

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

**ÇEŞİTLİ miRNA BELİRTEÇLERİNİN SEMEN
ÖZGÜNLÜĞÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Mustafa Ürün AY

**ADLİ BİLİMLER DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayşe SERİN**

ADANA-2024

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

ÇEŞİTLİ miRNA BELİRTEÇLERİNİN SEMEN ÖZGÜNLÜĞÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Mustafa Ürün AY

ADLİ BİLİMLER DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayşe SERİN

ADANA-2024

KABUL VE ONAY

XXXXXX

ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Bağımlık ve Adli Bilimler Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim./..../20...

İMZA

Adı Soyadı

Mustafa Ürün AY

TEŞEKKÜR



İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	iii
ETİK BEYANI.....	1
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELEr VE KISALTMALAR.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. RNA'ların Genel Özellikleri	4
2.2.1. Mesajcı RNA'lar	6
2.2.2. Transfer RNA'lar	8
2.2.3. Ribozomal RNA'lar	10
2.2.4. Long Non Coding RNA'lar.....	11
2.2.5. Small Non-Coding RNA'lar	12
2.2.5.1. Piwi Interacting RNA'lar.....	13
2.2.5.2. Small Nuclear RNA'lar	14
2.2.5.3. Small Nucleolar RNA'lar	15
2.2.5.4. Mikro RNA'lar	16
2.3. Adli Bilimler ve miRNA	22
2.3.1. Kuru Leke Yaşının Belirlenmesi ve MiRNA	22
2.3.2. Postmortem İnterval ve MiRNA	23
2.3.3. Ölüme Neden Olan Patolojik Mekanizmanın Anlaşılması, Ölüm Sürecinin Belirlenmesi ve MiRNA	24
2.3.4. Vücut Sıvılarının İdentifikasyonu ve MiRNA	25
2.3.5. miRNA Analiz Yöntemleri.....	31

2.3.5.1. RT-qPCR.....	31
2.3.5.2. Rolling Circle Amplifikasyonu (RCA).....	34
2.3.5.3. Exponential Amplifikasyon Reaksiyonu (EXPAR).....	34
2.3.5.4. Duplex-Spesifik Nükleaz Sinyal Amplifikasyonu.....	35
2.3.5.5. Hibridizasyon Zincir Reaksiyonu	36
2.3.5.6. Kapiller Elektroforez	37
2.3.5.7. Yeni Nesil Sekanslama.....	38
2.3.5.8. Mikroarray	39
3. YÖNTEM	40
3.1. Gereçler	40
3.1.1. Kullanılan Cihaz, Malzemeler ve Kitler	40
3.1.1.1. Cihazlar	40
3.1.1.2. Kitler ve Malzemeler.....	40
3.2. Yöntem.....	41
3.2.1. Örnek Alma	41
3.2.1.1. Örnek Alma	41
3.2.2. RNA İzolasyonu	41
3.2.3. RNA kantitasyonu.....	44
3.2.4. cDNA Aşaması.....	44
3.2.5. Real Time PCR aşaması	45
3.3. İstatistiksel Analiz	46
4. BULGULAR.....	48
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKÇA.....	64
EKLER.....	80
EK-1. Akademik Kurul Kararı 1	80
EK-2. Etik Kurul Kararı.....	81
EK-3. Tez Çalışma İzni Yazısı ve Kararı 1	82
EK-4. Tez Çalışma İzni Yazısı ve Kararı 2	83
ÖZGEÇMİŞ	84
EKLER.....	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1.. RNA moleküler strüktür	5
Şekil 2. RNA sınıflandırılması	6
Şekil 3. mRNA biyogenezi ve fonksiyonu	7
Şekil 4. mRNA strüktürü	8
Şekil 5. tRNA moleküler strüktür	9
Şekil 6. tRNA fonksiyon	10
Şekil 7. rRNA fonksiyon	11
Şekil 8. lncRNA fonksiyon.....	12
Şekil 9. sncRNA karşılaştırılması	13
Şekil 10. piRNA fonksiyon	14
Şekil 11. snRNA fonksiyon	15
Şekil 12. snoRNA fonksiyon	16
Şekil 13. miRNA biyogenez ve fonksiyon 1	18
Şekil 14. miRNA biyogenez ve fonksiyon 2	18
Şekil 15. miRNA biyogenez ve fonksiyon 3	19
Şekil 16. miRNA biyogenez ve fonksiyon 4	20
Şekil 17. RT-qPCR prensip.....	32
Şekil 18. RT-qPCR prensip 2.....	33
Şekil 19. RCA prensip	34
Şekil 20. EXPAR prensip	35
Şekil 21. DSNSA prensip	36
Şekil 22. HCR prensibi.....	37
Şekil 23. CE prensibi.....	38
Şekil 24. Kolon uygulaması	43
Şekil 25. Santrifüj Cihazı	43
Şekil 26. Qubit Cihazı	44
Şekil 27. Thermocycler Cihazı.....	45
Şekil 28. ABI 7500 Real Time PCR cihazı	46
Şekil 29. (A-E): Beş çeşit vücut sıvısında aday genlerin ifadesi (Y eksen: Hedef miRNA'nin relatif CT değeri-Delta CT); X eksen:5 farklı biyolojik örnek; Semen, Kan, Menstrüel kan, tükürük, vajinal sekresyon (VS).....	49

TABLolar DİZİNİ

Tablo No:

Sayfa No:

Tablo 1. Vücut sıvılarının identifikasyonu için test edilen miRNA belirteçlerinden bazıları.....	26
Tablo 2. Doku identifikasyonu için test edilen miRNA belirteçlerinden bazıları	27
Tablo 3. miR-10a-3p ve Vücut Sıvılarının Karşılaştırılması ($\Delta\Delta Ct$)	50
Tablo 4. miR-10a-5p ve Vücut Sıvılarının Karşılaştırılması ($\Delta\Delta Ct$)	51
Tablo 5. miR-888-3p ve Vücut Sıvılarının Karşılaştırılması ($\Delta\Delta Ct$)	52
Tablo 6. miR-888-5p ve Vücut Sıvılarının Karşılaştırılması ($\Delta\Delta Ct$)	53
Tablo 7. miR-891a-3p ve Vücut Sıvılarının Karşılaştırılması ($\Delta\Delta Ct$)	54



SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
cDNA	: Complementary/Copy (Tamamlayıcı/Kopya) Deoksiribonükleik Asit
Ct	: Cyle Threshold
G	: Gravite
Ng	: Nanogram
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Çoklu Zincir Reaksiyonu)
RT-PCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction (Gerçek Zamanlı Çoklu Zincir Reaksiyonu)
Pg	: Pikogram
PSA	: Prostate Specific Antigen (Prostat Spesifik Antijen)
Rfu	: Relative Fluorescent Unit (Relatif Floresan Unitesi)
STR	: Short Tandem Repeats (Kısa Ardışık Tekrarlar)
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromol
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
miRNA	: Mikro Ribonükleik Asit
ncRNA	: Non coding (Kodlamayan) Ribonükleik Asit
tRNA	: Transfer Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
lncRNA	: Long Non Coding (Uzun Kodlamayan) Ribonükleik Asit
sncRNA	: Short Non Coding (Kısa Kodlamayan) Ribonükleik Asit
snoRNA	: Small Nucleolar (Küçük Nüleolar) Ribonükleik Asit
snRNA	: Small Nuclear (Küçük Nüklear) Ribonükleik Asit
piRNA	: Piwi-Interacting (Piwi Etkileşimli) Ribonükleik Asit
nt	: Nükleotid
NGS	: New Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)
MI	: Mililitre
UTR	: Untranslated Region (Okunmayan Bölge)
UV	: Ultra Viyole
PMI	: Post Mortem İnterval

ÖZET

Çeşitli miRNA Belirteçlerinin Semen Özgünlüğünün Araştırılması

Adli bilimlerde yaşanan gelişmeler sayesinde olay yerlerinde karşılaşılan örneklerle karşı çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Kimliklendirme açısından DNA temelli yaklaşımlar öne çıkarken, olay yerini yeniden canlandırmak için gerekli parametrelerden biri olan vücut sıvısı/dokusu identifikasyonunda RNA temelli yaklaşımlar ön plandadır. Literatür incelendiğinde “mesajcı RNA (mRNA)” ya dayalı yaklaşımların temel problemi degradasyona eğilimli oluşu olarak görülmektedir. Buna karşın “mikro RNA” molekülleri ise degradasyon etkenlerine karşı daha dayanıklıdır. Bu özellikleriyle adli bilimler açısından önemli bir potansiyele sahiptirler. “Kodlamayan Mikro RNA (nc miRNA)” 18-22 nükleotid uzunluğunda, epigenetik mekanizmalarda önemli roller üstlenen ve gen ekspresyonunu düzenleyen bir RNA molekülüdür. Gen ekspresyonunu, çeşitli başka proteinlerle kompleksler oluşturup, mRNA’ların 3’ UTR bölgelerine bağlanarak down regüle ederler. mRNA tiplerinin doku/vücut sıvısı spesifik ekspresyon profilleri olduğu göz önüne alındığında, onları regüle eden miRNA’ların da benzer spesifite gösterdiği sonucuna ulaşılmaktadır. Kan, semen, tükürük vb. gibi çeşitli örnekler olay yerinde en sık karşılaşılan vücut sıvılarından biridir. Literatür incelendiğinde semen identifikasyonu için öne çıkan miRNA’lar miR-10a-3p, miR-10a-5p, miR-888-3p, miR-888-5p ve miR-891a-3p olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada 50 gönüllüden alınan venöz kan (n=10), menstrüel kan (n=10), vajinal sekresyon (n=10), tükürük (n=10) ve semen (n=10) örneklerinde miR-10a-3p, miR-10a-5p, miR-888-3p, miR-888-5p ve miR-891a-3p belirteçleri ile referans gen olarak SNORD48’in kullanılmıştır. Belirteçler SYBR Green’e dayalı gerçek zamanlı kantitatif PCR ile analiz edilmiştir. Vücut sıvılarını semen/semen olmayan şeklinde gruplayarak yaptığımız diskriminant analizler sonucunda; miR-10a-3p (%92,0), miR-10a-5p (%94,0), miR-888-3p (%94,0), miR-888-5p (%100,0) ve miR-891a-3p (%100,0) doğrulukta semen ayrımı yapabilmektedir. İstatistiksel analizler sonucunda miR-888-3p, miR-888-5p ve miR-891a-3p kombinasyonunun semen identifikasyonunda en iyi performansı gösterdiği belirlenmiştir. Bu 3 belirteç birlikte kullanıldığında %100,0 doğrulukta semen örneklerini diğer vücut sıvılarından ayırt ettiği görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Epigenetik, miRNA, Semen, Vücut Sıvısı İdentifikasyonu

ABSTRACT

Investigation of the Semen-Specificity of Various miRNA Markers

Advancements in forensic sciences have led to the development of diverse approaches for the analysis of evidence encountered at crime scenes. While DNA-based methods dominate for identification purposes, RNA-based approaches are more prominent in body fluid/tissue identification, a critical parameter for reconstructing crime scenes. A review of the literature indicates that the primary limitation of messenger RNA (mRNA)-based methods is their susceptibility to degradation. Conversely, microRNA (miRNA) molecules are more resistant to degradation factors, making them highly promising for forensic applications. Non-coding microRNAs (nc-miRNAs) are small RNA molecules, 18–22 nucleotides in length, playing significant roles in epigenetic mechanisms and regulating gene expression. They achieve gene expression regulation by forming complexes with various proteins and binding to the 3' UTR regions of mRNAs, thereby downregulating their expression. Considering the tissue/body fluid-specific expression profiles of mRNAs, it can be inferred that the miRNAs regulating them exhibit similar specificity. Among the most frequently encountered body fluids at crime scenes are blood, semen, and saliva. Literature highlights miRNAs such as miR-10a-3p, miR-10a-5p, miR-888-3p, miR-888-5p, and miR-891a-3p as prominent candidates for semen identification. In this study, miR-10a-3p, miR-10a-5p, miR-888-3p, miR-888-5p, and miR-891a-3p markers were analyzed in samples of venous blood (n=10), menstrual blood (n=10), vaginal secretions (n=10), saliva (n=10), and semen (n=10) collected from 50 volunteers. SNORD48 was used as the reference gene. Markers were analyzed by real-time quantitative PCR based on SYBR Green. Grouping body fluids into semen and non-semen categories, discriminant analyses showed that miR-10a-3p (92.0%), miR-10a-5p (94.0%), miR-888-3p (94.0%), miR-888-5p (100.0%), and miR-891a-3p (100.0%) could accurately distinguish semen samples. Statistical analyses identified the combination of miR-888-3p, miR-888-5p, and miR-891a-3p as the most effective for semen identification. When these three markers were used together, they achieved 100.0% accuracy in distinguishing semen from other body fluids.

Keywords: Body Fluid Identification, Epigenetics, miRNA, Semen

1. GİRİŞ

Olay yerinin rekonstrüksiyonu ve olayın aydınlatılması açısından adli seroloji ve adli genetik metodları 30 yılı aşkın süredir yaygın şekilde kullanılmaktadır. Olası şüphelilerin kimliklendirilmesi amacıyla DNA analizleri kullanılmakla birlikte, olay yeri örneklerinin tanımlanması amacıyla ön tarama testlerinin kullanımı rutin pratikte daha çok görülmektedir^{1,2}. Bununla birlikte ön tarama testlerinin çapraz reaksiyon, tekrarlanabilirlik, yanlış pozitiflik gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Buna ek olarak bu testlerin uygulamaları, olay yerinde halihazırda az veya eser miktarda bulunacak olan leke gibi delillerin, DNA testleri gibi kimliklendirme açısından daha kritik olan ileri analizlerini olanaksız hale getirmektedir³⁻⁶. Bu gibi sorunların çözümü için alternatif yollar aranmış ve halen aranmaktadır. Belirlenen stratejiler arasında doku/vücut sıvılarına özgün RNA belirteçleri araştırılmıştır. Bunların dışında doku/vücut sıvılarına özgün DNA metilasyon paternleri de araştırılmış ve halen araştırılmaktadır. Özellikle yapılan ilk çalışmalarda mesajcı RNA (mRNA) belirteçlerinin kullanılması planlanmış ve oldukça iyi sonuçlar alınmıştır. Periferik kan, semen, vajinal sıvı, menstrüel kan, tükürük gibi olay yerinde sıklıkla karşılaşılan vücut sıvılarına odaklanılmış ve bu sıvılara özgün belirteçler ortaya konulmuştur^{2,3,7}. Bu mRNA belirteçlerinin postmortem interval, yaş, cinsiyet belirleme gibi analizlerde de kullanılabilmesi düşünülmektedir⁸⁻¹¹. Olay yerinden elde edilen az ve/veya eser miktardaki örneklerin hem kimliklendirme açısından DNA analizlerinin, hem de vücut sıvısının belirlenmesi açısından mRNA analizlerinin aynı anda yapılması¹², geliştirilen teknik sayesinde mümkün olmaktadır. Buna bağlı olarak delil miktar kaybı minimize edilmekte, elde edilen veri ise maksimize edilmektedir¹³. mRNA analizlerinin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi olay yeri ortamlarının değişkenliğinden kaynaklanmaktadır. Güneşten kaynaklanan ultra viyole (UV) radyasyon, nem, ışık, ısı değişimleri, yağmur gibi iklim olayları gibi etkenler mRNA degradasyonu ya da stabilitesini önemli ölçüde etkilemektedir¹⁴. Bu sorunun çözümü için mikro RNA (miRNA) olarak isimlendirilen, 18-22 nükleotid uzunluğunda ve bu küçük boyutu sebebiyle olay yerinin potansiyel değişkenlerine karşı görece daha stabil ve degradasyona dirençli epigenetik mekanizmalarda önemli rol üstlenen kodlamayan RNA grubu, yapılan araştırmalarda öne çıkmıştır¹⁵⁻¹⁹.

Bununla birlikte miRNA'ların doku/vücut özgüllüğünün ileri analizlerle incelenmesi gerekmektedir^{15,20-23}.

Bu çalışmada miR-10a-3p, miR-10a-5p, miR-888-3p, miR-888-5p ve miR-891a-3p belirteçleri kullanılmış ve önemli bir olay yeri delili olan semene özgünlük değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

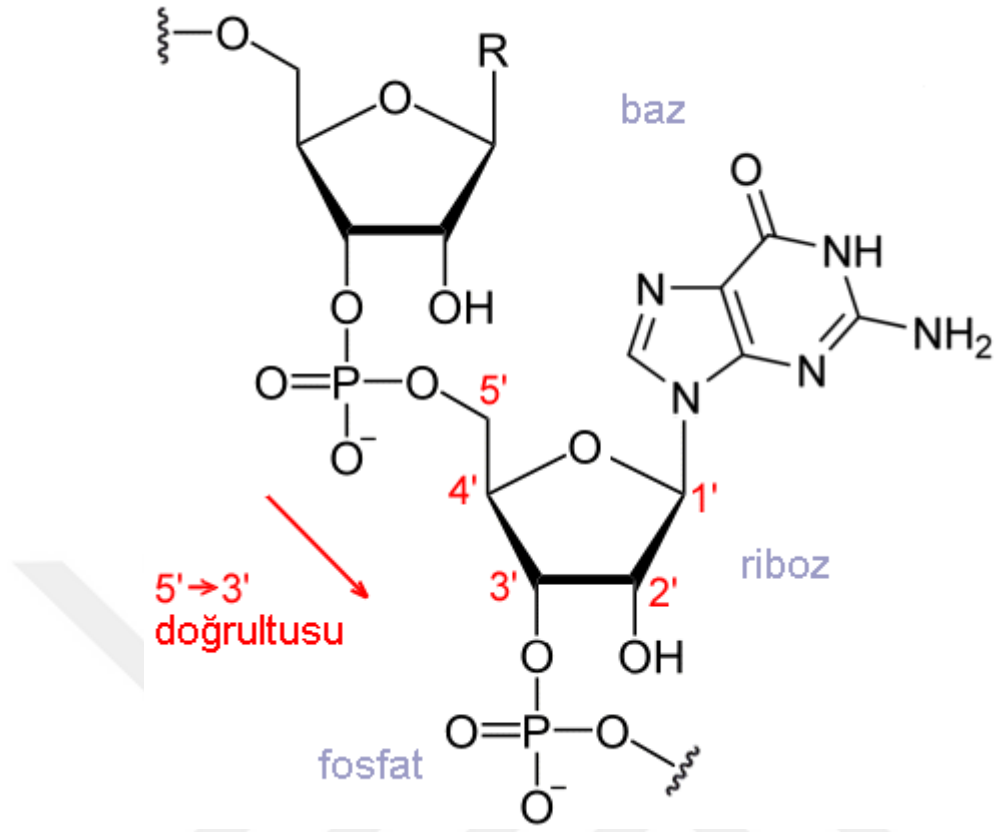
Alec Jeffreys'in 1984 yılında yaptığı devrimsel "DNA parmak izi" keşfinin üzerinden geçen 40 yıl boyunca, adli bilimlerde birçok gelişme yaşanmış/yaşanmaktadır. Özellikle Kary Mullis'in 1993 yılında geliştirdiği ve ona Nobel ödülü kazandıracak olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniğinin keşfi, adli bilimler açısından çok önemli avantajlar sağlamıştır. Adli analizlerde kullanılacak olan DNA'nın miktarını önemli ölçüde azaltması, degrade örneklerden profilleme yapmayı olanaklı hale getirmesi, zamandan ve iş gücünden tasarruf gibi avantajlar PCR tekniğini adli bilimler açısından oldukça önemli kılmaktadır²⁴⁻²⁶. Sonrasında ise Edwards ve arkadaşları tarafından tanımlanan Short Tandem Repeats (STRs)'ler adli analizlerde kullanılmıştır. 1990'ların sonuna geldiğinde STR'ler adli genetik laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılabilir hale gelmiştir²⁷. Adli bilimlerde yaşanan bu devrimsel gelişmeler yıllar içerisinde standartize edilmiştir. Çeşitli şirketler aracılığıyla ticari kitler geliştirilmiş ve bu sistemlerin daha da yaygınlaşmasını sağlamıştır. Günümüzde adli genetik laboratuvarlarında hem otozomal hem de gonozomal STR belirteç sistemleri altın standart olarak kullanılmaktadır²⁸⁻³¹. Adli genetik analizler, yeni nesil sekanslama gibi teknolojik platformların da ortaya çıkmasıyla birlikte daha da etkin hale gelmiştir³².

Hukuk sistemleri ve adli bilimler camiası DNA'ya dayalı kimliklendirme sistemini kabul etmekle birlikte, olay yerinin rekonstrüksiyonu açısından sadece DNA delillerinin yeterli olmadığı durumlar olduğunu belirtmektedirler³³. Bu camia içerisinde "X şahıs hakkında cinsel saldırı iddiası olduğunda" kanıtı dair sorular yükselmektedir. Örnek vermek gerekirse, cinsel şiddete/istismara maruz kaldığını belirten bir mağdurun iddiasının doğruluğu araştırılırken, olay yerinde bulunduğu, DNA analizi ile doğrulanan şüpheli şahıs/lar hakkında cinsel saldırı "yaşanmıştır" denilmesi mümkün değildir³⁴. Cinsel saldırıyı işaret edebilecek olan en önemli delil elbette semen ve vajinal sekresyon bulgusu olacaktır. Bununla birlikte bu ayrımı yapmakta kullanılan ön tarama testleri çeşitli dezavantajlar yaratabilmektedir. Yanlış pozitiflik, az miktardaki delilin, DNA analizlerine imkân vermeyecek şekilde kullanılması gibi sorunlar öne çıkmaktadır. Olay yerinin rekonstrüksiyonu açısından, RNA moleküllerinin analiz edilmesinin adli bilimler alanında büyük bir potansiyel taşıdığı gösterilmiştir². Özellikle postmortem intervalin

belirlenmesinde, yara yaşı tahminlerinde, biyolojik lekelerin yaş tahminlerinde, patolojik durumların varlığının araştırılmasında ve vücut sıvılarının/dokularının kimliklendirilmesinde kullanılabileceği belirtilmektedir^{2,35}. Farklı doku ve hücre tiplerinin farklı görevleri olduğu göz önüne alındığında RNA profillerinin değişkenlik göstereceği bilinmektedir. Bu amaçla çeşitli mRNA belirteçleri kullanılmış ve venöz kan, tükürük, menstrüel kan, semen ve vajinal sekresyon gibi vücut sıvılarının ayrımı yapılabilmektedir. Reverse Transkriptaz PCR tekniğinin³⁶ geliştirilmesi bu RNA analizlerinin yapılabilmesini önemli ölçüde kolaylaştırmıştır. Bununla birlikte olay yerinin, kompleks ve birden fazla fiziksel etkenin bir arada bulunduğu ortamlardan oluştuğu göz önüne alındığında, mRNA'ların degradasyona yatkın doğası çeşitli sorunlar yaratmaktadır¹⁴. Bu sorunu aşmak adına araştırmacılar küçük moleküler boyutları sayesinde degradasyona daha dirençli olan miRNA moleküllerinin kullanımını önermişlerdir^{16,17}. Bu tez kapsamında semene spesifik miRNA profilleri incelenmiştir.

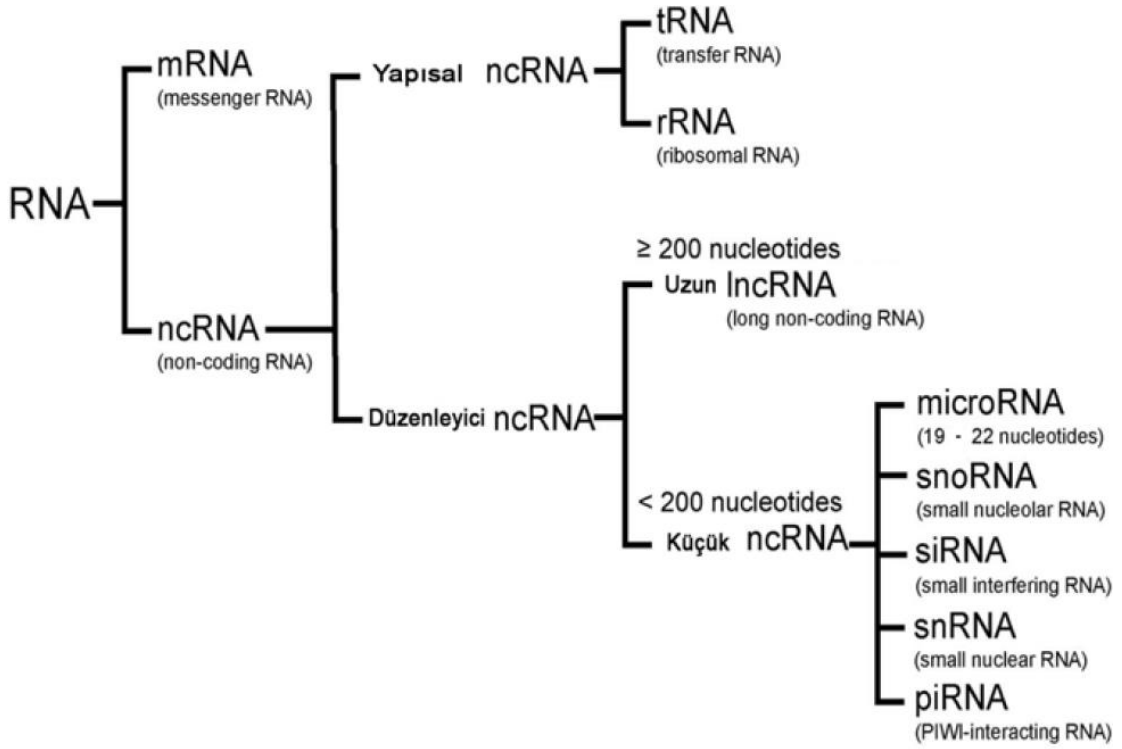
2.2. RNA'ların Genel Özellikleri

RNA (Ribonükleik Asit), temel olarak DNA'da kodlanmış olan bilginin transkripsiyonundan ve translasyonundan sorumlu, aminoasitlerin ve dolayısıyla proteinlerin düzenlenmesinde ve ekspresyonunda görev alan polimerik bir nükleik asittir. RNA incelendiğinde 5 karbonlu riboz şekerden, 1 fosfat grubundan ve Adenin, Guanin, Sitozin ve Urasil bazlarından birinden oluştuğu görülmektedir³⁷. Bu formdaki nükleotidler, fosfodiester bağlarıyla polinükleotid bir zincir oluşturmaktadır (Şekil 1). RNA'yı DNA'dan ayıran temel farklar ise, RNA'nın tek zincirli olması, Timin bazı yerine Urasil bazına sahip oluşu ve deoksiriboz şekeri yerine riboz şekere sahip olması olarak belirtilebilir.



Şekil 1.. RNA'nın moleküler yapısı

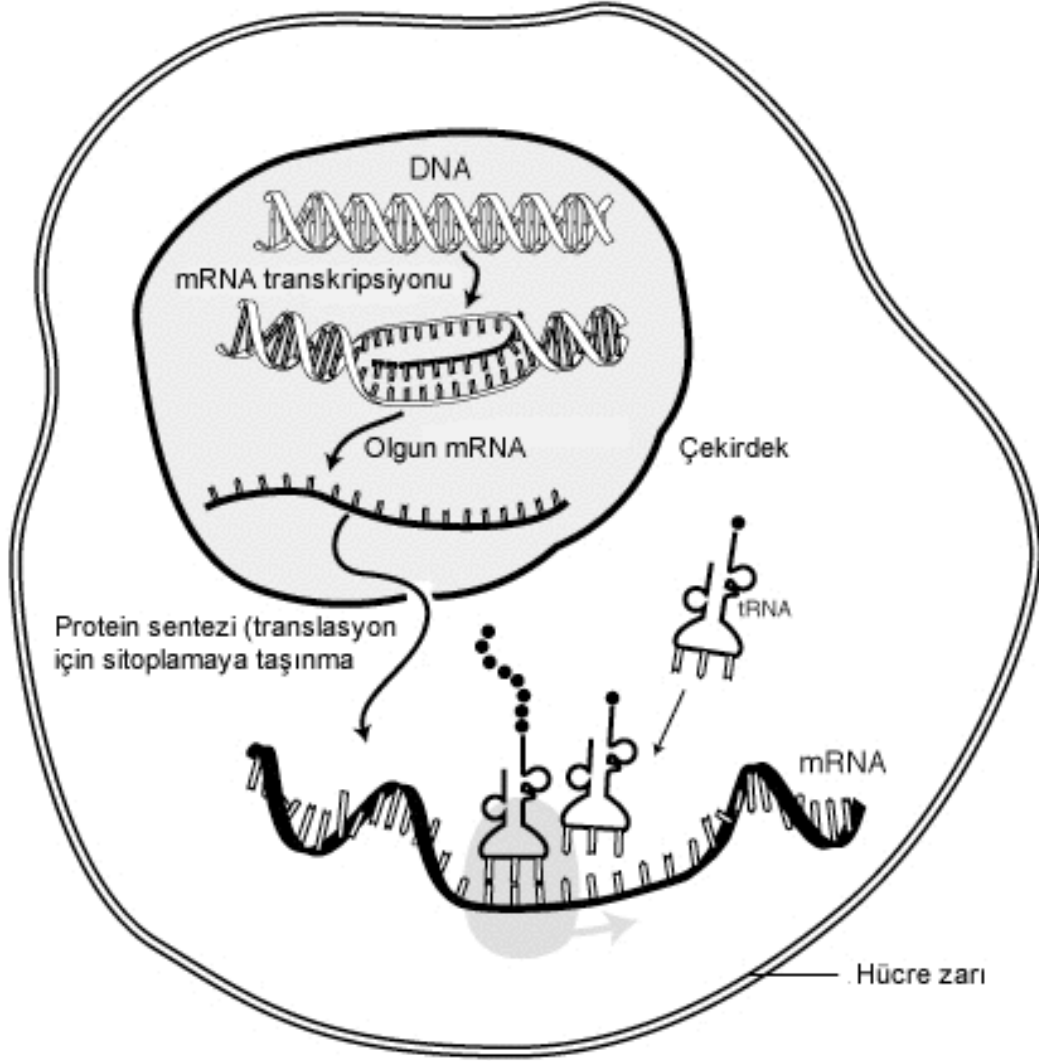
DNA'da kodlanan bilginin RNA'lar aracılığıyla işlenmesi, düzenlenmesi ve hatta susturulması işlemleri hücrel fonksiyonlar için hayati öneme sahiptir. Bu bilgi akışı farklı RNA tipleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. RNA'lar temel olarak 2 ana grupta sınıflandırılmaktadır (Şekil 2). Bunlar kodlayan ve kodlamayan gruplar olarak belirtilmektedir. Kodlayan grup mRNA'lardan oluşurken, kodlamayan grup 2 alt gruba ayrılmaktadır. Yapısal grupta taşıyıcı/transfer RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA) bulunmaktadır. Düzenleyici grup ise kısa ve uzun kodlamayan grup olarak ayrılmaktadır. Bu grup gen ekspresyonunun işleyişini düzenleyen RNA'lardan oluşmaktadır.



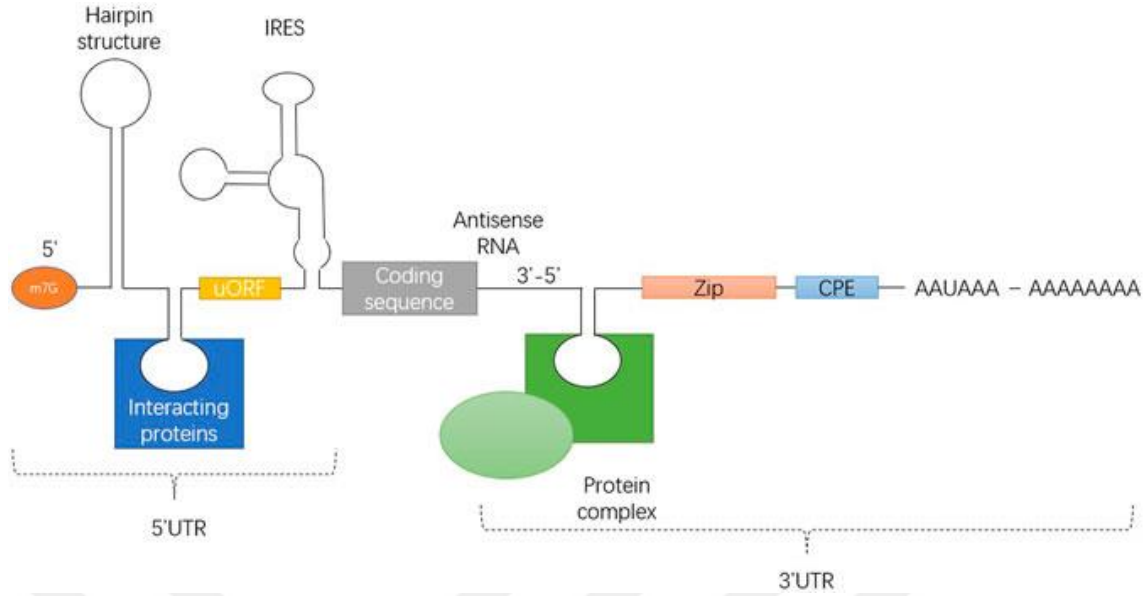
Şekil 2. RNA sınıflandırılması³⁸

2.2.1. Mesajcı RNA'lar

Çift zincirli DNA'daki genetik kod, bir takım yardımcı ve düzenleyici proteinler, enzimler ve promotör adı verilen bölgelere bağlanan baz dizileri aracılığıyla, kalıp DNA zincirine anti-sense olacak şekilde pre-mesajcı RNA'lara transkripte olur. Sonrasında "splicing" adı verilen bir süreç ile pre-mRNA dizisinden intronlar çıkarılır, "poliadenilasyon" adı verilen diğer bir modifikasyon ile Poly(A) kuyruğu eklenir, başlıklama denilen bir diğer modifikasyon ile ise 5' uç metillenir ve ortaya kodlayan matür mRNA dizisi çıkar (Şekil 3 ve Şekil 4). Ortaya çıkan bu yeni molekül çeşitli başka protein kompleksleri aracılığıyla nükleustan dışarı taşınıp amino asit sentezinde rol oynar³⁹. Ökaryotik hücrelerdeki RNA'nın yaklaşık %5 ini mRNA'lardan oluşmaktadır. Ökaryotik mRNA'lar monosistronik karakter göstermektedirler. Bir ökaryotik hücrede 10000 kadar farklı mRNA çeşidi bulunmaktadır. Hücrelerin işlevlerine göre mRNA ekspresyon profilleri değişkenlik gösterebilmektedir^{37,40-42}.



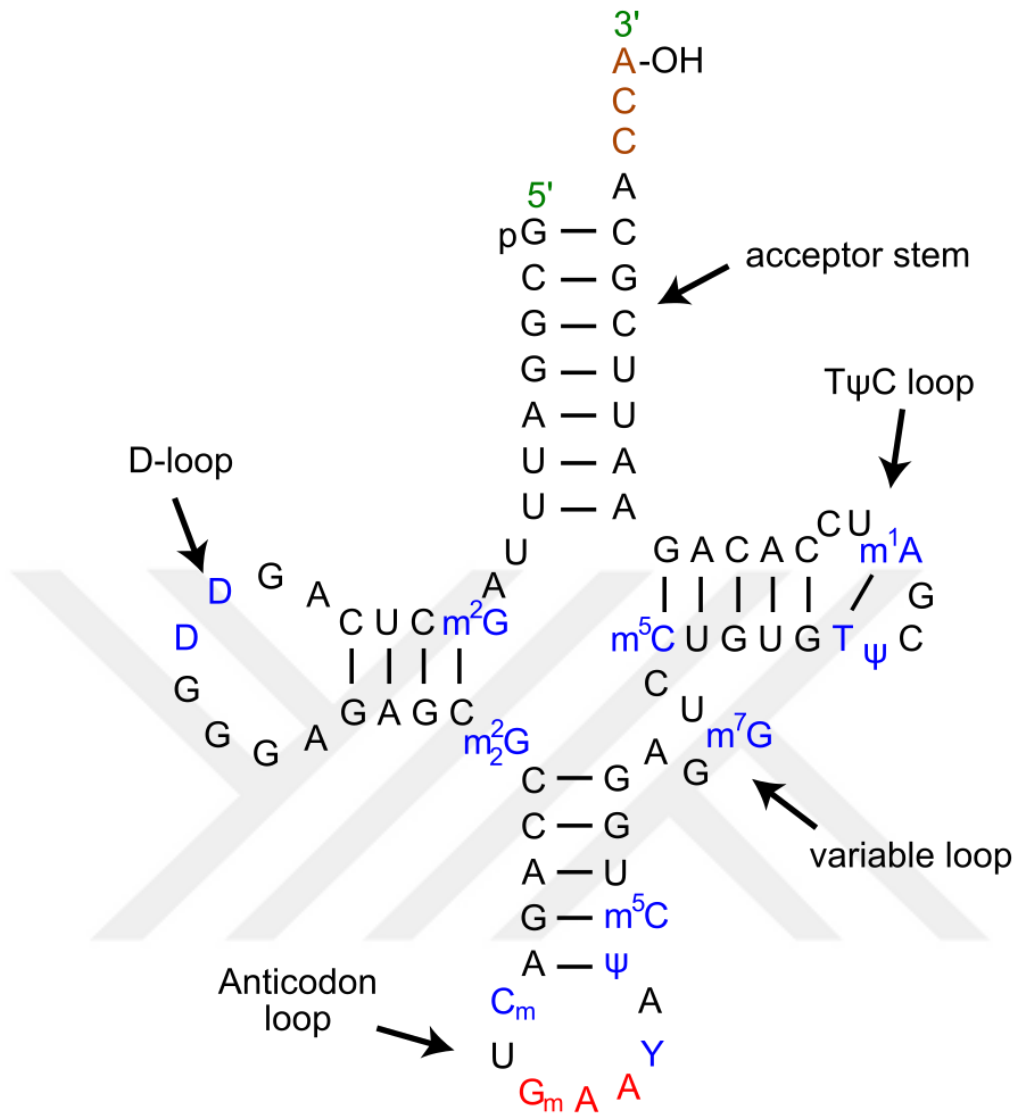
Şekil 3. mRNA biyogenezi ve fonksiyonu⁴³



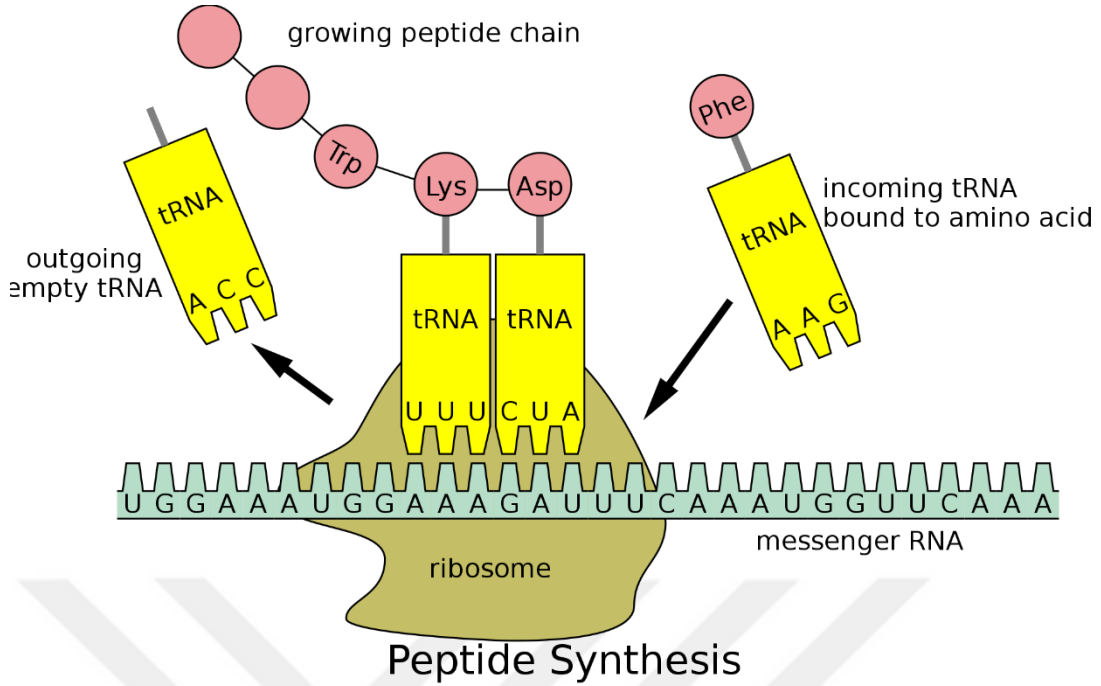
Şekil 4. mRNA'nın yapısı⁴⁴

2.2.2. Transfer RNA'lar

Kodlamayan, yapısal RNA'lar grubundadırlar. Amino asit/peptid sentezinde ribozomlarda bulunan mRNA moleküllerinin translasyonundan sorumlu olan tRNA'lar hücredeki total RNA'nın %15 kadarını oluşturmaktadırlar. tRNA'lar genellikle 75-90 baz uzunluğundan oluşan tek zincirli polinükleotid molekülleridir. Tek zincirli haldeki molekülün bazıları, kendi aralarında eşleşmeler yaparak 3 yapraklı yonca benzeri bir konfigürasyon oluşturmaktadır (Şekil 5). tRNA, sentezlendikten sonra bir dizi modifikasyonlar geçirmektedir. Bu modifikasyonlar temel olarak D-loop ve T-loop adı verilen bölgelerde görülmektedir. Adını, geçirdiği nükleotid modifikasyonundan alan D-loop bölgesi, Urasil nükleotidlerinin indirgenerek Dihidroüridin halini almasıyla ortaya çıkar. T-loop bölgesinde ise bulunan Urasil nükleotidleri metillenerek Ribotymidine (T) modifiye edilir. Bir diğer kol olan amino asit bağlanma bölgesi RNA'nın 3' ucuna karşılık gelmektedir. Amino asitler burada bulunan C-C-A dizisi ile kovalent bağ yaparlar. Bir diğer kolda ise antikodon bölgesi bulunmaktadır. Bu bölümde ilgili mRNA'ya komplementer 3 baz uzunluğundaki nükleotid dizisinden oluşan bir dizi bulunur (Şekil 6). Bunlara ek olarak değişken kol denilen bir ilmik de mevcuttur. Her bir tip tRNA spesifik bir aminoaside bağlanabilir. Bununla birlikte aminoasitler birden fazla tRNA ile bağ yapabilir^{37,41,42,45}.



Şekil 5. tRNA'nın moleküler yapısı

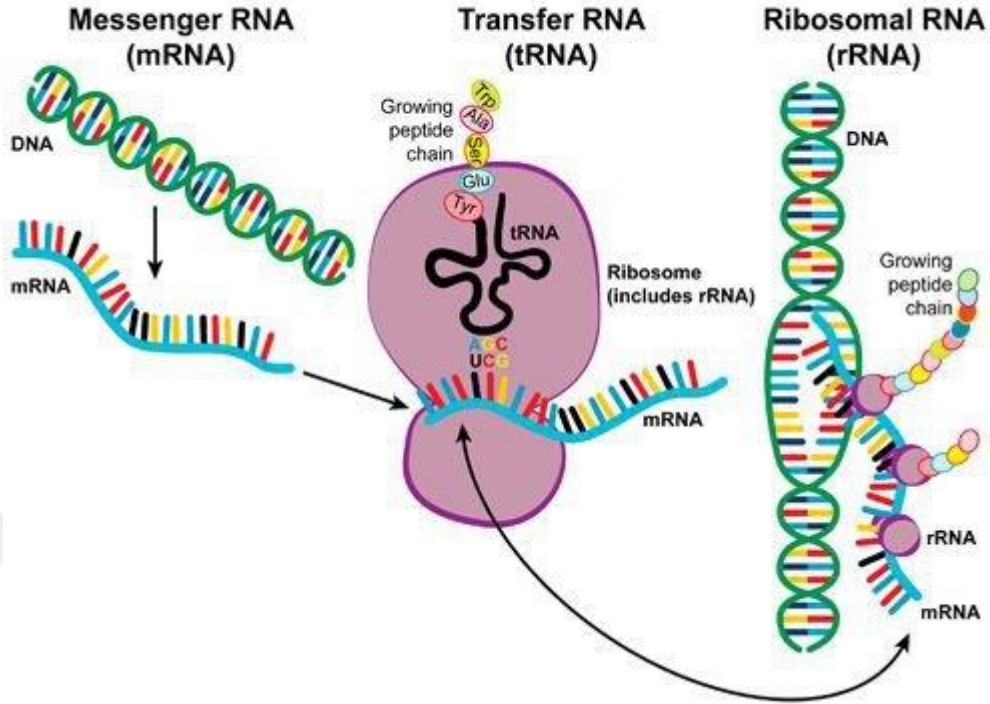


Şekil 6. tRNA fonksiyon

2.2.3. Ribozomal RNA'lar

Hücredeki protein sentezi makinesinin en önemli birleşenlerinden biri olan ribozomların %65 kadarı rRNA'lardan oluşmaktadır. Total hücre RNA'sının %85 kadarını da rRNA'lar oluşturmaktadır. Pre-rRNA sentezlenmesinin ardından sno RNP'lar adı verilen bir grup protein ve snoRNA'lardan oluşan kompleks, yeni oluşan pre-rRNA molekülünü birtakım modifikasyonlar ile olgun hale getirir. Bunlar metilasyon, psödoüridin formasyonu ve diğer bazı modifikasyonlar olarak özetlenebilir. Ortaya çıkan olgun rRNA ribozomların 2 alt ünitesini diğer başka proteinlerle birlikte oluşturmaktadır. Ökaryotik organizmalarda, 40S'lik küçük alt ünite 18S, 60S'lik büyük alt ünite ise 5S, 5.8S ve 28S'lik rRNA molekülleri bulunmaktadır. Aminoasit sentezi sırasında mRNA'lar bu iki alt ünite arasında bulunmaktadır. Küçük alt ünite mRNA'ların tutunduğu bölümdür. Büyük alt ünite ise tRNA ile koordineli şekilde amino asit polimerizasyonu gerçekleşmektedir (Şekil 7). Ribozomlardaki rRNA'lar amino asit polimerizasyonunda katalizör olarak görev yapmaktadırlar^{46,47}.

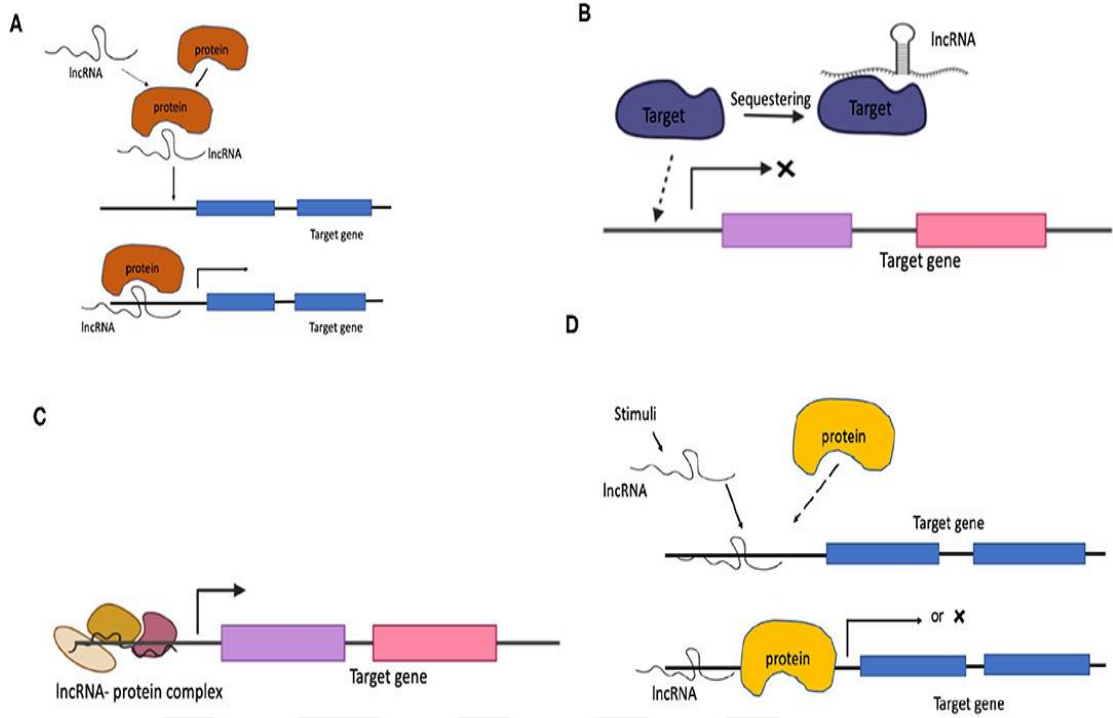
Ribonucleic acid (RNA)



Şekil 7. rRNA fonksiyon⁴⁸

2.2.4. Long Non Coding RNA'lar

Uzunluğu 200 nükleotitten daha fazla olan kodlamayan RNA çeşididir. Bulduğu yere, sekansına, yapısal özelliklerine ve fonksiyonlarına göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadırlar. Genellikle yapısal proteinlerle etkileşime girerek işlev görürler. Histon modifikasyonunda ve protein-DNA etkileşimde rol oynamaktadırlar (Şekil 8). Örneğin Xist gibi memeli dişilerinde dozaj kompanzasyonunun sağlanması için gereken X kromozom inaktivasyonunda rol oynamaktadırlar. Bunun dışında kanserlerle ilişkili olan HOXD lokusunun susturulmasında da görev aldığı bilinmektedir⁴⁹⁻⁵¹.



Şekil 8. lncRNA fonksiyon⁵²

2.2.5. Small Non-Coding RNA'lar

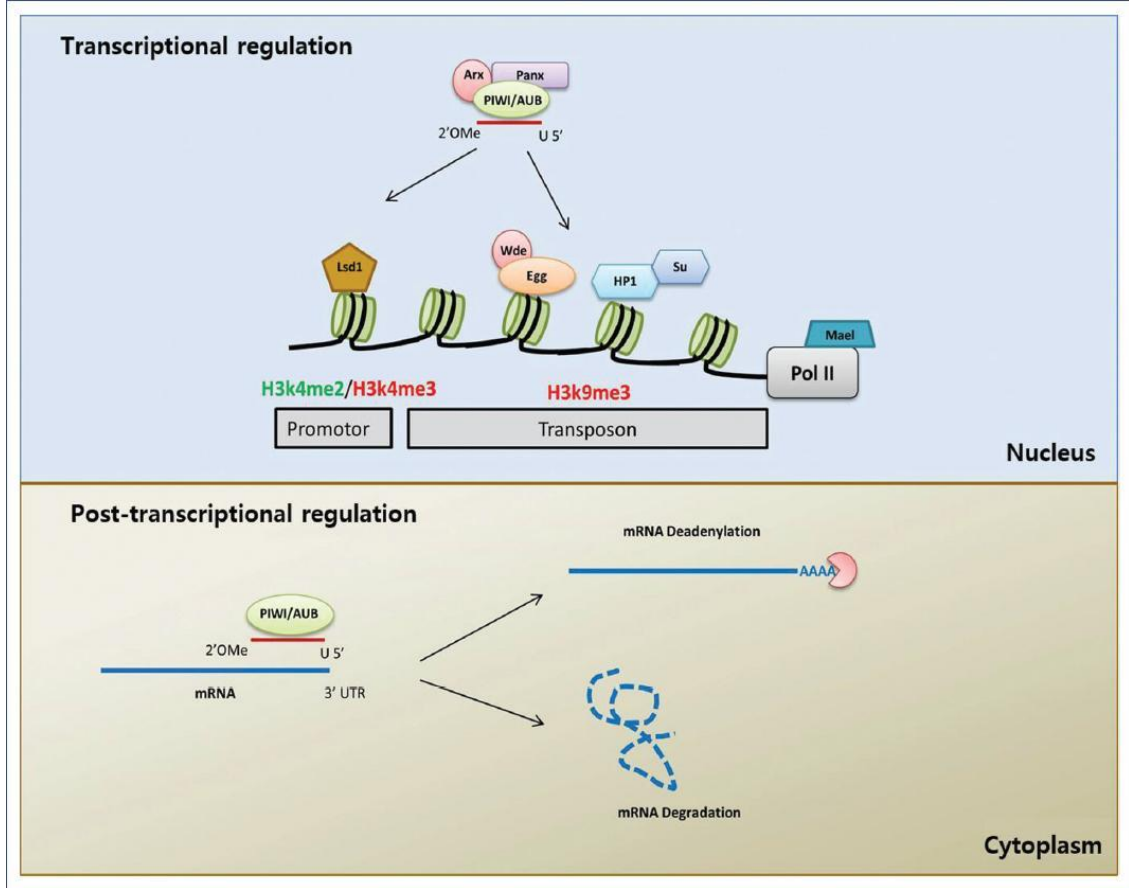
18-200 nükleotitten oluşan bir uzunluğa sahip, küçük kodlama yapmayan RNA'lardır. RNA'larla ilgili olarak 150'den fazla kimyasal modifikasyon çeşidi saptanmıştır. Bu post-transkripsiyonel modifikasyonlar RNA biyogenezinde ve RNA'nın işlev göstermesi bakımından önemli roller üstlenmektedir⁵³⁻⁵⁸. sncRNA'ların posttranskripsiyonel modifikasyonlar ve düzenleyici işlevlerine ek olarak bu RNA tiplerinin birçok fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde görev aldıkları görülmektedir. Fizyolojik işlevlerine örnek olarak nöron ve kasların gelişimde oynadıkları rol verilebilir⁵⁹. Patofizyolojik süreçlere ise tümör gelişimi ve metabolik hastalıkların gelişimindeki etkileri örnek verilebilir^{60,61}. MikroRNA'lar (miRNA'lar), PIWI ile etkileşen RNA'lar (piRNA'lar), small nucleolar RNA'lar (snoRNA), small nuclear RNA'lar (snRNA'lar) sncRNA grubunda yer almaktadırlar^{62,63} (Şekil 9).

pri-miRNA		<ul style="list-style-type: none"> • m⁶A • A to I • m⁷G • o⁶G • Uridylation • 2'-O-Me • 5'Pme2 • 8-OHG 				
pre-miRNA				snRNA		<ul style="list-style-type: none"> • 2'-O-Me • m⁶A • m⁶Am • TMG • ψ • m⁵C
miRNA						
piRNA		<ul style="list-style-type: none"> • 2'-O-Me 		snoRNA		<ul style="list-style-type: none"> • ψ • m⁶A

Şekil 9. snRNA karşılaştırması⁵⁸

2.2.5.1. Piwi Interacting RNA'lar

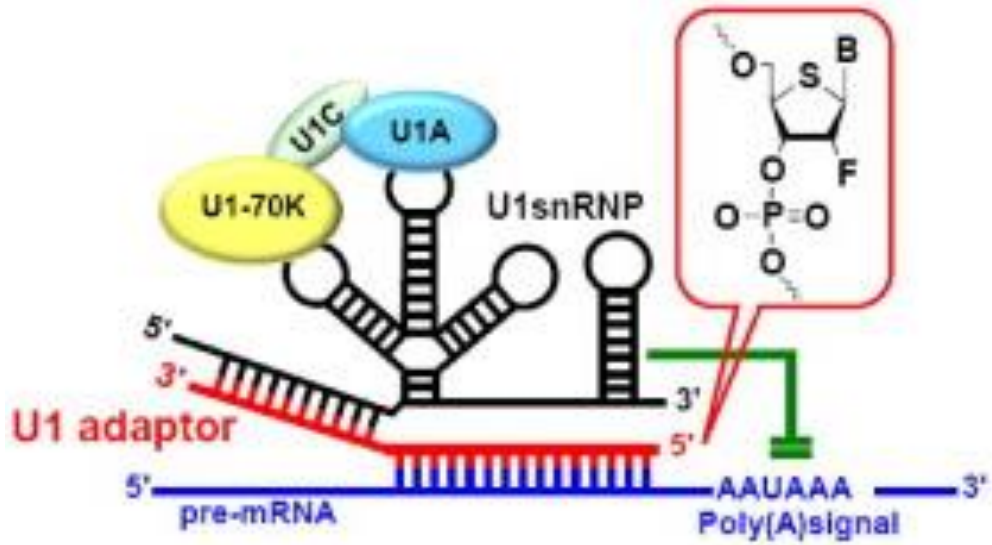
23-32 nükleotit uzunluğunda olan Piwi-interacting RNA'lar (piRNA'lar), snRNA ailesinde yer alırlar. Özellikle germline hücrelerinde bulunan piRNA'lar, retrotranspozonların ve transpozonların susturulmasında görev alarak genom stabilitesinin korunmasında kritik rol oynar⁶⁴ (Şekil 10). Ek olarak piRNA'lar, histon modifikasyonu ve DNA metilasyonunu tetikleyerek epigenetik mekanizmalarda da rol oynarlar⁶⁵. Bozulan piRNA ekspresyonunun bazı rol hastalıklarda rol oynadığı düşünülmektedir. Örneğin yapılan bazı çalışmalarda kanser hastalarında piwi proteinlerinin aşırı eksprese edildiği görülmüştür⁶⁶. piRNA'lar, primer biyogenez ve sekonder biyogenez olmak üzere iki temel yol ile üretilir. Primer biyogenezde, piRNA prekürsörleri Dicer enzimine ihtiyaç duymaksızın Argonaute protein ailesinin bir üyesi olan PIWI proteinlerine bağlanarak bir kompleks oluşturur⁶⁷. Sekonder biyogenezde ise, ilk üretilen piRNA'ların rehberliğinde yeni piRNA'lar amplifiye edilir bu süreç "ping-pong amplifikasyonu/döngüsü" olarak bilinmektedir. Bu süreç, transpozon RNA'larının parçalanmasını ve yeni piRNA'ların oluşmasının tetiklenmesi olarak özetlenebilir⁶⁸.



Şekil 10. piRNA fonksiyon⁶⁹

2.2.5.2. Small Nuclear RNA'lar

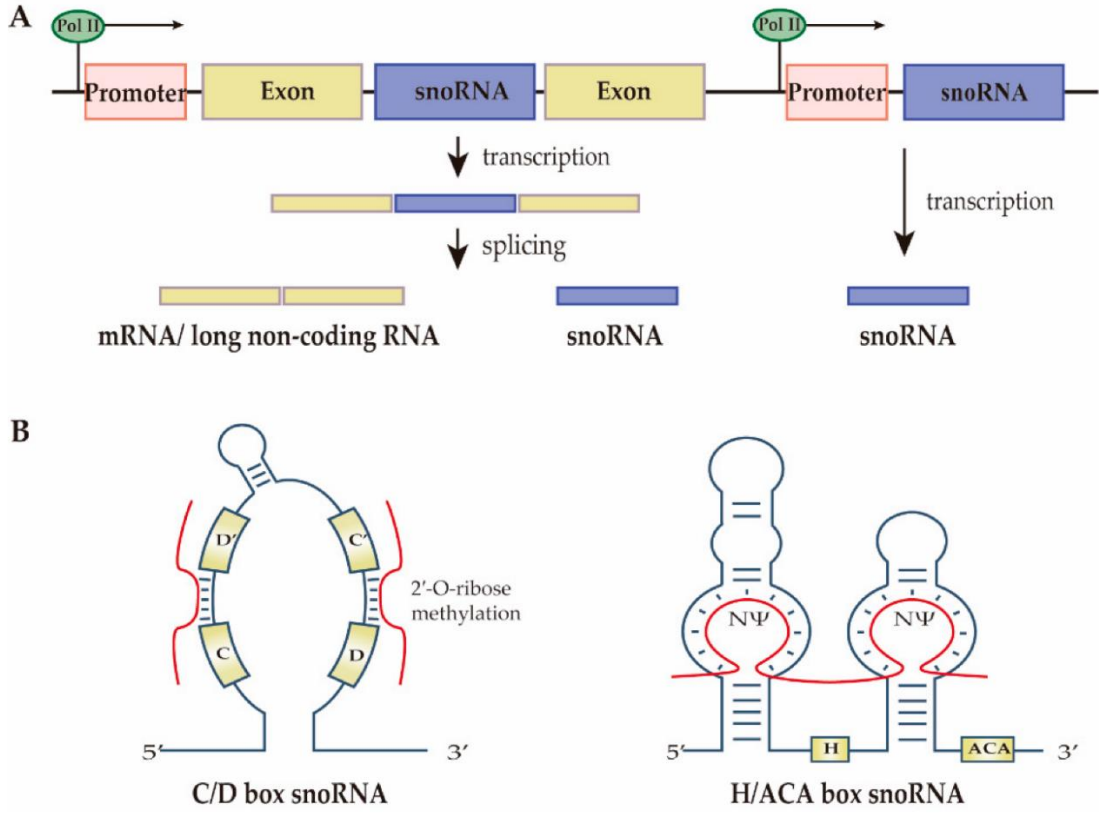
Uzunluğu yaklaşık 150 nükleotitten oluşan snRNA'lar, snRNA ailesine ait olan moleküllerdir. Nükleusta bulunurlar ve genetik bilginin işlenmesinde önemli roller oynarlar. Matür mRNA moleküllerinin oluşmasındaki aşamalardan biri olan splicing evresinde kritik bir role sahiptirler. Spliceosome kompleksinin oluşmasında önemli bir rol oynayarak pre-mRNA'daki intron sekanslarının çıkarılmasını veya bir başka deyişle ekson sekanslarının birleştirilmesini sağlarlar⁷⁰. Özellikle U1, U2, U4, U5 ve U6 bu RNA'lara örnek olarak verilebilir. Her bir snRNA çeşitli başka proteinlerle bir araya gelerek kendi small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) komplekslerini oluştururlar. Sonrasında bu snRNP'ler bir araya gelerek spliceosome aletini oluşturur⁷¹ (Şekil 11). Biyogenezleri genellikle RNA polimeraz II aracılığıyla olmaktadır⁷²⁻⁷⁴. Normal fizyolojik işlevlerin yanı sıra, kanserleşme gibi bazı patofizyolojik olaylarda da snRNA'ların bazı roller oynadığı görülmektedir. Over ekspresyon gösteren bazı snRNA'ların onkogenik özellikler taşıyabileceği gösterilmiştir⁷⁵.



Şekil 11. snRNA fonksiyon⁷⁶.

2.2.5.3. Small Nucleolar RNA'lar

Genellikle hücrenin nükleolusunda bulunan snoRNA'lar 60-300 nükleotit uzunluğundadırlar. sncRNA ailesinin önemli bir üyesidir. Ribozomların posttranskripsiyon modifikasyonu ve matür hale gelmesinde önemli bir rol üstlenmektedir. Bunun dışında snRNA'ların da posttranskripsiyonel modifikasyonunda görev alır. Bu mekanizmalar metilasyon ve psedoüridilasyon olarak özetlenebilir⁷⁷. Temel olarak 2 tip snoRNA kategorize edilmektedir. C/D Box snoRNA ve H/ACA Box snoRNA olarak isimlendirilmektedirler. C/D Box snoRNA sınıfı, rRNA'nın 2'-O-metilasyonunda görev almaktadır. C/D box snoRNA'lar, C (UGAUGA) ve D (CUGA) boxlarını içeren koruyucu dizilere sahiptir. H/ACA box snoRNA'lar ise rRNA ve snRNA'ların psödoüridilasyonunda görev almaktadır. Bu snoRNA'lar, H box (ANANNA) ve ACA box içeren yapısal motiflere sahiptir (Şekil 12). Bu modifikasyonlar rRNA'nın işlevinin ve strüktürel stabilitesinin artmasını sağlamaktadır. Bunlara ek olarak bazı durumlarda spliceosome'a katılarak gen ekspresyonunda rol oynamaktadır⁷⁸⁻⁸¹. Bunlara ek olarak snoRNA'ların kanser ve nörodejenaratif hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Örneğin aşırı ekspresyonu bazı akciğer kanserleriyle ilişkilendirilirken, az ekspresyonu prostat kanseriyle ilişkilendirilmiştir^{82,83}.



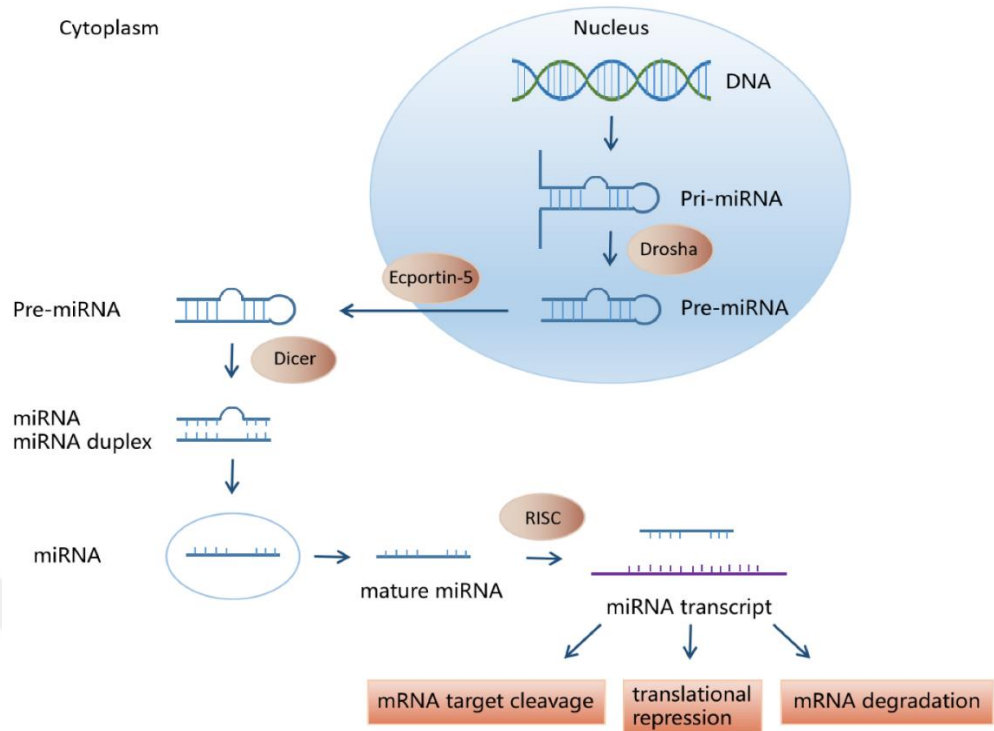
Şekil 12. snoRNA fonksiyon⁸⁴

2.2.5.4. Mikro RNA'lar

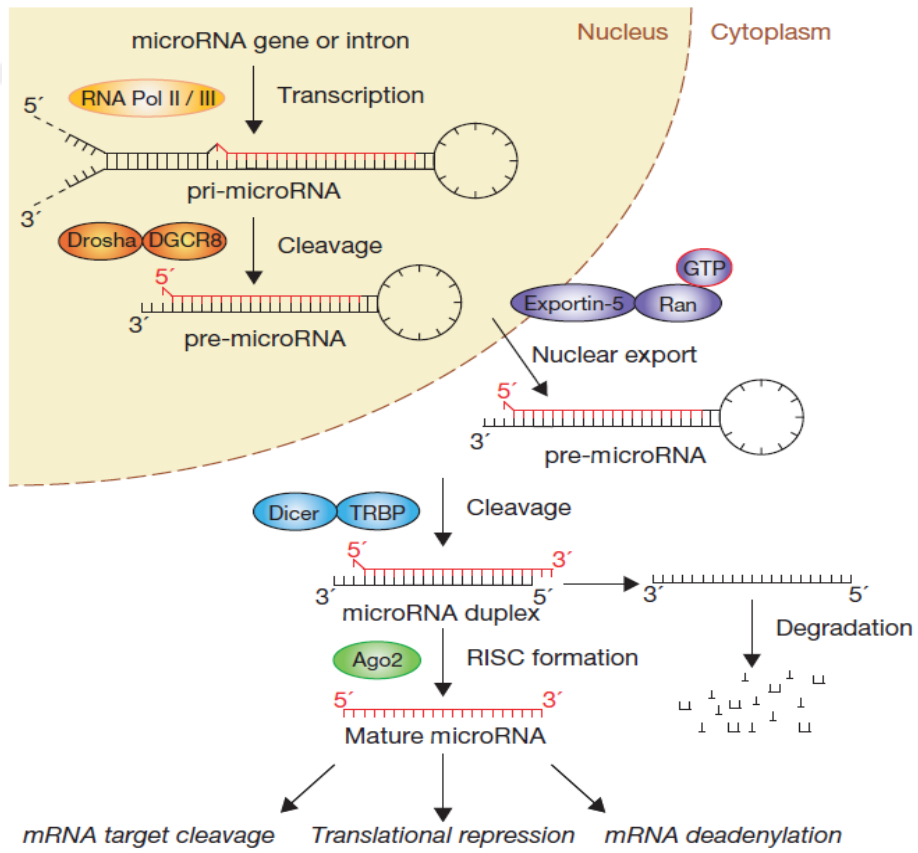
Lee ve arkadaşları 1993 yılında *Caenorhabditis elegans* üzerinde, solucanın larval gelişim sürecine dair araştırma yaparken önemli bir keşifte bulundular. Lin-4 adı verilen bu genetik materyal LIN-14 isimli bir proteini geçici olarak down regüle ederek larvanın gelişiminde önemli bir rol oynamaktaydı⁸⁵. İlerleyen yıllardaki çalışmalarda, 18-22 nükleotid uzunluğunda, sncRNA ailesine üye olan bu mikro RNA'ların epigenetik mekanizmalarda önemli roller üstlenen ve gen ekspresyonunu düzenleyen moleküller oldukları ortaya konulmuştur. Gen ekspresyonunu, çeşitli başka proteinlerle kompleksler oluşturup, mRNA'ların 3' UTR bölgelerine bağlanarak down regüle etikleri saptanmıştır⁸⁶⁻⁸⁹. Keşfedilen tüm miRNA'lar kategorize edilmiş ve bir veri tabanı oluşturulmuştur. mirBase adı verilen bu veri tabanı sürekli olarak güncellenmektedir. mirBase incelendiğinde, insanda belirlenen 1917 adet miRNA bulunmaktadır. Yeni çalışmalarla bu sayının artacağı düşünülmektedir⁹⁰.

Biyogenez

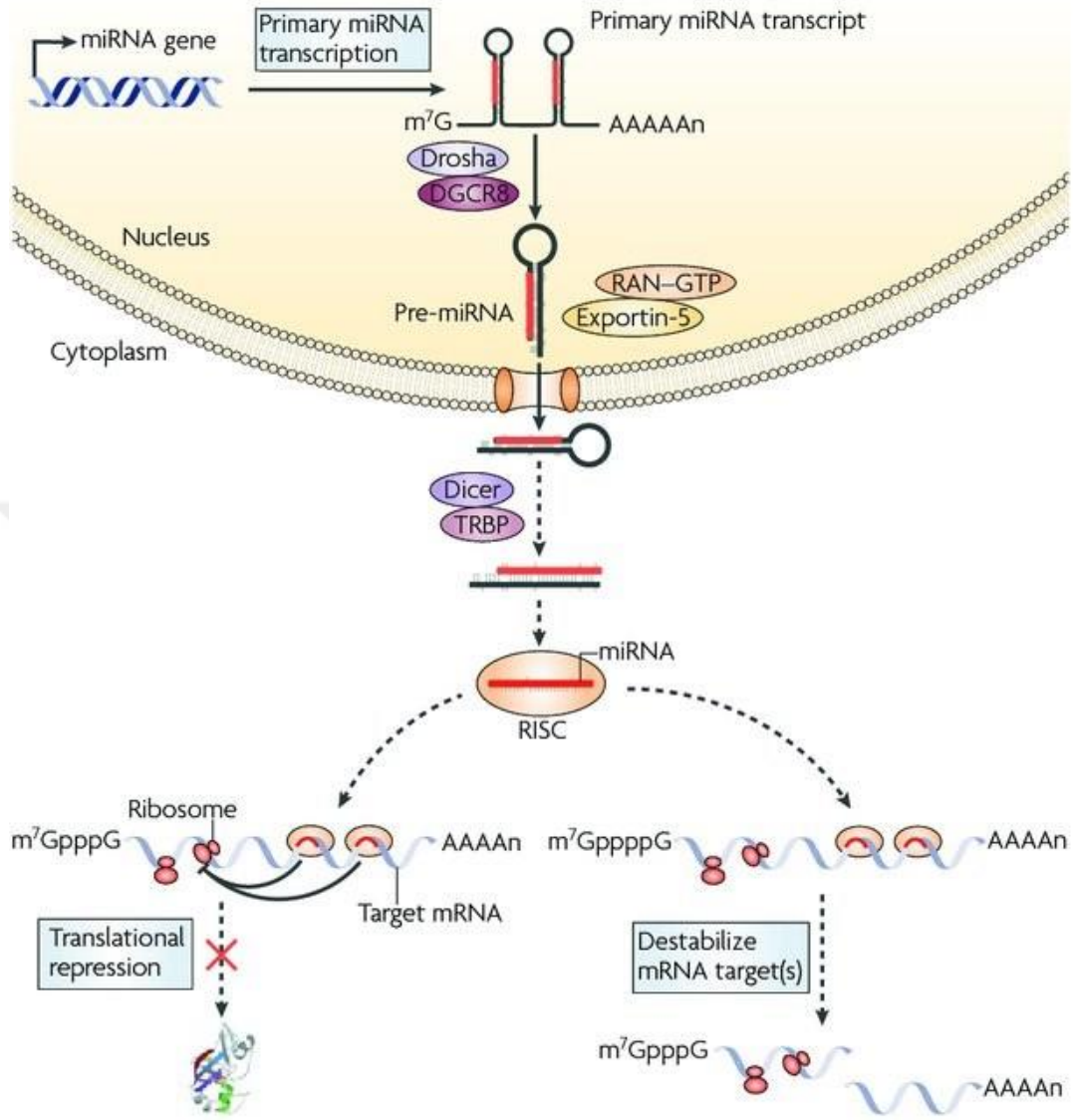
miRNA biyogenezi ise oldukça kompleks bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır. miRNA'lar, RNA polimeraz II veya RNA polimeraz III enzimleri tarafından ilgili sekanstan transkripte edilmektedirler⁹¹. Hair pin yapısındaki immatür pri-miRNA bu şekilde nükleusta sentezlenir. Bu noktadan sonra yine nükleus içerisinde bulunan DGCR8 isimli protein tarafından işaretlenir ve bir tür RNA III endonükleazı olan DROSHA enzimi uyarılır. DROSHA/DGCR8 kompleksi pri-miRNA'ya bağlanır ve belirli sekansları keserek pre-miRNA'yı oluşturur. Ortaya çıkan 70-100 nt uzunluğundaki Pre-miRNA, exportin-5/RanGTP adı verilen bir kompleks aracılığıyla nükleustan sitoplazmaya doğru taşınır. Pre-miRNA sitoplazmaya transfer olduğunda exportin-5'den ayrılarak yine bir tür RNAaz III endonükleazı olan DICER ve TRBP tarafından tanınır ve işaretlenir. TRBP, DICER'in daha stabil çalışmasını sağlar. DICER pre-miRNA'nın hair pin kısmını sekanstan keser ve iki zincirli miRNA molekülünü oluşturur. Buna matür miRNA adı verilmektedir. Daha sonrasında Arganout protein ailesinden olan Ago2, HSC70/HSP90 gibi bir dizi şaperon kompleksleri aracılığıyla DICER proteiniyle etkileşerek miRNA'ya bağlanır. İki zincirden biri Ago2 tarafından kesilir ve geriye tek zincirden oluşan "kılavuz zincir" /Ago2 kompleksi kalır. Sonrasında bu komplekse TNRC6 proteininin bağlanmasıyla miRISC makinası tamamlanmış olur (Şekil 13,14,15 ve 16). Kılavuz zincir, regüle edilecek olan mRNA molekülüne ya tamamen ya da parsiyel olarak uyumludur^{85,92-95}.



Şekil 13. miRNA biyogenez ve fonksiyon 1⁹⁶

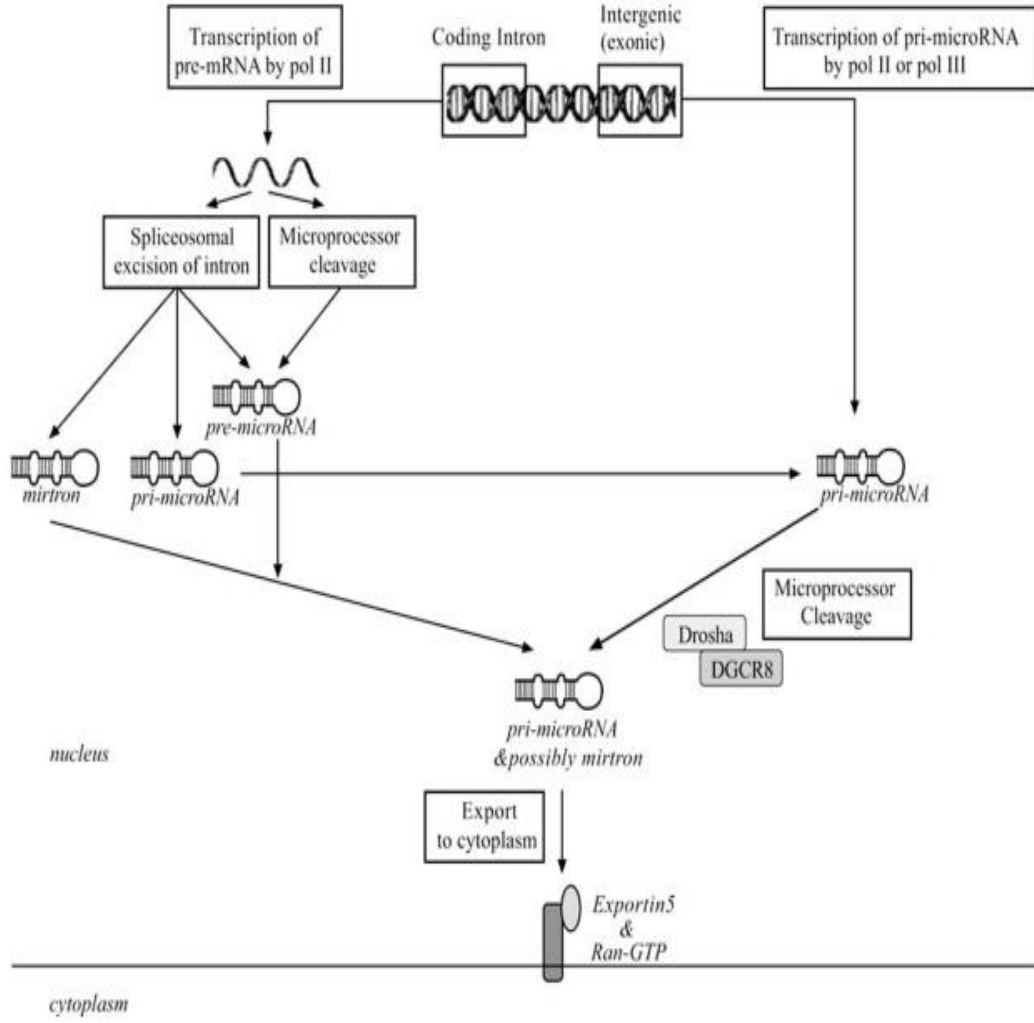


Şekil 14. miRNA biyogenez ve fonksiyon 2⁹⁷



Şekil 15. miRNA biyogenez ve fonksiyon 3⁹⁸

Yapılan bazı çalışmalar miRNA biyogenezinin alternatif başka şekillerde de olabildiğini iddia etmektedirler. Bu çalışmalarda pre-mRNA'dan intron bölgeleri splizyng ve/veya mikroprosesör ile çıkarıldığında pri-miRNA'ların, pre-miRNA'ların ve mirtronların oluştuğu gösterilmektedir. Bu senaryoda pri-miRNA'lar Drosha/DCGR8 kompleksiyle etkileşime geçerek matürasyonuna devam ederken, pre-miRNA'lar bu yolağı atlamış olurlar. Mirtronlar da debranching sonrasında pre-miRNA formunda oldukları için Drosha/DCGR8 modifikasyonununu atlamaktadırlar^{91,99-103}.



Şekil 16. miRNA biyogenez ve fonksiyon 4⁹¹

Fonksiyon

Matür mi-RNA, RISC kompleksiyle birleştikten sonra hedeflediği mRNA'ya afinite göstererek translasyonda önemli bir rol oynar. Genel olarak mi-RISC kompleksi Watson-Crick baz eşleşmesi yoluyla hedef mRNA'ya parsiyel ve/veya tam olarak komplementer karakter gösterir. Bu parsiyel ve/veya tam karakter hem mi-RNA-RISC kompleksinin fonksiyonunu hem de etkisini belirler. "Seed Sekans" adı verilen 2-11 nt uzunluğundaki miRNA sekansı hedef mRNA'yı belirlemede önemli bir rol oynar. Seed sekans mi-RNA'nın transkripsiyonu regüle ederken oynadığı rolü büyük ölçüde belirler. Buna ek olarak tek bir miRNA kılavuz zinciri birkaç farklı mRNA tiplerini hedefleyebileceği gibi birden fazla miRNA tipi, tek bir mRNA tipini de hedefleyebilmektedir¹⁰⁴.

Mi-RISC, mRNA'nın ORF denilen kısımlarına bağlanarak translasyonun inhibisyonunu nadiren de olsa sağlayabilir fakat genellikle mRNA'nın 3'UTR ucu mi-RISC tarafından hedeflenmektedir. Eğer seed sekans hedef mRNA'ya tam komplementer olarak bağlanırsa ki hayvanlarda genellikle tam uyum görülür, slicing-bağımlı yolak aktive olur¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. AGO proteinleri, RISC komplekslerine yüklenen miRNA'lar aracılığıyla hedef özgüllüğü sağlarken, TNRC6 (trinükleotid tekrar içeren gen 6 protein ailesi), AGO'nun PIWI bölgesine bağlanarak decapping ve deadenilasyon komplekslerinin oluşmasını sağlar⁹⁵. TNRC6, hedef mRNA'nın poly(A) kuyruğunun kısaltılması için poli(A)-nükleaz (PAN) ve CCR4-NOT kompleksini poly(A) kuyruğuna bağlar, bu da decapping ile 5'-3' ekzonükleolitik yıkım yoluyla mRNA'nın destabilizasyonuna yol açar¹⁰⁸. Ayrıca TNRC6 ve CCR4-NOT kompleksi, eIF4E ile etkileşime giren (eIF4G ile rekabet eden) DDX6'nın toplanmasına da katkıda bulunarak, hedef mRNA'ların yıkımını ve translasyonel baskılanmasını artırır¹⁰⁹. Seed sekans parsiyel olarak hedef mRNA'ya bağlanırsa slicing-bağımsız yolak mekanizması aktifleşir. AGO'ya bağlı kesilme mekanizması aktive olmaz. Bu yolaktaki mekanizma tam olarak keşfedilmemiş olmasına rağmen çalışmalar mRNA translasyonunun başlangıç ve/veya uzama aşamalarında miRNA'ların, translasyonun inhibisyonuna yol açtığını gösteren kanıtlar öne sürmektedirler^{110,111}. Translasyon faktörlerinin mi-RISC' bağlı çeşitli moleküler mekanizmalar aracılığıyla baskılandığı düşünülmektedir. Buna ek olarak P-cisimciklerinin de süreçte önemli bir rol oynadığını gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. P-cisimciklerinin, miRNA aracılı çeşitli mekanizmalarla mRNA baskılanması ve/veya mRNA degradasyonunun gerçekleştiği yer olduğunu göstermektedir. P-cisimcikleri, mRNA'nın decapping, deadenilasyon ve translasyonel represyonu gibi süreçler için gereken çeşitli enzimleri ve faktörleri içerir¹¹²⁻¹¹⁷. Örneğin deadenilasyon enzimleri Ccr4, Not1, Pop2, decapping enzimleri Dcp1, Dcp2 ve nükleazlar Xrn1p ve ekzosom, P-cisimcikleri içinde bulunur^{91,114,118-120}. Translasyon baskılanması için gerekli olan p54, FMRP, Gemin5 ve RAP55 gibi translasyonel kontrol enzimlerini ve faktörlerini barındırır. miRNA'nın seed sekansının parsiyel bağlanmasında bu baskılayıcı enzimlerin rol oynadığı düşünülmektedir^{118,119,121,122}.

Özetle miRNA'ların, epigenetik mekanizmalarda, embriyonik oluşumda oldukça önemli olduğu ve hücrelerin/dokuların fizyolojik mekanizmalarında büyük rol oynadığı bilinmektedir.

2.3. Adli Bilimler ve miRNA

Adli bilimler açısından bakıldığında olay yerinin rekonstrüksiyonu gerçeğin aydınlatılması için büyük önem taşımaktadır. Olayın oluş biçimini anlamak için olay yerinde bulunan kan, semen, tükürük, vajinal sıvı vb. biyolojik materyallerin tespiti ve doğrulanması gereklidir. Buna karşın olay yerleri, doğaları gereği kontrolsüz ortamlardır. Isı, nem, UV ışınları vb. etkenler olay yerinde bulunabilecek olan delil niteliği taşıyabilecek biyolojik materyalleri degrade etme eğilimindedirler. Ek olarak olay yerinde bulunan biyolojik materyallerin hangi vücut sıvısı/dokusu olduğunun da doğrulanması gereklidir. Bu etkenler adli vakaların çözülmesi ve adaletin sağlanması için yapılacak olan araştırmaları derinden etkilemektedir. Mevcutta bir takım ön tarama testleri araştırmacılara ön bilgi verse de bu testlerin çapraz reaksiyon, yanlış pozitiflik veya negatiflik gibi bazı dezavantajları olduğu bilinmektedir. Bunlara ek olarak ön tarama testlerinin, olay yerinde bulunan eser miktardaki genetik materyallerin ileri analizlerini etkileyecek bazı kimyasallar içerdikleri de bilinmektedir. Literatür incelendiğinde doku/sıvı spesifitesi gösteren çeşitli belirteçler belirlenmiştir. Spesifite ve degradasyona dayanıklı belirteçler arasında miRNA'ların kullanılması gündeme gelmektedir³⁴.

Sonuç olarak adli bilimler açısından miRNA kullanılması birçok alanda yaygınlaşmaktadır. Vücut sıvılarının ve dokularının identifikasyonunda, leke yaşının belirlenmesinde, postmortem intervalin belirlenmesinde, yara yaşının belirlenmesinde, ölüme neden olan patolojik mekanizmanın anlaşılmasında ve yaş belirlenmesinde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir.

2.3.1. Kuru Leke Yaşının Belirlenmesi ve MiRNA

Olay yerinden bulunan biyolojik lekelerin yaşı, suçun zamanlamasını belirlemede önemli bir rol oynar. Şüpheli/lerin veya mağdurun olay yeriyle olan ilişkisinin anlaşılması vakanın aydınlatılması için oldukça önemlidir. Kan, semen, tükürük, vajinal sıvı vb. biyolojik lekelerin yaşının belirlenmesi araştırmacılara önemli bilgiler vermektedir. Optik prensiplere dayanan geleneksel yöntemler tüm biyolojik lekelerin yaşını belirlemede sınırlı kalırlar. Özellikle renksiz olan tükürük, vajinal sıvı, semen, vb. biyolojik materyallerde leke yaşını ya çok sınırlı şekilde ya da hiç belirleyememektedirler. Araştırmacılar mRNA'ları ve DNA moleküllerini kullanarak bu sorunu çözmek için çeşitli çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmalardaki temel prensip bu moleküllerin zamana

bağlı bozunma hızlarını incelemek şeklinde olmuştur. Bu çalışmalar sonucunda 18S rRNA ve beta-actin mRNA moleküllerinin degradasyonlarını analiz etmiş ve iki molekülünde 150 güne kadar tespit edilebildiğini ortaya koymuşlardır. Bu moleküllerin bir diğer avantajı ise tüm hücrelerde bulunmaları ve ekspresyon seviyelerinin yüksek olmasıdır¹²³⁻¹²⁷. Bunlara ek olarak miRNA'lar da incelenmiş ve bu alanda kullanılabilirliği ortaya konmuştur. Fang ve ark.'nın yaptığı bir çalışmaya göre, kan lekelerinin yaşını belirlemek için bazı miRNA'ların zamana bağlı olarak değişkenlik gösteren ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Bu çalışmada miR-16 ve miR-451a'nın kan lekelerinin yaşının belirlenmesinde yüksek doğrulukta sonuçlar verdiği belirlenmiştir. miR-451a'nın eritrositlerde bol miktarda bulunması ve zamana bağlı degradasyonunun stabilite göstermesi nedeniyle kan lekelerinin yaşının belirlenmesinde potansiyel bir belirteç olarak öne çıkmaktadır¹²⁸.

2.3.2. Postmortem İnterval ve MiRNA

Postmortem interval (PMI) tayini, bir kişinin ölüm anı ile cesedin keşfi arasındaki süreyi belirlemek için yapılan önemli bir analizdir. Geleneksel yöntemler, vücut sıcaklığı, rigor mortis (ölüm sertliği), livor mortis (ölüm lekesi) ve vücut bozulma hızı gibi fiziksel özelliklere dayanır. PMI tayini, ölüm sonrası süreçte hücrelerde meydana gelen biyokimyasal ve moleküler değişikliklere dayanır. Geleneksel PMI tahmin yöntemleri, genellikle cesedin görünümü ve çevresel koşullara dayanır ve dolayısıyla yüksek oranda değişkenlik gösterebilir¹²⁹. Çevre koşullarının (ısı,nem, vb.) etkisi göz önüne alındığında bazı durumlarda gerçek ölüm anı için söylenilebilecek zaman aralığı önemli ölçüde genişleyebilir. Örneğin yüksek ısılarda pütrifikasyon daha hızlı olacağı için PMI belirlemek oldukça zorlaşır. Bu durum şüpheli/lerin olayla ilişkili olup olmadığının belirlenmesinde bazı sorunlara sebep olabilir. Bu zorluğun üstesinden gelmek adına araştırmacılar, ölüm sonrasında RNA moleküllerinin zamana bağlı degradasyonlarını belirlemeye yönelik çalışmalar ortaya koydular. Ye-hui ve ark. fare dalağından aldıkları örneklerde miR-125b, miR-143 ve 18S rRNA belirteçlerini analiz ettiklerinde miRNA belirteçlerinin anlamlı sonuçlar vermediğini ortaya koydular¹³⁰. Odriozola ve ark.'nın yaptığı bir başka çalışmada ise vitroz sıvıda çeşitli miRNA belirteçleri çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda miR-142-5p ve miR-541 belirteçlerinin gece ve gündüz farklı ekspresyon paternleri gösterdiklerini belirlemişlerdir. Bu durumun altındaki mekanizma

tam olarak bilinmemekle birlikte sirkardiyen ritim veya ışık maruziyetiyle alakalı olduğu düşünülmektedir¹³¹. Yine benzer bir çalışmada Corradini ve ark. gece ve gündüz ölen cesetlerden topladıkları vitröz sıvı ve periferik kan örneklerinde analizler yapmışlardır. 24 saat boyunca miRNA ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişiklik göremediklerini bildirmişlerdir. Gece ve gündüz ölümleri açısından farklı sonuçlara ulaştıklarını öne sürmüşlerdir. Bu sonuçlara göre vitröz sıvıda gece ve gündüz ölenler arasında miR-106b ve miR-96 anlamlı fark gösterdiğini belirtmişlerdir. Dahası gece ve gündüz farkı periferik kan analizlerinde de ortaya çıkmıştır. miR-142-5p ve miR-219'un anlamlı fark gösterdiğini ortaya koymuşlardır¹³². Singh ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada ise trafik kazasında ölen kişilerin kalp sol ventrikül dokuları incelenmiş ve miR-195, miR-206, miR-378'nin miktarlarında anlamlı ölçüde düşüş gözlemlediklerini bildirmişlerdir¹³³. miRNA'nın PMI açısından değerlendirilmesi için henüz yeterli çalışma yapılmadığı ve yeterli veri elde edilmediği görülmektedir.

2.3.3. Ölüme Neden Olan Patolojik Mekanizmanın Anlaşılması, Ölüm Sürecinin Belirlenmesi ve MiRNA

Ölüme sebep olan mekanizmalar genellikle gözle görülür değişimler meydana getirmezler. Bu değişiklikler genellikle fonksiyonel olup, gözle görünür şekilde gözlemlenecek kadar etki bırakacak kadar uzun sürmezler. Bu sorunun üstesinden gelmek için ölüme sebebiyet veren mekanizmanın aydınlatılmasını sağlamak moleküler mekanizmalar araştırılmış ve RNA'ların kullanılabileceği fikri ortaya atılmıştır. Hücre içindeki RNA ekspresyon paternleri incelenmiş ve miRNA'ların da belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Yu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada suda boğulmalar incelenmiştir. Yapılan çalışmada hem tuzlu su hem de tatlı suda boğulan fareler kullanılmış ve tatlı suda boğulmuş olan farelerin serebrumları incelenmiştir. miR-706'ın tatlı suda boğulmalarda up regüle olduğu ve tuzlu suda boğulmalarda down-regüle olduğu ortaya konmuştur. Araştırmacılar bu durumu açıklarken, suda boğulma vakalarında aquaporin sentezinde artış olabileceği fikriyle yola çıkmış ve iyon transport kanalıyla ilişkili proteinleri regüle eden miR-706 seçtiklerini belirtmişlerdir¹³⁴. Bir başka çalışmada ise sıçan hipokampusunda travmatik beyin hasarından sonra miRNA ekspresyonundaki değişiklikler araştırılmıştır. Araştırmacılar bu çalışmanın sonucunda miR-142-3p ve miR-221'in ekspresyon paterninin artış gösterdiğini ve bu belirteçlerin

travmatik beyin hasarlarının değerlendirilmesinde uygun belirteçler olduğunu belirtmektedirler¹³⁵. Yapılan bir başka araştırmada ise ani bebek ölümü sendromu vakalarında miRNA'lar incelenmiş, kalbe spesifik miR-1 ve beyine spesifik let-7b'nin up-regüle olduğunu ortaya koymuşlardır¹³⁶.

2.3.4. Vücut Sıvılarının İdentifikasyonu ve MiRNA

Olay yerinin rekonstrüksiyonunda vücut sıvılarının belirlenmesi önemli bir yer tutmaktadır. Bu sayede olayın oluş biçimi, varsa şüpheli/ler veya mağdurların ifadelerini doğrulamak ve/veya yanlışlamak için olay yerinde bulunan vücut sıvılarının doğru şekilde tespiti gereklidir. Bunun için yapılan ön tarama testlerinin sınırlılıklarından ve dezavantajları daha önce bahsedilmiştir. Yapılan çalışma ve analizlerde RNA moleküllerinin kullanımı önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle Mesajcı RNA'lar (mRNA) adli bilimlerde sıklıkla incelenmektedir. Doku spesifik oluşu vücut sıvısı/dokusu identifikasyonunda mRNA'ları önemli bir belirteç haline getirmektedir. mRNA'ların doku/vücut sıvısı spesifik ekspresyon profilleri sebebiyle sahip oldukları potansiyel avantaj yerini, olay yeri örneklerinde degradasyona olan yatkınlıkları sebebiyle bir dezavantaja bırakmaktadır. Bu sorunun aşılması için yapılan çalışmalarda miRNA'lar öne çıkmaktadır. Literatür incelendiğinde mikro RNA (miRNA)'ların stabilitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu dirençli yapıları kısa (18-22 nt) sekanslı yapıda olmalarından ileri gelmektedir.

miRNA'ların epigenetik mekanizmalardaki rolü göz önünde bulundurulduğunda, fonksiyonlarının doğası gereği down regüle edecekleri genler ve/veya mRNA'lar doku tiplerine göre farklılık gösterecektir. Semen, kan, tükürük, vajinal sekresyona bağlı sıvılar, vb. gibi vücut sıvı örnekleri farklı fizyolojik işlevler üstlenmektedir. Bu farklılıklar miRNA profillerine de yansımaktadır. Bu özellikleri miRNA'ların vücut sıvısı/doku spesifitesi ve olay yeri örneklerinin identifikasyonu için büyük bir potansiyel taşıdıklarını göstermektedir^{18,34,87-89,104,137-141}. Bunlara ek olarak olay yerinde genellikle az miktarda bulunan genetik materyallerin verimli kullanılması da sağlanabilmektedir. Simultane olarak hem şüphelilerin belirlenmesi ve doğrulanması/yanlışlanması için gerekli olan DNA'nın eldesi hem de vücut sıvılarının/dokularının belirlenmesi için gerekli olan RNA'nın eldesi güncel teknolojiyle mümkün olmakta ve büyük bir avantaj sağlamaktadır. Aşağıdaki tablolarda vücut sıvısı ve doku tipleri için potansiyel olarak kullanılacak miRNA'lar gösterilmektedir (Tablo 1 ve 2).

Tablo 1. Vücut sıvılarının identifikasyonu için test edilen miRNA belirteçlerinden bazıları.

Vücut sıvısı	miRNA	Kaynaklar
Kan	miR-451, miR-16	142
	miR-20a,miR-106a miR-185	143
	miR486	143
		144
Semen	miR-135b, miR-10b	142
	miR-943, miR-374	145
	miR-135a,miR-10a miR-507,	146
	miR-891a	143
	miR-888	144
	miR-1246	147
Tükrük	miR-658; miR-205	142
	miR-583 miR-518	143
	miR-208b	143
	miR138-2	144
	miR142-3p,	148
	miR-205	148
Vajinal sekresyon	miR-124a miR-372	142
	miR-617, miR-891a	143
Menstrüel kan	miR-451a	142
	miR-412, miR205	148
	miR-141-3p	148
	miR-185, miR-144	145
	miR-214	144
	miR-203, miR-214	149

Tablo 2. Doku identifikasyonu için test edilen miRNA belirteçlerinden bazıları

Doku/organ	miRNA	Kaynaklar
Cilt (Deri)	miR-152,miR-143,	150
	miR-126, miR-21,	150
	miR-27a, miR-214,	150
	miR-16, miR-203,	150
	miR -125b,miR-34a	150
	miR-27b, miR-30b	150
	miR-205-5p	151
Yağ dokusu	miR-103, miR-24	152
	miR-17-5,miR106a	153
	miR-132,miR-134,	154
	miR-181a,miR-27a, miR-30e, miR-	154
	140, miR-147, miR-155, miR-	154
	197, miR-210	154
		154
Beyin	miR-9,	155
	miR-124,125a,125b	155
	miR101, -127, -128	155
	miR131, miR-132	155
Kalp	MiR-124,let-7b	156
	miR-208	157
Hipofiz bezi	miR-1, miR-133	156
	miR-7a-5p	158
Karaciğer	miR-122-5p	155
Testis	miR-202-5p/3p	159
	miR-34c-5p,	160
	miR-509-3-5p,	151
	miR-508-3p	160
	miR-15b-5p	160
	miR-184	160
	miR-106b-5p	160
Epididim	hsa-miR-143,hsa-let-7	161
	miR-891a,	148
	miR-891b,	148
	miR-10b	148
	miR-142-3p	148
	miR-149-5p,	160
	miR-148a-3p,	160
	miR-28-3p,	160
	miR-196b-5p, miR-151-3p	160
		160
Retina	miR-182, miR-183	162
	miR-96	162

Bizim çalışmamızda kullanılan belirteçler miR-10a-3p, miR-10a-5p, miR-888-3p, miR-888-5p ve miR-891a-3p olmasına rağmen bu bölümde semen spesifik miRNA ekspresyon profili gösteren diğer belirteçlerden de bahsedilecektir. Semen için öne çıkan spesifik ekspresyon profili gösteren miRNA'lar ise miR-10a, miR-10b, miR-135a, miR-135b, miR-507, miR-888, miR-891a ve miR-943 olarak belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda vücut sıvılarında yaygın ve stabil olarak bulunan referans gen belirteçleri olarak RNU44, RNU48, U6 ve U6b öne çıkmaktadır^{15,20,139,163}.

miR-10a ve miR-10b:

17. kromozom üzerinde bulunan MIR10A ve MIR10B genleri tarafından kodlanmaktadır. miR-10 RNA ailesinin pek çok canlıda HOX gen transkriptlerini hedef aldığı bilinmektedir. Bu özellikleriyle gelişimsel süreçte düzenleyici rol aldıkları düşünülmektedir. Bunun dışında miR-10 ailesinin bazı kanser türleriyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Örneğin miR-10b'nin, HOXD10'u repress ederek meme kanseri metastazında rol oynadığı öne sürülmektedir^{164,165}. Ek olarak miR-10a'nın HOXA1 ve HOXA3 genlerini down regüle ettiği gösterilmiştir^{166,167}. Dahası miR-10a, USF2'yi repress ederken¹⁶⁸, miR-10b ise Syndecan-1 proteinini hedef alır^{169,170}. Adli bilimler açısından bu belirteçlerin ilk değerlendirilmesi Hanson ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. miR-10b, 452 miRNA'yı inceledikleri çalışmada semen için spesifik ekspresyon gösteren potansiyel bir belirteç olarak öne çıkmıştır²⁰. miR-10a'nın ise adli bilimler açısından önemi 718 miRNA'nın incelendiği bir çalışmada yine semen spesifik ekspresyon profili göstermesiyle belirlenmiştir¹⁵.

miR-135a ve miR-135b:

İki üyeden oluşan miR-135 ailesinin fizyolojik işlevlerdeki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. Onkogenik aktivite göstererek kolorektal kanser patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir¹⁷¹. Buna ek olarak küçük hücreli dışı akciğer kanseri tedavisinde kullanılan paclitaxel'e karşı direnç gelişiminde miR-135a'nın etkili olduğu gösterilmiştir¹⁷². Bu etkilerini APC genini süprese ederek yaptığı belirlenmiştir^{171,172}. Bunların dışında miR-135 ailesinin GSK3 β ekspresyonunu regüle ederek podosit yaralanmalarında rol oynadığı ve podosit hücre iskelet hasarına yol açtığı bilinmektedir¹⁷³. Adli bilimler açısından ilk olarak incelenmesi Hanson ve ark. tarafından yapılmıştır.

452 miRNA'yı inceledikleri çalışmada miR-135b semen için spesifik ekspresyon gösteren potansiyel 2 belirteçlerden biri olarak belirlenmiştir²⁰. Zubakov ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise 718 miRNA incelendiğinde miR-135a, semen spesifik ekspresyon profili gösteren 5 miRNA'dan biri olarak kendini göstermektedir¹⁵.

miR-507:

X kromozomu üzerinde bulunan MIR507 geni tarafından sentezlenen bir miRNA'dır. miR-507'nin fizyolojik işlevleri tam aydınlatılmamış olmakla birlikte, literatür incelendiğinde çeşitli çalışmalarda etkinliğinin incelendiği görülmektedir. Jia ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, miR-507'nin, Flt-1 ekspresyonunu modüle ederek meme kanserinde bir rol oynayabileceği gösterilmiştir¹⁷⁴. Buna ek olarak başka bir çalışmada malign melanomada miR-507'nin erken progresyon döneminde up regüle olup, metastatik kolonizasyon döneminde down regüle olduğu gösterilmiştir¹⁷⁵. Adli bilimler açısından incelendiği ilk çalışma ise yine Zubakov ve ark. tarafından yapılan geniş miRNA setlerinin incelendiği çalışmadır. Semen spesifik ekspresyon gösteren miRNA belirteçlerinden biri olarak miR-507 de belirtilmiştir¹⁵.

miR-888:

X kromozomu üzerinde bulunan MIR888 geni tarafından sentezlenen bir miRNA'dır. Landgraf ve arkadaşlarının yaptığı geniş kapsamlı memeli miRNA atlası çalışmasında epididimise spesifik bir miRNA olduğu belirtilmiştir¹⁷⁶. Lewis ve ark. tarafından yapılan bir çalışmaya göre miR-888'in, prostat kanserinde tümör supresör olarak rol oynayan RBL1 ve SMAD4 gen transkriptlerini suprese ettiği ve kanser progresyonunu kolaylaştırdığı belirtilmiştir¹⁷⁷. Dahası Hovey ve arkadaşlarının bildirdiği üzere miR-888, güçlü bir endometrial tümör supresörü olan progesteron reseptörünü doğrudan hedef almaktadır. Buna ek olarak endometrial karsinosarkomlarda miR-888 ekspresyon seviyesinin çok yüksek olarak görüldüğünü belirtmektedirler¹⁷⁸. Bir başka çalışmada ise kolorektal kanserlerde miR-888'in yüksek ekspresyonunun sağ kalımı azalttığı gösterilmiştir. Çalışmanın detayları incelendiğinde miR-888'in, iyi bilinen bir tümör supresör olan Smad4'ü hedef aldığı ifade edilmektedir¹⁷⁹. Adli bilimler bağlamında incelediğimizde semen identifikasyonu için kullanım potansiyeli ilk kez Wang ve ark. tarafından önerilmiştir. 754 miRNA belirteçlerini taradıkları bu çalışmada miR-888'i semen

identifikasyonunda kullanılabilecek potansiyele sahip yeni bir belirteç olarak ortaya koymuşlardır¹⁶³.

miR-891a:

X kromozomu üzerinde bulunan MIR891A geni tarafından sentezlenmektedir. Landgraf ve arkadaşlarının yaptığı geniş kapsamlı memeli miRNA atlası çalışmasında epididimise özgü gibi görünmektedir¹⁷⁶. miR-891a'nın fizyolojik etkileri büyük ölçüde bilinmemektedir¹⁸⁰. Literatürde kısıtlı bilgi olmakla birlikte, yapılan bir çalışmada hepatoselüler karsinoma hücre kültürlerine miRNA transfeksiyonları gerçekleştirildiğinde en hızlı migrasyon sağlayan miRNA'nın miR-891a olduğu belirlenmiştir¹⁸¹. Bir başka çalışmada ise meme kanserinde miR-891a-5p nin düşük seviye ekspresyonunun kötü prognozu işaret edebileceği ifade edilmiştir. Ek olarak ADAM10 ekspresyonunu engelleyerek meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu engellediği saptanmıştır¹⁸². Yine bir başka çalışmada ise pediatrik merkezi sinir sistemi neoplazilerinde miR-891a'nın tümör supresör özellikte olduğu belirtilmiştir¹⁸³. Epididimisin farklı segmentlerinde miRNA ekspresyonlarını inceleyen başka bir çalışmada ise miR-891a'nın corpus ve cauda bölgelerinde, caput'a kıyasla daha yüksek seviyede eksprese olduğu gösterilmiştir¹⁸⁴. Adli bilimlerde, miR-891a'nın potansiyel semen belirteci olarak ilk öne sürüldüğü çalışma yukarıda da belirtildiği üzere Zubakov ve ark.larının çalışmasıdır¹⁵. Sonrasında Wang ve ark. tarafından yapılan çalışmada miR-891a'nın çalışılan diğer bütün sıvılar incelendiğinde sadece semende görüldüğü ve ekspresyon seviyesinin oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir¹⁶³.

miR-943:

4. kromozom üzerinde bulunan MIR943 geni tarafından sentezlenmektedir. miR-943 ile ilgili literatürde oldukça kısıtlı veri olmakla birlikte, hepatoselüler karsinomda rol oynayabileceğine dair bazı bulgular vardır¹⁸⁵. Bununla birlikte servikal kanserlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir¹⁸⁶. Ek olarak prostat kanserlerini inceleyen bir çalışmada miR-943'ün rolü olabileceği belirtilmiştir¹⁸⁷. Yine ilk kez Zubakov ve ark. tarafından semen belirteci olarak öne sürülmüştür¹⁵.

2.3.5. miRNA Analiz Yöntemleri

MiRNA'ların oldukça kısa sekanslara sahip olması, analizlerinde bazı zorluklara neden olmaktadır. Ek olarak aynı aileye ait olan miRNA varyantları tek nükleotit farklılıklarına sahiptir. Dahası total RNA miktarının yalnızca %0,01'i miRNA'lardan oluşmaktadır. Bütün bu zorluklar göz önünde bulundurulduğunda araştırmacılar farklı stratejiler geliştirerek miRNA'ların tespit ve kantitasyonunu belirlemeye çalışmışlardır¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

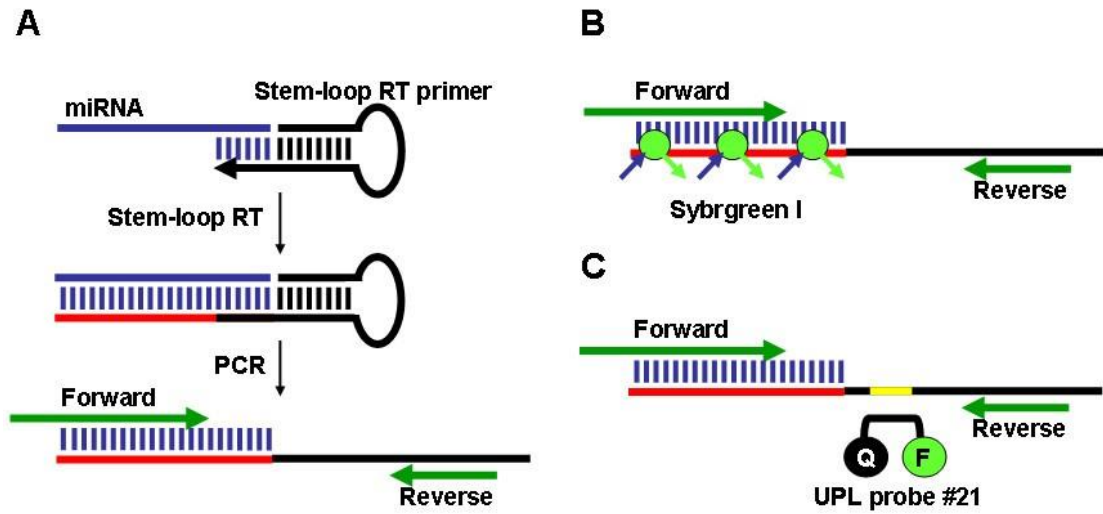
miRNA gibi kısa sekansların amplifikasyonu, konvansiyonel DNA amplifikasyon yöntemlerinden farklı stratejileri gerektirir. Bunun için reverse transkripsiyon, miRNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesi, bu cDNA'nın çeşitli kimyasal ve enzimatik yöntemlerle amplifikasyonu, düşük konsantrasyonlardaki miRNA'ları tespit etmede önemli bir strateji olarak öne çıkmaktadır¹⁹⁰.

2.3.5.1. RT-qPCR

Ortaya konulmuş tüm miRNA tespit teknikleri arasında, RT-qPCR hem adli bilimlerde hem de diğer alanlarda altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntem, miRNA hedeflerini görece düşük maliyetli olmasına rağmen, tek nükleotit seviyesinde yüksek özgünlükte tespit edebilmektedir. Temel olarak, RNA moleküllerinin RT-qPCR ile kantifikasyonu iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk olarak Reverse Transkriptaz (RT) kullanılarak hedef RNA'nın tamamlayıcı DNA'sı (cDNA) sentezlenir (Şekil 17). Sonraki aşama ise bu cDNA'nın bir çift primer ve DNA polimeraz ile PCR yoluyla amplifikasyonuna dayanır. Amplifikasyon işlemi, floresans boyaların ışımaları tespit edilerek gerçek zamanlı olarak izlenir. Çift zincirli DNA'ya yüksek afinite gösteren bu floresans boyalar (örn. SYBR Green I) amplifikasyon gerçekleştikçe çift zincire bağlanır ve ışımalar yayar. Bu yayılan ışımalar lazerle indüklenmiş optik kameralar aracılığıyla eş zamanlı olarak kaydedilir¹⁹¹. Veya farklı floresan boyalarla işaretlenmiş spesifik problemler (örn. hidroliz veya moleküler işaret problemleri) kullanılarak yapılır. Bu yöntemde 6-karboksifloresin (6-FAM, Reporter) boyasıyla 5' ucundan, 6-karboksiltetrametil-rodamin (TAMRA, Quencher) boyasıyla 3' ucundan işaretlenmiş problemler kullanılmaktadır. 6-FAM floresan ışımaya yaparken, TAMRA bu ışımayı sekanstaki konumlarının yakın olması sebebiyle maskeleyerek amplifikasyon gerçekleşmeden ışımaya oluşmasını engeller. Amplifikasyon sonunda Taq Polimeraz enzimi ekzonükleaz aktivitesiyle probu parçalar.

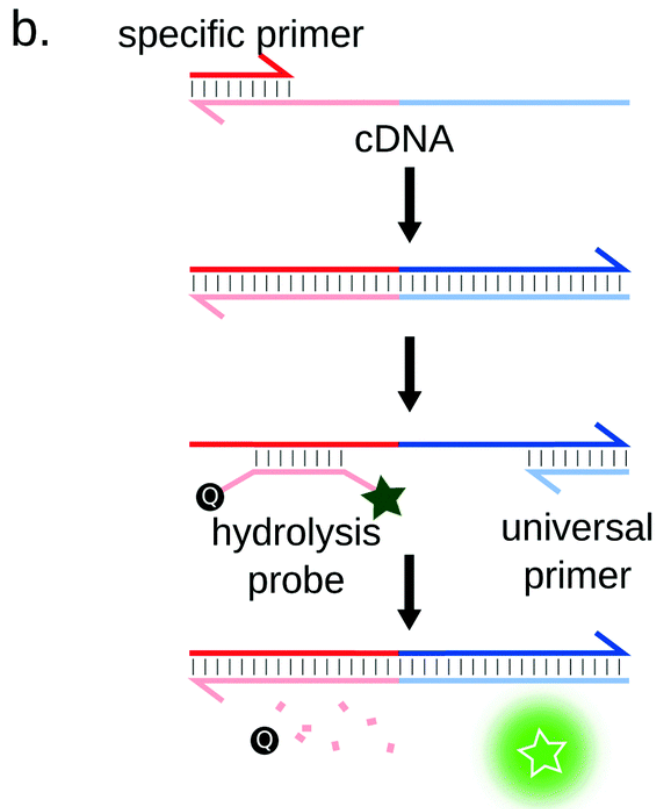
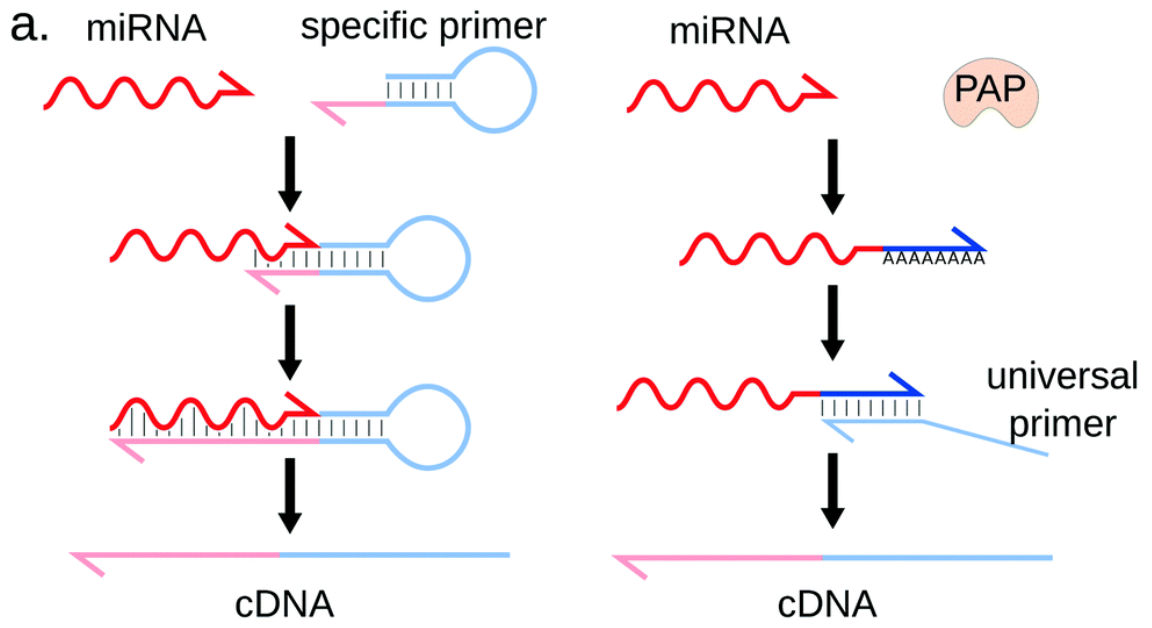
Reporter ve quencher birbirinden uzaklaşır. Reporter ışığa yapar ve bu ışığa monitörize edilir (Şekil 18). Bu yöntem reaksiyondan eş zamanlı olarak veri almamızı sağlamaktadır¹⁹¹.

Ct threshold adı verilen sınır döngü sınırına ulaşıldığında yazılım aracılığıyla sinyaller grafikleştirilir. Ct değeri ne kadar düşüğe hedeflenen DNA o derece bol anlamına gelmektedir. Bilinen konsantrasyonlara sahip bir standart örnek ile karşılaştırılarak kantifikasyon yapılır¹⁹⁰.



Şekil 17. RT-qPCR prensip¹⁹¹

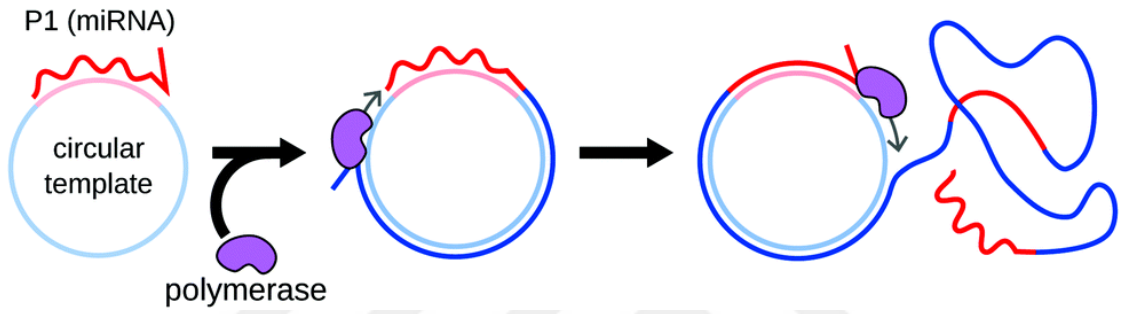
qPCR'nin miRNA kantifikasyonu bazı zorlukları da beraberinde getirmiştir. Klasik RT-qPCR uzun RNA dizilerinin kantifikasyonu için dizayn edilmiştir. Tipik PCR primerleri yaklaşık 20 baz uzunluğundadır. miRNA'ların sekans uzunluğu göz önüne alındığında tipik bir primer uzunluğu sebebiyle reaksiyon için uygun olmamaktadır. Bu sorunu gidermek adına miRNA'ya parsiyel komplementer özellikle olan stem-loop veya linear RT primerleri tasarlanmıştır. Ek olarak poli(A) polimeraz (PAP) kullanılmama stratejisi de kullanılmaktadır^{190,192,193}. Bu çözümünün pratik olmakla birlikte primerlerin özgünlüğünü ve hassasiyetini azaltabileceği düşünülmektedir^{190,191}. Bunlara ek olarak bu yöntemde verilerin normalizasyonu için referans gen adı verilen belirteçler kullanılmaktadır. Literatürde çeşitli referans genler önerilmektedir. Bunlardan öne çıkan U6 referans geni yaptığımız ön çalışmalarda verimli olmadığı (Ct>40) için çalışmamızdan çıkarılmış onun yerine SNORD48 referans geni eklenmiştir¹⁹⁴.



Şekil 18. RT-qPCR prensip 2 ¹⁹⁰

2.3.5.2. Rolling Circle Amplifikasyonu (RCA)

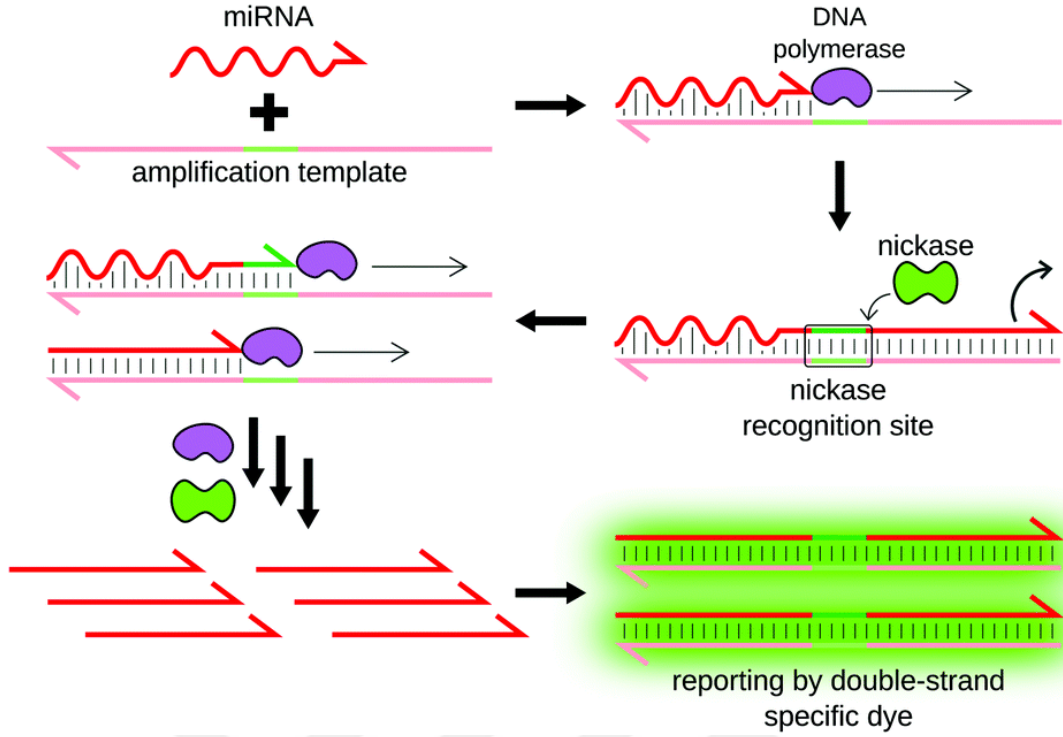
Kool ve ark tarafından geliştirilen Rolling circle amplifikasyonu (RCA), tek sarmallı RNA'nın lineer amplifikasyonunu hedefleyen bir yöntemdir. Bu teknikte, amplifikasyon işlemi için dairesel tek sarmallı DNA kalıp olarak kullanılır. RCA işlemi sırasında, forward primer gibi davranan miRNA dairesel şablona bağlanır ve DNA polimeraz tarafından uzatılır (Şekil 19). Polimeraz, dairesel şablon etrafında defalarca dolaşarak, kalıp sekansına komplementer birçok kopyadan oluşan uzun bir zincir üretir^{190,195}.



Şekil 19. RCA prensip¹⁹⁰

2.3.5.3. Exponential Amplifikasyon Reaksiyonu (EXPAR)

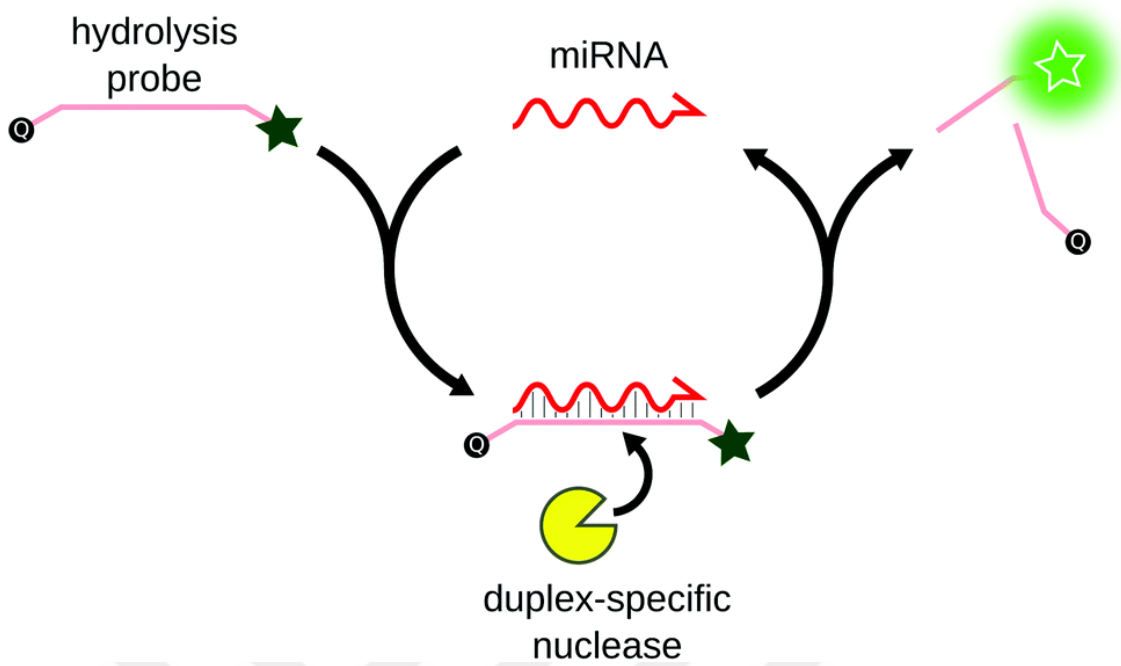
Exponential Amplification Reaction (EXPAR), Galas ve çalışma arkadaşları tarafından PCR'a alternatif olması için geliştirilmiş olan bir yöntemdir. EXPAR, bir DNA şablonu, bir DNA polimeraz ve bir kesici enzim kullanarak nükleik asit sekansının eksponansiyel olarak amplifikasyonunu sağlar. DNA şablonu, bir kesici enzim tanıma bölgesi ile ayrılmış iki hedef miRNA'ya komplementer sekanstan oluşur. Hibridizasyon gerçekleştiğinde, miRNA elongasyon aşaması için primer olarak kullanılır. Kesici enzim, spesifik tanıma bölgesini tanıyarak yalnızca miRNA içeren zinciri keser ve miRNA'nın bir DNA analogunu serbest bırakır. Bu DNA zinciri, diğer bir kalıpla hibritleşir ve daha fazla miRNA analogu üretir. Böylece miRNA dizisi eksponansiyel olarak çoğaltılır (Şekil 20). EXPAR oldukça etkili bir sinyal amplifikasyon yöntemi olmasına rağmen, özgün olmayan amplifikasyona eğilimlidir, bu da duyarlılığını sınırlamaktadır^{190,196-201}.



Şekil 20. EXPAR prensip¹⁹⁰

2.3.5.4. Duplex-Spesifik Nükleaz Sinyal Amplifikasyonu

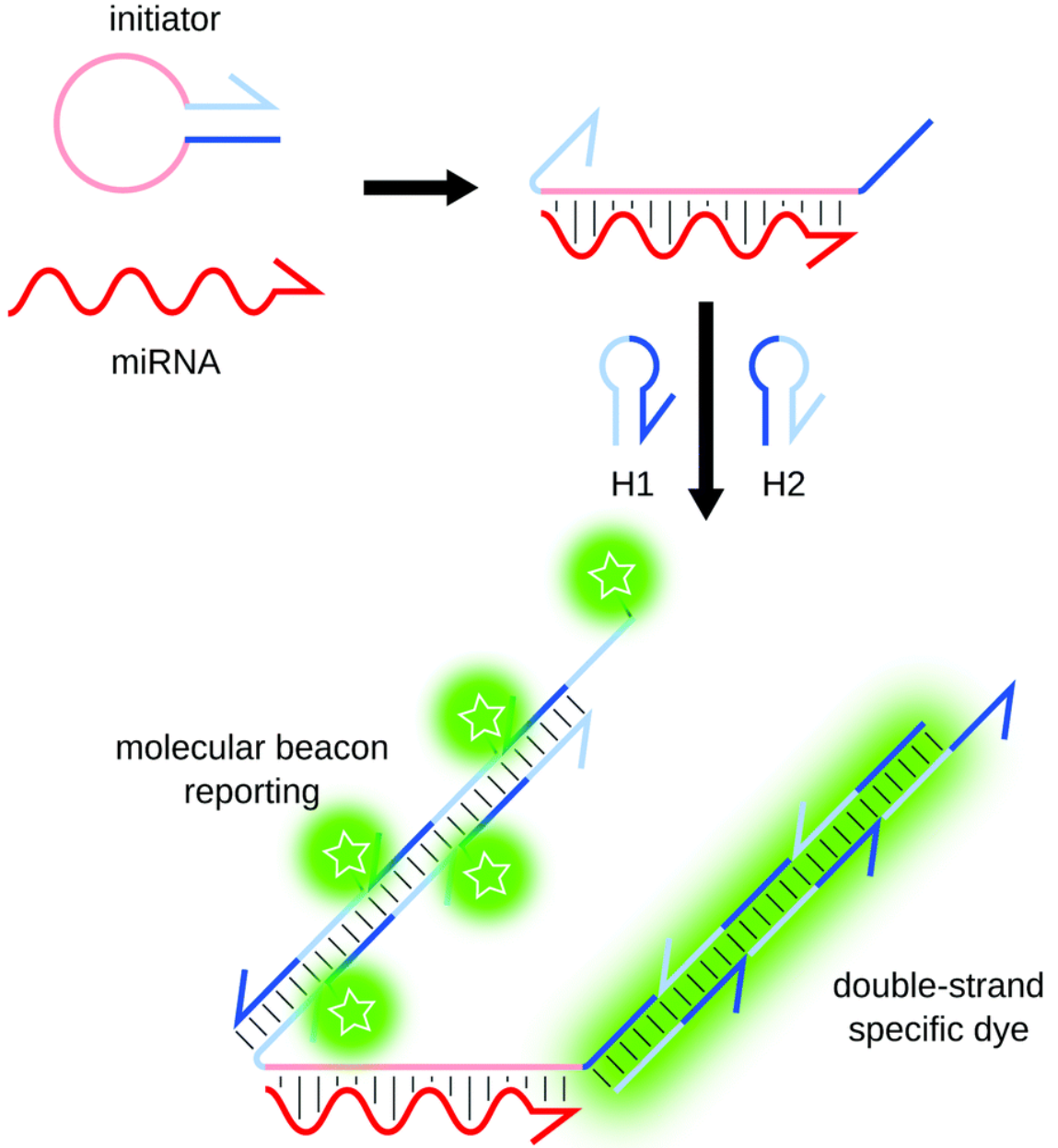
Duplex-spesifik nükleaz sinyal amplifikasyonu (DSNSA), genellikle multipleks miRNA analizi için kullanılan bir tekniktir. Özel bir tür olan Kamçatka yengecinden izole edilmiş olan bu nükleaz (DSN), öncelikle çift sarmallı DNA'yı spesifik olarak parçalayabilen bir ekzonükleaz olarak tanımlanmıştır. Anisimova ve ark. DNA:RNA duplekslerinin varlığında, DSN'nin özellikle DNA zincirini degrade ettiğini fakat RNA zincirlerini degrade etmediğini belirtmişlerdir. Yin ve ark enzimin bu özelliğini kullanarak DSN'yi üç miRNA'nın eşzamanlı tespiti için ilk kez uygulamıştır. Bu yöntem, miRNA'ya spesifik, reporter moleküllerle modifiye edilmiş, tek zincirli DNA problarının hedef miRNA'lar ile hibridizasyonunu ve daha sonrasında enzim bağımlı, modifiye DNA zincirinin lizis prensibine dayanmaktadır. Hibridizasyon sonucunda DNA:RNA duplesi oluşmaktaydı. Lizis süreci, probun DSN tarafından selektif olarak degrade edilmesiyle ve intakt haldeki miRNA'nın serbest kalarak başka bir proba hibridizasyonu ile devam etmekteydi. Her bir prob lizisinde reporter molekülleri sinyal oluşturmaktaydı (Şekil 21). Bunun sonucunda lineer sinyal grafikleri meydana gelmekteydi. DSN'ye alternatif olarak, CRISPR ile ilişkili nükleazlar (Cas) veya T7 ekzonükleaz gibi enzimlerin de benzer şekilde miRNA tespitinde kullanılabileceği belirtilmektedir^{190,192,193,195,199-202}.



Şekil 21. DSNSA prensip¹⁹⁰

2.3.5.5. Hibridizasyon Zincir Reaksiyonu

Diğer amplifikasyon yöntemlerinin aksine, hibritizasyon zincir reaksiyonu (HCR) içermeyen amplifikasyon tekniğidir. HCR, tek zincirli başlatıcı hair-pin formundaki bir molekül ve 2 adet kısa hair-pin formasyonundaki DNA moleküllerini (H1 ve H2) içeren bir tekniktir. Başlatıcı molekül hedef miRNA'ya komplementer bir sekans içerir. Başlatıcının 5' ve 3' uçları açıktadır ve her iki uçtan H1 ile komplementer özellikle sekanslara sahiptir. H2 ise H1 molekülüne komplementer sekanslar içerir. H1 başlatıcıya her iki uçtan bağlanır. Daha sonrasında H2, H1'e bağlanır ve floresans ışımaya gerçekleşir (Şekil 22). Bu şekilde sinyaller kaydedilip miRNA varlığı tespit edilmektedir^{190,203-208}.

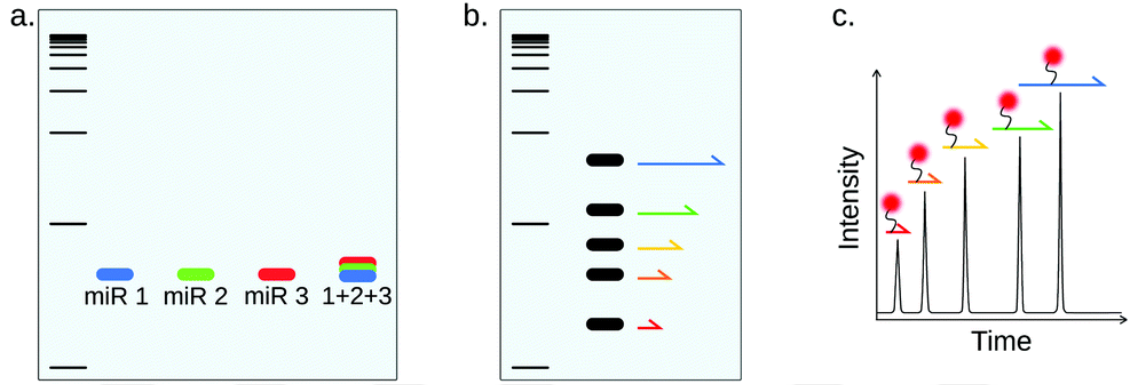


Şekil 22. HCR prensibi¹⁹⁰

2.3.5.6. Kapiller Elektroferez

Kapiller elektroferez, farklı renkteki florasan boyalarla işaretlenmiş moleküllerin jel içerisinde yürüme hızlarını, moleküllerin boyutlarına bağlı olarak saptama ve ayırma tekniğidir. miRNA'lar boyut olarak oldukça küçük moleküller olmakla birlikte sekans uzunlukları farklılıklar göstermektedir. Kapiller elektroferez sistemlerinin 0,5 baza kadar ayırım gücü olduğu göz önünde bulundurulduğunda miRNA'lar arasında ayırım yapabilme potansiyellerinin bulunduğu düşünülmektedir. Özellikle aynı aileye ait miRNA'ların aynı

sekans uzunluklarına sahip olmaları bazı problemler yaratmaktadır. Bu sorunu aşmak için yapılan çalışmalarda sekans farklılıklarının kullanımının, hedef miRNA'ların farklı floresans boyalarla hibridize edilerek kapiller elektroforezde benzer moleküler boyutlarına rağmen ayırt edilebildikleri gösterilmiştir. Jiang ve arkadaşları farklı uzunluklarda poli(A) kuyruğu içeren yakalama problemlerine hedef miRNA'ların hibridizasyonuna dayanan, amplifikasyon gerektirmeyen bir yöntem geliştirmiştir. Bu sayede, dupleksin moleküler ağırlığına göre ayırma yapılmasına olanak tanımıştır (Şekil 23). Ayırmadan önce PCR, DSNSA veya EXPAR gibi bir amplifikasyon adımı eklenerek hassasiyetin artırılabilceği belirtilmektedir^{190,209-212}.



Şekil 23. CE prensibi¹⁹⁰

2.3.5.7. Yeni Nesil Sekanslama

NGS, miRNA profillemesinde önemli potansiyel gösteren bir teknoloji olarak öne çıkmaktadır. RNA dizileme (RNA-seq) işlemini gerçekleştirmek için öncelikle numunedeki RNA'ların izolasyonunun yapıp saflaştırılması gerekmektedir. Saflaştırma sonrasında, universal adaptörler ve ligandlar her bir RNA zincirinin 5' ve 3' uçlarına ligamente edilir. Sonrasında genetik materyal flow cell adı verilen chipler üzerindeki, adaptör ve ligandlara komplementer oligonükleotidler tarafından yakalanır ve hibridize edilir. Devamında, köprü PCR amplifikasyonu adı verilen bir teknik uygulanır. Köprü PCR sonrasında floresans işaretli nükleotidler teker teker uzama süreci boyunca polimerize olur ve her eklenen nükleotit işaretlendiği rengin sinyalini verir. Teorik olarak ekstrakttaki tüm RNA'ların tespit edilebilen NGS, miRNA tespiti açısından en yüksek tespit kapasiteye sahiptir. Universal RT ve PCR primerlerinin kullanımı bu kapasitesinde büyük rol oynamaktadır. Tekniğin bu özelliği, önceden herhangi bir bilgi veya belirli bir

hedef diziyi gerektirmez. Bu özellik, RNA-seq'i miRNA tespit yöntemleri arasında benzersiz kılmaktadır. Çünkü diğer birçok teknik, hedeflenen her miRNA için spesifik primerlerin ve/veya problemlerin tasarımı gerektirir ve bu da analizin kapsamını daraltmaktadır^{190,213-215}.

2.3.5.8. Mikroarray

Bu yöntemde izole miRNA hedefleri öncelikle reverse transkripsiyon aşamasından geçerler. Reverse transkripsiyon aşamasında floresans işaretli parsiyel uyum gösteren moleküller rol oynar. RT aşamasında oluşan cDNA materyalleri, mikroçip üzerinde bulunan hedef miRNA'ya yüksek oranda komplementer sekansa sahip sabit sekanslarla muamele edilirler. Bu aşamada hedef miRNA molekülleri parsiyel olarak uyum gösterdikleri floresans işaretli zincirlerinden ayrılırlar ve yüksek komplementer sekans özelliği gösteren mikroçip üzerinde bulunan oligonükleotidlere bağlanırlar. Bu ayrılık floresans bir sinyale sebep olur ve bu sinyal lazerle indüklenmiş kameralar aracılığıyla kaydedilir²¹⁶⁻²¹⁸.

3. YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, Çukurova Üniversitesi Etik Kurulu'nun 02.04.2021 tarihli ve 110 sayılı toplantısında (Karar No: 29) alınan onay ile bilimsel çalışmalarda kullanılmasına onam veren 10 kişiden alınan semen, 10 (5 Kadın, 5 erkek) kişiden alınan kan, 10 kişiden alınan menstrüel kan, 10 (5 erkek, 5 kadın) kişiden alınan tükürük ve vajinal sıvı örnekleri kullanılmıştır. RNA izolasyonunu takiben Qubit florometrik yöntemle RNA miktar tayini yapıldı. Örneklerden alınan 5 ng RNA ile reverse transkriptaz PCR ve sonrasında cDNA ürünleri SYBR Green'e dayalı Real Time kantitatif PCR yöntemi ile çoğaltıldı. İşlem sonrası oluşan ürünlerin istatistiksel analizi ve hesaplamaları için Ms-Excel 2010 ve IBM SPSS İstatistik 20.0 (IBM Corp. 2013. IBM SPSS İstatistikleri Windows, Sürüm 20.0. Armonk, NY, IBM Corp.) kullanılmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihaz, Malzemeler ve Kitler

3.1.1.1. Cihazlar

- Qubit® fluorometer
- Beckman Coulter Microfuge 20R Soğutmalı Santrifüj Cihazı
- IKAMAG KS125 Basic karıştırıcı
- BioSan Vortex V-1 Plus
- Veriti 96-Well Thermal Cyclers PCR Cihazı
- ABI 7500 Real Time PCR Cihazı
- Eppendorf Mikropipet

3.1.1.2. Kitler ve Malzemeler

- miRNeasy Mini kit ekstraksiyon kiti
- Quant-iT™ RNA Assay Kit
- miRCURY LNA SYBR Green PCR Kiti

- miRCURY LNA RT Kiti
- Copan sürüntü çubuğu
- Pipet ucu (10, 100, 200 ve 1000 µl)
- 500 µl Eppendorf tüp
- 1.5 ml steril tüp
- PCR plate dhsghsdfshdg
- Rack
- Klorofom
- Etanol

3.2. Yöntem

Çalışma süreci örnek alma, RNA izolasyonu, RNA kantitasyonu, cDNA aşaması ve RT-PCR aşamalarından oluşmaktadır.

3.2.1. Örnek Alma

3.2.1.1. Örnek Alma

Sağlıklı 30 kadın ve 20 erkek gönüllüden semen, kan, menstrüel kan, tükürük ve vajinal sıvı örneğinden oluşan toplam 50 biyolojik alınmıştır. Semen, mastürbasyon yoluyla steril kaplar içerisinde toplanmış ve +4 derecede saklanmıştır. Diğer örnekler ise steril svablar aracılığıyla toplanmıştır.

3.2.2. RNA İzolasyonu

Semen örneklerinden RNA izolasyonu miRNeasy kiti ile yapılmıştır.

miRNeasy Mini Kit ile RNA ekstraksiyonu

Semen içeren örneklerden RNA ekstraksiyonu için kullanılan miRNeasy Mini kitinin aşamaları şu şekildedir;

1. 100 µl semen üzerine 700 µl **QIAzol Lizis Reaktifi** eklendikten sonra oda sıcaklığında 10 dk shaker üzerinde bekletildi.

2. Örneklerin üzerine 140 µl kloroform eklendi ve 15 saniye kuvvetlice sallayarak iyice karıştırılan örnekler oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildi.
3. 12.000 g'de 15 dakika (4°C'de) santrifüj yapılarak, faz oluşumu sağlandı.
4. Santrifüj sonucunda 3 faz oluştu. En üstteki RNA içeren şeffaf fazın tamamı pipetle çekilerek (350 µl) yeni bir 1.5 ml eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 525 µl %100 etanol eklendi. Birkaç kez pipetle çek-bırak yapılarak iyice karıştırıldı.
5. 700 µl örneği 2 ml'lik kite ait toplama tüpü üzerindeki RNeasy Mini spin kolona ekleyip 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildikten sonra altta kalan sıvı döküldü. 2 tekrar sonunda tüm örnek spin kolondan geçirildi. (Şekil 24.)
6. RNeasy Mini spin kolona 700 µl RWT tampon çözeltisi eklenip 8000 g' de 15 saniye santrifüj yapıp altta kalan sıvı döküldü.
8. RNeasy Mini spin kolona 500 µl RPE tampon çözeltisi eklenip 15 saniye santrifüj yapıldı ve altta kalan sıvı dökülerek tekrar 500 µl RPE eklenerek 2 dakika santrifüj yapıldıktan sonra RNeasy Mini spin kolonu alttaki tüpten etanol bulaştırmadan kaldırıldı.
9. RNeasy Mini spin kolonu yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve 1 dakika boyunca 12.000 g' de santrifüj edildi.
10. RNeasy Mini spin kolonunu tekrardan başka bir 1.5 ml' lik tüpe aktarıp 30 µl RNaz free su eklenip 8000 g' de 1 dakika santrifüj edilip ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır (Şekil 25).



Şekil 24. Kolon uygulaması



Şekil 25. Santrifüj Cihazı

3.2.3. RNA kantitasyonu

Kantitasyon analizi **Quant-iT™ RNA Assay Kiti** ile yapılmıştır.

Quant-iT™ RNA Assay Kit ile RNA kantitasyonu (Florometrik yöntem ile RNA kantitasyonu)

1. Çalışılacak olan her bir örnek için 1 µl Quant-iT™ RNA reagent ve 199 µl Quant-iT™ RNA buffer karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı.
2. Çalışma solüsyonundan her bir örnek için 198 µl yeni ependorf tüplerine aktarıldı.
3. 2 µl RNA ekstraktı hazırlanan tüplere eklendi ve yavaşça karıştırıldı.
4. Qubit® Fluorometer cihazı (Şekil 26.) kullanılarak total RNA miktarı belirlendi.



Şekil 26. Qubit Cihazı

3.2.4. cDNA Aşaması

cDNA aşamasında **QIAGEN miRCURY LNA RT Kiti** kullanılmıştır.

QIAGEN miRCURY LNA RT Kiti ile cDNA aşaması

Örnekler 5 ng/µl konsantrasyonunda olacak şekilde ayarlandı ve her bir örnek için;

1. 2 µl 5x miRCURY SYBR® RT reaksiyon tamponu.
2. 4.5 µl RNase Free Water
3. 1 µl 10x miRCURY RT Enzim karışımı
4. 0.5 µl UniSp6 RNA spike-in
5. 2 µl şablon RNA' dan eklenerek toplam hacim 10 µl'ye tamamlandı ve PCR cihazında uygun program başlatıldı. // 60 dakika 42°C' de ve 95 °C' de 5 dakika PCR cihazında inkübe edildi. (Şekil 27)
6. Son olarak hızlıca 4 °C' de soğutuldu ve cDNA aşaması tamamlandı.



Şekil 27. Thermocycler Cihazı

3.2.5. Real Time PCR aşaması

Real Time için **QIAGEN miRCURY LNA SYBR Green PCR Kiti** kullanılmıştır.

QIAGEN miRCURY LNA SYBR Green PCR Kiti Real Time PCR

Ön Hazırlık

1. Kullanılan primerlerin sulandırılması için 220 µl nükleaz free su eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi.
2. cDNA' ya çevrilen 10 µl'lik örnekler 590 µl RNase free su eklenerek 1/60 oranında dilüe edildi.

Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Her bir örnek için;

3. 5 µl miRCURY LNA SYBR Green Master Mix
4. 0.05 µl ROX referans boyası
5. 1 µl PCR primer Mix
6. 3 µl şablon cDNA 1/60 dilüe
7. 1 µl RNase free su eklenerek toplam hacim 10 µl' ye tamamlandı ve iyice karışması sağlandı.

Real Time aşaması

8. Hazırlanan çözeltiden 10 µl PCR plate kuyucuklarına yüklendi, cover yapıştırıldı, santrifüj yapıldı ve ABI 7500 Real Time PCR cihazında (Şekil 28.) uygun programda PCR döngüsü başlatıldı.



Şekil 28. ABI 7500 Real Time PCR cihazı

3.3. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada rölatif miRNA ekspresyonunu hesaplamak için delta Ct (ΔCt) ve delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) değerleri kullanılmıştır:

$$\Delta Ct = Ct (\text{miRNA}) - Ct (\text{SNORD48}),$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Hedef miRNA}) - \text{Endojen Gen (SNORD48)} \Delta Ct$$

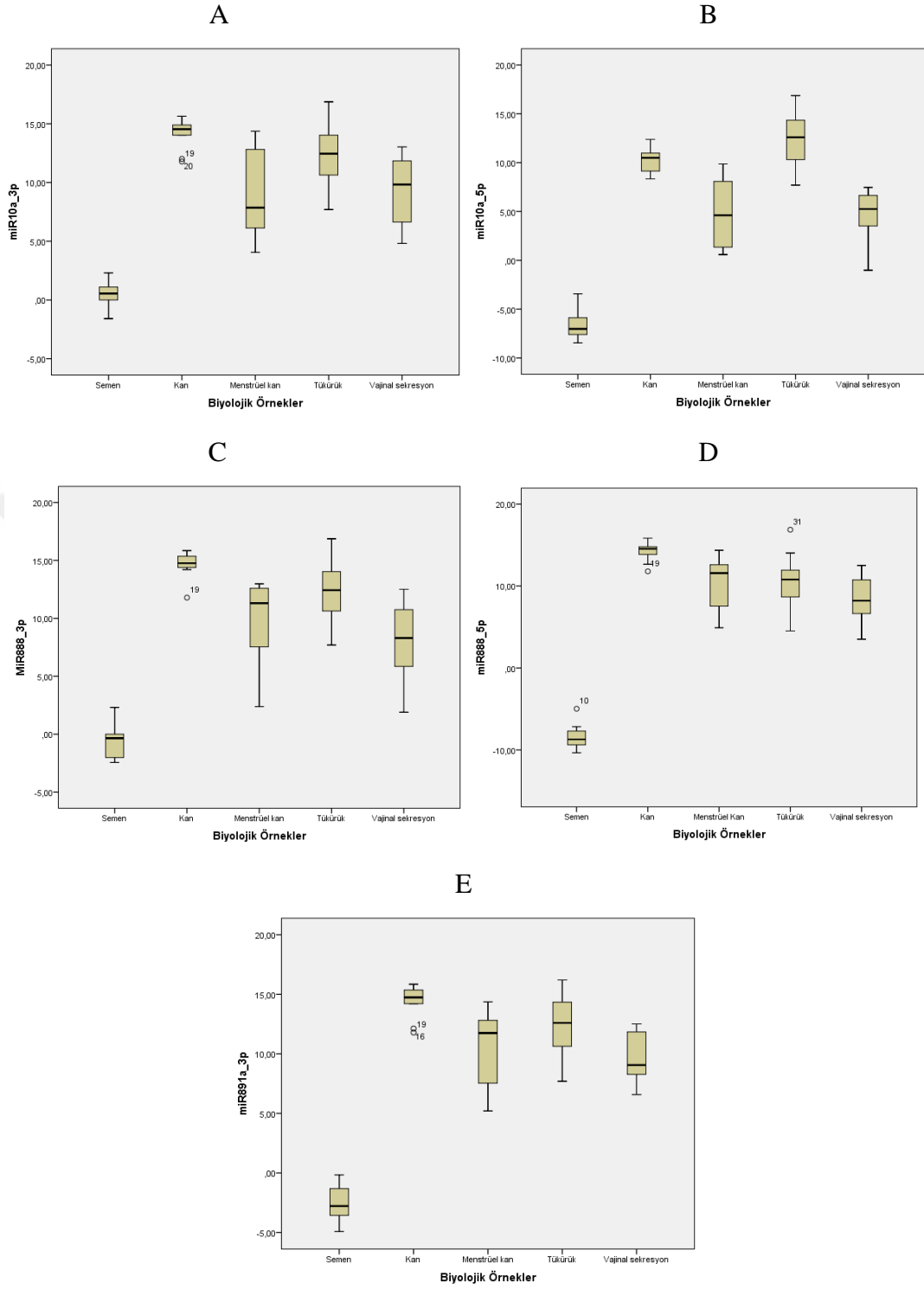
Verileri normalleştirmek amacıyla endojen kontrol olarak SNORD48 kullanılmıştır. Örneklerin kendi içinde ekspresyon seviyeleri arasında ve örnekler arasındaki ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı farklılıklar olup olmadığını karşılaştırmak için SPSS 20.0 istatistiksel analiz programı kullanılmıştır. Program ile önce her bir örnek grubunda $\Delta\Delta Ct$ değerleri arasında karşılaştırma yapılarak verilerin normal dağılıma uygunluğu, ardından da diskriminant fonksiyon analizi ile ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılıklar karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada adli amaçlı olarak semenin tanımlanmasında ayırt edici belirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağını test etmek için beş farklı miRNA'nın (miR-10a-3p, miR-10a-5p, miR-888-3p, miRNA-888-5p ve miR-891a) ve SNORD-48'in (endojen gen) ifade düzeyleri incelenmiştir.

Semen için seçilen 5 aday miRNA'nın 5 farklı vücut sıvısında ifadesinin analizi

Beş aday miRNA'nın beş vücut sıvısındaki ekspresyon seviyesinin analizinde 10 semen, 10 kan, 10 menstruel kan, 10 tükürük ve 10 vajinal sekresyon örneğinden oluşan toplam 50 örnek kullanılmıştır. Beş çeşit vücut sıvısında aday genlerin ekspresyon seviyeleri sırasıyla şekil 29. (A-E)'da gösterilmiştir.



Şekil 29. (A-E): Beş çeşit vücut sıvısında aday genlerin ifadesi (Y eksen: Hedef miRNA'nın relatif CT değeri-Delta CT); X eksen:5 farklı biyolojik örnek; Semen, Kan, Menstrüel Kan, Tükürük, Vajinal Sekresyon

Çalışılan 5 biyolojik örnekte diskriminant fonksiyon analizi ile test edilen 5 belirtecin ekspresyon seviyelerine dayalı ayırım gücünün test edildiği bireysel değerlendirmede; test edilen tüm belirteçler semen örneklerini semen olarak tanımlarken, semen dışı örneklerin tanımlanmasında çapraz sonuçlar alınmıştır. Her bir belirtecin ayrıntılı sonuçları altta aktarılmıştır.

miR-10a-3p'nin Ekspresyon Seviyesinin Değerlendirilmesi

miR-10a-3p'nin ekspresyon seviye ortalaması ($\Delta\Delta Ct$) diğer vücut sıvılarıyla karşılaştırıldığında semende farklılık göstermektedir. Fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tüm vücut sıvılarının birlikte değerlendirildiği diskriminant fonksiyon analizine göre miR-10a-3p'nin çalışılan tüm vücut sıvıları için ayırım gücü toplam %54,0 olarak belirlenmiştir. Bu analizde miR-10a-3p tüm semen örneklerini doğru kategorize ederken, kan örneklerinden 8'ini kan ve 2'sini tükürük; menstrüel kan örneklerinden ise 1'i semen, 1'i kan, 4'ü menstrüel kan, 2'si tükürük ve 2'si de vajinal sekresyon olarak sınıflandırılmıştır. 10a-3p'nin tükürük örneklerini sınıflandırma kapasitesi incelendiğinde örneklerden 4'ünün kan, 1'inin menstrüel kan, 3'ünün tükürük ve 2'sinin de vajinal sekresyon olarak sınıflandırıldığı görülmektedir. Vajinal sekresyon örneklerinde ise 4'ünü menstrüel kan, 4'ünü tükürük ve 2'sini vajinal sekresyon olarak kategorize etmiştir.

Semen ve semen olmayan örneklerden oluşan 2 ayrı sınıf dikkate alınarak yapılan diskriminant fonksiyon analizine göre bu belirtecin semeni diğer vücut sıvılarından ayırma kapasitesi %92,0 olarak belirlenmiştir.

Tablo 3. miR-10a-3p ve Vücut Sıvılarının Karşılaştırılması ($\Delta\Delta Ct$)

Belirteç/Doku/ Örnek	Kan	Semen	Menstrüel Kan	Tükürük	Vajinal Sekresyon
miR-10a-3p	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri
1	14,68	1,1	6,64	16,87	6,64
2	15,64	2,31	9,53	10,32	12,25
3	14,03	0,26	4,05	12,97	7,31
4	14,39	0,97	6,6	14,34	11,84
5	14,9	-1,59	9,07	13,25	5,41
6	14,73	0,47	12,98	7,7	10,03
7	15,36	0	6,13	14,03	4,82
8	14,21	-0,37	12,81	11,94	9,63
9	11,79	0,63	5,77	10,63	10,75
10	12,01	2,17	14,36	10,97	13,03

miR-10a-5p'nin Ekspresyon Seviyesinin Değerlendirilmesi

miR-10a-5p'nin ekspresyon seviye ortalaması ($\Delta\Delta Ct$) diğer vücut sıvılarıyla karşılaştırıldığında semende farklılık göstermektedir. Fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tüm vücut sıvılarının birlikte değerlendirildiği diskriminant fonksiyon analizine göre miR-10a-5p'nin çalışılan tüm vücut sıvıları için ayırım gücü toplam %70,0 olarak belirlenmiştir. Bu analizde miR-10a-5p tüm semen örneklerini doğru kategorize ederken, kan örneklerinden 8'ini kan ve 2'sini tükürük; menstrüel kan örneklerinden ise 3'ü kan, 5'i menstrüel kan ve 2'si de vajinal sekresyon olarak sınıflandırılmıştır. miR-10a-5p'nin tükürük örneklerini sınıflandırma kapasitesi incelendiğinde örneklerden 4'ünün kan ve 6'sının tükürük olarak sınıflandırıldığı görülmektedir. Vajinal sekresyon örneklerinde ise 1'ini semen, 3'ünü menstrüel kan ve 6'sini vajinal sekresyon olarak kategorize etmiştir.

Semen ve semen olmayan örneklerden oluşan 2 ayrı sınıf dikkate alınarak yapılan diskriminant fonksiyon analizine göre bu belirtecin semeni diğer vücut sıvılarından ayırma kapasitesi %94,0 olarak belirlenmiştir.

Tablo 4. miR-10a-5p ve Vücut Sıvılarının Karşılaştırılması ($\Delta\Delta Ct$)

Belirteç/Doku/ Örnek	Kan	Semen	Menstrüel Kan	Tükürük	Vajinal Sekresyon
miR-10a-5p	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri
1	9,14	-7,67	0,59	16,87	6,64
2	12,39	-5,88	9,75	10,32	6,39
3	10,98	-7,44	1,35	16,03	3,52
4	10,37	-6,92	4,23	14,34	7,47
5	12,29	-8,45	5,01	13,25	3,27
6	10,52	-7,13	6,23	7,7	6,87
7	10,48	-7,59	0,62	14,03	-1,02
8	10,56	-6,54	8,08	11,94	4,76
9	8,34	-4,95	1,94	10,63	5,18
10	8,67	-3,43	9,87	9,92	5,34

miR-888-3p'nin Ekspresyon Seviyesinin Değerlendirilmesi

miR-888-3p'nin ekspresyon seviye ortalaması ($\Delta\Delta Ct$) diğer vücut sıvılarıyla karşılaştırıldığında semende farklılık göstermektedir. Fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tüm vücut sıvılarının birlikte değerlendirildiği diskriminant fonksiyon analizine göre miR-888-3p'nin çalışılan tüm vücut sıvıları için ayırım gücü toplam %56,0 olarak belirlenmiştir. Bu analizde miR-888-3p tüm semen örneklerini doğru kategorize ederken, kan örneklerinden 9'unu kan ve 1'ini tükürük; menstrüel kan örneklerinden ise 1'ini semen, 2'sini menstrüel kan, 5'ini tükürük ve 2'sini de vajinal sekresyon olarak sınıflandırmıştır. miR-888-3p'nin tükürük örneklerini sınıflandırma kapasitesi incelendiğinde örneklerden 3'ünün kan, 2'inin menstrüel kan, 3'ünün tükürük ve 2'sinin vajinal sekresyon olarak sınıflandırıldığı görülmektedir. Vajinal sekresyon örneklerinde ise 2'sini semen, 2'sini menstrüel kan, 2'sini tükürük ve 4'ünü vajinal sekresyon olarak kategorize etmiştir.

Semen ve semen olmayan örneklerden oluşan 2 ayrı sınıf dikkate alınarak yapılan diskriminant fonksiyon analizine göre bu belirtecin semeni diğer vücut sıvılarından ayırma kapasitesi %94,0 olarak belirlenmiştir.

Tablo 5. miR-888-3p ve Vücut Sıvılarının Karşılaştırılması ($\Delta\Delta Ct$)

Belirteç/Doku/ Örnek	Kan	Semen	Menstrüel Kan	Tükürük	Vajinal Sekresyon
miR-888-3p	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri
1	14,68	-0,13	10,25	16,87	1,9
2	15,64	2,31	12,6	8,57	12,25
3	15,84	-0,78	2,38	14,94	5,85
4	14,39	-0,56	6,5	12,92	6,42
5	14,9	-2,02	12,09	13,25	8,2
6	14,73	-2,4	12,98	7,7	10,03
7	15,36	0	10,53	11,94	2,99
8	14,21	-2,44	12,81	14,03	12,51
9	11,79	-0,1	7,54	10,63	10,75
10	14,79	1,41	12,55	10,97	8,4

miR-888-5p'nin Ekspresyon Seviyesinin Değerlendirilmesi

miR-888-5p'nin ekspresyon seviye ortalaması ($\Delta\Delta Ct$) diğer vücut sıvılarıyla karşılaştırıldığında semende farklılık göstermektedir. Fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tüm vücut sıvılarının birlikte değerlendirildiği diskriminant fonksiyon analizine göre miR-888-3p'nin çalışılan tüm vücut sıvıları için ayırım gücü toplam %62,0 olarak belirlenmiştir. Bu analizde miR-888-5p tüm semen örneklerini doğru kategorize ederken, kan örneklerinden 9'unu kan ve 1'ini tükürük; menstrüel kan örneklerinden ise 3'ünü kan, 1'ini menstrüel kan, 3'ünü tükürük ve 3'ünü de vajinal sekresyon olarak sınıflandırılmıştır. miR-888-5p'nin tükürük örneklerini sınıflandırma kapasitesi incelendiğinde örneklerden 2'sinin kan, 5'inin tükürük ve 3'ünün vajinal sekresyon olarak sınıflandırıldığı görülmektedir. Vajinal sekresyon örneklerinde ise 1'ini kan, 1'ini menstrüel kan, 2'sini tükürük ve 6'sını da vajinal sekresyon olarak kategorize etmiştir.

Semen ve semen olmayan örneklerden oluşan 2 ayrı sınıf dikkate alınarak yapılan diskriminant fonksiyon analizine göre bu belirtecin semeni diğer vücut sıvılarından ayırma kapasitesi %100,0 olarak belirlenmiştir.

Tablo 6. miR-888-5p ve Vücut Sıvılarının Karşılaştırılması ($\Delta\Delta Ct$)

Belirteç/Doku/ Örnek	Kan	Semen	Menstrüel Kan	Tükürük	Vajinal Sekresyon
miR-888-5p	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri
1	14,68	-8,46	11,41	16,87	6,64
2	12,65	-7,69	12,6	4,52	11,57
3	15,84	-9,77	7,1	11,1	8,62
4	14,39	-8,96	4,9	10,63	10,01
5	13,85	-9,34	12,09	8,67	6,25
6	14,73	-10,35	11,73	7,7	7,81
7	15,36	-7,16	10,53	11,94	3,51
8	14,21	-9,38	12,81	14,03	12,51
9	11,79	-7,72	7,54	10,63	10,75
10	14,79	-4,97	14,36	10,97	7,13

miR-891a-3p'nin Ekspresyon Seviyesinin Değerlendirilmesi

miR-891a-3p'nin ekspresyon seviye ortalaması ($\Delta\Delta Ct$) diğer vücut sıvılarıyla karşılaştırıldığında semende farklılık göstermektedir. Fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tüm vücut sıvılarının birlikte değerlendirildiği diskriminant fonksiyon analizine göre miR-891a-3p'nin çalışılan tüm vücut sıvıları için ayırım gücü toplam %56,0 olarak belirlenmiştir. Bu analizde miR-891a-3p tüm semen örneklerini doğru kategorize ederken, kan örneklerinden ise 9'unu kan ve 1'ini tükürük; menstrüel kan örneklerinden ise 3'ünü kan, 1'ini menstrüel kan, 3'ünü tükürük ve 3'ünü de vajinal sekresyon olarak sınıflandırmıştır. miR-891a-3p'nin tükürük örneklerini sınıflandırma kapasitesi incelendiğinde örneklerden 2'sinin kan, 5'inin tükürük ve 3'ünün vajinal sekresyon olarak sınıflandırıldığı görülmektedir. Vajinal sekresyon örneklerinde ise 1'ini kan, 1'ini menstrüel kan, 2'sini tükürük ve 6'sını vajinal sekresyon olarak kategorize etmiştir.

Semen ve semen olmayan örneklerden oluşan 2 ayrı sınıf dikkate alınarak yapılan diskriminant fonksiyon analizine göre bu belirtecin semeni diğer vücut sıvılarından ayırma kapasitesi %100,0 olarak belirlenmiştir.

Tablo 7. miR-891a-3p ve Vücut Sıvılarının Karşılaştırılması ($\Delta\Delta Ct$)

Belirteç/Doku/Örnek	Kan	Semen	Menstrüel Kan	Tükürük	Vajinal Sekresyon
miR-891a-3p	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri	$\Delta\Delta Ct$ Değeri
1	14,68	-2,51	11,41	15,99	6,64
2	15,64	-3,1	12,6	10,32	12,25
3	15,84	-0,75	7,1	16,2	8,48
4	14,39	-1,82	5,21	14,34	11,84
5	14,9	-4,92	12,09	13,25	9,55
6	12,12	-3,82	12,98	7,7	8,28
7	15,36	-3,05	10,53	14,03	6,58
8	14,21	-3,56	12,81	11,94	12,51
9	11,79	-1,32	7,54	10,63	10,75
10	14,79	-0,16	14,36	10,83	8,56

RNA'ya dayalı vücut sıvılarının tanımlanmasında RNA ekspresyon seviyelerinin bireyler arasında varyasyon göstermesi, hastalık vs gibi çok çeşitli nedenlerle ekspresyon seviyelerinde farklılıklar oluşması ve bir vücut sıvısına tamamen spesifik bir belirtecin bulunmaması nedeniyle her vücut sıvısının en doğru tanımlamasını yapılabilmesi için her vücut sıvısı için birden fazla belirtecin bir arada değerlendirilmesi gerektiği ifade edilmektedir.

Beş belirtecin her biri ile biyolojik örnekler arasında ekspresyon seviyelerine bağlı olarak gözlenen çapraz reaksiyonların oluşturduğu belirsizliği ortadan kaldırmak için SPSS'e dayalı diskriminant fonksiyon analizi ile 5 belirtecin de dahil olduğu basamaklı (step-wise method) istatistiksel analiz yöntemi gerçekleştirilmiştir.

Her biyolojik materyalden 10 örneğin $\Delta\Delta Ct$ değerleri ile oluşturulan diskriminant fonksiyon analizinde miR-10a-3p, miR10a-5p, miR-888-3p, miR-888-5p ve miR-891a-3p'nin $\Delta\Delta Ct$ değerleri bağımsız değişkenler ve semen örnekleri ve semen olmayan (kan, menstrüel kan, tükürük ve vajinal sekresyon) örnekler bağımlı değişkenler olarak kullanılmıştır.

Program ile bu analiz yöntemine göre 5 aday belirteçten 3 belirtecin (888-3p, 888-5p ve 891a) öne çıktığı ve bu üç belirteç ile semen ile semen olmayan örneklerin ayrımının yapılabileceği bir fonksiyon üretilmiştir. Bu fonksiyon aşağıdadır.

$$Y1 = 2.304*\Delta Ct(miR-888-3p) + (-3,044)*\Delta Ct(miR-888-5p) + (-,066)*\Delta Ct(miR-891a-3p) - 12,988;$$

$$Y2 = (-0,912*\Delta Ct(miR-888-3p)) + (0,399*\Delta Ct(miR-888-5p)) + 2.197*\Delta Ct(miR-891a-3p) - 10.715.$$

miR-888-3p, miR-888-5p ve miR-891a-3p için ΔCt değerleri fonksiyonlara yerleştirildiğinde $Y1 > Y2$ ise bilinmeyen örnek Semen örneği, $Y1 < Y2$ ise örnek semen dışında bir başka örnek olarak sınıflandırılmıştır. Fonksiyon ile doğruluk oranı %100 hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA

Olay yerlerinin rekonstrüksiyonu adli vakaların aydınlatılması için hayati öneme sahiptir. Olay yerinde bulunan kanıt niteliği taşıyan biyolojik materyallerin analizi her zaman zorlayıcı bir konu başlığı olmuştur. Olay yerleri doğaları gereği (sıcaklık, nem, UV ışığı, diğer mekanik etkenler vb.) biyolojik materyallerin degrade olmasına yatkınlık sağlayan ortamlardır. Ek olarak olay yerinde bulunabilecek olan biyolojik materyaller sıklıkla eser miktarda bulunmaktadır. Biyolojik materyallerin tanımlanmasında yıllar içerisinde çeşitli ön tarama testleri ve doğrulayıcı testler geliştirilmiştir. Fakat bu testlerin çeşitli dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin ön tarama testlerinde kullanılan kimyasal ajanlar, DNA testleri gibi ileri analizler için inhibitör etkeni olmaktadır. Bunun dışında ön tarama testlerinin hassasiyet dereceleri her zaman yeterli olamayabilir. Dahası yanlış pozitif ya da negatif sonuçlarla da karşılaşmaktadır. Ek olarak eser miktardaki biyolojik materyaller boşa harcanabilmektedir. Doğrulayıcı testler ise kompleks iş akışı süreçleri ve yüksek maliyetler yaratmaktadır^{2,4-6,22,33}.

Bütün bu etkenler göz önüne alındığında araştırmacılar RNA moleküllerini kullanma yoluna gitmişlerdir. Vücut sıvılarının farklı işlevleri olduğu göz önünde bulundurulduğunda farklı RNA moleküllerinin farklı kompozisyonlara ve ekspresyon paternlerine sahip olduğu beklenmekte ve bilinmektedir. İlk etapta mRNA molekülleri öne çıkmış ve çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Tüm vücut sıvıları için çeşitli mRNA tipleri ve ekspresyon paternleri belirlenmiştir. mRNA moleküllerinin kullanılması başta iyi bir strateji olarak görülmekle birlikte boyutları sebebiyle olay yerlerinin zorlayıcı koşullarına karşı degradasyona açık moleküller oldukları anlaşılmıştır. Bu zorluğun üstesinden gelmek için ise daha küçük RNA molekülleri incelenmiştir. Bu çalışmalar ışığında özellikle miRNA'lar öne çıkmıştır. Küçük boyutları degradasyona karşı önemli bir direnç avantajı yaratmaktadır. Gen ekspresyonundaki regülatör rolleri sebebiyle bazı miRNA'ların doku/vücut sıvılarına özgün olduğu bilinmektedir. Ek olarak ekspresyon paternleri de doku ve vücut sıvılarında varyasyonlar göstermektedir. Bu özellikleri miRNA'ların vücut sıvısı identifikasyon potansiyellerinin yüksek olduğunu düşündürmektedir^{3,7,15-21,23}.

Bu çalışmada kullanılan miR-10a-3p, miR-10a-5p, miR-888-3p, miR-888-5p ve miR-891a-3p belirteçlerinin ekspresyon seviyelerinin ($\Delta\Delta Ct$) diğer vücut sıvılarıyla

karşılaştırıldığında semende daha yüksek olduğu, fakat istatistiksel değerlendirmede miR-888-3p, miR-888-5p ve miR-891a'nın anlamlı olduğunu ortaya konmuştur ($p < 0,05$).

Belirteçler semen ve semen olmayan örneklerin ayırımı açısından tekil olarak incelendiğinde, miR10a-3p'nin %92, miR10-5p'nin %94, miR-888-3p'nin %96,0, miR-888-5p'nin %100,0 ve miR-891a-3p'nin %100,0 derecesinde ayırım kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Her belirteç tek başına değerlendirildiğinde 5 belirtecin de ekspresyon seviyelerine dayalı bir farklılık gösterdiği, ancak bu farklılığın tüm vücut sıvılarının ayırımı için istatistiksel olarak yeterli olamayacağı ortaya çıkmıştır.

Semen örneklerini semen olmayan biyolojik örneklerden ayırt edebilmek için basamaklı diskriminant fonksiyon analizi (step-wise method) ile 5 belirteç birlikte değerlendirmeye alındığında, en iyi kombinasyonun 888-3p, miR-888-5p ve miR-891a'nın olduğu; bu üç belirtecin birlikte analiz edildiği program ile oluşturulan fonksiyon analizi ile semen-semen olmayan örnek ayırımının %100 güvenilirlikle yapılabileceği hesaplanmıştır. Bununla birlikte, miR-10a-3p ve miR-10a-5p'nin test edilen örnekler arasında gözlenen ekspresyon seviyelerindeki yakınlık nedeniyle semen ayırımı için yetersiz kaldığı ortaya çıkmıştır.

Zubakov ve ark.'nın vücut sıvılarının tanımlanmasına dayalı miRNA belirteçlerinin araştırıldığı örnekleme küçük olan çalışmada (3 erkek ve 3 kadın gönüllü) toplanan örnekleri 3 farklı yöntem ile incelemişlerdir. Yaptıkları mikroarray analizinde miR-10a'nın diğer vücut sıvılarından farklı olarak ifade düzeylerinin semende daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Buna karşın miR-891a'nın ifade düzeyinin vajinal sekresyonda yüksek olduğunu saptamışlardır. TaqMan problemleri kullanarak yaptıkları RT-PCR da ise miR-10a'yı ve miR-891a'yı diğer vücut sıvılarına kıyasla semende yüksek ekspresyon olarak saptamışlardır. Ek olarak LNA probuyla yaptıkları Northern Blotlamada yine miR-10a ve miR-891a'yı semene spesifik olarak tespit etmişlerdir. Mikroarray analizindeki farklılığın vajinal sekresyonun doğasına bağlı olarak bulunabilen bakteri veya mantarlarla ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Bir diğer olasılık olarak miR-891a'nın olgun olmayan prekürsörlerinden kaynaklı olabileceğini de belirtmişlerdir. Zubakov ve ark.'nın kullandığı mikroarray analizleri için miR-891a'nın semen identifikasyonunda uygun olmayacağı görülmektedir. Buna karşın RT-PCR ve Northern Blotlama gibi daha güvenilir ve altın standart sayılan teknikler miR-10a ve miR-891a'nın semen identifikasyonu için yüksek potansiyel göstermektedir. Bizim çalışmamızda farklı

RT-PCR kiti kullanılmasına rağmen miR-891a Zubakov ve ark.'ın yaptığı çalışmayla uyum göstermektedir. miR-891a semene spesifik olarak öne çıkmaktadır¹⁵. Wang ve ark.'nın TaqMan problemleriyle yaptığı çalışmada ise 5 farklı (kan, semen, tükürük, menstrüel kan, vajinal sekresyon) vücut sıvısı analiz edilmiş ve miR-888 ve miR-891a'nın diğer vücut sıvılarına kıyasla semende yüksek oranda eksprese edildiği belirlenmiş ve potansiyel semen belirteçleri olarak önerilmiştir. Farklı RT-PCR kitleri kullanmamıza rağmen çalışmamızdaki sonuçlarımız benzerlik göstermektedir¹⁶³. Luo ve ark.'nın 10 gönüllüyle yaptığı çalışmada 5 vücut sıvısı ve deri hücresi örnekleri RT-PCR yöntemiyle analiz edilmiş ve miR-888-5p'nin semen ayırımında oldukça etkin olduğu belirtilmiştir²¹⁹. Sauer ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise mikroarray ve TaqMan problemleriyle RT-PCR yöntemleri kullanılmıştır. Mikroarray analizi sonrasında miR-891a'nın semende çok güçlü, vajinal sekresyonda zayıf bir sinyal verdiğini belirtmişlerdir. RT-PCR analizlerinde ise miR-891a'nın sadece semende eksprese olduğunu ortaya koymuşlardır. Ek olarak miR-10a-5p'nin yapılan 2 analizde de diğer vücut sıvılarıyla karşılaştırıldığında semende yüksek eksprese olduğunu eklemişlerdir²³. He ve ark.'nın yaptığı 350 kişilik geniş kapsamlı çalışmada 5 farklı vücut sıvısı değerlendirilmiştir. SYBR Green kiti kullanılarak yaptıkları RT-PCR'in sonucunda miR-888-5p ve miR-891a'nın semeni ayırt etmekte %100 verimli olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları tüm kör testlerde bu iki belirteç tam doğrulukta semen ayırımını sağlayabilmiştir²²⁰. Seashols-Williams ve ark.'nın NGS ve RT-PCR yöntemlerini kullanarak yaptığı çalışmada miR-891a'nın NGS platformunda anlamlı seviyede farklılık göstermediği belirtilmiştir. Fakat RT-PCR analizi ile yaptıkları çalışmada semen belirteci olarak söylenebileceği ifade edilmiştir²²¹. Bir diğer çalışmada Mayes ve ark. tarafından kapiller elektroforez yöntemiyle yapılmıştır. Bu yöntemde önce floresan işaretli lineer ve uzun primerler seçilerek uzun cDNA'lar üretilmiş sonrasında elektroforezi yapılmıştır. Tüm semen örneklerinde, elektroforegramda miR-891a'nın sinyal piki görülürken, semen olmayan örneklerde bu belirtecin sinyal piki gözlemlenmemiştir. Ek olarak bu çalışmada DNA ve miRNA'lar eşzamanlı olarak çalışıldığı için iş gücünden önemli ölçüde tasarruf edilmiştir. Buna karşın primer maliyetleri büyük ölçüde artmıştır. Çalışmada belirtildiği üzere tüm örneklerin STR profilleri de başarıyla belirlenmiştir²²². Fujimoto ve ark.'nın çalışmasında miR-10a-5p, miR-888-5p ve miR-891a incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda miR-10a-5p'nin vajinal sekresyon ve kanda da semen ile aynı seviyede eksprese olduğu görülmüş buna

karşın miR-888-5p ve miR-891a'nın ya semene spesifik olduğu yada semende ekspresyonun diğer sıvılara göre daha yüksek olduğunu belirtmiştir²²³. Park ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 60 sağlıklı gönüllüden elde edilen kan, tükürük, semen ve vajinal sekresyon örnekleri analiz edilmiştir. Çalışmada mikroarray ve kantitatif RT-PCR yöntemleri kullanılmış ve semen için miR-10a'yı düşük eksprese, miR-891a'yı ise çok yüksek eksprese olarak raporlamışlardır. Park ve ark. miR-891a'yı mikroarray panelinde semen identifikasyonu için ideal bir aday olarak belirtmişlerdir. miR-891a bizim çalışmamızda da yüksek doğrulukta ayırım sağlamıştır (%100, p<0.05). Ek olarak çalışmamızın başlangıcında analiz etmeyi planladığımız miR-135a ve miR-135b'nin vajinal sıvıda semenden daha fazla eksprese olduğunu belirtmişlerdir.

Park ve ark.'nın yaptığı çalışmada normalizasyon için kullanılan referans gen U6 olarak belirtilmiştir. Literatürde birçok internal gen önerisi bulunmaktadır. U6 belirteci de ilk kullanılan ve halen sıklıkla kullanılmakta olan bir belirteç olsa da literatürde özellikle stabilite açısından farklı referans genler de önerilmektedir. Özellikle zamana bağlı stabilite çalışmalarında let-7 öne çıkmaktadır. Ek olarak yapılan bir çalışmada NormFinder, geNorm ve BestKeeper veri tabanları incelendiğinde SNORD48'in en güvenilir 3 adaydan birisi olduğu belirtilmiştir²²⁴. Yaptığımız ön analizlerde U6'nın, kullandığımız kantitatif RT-PCR sistemlerinde ve ticari kitinde verimli sonuç alınamamış ve alternatif olarak SNORD48 referans geni çalışmaya dahil edilmiştir.

Literatür incelendiğinde bu çalışma ile diğer çalışmalar arasında cDNA eldesinde farklı ticari kitler ve total RNA konsantrasyonlarının kullanıldığı görülmektedir. Bir diğer farklılık ise istatistiksel analiz modellemelerinde bulunmaktadır Park ve ark. ΔC_t değerleriyle istatistiksel analiz modellemeleri yaparken bu çalışmada $\Delta\Delta C_t$ parametresi kullanılmıştır²². Lewis ve ark.'nın yaptığı bir başka çalışmada ise 3 donörden alınan 4 farklı vücut sıvısı RT-PCR yöntemi ile analiz edilmiş ve miR-891a'nın semene spesifik olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız RNA izolasyon kitleri ve RT-PCR kitleri Lewis ve ark.'ın kullandığı kitlerden farklı olmasına rağmen miR-891a bağlamında sonuçlarımız uyumluluk göstermekte ve miR-891a'nın semen spesifik yüksek ekspresyonunu ortaya koymaktadır²²⁵.

Lancia ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise 17 donörden toplanan örnekler çalışılmıştır. Adli vakalar simüle edilmiştir. Analizlerde kot pantolon, kumaş, kondom, kâğıt peçete, mendil gibi ortamlardan elde edilen hem tekil vücut sıvıları hem de semen

ile karışık kan ve tükürük örnekleri çalışılmıştır. Ek olarak vajinal mukoza ve nazal mukoza da analiz edilmiştir. Çalışmada RT-PCR yöntemi kullanılmış ve araştırılan tüm belirteçlerin (miR-10a-5p, miR-888-5p, miR-891a-5p, miR-135a-5p ve miR-135b-5p) semen ayırımı yapabildiği belirlenmiştir. Buna karşın miR-135a-5p ve miR-135b-5p'nin nazal mukozada da yüksek eksprese olduğunu, miR-891a-5p ve miR-10a-5p'nin de vajinal mukozada yüksek eksprese olduğunu belirtmişlerdir. Bu sorunu aşmak için tüm örnekler için semen identifikasyonunu sağladıkları bir formül geliştirmişlerdir. Ayırım için kullandıkları formülasyon ise $x \geq n / 2$ ($x = \text{Delta CT değeri} < 30$, $n = \text{analiz edilen belirteç sayısı}$) şeklindedir. Bizim çalışmamızda ise miR-891a'nın vajinal sekresyonda ekspresyonu düşük olarak bulunmuştur ($p < 0,05$). Ek olarak Lancia ve ark. 26 yıllık donmuş semen örneğini de çalışmaya dahil etmiş ve araştırılan belirteçlerin stabilitesini koruduğunu ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmamızda zamana bağlı stabilite incelenmediği için karşılaştırma imkânı bulamamaktayız. Stabilite analizleri için yeni çalışmalar önermekteyiz²²⁶.

Tian ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada semen spesifik potansiyel miRNA'ları incelemiştir. Ek olarak çalışmada günümüzde özellikle artan infertilite ilişkili azospermi, astenoospermi, oligospermi, oligospermi ve astenospermi vakalarını sağlıklı semen örnekleriyle karşılaştırıp, adli vakalarda potansiyel infertil zanlı senaryolarını incelemişlerdir. Cinsel saldırı gibi adli vakalarda azospermik, vb. zanlıların da yer alabileceği göz önünde bulundurulduğunda yapılan çalışmadan elde edilen verilerin adli analizlerde kullanılabilme potansiyeli ortaya konmuştur. Bunlara ek olarak kan, menstrüel kan, tükürük, vajinal sekresyon da ilgili belirteçler için incelenmiştir. Lineer Diskriminasyon Analizinden elde edilen 2 boyutlu grafik incelenmiştir. miR-10a ve miR-10b için sağlıklı semen açısından spesifik kümeleşme göstermiş fakat menstrüel kan örnekleriyle kesin bir ayırım sağlanamamıştır. Buna karşın miR-891a ve miR-888 ile yapılan analizler diğer vücut sıvılarından kesin bir ayırma küme oluşturmuştur. Azospermik, astenoospermik, oligospermik, oligospermik ve astenospermik vakalarda ilgili belirteçler analiz edildiğinde miR-10a ve miR-10b diğer vücut sıvılarıyla ayırım sağlayamamış buna karşın miR-888 ve miR-891a belirteçleri ayırım sağlayabilmişlerdir²²⁷. Bu çalışmaya göre infertil bireyler, çalışmamızda da bulunan miR-888 ve miR-891a ile ayırt edilebilme potansiyeli göstermektedir. Bizim çalışmamızda likefaksiyon, motilite, sperm sayımı vb. parametreler olmadığı için karşılaştırma yapma imkânı bulamamakla birlikte gelecek

zamanlarda adli bilimler açısından validasyon bağlamında başka çalışmaların yapılması önerilmektedir. Bu konuda yapılan bir başka çalışmada ise Fujimoto ve ark. normospermik ve azospermik örnekleri miR-10a-5p, miR-888-5p ve miR-891a için test etmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda normospermik örnekler ve azospermik örneklerin arasında fark olmasına rağmen seçilen bu 3 belirteçin, semeni diğer vücut sıvılarından açık şekilde ayırt edebildiğini göstermişlerdir. Bu çalışmalar incelendiğinde özellikle miR-888-5p ve miR-891a'nın sperm anomalilerine sahip semen örneklerinde bile ayırım sağlama potansiyeli yüksek belirteçler olduğu görülmektedir²²⁸.

Literatür ve bizim sonuçlarımız arasında çoğunlukla paralel analiz sonuçları elde ettiğimiz görülmektedir. miR-888-3p, miR-888-5p ve miR-891a semen için ayırt edici belirteçler olarak görünmektedir. Literatür incelendiğinde var olan bazı farklılıkların RNA izolasyon yöntemleri, cDNA eldesi, RT-PCR kitleri gibi önemli adımlardaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ek olarak NGS, mikroarray, kapiller elektroforez, vb. gibi farklı platformlarda yapılan analizler ve istatistiksel yazılımlar da bu farklıları önemli ölçüde açıklamaktadır.

miRNA'lar adli bilimler camiasında artarak popülerleşmeye ve yaygınlaşmaya devam edecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Test edilen 5 belirtecin 10'u semen 40'ı diğer vücut sıvılarından oluşan toplam 50 örnekte yapılan diskriminant fonksiyon analizi ile;

- Belirteçlerin 5 farklı grup olarak sınıflandırılan her bir vücut sıvısını diğer vücut sıvısından/sıvılarından ayırt edebilme potansiyelleri

○ miR-10a-3p	%54,0
○ miR-10a-5p	%70,0
○ miR-888-3p	%56,0
○ miR-888-5p	%62,0
○ miR-891a-3p	%56,0

olarak hesaplanmıştır.

- Belirteçler semen ve semen olmayan örneklerin ayrımı açısından iki gruba ayrılarak incelendiğinde, semen örneğini diğer biyolojik materyallerden (kan-menstruel kan-tükrük-vajinal sekresyonun dahil olduğu tüm örnekler birlikte bir grup) ayırt edebilme potansiyelleri

○ miR-10a-3p	%92,0
○ miR-10a-5p	%94,0
○ miR-888-3p	%94,0
○ miR-888-5p	%100,0
○ miR-891a-3p	%100,0

olarak saptanmıştır.

- Toplam 50 örnekte, 5 belirteç ile birlikte yapılan diskriminant fonksiyon analizinde (step-wise method) miR-888-3p, miR888-5p ve miR-891a-3p birlikte değerlendirilerek %100,0 doğrulukta semen/semen olmayan örnek ayrımı yapılabileceği hesaplanmıştır. Bu sonuçlar ışığında semen identifikasyonu için miR-888-3p, miR888-5p ve miR-891a-3p'nin 3'lü kombinasyonun birlikte kullanılmasının güvenilir semen tanımlanması için uygun olacağı sonucuna varılmıştır.
- Bir sonraki aşamada miR-888-3p, miR888-5p ve miR-891a-3p belirteçlerinin zaman/çevre koşullarına bağlı stabiliteleri ile sperm patolojilerine sahip

örneklerin incelenmesi ve laboratuvar koşullarında geçerlilik ve güvenilirlik testlerinin yapılarak laboratuvarda kullanılması önerilmektedir.

- Son olarak adli analizlerde minimum örnekten maksimum verim alma önemli bir kriter olduğundan, her bir vücut sıvısına spesifik olan multi-belirteçler belirlenecek ve belirlenen bu belirteçler ile tüm vücut sıvılarının tanımlanmasına olanak tanıyan bir multipleks oluşturulacaktır. Oluşturulacak olan bu multipleks içinde semen için önerilen bu üç belirteçten en az ikisinin kullanılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.



KAYNAKÇA

1. **Virkler K, Lednev IK.** Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int.* **2009**;188(1-3):1-17. doi:10.1016/j.forsciint.2009.02.013
2. **Bauer M.** RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet.* **2007**;1(1):69-74. doi:10.1016/j.fsigen.2006.11.002
3. **Park JL, Kwon OH, Kim JH, et al.** Identification of body fluid-specific DNA methylation markers for use in forensic science. *Forensic Sci Int Genet.* **2014**;13:147-153. doi:10.1016/j.fsigen.2014.07.011
4. **Akutsu T, Kitayama T, Watanabe K, Sakurada K.** Comparison of automated and manual purification of total RNA for mRNA-based identification of body fluids. *Forensic Sci Int Genet.* **2015**;14:11-17. doi:10.1016/j.fsigen.2014.09.007
5. **Haas C, Muheim C, Kratzer A, Bär W, Maake C.** mRNA profiling for the identification of sperm and seminal plasma. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* **2009**;2(1):534-535. doi:10.1016/j.fsigs.2009.08.109
6. **Haas C, Hanson E, Kratzer A, Bär W, Ballantyne J.** Selection of highly specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of blood. *Forensic Sci Int Genet.* **2011**;5(5):449-458. doi:10.1016/j.fsigen.2010.09.006
7. **Frumkin D, Wasserstrom A, Budowle B, Davidson A.** DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci Int Genet.* **2011**;5(5):517-524. doi:10.1016/j.fsigen.2010.12.001
8. **Bauer M, Gramlich I, Polzin S, Patzelt D.** Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study. *Leg Med.* **2003**;5(4):220-227. doi:10.1016/j.legalmed.2003.08.001
9. **Preece P, Cairns NJ.** Quantifying mRNA in postmortem human brain: influence of gender, age at death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. *Molecular Brain Research.* **2003**;118(1-2):60-71. doi:10.1016/S0169-328X(03)00337-1
10. **Harrison PJ, Heath PR, Eastwood SL, Burnet PWJ, McDonald B, Pearson RCA.** The relative importance of premortem acidosis and postmortem interval for human brain gene expression studies: selective mRNA vulnerability and comparison with their encoded proteins. *Neurosci Lett.* **1995**;200(3):151-154. doi:10.1016/0304-3940(95)12102-A
11. **Peng D, Lv M, Li Z, et al.** Postmortem interval determination using mRNA markers and DNA normalization. *Int J Legal Med.* **2020**;134(1):149-157. doi:10.1007/s00414-019-02199-7
12. **Sirker M, Schneider PM, Gomes I.** A 17-month time course study of human RNA and DNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions. *Int J Legal Med.* **2016**;130(6):1431-1438. doi:10.1007/s00414-016-1373-9
13. **Bauer M, Patzelt D.** A method for simultaneous RNA and DNA isolation from dried blood and semen stains. *Forensic Sci Int.* **2003**;136(1-3):76-78. doi:10.1016/S0379-0738(03)00219-6

14. **Zubakov D, Boersma AWM, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EAC, Kayser M.** MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med.* **2010**;124(3):217-226. doi:10.1007/s00414-009-0402-3
15. **Zubakov D, Boersma AWM, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EAC, Kayser M.** MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med.* **2010**;124(3):217-226. doi:10.1007/s00414-009-0402-3
16. **Silva SS, Lopes C, Teixeira AL, Sousa MJC de, Medeiros R.** Forensic miRNA: Potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci Int Genet.* **2015**;14:1-10. doi:10.1016/j.fsigen.2014.09.002
17. **Sijen T.** Molecular approaches for forensic cell type identification: On mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers. *Forensic Sci Int Genet.* **2015**;18:21-32. doi:10.1016/j.fsigen.2014.11.015
18. **Rocchi A, Chiti E, Maiese A, Turillazzi E, Spinetti I.** MicroRNAs: An Update of Applications in Forensic Science. *Diagnostics.* **2020**;11(1):32. doi:10.3390/diagnostics11010032
19. **Glynn CL.** Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations. *RNA.* **2020**;26(1):1-9. doi:10.1261/rna.072173.119
20. **Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J.** Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem.* **2009**;387(2):303-314. doi:10.1016/j.ab.2009.01.037
21. **Wang Z, Luo H, Pan X, Liao M, Hou Y.** A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet.* **2012**;6(3):419-423. doi:10.1016/j.fsigen.2011.08.008
22. **Park J, Park S, Kwon O, et al.** Microarray screening and qRT-PCR evaluation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Electrophoresis.* **2014**;35(21-22):3062-3068. doi:10.1002/elps.201400075
23. **Sauer E, Reinke AK, Courts C.** Differentiation of five body fluids from forensic samples by expression analysis of four microRNAs using quantitative PCR. *Forensic Sci Int Genet.* **2016**;22:89-99. doi:10.1016/j.fsigen.2016.01.018
24. **JM. B.** *Advanced Topics in Forensic DNA Typing Methodology.* Elsevier/Academic Press; **2012.** <https://www.elsevier.com/books/advanced-topics-in-forensic-dna-typing-methodology/butler/978-0-12-374513-2>
25. **Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* **1985**;230(4732):1350-1354. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999980>
26. **Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA.** DNA typing from single hairs. *Nature.* **1988**;332(6164):543-546. doi:10.1038/332543a0
27. **Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT.** DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet.* **1991**;49(4):746-756.

28. **Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL.** Individual-specific “fingerprints” of human DNA. *Nature*. 316(6023):76-79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2989708>
29. **Clayton TM, Whitaker JP, Maguire CN.** Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Sci Int*. **1995**;76(1):7-15. doi:10.1016/0379-0738(95)01787-9
30. **Hagelberg E, Gray IC, Jeffreys AJ.** Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature*. **1991**;352(6334):427-429. doi:10.1038/352427a0
31. **Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E, Sonnberg A.** Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *Forensic Sci Int*. **1992**;56(1):65-76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1398379>
32. **de Knijff P.** From next generation sequencing to now generation sequencing in forensics. *Forensic Sci Int Genet*. **2019**;38(October 2018):175-180. doi:10.1016/j.fsigen.2018.10.017
33. **Virkler K, Lednev IK.** Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int*. 2009;188(1-3):1-17. doi:10.1016/j.forsciint.2009.02.013
34. **An JH, Shin KJ, Yang WI, Lee HY.** Body fluid identification in forensics. *BMB Rep*. 2012;45(10):545-553. doi:10.5483/BMBRep.2012.45.10.206
35. **Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neuzil P.** PCR past, present and future. *Biotechniques*. **2020**;69(4):317-325. doi:10.2144/btn-2020-0057
36. **Chelly J, Montarras D, Pinset C, Berwald-Netter Y, Kaplan J -C, Kahn A.** Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction: Application to dystrophin mRNA in cultured myogenic and brain cells. *Eur J Biochem*. **1990**;187(3):691-698. doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb15355.x
37. **Buckingham L, Flaws L. M.** *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, & Clinical Applications*. (F.A. Davis Company, ed.). F.A. Davis Company; **2007**.
38. **Acar BA.** *Adli Tipta Vücut Sivılarının Tanımlanmasında Biyolojik Marker Olarak MikroRNA'nın Kullanımı*. Mersin Üniversitesi; **2019**.
39. **Fasken MB, Corbett AH.** Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nat Struct Mol Biol*. **2005**;12(6):482-488. doi:10.1038/nsmb945
40. **Alberts B. JA, LJ, RM, RK, WP.** *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Science; **2002**.
41. **Mattick JS, Gagen MJ.** The Evolution of Controlled Multitasked Gene Networks: The Role of Introns and Other Noncoding RNAs in the Development of Complex Organisms. *Mol Biol Evol*. **2001**;18(9):1611-1630. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003951
42. **Lewis BP, Burge CB, Bartel DP.** Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell*. **2005**;120(1):15-20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035
43. **Ainger K, Avossa D, Diana AS, Barry C, Barbarese E, Carson JH.** Transport and Localization Elements in Myelin Basic Protein mRNA. *J Cell Biol*. **1997**;138(5):1077-1087. doi:10.1083/jcb.138.5.1077

44. **Liang Y, Huang L, Liu T.** Development and Delivery Systems of mRNA Vaccines. *Front Bioeng Biotechnol.* **2021**;9. doi:10.3389/fbioe.2021.718753
45. **Sharp SJ, Schaack J, Cooley L, Burke DJ, Soil D.** Structure and Transcription of Eukaryotic tRNA Gene. *Critical Reviews in Biochemistry.* **1985**;19(2):107-144. doi:10.3109/10409238509082541
46. **Sloan KE, Warda AS, Sharma S, Entian KD, Lafontaine DLJ, Bohnsack MT.** Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA Biol.* **2017**;14(9):1138-1152. doi:10.1080/15476286.2016.1259781
47. **Ciganda M, Williams N.** Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *WIREs RNA.* **2011**;2(4):523-533. doi:10.1002/wrna.74
48. **Petrov AS, Bernier CR, Gulen B, et al.** Secondary Structures of rRNAs from All Three Domains of Life. *PLoS One.* 2014;9(2):e88222. doi:10.1371/journal.pone.0088222
49. **Wang W, Min L, Qiu X, et al.** Biological Function of Long Non-coding RNA (LncRNA) Xist. *Front Cell Dev Biol.* **2021**;9. doi:10.3389/fcell.2021.645647
50. **Bhan A, Mandal SS.** LncRNA HOTAIR: A master regulator of chromatin dynamics and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer.* **2015**;1856(1):151-164. doi:10.1016/j.bbcan.2015.07.001
51. **Perkel JM.** Visiting “Noncodarnia.” *Biotechniques.* **2013**;54(6):301-304. doi:10.2144/000114037
52. **Chowdhary A, Satagopam V, Schneider R.** Long Non-coding RNAs: Mechanisms, Experimental, and Computational Approaches in Identification, Characterization, and Their Biomarker Potential in Cancer. *Front Genet.* **2021**;12. doi:10.3389/fgene.2021.649619
53. Roundtree IA, Evans ME, Pan T, He C. Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell.* **2017**;169(7):1187-1200. doi:10.1016/j.cell.2017.05.045
54. **Helm M, Motorin Y.** Detecting RNA modifications in the epitranscriptome: predict and validate. *Nat Rev Genet.* **2017**;18(5):275-291. doi:10.1038/nrg.2016.169
55. **Frye M, Jaffrey SR, Pan T, Rechavi G, Suzuki T.** RNA modifications: what have we learned and where are we headed? *Nat Rev Genet.* **2016**;17(6):365-372. doi:10.1038/nrg.2016.47
56. **Frye M, Harada BT, Behm M, He C.** RNA modifications modulate gene expression during development. *Science (1979).* 2018;361(6409):1346-1349. doi:10.1126/science.aau1646
57. **Boccaletto P, Machnicka MA, Purta E, et al.** MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res.* **2018**;46(D1):D303-D307. doi:10.1093/nar/gkx1030
58. **Li X, Peng J, Yi C.** The epitranscriptome of small non-coding RNAs. *Noncoding RNA Res.* **2021**;6(4):167-173. doi:10.1016/j.ncrna.2021.10.002
59. **Stefani G, Slack FJ.** Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2008**;9(3):219-230. doi:10.1038/nrm2347
60. **Gebetsberger J, Wyss L, Mleczko AM, Reuther J, Polacek N.** A tRNA-derived fragment competes with mRNA for ribosome binding and regulates translation during stress. *RNA Biol.* **2017**;14(10):1364-1373. doi:10.1080/15476286.2016.1257470

61. **Esteller M.** Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* **2011**;12(12):861-874. doi:10.1038/nrg3074
62. **Cech TR, Steitz JA.** The Noncoding RNA Revolution—Trashing Old Rules to Forge New Ones. *Cell.* **2014**;157(1):77-94. doi:10.1016/j.cell.2014.03.008
63. **Bartel DP.** Metazoan MicroRNAs. *Cell.* **2018**;173(1):20-51. doi:10.1016/j.cell.2018.03.006
64. **Malone CD, Hannon GJ.** Small RNAs as Guardians of the Genome. *Cell.* **2009**;136(4):656-668. doi:10.1016/j.cell.2009.01.045
65. **Gou L, Dai P, Liu M.** Small noncoding RNAs and male infertility. *WIREs RNA.* **2014**;5(6):733-745. doi:10.1002/wrna.1252
66. **Wang Z, Liu N, Shi S, Liu S, Lin H.** The Role of PIWIL4, an Argonaute Family Protein, in Breast Cancer. *Journal of Biological Chemistry.* **2016**;291(20):10646-10658. doi:10.1074/jbc.M116.723239
67. **Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA.** PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2011**;12(4):246-258. doi:10.1038/nrm3089
68. **Czech B, Hannon GJ.** One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. *Trends Biochem Sci.* **2016**;41(4):324-337. doi:10.1016/j.tibs.2015.12.008
69. **Eslava-Avilés E, Arenas-Huertero F.** piRNAs: nature, biogenesis, regulation, and their potential clinical utility. *Bol Med Hosp Infant Mex.* **2021**;78(5). doi:10.24875/BMHIM.20000185
70. **Graveley BR.** Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends in Genetics.* **2001**;17(2):100-107. doi:10.1016/S0168-9525(00)02176-4
71. **Will CL, Luhrmann R.** Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2011**;3(7):a003707-a003707. doi:10.1101/cshperspect.a003707
72. **Jurica MS, Moore MJ.** Pre-mRNA Splicing. *Mol Cell.* **2003**;12(1):5-14. doi:10.1016/S1097-2765(03)00270-3
73. **Will CL, Luhrmann R.** Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2011**;3(7):a003707-a003707. doi:10.1101/cshperspect.a003707
74. **Cáceres JF, Kornblihtt AR.** Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends in Genetics.* **2002**;18(4):186-193. doi:10.1016/S0168-9525(01)02626-9
75. **Dvinge H, Kim E, Abdel-Wahab O, Bradley RK.** RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nat Rev Cancer.* **2016**;16(7):413-430. doi:10.1038/nrc.2016.51
76. **Kikuchi Y, Yamazaki N, Tarashima N, et al.** Gene suppression via U1 small nuclear RNA interference (U1i) machinery using oligonucleotides containing 2'-modified-4'-thionucleosides. *Bioorg Med Chem.* **2013**;21(17):5292-5296. doi:10.1016/j.bmc.2013.06.023
77. **Kiss T.** Small Nucleolar RNAs. *Cell.* **2002**;109(2):145-148. doi:10.1016/S0092-8674(02)00718-3
78. **Watkins NJ, Bohnsack MT.** The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *WIREs RNA.* **2012**;3(3):397-414. doi:10.1002/wrna.117

79. **Tyc K, Steitz JA.** U3, U8 and U13 comprise a new class of mammalian snRNPs localized in the cell nucleolus. *EMBO J.* **1989**;8(10):3113-3119. doi:10.1002/j.1460-2075.1989.tb08463.x
80. **Meier UT.** The many facets of H/ACA ribonucleoproteins. *Chromosoma.* **2005**;114(1):1-14. doi:10.1007/s00412-005-0333-9
81. **Filipowicz W, Pogačić V.** Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol.* **2002**;14(3):319-327. doi:10.1016/S0955-0674(02)00334-4
82. **Zheng D, Zhang J, Ni J, et al.** Small nucleolar RNA 78 promotes the tumorigenesis in non-small cell lung cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* **2015**;34(1):49. doi:10.1186/s13046-015-0170-5
83. **Siprashvili Z, Webster DE, Johnston D, et al.** The noncoding RNAs SNORD50A and SNORD50B bind K-Ras and are recurrently deleted in human cancer. *Nat Genet.* **2016**;48(1):53-58. doi:10.1038/ng.3452
84. **Liu X, Xie W, Meng S, et al.** Small Nucleolar RNAs and Their Comprehensive Biological Functions in Hepatocellular Carcinoma. *Cells.* **2022**;11(17):2654. doi:10.3390/cells11172654
85. **Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* **1993**;75(5):843-854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y
86. **Bartel DP.** MicroRNAs. *Cell.* **2004**;116(2):281-297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5
87. **Hayashi K, Chuva de Sousa Lopes SM, Kaneda M, et al.** MicroRNA Biogenesis Is Required for Mouse Primordial Germ Cell Development and Spermatogenesis. Heard E, ed. *PLoS One.* **2008**;3(3):e1738. doi:10.1371/journal.pone.0001738
88. **Ambros V.** The functions of animal microRNAs. *Nature.* **2004**;431(7006):350-355. doi:10.1038/nature02871
89. **Bartel DP.** MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell.* **2009**;136(2):215-233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
90. <https://www.mirbase.org/>.
91. **MacFarlane LA, R. Murphy P.** MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics.* **2010**;11(7):537-561. doi:10.2174/138920210793175895
92. **Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ.** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* **2001**;409(6818):363-366. doi:10.1038/35053110
93. **Kim VN, Han J, Siomi MC.** Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2009**;10(2):126-139. doi:10.1038/nrm2632
94. **Bartel DP.** MicroRNAs. *Cell.* **2004**;116(2):281-297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5
95. **Bofill-De Ros X, Vang Ørom UA.** Recent progress in miRNA biogenesis and decay. *RNA Biol.* **2024**;21(1):1-8. doi:10.1080/15476286.2023.2288741
96. **Liu J, Zhou F, Guan Y, et al.** The Biogenesis of miRNAs and Their Role in the Development of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells.* **2022**;11(3):572. doi:10.3390/cells11030572

97. **Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S.** Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* **2009**;11(3):228-234. doi:10.1038/ncb0309-228
98. **Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen CZ.** Erratum: Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat Rev Immunol.* **2008**;8(3):238-238. doi:10.1038/nri2280
99. **Ruby JG, Jan CH, Bartel DP.** Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature.* **2007**;448(7149):83-86. doi:10.1038/nature05983
100. **Rainer J, Ploner C, Jesacher S, et al.** Glucocorticoid-regulated microRNAs and mirtrons in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* **2009**;23(4):746-752. doi:10.1038/leu.2008.370
101. **Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC.** Mammalian Mirtron Genes. *Mol Cell.* **2007**;28(2):328-336. doi:10.1016/j.molcel.2007.09.028
102. **Lin SL, Chang D, Wu DY, Ying SY.** A novel RNA splicing-mediated gene silencing mechanism potential for genome evolution. *Biochem Biophys Res Commun.* **2003**;310(3):754-760. doi:10.1016/j.bbrc.2003.09.070
103. **Ying SY, Lin SL.** Intron-derived microRNAs—fine tuning of gene functions. *Gene.* **2004**;342(1):25-28. doi:10.1016/j.gene.2004.07.025
104. **Bartel DP.** MicroRNAs. *Cell.* **2004**;116(2):281-297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5
105. **Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R.** Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs: Table 1. *Genes Dev.* **2006**;20(5):515-524. doi:10.1101/gad.1399806
106. **Liu J, Carmell MA, Rivas F V., et al.** Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science (1979).* **2004**;305(5689):1437-1441. doi:10.1126/science.1102513
107. **Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T.** Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell.* **2004**;15(2):185-197. doi:10.1016/j.molcel.2004.07.007
108. **Eisen TJ, Eichhorn SW, Subtelny AO, Bartel DP.** MicroRNAs Cause Accelerated Decay of Short-Tailed Target mRNAs. *Mol Cell.* **2020**;77(4):775-785.e8. doi:10.1016/j.molcel.2019.12.004
109. **Iwakawa H, Tomari Y.** Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Mol Cell.* **2022**;82(1):30-43. doi:10.1016/j.molcel.2021.11.026
110. **Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA.** Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. *Mol Cell.* **2006**;21(4):533-542. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.031
111. **PILLAI RS.** MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA?: FIGURE 1. *RNA.* **2005**;11(12):1753-1761. doi:10.1261/rna.2248605
112. **Coller J, Parker R.** Eukaryotic mRNA Decapping. *Annu Rev Biochem.* **2004**;73(1):861-890. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074032
113. **Cougot N, Babajko S, Séraphin B.** Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol.* **2004**;165(1):31-40. doi:10.1083/jcb.200309008

114. **Parker R, Sheth U.** P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Mol Cell.* **2007**;25(5):635-646. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.011
115. **Chan SP, Slack FJ.** microRNA-Mediated Silencing Inside P Bodies. *RNA Biol.* **2006**;3(3):97-100. doi:10.4161/rna.3.3.3499
116. **Liu J, Rivas F V., Wohlschlegel J, Yates JR, Parker R, Hannon GJ.** A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol.* **2005**;7(12):1261-1266. doi:10.1038/ncb1333
117. **Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R.** MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol.* **2005**;7(7):719-723. doi:10.1038/ncb1274
118. **Chu C ying, Rana TM.** Translation Repression in Human Cells by MicroRNA-Induced Gene Silencing Requires RCK/p54. *PLoS Biol.* **2006**;4(7):e210. doi:10.1371/journal.pbio.0040210
119. **Andrei Ma, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Lührmann R.** A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA.* **2005**;11(5):717-727. doi:10.1261/rna.2340405
120. **Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, et al.** Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol.* **2005**;169(6):871-884. doi:10.1083/jcb.200502088
121. **Kahvejian A, Svitkin Y V., Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N.** Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.* **2005**;19(1):104-113. doi:10.1101/gad.1262905
122. **Jakymiw A, Pauley KM, Li S, et al.** The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing. *J Cell Sci.* **2007**;120(8):1317-1323. doi:10.1242/jcs.03429
123. **Anderson S, Howard B, Hobbs GR, Bishop CP.** A method for determining the age of a bloodstain. *Forensic Sci Int.* **2005**;148(1):37-45. doi:10.1016/j.forsciint.2004.04.071
124. **Bauer M, Polzin S, Patzelt D.** Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains? *Forensic Sci Int.* **2003**;138(1-3):94-103. doi:10.1016/j.forsciint.2003.09.008
125. **Zha S, Wei X, Fang R, et al.** Estimation of the age of human semen stains by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a preliminary study. *Forensic Sci Res.* **2020**;5(2):119-125. doi:10.1080/20961790.2019.1642567
126. **Shine SM, Suhling K, Beavil A, Daniel B, Frascione N.** The applicability of fluorescence lifetime to determine the time since the deposition of biological stains. *Analytical Methods.* **2017**;9(13):2007-2013. doi:10.1039/C6AY03099H
127. **Manasatienkij C, Nimnual A.** Forensic blood stain aging using reverse transcription real-time PCR. *Forensic Science International: Reports.* **2021**;3:100205. doi:10.1016/j.fsir.2021.100205
128. **Fang C, Zhao J, Li J, et al.** Massively parallel sequencing of microRNA in bloodstains and evaluation of environmental influences on miRNA candidates using realtime polymerase chain reaction. *Forensic Sci Int Genet.* **2019**;38:32-38. doi:10.1016/j.fsigen.2018.10.001

129. **Singh P, Ali W, Sandhu S, et al.** Post-mortem interval estimation using miRNAs of road traffic accident cases: A forensic molecular approach. *Science & Justice*. 2023;63(4):485-492. doi:10.1016/j.scijus.2023.04.011
130. **Lv Y, Ma K, Zhang H, et al.** A Time Course Study Demonstrating m *scp*>RNA</i> , micro *scp*>RNA</i> , 18 *scp*>S</i> r *scp*>RNA</i> , and *scp*>U</i> 6 sn *scp*>RNA</i> Changes to Estimate *scp*>PMI</i> in Deceased Rat's Spleen. *J Forensic Sci*. 2014;59(5):1286-1294. doi:10.1111/1556-4029.12447
131. **Odriozola A, Riancho JA, de la Vega R, et al.** miRNA analysis in vitreous humor to determine the time of death: a proof-of-concept pilot study. *Int J Legal Med*. 2013;127(3):573-578. doi:10.1007/s00414-012-0811-6
132. **Corradini B, Alù M, Radheshi E, et al.** Estimation of the time of death through the analysis of clock miRNAs expression in blood and vitreous humor. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2015;5:e204-e206. doi:10.1016/j.fsigss.2015.09.082
133. **Singh P, Ali W, Sandhu S, et al.** Post-mortem interval estimation using miRNAs of road traffic accident cases: A forensic molecular approach. *Science & Justice*. 2023;63(4):485-492. doi:10.1016/j.scijus.2023.04.011
134. **Yu S, Na JY, Lee YJ, Kim KT, Park JT, Kim HS.** Forensic application of microRNA-706 as a biomarker for drowning pattern identification. *Forensic Sci Int*. 2015;255:96-101. doi:10.1016/j.forsciint.2015.06.011
135. **Sun T yi, Chen X rui, Liu Z long, et al.** Expression profiling of MicroRNAs in hippocampus of rats following traumatic brain injury. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. 2014;34(4):548-553. doi:10.1007/s11596-014-1313-1
136. **Courts C, Grabmüller M, Madea B.** Dysregulation of heart and brain specific micro-RNA in sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int*. 2013;228(1-3):70-74. doi:10.1016/j.forsciint.2013.02.032
137. **Roeder AD, Haas C.** Body Fluid Identification Using mRNA Profiling. In: ; 2016:13-31. doi:10.1007/978-1-4939-3597-0_2
138. **Auer H, Lyianarachchi S, Newsom D, Klisovic MI, Marcucci U, Kornacker K.** Chipping away at the chip bias: RNA degradation in microarray analysis. *Nat Genet*. 2003;35(4):292-293. doi:10.1038/ng1203-292
139. **Courts C, Madea B.** Micro-RNA – A potential for forensic science ? §. *Forensic Sci Int*. 2010;203(1-3):106-111. doi:10.1016/j.forsciint.2010.07.002
140. **Kakimoto Y, Kamiguchi H, Ochiai E, Satoh F, Osawa M.** MicroRNA Stability in Postmortem FFPE Tissues: Quantitative Analysis Using Autoptic Samples from Acute Myocardial Infarction Patients. Hosoda T, ed. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129338. doi:10.1371/journal.pone.0129338
141. **Peiró-Chova L, Peña-Chilet M, López-Guerrero JA, et al.** High stability of microRNAs in tissue samples of compromised quality. *Virchows Archiv*. 2013;463(6):765-774. doi:10.1007/s00428-013-1485-2
142. **Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J.** Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem*. 2009;387(2):303-314. doi:10.1016/j.ab.2009.01.037

143. **Zubakov D, Boersma AWM, Choi Y, Van Kuijk PF, Wiemer EAC, Kayser M.** MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. Published online **2010**. doi:10.1007/s00414-009-0402-3
144. **Wang Z, Zhang J, Luo H, Ye Y, Yan J, Hou Y.** Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet.* **2013**;7(1):116-123. doi:10.1016/J.FSIGEN.2012.07.006
145. **Sirker M, Fimmers R, Schneider PM, Gomes I.** Evaluating the forensic application of 19 target microRNAs as biomarkers in body fluid and tissue identification. *Forensic Sci Int Genet.* **2017**;27:41-49. doi:10.1016/j.fsigen.2016.11.012
146. **Sauer E, Reinke AK, Courts C.** Differentiation of five body fluids from forensic samples by expression analysis of four microRNAs using quantitative PCR. *Forensic Sci Int Genet.* **2016**;22:89-99. doi:10.1016/J.FSIGEN.2016.01.018
147. **Pantano L, Jodar M, Bak M, et al.** The small RNA content of human sperm reveals pseudogene-derived piRNAs complementary to protein-coding genes. *RNA.* 2015;21(6):1085-1095. doi:10.1261/rna.046482.114
148. **Mayes C, Seashols-Williams S, Hughes-Stamm S.** A capillary electrophoresis method for identifying forensically relevant body fluids using miRNAs. *Leg Med.* **2018**;30:1-4. doi:10.1016/J.LEGALMED.2017.10.013
149. **He H, Ji A, Zhao Y, et al.** A stepwise strategy to distinguish menstrual blood from peripheral blood by Fisher's discriminant function. *Int J Legal Med.* 2020;134(3):845-851. doi:10.1007/s00414-019-02196-w
150. **Banerjee J, Chan YC, Sen CK.** MicroRNAs in skin and wound healing. *Physiol Genomics.* **2011**;43(10):543-556. doi:10.1152/physiolgenomics.00157.2010
151. **Ludwig N, Leidinger P, Becker K, et al.** Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res.* **2016**;44(8):3865-3877. doi:10.1093/nar/gkw116
152. **Neville MJ, Collins JM, Gloyn AL, McCarthy MI, Karpe F.** Comprehensive Human Adipose Tissue mRNA and MicroRNA Endogenous Control Selection for Quantitative Real-Time-PCR Normalization. Published online **2011**. doi:10.1038/oby.2010.257
153. **Li H, Li T, Wang S, et al.** miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res.* **2013**;10(3):313-324. doi:10.1016/j.scr.2012.11.007
154. **Klötting N, Berthold S, Kovacs P, et al.** MicroRNA Expression in Human Omental and Subcutaneous Adipose Tissue. Polidori C, ed. *PLoS One.* **2009**;4(3):e4699. doi:10.1371/journal.pone.0004699
155. **Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T.** Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. *Current Biology.* **2002**;12(9):735-739. doi:10.1016/S0960-9822(02)00809-6
156. **Courts C, Grabmüller M, Madea B.** Dysregulation of heart and brain specific micro-RNA in sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int.* **2013**;228(1-3):70-74. doi:10.1016/J.FORSCIINT.2013.02.032

157. **Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N.** Plasma miR-208 as a Biomarker of Myocardial Injury. Published online **2009**. doi:10.1373/clinchem.2009.125310
158. **Wang CJ, Guo HX, Han DX, et al.** Pituitary tissue-specific miR-7a-5p regulates FSH expression in rat anterior adenohypophyseal cells. *PeerJ*. **2019**;7:e6458. doi:10.7717/peerj.6458
159. **Wainwright EN, Jorgensen JS, Kim Y, et al.** SOX9 Regulates MicroRNA miR-202-5p/3p Expression During Mouse Testis Differentiation 1. *Biol Reprod*. **2013**;89(2):1-12. doi:10.1095/biolreprod.113.110155
160. **Hu L, Wu C, Guo C, Li H, Xiong C.** Identification of microRNAs predominately derived from testis and epididymis in human seminal plasma. *Clin Biochem*. **2014**;47(10-11):967-972. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.11.009
161. **Li Y, Wang HY, Wan FC, et al.** Deep sequencing analysis of small non-coding RNAs reveals the diversity of microRNAs and piRNAs in the human epididymis. *Gene*. **2012**;497(2):330-335. doi:10.1016/J.GENE.2012.01.038
162. **Xu S, Witmer PD, Lumayag S, Kovacs B, Valle D.** MicroRNA (miRNA) Transcriptome of Mouse Retina and Identification of a Sensory Organ-specific miRNA Cluster. *Journal of Biological Chemistry*. **2007**;282(34):25053-25066. doi:10.1074/jbc.M700501200
163. **Wang Z, Zhang J, Luo H, Ye Y, Yan J, Hou Y.** Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet*. **2013**;7(1):116-123. doi:10.1016/j.fsigen.2012.07.006
164. **Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA.** Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. **2007**;449(7163):682-688. doi:10.1038/nature06174
165. **Lund AH.** miR-10 in development and cancer. *Cell Death Differ*. **2010**;17(2):209-214. doi:10.1038/cdd.2009.58
166. **Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al.** MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2006**;103(13):5078-5083. doi:10.1073/pnas.0600587103
167. **Han L, Witmer PD, Casey E, Valle D, Sukumar S.** DNA methylation regulates microRNA expression. *Cancer Biol Ther*. **2007**;6(8):1290-1294. doi:10.4161/cbt.6.8.4486
168. **Agirre X, Jimenez-Velasco A, San Jose-Eneriz E, et al.** Down-Regulation of hsa-miR-10a in Chronic Myeloid Leukemia CD34+ Cells Increases USF2-Mediated Cell Growth. *Molecular Cancer Research*. **2008**;6(12):1830-1840. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0167
169. **Schneider C, Kässens N, Greve B, et al.** Targeting of syndecan-1 by micro-ribonucleic acid miR-10b modulates invasiveness of endometriotic cells via dysregulation of the proteolytic milieu and interleukin-6 secretion. *Fertil Steril*. **2013**;99(3):871-881.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2012.10.051
170. **Ibrahim SA, Yip GW, Stock C, et al.** Targeting of syndecan-1 by microRNA miR-10b promotes breast cancer cell motility and invasiveness via a Rho-GTPase- and E-cadherin-dependent mechanism. *Int J Cancer*. **2012**;131(6):E884-E896. doi:10.1002/ijc.27629

171. **Nagel R, le Sage C, Diosdado B, et al.** Regulation of the Adenomatous Polyposis Coli Gene by the miR-135 Family in Colorectal Cancer. *Cancer Res.* **2008**;68(14):5795-5802. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0951
172. **Holleman A, Chung I, Olsen RR, et al.** miR-135a contributes to paclitaxel resistance in tumor cells both in vitro and in vivo. *Oncogene.* **2011**;30(43):4386-4398. doi:10.1038/onc.2011.148
173. **Yang X, WANG X, NIE F, et al.** miR-135 family members mediate podocyte injury through the activation of Wnt/ β -catenin signaling. *Int J Mol Med.* **2015**;36(3):669-677. doi:10.3892/ijmm.2015.2259
174. **Jia L, Liu W, Cao B, Li H, Yin C.** MiR-507 inhibits the migration and invasion of human breastcancer cells through Flt-1 suppression. *Oncotarget.* **2016**;7(24):36743-36754. doi:10.18632/oncotarget.9163
175. **Mueller DW, Rehli M, Bosserhoff AK.** miRNA Expression Profiling in Melanocytes and Melanoma Cell Lines Reveals miRNAs Associated with Formation and Progression of Malignant Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology.* **2009**;129(7):1740-1751. doi:10.1038/jid.2008.452
176. **Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al.** A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. **2009**;129(7):1401-1414. doi:10.1016/j.cell.2007.04.040.A
177. **Lewis H, Lance R, Troyer D, et al.** miR-888 is an expressed prostatic secretions-derived microRNA that promotes prostate cell growth and migration. *Cell Cycle.* **2014**;13(2):227-239. doi:10.4161/cc.26984
178. **Hovey AM, Devor EJ, Breheny PJ, et al.** miR-888: A Novel Cancer-Testis Antigen that Targets the Progesterone Receptor in Endometrial Cancer. *Transl Oncol.* **2015**;8(2):85-96. doi:10.1016/j.tranon.2015.02.001
179. **Gao S, Chen L, Lu W, Zhang L, Wang L, Zhu H.** miR-888 functions as an oncogene and predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Oncol Lett.* Published online April 11, **2018**. doi:10.3892/ol.2018.8461
180. **Salas-Huetos A, Blanco J, Vidal F, Mercader JM, Garrido N, Anton E.** New insights into the expression profile and function of micro-ribonucleic acid in human spermatozoa. *Fertil Steril.* **2014**;102(1). doi:10.1016/j.fertnstert.2014.03.040
181. **Zha R, Guo W, Zhang Z, et al.** Genome-Wide Screening Identified That miR-134 Acts as a Metastasis Suppressor by Targeting Integrin β 1 in Hepatocellular Carcinoma. Coleman WB, ed. *PLoS One.* **2014**;9(2):e87665. doi:10.1371/journal.pone.0087665
182. **Zhang Z, Xu L, He L, et al.** MiR-891a-5p as a prognostic marker and therapeutic target for hormone receptor-positive breast cancer. *J Cancer.* **2020**;11(13):3771-3782. doi:10.7150/jca.40750
183. **Braoudaki M, Lambrou GI, Giannikou K, et al.** Microrna expression signatures predict patient progression and disease outcome in pediatric embryonal central nervous system neoplasms. *J Hematol Oncol.* **2014**;7(1):96. doi:10.1186/s13045-014-0096-y
184. **Belleannée C, Calvo E, Thimon V, et al.** Role of MicroRNAs in Controlling Gene Expression in Different Segments of the Human Epididymis. Drevet JR, ed. *PLoS One.* **2012**;7(4):e34996. doi:10.1371/journal.pone.0034996

185. **Yu F, Shen XY, Fan L, Yu ZC.** Genome-wide analysis of genetic variations assisted by Ingenuity Pathway Analysis to comprehensively investigate potential genetic targets associated with the progression of hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* **2014**;18(15):2102-2108.
186. **Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A.** Patterns of Known and Novel Small RNAs in Human Cervical Cancer. *Cancer Res.* **2007**;67(13):6031-6043. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0561
187. **Hessvik NP, Phuyal S, Brech A, Sandvig K, Llorente A.** Profiling of microRNAs in exosomes released from PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* **2012**;1819(11-12):1154-1163. doi:10.1016/j.bbagr.2012.08.016
188. **Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X.** MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis. *Chem Rev.* **2013**;113(8):6207-6233. doi:10.1021/cr300362f
189. **Roush S, Slack FJ.** The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol.* **2008**;18(10):505-516. doi:10.1016/j.tcb.2008.07.007
190. **Jet T, Gines G, Rondelez Y, Taly V.** Advances in multiplexed techniques for the detection and quantification of microRNAs. *Chem Soc Rev.* **2021**;50(6):4141-4161. doi:10.1039/D0CS00609B
191. **Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP.** Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods.* **2007**;3(1):12. doi:10.1186/1746-4811-3-12
192. **Raymond Ck, Roberts Bs, Garrett-Engle P, Lim Lp, Johnson JM.** Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA.* **2005**;11(11):1737-1744. doi:10.1261/rna.2148705
193. **Chen C.** Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2005**;33(20):e179-e179. doi:10.1093/nar/gni178
194. **Veryaskina YA, Titov SE, Ivanov MK, et al.** Selection of reference genes for quantitative analysis of microRNA expression in three different types of cancer. *PLoS One.* **2022**;17(2):e0254304. doi:10.1371/journal.pone.0254304
195. **Daubendiek SL, Ryan K, Kool ET.** Rolling-Circle RNA Synthesis: Circular Oligonucleotides as Efficient Substrates for T7 RNA Polymerase. *J Am Chem Soc.* **1995**;117(29):7818-7819. doi:10.1021/ja00134a032
196. **Qian J, Ferguson TM, Shinde DN, et al.** Sequence dependence of isothermal DNA amplification via EXPAR. *Nucleic Acids Res.* **2012**;40(11):e87-e87. doi:10.1093/nar/gks230
197. **Tan E, Erwin B, Dames S, et al.** Specific versus Nonspecific Isothermal DNA Amplification through Thermophilic Polymerase and Nicking Enzyme Activities. *Biochemistry.* **2008**;47(38):9987-9999. doi:10.1021/bi800746p
198. **Cheng Y, Dong L, Zhang J, Zhao Y, Li Z.** Recent advances in microRNA detection. *Analyst.* **2018**;143(8):1758-1774. doi:10.1039/C7AN02001E
199. **Jia H, Li Z, Liu C, Cheng Y.** Ultrasensitive Detection of microRNAs by Exponential Isothermal Amplification. *Angewandte Chemie International Edition.* **2010**;49(32):5498-5501. doi:10.1002/anie.201001375

200. **Tan E, Wong J, Nguyen D, et al.** Isothermal DNA Amplification Coupled with DNA Nanosphere-Based Colorimetric Detection. *Anal Chem.* **2005**;77(24):7984-7992. doi:10.1021/ac051364i
201. **Van Ness J, Van Ness LK, Galas DJ.** Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **2003**;100(8):4504-4509. doi:10.1073/pnas.0730811100
202. **Gines G, Menezes R, Xiao W, Rondelez Y, Taly V.** Emerging isothermal amplification technologies for microRNA biosensing: Applications to liquid biopsies. *Mol Aspects Med.* **2020**;72:100832. doi:10.1016/j.mam.2019.11.002
203. **Schwarzkopf M, Pierce NA.** Multiplexed miRNA northern blots via hybridization chain reaction. *Nucleic Acids Res.* Published online June 7, **2016**:gkw503. doi:10.1093/nar/gkw503
204. **Choi HMT, Beck VA, Pierce NA.** Next-Generation *in Situ* Hybridization Chain Reaction: Higher Gain, Lower Cost, Greater Durability. *ACS Nano.* **2014**;8(5):4284-4294. doi:10.1021/nn405717p
205. **Guo Q, Bian F, Liu Y, Qu X, Hu X, Sun Q.** Hybridization chain reactions on silica coated Qbeads for the colorimetric detection of multiplex microRNAs. *Chemical Communications.* **2017**;53(36):4954-4957. doi:10.1039/C7CC00462A
206. **Choi HMT, Chang JY, Trinh LA, Padilla JE, Fraser SE, Pierce NA.** Programmable *in situ* amplification for multiplexed imaging of mRNA expression. *Nat Biotechnol.* **2010**;28(11):1208-1212. doi:10.1038/nbt.1692
207. **Venkataraman S, Dirks RM, Rothmund PWK, Winfree E, Pierce NA.** An autonomous polymerization motor powered by DNA hybridization. *Nat Nanotechnol.* **2007**;2(8):490-494. doi:10.1038/nnano.2007.225
208. **Dirks RM, Pierce NA.** Triggered amplification by hybridization chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **2004**;101(43):15275-15278. doi:10.1073/pnas.0407024101
209. **Na J, Shin GW, Son HG, Lee SJ V., Jung GY.** Multiplex quantitative analysis of microRNA expression via exponential isothermal amplification and conformation-sensitive DNA separation. *Sci Rep.* **2017**;7(1):11396. doi:10.1038/s41598-017-11895-6
210. **Wei K, Zhao J, Qin Y, Li S, Huang Y, Zhao S.** A novel multiplex signal amplification strategy based on microchip electrophoresis platform for the improved separation and detection of microRNAs. *Talanta.* **2018**;189:437-441. doi:10.1016/j.talanta.2018.07.037
211. **Jiang RM, Chang YS, Chen SJ, Chen JH, Chen HC, Chang PL.** Multiplexed microRNA detection by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. *J Chromatogr A.* **2011**;1218(18):2604-2610. doi:10.1016/j.chroma.2011.02.061
212. **Zhang P, Liu Y, Zhang Y, Liu C, Wang Z, Li Z.** Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for ultrasensitive multiplexed microRNA detection using ribonucleotide-modified DNA probes. *Chemical Communications.* **2013**;49(85):10013. doi:10.1039/c3cc45760e
213. **Glenn TC.** Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour.* **2011**;11(5):759-769. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x

214. **Dave VP, Ngo TA, Pernestig AK, et al.** MicroRNA amplification and detection technologies: opportunities and challenges for point of care diagnostics. *Laboratory Investigation*. **2019**;99(4):452-469. doi:10.1038/s41374-018-0143-3
215. **Barberán-Soler S, Vo JM, Hogans RE, Dallas A, Johnston BH, Kazakov SA.** Decreasing miRNA sequencing bias using a single adapter and circularization approach. *Genome Biol*. **2018**;19(1):105. doi:10.1186/s13059-018-1488-z
216. **Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, et al.** Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol*. 2004;5(9):R68. doi:10.1186/gb-2004-5-9-r68
217. **Baskerville S, Bartel Dp.** Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*. **2005**;11(3):241-247. doi:10.1261/rna.7240905
218. **Liu CG, Calin GA, Meloon B, et al.** An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2004**;101(26):9740-9744. doi:10.1073/pnas.0403293101
219. **Luo XY, Li ZL, Peng D, Wang L, Zhang L, Liang WB.** MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from miRCURY™ LNA array. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. **2015**;5:e630-e632. doi:10.1016/j.fsigs.2015.10.006
220. **He H, Han N, Ji C, et al.** Identification of five types of forensic body fluids based on stepwise discriminant analysis. *Forensic Sci Int Genet*. 2020;48:102337. doi:10.1016/j.fsigen.2020.102337
221. **Seashols-Williams S, Lewis C, Calloway C, et al.** High-throughput miRNA sequencing and identification of biomarkers for forensically relevant biological fluids. *Electrophoresis*. **2016**;37(21):2780-2788. doi:10.1002/elps.201600258
222. **Mayes C, Seashols-Williams S, Hughes-Stamm S.** A capillary electrophoresis method for identifying forensically relevant body fluids using miRNAs. *Leg Med*. **2018**;30:1-4. doi:10.1016/j.legalmed.2017.10.013
223. **Fujimoto S, Manabe S, Morimoto C, et al.** Distinct spectrum of microRNA expression in forensically relevant body fluids and probabilistic discriminant approach. *Sci Rep*. **2019**;9(1):14332. doi:10.1038/s41598-019-50796-8
224. **Sauer E, Babion I, Madea B, Courts C.** An evidence based strategy for normalization of quantitative PCR data from miRNA expression analysis in forensic organ tissue identification. *Forensic Sci Int Genet*. **2014**;13:217-223. doi:10.1016/j.fsigen.2014.08.005
225. **Lewis CA, Layne TR, Seashols-Williams SJ.** Detection of microRNAs in DNA Extractions for Forensic Biological Source Identification. *J Forensic Sci*. 2019;64(6):1823-1830. doi:10.1111/1556-4029.14070
226. **Lancia M, Severini S, Tommolini F, Carnevali E.** The appropriateness of analysing some known micro-RNAs to detect the presence of semen in old stains. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2019;7(1):498-500. doi:10.1016/j.fsigs.2019.10.066
227. **Tian H, Lv M, Li Z, et al.** Semen-specific miRNAs: Suitable for the distinction of infertile semen in the body fluid identification? *Forensic Sci Int Genet*. **2018**;33:161-167. doi:10.1016/j.fsigen.2017.12.010

228. **Fujimoto S, Manabe S, Morimoto C, Hamano Y, Tamaki K.** Effect of the absence of spermatozoa on microRNA-based semen identification. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* **2017**;6:e238-e240. doi:10.1016/j.fsigss.2017.09.099



EKLER

EK-1. Akademik Kurul Kararı 1

01/06/2021-105306

Ç.Ü. BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ YÖNETİM KURULU KARARLARI

TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI	TOPLANTI TARİHİ
8	2	26.05.2021

26.05.2021 tarihinde saat 13 00'da toplanan Enstitü Yönetim Kurulunca aşağıdaki kararlar oy birliği ile kabul edildi.

Karar-2: Adli Bilimler Anabilim Dalı 2018944004 No'lu Doktora öğrencisi Mustafa Ürün AY'ın tez önerisinin kabulüne ait 01.04.2021 tarihli ve 4/1 No'lu Akademik Kurulu Kararı görüşüldü.

Adli Bilimler Anabilim Dalı 2018944004 No'lu Doktora öğrencisi Mustafa Ürün AY'ın “**Çeşitli miRNA Belirteçlerinin Semen Özgüllüğünün Araştırılması**” başlıklı tez önerisine ait Akademik Kurulu Kararının kabulüne ve kararın Anabilim Dalı ile öğrencinin Danışmanına bildirilmesine oy birliği ile karar verildi.

EK-2. Etik Kurul Kararı

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Sayısı		Tarih
110		2 Nisan 2021

KARAR NO 29- Çukurova Üniversitesi Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Bilimler Anabilim Dalı'nda, Prof. Dr. Ayşe Serin yönetiminde, Doktora Öğrencisi Mustafa Ürün Ay tarafından yürütülmesi öngörülen, "Çeşitli miRNA Belirteçlerinin Semen Özgünlüğünün Araştırılması" başlıklı doktora tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

EK-3. Tez Çalışma İzni Yazısı ve Kararı 1

21/05/2021-99163



T.C.
DAHİLİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜM BAŞKANLIĞI
Adli Tıp Anabilim Dalı Başkanlığı

Sayı :E-54014131-302.08.01-81326
Konu :Tez çalışması izni hk.

19/04/2021

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 77528185 - 15/04/2021 tarihli, 79504 sayılı ve "Tez çalışması izni hk." konulu yazı,

Çukurova Üniversitesi Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsünün 14.04.2021 tarih ve E.79109 sayılı, Adli Bilimler Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Mustafa Ürün AY'ın "Çeşitli miRNA Belirteçlerinin Semen Özgünlüğünün Araştırılması" başlıklı tez çalışmasının Adli Genetik Laboratuvarımızda yapılması Anabilim Dalımızca uygun görülmüştür.
Gereği bilgilerinize arz olunur.

EK-4. Tez Çalışma İzni Yazısı ve Kararı 2

21/05/2021-99163



T.C.
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Fakülte Sekreterliği

Sayı : E-77528185-302.08.01-99163
Konu : Tez Çalışması İzni (Mustafa Ürün AY)

21/05/2021

BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 57861215 - 14/04/2021 tarihli, 79109 sayılı ve "Tez Çalışması İzni (Mustafa Ürün AY)"
konulu yazı,

Adli Tıp Anabilim Dalı Başkanlığının 19.04.2021 tarih ve 81326 sayılı, Adli Bilimler Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Mustafa Ürün AY'ın "Çeşitli miRNA Belirteçlerinin Semen Özgünlüğünün Araştırılması" başlıklı tez çalışmasının Adli Genetik Laboratuvarında yapılması ile ilgili yazısı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

ÖZGEÇMİŞ

