
18	**T21-XY-029**	101 ng/ µL	**76**	**T21-XY-221**	1,48 ng/ µL
19	**T21-XY-030**	42 ng/ µL	**77**	**T21-XY-222**	33,2 ng/ µL
20	**T21-XY-031**	110 ng/ µL	**78**	**T21-XY-223**	54 ng/ µL
21	**T21-XY-032**	28 ng/ µL	**79**	**T21-XY-228**	130 ng/ µL
22	**T21-XY-033**	20,6 ng/ µL	**80**	**T21-XY-229**	81,8 ng/ µL
23	**T21-XY-035**	6,92 ng/ µL	**81**	**T21-XY-238**	176 ng/ul
24	**T21-XY-036**	4,10 ng/ µL	**82**	**T21-XY-240**	156 ng/ µL
25	**T21-XY-037**	30,5 ng/ µL	**83**	**T21-XY-241**	183 ng/ µL
26	**T21-XY-038**	24,8 ng/ µL	**84**	**T21-XY-244**	8,56 ng/ µL
27	**T21-XY-039**	238 ng/ µL	**85**	**T21-XY-246**	26,4 ng/ µL
28	**T21-XY-040**	21,4 ng/ µL	**86**	**T21-XY-247**	844 ng/ µL
29	**T21-XY-041**	27.2 ng/ µL	**87**	**T21-XY-248**	420 ng/ µL
30	**T21-XY-042**	85,2 ng/ µL	**88**	**T21-XY-249**	9,5 ng/ µL
31	**T21-XY-043**	47,2 ng/ µL	**89**	**T21-XY-250**	68,2 ng/ µL
32	**T21-XY-044**	10,5 ng/ µL	**90**	**T21-XY-251**	39 ng/ µL
33	**T21-XY-046**	198 ng/ µL	**91**	**T21-XY-253**	105 ng/ µL
34	**T21-XY-047**	22,4 ng/ µL	**92**	**T21-XY-254**	11,6 ng/ µL
35	**T21-XY-048**	71,8 ng/ µL	**93**	**T21-XY-255**	172 ng/ul
36	**T21-XY-049**	38 ng/ul	**94**	**T21-XY-256**	16,9 ng/ µL
37	**T21-XY-**	166 ng/ µL	**95**	**T21-XY-**	80 ng/ µL

	051			**258**	
38	**T21-XY-052**	107 ng/ µL	**96**	**T21-XY-261**	74,8 ng/ µL
39	**T21-XY-053**	206 ng/ µL	**97**	**T21-XY-262**	123 ng/ µL
40	**T21-XY-054**	153 ng/ µL	**98**	**T21-XY-270**	3,42 ng/ µL
41	**T21-XY-055**	196 ng/ µL	**99**	**T21-XY-275**	76,2 ng/ µL
42	**T21-XY-057**	99,4 ng/ µL	**100**	**T21-XY-276**	26 ng/ µL
43	**T21-XY-058**	94,8 ng/ µL	**101**	**T21-XY-277**	20,8 ng/ µL
44	**T21-XY-059**	24.8 ng/ µL	**102**	**T21-XY-278**	190 ng/ µL
45	**T21-XY-060**	200,6 ng/ µL	**103**	**T21-XY-281**	97,6 ng/ µL
46	**T21-XY-061**	15 ng/ µL	**104**	**T21-XY-282**	70 ng/ µL
47	**T21-XY-062**	84,2 ng/ µL	**105**	**T21-XY-283**	42,8 ng/ µL
48	**T21-XY-063**	290 ng/ µL	**106**	**T21-XY-285**	74,8 ng/ µL
49	**T21-XY-064**	88,2 ng/ µL	**107**	**T21-XY-286**	53,2 ng/ µL
50	**T21-XY-069**	124 ng/ µL	**108**	**T21-XY-287**	32,4 ng/ µL
51	**T21-XY-070**	87,4 ng/ µL	**109**	**T21-XY-288**	69,5 ng/ µL
52	**T21-XY-079**	162 ng/ µL	**110**	**T21-XY-289**	9,42 ng/ µL
53	**T21-XY-080**	27,8 ng/ µL	**111**	**T21-XY-292**	44 ng/ Ml
54	**T21-XY-082**	4,60 ng/ µL	**112**	**T21-XY-295**	348 ng/ µL
55	**T21-XY-084**	123 ng/ul	**113**	**T21-XY-297**	47,8 ng/ µL
56	**T21-XY-085**	14 ng/ µL	**114**	**T21-XY-298**	24,2 ng/ µL
57	**T21-XY-086**	25,4 ng/ µL	**115**	**T22-XY-054**	268 ng/ µL
58	**T21-XY-088**	57,4 ng/ µL			

4.2. Bisülfit Dönüşümü ve PCR Aşaması

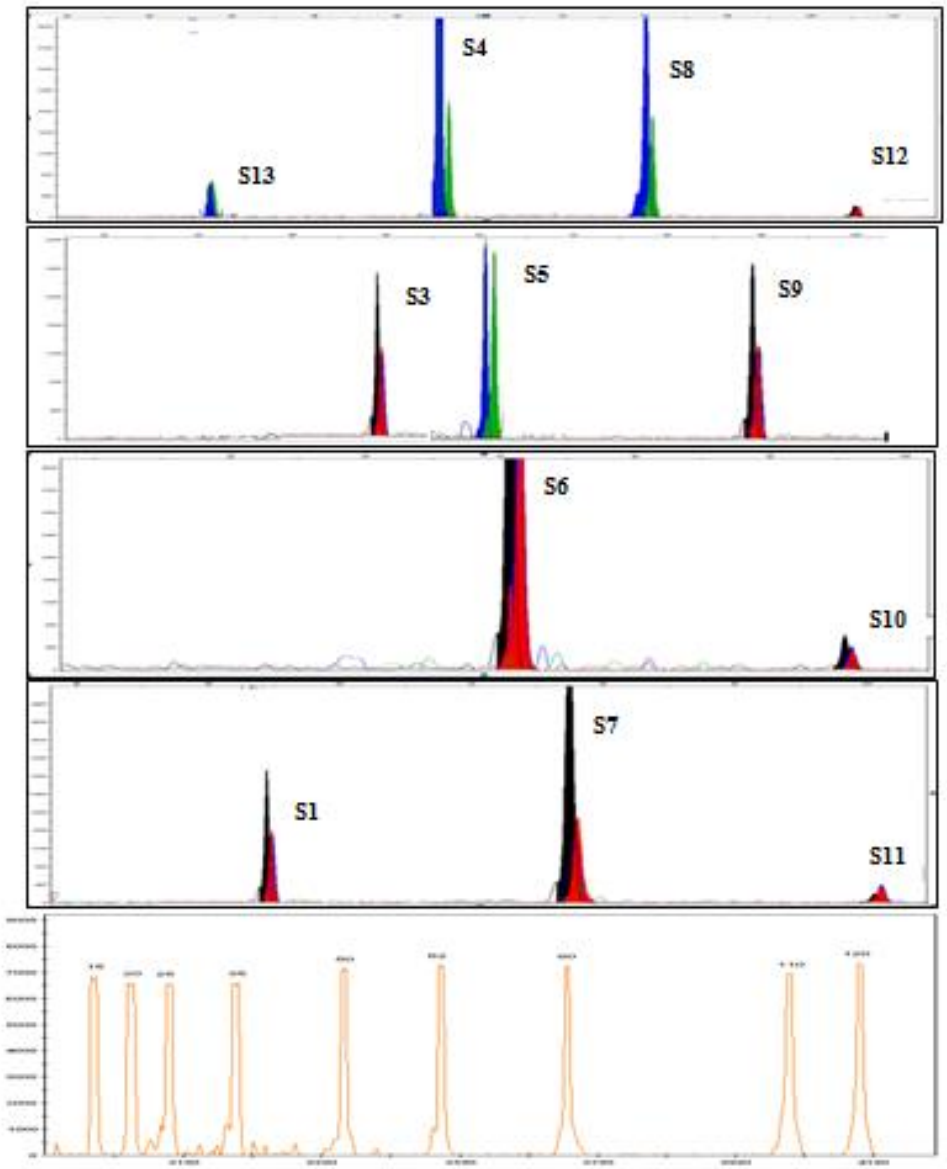
115 kişiden alınan semen örneklerinin DNA izolasyonu sonrası miktar tayini ve ardından bisülfit dönüşümü gerçekleştirildi. Bisülfit dönüşümü sağlanmış örneklere PCR aşaması uygulandı. PCR reaksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü için PCR ürünleri agaroz jelde yürütüldü ve elde edilen jel görüntülerinden bir örneği Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 9. PCR Sonucu elde edilen ürünlerin örnek bir jel görüntüsü.

4.3. Elektroforez Aşaması

Çalışmanın ilk aşamasında optimizasyon yapıldı. Bu amaç doğrultusunda seçilen 12 CpG noktası belli gruplara ayrıldı ve elektroforegramdaki yerleri tespit edildi (Şekil 11). Buna göre beklenen ve gözlenen son ürün uzunlukları belirlendi ve değerlendirmeler bu uzunluklara göre yapıldı (Tablo XIII).

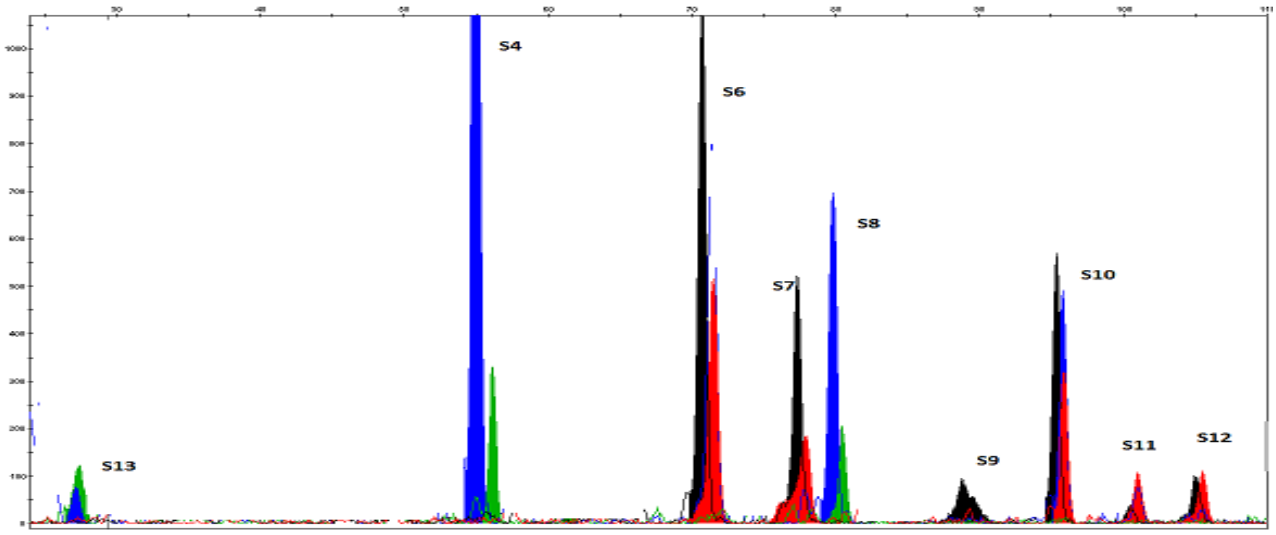


Şekil 10. Seçilen CpG noktalarının optimizasyon aşamasındaki elektroforegram görüntüleri.

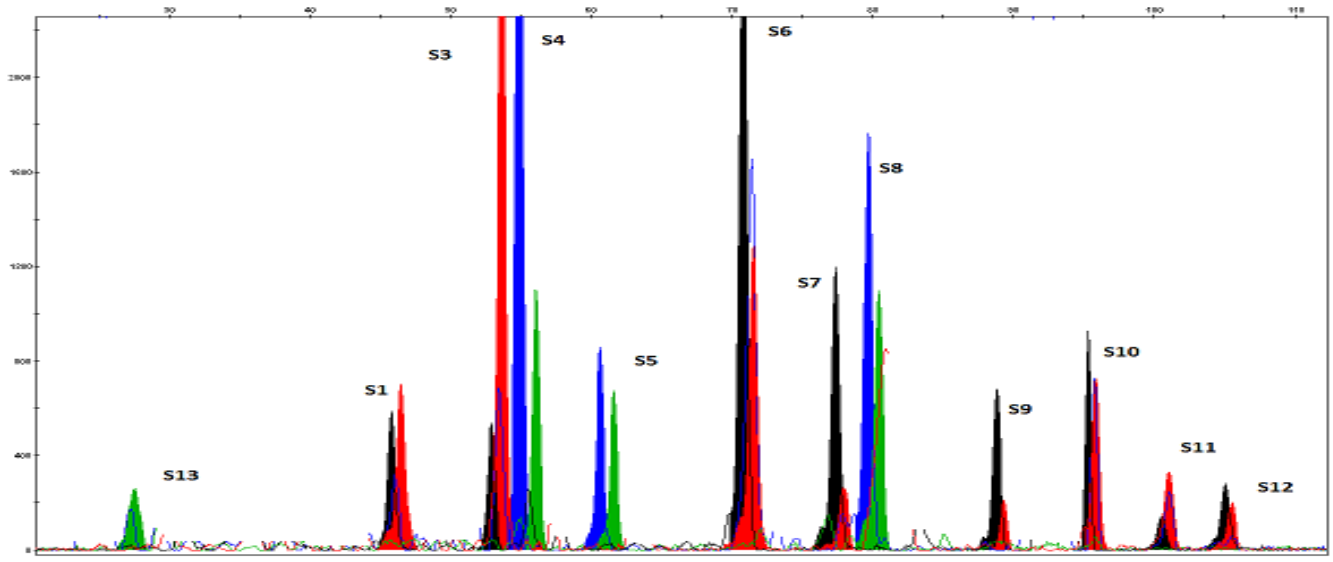
Tablo XIII. CpG noktalarına ait elektroforegramda beklenen ve gözlenen değerler.

Çalışmadaki Numarası	Yön	CpG Noktası	Beklenen	Gözlenen
S1	F	PARP14	38	46
S3	F	C5orf25	46	52
S4	R	cg23488376	54	55
S5	R	MXRA5	60	60
S6	F	PFKFB3	66	70
S7	F	DLL1	72	77
S8	R	NOX4	78	79
S9	F	cg12837463	84	89
S10	F	TTC7B	90	95
S11	F	KCNA7	96	100
S12	F	NKX2-1	102	105
S13	R	SYNE4	22	26

Çalışmanın multipleks optimizasyon aşamasında single-plex PCR'da gözlenen fakat multiplekste gözlenemeyen CpG noktaları oldu (Şekil 11). Primer miktarları değiştirilerek tüm bölgelerin gözlendiği optimize 12 bölge CpG bölgesi olan multipleks panel elde edildi (Şekil 12). 12 bölgeye ait multipleks PCR primer konsantrasyonunda optimizasyon sağlandı. Optimize primer miktarları ile 115 gönüllüye ait örnek çalışıldı.



Şekil 11. S1, S3ve S5 bölgelerinin gözlemlenemediği elektroforegram.



Şekil 12.Tüm bölgelerin gözlendiği optimize bir elektroforegram örneği.

ABI PRISM 310 genetik analizör cihazında elektroforez sonrasında GeneMapper v3.2 programı ile 12 CpG lokusuna ait 115 kişinin metilasyon değerleri tespit edildi (Tablo XIV).

Tablo XIV. 115 kişiye ait metilasyon değerleri

Örnek Adı	SYNE4	PARP14	C5orf25	cg23488376	MXRA5	PFKFB3	DLL1	NOX4	cg12837463	TTC7B	KCNA7	NKX2-1
T21-XY-010	0,251445	0,34253	0,10818	0,633339	0,388662	0,568782	0,740466	0,427182	0,625126	0,482234	0,21194	0,467554
T21-XY-011	0,412844	0,495245	0,209718	0,727948	0,448423	0,560583	0,700809	0,622269	0,501136	0,57802	0,246089	0,314402
T21-XY-013	0,158649	0,362479	0,147491	0,639292	0,281509	0,381016	0,764398	0,350518	0,515854	0,354317	0,275354	0,505706
T21-XY-014	0,348148	0,504587	0,08955	0,762443	0,480541	0,546305	0,822222	0,523259	0,523324	0,573843	0,333333	0,331906
T21-XY-015	0,845758	0,449223	0,11811	0,558011	0,243622	0,576979	0,487852	0,166667	0,606557	0,580524	0,272136	0,336538
T21-XY-016	0,90743	0,459895	0,154795	0,668313	0,181892	0,332731	0,272811	0,627225	0,347241	0,473322	0,205327	0,31715
T21-XY-017	0,2	0,190646	0,0471	0,283998	0,142008	0,230352	0,57792	0,491371	0,490045	0,255741	0,113539	0,301669
T21-XY-018	0,104575	0,440451	0,21519	0,670968	0,411621	0,626345	0,777215	0,285199	0,678345	0,609756	0,34965	0,477178
T21-XY-019	0,877215	0,545496	0,13933	0,696447	0,366391	0,556232	0,303331	0,621016	0,462963	0,636956	0,214724	0,283773
T21-XY-020	0,411992	0,346518	0,193341	0,74485	0,255057	0,476547	0,768694	0,575983	0,481221	0,436503	0,195618	0,336115
T21-XY-022	0,831041	0,566879	0,260757	0,688819	0,439316	0,804765	0,819995	0,311745	0,757	0,694051	0,25804	0,515548

T21-XY-023	0,089552	0,219457	0,087209	0,397647	0,175401	0,301141	0,372677	0,717305	0,287025	0,312392	0,162385	0,30837
T21-XY-024	0,312292	0,298897	0,075499	0,280233	0,148325	0,306353	0,531785	0,792809	0,341661	0,279642	0,128545	0,270334
T21-XY-025	0,915593	0,405123	0,109149	0,448494	0,280459	0,465879	0,509978	0,665563	0,385928	0,370247	0,156431	0,375128
T21-XY-026	0,154639	0,405934	0,148874	0,501916	0,219474	0,430747	0,511009	0,317073	0,469799	0,478681	0,15041	0,384615
T21-XY-027	0,2	0,336406	0,159967	0,440476	0,181818	0,469231	0,513961	0,326484	0,50554	0,508456	0,181586	0,259939
T21-XY-028	0,237811	0,186467	0,068953	0,324008	0,219469	0,279793	0,455403	0,796992	0,28923	0,296378	0,105859	0,285437
T21-XY-029	0,74605	0,27897	0,109489	0,327739	0,187831	0,338727	0,488051	0,473721	0,441945	0,362027	0,118292	0,323276
T21-XY-030	0,679715	0,426331	0,130238	0,523438	0,18334	0,539434	0,513686	0,176064	0,481893	0,464804	0,277572	0,433071
T21-XY-031	0,942704	0,508125	0,225476	0,746159	0,288538	0,55582	0,60026	0,471746	0,507378	0,53413	0,225944	0,382003
T21-XY-032	0,237548	0,358243	0,113008	0,622899	0,253401	0,365936	0,593529	0,781818	0,485577	0,385446	0,158753	0,352652
T21-XY-033	0,445596	0,459103	0,144552	0,736007	0,346939	0,500097	0,71332	0,471409	0,539568	0,433811	0,232464	0,429304
T21-XY-035	0,251939	0,895739	0,849057	0,933458	0,798319	0,675182	0,779025	0,692603	0,421008	0,868215	0,34407	0,07301
T21-XY-	0,078825	0,234986	0,062023	0,363526	0,204324	0,25488	0,413988	0,746348	0,265459	0,310104	0,084922	0,287704

036												
T21-XY-037	0,768349	0,385472	0,093921	0,447807	0,265843	0,377552	0,628743	0,623762	0,471517	0,463364	0,154251	0,296912
T21-XY-038	0,161491	0,227183	0,064457	0,327158	0,162953	0,266214	0,323731	0,815741	0,27248	0,209895	0,066627	0,227273
T21-XY-039	0,286652	0,430249	0,229082	0,720108	0,524333	0,559129	0,73616	0,459503	0,615963	0,58295	0,280073	0,442697
T21-XY-040	0,867123	0,310576	0,055807	0,434043	0,261967	0,488565	0,602995	0,330391	0,474028	0,420232	0,157116	0,414424
T21-XY-041	0,177215	0,293732	0,074048	0,425548	0,195675	0,416205	0,668713	0,612888	0,446029	0,354922	0,126595	0,283792
T21-XY-042	0,143032	0,196653	0,079678	0,285444	0,185047	0,201588	0,325007	0,728524	0,215577	0,192057	0,073486	0,287465
T21-XY-043	0,219144	0,379556	0,204284	0,518083	0,323346	0,540966	0,734227	0,653648	0,526196	0,522234	0,136187	0,353218
T21-XY-044	0,504225	0,431666	0,339367	0,722491	0,224884	0,678593	0,561397	0,686747	0,600815	0,511811	0,158255	0,371287
T21-XY-046	0,678177	0,371255	0,053276	0,399101	0,277056	0,343321	0,543196	0,603687	0,507542	0,362053	0,1417	0,335775
T21-XY-047	0,712823	0,580405	0,266621	0,608466	0,306653	0,622218	0,49195	0,27003	0,653525	0,591054	0,299145	0,401662
T21-XY-048	0,884125	0,52396	0,249011	0,763492	0,487977	0,702544	0,794811	0,517241	0,511851	0,581544	0,22092	0,321337
T21-XY-049	0,896962	0,610522	0,345826	0,762186	0,383285	0,664187	0,75	0,583697	0,481374	0,633227	0,267318	0,179429

T21-XY-051	0,719258	0,445845	0,213144	0,625806	0,364845	0,66393	0,492063	0,264088	0,640709	0,668203	0,257732	0,447681
T21-XY-052	0,185185	0,546099	0,281675	0,747851	0,421603	0,646141	0,714851	0,388889	0,529512	0,559341	0,340412	0,466667
T21-XY-053	0,764823	0,188811	0,069342	0,303732	0,154097	0,19922	0,481351	0,601691	0,22806	0,26378	0,073183	0,220188
T21-XY-054	0,544243	0,620354	0,35585	0,749636	0,448864	0,675514	0,591054	0,534527	0,632184	0,675676	0,186722	0,276753
T21-XY-055	0,184874	0,392747	0,214632	0,646724	0,413086	0,584989	0,763098	0,314775	0,45939	0,567282	0,245714	0,362083
T21-XY-057	0,926889	0,641273	0,323711	0,881867	0,614907	0,677119	0,769405	0,590296	0,535135	0,636723	0,317668	0,296108
T21-XY-058	0,068596	0,208691	0,062129	0,213121	0,086589	0,231751	0,516358	0,499273	0,200532	0,192475	0,062194	0,182273
T21-XY-059	0,797115	0,268071	0,079365	0,329495	0,186999	0,290709	0,536181	0,546371	0,48462	0,267666	0,125705	0,365551
T21-XY-060	0,189474	0,409836	0,177621	0,717514	0,477043	0,634256	0,732601	0,321196	0,612478	0,585697	0,254001	0,511983
T21-XY-061	0,340659	0,325281	0,130061	0,722222	0,346179	0,580767	0,730466	0,579213	0,551041	0,457116	0,248796	0,385808
T21-XY-062	0,158287	0,451246	0,150809	0,515031	0,306926	0,40977	0,602767	0,612479	0,41694	0,45045	0,200974	0,244123
T21-XY-063	0,196065	0,228426	0,10141	0,286259	0,143351	0,343788	0,390924	0,752938	0,264581	0,265924	0,102251	0,269122
T21-XY-	0,836181	0,353916	0,106414	0,510555	0,297316	0,323452	0,571489	0,44495	0,451807	0,38167	0,195822	0,405714

064												
T21-XY-069	0,188612	0,557196	0,218659	0,576369	0,692308	0,711423	0,65	0,463415	0,606495	0,727676	0,230567	0,420975
T21-XY-070	0,783266	0,231469	0,069824	0,307247	0,189248	0,286651	0,547945	0,345823	0,277626	0,332231	0,090707	0,264798
T21-XY-079	0,216274	0,303266	0,095626	0,357106	0,185185	0,343238	0,500424	0,7968	0,323295	0,352887	0,100947	0,283993
T21-XY-080	0,636796	0,329341	0,08222	0,39473	0,227144	0,338291	0,442757	0,579439	0,34644	0,38245	0,155533	0,254237
T21-XY-082	0,762308	0,390432	0,182277	0,355494	0,271271	0,386894	0,552553	0,521662	0,513656	0,391082	0,110783	0,384615
T21-XY-084	0,223065	0,251537	0,085714	0,269767	0,149142	0,301357	0,396967	0,912111	0,270535	0,31142	0,1051	0,260202
T21-XY-085	0,168122	0,413448	0,173626	0,527491	0,342736	0,394265	0,65973	0,578186	0,464137	0,46953	0,145101	0,291577
T21-XY-086	0,896982	0,514059	0,287412	0,813459	0,3748	0,731724	0,815404	0,342906	0,667096	0,631379	0,372014	0,458937
T21-XY-088	0,80722	0,473365	0,170061	0,527982	0,428776	0,597858	0,65973	0,350852	0,602401	0,570567	0,229996	0,496755
T21-XY-089	0,115079	0,250126	0,103571	0,532403	0,198188	0,361984	0,586568	0,720154	0,399688	0,323944	0,132626	0,318642
T21-XY-092	0,895844	0,354904	0,092256	0,665691	0,286224	0,284082	0,563703	0,514735	0,346178	0,376068	0,148078	0,292259
T21-XY-093	0,697974	0,48511	0,147059	0,561618	0,309833	0,413824	0,557338	0,625632	0,412186	0,41694	0,158063	0,315682

T21-XY-094	0,256757	0,402473	0,099269	0,325629	0,226563	0,384835	0,561326	0,760024	0,506849	0,340219	0,156018	0,333014
T21-XY-095	0,848673	0,697387	0,335878	0,748078	0,647183	0,520275	0,68674	0,592243	0,466089	0,757222	0,272727	0,131165
T21-XY-096	0,880126	0,464684	0,190648	0,64119	0,418939	0,552408	0,288726	0,481598	0,625338	0,561644	0,20398	0,345168
T21-XY-201	0,762855	0,254543	0,096154	0,590517	0,16957	0,267653	0,459241	0,569932	0,342258	0,232641	0,131543	0,25819
T21-XY-202	0,847386	0,316475	0,059611	0,460317	0,17005	0,267297	0,329803	0,764986	0,329255	0,310083	0,096419	0,300401
T21-XY-203	0,195092	0,317393	0,145658	0,703045	0,341998	0,485036	0,788821	0,356719	0,620585	0,443232	0,369458	0,496004
T21-XY-208	0,882798	0,551102	0,260712	0,725252	0,415094	0,63389	0,730936	0,508197	0,698384	0,651591	0,321726	0,493373
T21-XY-209	0,796667	0,463219	0,20682	0,555426	0,404819	0,69192	0,804878	0,331253	0,64467	0,573237	0,285171	0,468635
T21-XY-210	0,877629	0,476	0,254286	0,667824	0,516476	0,647319	0,755078	0,348037	0,670982	0,568959	0,299446	0,543001
T21-XY-212	0,919149	0,485555	0,158085	0,756515	0,338329	0,449712	0,535168	0,500557	0,383164	0,609546	0,243829	0,211679
T21-XY-213	0,209622	0,644856	0,270655	0,768374	0,565567	0,699156	0,694656	0,49372	0,504803	0,764439	0,319149	0,346097
T21-XY-215	0,221902	0,446896	0,203825	0,556688	0,271952	0,611345	0,768016	0,347226	0,598706	0,546467	0,250836	0,443733
T21-XY-	0,85	0,438308	0,240964	0,820835	0,419569	0,747656	0,675676	0,377535	0,458996	0,492617	0,238095	0,180328

218												
T21-XY-219	0,844444	0,289398	0,095541	0,326577	0,162449	0,32541	0,469613	0,367483	0,234871	0,34795	0,142857	0,298507
T21-XY-221	0,851827	0,335381	0,086686	0,532338	0,246766	0,531476	0,641367	0,223417	0,583524	0,540309	0,246015	0,312831
T21-XY-222	0,825777	0,332623	0,160745	0,607099	0,25652	0,36326	0,625327	0,359439	0,413211	0,402888	0,151304	0,377728
T21-XY-223	0,878857	0,604494	0,391557	0,86014	0,498799	0,624284	0,68496	0,583456	0,718581	0,647787	0,224242	0,37925
T21-XY-228	0,805648	0,301685	0,056912	0,433398	0,200397	0,321779	0,401015	0,433236	0,358067	0,339677	0,101664	0,332671
T21-XY-229	0,823705	0,363569	0,198642	0,688503	0,370471	0,540675	0,71608	0,431034	0,584416	0,517185	0,255916	0,345269
T21-XY-238	0,765849	0,354449	0,132603	0,412545	0,243882	0,356756	0,529965	0,535657	0,426855	0,398266	0,116377	0,317876
T21-XY-240	0,833521	0,613423	0,189115	0,759236	0,398936	0,52409	0,747945	0,521562	0,571201	0,601898	0,258799	0,303777
T21-XY-241	0,886598	0,418793	0,131109	0,616409	0,250282	0,475028	0,680601	0,493956	0,456716	0,469803	0,228958	0,288788
T21-XY-244	0,530806	0,650481	0,24482	0,694188	0,382114	0,527001	0,635951	0,74456	0,546392	0,514988	0,26564	0,461394
T21-XY-246	0,874307	0,422579	0,131116	0,680706	0,366004	0,602903	0,614308	0,510965	0,609947	0,555191	0,325444	0,320665
T21-XY-247	0,27619	0,40636	0,245413	0,585255	0,392713	0,525583	0,756026	0,557411	0,629709	0,556531	0,170654	0,48071

T21-XY-248	0,556863	0,782427	0,576425	0,886208	0,722814	0,596435	0,792798	0,694452	0,503293	0,793548	0,3407	0,135773
T21-XY-249	0,492711	0,406075	0,30609	0,787879	0,411122	0,661543	0,822166	0,531944	0,603387	0,65681	0,294523	0,503421
T21-XY-250	0,251407	0,454961	0,162489	0,631315	0,312623	0,458313	0,586779	0,639397	0,358709	0,351566	0,190454	0,404858
T21-XY-251	0,197531	0,402864	0,13166	0,503311	0,211044	0,504356	0,555556	0,270896	0,528009	0,462795	0,20413	0,371622
T21-XY-253	0,399577	0,408004	0,245397	0,682314	0,365486	0,699914	0,765607	0,517073	0,486278	0,601458	0,262655	0,387616
T21-XY-254	0,085714	0,455617	0,165674	0,59434	0,461409	0,575868	0,651459	0,375921	0,652174	0,540335	0,203488	0,445026
T21-XY-255	0,852619	0,396518	0,258979	0,691465	0,455462	0,588383	0,762213	0,355003	0,461538	0,62046	0,20081	0,370582
T21-XY-256	0,849354	0,484325	0,151212	0,733147	0,433303	0,411141	0,537559	0,682339	0,457746	0,499717	0,168539	0,183673
T21-XY-258	0,257143	0,402734	0,121864	0,548387	0,278604	0,50706	0,493604	0,336609	0,651416	0,496275	0,206408	0,381062
T21-XY-261	0,640472	0,384615	0,079839	0,301525	0,201878	0,401589	0,479852	0,469446	0,495716	0,381883	0,155573	0,344986
T21-XY-262	0,240506	0,590977	0,23983	0,424744	0,499485	0,699588	0,777669	0,378685	0,652721	0,706884	0,248322	0,390405
T21-XY-270	0,319728	0,407793	0,193042	0,620661	0,28	0,449253	0,583049	0,400713	0,491607	0,77229	0,168362	0,33359
T21-XY-	0,767478	0,5273	0,196024	0,634992	0,414466	0,568182	0,619152	0,527452	0,55418	0,549639	0,293391	0,364238

275												
T21-XY-276	0,860432	0,471299	0,178409	0,6824	0,441155	0,650004	0,699565	0,428434	0,683031	0,538114	0,313673	0,473192
T21-XY-277	0,825625	0,303569	0,104815	0,487307	0,267148	0,362756	0,604284	0,52164	0,685279	0,446129	0,181147	0,404305
T21-XY-278	0,821648	0,416168	0,094858	0,377405	0,189551	0,347572	0,4202	0,515203	0,449656	0,433175	0,133661	0,232614
T21-XY-281	0,715094	0,454178	0,162001	0,430712	0,264368	0,476962	0,647295	0,396552	0,497159	0,478065	0,199459	0,358362
T21-XY-282	0,808942	0,254842	0,037093	0,436201	0,268974	0,321503	0,518499	0,522665	0,477997	0,375086	0,132867	0,301028
T21-XY-283	0,151739	0,332285	0,071023	0,630226	0,304034	0,270541	0,477686	0,819887	0,374111	0,257398	0,112845	0,279446
T21-XY-285	0,706992	0,578207	0,171117	0,59393	0,426786	0,468599	0,526924	0,488032	0,405581	0,558795	0,182109	0,144158
T21-XY-286	0,183333	0,124088	0,13667	0,628692	0,343874	0,69916	0,736886	0,364522	0,811518	0,528228	0,244755	0,477583
T21-XY-287	0,162791	0,463807	0,232699	0,66242	0,407155	0,695702	0,659164	0,28655	0,678808	0,619694	0,30086	0,619425
T21-XY-288	0,125786	0,431145	0,30837	0,714286	0,43694	0,628627	0,6621	0,452632	0,675544	0,574348	0,288303	0,470588
T21-XY-289	0,285714	0,391272	0,094679	0,437364	0,283019	0,375467	0,565495	0,681478	0,471698	0,405655	0,133779	0,31281
T21-XY-292	0,794805	0,526132	0,167383	0,675077	0,357827	0,479781	0,555556	0,617595	0,414462	0,485669	0,15617	0,194508

T21-XY-295	0,846741	0,291676	0,118024	0,567269	0,261029	0,427164	0,602771	0,455816	0,448276	0,341788	0,180897	0,403574
T21-XY-297	0,824695	0,483127	0,152917	0,632234	0,420129	0,435264	0,579481	0,694872	0,391924	0,517827	0,166052	0,257048
T21-XY-298	0,27451	0,320168	0,11351	0,500426	0,202198	0,322272	0,37918	0,815473	0,271259	0,285559	0,116883	0,241309
T22-XY-054	0,807069	0,248334	0,083423	0,329804	0,165661	0,403212	0,479603	0,594619	0,339806	0,345962	0,150467	0,272727

4.4. Korelasyon Değerleri ve Lineer Regresyon Grafikleri

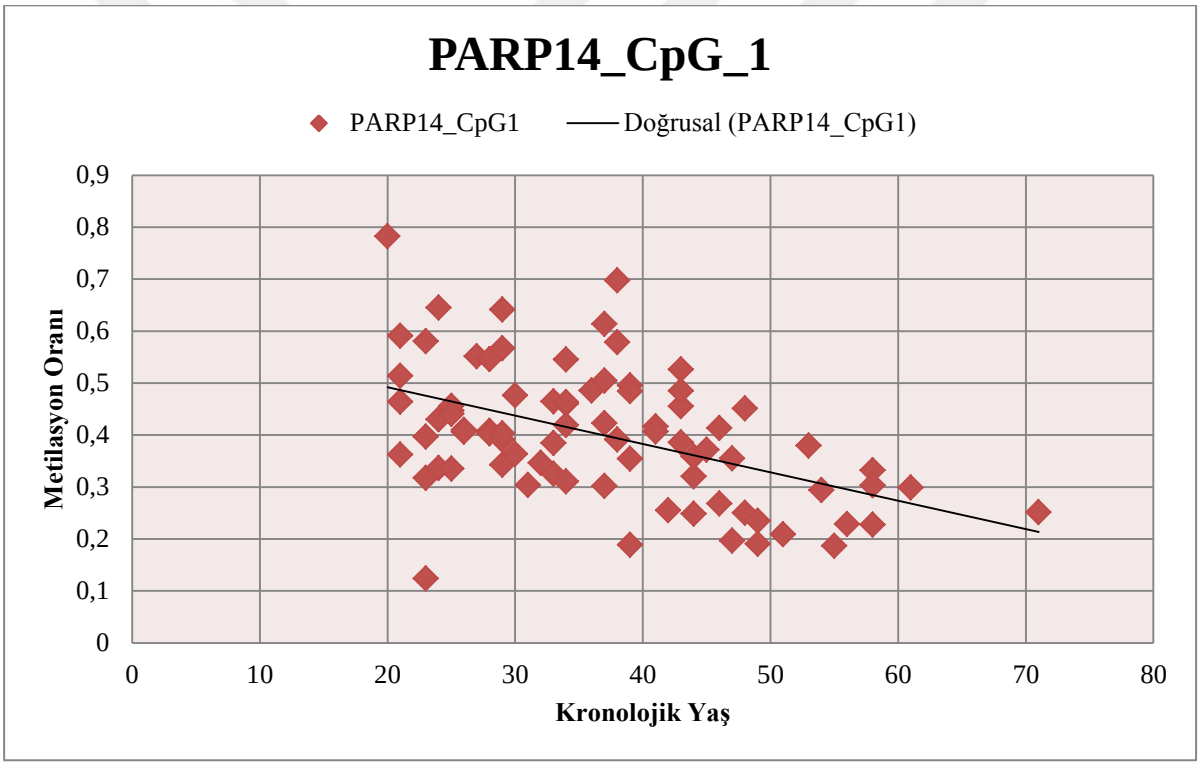
Microsoft Excel (Microsoft 365 ProPlus) programı ile kronolojik yaş ile lokuslara ait metilasyon oranları hesaplanarak korelasyon değerleri belirlendi (Tablo XV).

Korelasyon hesapmaları sonucunda 12 CpG lokusundan 11'inde (PARP14(chr3:122401343), C5orf25(chr5:175664221), cg23488376(chr19:48367266), MXRA5(chrX:3236105), PFKFB3(chr10:6185502), DLL1(chr6:170596856), cg12837463(chr7:35300228), TTC7B(chr14:91283606), KCNA7(chr19:49577206), NKX2-1(chr14:36985063) ve SYNE4(chr19:36499326)) artan yaşla metilasyon oranında pozitif yönlü ancak NOX4(chr11:89322851) olarak adlandırılan lokusta negatif yönlü korelasyon meydana geldiği sonucuna varılmıştır. En yüksek korelasyon değeri NOX4 geninde yer alan CpG'de en düşük korelasyon değeri ise SYNE4 geninde yer alan CpG'de gözlenmektedir. 12 CpG noktasına ait metilasyon oranı ve kronolojik yaş değerlerinin karşılaştırıldığı lineer regresyon grafikleri Şekil 13 -24'te verilmiştir.

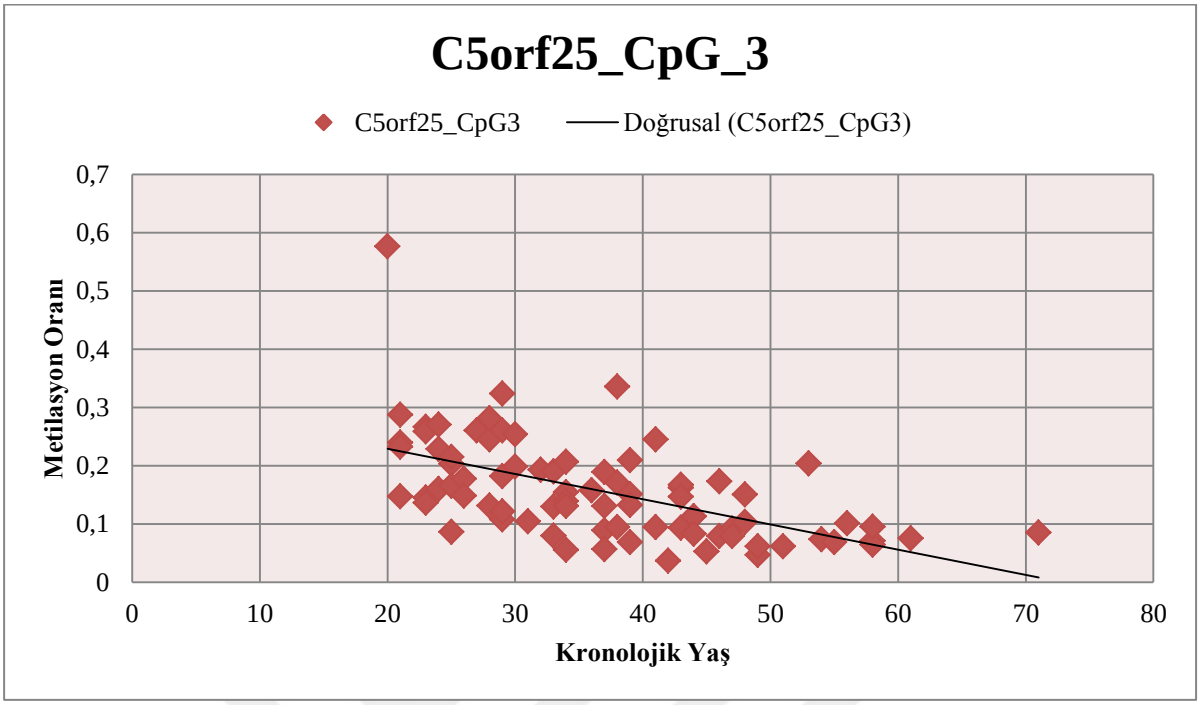
Tablo XV. 12 CpG noktasına ait korelasyon değerleri

Gen Bölgesi	***GRCh37 Kromozom Pozisyonu***	***CpG Kodu***	***Korelasyon Değeri***
PARP14	chr3:122401343	S1	**-0,48478218**
C5orf25	chr5:175664221	S3	**-0,56848995**
-	chr19:48367266	S4	**-0,586167221**
MXRA5	chrX:3236105	S5	**-0,54731087**
PFKFB3	chr10:6185502	S6	**-0,71471096**
DLL1	chr6:170596856	S7	**-0,516175**
NOX4	chr11:89322851	S8	**0,80018423**

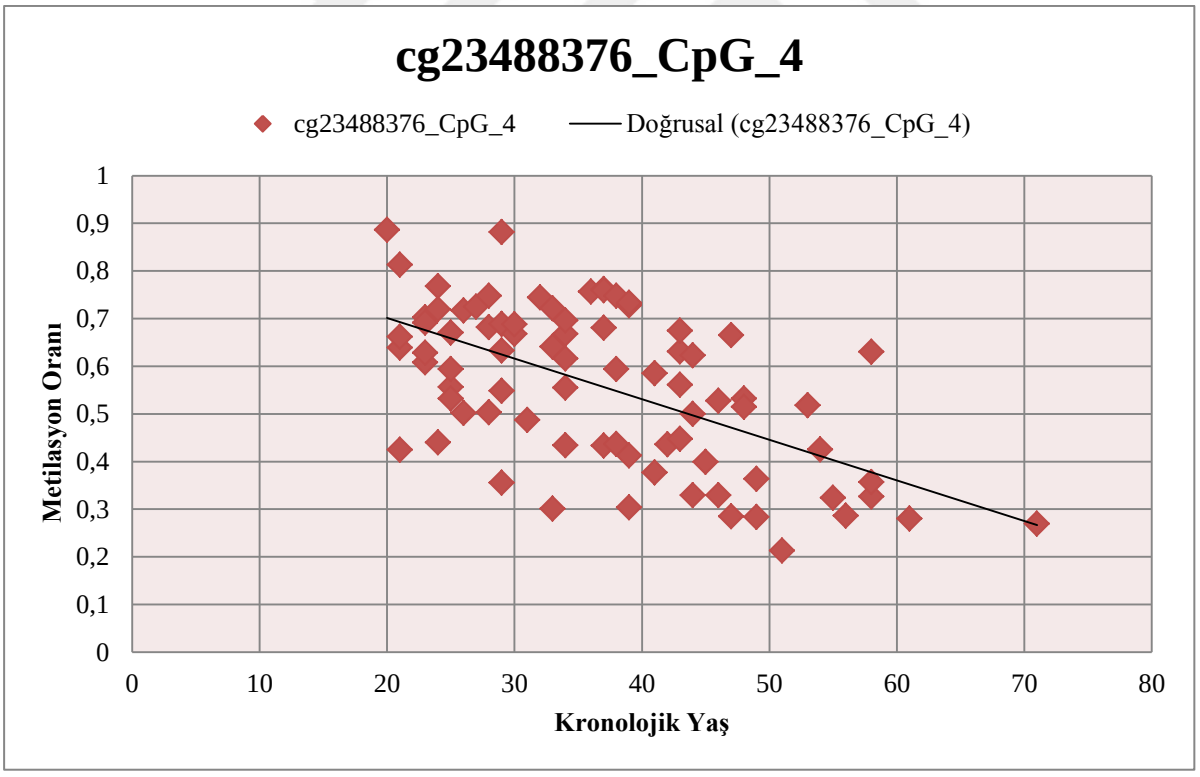
-	chr7:35300228	S9	**-0,71517626**
TTC7B	chr14:91283606	S10	**-0,699619064**
KCNA7	chr19:49577206	S11	**-0,73095158**
NKX2-1	chr14:36985063	S12	**-0,53831682**
SYNE4	chr19:36499326	S13	**-0,182979775**



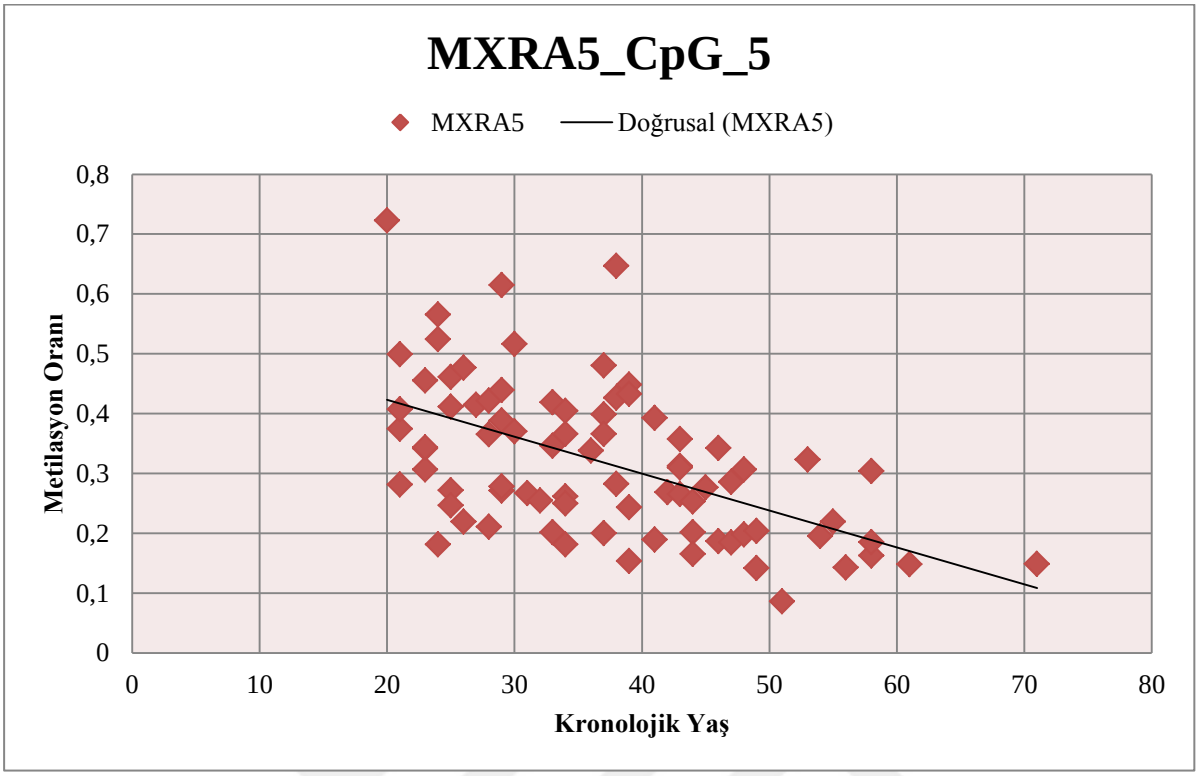
Şekil 13. PARP14 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



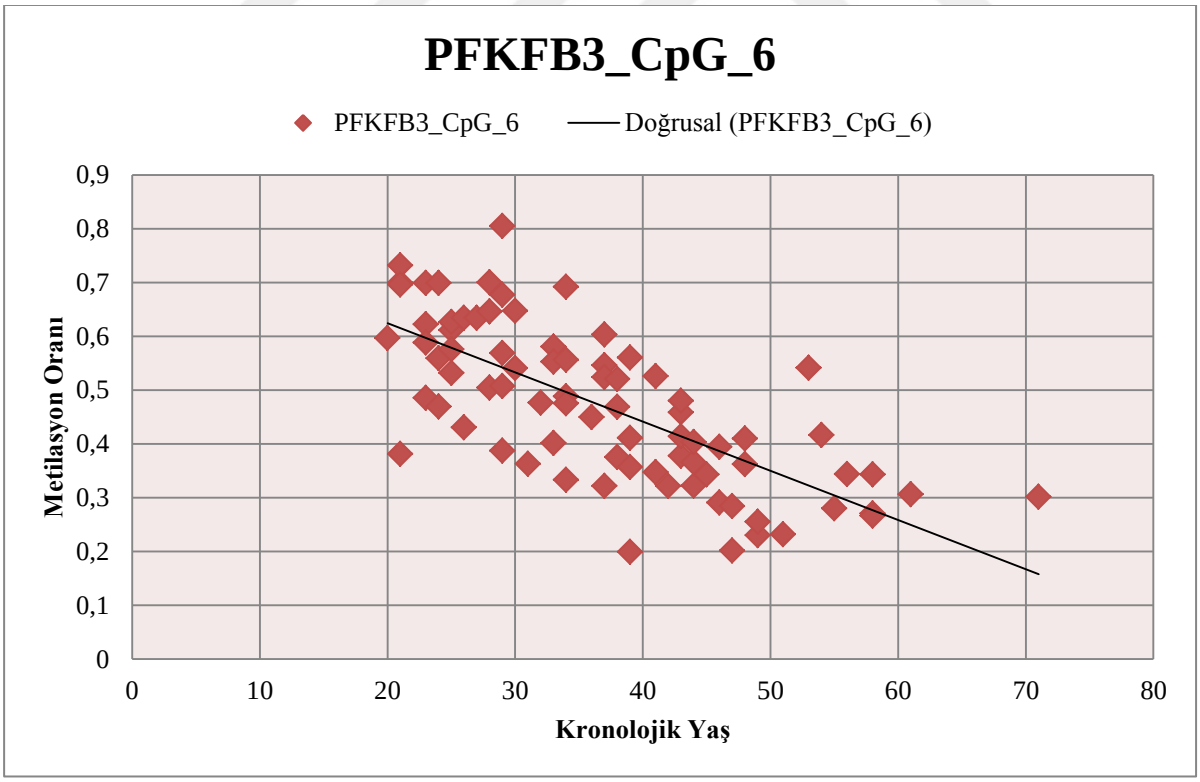
Şekil 14. C5orf25 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



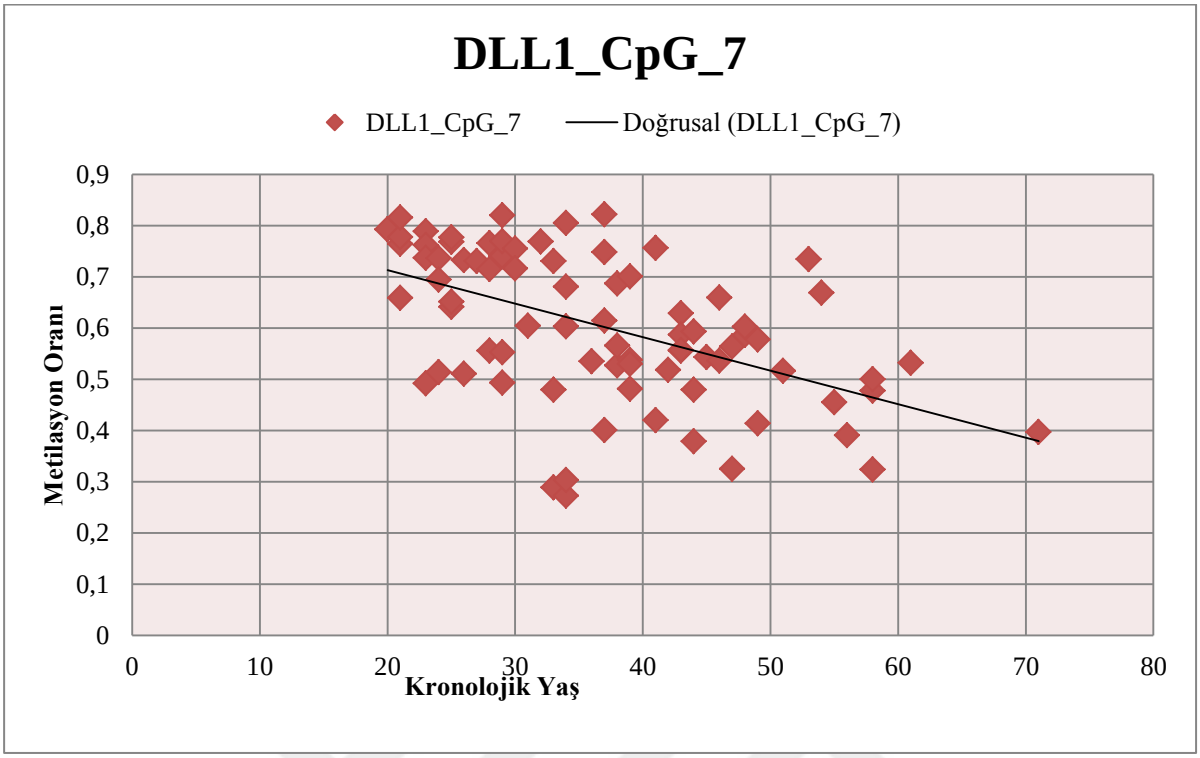
Şekil 15. cg23488376 CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



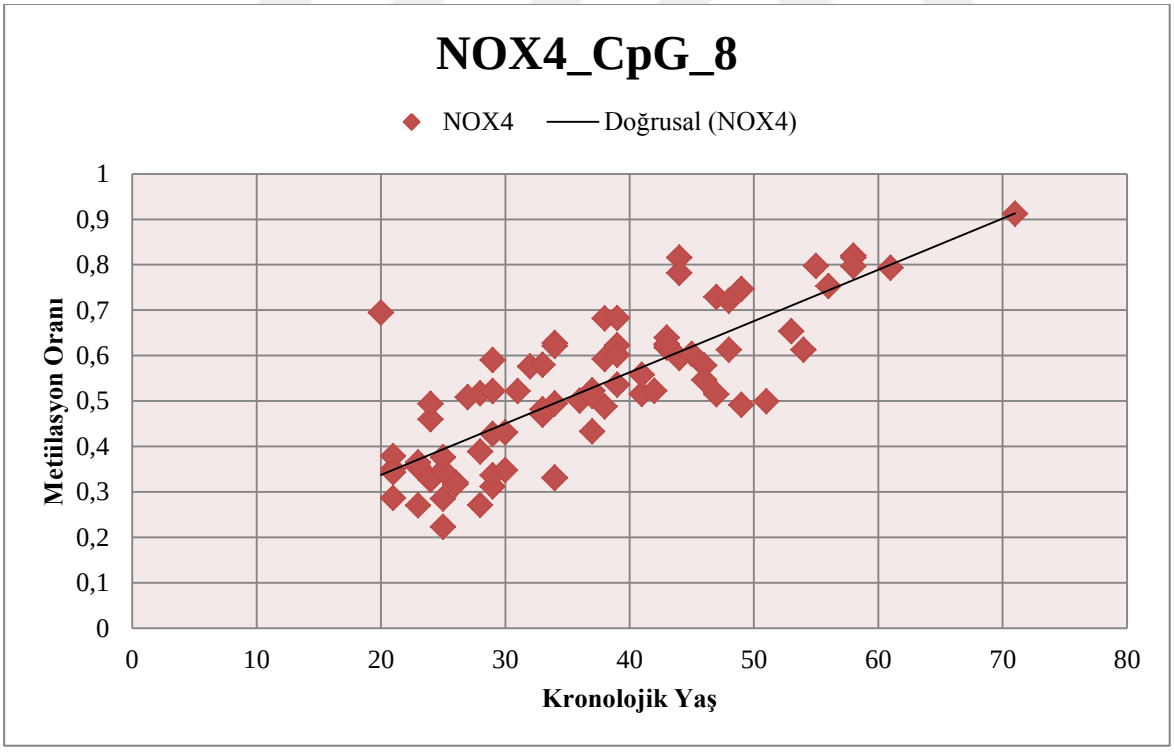
Şekil 16. MXRA5 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



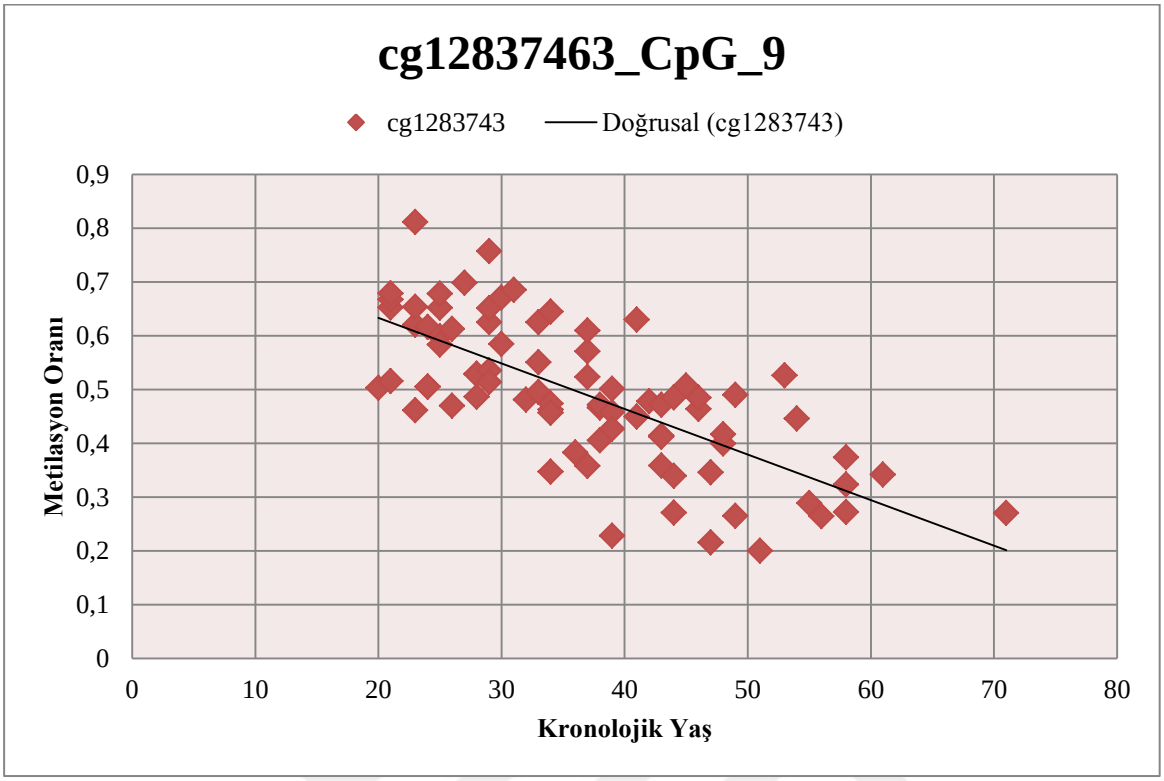
Şekil 17. PFKFB3 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



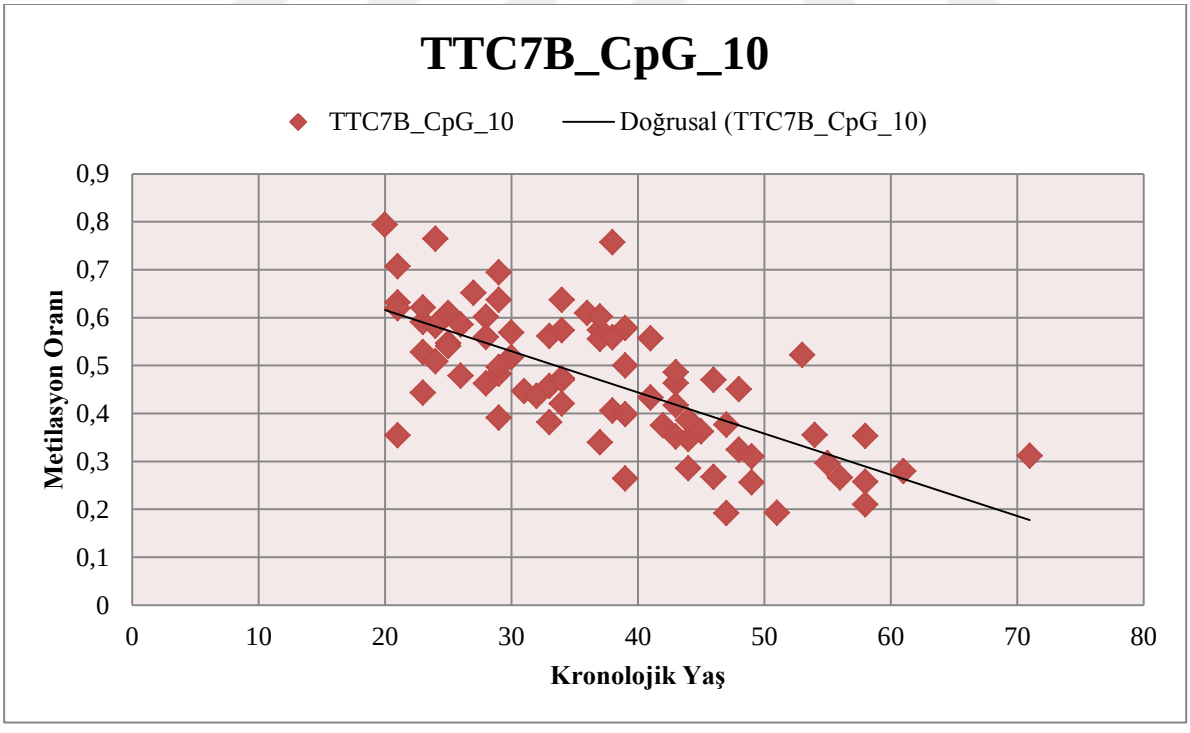
Şekil 18. DLL1 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



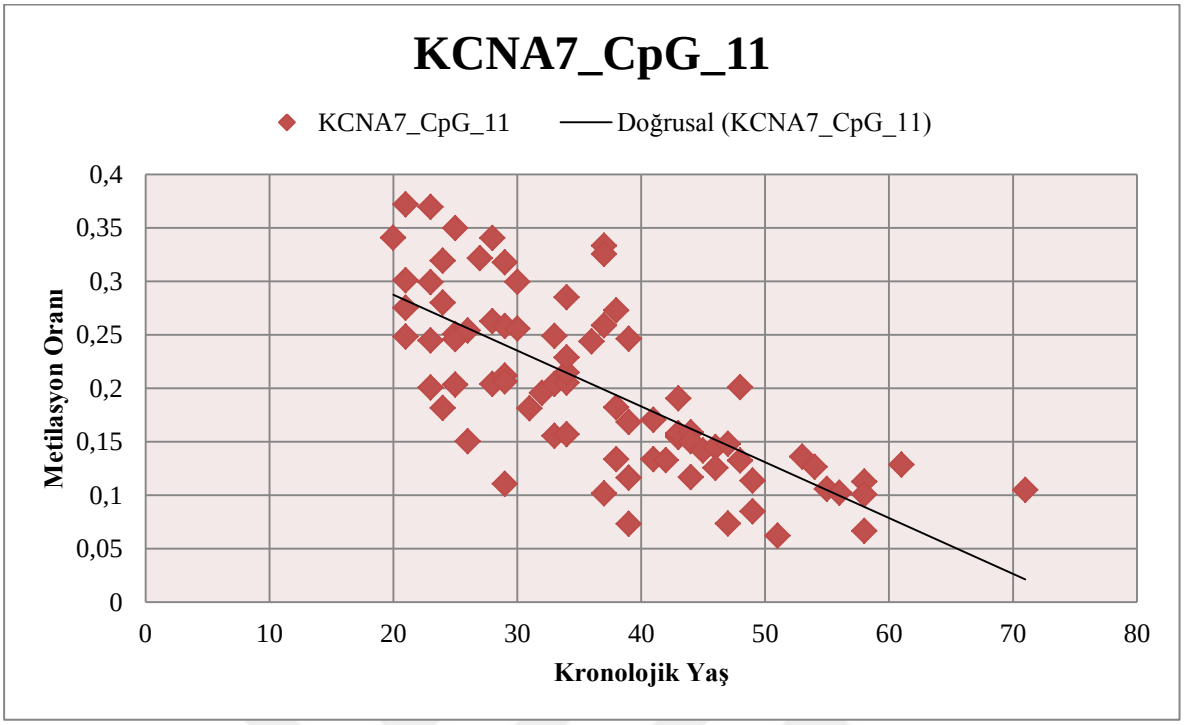
Şekil 19. NOX4 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



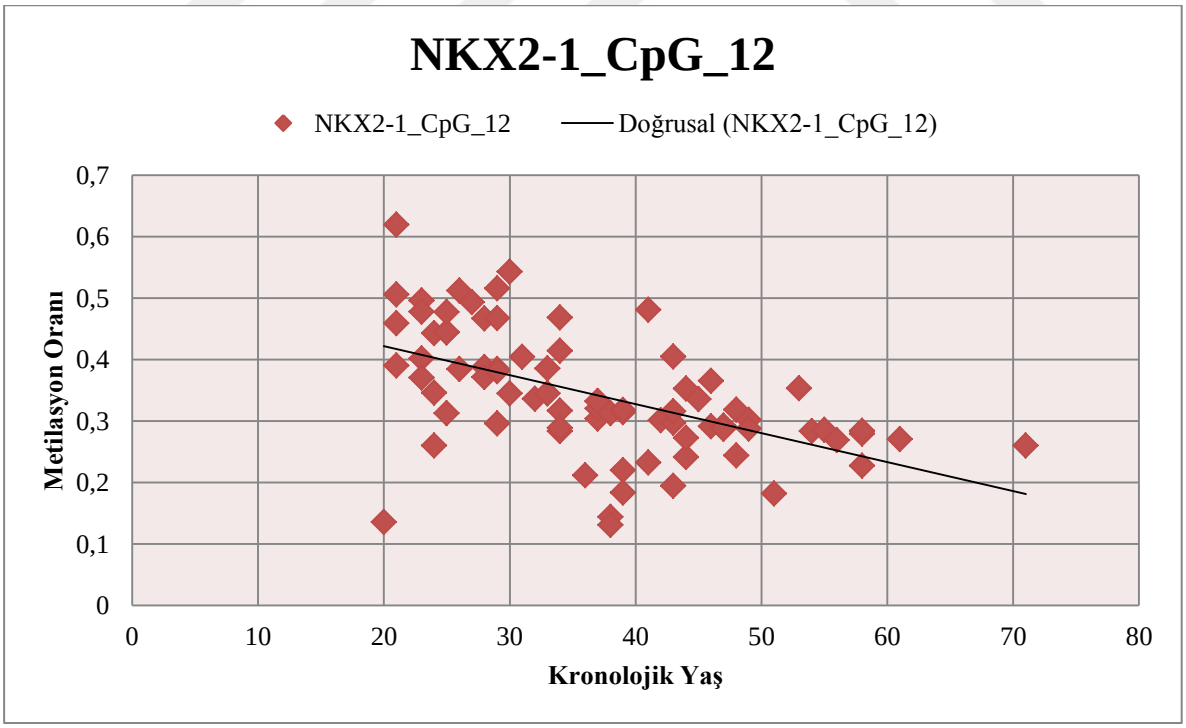
Şekil 20. cg12837463 CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



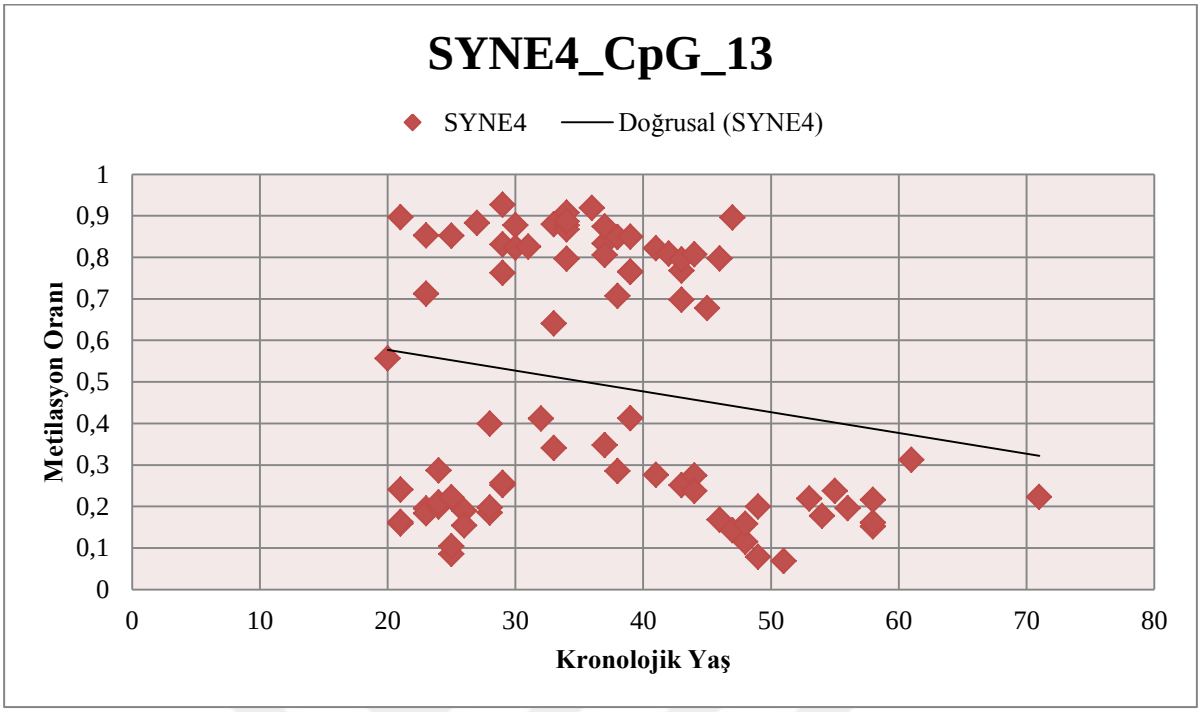
Şekil 21. TTC7B geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



Şekil 22. KCNA geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



Şekil 23. NKX2-1 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği



Şekil 24. SYNE4 geninde yer alan CpG lokusuna ait lineer regresyon grafiği

4.5. İstatistiksel Analiz

4.5.1.Aşamalı çok değişkenli doğrusal regresyon analizi

80 kişilik model grubuna ait 12 CpG noktası metilasyon değerleri üzerinden, bağımlı değişken 'Gerçek yaş' olmak üzere, değişkenlerin ileri yönlü ve aşamalı olarak dahil edildiği çok değişkenli lineer regresyon modeli üretildi. Buna göre en yüksek korelasyonu gösteren NOX4 ile oluşturulan ilk modele, ikinci aşamada C5orf25 (R: 0.620, p=.000), üçüncü aşamada cg23488376 (R=0.328; p=.003) bölgeleri eklendi. Böylece 3 numaralı modeli oluşturan NOX4, c5orf25 ve cg23488376 belirteçlerinin semen matriksinde metilasyon dereceleri kronolojik yaşla en fazla korelasyon gösteren belirteçler olduğu görüldü. Modele ait regresyon formülü Şekil 25'te, model özeti değerleri Tablo XVI da verilmiştir.

Tablo XVI. Aşamalı çok değişkenli doğrusal regresyon analizi

Düzeltilmiş R²=0.795 $F_{(1,76)}$=9.157 p=.000 Durbin Watson=1.483 RMSE= 5 MAD= 4.05

	Modeller	**Standardize Olamamış Katsayılar**		**Standardize Katsayılar**	**T**	**P**	**%95 B için Güven Aralığı**		**Doğrusallık İstatistiği**	
		B	**SH**	**Beta**		**Değeri**	**Lower Bound**	**Upper Bound**	**Tolerans**	**VIF**
1	Sabit Terim	6.936	2.653		2.614	.011	1.654	12.218		
	NOX4	56.737	4.815	.800	11.783	.000	47.151	66.323	1.000	1.000
2	Sabit Terim	18.626	2.690		6.925	.000	13.270	23.982		
	NOX4	49.579	3.940	.699	12.582	.000	41.732	57.425	.931	1.074
	C5orf25	-50.651	7.307	-.385	-6.932	.000	-65.200	-36.102	.931	1.074
3	Sabit Terim	25.047	3.323		7.537	.000	18.428	31.666		
	NOX4	47.598	3.804	.671	12.513	.000	40.022	55.173	.904	1.107
	C5orf25	-32.010	9.286	-.243	-3.447	.001	-50.503	-13.516	.521	1.918
	cg23488376	-14.866	4.913	-.216	-3.026	.003	-24.650	-5.082	.509	1.964

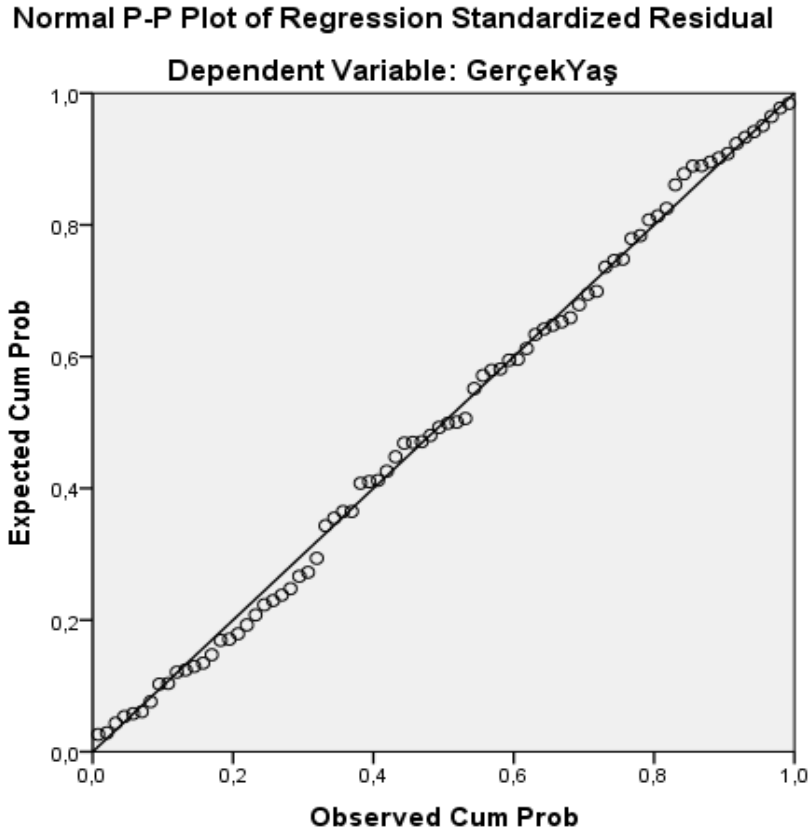
Bağımlı değişken: gerçek yaş

Tahmini Yaş =25.047 + 47.598 * NOX4 - 32.010 * C5orf25 - 14.866 * cg23488376

Şekil 25. Aşamalı çok değişkenli lineer regresyon analizi gerçek yaş tahmin denklemi

4.5.1.1.Aşamalı regresyon analizinin test varsayımları

<u>*Doğrusallık:*</u> Modelin artık değerler toplamı sıfıra eşittir. Oluşturulan P-P Plot grafiğine göre modelin doğrusallığının gerçekleşmiş olduğu görülmektedir (Şekil 26).



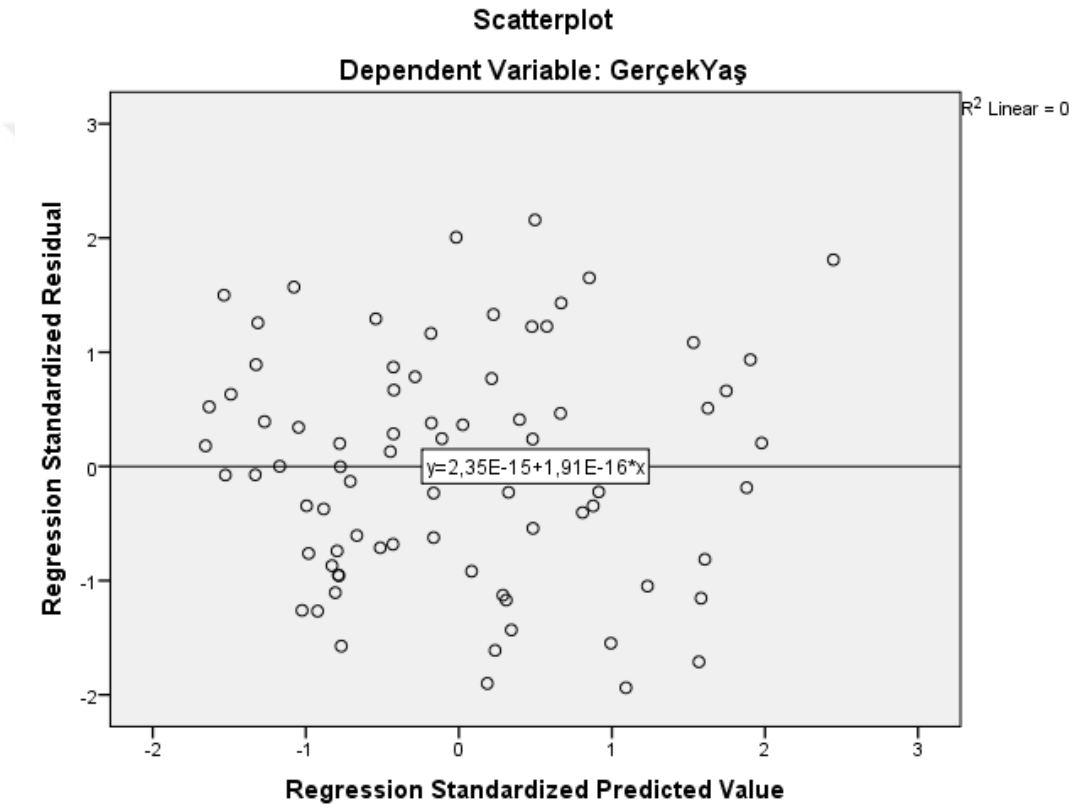
Şekil 26. Aşamalı çok değişkenli doğrusal regresyonuna ait P-P plot grafiği

Heteroskedasticity: Regresyon modelinde standardize tahmini değerlerin standardize artık değerlere göre saçılımı Şekil 27'de gösterilmektedir. Buna göre dağılımı varyans değişkenliği (heteroskedasticity) bulunmamaktadır. Rezidüel değerlerin kareleri alınıp belirteçlerle regresyona sokulduğunda ANOVA test değerlerine göre de heteroskedasticity problemi yoktur (F=1.424; p=0.177).

Uç değerler: Ortalama Cook distance değeri 0,19; minimum ve maksimum standart artık değerler sırasıyla -1.938 ve 2.158 olduğundan uç değer izlenmemektedir.

Otokorelasyon: Durbin – Watson test değeri 1.483 olup buna göre değişkenler arasında otokorelasyon problemi yoktur.

Multicollinearity: NOX4, C5orf25 ve cg23488376 için VIF değerleri sırasıyla 1.107; 1.91 ve 1.964 olarak saptanmıştır. Dışlanan noktalara içinde en yüksek VIF değeri ise sadece 4.886'dır ve TTC7B belirtecine aittir. Bu verilerle belirteç değişkenlerinin arasında multicollinearity (çoklu doğrusal bağlantı) bulunmadığı görülmektedir.



Şekil 27. Aşamalı çok değişkenli doğrusal regresyonuna ait standardize artık değer saçılım grafiği

4.5.1.2.Aşamalı çok değişkenli doğrusal regresyon model validasyonu

Bu aşamada, elde edilen modelin validasyonu için model 35 kişilik test grubuna uygulanarak bu gruptaki katılımcıların tahmini yaşları beirilenmiştir. Saptanan tahmini yaş değerleriyle gerçek yaş değerlerine dair ortalama değerler Tablo XVII de verilmiştir. Yapılan eşleştirilmiş örneklem

testi sonuçlarına göre gerçek ve tahmini yaş değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur. Gerçek yaş ve tahmini yaş değerleri arasında anlamlı ve ileri derecede doğrusal ilişki mevcuttur (R: 0.710; p=0.000).

Tablo XVII. Aşamalı yöntemle elde edilmiş regresyon modeli için eşleştirilmiş örneklem test sonuçları

	GERÇEK YAŞ	***TAHMİNİ YAŞ***
Ortalama	33.3140	33.1664
Standart Sapma	8.2490	9.0991
Ortalama Standart Hata	1.3943	1.5380
Test MAD Değeri	3.65	
Eşleştirilmiş Farklar		
Ortalama	-0.14790	
Standart Sapma	6.81411	t= 0.128
		p= 0.899
Ortalama Standart Hata	1.1518	df= 34
%95 Güvenirlik Aralığı Alt Sınır	-2.21928	
%95 Güvenirlik Aralığı Üst Sınır	2.4886	

4.5.2. Tüm değişkenlerin dahil olduğu çok değişkenli lineer regresyon analizi

80 kişilik model grubuna ait 12 CpG noktası metilasyon değerleri üzerinden, bağımlı değişken ‘Gerçek yaş’ olmak üzere, tüm değişkenlerin dahil edildiği çok değişkenli lineer regresyon modeli üretilmiştir (Şekil 28). Model özeti, model içi değişken katsayı ve etkinlik değerleri Tablo XVIII de verilmekle beraber F değişim değeri 26,243 olup modelle gerçek yaş arasında anlamlı korelasyon bulunmaktadır.

Tablo XVIII. Tüm Değişkenlerin Dahil Olduğu Çok Değişkenli Lineer Regresyon Modeli

BAĞIMSIZ DEĞİŞKENLER	B	SH.	ß	T	P	TOLERANS	VIF
SABİT TERİM	24.566	7.206		3.409	.001		
SYNE4	.369	2.176	.010	.169	.866	.738	1.354
PARP14	14.841	10.276	.169	1.444	.153	.195	5.116
C5ORF25	-41.159	13.513	-.313	-3.046	.003	.248	4.034
CG23488376	-14.220	7.218	-.207	-1.970	.053	.237	4.212
MXRA5	-2.707	11.020	-.030	-.246	.807	.170	5.882
PFKFB3	17.082	11.792	.219	1.449	.152	.115	8.709
DLL1	12.630	6.536	.160	1.932	.058	.382	2.620
NOX4	44.281	5.886	.625	7.523	.000	.380	2.632
CG12837463	-5.883	9.613	-.070	-.612	.543	.202	4.945
TTC7B	-17.123	15.523	-.210	-1.103	.274	.072	13.893
KCNA7	-17.082	17.260	-.122	-.990	.326	.172	5.798
NKX2-1	-9.468	10.970	-.083	-.863	.391	.284	3.525

Düzeltilmiş R^2=0.793 **$F_{(12,67)}$**=26.243 **p**=.000 **Durbin Watson**=1.622 **RMSE**= 4.7
MAD=3.81

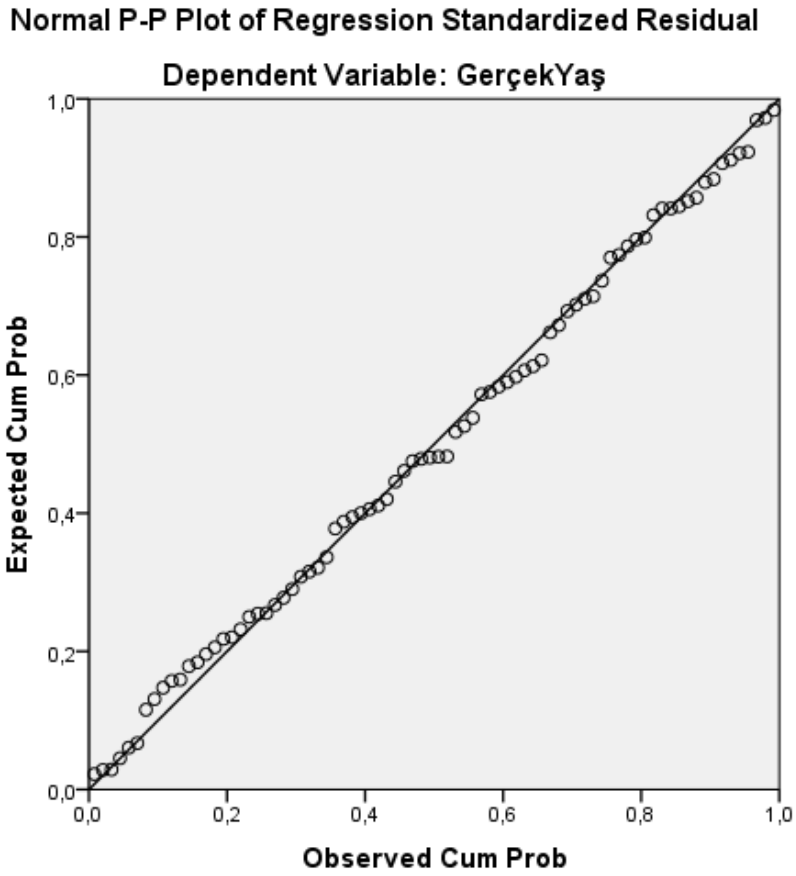
Bağımlı değişken: gerçek yaş

Tahmini Yaş = 24.566 + 0.369 * SYNE4 + 14.841 * PARP14 + 17.082 * PFKFB3 + 12.630 * DLL1 + 44.281 * NOX4 - 41.159 * C5orf25 - 14.220 * cg23488376 - 2.707 * MXRA5 - 5.883 * cg12837463 - 17.123 * TTC7B - 17.082 * KCNA7 - 9.468 * NKX21

Şekil 28. Tüm Değişkenlerin Dahil Olduğu çok değişkenli lineer regresyon analizi gerçek yaş tahmin denklemi

4.5.2.1.Tüm değişkenlerin dahil olduğu regresyon analizinin test varsayımları

Doğrusallık: Modelin artık değerler toplamı sıfıra eşittir. Oluşturulan basit saçılım grafiğine göre modelin doğrusallığının gerçekleşmiş olduğu görülmektedir (Şekil 29).



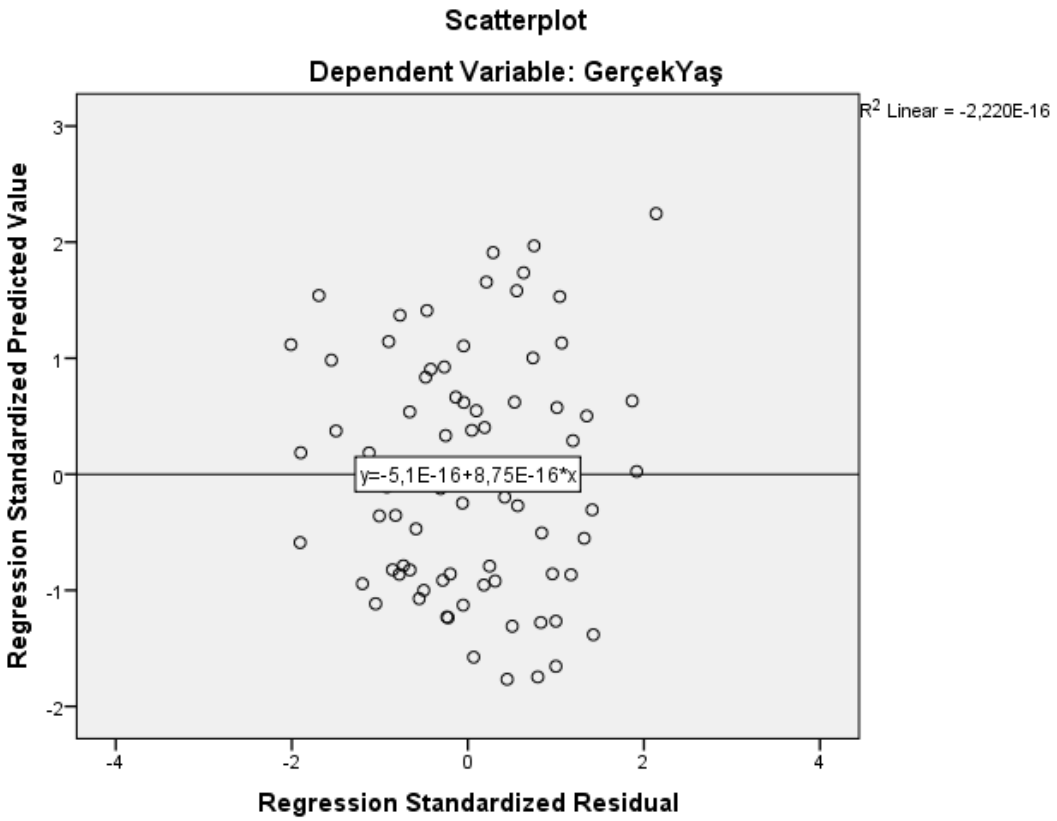
Şekil 29. Tüm değişkenlerin dahil edildiği çok değişkenli doğrusal regresyona ait P-P plot grafiği

Heteroskedasticity: Regresyon modelinde standardize tahmini değerlerin standardize artık değerlere göre saçılımı Şekil 30'da gösterilmektedir. Buna göre dağılımı varyans değişkenliği (heteroskedasticity) bulunmamaktadır.

Uç değerler: Ortalama Cook distance değeri 0.18; minimum ve maksimum standart artık değerler sırasıyla -2.011 ve 2.138 olduğundan uç değer izlenmemektedir.

Otokorelasyon: Durbin – Watson test değeri 1.622 olup buna göre değişkenler arasında otokorelasyon problemi yoktur.

Multicollinearity: Tablo XVIII de görüldüğü gibi Variance Inflation Factor (VIF) ve tolerans değerleri sırasıyla TTC7B belirteci için 13.893; 0.072; ve PFKFB3 belirteci için 8.709; 0.115 bulunmuştur. Bu değerlere göre birinci belirteç için yüksek, ikinci belirteç için orta derecede çoklu doğrusal bağlantı bulunduğu görülmüştür. TTC7B belirteci dışlanarak tekrarlanan analizde tüm belirteçler için VIF ve tolerans değerleri Tablo XIX da gösterildiği şekilde bulunmuş, multicollinearity problemi ortadan kalkmıştır. Bununla birlikte düzeltilmiş R^2 skoru 0.792 bulunmuştur. Tartışmada aktarılan sebeplerle TTC7B'nin model analizinde kalmasına karar verilmiştir.



Şekil 30. Tüm Değişkenlerin dahil edildiği çok değişkenli doğrusal regresyonuna ait standardize artık değer saçılım grafiği

Tablo XIX. TTC7B dahil edilmeden yapılan çoklu doğrusal bağlantı analizinin test değerleri.

MODEL	TOLERANS DEĞERİ	VIF DEĞERİ
SABİT		
SYNE4	.743	1.345
PARP14	.223	4.476
C5ORF25	.256	3.907
CG23488376	.238	4.197
MXRA5	.186	5.386
PFKFB3	.167	5.984
DLL1	.388	2.574
NOX4	.406	2.462
CG12837463	.220	4.552
KCNA7	.173	5.794
NKX21	.340	2.941

4.5.2.2.Tüm değişkenlerin dahil edildiği çok değişkenli doğrusal regresyon model validasyonu

Son aşamada elde edilen modelin validasyonu için model, 35 kişilik test grubuna uygulanarak bu gruptaki katılımcıların tahmini yaşları belirlenmiştir. Saptanan tahmini yaş değerleriyle gerçek yaş değerlerine dair ortalama değerler Tablo XX de verilmiştir. Yapılan eşleştirilmiş örneklem testi sonuçlarına göre gerçek ve tahmini yaş değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur. Gerçek yaş ve tahmini yaş değerleri arasında anlamlı ve ileri derecede doğrusal ilişki mevcuttur (R:0.710; p=0.000).

Tablo XX. Tüm değişkenlerin dahil edildiği yöntemle oluşturulan regresyon modeli için eşleştirilmiş örneklem test sonuçları

	GERÇEK YAŞ	***TAHMİNİ YAŞ***
ORTALAMA	33.3140	33.3176
STANDART SAPMA	8.2490	9.24665
ORTALAMA STANDART HATA	1.3943	1.56297

TEST MAD DEĞERİ	2.91	
EŞLEŞTİRİLMİŞ FARKLAR		
ORTALAMA	-0.00328	
STANDART SAPMA	6.60759	t=0.003 p=0.998
ORTALAMA STANDART HATA	1.1168	df=34
%95 GÜVENİRLİK ARALIĞI ALT SINIR	-2.2730	
%95 GÜVENİRLİK ARALIĞI ÜST SINIR	2.2665	

4.5.3. Farklı yaş gruplarında yaş tahmin başarısının değerlendirilmesi

Test grubunda yer alan örnekler 4 farklı gruba (birinci grup: 20-29; ikinci grup: 30-39; üçüncü grup:40-49 ve dördüncü grup: 50-59) ayrılarak hem enter hem de stepwise lineree regresyon modelleri için yaş tahimin başarısı değerlendirildi. 20-29, 30-39, 40-49 ve 53 yaşındaki bir kişi için stepwise lineer regresyon model denklemi ile belirlenen tahmini yaşlardaki sapmanın ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla; 2,38- 1,79; 3,96- 2,26; 3,81-2,13 ve 0,2 olarak hesaplanırken enter lineer regresyon model denklemi ile belirlenen tahmini yaşlardaki sapmanın ortalama ve standart sapma değerleri sırasıyla; 2,41-1,82; 3,35-2,4; 2,89-1,4 ve 1 olarak belirlenmiştir.

Tablo XXI. Yaş Gruplarında Tahmin Farklılıkları

Örnek Adı	Gerçek Yaş	Stepwise Lineer Regresyon Modeli	Fark	Ortalama/ Standart Sapma	Enter Lineer Regresyon Modeli	Fark	Ortalama/ Standart Sapma
20-29 Yaş Grubu							
T21-XY-253	**20**	23,55	3,55		24,84	4,84	
T21-XY-249	**21**	21,49	0,49		18,19	2,81	
T21-XY-15	**22**	20,90	1,10		20,14	1,86	

T21-XY-89	**24**	26,10	2,10		22,93	1,07	
T21-XY-218	**25**	29,19	4,19	2,38	30,14	5,14	2,41
T21-XY-52	**26**	28,86	2,86	1,79	26,51	0,51	1,82
T21-XY-215	**27**	21,48	5,52		21,71	5,29	
T21-XY-63	**27**	28,71	1,71		23,84	3,16	
T21-XY-36	**28**	23,10	4,90		29,77	1,77	
T21-XY-40	**28**	27,50	0,50		26,57	1,43	
T21-XY-39	**29**	27,99	1,01		28,39	0,61	
T21-XY-69	**29**	29,58	0,58		29,48	0,48	
30-39 Yaş Grubu							
T21-XY-22	**30**	31,92	1,92		33,98	3,98	
T21-XY-241	**30**	36,13	6,13		36,88	6,88	
T21-XY-283	**31**	28,45	2,55		28,36	2,64	
T21-XY-64	**31**	34,44	3,44		34,20	3,20	
T21-XY-251	**32**	27,95	4,05		29,03	2,97	
T21-XY-80	**32**	32,33	0,33		34,03	2,03	
T21-XY-27	**33**	35,23	2,23	3,96	33,75	0,75	3,35
T21-XY-213	**35**	39,22	4,22	2,26	38,35	3,35	2,40
T21-XY-37	**36**	34,63	1,37		35,31	0,69	
T21-XY-247	**37**	30,35	6,65		35,40	1,60	
T21-XY-248	**37**	30,43	6,57		34,57	2,43	
T21-XY-208	**39**	46,57	7,57		48,32	9,32	
T21-XY-94	**39**	34,53	4,47		35,27	3,73	
40-49 Yaş Grubu							
T21-XY-47	**40**	42,33	2,33		42,50	2,50	
T21-XY-275	**42**	34,70	7,30		36,29	5,71	
T21-XY-292	**43**	40,32	2,68	3,81	40,73	2,27	2,89
T21-XY-202	**45**	50,49	5,49	2,13	47,02	2,02	1,40
T21-XY-277	**46**	44,13	1,87		43,45	2,55	
T21-XY-95	**47**	43,83	3,17		44,70	2,30	
50-59 Yaş Grubu							
T21-XY-288	**53**	53,20	0,20	0,20	54,00	1,00	1,00

5. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada yaşa bağlı olarak gen ekspresyon değişiminden yola çıkılarak semenden yaş tahmini yapılması amacıyla yaşla yüksek korelasyon değerlerine sahip olduğu belirlenen 12 CpG lokusu çalışılmış ve multipleks panel oluşturulmuştur. Panel toplamda 115 semen örneğine uygulanmıştır. IBM SPSS Windows programında iki farklı lineer regresyon yöntemi (stepwise ve enter) kullanılarak yaş tahmini modeli oluşturulmuş ve modellerin validasyonu sağlanmıştır.

PARP14 geni poli (ADP-riboz) polimeraz aile üyesi 14 olarak adlandırılan enzim görevindeki potein üretiminden sorumludur. PARP14 enzimi ADP ribozillenmiş proteinler ile etkileşim kurabilmekle beraber üç alt üniteye sahiptir. PARP14 enzimi ile yapılan çalışmalara bakıldığında B hücrelerinde apoptotik sürecin düzenlenmesinde etkili olduğu ve hastalık gelişimine pozitif yönde etki ettiği bulunmakla beraber söz konusu enzimin göğüs, akciğer, mide ve beyin tümörlerinde yapılan incelemelerde yüksek ekspresyon düzeyine sahip olduğu saptanmıştır (113,114).

C5orf25 (Chromosome 5 open reading frame 25) geni, HUGO gen isimlendirme komitesi tarafından yapılan son güncellemede SIMC1(SUMO-interacting Motifs Containing 1) olarak adı değiştirilmiş olup çalışmada gen üzerinde yaş ile ilişkili olarak bulunan CpG lokusu S3 koduyla adlandırılmıştır. SIMC1 geni 5. Kromozom üzerinde açık okuma bölgesinde yer alır. Protein kodlayan bir gendir ve protein otolitik bozulmanın inhibisyonu için platform elemanı olarak rol almaktadır (115).

MXRA5 (Matrix Remodelling Associated 5) geni X kromozomu üzerinde bulunmakla beraber matris yeniden şekillenmesiyle ilişkili proteinlerden birini kodlamaktadır. MXRA5 üzerinde yer alan cg00881487 CpG ID'li noktanın artan yaşla lokustaki metilasyon oranı negatif korelasyon göstermekte ve artan yaşta meydana gelen varyansın %83'ünü açıklamaktadır (6).

PFKFB3 (6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase3) geninin kodladığı protein iki işlevli bir protein ailesine aittir. Enzim glikolizin kontrolünden sorumlu ve düzenleyici bir molekül olan fruktoz 2,6 bifosfatın hem sentez hem de parçalanmasında rol almaktadır. Enzim hücre döngüsünün ilerlemesi ve apoptozun engellenmesi için gereklidir. Ayrıca PFKFB geninin alternatif transkripsiyon formlarının enzimin farklı izoformlarını kodladığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda PFKFB3 enziminin çeşitli kanser türlerinde yüksek miktarda eksprese olduğu ve özellikle kanser kök hücrelerinde glikolizi ve mikroçevresinde hayatta kalma başarısını arttırmakla beraber kanser metastasında etkili olduğu görülmüştür (116,117). Lee ve ark. (2015) tarafından yapılan semen örneklerinde metilasyon analizine dayalı olarak yaş tayini çalışmasında; 12 örnekle yapılan çalışmada PFKFB3 CpG noktasının R^2 değerinin 0.831 iken 31 semen örneğinde R^2 değerinin 0.433 olarak belirlediği görülmüştür (6).

DLL1 (Delta Like Canonical Notch Ligand 1) 6. kromozom üzerinde bulunur protein kodlayıcı gen olup Delta benzeri protein 1 proteininin kodlanmasından sorumludur. DLL1, Notch hücre yüzey reseptörünün ligandı olmakla beraber, notch sinyal yolağı farklılaşma, çoğalma, apoptoz ve morfogenezde rol alır (6).

NOX4 geni (NADPH oksidaz 4) 11. Kromozom üzerinde yer almaktadır. Protein kodlayan bir gen olan NOX4, NADPH oksidaz enzim alt bileşenlerinden birini kodlamaktadır. Lee ve ark. (2015) NOX4 genine ait cg06979108 metilasyon noktasının yaş tayini için uygun marker olduğunu 31 semen örneği DNA'sına bisülfit dönüşümü ardından SNaPshot yaparak ortaya koymuş ve artan yaşla pozitif korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Pisarek ve ark.(2021) tarafından semenden yaş tayini için marker seçimi ve model geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmada istatistiksel olarak en önemli ve en yüksek korelasyon gösteren metilasyon noktasının NOX4 olduğu belirlenmiş ve +0,59 korelasyon ile artan yaşla pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır (6,118).

Çalışmada S9 olarak adlandırdığımız cg12837463 metilasyon noktası 7. kromozom üzerinde yer almaktadır. Kayser ve ark.(2021) tarafından 26-56 yaş aralığındaki 125 kişiden alınan semen örnekleriyle yapılan çalışmada cg12837463 noktasının korelasyon değeri çalışma ile aynı yönlü, negatif, ancak daha düşük -0,46 olarak belirlenmiştir (118). Lee ve ark. (2015) tarafından yapılan ön çalışmada cg12837463 CpG noktasınan artan yaşla negatif yönlü yüksek korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (6).

TTC7B geni (tetratrikopeptit tekrar bölgesi 7B) 14. kromozomda -0,568489 yer alır ve fosfatidilinositol 4-kinaz enziminin plazma zarına lokalizasyonunu sağlayan kompleksin bir bileşenini kodlar. Söz konusu kompleks fosfatidilinositol 4-kinaz enzim sentezinde regülatör rolüne sahiptir. Bölgenin Lee ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada da artan yaşla lokustaki metilasyon oranı arasında negatif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (6).

KCNA7 (voltaj kapılı potasyum kanalı A alt ailesi üyesi 7) geni voltaj bağımlı potasyum kanalı olarak rol alan protein kodlamakla görevlidir. KCNA7 proteininin membrana gömülü 6 bölgeye sahiptir, protein öncelikli olarak iskeleti kalp ve böbreklerde eksprese olmakla beraber kalp hastalıklarının kalıtımında rol aldığı düşünülmektedir. Lee ve ark. tarafından yapılan çalışmada çalışmamıza benzer olarak negatif korelasyon varlığı saptanmıştır (6). Atsem ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada da diğer çalışmalara benzer olarak KCNA7 CpG lokusunun hipometile bir profil göstermekle beraber -0,34 değerinde korelasyon katsayısına sahip olduğu gözlemlenmiştir (119).

Çalışmada NKX2-1; NK2 homeobox ya da tiroid transkripsiyon faktörü olarak adlandırılan genin üzerinde yer alan cg18686206 CpG ID'li lokusta Lee ve ark. tarafından yapılan çalışmada da lokusun artan yaşla metilasyon oranı arasındaki negatif korelasyonu gözlemlenmiştir (6).

SYNE4, spektrin içeren nükleer zar aile üyesi 4 geni 19. kromozomda bulunan protein kodlayıcı bir gendir. Söz konusu protein nükleus zarının dış kısmında lokalize olup hücre iskeleti ile

nükleer iskelet arası bağlayıcı kompleks bir proteinin, bir alt ünitesidir. Gende meydana gelen mutasyonlar işitme kayıpları ile ilişkilendirmiştir (120).

Literatürde yer alan semen örneklerinden yaş tayin modelleri ve performansları incelendiğinde:

Semen örneğinde metilasyon analizine dayalı olarak yapılan ilk çalışma Lee ve ark (2015) tarafından yapılmıştır. 12 gönüllüden alınan semen örnekleri Infinium HumanMethylation450 BeadChip array ile çalışmış yaş tayininde kullanılabilecek potansiyel 24 CpG noktası belirlenmiştir. SNaPshot metodu kullanarak 20-73 yaş aralığındaki ekstra 68 örnekte bu CpG lokusları çalışılmıştır. En iyi korelasyon değerinin TTC7B geninde yer alan ve bizimde çalışmamızda değerlendirdiğimiz ancak farklı oranda korelasyon değerine sahip olduğunu tespit ettiğimiz cg06304190 lokusunda bulunduğu saptanmıştır. 3 CpG (cg06304190, cg06979108 ve cg12837463) lokusu içeren lineer regresyon modeli kullanarak tahmini ve gerçek yaş arasındaki ortalama mutlak sapma 5 olarak hesaplanmıştır (6). Çalışmamızda aynı bölgeler çalışılmasına rağmen farklı oranlarda korelasyon değerleri eldesi; metilasyonun kişinin maruz kaldığı çevresel faktörlerden etkilenmesinden ileri gelebileceği gibi popülasyon farklılığından da kaynaklanmış olabilir. Bu etmenler ileriki çalışmalarda göz önünde bulunurulmalı ve farklılığın temel sebebi ortaya koyulmalıdır.

Li ve ark. (2017) 21-54 yaş arasındaki 38 gönüllünün semen örneğinde sadece cg06979108 lokus analizi ile bisülfit pirodizileme yöntemi kullanmış ve Çin Han popülasyonundaki erkeklerde yaş tahmini yapmışlardır. Geliştirdikleri lineer regresyon modelinin başarı yüzdesi 74 (R^2=0.739) olarak bulunurken validasyon için kullandıkları 17 örnekle modelin MAD değeri 4.048 olarak hesaplanmıştır (121).

Jenkins ve ark.(2018) HumanMethylation450 BeadChip array datasını 329 semen örneğinde çalışmıştır. 51 CpG lokusunu içeren lineer regresyon modeli oluşturulmuş model test grubunda değerlendirilerek MAE değeri bizim çalışmamızla benzer olarak 2.37 olarak bulunmuştur (122).

Pisarek ve ark.(2021) semenden yaş tayininde kullanmak üzere model geliştirmişlerdir. 13 CpG lokusunun validasyonunu yaparak, 12 CpG lokusun yaş ile korelasyonu değerlendirilmiştir. Geliştirdikleri tahmin modeline ait 6 CpG lokusu; SH2B2, EXOC3, IFITM2 ve GALR2 genleri üzerindedir ve modele ait MAD: 5.1 olarak bulunmuştur (118).

Çalışmamızda literatürde farklı sayılarda CpG noktaları ile yapılan yaş tahmin modellemeleri ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında ±4.7 aralığında yaş tahmini yapılabileceği görülmüştür. Çalışmamızda diğer araştırmalara göre model ve test grubu daha (80 ve 35) geniş tutulmuştur. Ancak bundan sonraki çalışmalarda daha fazla sayıda gönüllü ile çalışılması çalışmanın başarısını arttıracaktır. Yapılan çalışmada farklı yaş grupları arasında tahmin sonuçları değerlendirilmiş genel ortalamadan farklı bir sonuç gözlenmemiştir (TabloXXI). Ancak 40 yaş üzerinde örnek sayısı az olduğundan test grubu sayısının arttırılması daha net sonuçlar ortaya koyacaktır.

Çalışmada TTC7B ve PFKFB3 belirteçleri için çoklu doğrusal bağlantı problemi görülmüştür. Ancak gen ontolojisi (GO) çalışması yapılamadığı için hangi CpG ile etkileşimde olduğu belirlenememiştir.

Adli bilimlerde genetik incelemeler delil ile şüphelinin DNA profili eşleşmesine dayanmakta olup şüpheli olmadığı durumda profil eldesinin rolü olamamaktadır Son dönemde adli fenotipleme çalışmaları ile DNA'dan kişinin dış görünüşü dair bilgi edinilmektedir. Yaş tüm bu fenotipik özellikler gibi özellikle DNA veri bankası olmayan ülkeler için oldukça önemlidir. Sadece diş ve kemik yapısı kompozisyonunun uzmanlarca değerlendirilmesi sonucunda bir yaş

tahmini yapılması ve bu materyallerin her suç olgusunda eldesi mümkün olamaması, metilasyon çalışmalarını önemli kılmıştır. Olay yerinde bulunan biyolojik örnekler kan, semen, vajinal sekresyon ve tükürük olup semen örnekleri özellikle cinsel saldırı olaylarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Bu gibi olgularda saldırganın yaşının belirlenmesi olayın aydınlatılması veya suçlunun alacağı cezanın belirlenmesinde oldukça kritik olabilmektedir.

Sonuç olarak semen örneklerinden yaşla metilasyon düzeyinde farklılaşma meydana geldiği gerçeği ile yola çıkılarak çok değişkenli lineer regresyon modeli ile semenden yaş tahmin paneli oluşturulmuş ve validasyonu tamamlanmıştır. Panelle ±4.7 aralığında yaş tahmini yapılabileceği ortaya koyulmuştur. Panelin özellikle cinsel saldırı olaylarında failin tespitine katkı sağlaması beklenmektedir. Geliştirilen panel Adli Tıp Kurumu, Emniyet Genel Müdürlüğü Kriminal Polis Laboratuvarları, Jandarma Genel Komutanlığı Kriminal Daire Başkanlığı Kriminal Laboratuvarları ve üniversiteler ile enstitülerin yaş tayini yapılmasını gerektiren araştırma projelerinde kullanılabilecektir.

6. Kaynakça

1. Rana AK. Crime investigation through DNA methylation analysis: methods and applications in forensics. Egypt J Forensic Sci. 2018;8(1):1–17.

2. Zha S, Wei X, Fang R, Wang Q, Lin H, Zhang K, et al. Estimation of the age of human semen stains by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a preliminary study. Forensic Sci Res [Internet]. 2020;5(2):119–25. Available from: https://doi.org/10.1080/20961790.2019.1642567

3. Nakanishi H, Hara M, Takahashi S, Takada A, Saito K. Evaluation of forensic examination of extremely aged seminal stains. Leg Med [Internet]. 2014;16(5):303–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2014.04.002

4. Hamano Y, Manabe S, Morimoto C, Fujimoto S, Tamaki K. Forensic age prediction for saliva samples using methylation-sensitive high resolution melting: Exploratory application for cigarette butts. Sci Rep [Internet]. 2017;7(1):1–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-10752-w

5. 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.

6. Lee HY, Jung SE, Oh YN, Choi A, Yang WI, Shin KJ. Epigenetic age signatures in the forensically relevant body fluid of semen: A preliminary study. Forensic Sci Int Genet. 2015;19:28–34.

7. Richards R, Patel J, Stevenson K, Harbison SA. Evaluation of massively parallel sequencing for forensic DNA methylation profiling. Electrophoresis. 2018;39(21):2798–805.

8. 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.

9. Stigler SM. Galton and identification by fingerprints. Genetics. 1995;140(3):857–60.

10. Satcher L. DNA Methylation Analysis for Tissue and Age Determination for DNA Methylation Analysis for Tissue and Age Determination for Forensic Human Identification Forensic Human Identification. 2020;

11. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, et al. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science (80-). 1987;235(4796):1616–22.

12. Parson W. Age Estimation with DNA: From Forensic DNA Fingerprinting to Forensic (Epi)Genomics: A Mini-Review. Gerontology [Internet]. 2018;64(4):326–32. Available from: https://www.karger.com/Article/FullText/486239

13. Kayser M. Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. Forensic Sci Int Genet [Internet]. 2015;18:33–48. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.02.003

14. Butler JM, Buel E, Crivellente F, McCord BR. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. Electrophoresis. 2004;25(10–11):1397–412.

15. Budowle B, Bieber FR, Eisenberg AJ. Forensic aspects of mass disasters: Strategic considerations for DNA-based human identification. Leg Med. 2005;7(4):230–43.

16. Stranger BE, Stahl EA, Raj T. Progress and promise of genome-wide association studies for human complex trait genetics. Genetics. 2011;187(2):367–83.

17. Branicki W, Brudnik U, Kupiec T, Wolañska-Nowak P, Wojas-Pelc A. Determination of phenotype associated SNPs in the MC1R gene. J Forensic Sci. 2007;52(2):349–54.

18. Walsh S, Liu F, Ballantyne KN, Van Oven M, Lao O, Kayser M. IrisPlex: A sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. Forensic Sci Int

Genet [Internet]. 2011;5(3):170–80. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.02.004

19. Pośpiech E, Draus-Barini J, Kupiec T, Wojas-Pelc A, Branicki W. Gene-gene interactions contribute to eye colour variation in humans. J Hum Genet. 2011;56(6):447–55.

20. Haddrill PR. Developments in forensic DNA analysis. Emerg Top Life Sci. 2021;0:1–13.

21. Branicki W, Liu F, Van Duijn K, Draus-Barini J, Pośpiech E, Walsh S, et al. Model-based prediction of human hair color using DNA variants. Hum Genet. 2011;129(4):443–54.

22. Walsh S, Chaitanya L, Clarisse L, Wirken L, Draus-Barini J, Kovatsi L, et al. Developmental validation of the HIrisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. Forensic Sci Int Genet [Internet]. 2014;9(1):150–61. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.006

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

24. Meg R. Gerstenblith, Alisa M. Goldstein, Maria Concetta Fargnoli, Ketty Peris and MTL. Comprehensive Evaluation of Allele Frequency Differences of MC1R Variants Across Populations. Hum Mutat. 2006;28(February):495–505.

25. Marcińska M, Pośpiech E, Abidi S, Andersen JD, Van Den Berge M, Carracedo Á, et al. Evaluation of DNA variants associated with androgenetic alopecia and their potential to predict male pattern baldness. PLoS One. 2015;10(5):1–18.

26. Fagertun J, Wolffhechel K, Pers TH, Nielsen HB, Gudbjartsson D, Stefansson H, et al. Predicting facial characteristics from complex polygenic variations. Forensic Sci Int Genet. 2015;19:263–8.

27. Adhikari K, Fuentes-Guajardo M, Quinto-Sánchez M, Mendoza-Revilla J, Camilo Chacón-Duque J, Acuña-Alonzo V, et al. A genome-wide association scan implicates DCHS2, RUNX2, GLI3, PAX1 and EDAR in human facial variation. Nat Commun. 2016;7(May):1–11.

28. Cunha E, Baccino E, Martrille L, Ramsthaler F, Prieto J, Schuliar Y, et al. The problem of aging human remains and living individuals: A review. Forensic Sci Int. 2009;193(1–3):1–13.

29. Schmeling A, Geserick G, Reisinger W, Olze A. Age estimation. Forensic Sci Int. 2007;165(2–3):178–81.

30. Alkass K, Buchholz BA, Ohtani S, Yamamoto T, Druid H, Spalding KL. Age estimation in forensic sciences: Application of combined aspartic acid racemization and radiocarbon analysis. Mol Cell Proteomics. 2010;9(5):1022–30.

31. M.S. G. Adli Tıpta Yaş Tayininde Kullanılan Radyolojik Atlasların Değerlendirilmesi.Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi; 2021.

32. Sirin N, Matzenauer C, Reckert A, Ritz-Timme S. Age estimation based on aspartic acid racemization in dentine: What about caries-affected teeth? Int J Legal Med. 2018;132(2):623–8.

33. Stephenson RC, Clarke S. Succinimide formation from aspartyl and asparaginyl peptides as a model for the spontaneous degradation of proteins. J Biol Chem [Internet]. 1989;264(11):6164–70. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83327-0

34. Geiger T, Clarke S. Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. J Biol Chem [Internet]. 1987;262(2):785–94. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)75855-4

35. Helfman PM, Bada JL. Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975;72(8):2891–4.

36. Griffin RC, Moody H, Penkman KEH, Fagan MJ, Curtis N, Collins MJ. A new approach to amino acid racemization in enamel: Testing of a less destructive sampling methodology. J Forensic Sci.

2008;53(4):910–6.

37. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. Recent Prog Horm Res. 2001;56:1–21.

38. Bartling B, Desole M, Rohrbach S, Silber R, Simm A. Age-associated changes of extracellular matrix collagen impair lung cancer cell migration. FASEB J. 2009;23(5):1510–20.

39. Lynnerup N, Kjeldsen H, Zweihoff R, Heegaard S, Jacobsen C, Heinemeier J. Ascertaining year of birth/age at death in forensic cases: A review of conventional methods and methods allowing for absolute chronology. Forensic Sci Int [Internet]. 2010;201(1–3):74–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.03.026

40. Torroni A, D'Urbano L, Rengo C, Scozzari R, Sbracia M, Manna C, et al. Intracytoplasmic injection of spermatozoa does not appear to alter the mode of mitocondrial DNA inheritance [1]. Hum Reprod. 1998;13(6):1747–9.

41. Meissner C, Ritz-Timme S. Molecular pathology and age estimation. Forensic Sci Int [Internet]. 2010;203(1–3):34–43. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.010

42. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. J Biol Chem [Internet]. 2002;277(47):44784–90. Available from: http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M207217200

43. Melov S, Shoffner JM, Kaufman A, Wallace DC. Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle. Nucleic Acids Res. 1995;23(23):4938.

44. Kovalenko SA, Kopsidas G, Kelso JM, Linnane AW. Deltoid human muscle MTDNA is extensively rearranged in old age subjects. Biochem Biophys Res Commun. 1997;232(1):147–52.

45. Meissner C, Bruse P, Oehmichen M. Tissue-specific deletion patterns of the mitochondrial genome with advancing age. Exp Gerontol. 2006;41(5):518–24.

46. Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, et al. Mammalian Mitochondrial DNA Replicates Bidirectionally from an Initiation Zone. J Biol Chem [Internet]. 2003;278(51):50961–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M308028200

47. Herrmann M, Pusceddu I, März W, Herrmann W. Telomere biology and age-related diseases. Clin Chem Lab Med. 2018;56(8):1210–22.

48. Zglinicki T, Martin-Ruiz C. Telomeres as Biomarkers for Ageing and Age-Related Diseases. Curr Mol Med. 2005;5(2):197–203.

49. Tsuji A, Ishiko A, Takasaki T, Ikeda N. Estimating age of humans based on telomere shortening. Forensic Sci Int. 2002;126(3):197–9.

50. 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;125(4):603–8.

51. Cho S, Ge J, Seo SB, Kim K, Lee HY, Lee SD. Age estimation via quantification of signal-joint T cell receptor excision circles in Koreans. Leg Med [Internet]. 2014;16(3):135–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2014.01.009

52. 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 [Internet]. 2010;20(22):970–1. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.022

53. Jin Z, Liu Y. DNA methylation in human diseases. Genes Dis [Internet]. 2018;5(1):1–8. Available from: https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.01.002

54. Hamilton JP. Epigenetics: Principles and practice. Dig Dis. 2011;29(2):130–5.

55. Joosten SC, Smits KM, Aarts MJ, Melotte V, Koch A, Tjan-Heijnen VC, et al. Epigenetics in renal cell cancer: Mechanisms and clinical applications. Nat Rev Urol [Internet]. 2018;15(7):430–51. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/s41585-018-0023-z

56. Vidaki A, Daniel B, Court DS. Forensic DNA methylation profiling - Potential opportunities and challenges. Forensic Sci Int Genet [Internet]. 2013;7(5):499–507. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.05.004

57. Mahmoud SA, Poizat C. Epigenetics and chromatin remodeling in adult cardiomyopathy. J Pathol. 2013;231(2):147–57.

58. Kim S, Kaang BK. Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory. Exp Mol Med [Internet]. 2017;49(1):e281-8. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/emm.2016.140

59. Tollefsbol TO. Handbook of epigenetics: The new molecular and medical genetics. Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics. 2017. 1–668 p.

60. Gündoğdu R, Çelik V. RNA İnterferans (RNAi). Erciyes Üniversitesi Fen Bilim Enstitüsü Derg. 2009;25:34–47.

61. Das S, Shah R, Dimmeler S, Freedman JE, Holley C, Lee JM, et al. Noncoding RNAs in cardiovascular disease: Current knowledge, tools and technologies for investigation, and future directions: A scientific statement from the american heart association. Circ Genomic Precis Med. 2020;(August):350–72.

62. Hotchkiss D. The Quantative Separation of Purines and Nucleosides . J Biol Chem [Internet]. 175(1):315–32. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57261-6

63. Moore LD, Le T, Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. Neuropsychopharmacology. 2013;23–38.

64. Dodge JE, Ramsahoye BH, Wo ZG, Okano M, Li E. De novo methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. Gene. 2002;289(1–2):41–8.

65. Sweatt JD, Nestler EJ, Meaney MJ, Akbarian S. An Overview of the Molecular Basis of Epigenetics [Internet]. First Edit. Epigenetic Regulation in the Nervous System. Elsevier Inc.; 2013. 3–33 p. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-391494-1.00001-X

66. Huang K, Fan G. DNA methylation in cell differentiation and reprogramming: An emerging systematic view. Regen Med. 2010;5(4):531–44.

67. B. E.Eser, Ü.C. Yazgan,S. A. Gürses MA. Diabetes Mellitus ve Epigenetik Mekanizmalar. 2016;43(2):375–82.

68. Pastor WA, Aravind L, Rao A. TETonic shift : biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. 2013;14(June).

69. Zhao G, Yang Q, Huang D, Yu C, Yang R, Chen H, et al. Study on the application of parent-of-origin specific DNA methylation markers to forensic genetics. Forensic Sci Int. 2005;154(2–3):122–7.

70. Nakayashiki N, Takamiya M, Shimamoto K, Aoki Y, Hashiyada M. Studies on differentially methylated parental allele in imprinted genes. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser. 2008;1(1):572–3.

71. Silva SS, Lopes C, Teixeira AL, Sousa MJC De, Medeiros R. Forensic miRNA: Potential biomarker for body fluids? Forensic Sci Int Genet. 2015;14:1–10.

72. Sijen T. Molecular approaches for forensic cell type identification: On mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers. Forensic Sci Int Genet [Internet]. 2015;18:21–32. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.11.015

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

74. Frumkin D, Wasserstrom A, Budowle B, Davidson A. DNA methylation-based forensic tissue identification. Forensic Sci Int Genet [Internet]. 2011;5(5):517–24. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.12.001

75. Alghanim H, Balamurugan K, McCord B. Development of DNA methylation markers for sperm, saliva and blood identification using pyrosequencing and qPCR/HRM. Anal Biochem [Internet]. 2020;611(June):113933. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113933

76. 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 [Internet]. 2015;19:136–45. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.07.014

77. Du Q, Zhu G, Fu G, Zhang X, Fu L, Li S, et al. A Genome-Wide Scan of DNA Methylation Markers for Distinguishing Monozygotic Twins. Twin Res Hum Genet. 2015;18(6):670–9.

78. Jiang Y, Wei J, Zhang H, Ewart S, Rezwan FI, Holloway JW, et al. Epigenome wide comparison of DNA methylation profile between paired umbilical cord blood and neonatal blood on Guthrie cards. Epigenetics [Internet]. 2020;15(5):454–61. Available from: https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1699983

79. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(30):10604–9.

80. 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;3(1):337–8.

81. Li C, Zhao S, Zhang N, Zhang S, Hou Y. Differences of DNA methylation profiles between monozygotic twins' blood samples. Mol Biol Rep. 2013;40(9):5275–80.

82. Park JL, Woo KM, Kim SY, Kim YS. Potential forensic application of DNA methylation to identify individuals in a pair of monozygotic twins. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser [Internet]. 2017;6(September):e456–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.177

83. Vidaki A, Kayser M. Recent progress, methods and perspectives in forensic epigenetics. Forensic Sci Int Genet [Internet]. 2018;37(August):180–95. Available from: https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.08.008

84. Mawlood SK, Dennany L, Watson N, Pickard BS. The EpiTect Methyl qPCR Assay as novel age estimation method in forensic biology. Forensic Sci Int [Internet]. 2016;264:132–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.03.047

85. 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.

86. Huang Y, Yan J, Hou J, Fu X, Li L, Hou Y. Developing a DNA methylation assay for human age prediction in blood and bloodstain. Forensic Sci Int Genet [Internet]. 2015;17:129–36. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.007

87. Sven Bocklandt, Wen Lin, Mary E. Sehl, Francisco J. Sa´nchez, , Janet S. Sinsheimer S, Horvath EV. Epigenetic Predictor of Age. PLoS One. 2012;7(4):1–10.

88. Jung SE, Lim SM, Hong SR, Lee EH, Shin KJ, 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 [Internet]. 2019;38:1–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.09.010

89. Correia Dias H, Cunha E, Corte Real F, Manco L. Age prediction in living: Forensic epigenetic age estimation based on blood samples. Leg Med [Internet]. 2020;47(May):101763. Available from: https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2020.101763

90. Zapico SC, Gauthier Q, Antevska A. Identifying Methylation Patterns in Dental Pulp Aging : Application to Age-at-Death Estimation in Forensic Anthropology. 2021;

91. Creasy DM, Chapin RE. Male Reproductive System. In: Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology [Internet]. Third Edit. Elsevier; 2013. p. 2493–598. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00059-5

92. Coward, K. Wells D. Textbook of Clinical Embriology. United Kingdom: Cambridge University Press; 2013. 391 p.

93. Kızılay F, Altay B. Spermatogenez, spermiyogenezis ve klinik yansımaları. Androloji Bülteni. 2019;177–84.

94. Ö. Sİ ve B. Güncel Üroloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi;

95. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. Semin Cell Dev Biol. 1998;9(4):411–6.

96. Tiwana MS, Leslie SW. Anatomy , Abdomen and Pelvis , Testicle. 2021;1–6.

97. Flint M, Agarwal A, Clinic C, Plessis SS Du. Male Accessory Sex Glands: Structure and Function. In: Mammalian Endocrinology and Male Reproductive Biology. 2015. p. 245–57.

98. Ehmcke J, Hübner K, Schöler HR, Schlatt S. Spermatogonia: Origin, physiology and prospects for conservation and manipulation of the male germ line. Reprod Fertil Dev. 2006;18(1–2):7–12.

99. Tsili AC, Sofikitis N, Stiliara E, Argyropoulou MI. MRI of testicular malignancies. Abdom Radiol [Internet]. 2019;44(3):1070–82. Available from: https://doi.org/10.1007/s00261-018-1816-5

100. Yang Y, Workman S, Wilson MJ. The molecular pathways underlying early gonadal development. J Mol Endocrinol. 2019;62(1):R47–64.

101. Jan SZ, Hamer G, Repping S, de Rooij DG, Van Pelt AMM, Vormer TL. Molecular control of rodent spermatogenesis. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis [Internet]. 2012;1822(12):1838–50. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.008

102. Özpak, Lütfiye., Pazarbaşı A. Erkek İnfertilitesinin Sitogenetiği. 2011;20:230–45.

103. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertil Steril [Internet]. 1988;49(1):112–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(16)59660-5

104. Kuyucu F. Oligoastenospermik İnfertil HastalardaVarikosel Saptanan ve Varikosel Saptanmayan Grupların Mitokondrial DNA Delesyonlarının Araştırılması .T.C Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Oligoastenospermik. 2006.

105. Erdemir F, Firat F, Gencten Y. The Evaluation and Clinical Significance of Sperm Morphology. Türk Üroloji Semin Urol Semin. 2011;2(1):11–7.

106. Çavlak G.Ö., Müslümanoğlu Ö.H.A., Akyüz F., Türker A. ÇÜ. Asit fosfataz, PSA Testleri ve Mikroskobik İnceleme ile Meni Lekelerinin Hassasiyetlerinin, Seçiciliğinin ve Tespit Sınırının Belirlenmesi. Adli Tıp Derg. 2015;30(1):103–9.

107. Singh Rana A, Verma P, Vekariya H, Mittal P. Study on Acid Phosohatase Enzyme Activity in Semen Mixed with Various Body Fluids. J Forensic Sci Crim Inves. 2019;11(5):1–8.

108. Lewis J, Baird A, McAlister C, Siemieniuk A, Blackmore L, McCabe B, et al. Improved detection of semen by use of direct acid phosphatase testing. Sci Justice [Internet]. 2013;53(4):385–94. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.scijus.2013.04.009

109. Laffan Á, Sawyer I, Quinones I, Daniel B. Evaluation of semen presumptive tests for use at crime scenes. Med Sci Law. 2011;51(1):11–7.

110. Hanson EK, Berdos PN, Ballantyne J. Testing and evaluation of 43 "Noncore" Y chromosome markers for forensic casework applications. J Forensic Sci. 2006;51(6):1298–314.

111. Yücebilgili K. Türkiye İnsan Popülasyonunda 17 Y-STR Lokusu İçin Allel ve Haplotip Analizi. Fatih Üniversitesi; 2011.

112. Mertoğlu E. Türkiye'deki Y-STR Mutasyon Oranlarının Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi; 2013.

113. Yao N, Chen Q, Shi W, Tang L, Fu Y. PARP14 promotes the proliferation and gemcitabine chemoresistance of pancreatic cancer cells through activation of NF-κB pathway. Mol Carcinog. 2019;58(7):1291–302.

114. Nicolae CM, Aho ER, Choe KN, Constantin D, Hu HJ, Lee D, et al. A novel role for the mono-ADP-ribosyltransferase PARP14/ARTD8 in promoting homologous recombination and protecting against replication stress. Nucleic Acids Res. 2015;43(6):3143–53.

115. Coding P. SIMC1 Gene-SUMO Interacting Motifs Containing 1 [Internet]. Vol. 1. 2022. Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SIMC1

116. Thirusangu P, Ray U, Sarkar Bhattacharya S, Oien DB, Jin L, Staub J, et al. PFKFB3 regulates cancer stemness through the hippo pathway in small cell lung carcinoma. Oncogene [Internet]. 2022;(July). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35804016

117. Lei L, Hong LL, Ling ZN, Candidate YZ, Hu XY, Li P, et al. A potential oncogenic role for pfkfb3 overexpression in gastric cancer progression. Clin Transl Gastroenterol. 2021;12(7):1–10.

118. Pisarek A, Pośpiech E, Heidegger A, Xavier C, Papież A, Piniewska-Róg D, et al. Epigenetic age prediction in semen - marker selection and model development. Aging (Albany NY). 2021;13(15):19145–64.

119. Atsem S, Reichenbach J, Potabattula R, Dittrich M, Nava C, Depienne C, et al. Paternal age effects on sperm FOXK1 and KCNA7 methylation and transmission into the next generation. Hum Mol Genet. 2016;25(22):4996–5005.

120. Horn HF, Brownstein Z, Lenz DR, Shivatzki S, Dror AA, Dagan-Rosenfeld O, et al. The LINC complex is essential for hearing. J Clin Invest. 2013;123(2):740–50.

121. Li L, Song F, Huang Y, Zhu H, Hou Y. Age-associated DNA methylation determination of semen by pyrosequencing in Chinese Han population. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser [Internet]. 2017;6(September):e99–100. Available from: https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.042

122. Jenkins TG, Aston KI, Cairns B, Smith A, Carrell DT. Paternal germ line aging: DNA methylation age prediction from human sperm. BMC Genomics. 2018;19(1):1–10.

7. Ekler

Ek1. Spermden DNA İzolasyonu (Omega, E.Z.N.A. ® Tissue DNA Kit)

1. 200 µl semen örneği 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
2. 200 µl TL Buffer ve 20 µl 1M DTT eklenip 10 sn vortekslendi.
3. Isıtıcı blokta 55° C'de 15 dk inkübe edildi. Lizis etkinliğini arttırmak için 2 dk da bir vortekslendi.
4. 25 µl proteinaz K solüsyonu eklendi ve ısıtıcı blokta 60 ° C'de 45 dakika inkübe edildi.
5. 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
6. 225 µl BL Buffer eklendi ve 10 sn vortekslendi.
7. Örnekler ısıtıcı blokta 60° C'de 10 dk bekletildi. Lizisin etkinliğini arttırmak için 3dk'da bir 10sn vortekslendi.
8. 14.000rpm'de 1dk santrifüj edildi.
9. 300 µl Isopropanol eklendi 15 sn vortekslendi.
10. HiBind® DNA mini spin kolonu çıkarıldı ve mikrosantrifüj tüpündeki süpernatant, spin kolona transfer edildi.
11. 14.000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi.
12. Altındaki filtrat içeren tüpü atıldı yeni toplama tüpü eklendi.
13. Kolona 500 µl Buffer HBC eklendi.
14. 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi, toplama tüpü yenilendi.
15. Kolona 700 µl DNA Wash Buffer eklendi.
16. 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi, toplama tüpü yenilendi.
17. Kolona 700 µl DNA Wash Buffer eklendi.
18. Boş şekilde 14,000rpm de 2 dk santrifüj edildi.
19. HiBind® DNA mini spin kolonu, 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Kolonun kapağı açılarak oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
20. 100 µl Elüsyon Buffer eklendi.
21. 5 dk oda ısısında (25° C) bekletildi.
22. 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
23. Spin kolonu atıldı. İzolatlar parafilmlenerek -20° C 'de saklandı.

Ek2. DNA Miktar Tayini (Quant-it^{TM} dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen))

1. Cihazının kalibrasyonu için 2 standart (Standart 1(S1) ve Standart 2 (S2)) kullanıldı.

2. Miktar tayini yapılacak her örnek ve 2 standart için Quant-itTM dsDNA HS Buffer çözeltisinden 199 µL Quant-itTM Reagent 1 µL alınarak karışım hazırlandı.

3. Hazırlanan karışım çözeltisinden standartlar için 190 µL, S1 ve S2'den ise ayrı ayrı 10 µL alındı.

4. Karışım çözeltisinden 199 µL ve DNA örneklerinden 1 µL alınarak karışım hazırlandı.

5. Standart ve örnek karışımları oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.

6. Cihazda sırasıyla S1 ve S2'nin ölçümü yapıldı ve kalibrasyon sağlandı.

7. Örnekler sırasıyla cihaza yerleştirilerek ölçümleri sağlandı.

8. Miktarları belirlenen DNA izolatları 10 ng/µL'ye seyreltildi.

Ek3. Bisülfit Dönüşümü (EZ DNA Methylation Gold™ Kit (Zymo Research))

1. DNA izolatından 20 µL alınarak PCR tüpüne aktarıldı.

2.130 µL Bisulfite CT Conversion Reagent DNA izolatlarının üzerine eklenerek pipetaj yapıldı ve kısa spin atıldı.

3. Termal döngü cihazında Tablo XXI de belirtilen koşullarında inkübasyon sağlandı.

Tablo XXI. Termal Döngü Cihazı Koşulları

Sıcaklık	*Süre*
98 °C	10 dakika
64°C	2,5 saat
4°C	∞

4. İnkübasyon sonucu örnekler ME Spin kolonuna aktarıldı.

5. 600 µL ME Binding Buffer spin kolonlara eklendi.

6. 14.000 rpm hızda 30 sn santrifüj yapıldı.

7. Toplama tüpündeki filtrat döküldü ve tekrar kullanıldı.

8. 100 µL M- Wash Buffer kolona eklendi ve 14.000 rpm hızda 30 sn santrifüj yapıldı.

9. 200 µL M-Desulphonation Buffer kolona eklendi ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildi.

10. 14000 rpm hızda 30 sn santrifüj yapıldı.

11. 200 µL M- Wash Buffer kolona eklendi ve 14000 rpm hızda 30 sn santrifüj edildi.

12. 200 µL M- Wash Buffer kolona eklendi ve 14000 rpm hızda 30 sn santrifüj edildi.

13. ME Spin kolonları 1,5 mL eppendorf tüpe yerleştirildi.

14. 10 µL ME Elution Buffer kolona eklendi ve 14000 rpm hızda 30 saniye santrifüj edildi.

15. ME Spin kolonları çıkarılarak -20°C'de saklandı.

Ek4. Agaroz Jel Prosedürü

1. Elektroforez tamponu için 10X Tris-Borat-EDTA (TBE, Tris Borate EDTA) stok solüsyonu için hassas terazi kullanıldı. Sırasıyla Tris, Borik asit ve EDTA miktarları 108 g, 55 g, 7,5g olarak belirlenip tartıldı. Tartım sonrası 1 L distile su ile tamamlandı. 1X TBE için 900 mL distile su ile 100 mL 10X TBE stok solüsyonu karıştırıldı.
2. 0,5 g agaroz üzerine 50 ml 1X TBE tamponu eklendi.
3. Agarozun çözünmesi için mikrodalgada çözelti ısıtıldı ara ara karıştırıldı.
4. 2,5 µL RedSafe Nucleic acid staining çözeltiye eklendi.
5. Jel kasetine taraklar yerleştirildi. Soğutulup boyası eklenen jel kasete döküldü.
6. Agaroz jel kasetten çıkarılmadan önce 20 dk bekletildi.

Ek5. Örneklerin Jele Yüklenmesi

1. Agaroz jel, elektroforez cihazına yerleştirildi.
2. Jel üzerini tamamen kaplayacak şekilde 1X TBE tamponu eklendi.
3. Parafilm üzerine 0,5 µL bromofenol blue konuldu, 1,5 µLPCR ürünü boya ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi.
4. 90V'ta 20 dk süresince elektroforez işlemi gerçekleştirildi.
5. Yürütme sonrası UV altında DNA bantları gözlendi.

Ek6: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR

"Bir araştırmaya 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 lütfen çalışmadaki araştırmacılara sorarak bilgi edininiz."

1.''Semen örneklerinden DNA Metilasyonuna dayalı kişilerin yaş tahmininin yapılması'' adlı bu çalışma bir araştırma olup, akademik amaçla yapılmaktadır.

2.Araştırmanın amacı: Soruşturma aşamasında şüphelinin olmadığı durumlarda suçluya ait olduğu düşünülen herhangi bir biyolojik delilden (kan lekesi, semen, tükürük gibi) kişiye dair fikir verebilecek bilgiler elde edilmek istenir. Bu olay yeri materyallerinden DNA yoluyla bilgi edinilmesi soruşturmanın aydınlatılmasında önemli yer tutar. Eğer DNA'dan kişinin yaşına ait bir öngörüde bulunulabilinirse Polis, Jandarma ve Savcılık birimleri

şüpheliye daha kolay ulaşabilir hale gelir. 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 semen örneklerinde genin CpG bölgelerinde bulunan metillenmiş sitozinler analiz edilerek kişilerin gerçek yaşlarıyla karşılaştırılması ve kişilerin gerçek yaş aralıklarının tahmin edilmesidir.

3.Gönüllünün araştırmaya devam etmesi için öngörülen süre:

Gönüllüden semen örneği alındıktan sonra hiçbir sorumluluğu olmayacaktır. Gönüllünün biyolojik örneği çalışma süresince (2 yıl) saklanacak olup, çalışma sonuçlanınca imha edilecektir.

4.Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı: Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı, çalışmaya rıza gösteren yaklaşık 100 kişi olacaktır.

5.Araştırmada uygulanacak tedaviler:Araştırmada sadece gönüllülerden alınan semen örneği kullanılacak olup uygulanacak tedavi bulunmamaktadır.

6.Varsa farklı tedaviler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığının bulunduğu: Gönüllülere herhangi bir tedavi uygulanmayacak olup başka bir araştırma grubuna atanma olasılıkları bulunmamaktadır.

7.Araştırma sırasında uygulanacak olan invazif yöntemler dâhil olmak üzere izlenecek veya gönüllüye uygulanacak yöntemlerin tümü:

Araştırma sırasında gönüllülere invaziv yöntemler uygulanmayacaktır. Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilimdalı, Androloji Polikliniğine başvuran fertilite, erken boşalma, kronik prostatit tanılı hastalardan elde edilen semen örnekleri toplanacaktır. Araştırmada, çalışmaya rıza gösteren yaklaşık 150-200 kişiden sperm örneği alınarak İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Ar-ge Laboratuvarında belirlenen metilasyon bölgeleri incelenecektir.

8.Araştırmanın deneysel kısımları: Bu çalışmada, çalışmaya rıza gösteren gönüllülerden semen örnekleri alınarak kullanılacaktır. Araştırmanın laboratuvar aşamasında ise DNA analizi yöntemiyle, biyolojik örneklerden DNA profilleri elde edilecektir.

9.Gönüllünün maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar: Gönüllüden semen örnekleri alınacaktır. Bu süreçte karşılaşabilecekleri herhangi bir risk bulunmamaktadır.

10.Araştırmadan makul ölçüde beklenen yararlarla ilgili olarak gönüllü açısından hedeflenen herhangi bir klinik yarar olmadığında gönüllünün bu durum hakkında bilgilendirileceği: Gönüllü açısından çalışmada yapılan DNA analizi herhangi bir klinik yarar sağlamamaktadır.

11.Gönüllüye uygulanabilecek olan alternatif yöntemler veya tedavi şeması ve bunların olası yarar ve riskleri: Gönüllülere herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.

12.İlgili mevzuat gereğince gerekiyorsa gönüllüye verilecek tazminat (sigorta) ve / veya sağlanacak tedaviler: Gönüllülere yapılacak işlem *semen* örnekleri almak olup bu işlem sırasında katılımcılarda doğabilecek hukuki ve mali riskleri proje yürütücüsü olarak tamamen üstlendiğimi bildiririm.

13.Varsa, gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler hakkındaki bilgiler: Gönüllülere yemek, ulaşım veya başka bir nedenle ödeme yapılmayacaktır.

14.Gönüllülerin sorumlulukları: Gönüllülerin kendilerine ait semen örneği vermek dışında bir sorumlulukları yoktur.

15.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 gönüllü istediği zaman, herhangi bir yaptırıma maruz kalmaksızın araştırmadan çekilebilecektir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcı araştırma dışı bırakılabilir.

16.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 kayıtları gizli tutulacak olup kamuoyu ile paylaşılmayacaktır araştırma sonuçları yayımlansa dahi gönüllünün kimliği gizli kalacaktır.

17.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 kanuni temsilcisinin söz konusu erişime izin vermiş olacağı: İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, etik kurul, bakanlık ve diğer ilgili sağlık otoriteleri gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişebilirler ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.

18.Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya kanuni 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.

19.Gönüllünün; araştırma, kendi hakları veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler ile bu kişilere ait günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları: Gönüllünün araştırma ile ilgili veya kendi hakları hakkında herhangi bir bilgi temin edebilmesi için proje yürütücüsü Dr. Öğr. Üyesi Özlem Bülbül'e ait günün 24 saati ulaşabileceği telefon numarası .....'dır.

20.Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler: Gönüllünün biyolojik örneğinden herhangi bir nedenle DNA elde edilemediğinde katılım sona erdirilir.

21.Gönüllülerden alınacak biyolojik materyallerin ne olduğu, hangi amaçla alındığı ve analizlerinin nerede yapılacağına dair bilgiler: Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilimdalı, Androloji Polikliniğine başvuran fertilite, erken boşalma, kronik prostatit tanılı hastaların gönüllü olanlarından elde edilen semen örnekleri toplanacaktır. Gönüllünün vermiş olduğu semen örneğinden DNA profili elde etmek amacıyla DNA analizi yapılacak ve yaş tayini yapılacaktır. Çalışma, İ.Ü Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Ar-ge laboratuvarında yapılacaktır ve 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 araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının adı / soyadı / imzası / tarih:
26.Gerekiyorsa olur işlemine tanık olan kişinin adı / soyadı / imzası / tarih:
27.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.

''Semen örneklerinden DNA Metilasyonuna dayalı kişilerin yaş tahmininin yapılması''
adlı araştırma kapsamında vermiş olduğum semen örneğinin (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 ve Soyadı: Yetkin Araştırmacının Adı Soyadı: Dr. Öğr. Üyesi Özlem BÜLBÜL

Gönüllünün Doğum Tarihi: Yetkin Araştırmacının İmzası:

Gönüllünün İmzası:

Tarih:

Gönüllünün boyu ve kilosu:
Göz Rengi:
Saç Rengi: Kellik:
Ten Rengi:

Nereli: Annesi nereli: Babası nereli:

<u>Tablodan size en uygun seçeneği işaretleyiniz</u>

Günlük Sigara Kullanımı		**Sigara Kullanım Süresi**		**Günlük Alkol Kullanımı**		**Alkol Kullanım Süresi**		**Beslenme (Fastfood)**		**Egzersiz**	
Kullanmıyor		Kullanmıyor		Kullanmıyor		Kullanmıyor		Kullanmıyor		Kullanmıyor	
1-5 adet		1-2 yıl		Çok seyrek		1-2 yıl		Çok seyrek		Çok seyrek	
5-10 adet		3-4 yıl		Seyrek		3-4 yıl		Seyrek		Seyrek	
10-15 adet		5-6 yıl		Bazen		5-6 yıl		Bazen		Bazen	
15-20 adet		7-8 yıl		Sık sık		7-8 yıl		Sık sık		Sık sık	
20 ve fazlası		9 yıl ve fazlası		Çok sık		9 yıl ve fazlası		Çok sık		Çok sık	

Ek7: Etik Kurul Onayı



8. Özgeçmiş

Moleküler Biyolog SENA ER

E-mail :

2019-2021 İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa- *Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, Tezli Yüksek Lisans Programı*

2014-2018 Yıldız Teknik Üniversitesi *Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (3.61)*

2009-2013 Prof. Dr. Nabi Avcı Fen Lisesi

Proje ve Tezler
2209/A – Tübitak Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı - Farklı Sitokinin Çeşitleri (BAP, TDZ, Kinetin) ve Konsantrasyonlarının Lavander (*Lavandula angustigolia* Sevtapolis) Sürgün Rejenerasyonuna Etkileri

TEZ: İnsan İnterlökin – 4 (IL-4) cDNA'sının Pjıt61 Vektörüne Klonlanması

Stajlar
31.08.2015-11.09.2015-Kuzey Kamu Hastaneler Birliği Merkezi Laboratuvarı PCR bölümü (gönüllü staj)

23.01.2017- 03.02.2017 GEEN BİYOTEKNOLOJİ (Moleküler Biyoloji Laboratuvarı)

11.07.2017 – 07.08.2017 YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ (Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı)