



T.C.

ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ

BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

BİYOLOJİK YAŞ TAYİNİNDE KULLANILMAK ÜZERE FHL2 BÖLGESİNİN
METİLASYONUNUN YAŞ İLE BAĞLANTISININ BELİRLENMESİ

Ali Zikir DUMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı

Dr. Öğretim Üyesi Tuğba ÜNSAL SAPAN

İSTANBUL-2024

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

BİYOLOJİK YAŞ TAYİNİNDE KULLANILMAK ÜZERE FHL2 BÖLGESİNİN
METİLASYONUNUN YAŞ İLE BAĞLANTISININ BELİRLENMESİ

Ali Zikir DUMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı

Dr. Öğretim Üyesi Tuğba ÜNSAL SAPAN

İSTANBUL-2024

EKLER



www.uskudar.edu.tr

Altunizade Mahallesi Üniversite Sokak No:14 34662 Üsküdar/İSTANBUL
T: 0216 400 22 22 F: 0216 474 12 56 bilgi@uskudar.edu.tr

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

SAYI: 61351342/020-93

KONU:MAYIS 2024-05 No.lu Dosyanın Onay Yazısı

31/05/2024

Sayın; Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÜNSAL SAPAN
(Ali Zikir DUMAN)

Üsküdar Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulunun 28/05/2024 tarihinde yapılan 05 No.lu toplantısında “Biyolojik Yaş Tayininde Kullanılmak Üzere FHL2 Metilasyon Bölgesinin Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi” adlı araştırma projenizin etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Cumhuri TAŞ
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik
Kurulu Başkanı

YEMİN METNİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Biyolojik Yaş Tayininde Kullanılmak Üzere FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi” adlı çalışmanın, tarafımdan bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın yazıldığını, intihal yapmadığımı ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve bunu onurumla doğrularım.

../../2024

Ali Zikir DUMAN

TEŞEKKÜR

Başta, Adli Bilimler alanına ilgi duymamda ve bu alanı meslek olarak seçmemde büyük katkısı olan, eğitim hayatım boyunca ayak izlerini takip etmeye çalıştığım, Adli Bilimler alanında dünyada ve ülkemizde birçok başarının mimarı, Üsküdar Üniversitesi Rektör Yardımcısı, Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü Müdürü, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Adli Bilimler Bölüm Başkanı, Birleşmiş Milletler Uluslararası Uyuşturucu Kontrol Kurulu Üyesi, bölüm başkanımız sayın **Prof. Dr. Sevil ATASOY'a**,

Adli Genetik alanına merak duymamı ve bu alanı sevmemi sağlayan, lisans ve yüksek lisanstaki tüm eğitim sürecimde yürüdüğüm yolda değerli bilgileriyle bana ışık tutan çok kıymetli danışman hocam **Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Ünsal SAPAN'a**,

Tez sürecimde bana yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam ve aynı zamanda kıymetli bir dostum olan **Arş. Gör. Umut KENDÜZ'e**,

Birlikte yola çıktığım, maddi manevi desteğini hiç esirgemeyen ekip arkadaşım **Gülru ÖZAKMAN'a** ve sadece ekip arkadaşım değil tez yoldaşım da olan, laboratuvarında birlikte gülüp, birlikte üzüldüğüm sevgili arkadaşım **Beyzanur Kalender'e**

Uzakta da olsalar, yürüdüğüm yolu bir güneş gibi aydınlatan, her koşulda beni destekleyen ve bu günlere gelmemi sağlayan canım **Ailem'e**

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

EKLER	ii
YEMİN METNİ.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	ix
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Adli Bilimler	3
2.1.1. Adli Genetik ve DNA.....	4
2.1.2. Adli Genetiğin Tarihçesi	6
2.2. Olay Yerlerindeki Biyolojik Örnekler.....	8
2.2.1. Olay Yerlerinde Bulunan Tükürük Lekeleri.....	8
2.3. Epigenetik.....	10
2.3.1. Epigenetik Mekanizmalar.....	11
2.3.1.1. DNA Metilasyonu.....	13
2.3.1.2. Adli Bilimlerde DNA Metilasyonu	15
2.3.1.3. DNA Metilasyonu ile Yaş Tayini.....	16
2.3.1.4. FHL2 Geninin DNA Metilasyonu ile Bağlantısı.....	17
2.4. SNaPshot (SBE) Yöntemiyle SNP Analizi	19
2.4.1. Bisülfid Dönüşümü	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21

3.1. Örneklerin Toplanması.....	23
3.2. DNA İzolasyonu	24
3.2.1 Tükürük Örneklerinden DNA İzolasyon Protokolü.....	24
3.3. DNA Miktar Tayini.....	25
3.3.1. DNA Miktar Tayini Prosedürü	26
3.4. Bisülfıt Dönüşümü	26
3.4.1. Bisülfıt Dönüşümü Prosedürü	27
3.5. PCR	29
3.5.1. Primer Tasarımı	29
3.5.2. PCR Aşaması.....	30
3.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	31
3.6.1. PCR Temizleme Kiti Prosedürü	31
3.7. SNaPshot PCR	32
3.8. SNaPshot Ürünlerinin Saflaştırılması	33
3.8.1. İkinci PCR Aşaması İçin Temizleme Kiti Prosedürü	33
3.9. PCR Ürünlerinin Elektrophorezi	34
3.10. Verilerin Analizi	35
4.BULGULAR	36
4.1. Tükürük Lekelerinden DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini	36
4.2. Kapiller Elektrophorez ile Sonuçların Görüntülenmesi.....	38
4.3. İstatistiksel Değerlendirme	41
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ	51
7. KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Çift Sarmallı DNA'nın Gösterimi [3]	5
Şekil 2. Epigenetik Mekanizmalar [36].....	10
Şekil 3. DNA Metilasyon Mekanizması [3]	14
Şekil 4. Metilasyon Değeri Hesaplama Formülü [7]	35
Şekil 5. 12-17 Yaş Grubuna ait bir Elektroforegram Görüntüsü	38
Şekil 6. 18-29 Yaş Grubuna ait bir Elektroforegram Görüntüsü	38
Şekil 7. 30-49 Yaş Grubuna ait bir Elektroforegram Görüntüsü	38
Şekil 8. 50-70 Yaş Grubuna ait bir Elektroforegram Görüntüsü	38
Şekil 9. Yaş Gruplarına Göre Metilasyon Oranları Grafiği	40
Şekil 10. Kadın, Erkek ve Tüm Kişilerin Ortalama Metilasyon Oranları Grafiği	41
Şekil 11. FHL2 Genindeki CpG Adalarına Ait Lineer Regresyon Grafiği	45

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Cinsiyet Dağılımı Tablosu	23
Tablo 2. Bisülfid Dönüşümü İçin Termal Cyclers Cihazı Koşulları	27
Tablo 3. FHL2 Geninin Primerleri	29
Tablo 4. FHL2 Geninin Özellikleri	29
Tablo 5. Birinci PCR Aşamasında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları.....	30
Tablo 6. Birinci PCR Aşaması İçin Termal Cyclers Koşulları.....	31
Tablo 7. SNaPshot PCR Aşamasında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları	32
Tablo 8. SNaPshot PCR Aşaması İçin Termal Cyclers Koşulları	33
Tablo 9. Kapiller Elektroforez Aşamasında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları	34
Tablo 10. Kapiller Elektroforez Koşulları	34
Tablo 11. DNA Miktar Tayini Sonuçları.....	37
Tablo 12. DNA Metilasyon Sonuçları	39
Tablo 13. Yaş Gruplarına Göre Ortalama Metilasyon ve Standart Sapma Oranı	39
Tablo 14. Yaş Gruplarına Göre Kadınların ve Erkeklerin Ortalama Metilasyon Değerleri	40
Tablo 15. Spearman Korelasyon Testi Sonucu	42
Tablo 16. Kadınların Kendi Arasındaki Spearman Korelasyon Testi Sonucu.....	43
Tablo 17. Erkeklerin Kendi Arasındaki Spearman Korelasyon Testi Sonucu.....	43
Tablo 18. Yaş Gruplarının Aralarındaki Kruskal Wallis Korelasyon Testi Sonucu	44

KISALTMALAR VE SİMGELER

DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
FHL2	Four And A Half LIM Domains 2
STR	Short Tandem Repeat
PCR	Polymerase Chain Reaction
CpG	Sitozin-Fosfat-Guanin
-CH3	Metil
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
CODIS	Combined DNA Index System
FBI	Federal Bureau of Investigation
A,T,G,C	Adenin, Timin, Guanin, Sitozin
ATP	Adenozin Trifosfat
DNMT	DNA MetilTransferaz
SAM	S-Adenozil Metiyonin
mRNA	Messenger RNA
sjTREC	Signal Joint T-Cell Receptor Excision Circles
SBE	Single Base Extension
5mC	5' Metil-sitozin
pH	Power of Hydrogen
RFU	Relative Fluorescence Units

UV	Ultraviyole
ml	Mililitre
cm	Santimetre
μL	Mikrolitre
PBS	Phosphate Buffered Saline
μg	Mikrogram
μM	Mikromolar
°C	Santigrat
rpm	Revolutions per Minute
nm-ng	Nanometre- Nanogram
RNaz	Ribonükleaz
NCBI	National Center for Biotechnology Information
F-R	Forward-Reverse
bp(bç)	Baz çifti
dNTP	Deoksribonükleotid Trifosfat
ddNTP	Dideoksribonükleotid Trifosfat
p	Probability
sn	Saniye
kV	Kilovolt

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

(DUMAN, Ali Zikir, Yüksek Lisans, İstanbul, 2024)

Biyolojik Yaş Tayininde Kullanılmak Üzere FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

ÖZET

DNA metilasyonu, gen ifadesini düzenleyen ve yaşa bağlı olarak bazı CpG bölgelerinde değişiklikler gösteren kalıtsal bir mekanizmadır. Bu nedenle, yaşa bağlı CpG metilasyon profilleri, adli bilimlerde kimliği belirsiz kişilerin yaş tahmini için güvenilir biyomarkerlar olarak kullanılabilmektedir [46].

Bu tez çalışmasında Adli Bilimlerde biyolojik yaş tahmini amacıyla FHL2 gen bölgesindeki DNA metilasyon seviyelerinin biyolojik yaş ile olan ilişkisi incelenmiştir.

Bu analiz için 4 ayrı yaş grubu için (12-17, 18-29, 30-49, 50-70) Marmara bölgesi popülasyonundan gönüllü 50 kişiden tükürük lekeli örnekleri alınmıştır. Bisülfid yöntemi uygulanan örnekler SNaPshot yöntemi kullanılarak PCR yapılmıştır. PCR aşaması tamamlanan örnekler Kapiller elektroforez 3500 cihazı ile yürütülmüş ve elde edilen sonuçların analizi yapılmıştır.

Tez çalışmasında tükürük örneklerinden elde edilen verilerle belirlenen yaş aralığındaki kişilerden alınan tükürük örnekleri üzerinde yapılan analizler sonucunda, FHL2 gen bölgesindeki CpG bölgelerinin metilasyon seviyelerinin biyolojik yaş ile anlamlı bir korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Yaş ilerledikçe bu bölgelerdeki DNA metilasyon seviyelerinde belirgin değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu bulgular, FHL2 gen bölgesindeki metilasyon profillerinin adli soruşturmalarda kullanılabilecek yaş tahmini modeli için potansiyel bir biyomarkır olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Adli Bilimler, Adli Genetik, DNA Metilasyonu, Biyolojik Yaş Tayini, FHL2

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

(DUMAN, Ali Zikir, Master, İstanbul, 2024)

Determination Of The Age Correlation Of The FHL2 Methylation Site For Use In Biological Age Estimation

ABSTRACT

DNA methylation, a heritable mechanism regulating gene expression, exhibits changes in certain CpG regions with age. Therefore, age-related CpG methylation profiles can serve as reliable biomarkers for estimating the age of unidentified individuals in forensic sciences [46].

In this thesis, the relationship between DNA methylation levels in the FHL2 gene region and biological age was examined for the purpose of biological age estimation in forensic sciences.

Saliva stain samples were collected from 50 volunteers from the Marmara region population, divided into 4 different age groups (12-17, 18-29, 30-49, 50-70). The bisulfite method was applied to the samples, and PCR was performed using the SNaPshot method. After the PCR stage was completed, the samples were analyzed using a Capillary electrophoresis 3500 device, and the obtained results were examined.

As a result of the analysis conducted on saliva samples collected from individuals in the specified age range, it was found that methylation levels in the CpG regions of the FHL2 gene showed a significant correlation with biological age. Significant changes in DNA methylation levels in these regions were observed as age increased. These findings suggest that the methylation profiles in the FHL2 gene region could be used as potential biomarkers for an age estimation model in forensic investigations.

Keywords: Forensic Sciences, Forensic Genetics, DNA Methylation, Biological Age Determination, FHL2

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adli Bilimler, olay yerlerinden elde edilen deliller ile suç, fail, mağdur üçgeni arasındaki bağlantıyı oluşturan multidisipliner bir alandır. Suçun aydınlatılması, güven ortamının sağlanması ve adaletin tecellisi için delillerin hızlı ve doğru incelenmesi, yorumlanması ve raporlanması gereklidir. Teknoloji ve insanlığın gelişimi ile suç tipleri de değişmiş, buna paralel olarak Adli Bilimler alanı da gelişmiştir [1, 2].

Yirminci yüzyılın sonlarına doğru moleküler genetik alanındaki gelişmeler, Adli Bilimler ve Adli Genetik alanına büyük etkiler yapmıştır. Özellikle DNA'nın açıklanması ve bilimsel çalışmalara kazandırılması, polimorfik özelliklerin doğrudan DNA düzeyinde incelenmesini sağlamış ve Adli Genetik alanında DNA'nın kullanılmasının önünü açmıştır. Bu sayede DNA bulguları, dünya genelinde adli soruşturmalarda vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir. Olay yerlerinden elde edilen kan, tükürük, seminal sıvı, vajinal sıvı, idrar, ter, menstrüel kan ve "Touch DNA" olarak adlandırılan epitel vücut hücreleri gibi biyolojik bulgular sayesinde kişilerin kimliklendirilmesi mümkün olmuştur. DNA izolasyonu ve amplifikasyonu alanındaki gelişmeler, çok küçük miktardaki biyolojik örneklerden tam veya parçalı profil elde edilmesine olanak sağlamıştır [3, 4, 5].

Son yıllarda Adli Genetiğin en dikkat çeken gelişmelerinden biri, 'Epigenetik' incelemelerdir. Epigenetik, gen ifadesini değiştiren ancak DNA diziliminde değişiklik yapmayan kalıtsal değişiklikleri inceler. Çevresel faktörler, yaşam tarzı ve beslenme gibi dış etkenler bu değişiklikleri etkileyebilir. Epigenetik mekanizmalar arasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve RNA moleküllerinin etkileri bulunur. DNA metilasyonu temelli analizler, biyolojik doku ve sıvıların kaynağını belirleme, yaş ve cinsiyet tahmini yapma ve monozigotik ikizleri ayırt etme gibi durumlarda kullanılır [6, 7].

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

Son yıllarda, Adli Genetik ve epigenetik alanında yapılan çalışmalar arasında DNA metilasyonu temelli yaş tahmini öne çıkmaktadır. Şüphelilerin yaşlarının belirlenmesi, soruşturmayı yürüten kolluk kuvvetlerine şüpheli havuzunu daraltma ve failin alacağı ceza hakkında bilgi sağlayabilir. Olay yerlerinde sıklıkla karşılaşılan biyolojik örnekler kan, tükürük, seminal sıvı, vajinal sekresyon ve idrardır. Özellikle cinsel saldırı vakalarında, tükürük lekeleri mağdurun vücudunda veya kıyafetlerinde ve saldırının gerçekleştiğinden şüphelenilen eşyalarda bulunabilir. Bu tür durumlarda, saldırganın yaşının tahmini, şüpheli havuzunda hedefi bulmada yardımcı olacaktır [7, 8].

DNA metilasyon analizlerinin adli vakalarda STR analizlerini destekleyici olarak kullanılması önerilmektedir. Bu analizler, STR bölgeleriyle profil çıkarmaya uygun olmayan veya şüpheli havuzunu daraltmak amacıyla, şüphelinin fenotipik özellikleri hakkında bilgi sağlar. Yaşla bağlantılı CpG bölgelerindeki DNA metilasyon işaretleri, kimliği belirsiz kişilerin yaşlarını tahmin etmek için en güvenilir biyomarkırlardır. CpG adaları, %60-90 oranında fosfat bağlarının metil (CH₃-) ile değiştiği bölgeler olarak tanımlanır. Araştırmalar, CpG dinükleotid yapısının yaşla birlikte düzenli olarak değiştiğini ve metilasyon seviyelerinin yaşla sistematik bir artış veya azalma gösterdiğini kanıtlamıştır [2, 7].

Yapılan bu çalışmadaki amaç; geçmişte yapılan çalışmaların incelenmesi sonucunda DNA metilasyonu ile bağlantısı olduğu düşünülen FHL2 gen bölgesinin, olay yerlerinde sıkça karşılaşılabilen tükürük lekesi örneklerinde metilasyon seviyeleri araştırılarak FHL2 gen bölgesinin DNA metilasyonu ile biyolojik yaş tayini arasında anlamlı bir bağlantı olup olmadığı araştırılacaktır. Hedef gruptan alınan tükürük lekesi örneklerinin hipometilasyon ve hipermetilasyon seviyeleri incelenerek FHL2 gen bölgesinin metilasyon sonuçlarının yaş ile bağlantısı olup olmadığının tespiti yapılmaya çalışılacaktır [9, 10].

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adli Bilimler

Adli Bilimler; suç unsurunu oluşturan sınırların aşılmasının ardından, suçu oluşturan unsurun tespiti, olay yeri, olayın faili, olayın mağduru, fail ve mağdur arasındaki bağlantıyı biyolojik, kimyasal, fiziki, hukuki ya da dijital gibi birçok farklı bulgu çeşitleriyle inceleyip karşılaştırmalarını yaparak adaletin tecelli etmesi için çabalamaktadır. Suçun tespiti gerçek suçlunun bulunması, haksız mahkûmiyetlerin olmaması, halkın suç konusunda bilinçlendirilmesi, suç oranlarının azaltılması adli bilimleri yakından ilgilendiren konuların başında gelmektedir. Suç her zaman diliminde ve her toplumda var olmuştur. Suçun bu sürekliliği ile Adli Bilimler'in varlığı da paralel şekilde ilerlemiştir. 19. yüzyılın başlarında gerçekleşen kriminalistik alanındaki gelişmeler kimlik tespitlerinin ve olay yeri incelemenin altyapısını oluşturmuştur. 20. yüzyılda Edmond Locard isimli bilim insanının 'Her temas bir iz bırakır.' tezi, Adli Bilimler alanının yeni bir milat kazanmasına sebep olmuştur. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte suç unsurları da değişmiş olup bu değişim doğrudan Adli Bilimler alanının da değişmesini ve gelişmesini sağlamıştır [11, 12, 13, 14].

Adli Genetik, Adli Fizik, Adli Kimya, Adli Toksikoloji, Adli Tıp, Adli Bilişim gibi birçok alt dalı kapsayan Adli Bilimler; bir suçun tespiti, çözümü ve haksız mahkumiyetlerin olmasını engellemek için birçok bilim dalını kullanan multidisipliner bir bilim olma özelliğine sahiptir. Multidisipliner olan bu bilimin farklı çalışma alanları bulunmaktadır. Bu çalışma alanlarında inceledikleri bulgular da farklılık göstermektedir. İz bulguları, fiziksel bulgular, toksikolojik bulgular, kimyasal bulgular, biyolojik bulgular, dijital bulgular, kişisel beyanlar gibi birçok bulgu suç düğümünün çözülmesi ve adaletin tecellisi için kullanılmaktadır [11, 13].

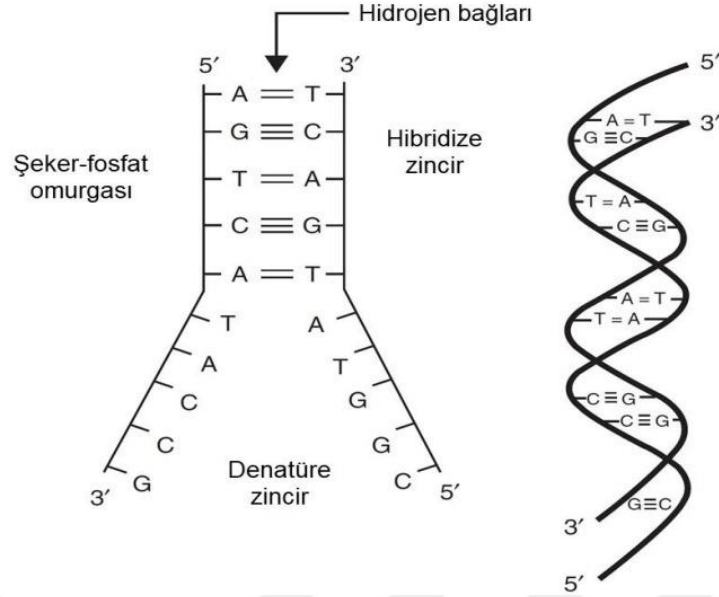
FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

2.1.1. Adli Genetik ve DNA

Adli Genetik, olay yerlerinde bulunan biyolojik materyallerin incelenmesiyle kimlik tespiti ve suçluların belirlenmesi sürecinde büyük rol oynamaktadır. DNA profillemesi, STR analizleri, SNP analizleri Adli Genetik'te en yaygın kullanılan yöntemlerdendir. STR analizleri, insan genomunda tekrarlayan DNA dizilerinin tekrar sayılarını karşılaştırarak bireyler arasındaki farklılıkları ortaya koymaktadır. Bu yöntem ile suç mahallindeki kan, tükürük, sperm, idrar ve diğer biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın, şüphelilerin DNA örnekleriyle karşılaştırılmasına olanak tanımaktadır. STR analizleri, uluslararası bir geçerliliğe sahip olduğu için tüm dünyadaki kriminal laboratuvarlarda standart hale getirilmiştir. Bununla birlikte FBI, CODIS (Combined DNA Index System) DNA veri tabanı oluşturarak 13 STR (CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 ve D21S11) bölgesinin tüm uluslarca kimliklendirilmede kullanılması adına öncü olmuştur. Adli Genetik, sadece suçluların belirlenmesinde değil, aynı zamanda kimliği belirsiz cesetlerin tanımlanmasında ve akrabalık ilişkilerinin özellikle de babalık davalarının doğrulanmasında da önemli bir rol oynamaktadır [15, 16].

DNA, biyolojik materyallerin analiz edilmesinde ve olay yerlerinden elde edilen bulguların incelenmesindeki görevi sayesinde, Adli Bilimler alanında büyük bir öneme sahiptir. DNA'nın benzersiz oluşu ve bireyler arasındaki genetik farklılıkları net bir şekilde ortaya koyabilmesi, DNA'yı suçun ve suçluların tespit edilmesinde, mağdurların kimliklerinin belirlenmesinde ve akrabalık ilişkilerinin doğrulanmasında kullanılan en önemli yöntemlerden biri yapmıştır [15, 16].

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi



Şekil 1. Çift Sarmallı DNA'nın Gösterimi [3]

DNA analizlerinin kullanıldığı bir diğer uygulama da haksız mahkûmiyet uygulamalarıdır. DNA sisteminin henüz var olmadığı zamanlarda haksız yere mahkûm edilen kişilerin davaları DNA analizlerinin varlığı ile tekrar masaya yatırılmıştır. Böylece yıllardır adalet arayan mağdurların ve yakınlarının özgürlük haklarının geri verilmesine yardımcı olmuştur. Ayrıca DNA analizleri; deprem, sel, uçak kazası gibi kitlesel felaketlerde ve savaş bölgelerinde kimliği belirsiz cesetlerin kimliklerinin tespitinde de kullanılmaktadır. Bu tip kitlesel felaketlerde DNA analizleri mağdurların kimliklerinin belirlenmesi ve mağdurların naaşlarının ailelerine teslim edilmesi sürecinde de önemli bir rol oynamaktadır [17, 18, 19].

Gelişen teknolojiyle birlikte, epigenetik işaretlerin, özellikle DNA metilasyonunun kullanımı Adli Bilimlerde giderek daha fazla önem kazanmaktadır. DNA metilasyonu, belirli yaşla ilişkili CpG bölgelerindeki değişiklikleri inceleyerek kimliği belirsiz kişilerin veya suç mahallindeki biyolojik örneklerin yaşını tahmin etme potansiyeline sahiptir. Bu

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

durum, özellikle kimlik tespitinin zor olduğu vakalarda adli soruşturmaların daha kesin ve kapsamlı yapılmasına olanak tanımaktadır. Ayrıca, DNA metilasyon profillemesi, monozigotik ikizler arasında bile farklılıklar gösterebildiğinden, geleneksel STR analizlerinin yetersiz kaldığı durumlarda önemli bir araç olarak değerlendirilebilir. Bu yöntemler, suçların aydınlatılmasında ve doğru kişilerin tespit edilmesinde Adli Bilimcilere önemli avantajlar sunmaktadır [7, 20, 21].

2.1.2. Adli Genetiğin Tarihçesi

Adli Genetik çalışmaları, bilim ve teknolojinin ilerlemesiyle günümüze kadar önemli bir gelişim ve değişim göstermiştir. Genetik çalışmaların tarihçesi, genetik biliminin ve Adli Tıp'ın birbirine paralel olarak yaşanan önemli dönüm noktalarına dayanmaktadır [14].

Adli Genetik çalışmalarının başlangıcı, 1985 yılında İngiliz bir genetikçi olan Alec Jeffreys'in DNA parmak izi yöntemini geliştirmesiyle başlamıştır. Jeffreys, belirli DNA dizilerinin her bireyde benzersiz olduğunu keşfetmiş ve bu bilgiyi, kimlik tespitinde kullanabilecek bir teknik haline getirmiştir. Jeffreys'in bu keşfi, ilk olarak 1986 yılındaki bir cinayet davasında kullanılmış ve suçlunun tespit edilmesinde kritik bir rol oynamıştır. Yaşanan bu keşif sonrası Adli Genetiğin temeli atılmıştır [14, 22].

Jeffreys'in bu keşfinden sonra, DNA analizleri Adli Tıp ve kriminalistik alanlarında hızla kabul görmüş ve yaygınlaşmıştır. 90'lı yılların başlarında ise, ABD Federal Soruşturma Bürosu (FBI), Combined DNA Index System (CODIS) adı verilen ulusal bir DNA veri tabanını geliştirmiştir. FBI'ın geliştirdiği bu sistem, suçluların ve kayıp kişilerin DNA profillerinin saklandığı ve karşılaştırılabildiği bir veri tabanıdır ve ABD'deki birçok adli soruşturmada önemli bir araç olarak kullanılmaktadır [23, 24].

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

2000'li yıllarda, DNA analiz teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte, Adli Tıp ve kriminalistik alanlarında STR ve mitokondriyal DNA analizleri gibi daha hassas ve spesifik yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Geliştirilen bu yöntemler, özellikle de eski ve bozulmaya yüz tutmuş biyolojik örneklerden DNA elde edilmesinde büyük avantajlar sağlamaktadır [20, 24].

Son yıllarda gerçekleşen, epigenetik işaretlerin gelişimi, özellikle DNA metilasyonunun kullanımı, Adli Genetik çalışmalarında yeni bir boyut kazandırmıştır. DNA metilasyonu, bireylerin yaşını ve hatta bazı çevresel faktörlere maruz kalma durumlarını belirlemek için kullanılabilir. Bu durum, adli soruşturmalarda kimlik tespiti ve olay yerlerindeki biyolojik bulguların analizinde yeni yöntemlerin kullanılmasına olanak sunmaktadır [20].

Günümüzde teknolojinin yüksek seviyelerde kullanımıyla birlikte kullanımı yaygınlaşan gelişmiş genetik analiz teknikleri ve yapay zekâ (AI) uygulamaları, Adli Genetik alanında daha hızlı ve daha doğru sonuçların elde edilmesine olanak sağladı. Bu teknolojiler, suç mahallindeki biyolojik örneklerin analizinde yeni olanaklar sundu ve adli soruşturmalarda daha kapsamlı bilgiler elde edilmesine yardımcı olmuştur [25].

Adli Bilimler alanındaki bu gelişmeler, Adli Genetik çalışmalarının tarihçesinde önemli dönüm noktaları olarak kabul edilmektedir ve bu alandaki araştırmaların sürekli olarak ilerlemesi, Adli Bilimler ve adalet sistemlerinde daha doğru ve güvenilir sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır [20].

2.2. Olay Yerlerindeki Biyolojik Örnekler

Olay yerlerinde en sık karşılaşılan bulgular biyolojik bulgulardır. Bunun temel sebebi biyolojik örneklerin bulaş seviyesinin fazla olmasıdır. Suçlular ya da mağdurlar, olay yerindeki herhangi bir temasından sonra bile ter ya da epitel hücrelerini dokunduğu zemine bırakarak olay yerine biyolojik sıvıların yani genetik materyallerinin geçmesini sağlamış olur. İçilen bir bardak ağzında, tutulan kapı kollarında, oturulan koltukta, hatta ilerleyen teknolojiyle birlikte kişilerin girdiği odadaki havada bile kişilerin genetik materyaline ulaşılabilir [4, 26].

Adli Bilimlerde suç mahallerinden toplanan biyolojik örnekler, suçun aydınlatılmasında kritik bir rol oynamaktadır. Bu örnekler, genellikle kan, tükürük, semen, idrar, dışkı, ter, saç, deri hücreleri ve diğer vücut sıvıları veya dokuları içermektedir. Bu gibi biyolojik örnekler genetik materyal taşıdığı için, olay yerinde bırakılan izler aracılığıyla suçlunun kimliğini belirlemek, suçun nasıl işlendiğini anlamak ve olayın kronolojik olarak zaman çizelgesini oluşturmak için kullanılmaktadır [27].

Olay yerlerinde bulunan genetik materyaller, sadece genetik çalışmalar için değil diğer alanlardaki çalışmalar için de ışık veren bulgulardır. Olay yerinde bulunan kan ile sadece genetik testler yapılmaz. Kan örnekleri, toksikoloji testleri kullanılarak mağdurun veya failin uyuşturucu-uyarıcı madde ya da alkol kullanıp kullanmadığını tespit etmek için de kullanılabilir. Benzer durum tükürük, saç, idrar gibi biyolojik örneklerde de geçerli olup failin ya da mağdurun yaşamış biçimi hakkında da bilgi verebilir [28, 29].

2.2.1 Olay Yerlerinde Bulunan Tükürük Lekeleri

Adli Bilimlerde olay yerinden toplanan tükürük lekeleri örnekleri, suç soruşturmalarında en önemli delil kaynaklarından birisidir. Tükürük lekeleri, DNA analizi için zengin bir biyolojik örnek olup, failin kimliğini belirlemede kritik bir rol oynamaktadır. Tükürük

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

lekeleri örnekleri, sigara izmaritleri, bardaklar, şişeler, zarflar, damga pulları, ısırık izleri ve diğer temas edilen nesneler üzerinde bulunabilmektedir. Tükürük örneklerinin bu özelliği ile failin olay yerinde bulunup bulunmadığının tespit edilmesi ve suçun işleniş biçimi ile ilgili yorumların yapılması mümkün olmaktadır [24].

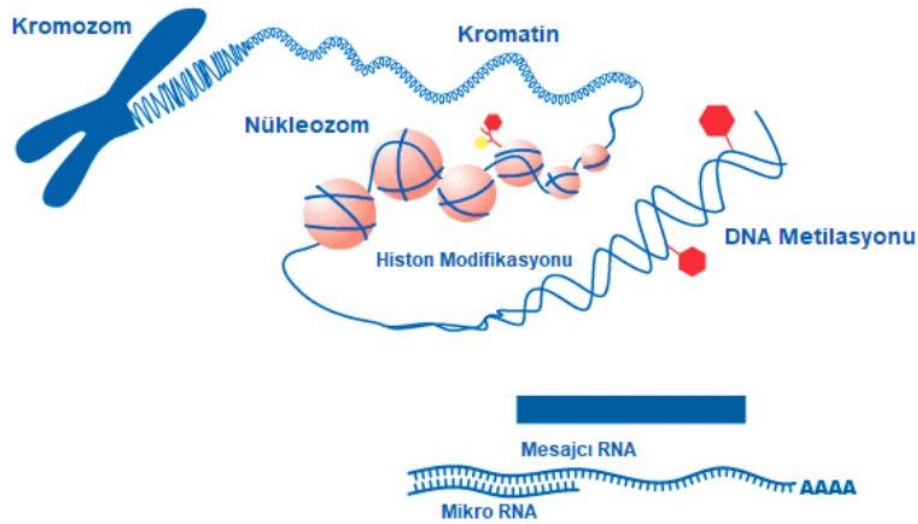
Diğer vücut sıvıları, özellikle semen ve vajinal sıvı, cinsel saldırı vakalarında önemli delil kaynaklarıdır. Tükürük lekeleri de semen ve vajinal sıvı ile cinsel saldırı vakalarında görülebilen bulgulardandır. Tükürük lekeleri, cinsel saldırı davalarında ısırık izlerinin bulunduğu bölgeler veya iç çamaşırlar gibi yüzeyler üzerinde bulunabilir. Bu tür örnekler, DNA profillemesi için kullanılabilir ve suçlunun kimliğini belirlemede doğrudan kanıt sağlamaktadır. Ayrıca, bu sıvılar çeşitli cinsel yolla bulaşan hastalıkların tespitinde de kullanılabilir, bu da olayın aydınlatılmasında ek bilgiler sunabilmektedir [24, 30].

Tükürük lekeleri örnekleri, biyolojik sıvılar arasında yüksek miktarda DNA içermesi sebebiyle, özellikle 'Touch DNA' olarak adlandırılan örneklerde, yüzeylerdeki izler üzerinden değerli bir delil kaynağıdır. Tükürük örnekleri, sadece failin kimliğini belirlemekle kalmaz, aynı zamanda olayın nasıl gerçekleştiğine dair ipuçları da sunmaktadır. Örnek olarak, ısırık izleri üzerinde bulunan tükürük, failin fiziksel özellikleri ve diş yapısı hakkında bilgi verir ve olayın şiddetini belirlemede yardımcı olabilmektedir [24, 31, 32].

Gelişen DNA teknolojileri ve analiz yöntemleri, tükürük lekelerinin değerlendirilmesinde büyük ilerlemeler sağlamıştır. Özellikle, yeni nesil DNA sekanslama ve epigenetik işaretlerin analizi gibi yöntemler, daha hassas ve detaylı sonuçlar elde edilmesine olanak tanımaktadır. DNA metilasyonu gibi epigenetik işaretler, tükürük örneklerinden elde edilen DNA'nın yaş ve cinsiyet gibi özelliklerini belirlemede kullanılabilmektedir [20].

2.3. Epigenetik

Epigenetik, gen ifadesini DNA diziliminde değişiklik yapmadan düzenleyen kalıtsal ve biyokimyasal değişiklikleri incelemektedir. Gerçekleşen bu kalıtsal değişiklikler, hücrelerin ve organizmaların genetik bilgilere nasıl tepki verdiğini ve çevresel faktörlerle nasıl etkileşime girdiğini belirler. Genetik değişikliklerin dışında kalan bölgeyi kapsamaktadır. DNA üzerinde gerçekleşen bu değişim süreci, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin yeniden şekillenmesi gibi mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Epigenetik değişimler, hücre farklılaşması, gelişim ve çevresel faktörlere yanıt verme gibi biyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Epigenetik mekanizmalar arasında özellikle DNA metilasyonu, CpG bölgelerinde meydana gelen metil grubu eklenmesiyle gen ifadesini düzenlemektedir ve bu durum, genellikle gen ifadesinin baskılanması ile ilişkilidir [33, 34, 35].



Şekil 2. Epigenetik Mekanizmalar [36]

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

Genetik, DNA dizilimindeki nükleotid sıralarını ve bu sıraların protein kodlaması üzerindeki etkilerini incelemektedir. Genetik bilgiler, kalıtsal olarak ebeveynlerden yavrulara aktarılmaktadır ve DNA'nın çift sarmal yapısında depolanmaktadır. Epigenetik ise, DNA dizilimindeki değişikliklere odaklanmadan, DNA'nın yapısında ve gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal değişiklikleri incelemektedir. Bu değişiklikler, genlerin ne zaman ve nasıl ifade edileceğini belirler ve genellikle çevresel faktörler tarafından tetiklenir. Epigenetik değişiklikler, gen ifadesini düzenleyerek genlerin ne zaman ve ne kadar ifade edileceğini belirler. Bu değişiklikler, gelişim süreçlerinde, hücre farklılaşmasında ve hastalıkların ortaya çıkışında önemli rol oynar. Epigenetik değişiklikler de genetik değişimler gibi kalıtsal olabilmektedir, ancak bu değişiklikler genellikle çevresel etkilere yanıt olarak ortaya çıkmaktadır. Bir bireyin yaşam tarzı ve çevresel maruziyeti, epigenetik işaretlerin düzenlenmesinde rol oynayabilmektedir [34, 35, 37].

Epigenetik değişiklikler özellikle de DNA metilasyonu, Adli Bilimler alanında kişilerin kimlik tespitinde kullanılabilmektedir. Bu profillemeye yöntemi, monozigotik ikizler arasında bile farklılık gösterebilmektedir ve rutin olarak gerçekleştirilen STR analizlerinin eksik kaldığı durumlarda önemli bir tamamlayıcı analiz yöntemi olarak kullanılabilmektedir. Epigenetik işaretler ile; kimlik tespiti, cinsiyet, yaş gibi fenotipik özelliklerin belirlenmesi, biyolojik örneklerin analizi, kanser ve hastalıkların etkisinin incelenmesi, Adli Tıp araştırmalarının yapılması mümkün olmaktadır [20, 35].

2.3.1. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar, gen ifadesinin yapısını düzenleyen ve DNA ipliklerini değiştirmeden kalıtsal biyokimyasal değişimlere yol açan mekanizmalardır. Epigenetik mekanizmalar, hücrelerin değişmesinde, gelişmesinde ve çevresel etkilere adaptasyona

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

uğramasında önemli rol oynamaktadır. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin yeniden şekillenmesi, RNA tabanlı değişimler epigenetik mekanizmalara örnektir. Doğrudan gen ifadesine etkisi olan bu değişimler kalıtsal olarak aktarılabilmektedir [34, 38, 39].

DNA metilasyonu, genel olarak CpG adalarında gerçekleşmektedir. CpG dinükleotidlerinin yoğun şekilde bulunduğu DNA üzerindeki bölgelere "CpG adaları" denmektedir. CpG adaları, genellikle genlerin promotör bölgelerinde yani genin çalışmasını etkileyen bölgelerde yer almaktadır ve yüksek derecede guanin ve sitozin nükleotitlerini içermektedir. CpG adaları, gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. CpG adalarındaki sitozin nükleotitlerinin 5' uçlarındaki fosfat bağlarının kopartılıp yerine metil (CH₃) molekülünün bağlanmasıyla gerçekleşmektedir [34].

Histon modifikasyonları; genellikle histon proteinlerinin metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon gibi kimyasal modifikasyon değişimlerinin, kromatin yapısının değişmesine ve dolayısıyla gen ifadesinin düzenlenmesini sağlamaktadır. Histon proteinlerindeki modifikasyonlar, genellikle kromatin yapısını zayıflatarak transkripsiyonun artmasına yardımcı olmaktadır [38].

Kromatin yeniden şekillenmesi, ATP harcanarak gerçekleştirilen kromatin yeniden şekillendirme kompleksleri aracılığıyla DNA'nın yapısının değişmesidir. Bu kompleksler, DNA'nın etrafında sarılı olan histon proteinlerinden ayrılmasına veya daha sıkı bir şekilde bağlanmasına sebep olarak gen ifadesini düzenlemektedir. Yaşanan bu gevşeme ve sıkılaşma transkripsiyonel aktiviteyi etkilemektedir. Bu gibi epigenetik mekanizmalar, genetik bilgiyi direkt olarak değiştirmeksizin hücrelerin farklı görevlere sahip olmasını sağlamakta ve ayrıca gelişim, hastalık süreçleri ve çevresel etkiler gibi birçok biyolojik değişimde ön plana çıkmaktadır [39].

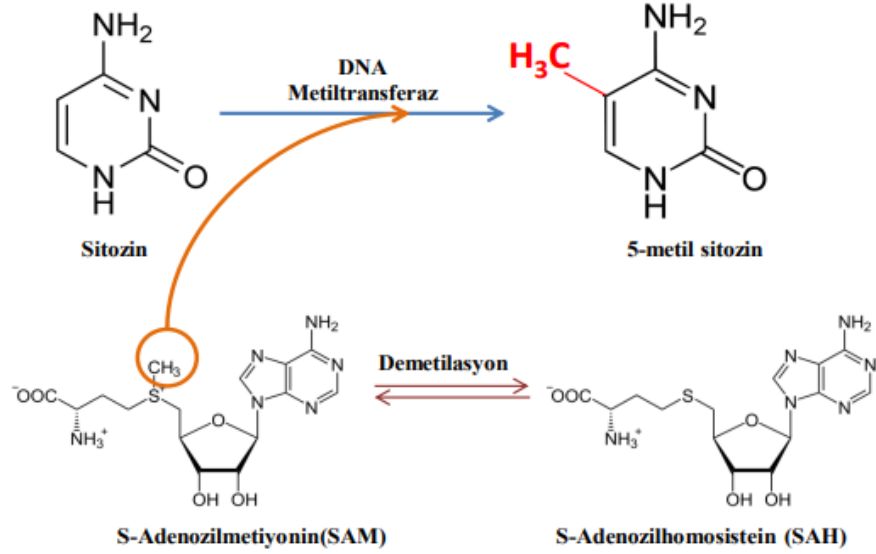
FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

2.3.1.1. DNA Metilasyonu

Epigenetik mekanizmalar arasındaki DNA metilasyonu, sitozin nükleotidlerine metil gruplarının eklenmesi ile gerçekleşmektedir. Sitozinlerin 5' ucuna bağlı olan fosfat bağları koparak yerine metil grubu bir molekül gelip sitozin ile arasında kovalent bir bağ oluşturmaktadır. İlk olarak 1948'de Rollin Hotchkiss isimli biyokimyacı tarafından keşfedilmiştir. 80'li yıllara kadar gen aktivasyonu ve hücre farklılaşmasıyla ilgili olduğu anlaşılamamıştır. Ancak güncel çalışmalar ve araştırmalar ışığında DNA metilasyonunun gen ifadesinde önemli bir rolü olduğu kabul edilmektedir. DNA metilasyonu, genomik imprinting, X kromozom inaktivasyonu, DNA yenilenmesi ve hücre bölünmesi gibi aşamalarda etkili olmaktadır. DNA metilasyonu guanin ve sitozinden oluşmuş CpG dinükleotidleri üzerinde gerçekleşmektedir. İnsan genomunda yaklaşık olarak 28 milyon CpG adası bulunmaktadır ve bu CpG adalarının çoğu metillenmiştir. Metillenmiş bölgelerin dışında, genlerin düzenleyici bölgelerinde yer almakta olan CpG adaları metillenmemiştir. CpG adaları genlerin yaklaşık olarak yarısında DNA'nın promotör bölgelerinde bulunmaktadır. Promotör bölgesinde bulunan bu metillenmiş CpG adaları gen ekspresyonunun düzenlenmesini sağlamaktadır [3, 7, 40].

DNA metilasyonu, CpG bölgelerine DNA metiltransferaz enzimi ile sitozin nükleotidinin pirimidin halkasının 5.karbonuna bir metil (-CH₃) molekülünün bağlanması ile gerçekleşmektedir. Gerçekleşen bu bağlanma mekanizmasında esas rol oynayan moleküller, DNA metil transferaz (DNMT) enzimi ve S-Adenozil Metiyonin (SAM) enzimidir. DNMT enzimi, CpG bölgelerine metil grubu bağlanmasını sağlayan enzimdir. SAM ise metil vericisi olarak görev yapan moleküldür [3].

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi



Şekil 3. DNA Metilasyon Mekanizması [3]

DNA metilasyonunu etkileyen çevresel faktörler hücre değişimleri, yaşlanma, genetik çeşitlilik, beslenme düzeni ve diyet, sigara, alkol ve uyuşturucu kullanımı, güneş ışığı, farklı radyasyon çeşitleri, patojen enfeksiyonu, spor, stres ve hayat standartları vb. gibi birçok durumdan oluşmaktadır. DNA metilasyon profilleri, CpG adalarındaki metil gruplarının analizi ile yorumlanmaktadır. DNA metilasyonu gen transkripsiyonu üzerinde baskılayıcı bir rol oynarken (hipermetilasyon) DNA'nın demetilasyonu (hipometilasyon) ise transkripsiyonu aktif hale getirmektedir. DNA metilasyonu, bireylerin yaşam tarzı, fiziksel görünüm ve sağlık üzerindeki etkilerinin yanı sıra sosyoekonomik durumları, beslenme alışkanlıkları, fiziksel aktiviteleri, sigara, alkol ve uyuşturucu gibi bağımlılıkları da etkileyebileceği bilinmektedir. Bu sebeple kişilerin DNA metilasyon profillerinden kişiler ve kişilerin hayatı ile ilgili bilgiler edinilebilmektedir. Adli Bilimler açısından bakıldığında da olay yerinde bulunan biyolojik delillerin analizleri ile suçları çözmek ve şüpheli havuzunun daraltılması için faydalı bir belirteç haline gelmiştir [36, 41].

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

2.3.1.2. Adli Bilimlerde DNA Metilasyonu

Epigenetik değişiklikler, Adli Bilimlere de önemli analiz yöntemleri kazandırmıştır. DNA metilasyon profillemesi, kimliği tespit edilemeyen kişilerin veya olay yerlerindeki biyolojik örneklerin kaynağı olan bireylerin yaşını, cinsiyetini ve fenotipik özelliklerini belirlemek için kullanılmaktadır. DNA metilasyonu yöntemi, özellikle kimlik tespitinin zor olduğu vakalarda adli soruşturmaların çözüme kavuşmasına katkı sağlamaktadır. DNA metilasyonu, suç mahallindeki biyolojik bulguların analizinde, özellikle tükürük, kan ve diğer vücut sıvılarının incelenmesinde kullanılabilmektedir [20, 29].

Adli Bilimler alanında DNA metilasyonunun kullanımı, özellikle kişilerin yaş tahmininin, kimliği belirlenemeyen kişilerin kimlik tespitinin ve çevresel etkilerin kişiler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılabilmektedir. DNA metilasyonu ile DNA üzerinde gerçekleşen değişimler, yaşa bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu değişiklikler, bireylerin biyolojik yaşının tahmini için kullanılabilmektedir. Bireylerin biyolojik yaşlarının tahmini, özellikle kimliği tespit edilemeyen bedenlerin kimliklendirilmesinde ve kayıp kişilerin bulunmasında büyük rol oynamaktadır. DNA metilasyonu bunun dışında Adli Tıp'ta travmaların ve hastalıkların tespitinde de kullanılabilmektedir. Mağdurların ölüm sebebinin tespitinde ve adli olayların çözülmesinde önemli bir araç olarak kullanılabilmektedir [3, 20, 29].

Monozigotik ikizlerin DNA yapıları aynı hücreden meydana geldiği için birbirlerine eşittir. Bu durum suça karışmış bir ikizlerin kardeşinden ayrılmasını güçleştirmektedir. Aynı zamanda rutinde kullanılan STR analizleri yeterli olmamaktadır. Bu sebeple yüksek maliyetli olan fazla miktarda ve kaliteli örnekler gerektiren tüm genom analizi yapılabilmektedir. Ancak tüm genom analizinin masraflı olması sebebiyle bu analiz yöntemi sık tercih edilmemektedir. SNP analizleri ise rutin olarak yapılmasa da

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

monozygotik ikizleri ayırmada kullanılabilmektedir. Özellikle DNA metilasyonu, Adli Bilimler alanında monozygotik ikizlerin ayırımında kullanılabilmektedir [3, 42].

2.3.1.3. DNA Metilasyonu ile Yaş Tayini

Yaş, bir bireyin dışarıdan fiziksel olarak görülebilen fenotipik bir özelliğidir. Olay yerlerinden elde edilen kan, tükürük, semen, idrar gibi biyolojik materyallerden bireylerin kronolojik yaşının doğru bir şekilde tahmin edilebilmesi, potansiyel şüphelilerin aralığını daraltmaya yardımcı olabilir ve bu nedenle bu durum cezai soruşturma için çok önemli hale gelmektedir [43].

Son yıllarda araştırmacılar mitokondriyal DNA oksidatif hasarı ve delesyonu, ileri glikasyon son ürünleri, telomer uzunluğu, aspartik asit rasemizasyonu ve haberci RNA (mRNA) gibi yaşla ilişkili olduğu düşünülen çeşitli biyobelirteçler bildirmişlerdir. Bununla birlikte, bu biyobelirteçler hala düşük tahmin doğruluğu, tespit yöntemlerinin azlığı veya tekrarlanabilir olmaması ve çevresel faktörlere karşı savunmasızlık gibi eksikliklere sahiptir [44, 45, 46].

Olay yerlerinde bulunan biyolojik örneklerden yaş tahmini, adli DNA fenotiplemede önemli bir anahtardır. DNA metilasyonu, adli yaş tahmini için gelecek yıllarda en umut verici biyobelirteç olarak kabul edilmektedir. Bugüne kadar, metilasyondaki değişikliklere dayalı olarak yapılan birçok çalışmada çok sayıda CpG bölgesinin yaşla ilişkili olduğu belirtilmiştir [44, 45, 46].

Günümüzde, insan genomundaki belirli CpG bölgelerindeki DNA metilasyon seviyesinin yaşla önemli ölçüde ilişkili olduğuna ve "epigenetik saat" olarak bilindiğine dair çalışmalar artmaktadır. Yakın zamanda Adli Bilimler alanında yapılan çalışmalarda, yaş tahmini amacıyla DNA metilasyon belirteçlerinin mRNA, sjTREC ve telomer uzunluğu

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

gibi diğer moleküler biyobelirteç türlerinden daha üstün olduğunu ispatlamıştır. Şimdiye kadar, çok sayıda yaşla ilişkili CpG bölgesi tespit edilmiş ve farklı metilasyon analizi yöntemlerine dayalı olarak kan, tükürük, ağız içi swab, semen veya diğer dokular için çeşitli yaş tahmin modelleri geliştirilmiştir [43, 44, 45, 46].

Epigenetik değişikliklerin yaşla ilişkisi, Adli Bilimler alanında önemli bir uygulama alanı olarak kullanılmaktadır. DNA metilasyon profillemesi, kimliği belirsiz kişilerin veya suç mahallindeki biyolojik örneklerin kaynağı olan şüpheli kişilerin yaşını tahmin etmek için kullanılabilir. Bu yöntem, özellikle kimlik tespitinin zor olduğu durumlarda adli soruşturmanın daha kesin ve kapsamlı olmasına katkı sağlamaktadır [46, 47].

İlerleyen yaşla birlikte bireylerin farklı gen bölgelerindeki DNA'larındaki metilasyon miktarları farklılık göstermektedir. Bu değişim olay yerinde bulunan bir biyolojik bulgunun kaynağı hakkında bilgiler verebilmektedir. Yaş ile bağlantılı gen bölgelerindeki DNA metilasyon miktarına bakılarak kişilerin yaklaşık kronolojik yaşları hakkında bir tahmin yapılabilir. Yapılan bu kronolojik yaş tahmini ile şüpheli havuzunda daraltma yapılarak olayın mutlak failinin tespitinde kolaylık sağlayabilmektedir [46, 47, 48].

2.3.1.4. FHL2 Geninin DNA Metilasyonu ile Bağlantısı

FHL2 (Four And A Half LIM Domains 2) protein kodlayan bir gendir. Bu gen, Familial Isolated Dilated Cardiomyopathy (Ailevi İzole Dilate Kardiyomiyopati), Rhabdomyosarcoma (Rabdomyosarkom) ve gen ile aynı isimdeki (FHL2) familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (Ailevi Hemofagositik Lenfositosis Tip 2) gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Bu hastalıklar bağışıklık sistemi işlevlerinde ve hücre ölümleriyle ilişkilendirilebilen hastalıklardır. Ayrıca bu gen, perforin (PRF1) proteininin üretiminden sorumludur ve mutasyonları bağışıklık hücrelerinin düzgün çalışmasını

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

engelleyerek aşırı inflamasyona ve ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Bu protein, hücre dışı zarların oluşumunda bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca, bu genin normal kas hücrelerinin rabdomyosarkom adı verilen kanser hücrelerine dönüşümü sırasında etkinliğinin azaldığı ve kodlanan proteinin presenilin-2 ile hücre içi sinyal yolları arasında bir bağlantı sağlayabileceği öne sürülmüştür [10, 49, 50].

Yaşlanma, canlı organizmaları etkileyen zamana bağlı doğal bir süreçtir. Bu süreç, işlevde azalma ve hastalık gelişimine ve ölüme yatkınlıkta artış ile temsil edilmektedir. Çok hücreli organizmalarda yaşlanmanın dokuz temel özelliği tanımlanmıştır; bunlar arasında epigenetik değişiklikler, hücresel homeostazın bozulması ve artan hücresel yaşlanma yer almaktadır. FHL2 geninin ilgili olduğu vücut işlevlerinin doğrudan ya da dolaylı olarak yaş ile ilişkilendirilebilmesi mümkündür. Bu durum FHL2 genini, yaş ile ilgili yapılan DNA metilasyon çalışmalarında kullanılabilir kılmıştır [49].

Yapılan güncel çalışmalarda, FHL2 geninin eklem dokularında yaşa bağlı promotör hipermetilasyonunu doğrulamak amaçlanmıştır. FHL2, yara iyileşmesi, inflamasyon, hücre çoğalması, hücre ölümü ve ekstrasellüler matris (ECM) oluşumunda rol oynayan bir ko-aktivatör proteindir. Promotör DNA metilasyonundaki ve gen ekspresyonundaki yaşa bağlı değişiklikler, yaşlanmayla birlikte kondrositlerde gözlemlenen fenotip değişikliklerini açıklayabilir ve bu değişiklikler, gen susturma ve aşırı ekspresyon çalışmaları ile araştırılmaktadır. Bu çalışmalar sonucu FHL2 ekspresyonunun promotör bölgesindeki DNA metilasyonunun artması nedeniyle değişikliğe uğradığı ve bu dokuların fonksiyonlarının yaşlanmaya bağlı gözlemlenen bazı fenotipleri açıklayabileceği hipotez edilmektedir [49, 50].

2.4. SNaPshot (SBE) Yöntemiyle SNP Analizi

Kısa ardışık tekrarlar (STR) kimlik tespiti için altın standart olarak kabul edilmektedir, ancak adli DNA fenotipleme için bir bilgi vermemektedirler. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) ise hem kimlik tespiti hem de fenotipleme için kullanılabilir bir yöntemdir [51].

Son on yıldır, SNaPshot® tekniği adli DNA analizlerinde kimlik ve fenotipleme ile ilişkili SNP'leri analiz etmek için kullanılmaktadır. SNaPshot, kapiler elektroforez ile tek baz uzatma (SBE) analizine dayanan bir tespit sistemidir. Bu multipleksleme tekniği, ek bir ekipman gerektirmeden mevcut adli laboratuvarlara kolayca entegre edilebilir. Bu da operasyonel süreçleri daha verimli hale getirmektedir [51, 52].

SNaPshot analizi; tek nükleotit uzaması (Single Base Extension, SBE) yöntemine dayanan SNaPshot ile CpG noktalarına özel olarak tasarlanmış primerlere karşılık gelen nükleotide bağlanması sonucu dizileme işlemi gerçekleştirilmesi yöntemidir. SNaPshot, tek bir analizde 30-40 SNP'yi multipleksleme imkânı sağlamaktadır. SNaPshot'ın tek bir analizde multipleksleme limiti 30-40 SNP olduğundan, birden fazla analiz yapılması gerekmektedir. SNaPshot® analizi, tek baz uzatma (SBE) prensibi üzerine çalışan en yaygın ticari mini dizileme yöntemidir. DNA metilasyonu Analizi de SBE prensibine dayanan bir yöntemdir. Bu sebeple DNA metilasyon analizi çalışmalarında SNaPshot yöntemi sık karşılaşılan bir yöntemdir [51, 52].

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

2.4.1 Bisülfıt Dönüşümü

Bisülfıt dönüşümü, 1990'lı yıllarda DNA metilasyonunu tespit ve analiz etmek için keşfedilmiş bir yöntemdir. DNA metilasyon analizinde "altın standart" olarak kabul edilen bu teknik, tek nükleotid hassasiyetinde DNA metilasyon seviyelerini belirlemeye olanak tanımaktadır. Sodyum bisülfıt modifikasyonu, metillenmemiş sitozinleri (C) urasile dönüştürerek PCR basamağında timin nükleotiti (T) olarak çoğaltıp elektroforezde yürütülmesini sağlamaktadır, metillenmiş sitozinler (5mC) ise sitozin olarak kalmaktadır. Bu sayede, metillenmemiş ve metillenmiş sitozin seviyeleri, C/T polimorfizmi oranı ile belirlenebilmektedir [53].

Sodyum bisülfıt işlemi doğru koşullarda uygulandığında, metillenmemiş sitozinlerin urasillere dönüşme oranı %99'a yakındır. Ancak, bazı promotör bölgelerinde bu yüksek dönüşüm oranı her zaman sağlanamayabilir ve bu durum DNA'nın kalitesine de bağlıdır [3, 54].

Bisülfıt işlemi, denatüre edilmiş tek iplikli DNA'nın düşük pH ve yüksek sıcaklık koşullarında sodyum bisülfıt (HSO_3^-) ile kimyasal olarak reaksiyona girmesiyle gerçekleşir. Bu işlem, üç aşamada gerçekleşir: İlk olarak, sitozin sülfonasyonla modifiye olur. Ardından, geri dönüşümsüz hidrolitik deaminasyon gerçekleşir ve urasil sülfonat oluşur. Son aşamada ise, alkali koşullarda desülfonasyon meydana gelir ve urasil oluşur [3, 54].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada yaşa bağlı olarak gen ifadesinin değişiminden yola çıkılarak olay yerlerinde bulunan tükürük lekelerinden kişinin tahmini yaş tayininin yapılması hedeflenmiştir. Yaşla ilgili yüksek korelasyon değerleri gösteren FHL2 (chr2:105399282) gen bölgesinin Türkiye Marmara bölgesi popülasyonu içinde DNA metilasyonu ve yaş ile bağlantısı incelenmek istenmiştir. Çalışmanın yapılması amacıyla gönüllülük esasına dayalı olarak kişilerin tükürük lekesi örnekleri alınmıştır. Farklı yaş gruplarına ait toplam 50 tükürük lekesi örneklerine DNA izolasyonu ve miktar tayini yapılmıştır. Miktarı ölçülen DNA'lar ile Bisülfid dönüşümü basamağına geçilmiştir. Bisülfid basamağından sonra 'Methprimer' programı ile tasarlanan FHL2 genine ait olan primerler hazırlanmıştır ve ilk PCR basamağı yapılmıştır. İlk PCR basamağından sonra birinci pürifikasyon (saflaştırma) aşaması gerçekleştirilmiştir. SNaPshot reaksiyonu, ikinci PCR basamağı olarak tek baz düşürme amacıyla gerçekleştirilmiştir. SNaPshot analizinden sonra ikinci temizleme aşaması tamamlanarak örnekler elektroforeze hazır hale getirilmiştir. SNaPshot ürünlerinin analizi Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer cihazında yürütülmüştür. Ardından analiz sonuçları görüntülenerek piklerin RFU değerleri not edilerek metilasyon değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan metilasyon oranları ile kişilerin biyolojik yaşları arasındaki korelasyon değerleri hesaplanmıştır.

Kullanılan Cihazlar

Stuart Scientific SA8 Vortex

Termal çalkalamalı inkübatör (BİOSAN Thermo–Shaker TS-100C)

Eppendorf otomatik pipet seti (10ul, 100ul ,1000ul)

Termal döngü cihazı (Applied Biosystems™ Veriti 96 Well Thermal Cycler)

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

Grant-bio UV kabin

Soğutmalı santrifüj Nuve Nf 800R

Invitrogen Qubit 4 florometre

Bilgisayar kontrollü 3500 Genetik Analizör (HITACHI Applied Biosystems)

Buzdolabı

Kullanılan Kitler ve Kimyasallar

İzolasyon: PureLink™ Genomic DNA Kit Invitrogen™

Miktar ölçümü: Invitrogen Qubit dsDNA HS Quantification Assay Kit

Bisülfid dönüşümü: EpiTect Bisulfite Kit – Qiagen

PCR: Applied Biosystems™ Platinum™ Multiplex PCR Master Mix

Pürifikasyon: QIAquick PCR Purification Kit – Qiagen

SNaPshot PCR: Applied Biosystems™ SNaPshot™ Multiplex Kit

Etil Alkol (%96)

POP-4 Polimer (Performance Optimized Polymer 4) – Thermo Fisher Scientific

HiDi Formamid

GeneScan -600 LIZ Size Standart v2.0

Anode -Cathode Buffer (3500 Series)

DS-36 (dye set J6) Matrix Std Kit

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

3.1. Örneklerin Toplanması

Bu yüksek lisans tez çalışması için gönüllülerden alınan tükürük lekeli örnekleri kullanılmıştır. ‘Biyolojik Yaş Tayininde Kullanılmak Üzere FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi’ tez konusuyla Üsküdar Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu’na başvuru yapılmış ve etik açıdan uygunluk belgesi alınmıştır. Etik açıdan uygunluk onayından sonra, ‘Bilgilendirilmiş gönüllü onam formu’ ve 18 yaşından küçük gönüllüler için ise ‘veli onam formu’ imzalatılmış 50 gönüllü ve sağlıklı bireylerden tükürük lekeli örnekleri alınmıştır.

Gönüllü kişiler; alkol, sigara, uyuşturucu-uyarıcı madde ve düzenli olarak ilaç kullanmayan, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan ve Türkiye-Marmara Bölge’inde yaşayan popülasyondan oluşturulmuştur. 50 kişinin yaş ve cinsiyet dağılımı aşağıdaki tabloda (Tablo 1) gösterilmiştir. Çalışma için 4 farklı yaş aralığı seçilmiştir.

Tablo 1. Cinsiyet Dağılımı Tablosu

	Kadın	Erkek
12-17 Yaş (X)	6	6
18-29 Yaş (V)	7	7
30-49 Yaş (Y)	6	6
50-70 Yaş (Z)	6	6
Toplam	50	

Gönüllülerden, UV ışık altında 3 saat bekletilmiş steril peçetelere tükürük lekeleri bırakmaları istenmiştir. Bırakılan tükürük lekeleri steril ortamda kurutulduktan sonra steril zarflara yerleştirilip tüm zarflara kodlar verilmiştir. Alınan numuneler ile laboratuvar aşamasına geçilmiştir.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

3.2. DNA İzolasyonu

Örneklerin DNA izolasyonu için Invitrogen™ firmasının PureLink Genomic DNA Kit'i kullanılmıştır. Bu izolasyon kiti; Silika bazlı katı faz ekstraksiyonu yöntemini kullanarak biyolojik materyaldeki DNA'nın spin kolona bağlanarak DNA dışındaki maddelerden ayrıştırılmasını amaçlamaktadır. Spin kolon yönteminde, yıkama işlemi hücresel kalıntılar ve kontaminantların ortamdan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Spin kolona bağlı DNA molekülleri, elüsyon aşamasında silika bazlı filtreden geri kazanılmaktadır.

3.2.1. Tükürük Örneklerinden DNA İzolasyon Protokolü

- Tükürük numuneleri emdirilen peçetelerden steril makaslar ile 1 cm uzunluğunda parçalar kesilerek, kesilen bu parçalar steril 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı.
- Numuneye 400 µl PBS ve 20 µl Proteinaz K eklendi.
- Pipetleme ya da darbeli vorteks yardımı ile örnekler iyice karıştırıldı.
- Lizata eşit hacimde (420 µl) PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve kısaca vorteksleyerek karıştırıldı.
- Örnekler önceden 55 °C ye ayarlanmış olan termal çalkalamalı inkübatöre konularak en az 1 saat örnekler inkübe edildi.
- 1 saat inkübasyonun ardından tüp kapaklarındaki lizati toplamak için örnekler kısaca santrifüjlendi.
- Tüpe 200 µl %96-100 etanol eklendi. Homojen bir çözelti elde etmek için örnekler 5 saniye vortekslendi.
- Ardından bütün sıvı kit ile birlikte verilen 2ml'lik PureLink® Spin Kolonuna aktarıldı.
- Kolon oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 8.000rpm'de santrifüjlendi.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

- Toplama tüpü atılarak yeni bir toplama tüpü takıldı.
- Kolona etanol ile hazırlanmış 500 µL Wash Buffer 1 eklendi.
- Kolon oda sıcaklığında 1 dakika 10.000rpm'de santrifüjlendi.
- Toplama tüpü atılır ve yerine yeni bir toplama tüpü takıldı.
- Etanol ile hazırlanmış 500 µL Wash Buffer 2 kolona eklendi.
- Kolon oda sıcaklığında maksimum hızda santrifüjlendi ve kullanılan toplama tüpü atıldı.
- Spin kolon steril bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- Elüsyon basamağı için kolona 50 µL PureLink® Genomic Elution Buffer eklendi.
- Örnekler oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Ardından kolon oda sıcaklığında 1 dakika boyunca maksimum hızda santrifüjlendi. 1,5 mL'lik tüp saflaştırılmış genomik DNA içermektedir.
- Spin kolon çıkarılıp atıldı. Saflaştırılmış DNA içeren tüpler parafilmle sarılarak -20 °C'de saklandı.

3.3. DNA Miktar Tayini

DNA miktar tayini yapılırken florometrik ölçümler kullanılmıştır. Bu ölçümler 260 nm dalga boyunda yapılan analizlerle DNA miktarını yüksek hassasiyet ve doğrulukla belirleyebilmektedir. İzolasyon sonrası DNA miktarını ölçmek için Invitrogen Qubit 4 Florometre cihazı ve Invitrogen'in Quantit™ dsDNA HS (High Sensitive) Assay kiti kullanılmıştır.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

3.3.1. DNA Miktar Tayini Prosedürü

- Qubit® 4.0 cihazının kalibrasyonunun yapılabilmesi için 2 tüpe standart örnekleri hazırlandı.
- Her bir örnek için Quant-it dsDNA HS Buffer çözeltisinden 199 μL alınarak yine her bir örnek için 1 μL Quant-it Reagent eklendi. Hazırlanan stok çözelti kısaca vorteksenerek karıştırıldı.
- Hazırlanan stok çözeltisinden standartlar için 190 μL , S1(Standart 1) ve S2(Standart 2) çözeltilerinden 10 μL alınarak 0,5 ml'lik ependorf tüplerine konuldu.
- Örneklerin analizi için ise stok çözeltisinden 190 μL alınarak 0,5ml'lik ependorf tüplerinde üzerine 10 μL DNA örneği eklendi.
- Elde edilen karışım 2-3 saniye vortekslendi.
- İlk adımda Standart 1 ve Standart 2'nin ölçümü yapılarak Qubit 4.0 cihazının kalibrasyonu yapıldı.
- Örnekler Qubit 4.0 cihazına konularak ölçüm yapıldı ve ölçüm sonuçları not edildi [55].

3.4.Bisülfite Dönüşümü

Bisülfite yöntemi, metillenmemiş sitozinlerin urasil nükleotidine dönüşmesini ve PCR aşamasında timin nükleotidi olarak çoğalmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu basamakta Qiagen marka EpiTect Bisulfite Kiti kullanılmıştır.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

3.4.1. Bisülfite Dönüşümü Prosedürü

- Dondurulmuş DNA çözeltileri oda sıcaklığında çözülmeye bırakıldı.
- Liyofilize halde bulunan Bisülfite Mix tüpünün içerisine 800 µL RNaz içermeyen su konularak karışım çözdürüldü. Bisülfite Karışımı tamamen çözülene kadar vortekslendi.
- Bisülfite reaksiyonunun gerçekleşmesi için 200 µL PCR tüpünün içerisine 85 µL Bisülfite Mix, 35 µL DNA Protect Buffer ve 20 µL saflaştırılmış DNA numuneleri konuldu. Toplam hacim 140 µL olarak hazırlandı.
- PCR tüplerini kapatıldı ve bisülfite reaksiyonları oda sıcaklığında iyice karıştırıldı. Tüplerdeki çözeltinin rengi maviden yeşile dönmelidir.
- Hazırlanan çözeltiler Applied Biosystems™ Veriti 96 Well Thermal Cycler cihazına konuldu. Thermal cycler cihazı Tablo 2'ye göre programlanmıştır [56].

Tablo 2. Bisülfite Dönüşümü İçin Thermal Cycler Cihazı Koşulları

Adım	Süre	Sıcaklık (°C)
Denatürasyon	5 dakika	95°C
İnkübasyon	25 dakika	60°C
Denatürasyon	5 dakika	95°C
İnkübasyon	85 dakika	60°C
Denatürasyon	5 dakika	95°C
İnkübasyon	175 dakika	60°C
Saklama	∞	20°C

- Bisülfite dönüşümü tamamlandığında, bisülfite reaksiyonlarını içeren PCR tüplerini kısa bir süre santrifüjlendi ve ardından bisülfite reaksiyonlarının tamamı temiz 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

- Her tüpe ayrı ayrı 10 µg/mL taşıyıcı RNA içeren 560 µL Buffer BL eklendi. Çözeltiler vortekslenerek karıştırıldı ve ardından kısa bir süre santrifüjlendi.
- Tüplerdeki örneklerin tamamı EpiTect spin kolonlara alındı.
- Spin kolonları 1 dakika boyunca maksimum hızda santrifüjlendi. Atık su döküldü ve spin kolonları toplama tüplerine geri konuldu.
- Her bir spin kolona 500 µL Buffer BW eklendi ve örnekler 1 dakika boyunca maksimum hızda santrifüjlendi. Spin kolonları yeni toplama tüplerine konuldu.
- Her bir spin kolonuna 500 µL Tampon BD eklendi ve örnekler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- Spin kolonları 1 dakika boyunca maksimum hızda santrifüjlendi. Atık su döküldü ve spin kolonları toplama tüplerine geri yerleştirildi.
- Her bir spin kolona 500 µL Buffer BW eklendi ve 1 dakika boyunca maksimum hızda santrifüjlendi. Atık suyu döküldü ve spin kolonları toplama tüplerine geri yerleştirildi.
- Aynı adım bir kez daha yapıldı.
- Spin kolonları yeni 2 mL'lik toplama tüplerine yerleştirildi ve filtreyi tamamen kurutup kalan sıvıyı uzaklaştırmak için spin kolonları 1 dakika boyunca maksimum hızda santrifüjlendi.
- Spin kolonları steril bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Her bir membranın ortasına 20 µL Buffer EB eklendi. Safılaştırılmış DNA 12.000rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenerek elüe edildi.
- Bisülfid dönüşümü tamamlanan DNA'lar -20°C'de saklandı [56].

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

3.5. PCR

3.5.1. Primer Tasarımı

Primer tasarımı yapmak için NCBI (National Center for Biotechnology Information) üzerinden FHL2 genine özgü nükleotit dizisi seçilmiştir. Seçilen bu insana özgü nükleotit dizisi kopyalanarak DNA metilasyon çalışmalarında kullanılan bir bioinformatik aracı ve web sitesi olan ‘MethPrimer 2.0’ sitesine yüklenmiştir. Bu web sitesi bu nükleotit dizisine uygun birden çok primer dizisi tasarlamıştır. Sadece bu bölgeye özgü olup başka bölgeleri amplifiye etmeyen primerler seçilmiştir. F (Forward), R (Reverse) ve SBE (SNaPshot) primerleri seçildikten sonra bu primerler tasarlatılarak sipariş edilmiştir.

Tablo 3. FHL2 Geninin Primerleri

Baz Dizisi (F)	Baz Dizisi (R)	Baz Dizisi (SBE)
GGTATAAAATATATTTTTTTTGAGGAA	AACAACCTTCTCTATATTAAATTCAAATATC	GGGTTTGGGAGTATAGTAGTTAT

Tablo 4. FHL2 Geninin Özellikleri

CpG ID	Gen	Pozisyon	Amplikon Boyu(bp)
cg06639320	FHL2	chr2:105,399,282	192

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

3.5.2. PCR Aşaması

Sipariş edilen primerler liyofilize şekilde geldiği için uygun koşullarda primer konsantrasyonuna uygun olarak primerler sulandırılarak stok çözelti hazırlanmıştır. 100 μM stok çözelti hazırlanmış ardından literatür taramasında FHL2 geni için en uygun konsantrasyon olduğu görülen 0,5 μM 'lık ara stok hazırlanmıştır ancak 0,5 μM değerindeki primerlerle hazırlanan örnekler bilgisayar kontrollü 3500 genetik analizör cihazında yürütüldüğünde sonuç vermemiştir. Bu nedenle optimizasyon sonrası PCR primer konsantrasyonları 100 μM stok çözelti 1 μM 'lık ara stok çözelti olarak kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

Bisülfid dönüşümü yapılmış örneklerin çoğaltılması için gereken maddelerin hepsini içerisinde bulunduran Applied Biosystems firmasının geliştirdiği Platinum™ Multiplex PCR Master Mix kiti kullanılmıştır. Ardından PCR aşamasının gerçekleşmesi için örnekler Veriti 96 Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) cihazına konulmuştur. Kitin kullanıldığı miktarlar (Tablo 5) ve Thermal Cycler cihazının döngü koşulları (Tablo 6) aşağıdaki tablolarda verilmiştir. Applied Biosystems Platinum™ Multiplex PCR Master Mix kitinin prosedürü uygulanmıştır [57].

Tablo 5. Birinci PCR Aşamasında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

Bileşenler	Miktar (μl)
Platinum™ Multiplex PCR Master Mix	25 μl
Primer Mix F	5 μl
Primer Mix R	5 μl
GC Enhancer	10 μl
PCR Ürünü	5 μl
Toplam Hacim	50 μl

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

Tablo 6. Birinci PCR Aşaması İçin Termal Cyclers Koşulları

Adım	Döngü	Sıcaklık	Süre
Activation	1	95°C	2 dakika
Denaturation	30	95°C	30 saniye
Annealing		60°C	90 saniye
Extension		72°C	60 saniye
Final Extension	1	60°C	30 dakika
Final Hold	1	4°C	∞

3.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR sonrasında DNA'nın saf bir şekilde elde edilebilmesi için bağlanmamış primerlerin ve dNTP'lerin ortamdan uzaklaştırılması gereklidir. Bu saflaştırma işleminin gerçekleştirilebilmesi için Qiagen firmasının geliştirdiği QIAquick PCR Purification Kit'i kullanılmıştır.

3.6.1. PCR Temizleme Kiti Prosedürü

- 50 µL PCR numunesine 250 µL Buffer PB eklenir ve ardından vorteks ile karıştırıldı.
- Kit ile verilen QIAquick spin kolonlarına örnekler aktarıldı.
- Ardından DNA'yı membrana bağlamak için numune 2 dakika boyunca 10.000rpm'de santrifüjlendi.
- Toplama tüpündeki atık sıvı döküldü. QIAquick kolonu aynı tüpe geri yerleştirildi. Plastik atığı azaltmak için toplama tüpleri yeniden kullanıldı.
- Yıkama aşaması için QIAquick kolonuna 750 µL Buffer PE eklendi ve 2 dakika boyunca 10.000rpm'de santrifüjlendi.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

- Kolonu tamamen kurutmak için atık su atıldıktan sonra aynı ayarlarda santrifüj tekrarlandı.
- Toplama tüpü atıldıktan sonra QIAquick kolonu temiz bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- DNA'yı elüe etmek için QIAquick membranının merkezine 50 µl Buffer EB eklendi ve kolon 1 dakika boyunca 10.000rpm'de santrifüjlendi. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünün içerisinde PCR ürünü bulunmaktadır [58].

3.7. SNaPshot PCR

SNaPshot, tek nükleotid bazı uzamasına (SBE, Single Nucleotide Extension) dayanan bir mini sekanslama yöntemidir. Bu yöntemde, spesifik nükleotidlere karşılık gelen primerlerin bağlanması ve bu noktaya denk gelen ddNTP'nin yani serbest nükleotidlerin eklenmesiyle sekanslama tamamlanır. SNaPshot reaksiyonun yapılması için SNaPshot™ Multiplex Kiti kullanılmıştır. Reaksiyon için SBE primeri 1 µM olarak hazırlanmış ve PCR tüpü içeriği Tablo 7'de gösterildiği şekilde oluşturulmuştur. Termal cyler cihazında (Applied Biosystems™ Veriti 96 Well Thermal Cycler) uygulanan protokol ise Tablo 8'de belirtilmiştir. Toplam SNaPshot PCR süresi yaklaşık olarak 1 saat 10 dakikadır [59].

Tablo 7. SNaPshot PCR Aşamasında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

Bileşenler	Miktar (µl)
SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix	5 µl
PCR Ürünü	3 µl
SNaPshot Primeri	1 µl
Nükleaz İçermeyen Su	1 µl
Toplam	10 µl

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

Tablo 8. SNaPshot PCR Aşaması İçin Termal Cyclus Koşulları

25 Döngü İçin Sıcaklık (°C)	25 Döngü İçin Süre (sn.)
96°C	10 saniye
50°C	5 saniye
60°C	30 saniye
4°C	∞

3.8. SNaPshot Ürünlerinin Saflaştırılması

SNaPshot PCR ürünlerinin saflaştırılması için ek bir temizleme aşaması uygulanmıştır. Bu aşamada, SNaPshot reaksiyonu sonrasında tüpte kalan bağlanmamış floresan işaretli ddNTP'lerin elektroforez analizini zorlaştırmasını engellemek amacıyla, Qiagen'in QIAquick PCR Purification Kit'i kullanılarak serbest ddNTP'ler pasif hale getirilmiştir. Ürünler saflaştırıldıktan sonra elektroforeze hazır hale gelmiştir. Elektroforeze hazır olan örnekler elektroforez öncesi 3 dakika boyunca 95°C sıcaklıkta inkübe edilmiştir.

3.8.1. İkinci PCR Aşaması için Temizleme Kiti Prosedürü

- 10 µL PCR numunesine 50 µL Buffer PB eklendi ve ardından vorteks ile karıştırıldı.
- Kit ile verilen QIAquick spin kolonlarına örnekler aktarıldı.
- Ardından DNA'yı membrana bağlamak için numune 2 dakika boyunca 10.000rpm'de santrifüjlendi.
- Toplama tüpündeki atık sıvı döküldü. QIAquick kolonu aynı tüpe geri yerleştirildi. Plastik atığı azaltmak için toplama tüpleri yeniden kullanıldı.
- Yıkama aşaması için QIAquick kolonuna 750 µL Buffer PE eklendi ve 2 dakika boyunca 10.000rpm'de santrifüjlendi.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

- Kolonu tamamen kurutmak için atık su atıldıktan sonra aynı ayarlarda santrifüj tekrarlandı.
- Toplama tüpü atıldıktan sonra QIAquick kolonu temiz bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- DNA'yı elüe etmek için QIAquick membranının merkezine 50 µl Buffer EB eklendi ve kolon 1 dakika boyunca 10.000rpm'de santrifüjlendi. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünün içerisinde saflaştırılmış SNaPshot PCR ürünü bulunmaktadır [58].

3.9.PCR Ürünlerinin Elektroforezi

Kapiller elektroforezde görüntüleme için hazırlanan PCR ürünleri ile, Tablo 9'da belirtilen miktarlarda Hi-di formamid (ThermoFisher Scientific) ve 600 LIZ Size standart (ThermoFisher Scientific) platelere eklenmiştir. PCR ürünlerinin analizi, ABI 3500 Genetik Analizör (ThermoFisher Scientific) cihazında POP-4 polimeri, 36 cm uzunluğundaki kapiller, DS-02 matriksi ve E5 modülü kullanılarak, Tablo 10'da belirtilen koşullarda yapılmıştır.

Tablo 9. Kapiller Elektroforez Aşamasında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

Hi-di Formamid	10 µl
600 LIZ Size standart	0,5 µl
PCR Ürünü	1 µl

Tablo 10. Kapiller Elektroforez Koşulları

Parametre	GSPOP-4(1ml) E5 Modül
Yürütme Voltajı	15 kV
Yürütme Sıcaklığı	60°C
Yürütme Süresi	24 dakika
Şırınga Pompalama Süresi	150 saniye
Enjeksiyon Süresi	5 saniye
Matriks	DS02

Genetik analizörde GeneMapper ID-X yazılımıyla sonuçlar görüntülenmiştir.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

3.10. Verilerin Analizi

Çalışılan örneklerin elde edilen FHL2 gen bölgesine ait CpG adacıklarındaki elektroforezde görüntülediğimiz sitozin ve timin piklerinin RFU değerleri kullanılarak, metilasyon oranları aşağıda verilen formüle göre Microsoft Excel (Microsoft 365 ProPlus) programında hesaplanmıştır. Bu formül DNA metilasyon çalışmalarında kullanılan matematiksel bir orandır. 1,6 değeri; sapmalar için bulunan bir katsayıdır. Bu katsayı, analiz yöntemine göre belirlenen bir düzeltme faktörüdür. Bu faktör, metillenmemiş ve metillenmiş bazların RFU'ları arasında bir oranlama yaparken kullanılır [7].

Daha sonra, örneklerin korelasyon değerlerinin analiz edilebilmesi için IBM SPSS Statistics v20 programıyla Spearman korelasyon testi ve Kruskal Wallis testi yapılarak istatistiksel değerlendirme yapılmış ve tek bir genden yaş tahmin modeli oluşturulmaya çalışılmıştır. Spearman korelasyon testi, yaş ile metilasyon değerleri arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığını, Kruskal Wallis testi ise yaş gruplarının metilasyon değerleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığını gözlemlemek amacıyla yapılmıştır. Çizilen lineer regresyon grafiği, metilasyon değerleri ve yaş arasındaki doğrusal ilişkiyi görselleştirmektedir. Bu grafikte, bağımsız değişken ile bağımlı değişken arasındaki ilişkiyi göstermek için bir doğrusal çizgi kullanılmıştır. Bu grafik ile metilasyon değerleri ve yaş arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir.

$$\frac{\text{Metillenmiş baz (sitozin)}(RFU)}{\text{Metillenmiş baz (sitozin)}(RFU) + (\text{Metillenmemiş baz (timin)}(RFU) \times 1,6)}$$

Şekil 4. Metilasyon Değeri Hesaplama Formülü [7]

4. BULGULAR

Yapılan bu tez çalışmasında; dört farklı yaş grubunda bulunan gönüllülerden 25'i erkek, 25'i kadın olmak üzere toplam 50 kişinin tükürük lekesi örneği alınmıştır. 12-17 yaş grubuna 'X', 18-29 yaş grubuna 'V', 30-49 yaş grubuna 'Y' ve 50-70 yaş grubuna 'Z' kodu verilmiştir. Cinsiyet kodları kadın için 'K', erkek için ise 'E'dir. 50 adet tükürük lekesi numunesinin izolasyonları, miktar tayinleri, bisülfıt dönüşümleri, PCR basamakları yapıp numuneler bilgisayar kontrollü 3500 genetik analizör cihazında yürütülmüştür. Ardından GeneMapper ID-X yazılımıyla sonuçlar görüntülenmiştir. Microsoft Excel (Microsoft 365 ProPlus) programıyla DNA metilasyon oranları hesaplanmıştır. Kişilerin biyolojik yaşları ile DNA metilasyon oranları arasındaki ilişki incelenerek yorumlanmıştır.

4.1. Tükürük Lekelerinden DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

25'i kadın, 25'i erkek olmak üzere toplam 50 kişiden alınan tükürük numunelerinin izolasyonları PureLink Genomic DNA Kit ile gerçekleşmiştir. Numunelerin kodları ve DNA miktar tayini sonuçları Tablo 11'de verilmiştir.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

Tablo 11. DNA Miktar Tayini Sonuçları

Yaş Grupları	Cinsiyet	Kod	DNA Miktarı
12-17 Yaş	K	XK1	1,68 ng/μL
		XK2	6,74 ng/μL
		XK3	3,66 ng/μL
		XK4	5,50 ng/μL
		XK5	1,27 ng/μL
		XK6	1,49 ng/μL
	E	XE1	6,98 ng/μL
		XE2	4,10 ng/μL
		XE3	5,35 ng/μL
		XE4	6,68 ng/μL
		XE5	1,68 ng/μL
		XE6	8,42 ng/μL
18-29 Yaş	K	VK1	3,72 ng/μL
		VK2	2,80 ng/μL
		VK3	2,20 ng/μL
		VK4	3,08 ng/μL
		VK5	1,92 ng/μL
		VK6	5,10 ng/μL
		VK7	1,07 ng/μL
	E	VE1	7,52 ng/μL
		VE2	1,84 ng/μL
		VE3	8,94 ng/μL
		VE4	5,20 ng/μL
		VE5	7,60 ng/μL
		VE6	1,74 ng/μL
		VE7	1,94 ng/μL
30-49 Yaş	K	YK1	11,60 ng/μL
		YK2	1,01 ng/μL
		YK3	2,62 ng/μL
		YK4	1,52 ng/μL
		YK5	4,20 ng/μL
		YK6	4,35 ng/μL
	E	YE1	2,62 ng/μL
		YE2	2,92 ng/μL
		YE3	9,90 ng/μL
		YE4	14,60 ng/μL
		YE5	5,72 ng/μL
		YE6	3,92 ng/μL
50-70 Yaş	K	ZK1	5,98 ng/μL
		ZK2	17,9 ng/μL
		ZK3	10,0 ng/μL
		ZK4	6,32 ng/μL
		ZK5	4,92 ng/μL
		ZK6	5,80 ng/μL
	E	ZE1	2,30 ng/μL
		ZE2	4,12 ng/μL
		ZE3	4,22 ng/μL
		ZE4	5,05 ng/μL
		ZE5	7,80 ng/μL
		ZE6	4,31 ng/μL

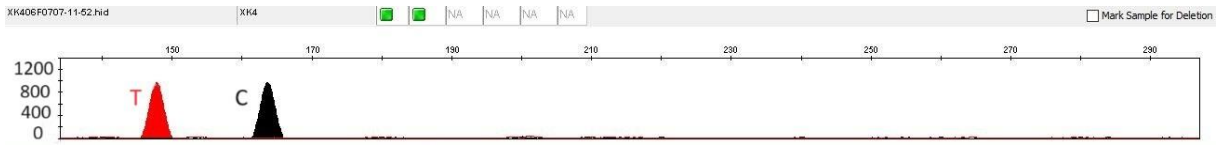
İzolasyonu ve miktar tayini yapılan numunelere, elektroforezde metillenmemiş sitozinlerin metillenmiş sitozinlerden ayırt edilebilmesi için metillenmemiş sitozinlere bisülfıt dönüşümü reaksiyonu yapılır. Bu reaksiyonla metillenmemiş sitozinler elektroforez aşamasında timin nükleotidi olarak görüntülenir.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

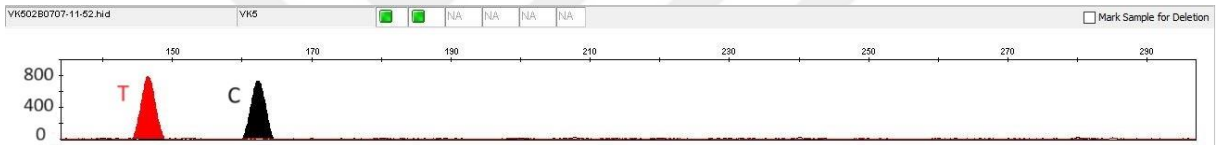
Bisülfıt dönüşümü tamamlanan örneklere sırasıyla Multiplex PCR, ilk temizleme SNaPshot PCR ve ikinci temizleme aşaması gerçekleştirildi.

4.2. Kapiller Elektforez ile Sonuçların Görüntülenmesi

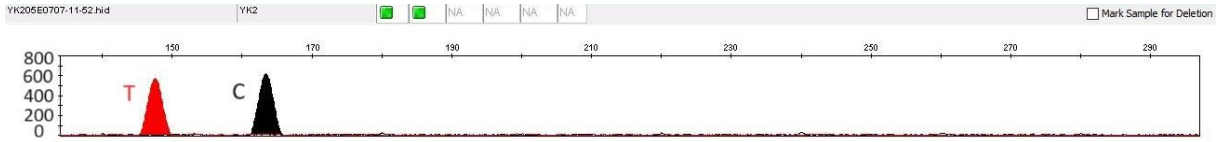
Applied Biosystems 3500 Genetik Analizör cihazında yürütülen örnekler GeneMapper® ID-X v1.5 yazılımı ile elektforez sonuçları görüntüldü. Aşağıdaki şekillerde dört farklı yaş grubuna ait elektforegram görüntüleri verilmiştir.



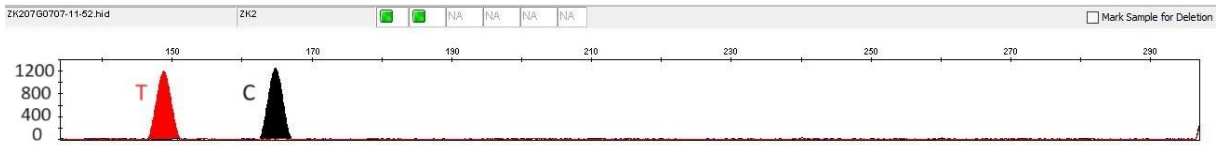
Şekil 5. 12-17 Yaş Grubuna ait bir Elektforegram Görüntüsü



Şekil 6. 18-29 Yaş Grubuna ait bir Elektforegram Görüntüsü



Şekil 7. 30-49 Yaş Grubuna ait bir Elektforegram Görüntüsü



Şekil 8. 50-70 Yaş Grubuna ait bir Elektforegram Görüntüsü

50 örneğin RFU değerleri Microsoft Excel programına not edilmiş ve burada metilasyon oranları hesaplanmıştır. Aşağıdaki tabloda 50 örneğin metilasyon sonuçları verilmiştir (Tablo 12).

Tablo 12. DNA Metilasyon Sonuçları

Yaş Grupları	Cinsiyet	Kod	Metilasyon Oranı	Yaş Grupları	Cinsiyet	Kod	Metilasyon Oranı
12-17 Yaş	K	XK1	0,638970898	30-49 Yaş	K	YK1	0,402721589
		XK2	0,393251093			YK2	0,676088617
		XK3	0,408216084			YK3	0,577190542
		XK4	0,386563267			YK4	0,614773259
		XK5	0,606557377			YK5	0,663865546
		XK6	0,369649805			YK6	0,628086751
	E	XE1	0,375000211		E	YE1	0,669658887
		XE2	0,624413146			YE2	0,403856175
		XE3	0,391264786			YE3	0,712560386
		XE4	0,394545339			YE4	0,611650485
		XE5	0,643848731			YE5	0,645569621
		XE6	0,538730344			YE6	0,619047619
18-29 Yaş	K	VK1	0,361883874	50-70 Yaş	K	ZK1	0,613174492
		VK2	0,553379041			ZK2	0,666052793
		VK3	0,633908477			ZK3	0,582766441
		VK4	0,635359116			ZK4	0,712574851
		VK5	0,369161226			ZK5	0,643769417
		VK6	0,383641829			ZK6	0,637455637
		VK7	0,664247397		E	ZE1	0,673076923
	E	VE1	0,408668118			ZE2	0,652173913
		VE2	0,638820639			ZE3	0,655960806
		VE3	0,395189003			ZE4	0,632836527
		VE4	0,569033179			ZE5	0,657949357
		VE5	0,625562556			ZE6	0,682382134
		VE6	0,509202454				
		VE7	0,626459144				

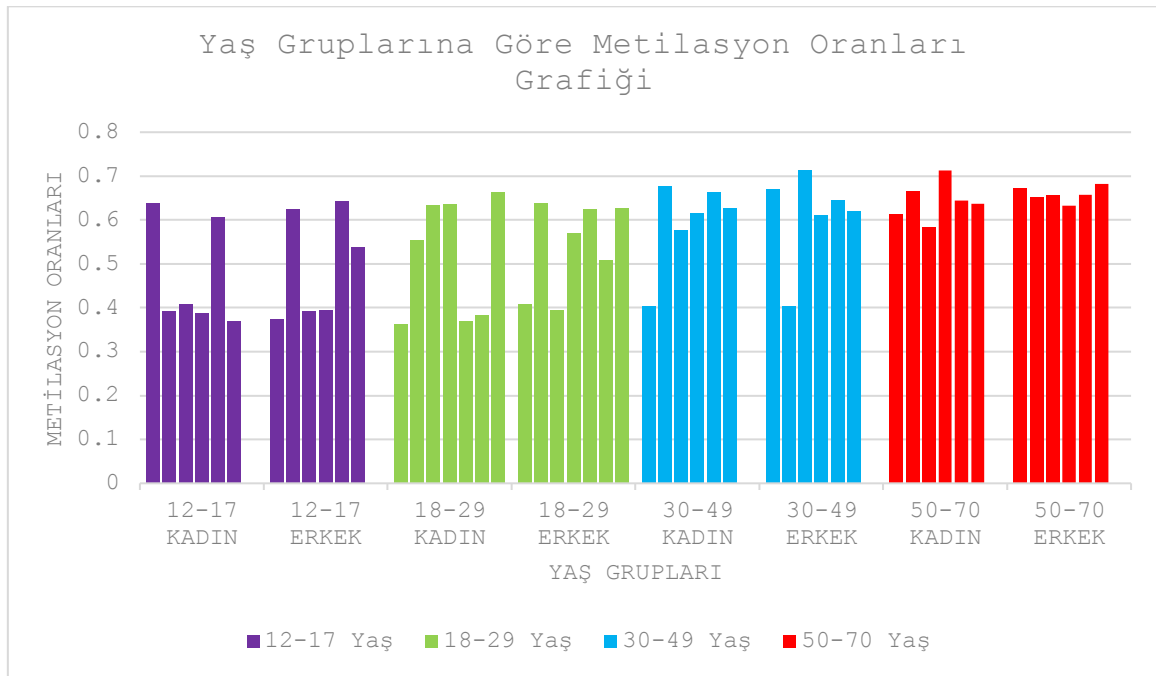
Tablo 13. Yaş Gruplarına Göre Ortalama Metilasyon ve Standart Sapma Oranı

	Aritmetik Ortalama	Standart Sapma
12-17 Yaş	0,480917573	0,117634472
18-29 Yaş	0,526751147	0,117996611
30-49 Yaş	0,602089123	0,099467586
50-70 Yaş	0,650847774	0,033325545

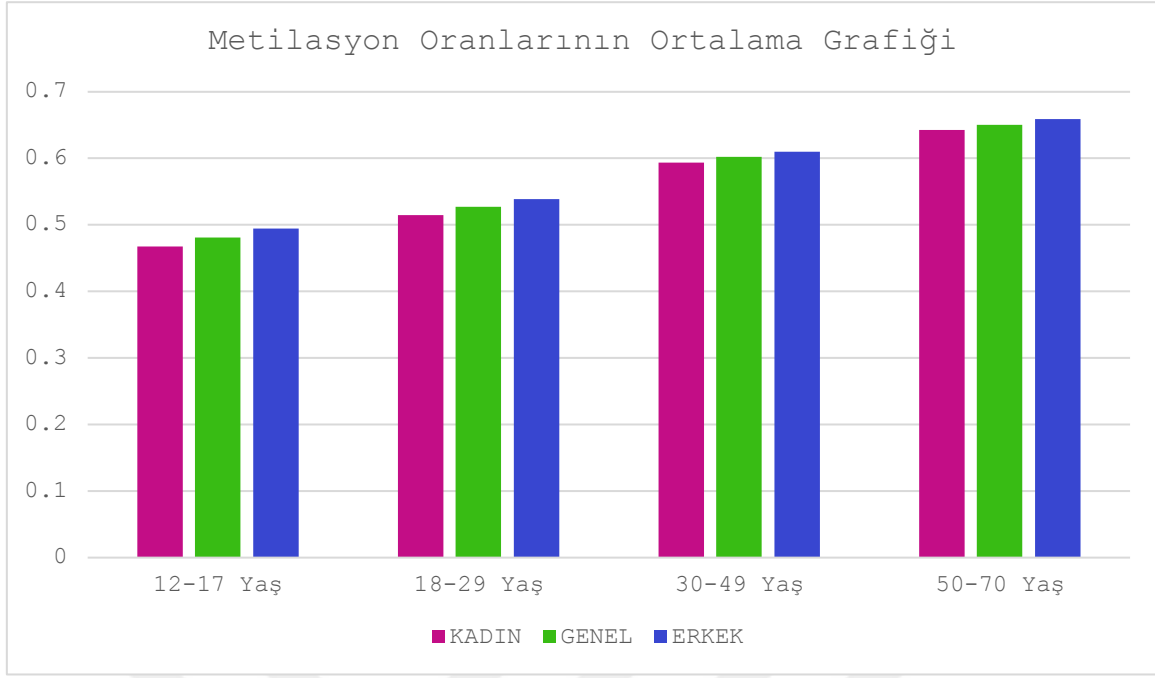
FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

Tablo 14. Yaş Gruplarına Göre Kadınların ve Erkeklerin Ortalama Metilasyon Değerleri

	Kadınların Metilasyon Oranı Ortalaması	Erkeklerin Metilasyon Oranı Ortalaması
12-17 Yaş	0,467201	0,494634
18-29 Yaş	0,514512	0,538991
30-49 Yaş	0,593788	0,610391
50-70 Yaş	0,642632	0,659063

**Şekil 9.** Yaş Gruplarına Göre Metilasyon Oranları Grafiği

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi



Şekil 10. Kadın, Erkek ve Tüm Kişilerin Ortalama Metilasyon Oranları Grafiği

4.3. İstatistiksel Değerlendirme

SPSS uygulaması ile korelasyon ve lineer regresyon analizleri yapılmıştır. FHL2 gen bölgesinde bulunan CpG'lerdeki DNA metilasyon oranı, multipleks metilasyon SNaPshot testi kullanılarak 50 örnekten oluşan bir analiz yapıp, yaş ile metilasyon seviyeleri arasındaki korelasyon, Spearman korelasyon testi kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo 15).

Tablo 15. Spearman Korelasyon Testi Sonucu

Korelasyon			Yaş	Metilasyon Değeri
Spearman'ın sıralama korelasyon katsayısı	Yaş	Korelasyon katsayısı	1,000	,567**
		Anlamlılık düzeyi (iki yönlü)	.	,000
		N	50	50
	Metilasyon Değeri	Korelasyon katsayısı	,567**	1,000
		Anlamlılık düzeyi (iki yönlü)	,000	.
		N	50	50

** . Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır (iki yönlü).

Yapılan Spearman's korelasyon testine göre metilasyon oranları ve yaş arasında pozitif yönde bir korelasyon görülmüştür ve bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Ardından erkekler ve kadınlar için metilasyon değerleri kendi içlerinde de korelasyon analizi yapılarak metilasyon değerleri ve yaş arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı incelenmiştir.

Kadınların kendi arasındaki (Tablo 16) ve erkeklerin kendi arasındaki (Tablo 17) Spearman korelasyon testleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

Tablo 16. Kadınların Kendi Arasındaki Spearman Korelasyon Testi Sonucu

Korelasyon			Yaş	Metilasyon Değeri
Spearman'ın sıralama korelasyon katsayısı	Yaş	Korelasyon katsayısı	1,000	,464*
		Anlamlılık düzeyi (iki yönlü)	.	,020
		N	25	25
	Metilasyon Değeri	Korelasyon katsayısı	,464*	1,000
		Anlamlılık düzeyi (iki yönlü)	,020	.
		N	25	25

**. Korelasyon 0,05 düzeyinde anlamlıdır (iki yönlü).

Cinsiyet = Kadın

Yapılan Spearman korelasyon testine göre kadınların kendi içerisinde yaş ve metilasyon oranları arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 17. Erkeklerin Kendi Arasındaki Spearman Korelasyon Testi Sonucu

Korelasyon			Yaş	Metilasyon Değeri
Spearman'ın sıralama korelasyon katsayısı	Yaş	Korelasyon katsayısı	1,000	,673**
		Anlamlılık düzeyi (iki yönlü)	.	,000
		N	25	25
	Metilasyon Değeri	Korelasyon katsayısı	,673**	1,000
		Anlamlılık düzeyi (iki yönlü)	,000	.
		N	25	25

**Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır (iki yönlü).

Cinsiyet = Erkek

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

Yapılan Spearman korelasyon testine göre erkeklerin kendi içerisinde yaş ve metilasyon oranları arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon bulunmuştur ($p < 0,05$).

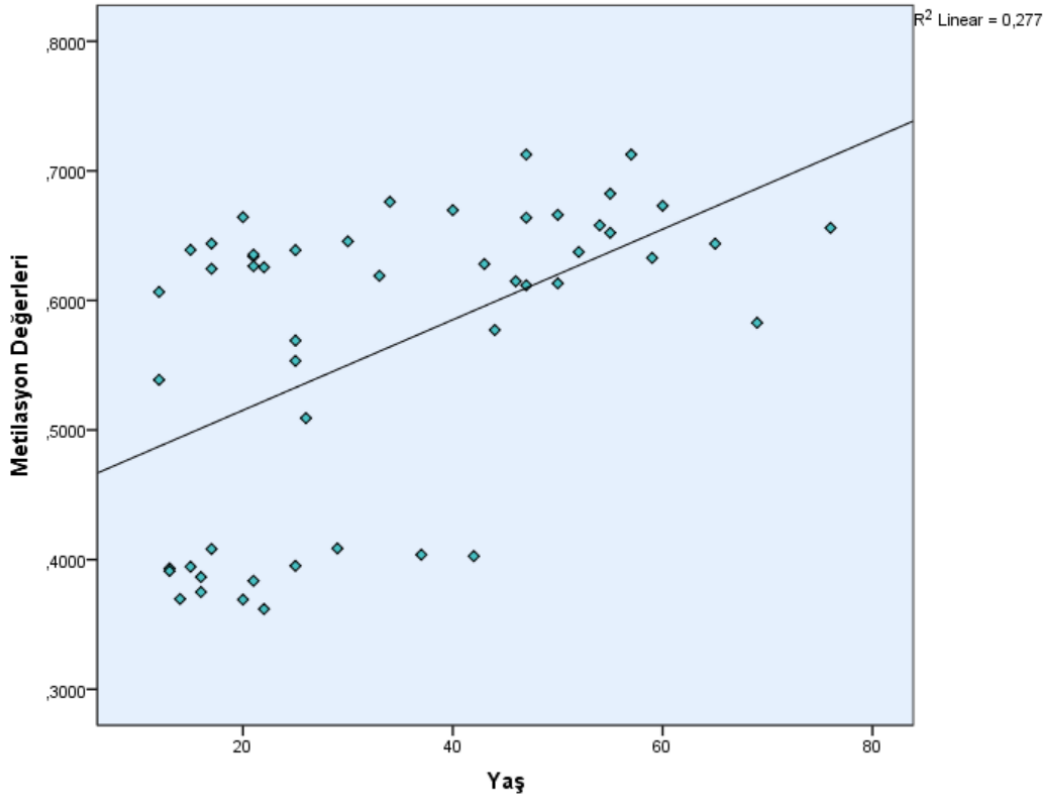
Ardından yaş gruplarının birbirleri arasında ve metilasyon değerleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığına bakılmak için Kruskal Wallis testi yapılmıştır (Tablo 18).

Tablo 18. Yaş Gruplarının Aralarındaki Kruskal Wallis Korelasyon Testi Sonucu

Yaş Grupları	Kişi Sayısı	P Değeri
12-17	12	0,01*
18-30	14	
31-50	12	
51-70	12	

Yapılan Kruskal Wallis Yaş gruplarına göre metilasyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu durum yapılan korelasyon testi ile paralel sonuç göstermektedir. Metilasyon değerleri ve yaş arasındaki lineer regresyon grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 11) [60].

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi



Şekil 11. FHL2 Genindeki CpG Adalarına Ait Lineer Regresyon Grafiği

*Bu grafik, yaş ile metilasyon değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren bir lineer regresyon grafiğidir. Elde edilen lineer regresyon çizgisi (siyah çizgi), yaş arttıkça metilasyon değerlerinde bir artış eğilimi olduğunu göstermektedir.

** R^2 değeri, determinasyon katsayısı demektir. Bu katsayı modelin bağımsız değişken (yaş) tarafından açıklanan bağımlı değişkenin (metilasyon değerleri) varyansının yüzdesini ifade etmektedir. 0,75'ten büyük R^2 değerleri için oldukça güçlü bir korelasyon gösterdiği belirtilmiştir [60, 61]

***0,277 değeri, metilasyon değerlerindeki varyansın yaklaşık %27,7'sinin yaş ile açıklanabileceğini gösterir. Bu, orta düzeyde bir ilişki olduğunu, ancak başka faktörlerin de metilasyon değerlerini etkileyebileceğini işaret eder. Bu değer 0-0,1 arasındaysa istatistiksel açıdan anlamsız, 0,1-0,2 arasındaysa zayıf korelasyon, 0,2-0,5 arasındaysa orta düzey korelasyon, 0,5'ten büyük ise yüksek korelasyon göstermektedir [60, 61].

5. TARTIŞMA

Son yıllarda Adli Bilimler alanında DNA metilasyon çalışmalarının sıklığı artmıştır. DNA metilasyonu kişilerin fenotipik bazı özelliklerine ulaşılmasına olanak sağlamaktadır. Özellikle de DNA metilasyonu ile yaş tayini yapılması, suç olaylarının aydınlatılmasına yakın gelecekte ışık tutması beklenen bir yenilik olarak görülmektedir. Bu yenilik olay yerlerinde karşılaşılan biyolojik lekelerden, lekenin kaynağına ulaşabilmeyi mümkün kılacaktır. DNA metilasyon çalışmalarının spesifik gen bölgelerinde görüldüğü düşünüldüğü zaman FHL2 geninin, yara iyileşmesi, inflamasyon, hücre çoğalması, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminde rol oynayan bir gen olması bu geni yaşa bağlı DNA metilasyon çalışmalarında ilişkilendirilebilir hale getirmiştir [49].

Bu tez çalışmasında, olay yerlerinde sıkça karşılaşılabilen tükürük lekesi örneklerine DNA metilasyonu ile biyolojik yaş tespiti çalışması yapılmıştır. FHL2 gen bölgesinin DNA metilasyonunun biyolojik yaş tayininde kullanılabilirliği incelenmiştir. Bu çalışmanın amacı FHL2 geniyle biyolojik yaş arasında anlamlı bir ilişki bulmaktır. Çalışmanın bulguları, literatürde de belirtilen FHL2 gen bölgesinin yaş ile olan bağlantısını doğrulamakla birlikte, bu bağlantının çeşitli yaş grupları ve cinsiyetler arasında nasıl farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışmasındaki sonuçlar irdelendiğinde 12-17 kadın yaş grubu ortalama metilasyon oranı 0,467201421 (Tablo 14), 12-17 erkek yaş grubu ortalama metilasyon oranı 0,494633724 (Tablo 14), 12-17 yaş grubunun cinsiyetten bağımsız olarak metilasyon oranı ise 0,480917573 olarak bulunmuştur (Tablo 13).

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

- 18-29 kadın yaş grubu ortalama metilasyon oranı 0,514511565 (Tablo 14), 18-29 erkek yaş grubu ortalama metilasyon oranı 0,538990728 (Tablo 14), 18-29 yaş grubunun cinsiyetten bağımsız olarak metilasyon oranı ise 0,526751147 olarak bulunmuştur (Tablo 13).
- 30-49 kadın yaş grubu ortalama metilasyon oranı 0,593787717 (Tablo 14), 30-49 erkek yaş grubu ortalama metilasyon oranı 0,610390529 (Tablo 14), 30-49 yaş grubunun cinsiyetten bağımsız olarak metilasyon oranı ise 0,602089123 olarak bulunmuştur (Tablo 13).
- 50-70 kadın yaş grubu ortalama metilasyon oranı 0,642632272 (Tablo 14), 50-70 erkek yaş grubu ortalama metilasyon oranı 0,659063277 (Tablo 14), 50-70 yaş grubunun cinsiyetten bağımsız olarak metilasyon oranı ise 0,650847774 olarak bulunmuştur (Tablo 13).

Çalışma kapsamında elde edilen verilere göre, ortalama DNA metilasyon sonuçları, yaş grupları arasında yaş artıka metilasyon değeerlerinde de bir artış görüldüğünü göstermektedir.

Cinsiyetten bağımsız:

Yaş gruplarının FHL2 metilasyon seviyelerinin anlamlılık düzeylerini tespit edebilmek için yapılan Spearman korelasyon testi sonucuna göre (Tablo 15) p değeerinin 0,05'ten küçük çıkmıştır. Dolayısıyla yaşa bağılı anlamlı bir değışiklik gözlenmiştir. İstatistikte kullanılan p değeri gözlemlenen sonuçların rastgele bir şansla elde edilme olasılığını, yani sıfır hipotezin doğru olduğu durumda bu sonuçların meydana gelme olasılığını temsil etmektedir. Bu değeer 0,05 olarak kabul edilmektedir, bu da testlerin %5 olasılıkla yanlış pozitif sonuçlar verme riskini temsil etmektedir [60].

Seçilen yaş gruplarının da kendi içlerinde Kruskal Wallis testi ile anlamlılıkları araştırılmıştır.

Bu test sonucunda p değeri 0,01 olarak bulunmuş olup bu sonuç 0,05'ten küçük olduğu için yaş

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

gruplarına göre metilasyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Tablo 18). Bu durum yapılan korelasyon testi ile paralel sonuç göstermektedir. Yaş gruplarının içerisinde de yaş arttıkça metilasyon değeri artar yorumu yapılabilmektedir.

Yaş ile metilasyon değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren lineer regresyon grafiği sonucuna göre yaş arttıkça metilasyon değerlerinde bir artış eğilimi olduğunu göstermiştir. Lineer regresyon analiz R^2 değeri (determinasyon katsayısı) ise 0,277 olarak bulunmuştur (Şekil 11). Bu değer 0-0,1 arasındaysa istatistiksel açıdan anlamsız, 0,1-0,2 arasındaysa zayıf korelasyon, 0,2-0,5 arasındaysa orta düzey korelasyon, 0,5'ten büyük ise yüksek korelasyon göstermektedir. 0,75'ten büyük R^2 değerleri için oldukça güçlü bir korelasyon gösterdiği belirtilmiştir [60, 61].

Yapılan tez çalışmasındaki 0,277 değeri FHL2 geni metilasyonun **yaş ile orta düzey korelasyon gösterdiğini göstermektedir.**

Cinsiyet bazlı tartışıldığı zaman:

Kadın ve erkek ayrımına bakıldığında erkeklerin kendi aralarındaki metilasyon oranlarının kadınların metilasyon oranları ortalamasından yüksek olduğu görülmüştür.

Kadınların ortalama metilasyon değeri 0,554533244 olarak, erkeklerin ortalama metilasyon değeri 0,575769564 olarak bulunmuştur (Tablo 14). Bu değerler arasında fark olduğu görülse de yapılan korelasyon testlerinde anlamlı bir sonuca varılmamıştır (Tablo 18). Dolayısıyla FHL2 gen bölgesi metilasyon seviyelerinin yaş ile bağlantısında cinsiyetin durumu değiştirmedığı söylenebilmektedir. Ancak çalışılan kişi sayısı artırılırsa cinsiyet bazında bu değerler anlamlılık ifade edebileceği de göz ardı edilmemelidir.

Bu sonuçlar FHL2 geni üzerindeki CpG'ler ile yapılan çalışmadaki metilasyon oranları ve yaş arasında pozitif yönde bir korelasyon olduğunu yani FHL2 gen bölgesinin yaş tahmininde potansiyel bir biyomarkır olarak kullanılabileceğini desteklemektedir.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

Literatürdeki diğer çalışmalar

Pan ve ark. 2020 yılında yaptığı ‘Çin popülasyonundan alınan kan örneklerinde yaşla ilişkili yedi CpG'nin adli amaçlı değerlendirilmesi’ adlı çalışmasında içerisinde FHL2 geninin de olduğu, 7 gen bölgesi kullanılarak yaş tahmin modeli oluşturulmuştur. 230 kişinin kan örneği kullanılan bu çalışmada yedi CpG bölgesinin tamamı DNA metilasyonu ve yaş arasında güçlü veya orta düzeyde bir korelasyon göstermiştir. Pan ve ark. yaptıkları lineer regresyon sonucu R^2 değeri yani determinasyon katsayısı FHL2 geni için 0,85 çıkmıştır. Pan ve ark. yaptığı çalışmanın sonucundan seçilen gen bölgelerinin Çin popülasyonundan alınan kan örneklerinde doğru yaş tahmini için kullanılabileceğini göstermiştir [46]. Bu tezdeki Pan ve ark.’dan farklı olarak tükürük lekelerinde çalışma yapılmış olup; R^2 değeri (0,27) Pan ve arkadaşlarının çalışmasındaki R değerinden daha düşük çıkmıştır. Bu sonuç FHL2 geni metilasyon oranlarının Çin popülasyonundan farklı bir popülasyon olan Türkiye-Marmara bölgesi popülasyonunun farklı olduğunu göstermektedir.

Filoğlu ve ark. (2023) yaptıkları çalışmada alkol kullanım bozukluğunun yaş tahmininde kullanılan DNA metilasyon belirteçleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Ağız içi swap ile her hafta düzenli alkol tüketen Türkiye İstanbul’da ikamet eden toplam 62 kişiden örnek alınmıştır. 19-63 yaş arasındaki bu 62 kişinin 47’si erkek, 15’i kadındır. İçlerinde FHL2’nin de bulunduğu 3 CpG gen bölgesinde yapılan çalışmada regresyon grafikleri oluşturulmuş ve FHL2 geni için R^2 değeri 0,3151 olarak bulunmuştur [62]. Bu R^2 değeri bu tezde sigara-alkol tüketmeyen, kronik hastalığı olmayan ve ilaç kullanmayan sağlıklı kişilerden alınan örneklerde R^2 değeri ile karşılaştırıldığı zaman (0,277) daha yüksek bir anlamlılık düzeyi göstermiştir. Aynı popülasyon olmasına rağmen verilerde elde edilen bu farklılık alkol tüketiminin DNA metilasyonu üzerine etkili olduğunu ve metillenme oranını artırdığını gösteren bir sonuçtur.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

Dias ve ark. (2024) yaptıkları çalışmada ise DNA metilasyon belirteçleri farklı bir yöntem ile karşılaştırılmış ve iki yöntemle de yaş tahmin modeli oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu çalışma için Portekiz popülasyonundan 42 kadın 16 erkek olmak üzere 58 kişiden kan örnekleri alınmıştır. 1 ile 93 yaşları arasında değişen kişilerden örnek alınmıştır. Damlacık dijital PCR (ddPCR) yöntemi olarak adlandırılan bir yöntem kullanarak kan örneklerinden yaş tahmini yapmayı hedeflemişlerdir. Dias ve ark, yaşa bağlı DNA metilasyon değişikliklerini değerlendirmek için arasında FHL2'nin de bulunduğu üç spesifik DNA metilasyon belirtecini (CpG bölgesi) kullanmışlardır. DdPCR teknolojisi ile bu bölgelerdeki metilasyon seviyeleri ölçülerek, bireylerin biyolojik yaşı tahmin edilmeye çalışılmıştır. FHL2 geni için determinasyon katsayısı (R^2) 0,899 olarak hesaplanmıştır. Bu değer ile yüksek doğruluk sağlayan bir metodoloji geliştirilmiştir. Ayrıca bu değer yaptığımız tez çalışmasına göre daha yüksek anlamlılık göstermiştir ($R^2=0,277$). Yaptığımız tez ile karşılaştırıldığında, Portekiz popülasyonunun farklı olması ve farklı bir yöntem kullanılarak (ddPCR) analizlerin yapıldığı için değerlerin farklı çıkmış olabileceği düşünülebilir. Ayrıca yaş grupları geniş tutulduğu için anlamlılık düzeyi artmıştır yorumu yapılabilir [9].

Hong ve ark. (2017) yaptığı çalışmada ise, tükürük örneklerinden DNA metilasyonuna dayalı yaş tahmini üzerine odaklanmaktadır. Araştırmada; Hong yaş tahmini için FHL2 geni dahil 7 CpG belirteci kullanmıştır. 226 tükürük örneğinin DNA metilasyon profilleri oluşturulmuştur. Bu çalışmada tahmin edilen yaş ile kronolojik yaş arasında %94,5'lik bir korelasyon bulunmuştur. Bu çalışmada R^2 değeri 0,634 bulunmuş olup yaptığımız tez çalışmasından daha anlamlı bir istatistik göstermiştir (0,277). Determinasyon katsayıları arasındaki fark bu tezde kullanılan gönüllü sayısının daha az oluşu ve popülasyon farkından kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmiştir [45].

6. SONUÇ

Adli bilimlerde DNA metilasyon çalışmaları, olay yerlerinde bulunan ve kime ait olduğu bulunamayan bir biyolojik örneğin sahibinin yaklaşık olarak yaş aralığını belirlemek üzere yapılmaktadır. Bu alanda yapılan diğer çalışmalar ve bu tez çalışması da FHL2 geni metilasyonun yaş ile bağlantısının olduğu ve biyolojik bir lekenin sahibinin yaşını belli bir aralıkta verebileceğini destekleyen çalışmalardır.

Bu tez çalışması tükürük lekelerinden elde edilen DNA'daki FHL2 gen bölgesinin CpG adacıklarının analizi sonucu elde edilen metilasyon oranlarına göre, yaş arttıkça metilasyon değerlerinde bir artış eğilimi olduğunu göstermiştir. Lineer regresyon analiz R^2 değeri (determinasyon katsayısı) ise 0,277 olarak bulunmuştur. Bu değer **FHL2 geni metilasyonun yaş ile orta düzey korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur**. Bu sonuçlar FHL2 geni üzerindeki CpG'ler ile yapılan çalışmadaki metilasyon oranları ve yaş arasında pozitif yönde bir korelasyon olduğunu yani FHL2 gen bölgesinin yaş tahmininde potansiyel bir biyomarkır olarak kullanılabileceğini desteklemektedir. Bu da soruşturmaların önünün açılmasına ve suçla fail arasında bağlantı kurulup adaletin tecellisine katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışma FHL2 metilasyonunun adli bilimlerde yaş tahmini için kullanılabilir bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur. Ancak, FHL2 gen bölgesinin farklı popülasyonlarda ve çeşitli biyolojik örneklerdeki metilasyon profillerinin daha geniş kapsamlı çalışmalarda ele alınması, bu biyomarkırın güvenilirliğini ve geçerliliğini artıracaktır. Ayrıca, diğer epigenetik markırların da dahil edilerek yaş tahmin modellerinde tahmin gücünün artırılması çalışmalarının devamı önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

- [1] S. Aksungur ve N. Göksal, *DNA Metilasyonu ve Adli Bilimlerde Uygulamaları*, Ankara, 2019.
- [2] L. D. Mutesi ve A. Serin, *Forensic Age Prediction Based on DNA Methylation Using Next Generation Sequencing*, Adana, 2023.
- [3] S. Z. Şimşek ve G. Filoğlu, *Yaş Tayininde DNA Metilasyon Belirteçlerinin Kullanımı ve Optimizasyonu*, İstanbul , 2020.
- [4] D. O. M. Bonsua, D. Higgins ve J. J. Austin, «Forensic Touch DNA Recovery From Metal Surfaces- A Review,» *Science & Justice*, cilt 60, no. 3, pp. 206-215, Mayıs 2020.
- [5] A. K. Rana, «Crime Investigation Through DNA Methylation Analysis: Methods and Applications in Forensics,» *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, cilt 1, no. 8, 2018.
- [6] M. İ. Can ve A. Aslan, «Epigenetik Mekanizmalar ve Bazı Güncel Çalışmalar,» *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, cilt 2, no. 6, pp. 445-452, 2016 .
- [7] S. Er ve Ö. Bülbül, *Semen Örneklerinde DNA Metilasyonu ile Yaş Tahmini*, İstanbul, 2022.
- [8] B. Bekaerta, A. Kamalandua, S. Zapico, W. V. d. Voorde ve R. Decorte, «A Selective Set of DNA-Methylation Markers for Age Determination of Blood, Teeth and Buccal Samples,» *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, cilt 5, pp. e144-e145, September 2015.
- [9] H. C. Dias ve L. Manco, «Predicting Age From Blood by Droplet Digital PCR Using a Set of Three DNA Methylation Markers,» *Forensic Science International*, cilt 356, no. 111950, 2024.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

- [10] Ö. An ve Ö. Keskin, *Structural and functional analysis of perforin mutations in association with clinical data of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 2 (FHL2) patients*, İstanbul, 2011.
- [11] K. Hemanth, M. Tharmavaram ve G. Pandey, «History of Forensic Science,» *Technology in Forensic Science*, pp. 1-16, 2020.
- [12] W. J. Tilstone, K. A. Savage ve L. Clark, «Forensic Science: An Encyclopedia of History, Methods, and Techniques,» *Strathclyde Institute Of Pharmacy And Biomedical Sciences*, 2006.
- [13] H. A. Harris ve H. C. Lee, « Introduction to forensic science and criminalistics,» CRC Press, 2019.
- [14] J. A. Siegel ve K. Mirakovits, *Forensic Science: the Basics*, CRC Press, 2015.
- [15] B. R. McCord, Q. Gauthier, S. Cho, M. N. Roig, G. C. Gibson-Daw, B. Young, F. Taglia, S. C. Zapico, R. F. Mariot, S. B. Lee ve G. Duncan, «Forensic DNA Analysis,» *Analytical Chemistry*, cilt 91, no. 1, pp. 673-688, 2019.
- [16] M. Kayser ve M. Stoneking, «Hypervariable mini- and microsatellite DNA sequences in forensic identity testing,» *Journal of Clinical Forensic Medicine*, cilt 1, no. 10, pp. 24-30, 2003.
- [17] M. A. J. & P. Gill, «Encoded evidence: DNA in forensic analysis,» *Nature Reviews Genetics*, cilt 5, 2004, pp. 739-751.
- [18] M. Hofreiter, V. Jaenicke, D. Serre, A. v. Haeseler ve S. Pääbo, «DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA,» *Nucleic Acids Research*, cilt 29, no. 23, p. 4793–4799, 2001.
- [19] N. U. Akıncıoğlu, İ. Aslan ve Y. Doğan, «Afet Kurbanlarının Kimliklendirilmesinde Kullanılan Yöntemler ve Ülkemizdeki Durum,» *Güvenlik Bilimleri Dergisi*, cilt 10, no. 1, pp. 217-238, Mayıs 2021.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

- [20] A. Vidaki, D. Ballard, A. Aliferi, T. H. Miller ve D. S. Court, «DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing,» *Forensic Science International: Genetics*, cilt 28, pp. 225-236, May 2017.
- [21] A. L. Mattei, N. Bailly ve A. Meissner, «DNA methylation: a historical perspective,» *Trends in Genetics*, cilt 38, no. 7, pp. 667-707, July 2022.
- [22] J. Aj, «Individual-specific "fingerprints" of human DNA,» *Nature*, cilt 316, pp. 76-79, 1985.
- [23] J. M. Butler, «Genetics and Genomics of Core STR Loci Used in Human Identity Testing,» *Journal of Forensic Sciences*, pp. 1-48, 2006.
- [24] M. J. Butler ve C. R. Hill, «Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis,» *Forensic Science Review*, cilt 24, no. 1, p. 15, 2012.
- [25] F. Sessa, M. Esposito, G. Cocimano, S. Sablone, M. A. A. Karaboue, M. Chisari, D. G. Albano ve M. Salerno, «Artificial Intelligence and Forensic Genetics: Current Applications and Future Perspectives,» *Applied Sciences*, cilt 14, no. pp. 1-16, 2024.
- [26] U. Z. O. a. C. B. a. A. H. a. Ş. F. Tıplamaz Sıtkı, *Forensic Identification Using Airdna: A Preliminary Study on the Collection, Isolation, Amplification and Sequencing of Human DNA from Air Samples*, İstanbul, 2024.
- [27] J. H. An, K.-J. Shin, W. I. Yang ve H. Y. Lee, «Body fluid identification in forensics,» *BMB Reports*, pp. 545-553, 2012.
- [28] T. Lindholm, J. Rajs ve P. Lindqvist, «Toxicological analysis in forensic science: a review,» *Forensic Science International*, cilt 222, no. 1-3, pp. 89-98, 2012.
- [29] v. Oorschot ve M. K. Jones, «DNA fingerprints from fingerprints,» *Nature*, cilt 387, no. 6635, p. 767, 1997.
- [30] D. H. Kaye, «The double helix and the law of evidence,» *Harvard University Press*, 2010.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

- [31] D. Sweet ve I. A. Pretty, «A look at forensic dentistry – Part 1: The role of teeth in the determination of human identity,» *British Dental Journal*, cilt 190, no. 7, pp. 359-366, 2001.
- [32] T. Shamim, «Forensic odontology,» *J Coll Physicians Surg Pak*, cilt 22, no. 4, pp. 5-240, 2012.
- [33] A. Bird, «Perceptions of epigenetics,» *Nature*, cilt 447, no. 7147, pp. 396-398, 2007.
- [34] R. Jaenisch ve A. Bird, «Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals,» *Nature Genetics*, cilt 33, no. 3s, pp. 245-254, 2003.
- [35] J. Y. J. MS, M. H. So, K.-S. Jeong, S.-I. Kim, E. J. Kim, J. H. Park, E. Kim ve H. Y. Lee, «Epigenetic age prediction using costal cartilage for the investigation of disaster victims and missing persons,» *Journal of Forensic Sciences*, pp. 1-9, 2024.
- [36] B. M. Şaşmaz ve G. Filoğlu, *Yaş Tayininde Kullanılan DNA Metilasyon Belirteçlerinin Yapay Oluşturulmuş Olay Yeri Kan Örneklerinde Uygulanabilirliği*, İstanbul , 2024.
- [37] R. Lister ve J. Ecker, «Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation,» *Genome Research*, cilt 19, no. 6, pp. 959-966, 2009.
- [38] T. Kouzarides, «Chromatin modifications and their function,» *Cell*, cilt 128, no. 4, pp. 693-705, 2007.
- [39] D. Jiang, T. Li, C. Guo, T. Tang ve H. Liu, «Small molecule modulators of chromatin remodeling: from neurodevelopment to neurodegeneration,» *Cell & Bioscience*, cilt 13, no. 10, pp. 1-32, 2023.
- [40] L. D. Moore, T. Le ve G. Fan, «DNA Methylation and Its Basic Function,» *Neuropsychopharmacology*, pp. 23-38, 2013.
- [41] S.Jung, K. Shin ve H. Y. Lee, «DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids,» *BMB Reports*, cilt 50, no. 11, pp. 546-553, 2017.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

- [42] L. Stewart, N. Evans, K. J. Bexon, v. d. Meer ve G. A. Williams, «Differentiating between monozygotic twins through DNA methylation-specific high-resolution melt curve analysis,» *Anal Biochem*, cilt 475, pp. 9-39, 2015.
- [43] H. C. Diasa, C. Cordeiroc, J. Pereirae, C. Pintoe, F. C. Realc, E. Cunhab ve L. Mancoa, «DNA methylation age estimation in blood samples of living and deceased individuals using a multiplex SNaPshot assay,» *Forensic Science International*, cilt 311, 2020.
- [44] F. Kader ve M. Ghai, «DNA methylation and application in forensic sciences,» *Forensic Science International*, cilt 249, pp. 255-265, 2015.
- [45] S. R. Hong, S.-E. Jung, E. H. Lee, K.-J. Shin, W. I. Yanga ve H. Y. Lee, «DNA methylation-based age prediction from saliva: High age predictability by combination of 7 CpG markers,» *Forensic Science International: Genetics*, cilt 29, pp. 118-125, 2017.
- [46] C. Pan, S. Yi, C. Xiao, Y. Huang, X. Chen ve D. Huang, «The evaluation of seven age-related CpGs for forensic purpose in blood from Chinese Han population,» *Forensic Science International: Genetics*, cilt 46, no. 102251, pp. 1-8, 2020.
- [47] F. Gentile, E. Castoldi, P. Serventi, D. Colloca, R. Ciccotelli ve A. Marino, «Early evaluation of five age-correlated DNA methylation markers in an Italian population sample,» *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, no. 7, pp. 424-426, 2019.
- [48] K. Yanar ve S. Aksungur, «Adli Bilimlerde DNA Metilasyonları Kullanılarak Bireysel Yaş Tahmini,» *Adli Bilimler ve Suç Araştırmaları Dergisi*, cilt 6, no. 1, pp. 42-47, 2024.
- [49] R. Fulea, L. Reynard, D. Young ve G. Bou-Gharios, «FHL2 promoter DNA methylation increases with chronological age in joint tissues and impacts target gene expression,» cilt 29, no. 1, pp. 10-432, April 2021.
- [50] J. J. Habibe, M. P. Clemente-Olivo ve C. J. d. Vries, «How (Epi)Genetic Regulation of the LIM-Domain Protein FHL2 Impacts Multifactorial Disease,» *Cells*, cilt 10, no. 10, pp. 1-14, 2021.

FHL2 Bölgesinin Metilasyonunun Yaş ile Bağlantısının Belirlenmesi

- [51] B. Mehta, R. Daniel, C. Phillips ve D. McNevin, «Forensically relevant SNaPshot® assays for human DNA SNP analysis: a review,» *International Journal of Legal Medicine*, cilt 131, pp. 21-37, 2017.
- [52] R. Daniel, C. Santos, C. Phillips, M. Fondevila, R. v. Oorschot, A. .. Carracedo, M. Lareu ve D. McNevin, «A SNaPshot of next generation sequencing for forensic SNP analysis,» *Forensic Science International: Genetics*, cilt 14 , pp. 50-60, 2015.
- [53] K. Patterson, L. Molloy ve S. C. Q. W, «DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis.,» cilt 56, pp. 1-21, 2011.
- [54] Z. Kaminsky ve A. Petronis, «Methylation SNaPshot: A Method for the Quantification of Site-Specific DNA Methylation Levels,» *In Humana Press*, pp. 55-241, 2009.
- [55] Invitrogen™, *Qubit™ dsDNA HS Assay Kit Handbook*, Thermo Fisher Scientific, 2021.
- [56] QIAGEN, *EpiTect® Bisulfite Handbook*, 2023.
- [57] A. Biosystems, *Platinum™ Multiplex PCR Master Mix User Guide*, Thermo Fisher Scientific, 2018.
- [58] QIAGEN, *QIAquick PCR Purification Kit Handbook*, 2020.
- [59] A. Biosystems, *SNaPshot™ Multiplex Kit Protocol*, 2010.
- [60] J. Cohen, «Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences,» *Lawrence Erlbaum Associates*, 1988.
- [61] Z. Bobbit, «What is Considered to be a Strong Correlation?,» *Statology*, 2020.
- [62] N. Keskin ve G. Filoğlu, «Alkol Kullanım Bozukluğunun Yaş Tahmininde Kullanılan DNA Metilasyon Belirteçlerine Etkisi,» *İstanbul Üniversitesi , İstanbul*, 2023.

ÖZGEÇMİŞ**KİŞİSEL BİLGİLER****ADI SOYADI:** Ali Zikir DUMAN**EĞİTİM BİLGİLERİ**

2022-Halen, Üsküdar Üniversitesi, Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü, Adli Bilimler
Tezli Yüksek lisans (Tam Burslu)

2018-2022, Üsküdar Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Adli
Bilimler bölümü (Tam Burslu)