

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP ve ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Doç. Dr. Özlem Bülbül ERCAN

DNA METİLASYONU İLE YAŞ TAHMİNİNİN LÖSEMİ HASTALARINDA
DEĞERLENDİRİLMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG KADRIYE CAN
İSTANBUL, 2023

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP ve ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Doç. Dr. Özlem Bülbül ERCAN

DNA METİLASYONU İLE YAŞ TAHMİNİNİN LÖSEMİ HASTALARINDA
DEĞERLENDİRİLMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG KADRIYE CAN
İSTANBUL, 2023

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

Proje No: 36235

BEYAN

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

İTHAF

Benim bugünlere gelmem için maddi ve manevi destek sağlamış her daim yanımda olamasalar da yüreğimde olacak olan rahmetli annem Hadice CAN ve rahmetli babam Ömer CAN'a ithafen sonsuz minnet ve sevgimle...

Kadriye Can

İstanbul, Haziran, 2023

ÖNSÖZ

Tezime başladığım günden itibaren bilgi birikimi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve her daim desteğini esirgemeyen yol gösteren ve moral desteğiyle birlikte yanımda olan hocam *Doç. Dr. Özlem Bülbül Ercan*'a,

Örnek toplama sürecinde lösemi grubu için İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi- İç Hastalıklar Anabilim Dalı- Hematoloji Bölümünden *Prof. Dr. M. Cem Ar* ve tüm poliklinik doktorlarına ve çalışmaya rıza gösteren tüm gönüllülerime,

Laboratuvar deneyleri sürecinde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan *Uzm. Bio. Sümeyye Zülal Şimşek, Uzm. Bio. Melek Şenışık ve Mol. Bio. Sena Er* ve laboratuvarıda bana destek olan arkadaşlarım *Biyomühendis Nursena Keskin, Mol. Bio. Zehra Abik ve Laborant Hüsamettin Kılıç*'a

Benimle canla başla örnek toplayan ablam *Songül Gündoğdu*'ya ve diğer tüm gönüllülerime, manevi ve moral desteği için ablalarım *Ferahnaz Can ve Süreyya Can*'a sonsuz teşekkür ederim.

Kadriye CAN

İstanbul, Haziran, 2023

İÇİNDEKİLER

İçindekiler.....	v
Şekiller Dizini.....	viii
Tablolar Dizini.....	x
Ekler.....	xi
Kısaltmalar.....	xii
Özet ve Anahtar Kelimeler.....	1
Summary.....	2
1. GİRİŞ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. EPİGENETİK.....	6
2.1.1. Histon modifikasyonu.....	7
2.1.2. Kodlanmayan RNA.....	9
2.1.3. DNA Metilasyonu.....	10
2.2. Adli Bilimlerde Epigenetik Yaklaşım Kullanımı.....	13
2.2.1. Vücut Sıvılarının ve Dokularının Tanımlanması.....	14
2.2.2. Monozigotik İkizler.....	15
2.2.3. Yaş Tahmini.....	16
2.2.3.1. DNA Metilasyonu ile Yaş Tahmini.....	19
2.2.3.1.1. DNA Metilasyonu Analizinde Kullanılan Yöntemler...21	
2.3. KANSER.....	22
2.3.1. Kanser Genetiği.....	23
2.3.2. DNA Metilasyonunun Kanser ile İlişkisi	24
2.4. LÖSEMİ	27
2.4.1. Akut Lösemi.....	28

2.4.1.1. Akut Miyeloid Lösemi (AML).....	29
2.4.1.2. Akut Lenfositik Lösemi (ALL).....	30
2.4.2. Kronik Lösemiler.....	31
2.4.2.1. Kronik Miyeloid Lösemi (KML).....	31
2.4.2.2. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL).....	33
2.5. Adli Bilimlerde Yaş Tahmininde Kanser ile İlişkili Çalışmalar.....	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Kullanılan Gereçler	37
3.1.1. Ekipman.....	37
3.1.2. Ticari Kit ve Harici Malzemeler.....	38
3.2. Deney Aşaması.....	38
3.2.1. Örneklerin Toplanması.....	39
3.2.2. DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini.....	41
3.2.3. Bisülfıt Dönüşümü.....	41
3.2.4. PCR.....	41
3.2.4.1. PCR Koşulları.....	42
3.2.4.2. Agaroz Jel Elektforezi.....	43
3.2.4.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	44
3.2.4.4. SNaPshot Reaksiyonu.....	44
3.2.4.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	45
3.2.4.6. Kapiller Elektforez.....	46
3.3. Veri Analizi.....	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini.....	48
4.2. Bisülfıt Dönüşümü.....	49

4.3. Kapiller Elektroforez Aşaması.....	50
4.4. İstatistiksel Analiz.....	51
4.4.1. Metilasyon Değerleri.....	51
4.4.2. Korelasyon ve Lineer Regresyon Grafikleri.....	57
4.4.3. Yaş Tahmini.....	62
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	68
5.1. Yaş Tahmini Değerlendirilmesi	75
6. KAYNAKÇA.....	79
7. EKLER.....	91
8. ÖZGEÇMİŞ.....	97

ŞEKİLLER

Şekil 1. Epigenetik mekanizmalar.....	7
Şekil 2. Histon modifikasyon mekanizmaları	8
Şekil 3. Histon asetilasyon ve metilasyon şeması	9
Şekil 4. Sitozin nükleotidinin metilasyon ve demetilasyonu.....	11
Şekil 5. DNA metil transferazların fonksiyonları.....	12
Şekil 6. CpG adalarında hipometilasyon ve hipermetilasyon şeması.....	13
Şekil 7. Sodyum bisülfid işleminde metillenmemiş sitozinin urasile dönüşümü.....	22
Şekil 8. Hücre döngüsü.....	24
Şekil 9. Kanserde metilasyon değişimi.....	28
Şekil 10. Philedelphia (Ph) kromozomunun oluşum şeması.....	33
Şekil 11. Çalışma grubunun lösemi tiplerine göre dağılımı.....	40
Şekil 12. Çalışma grubunun yaş aralığına göre dağılımı.....	40
Şekil 13. Metilasyon oranı hesaplama formülü.....	47
Şekil 14. Metilasyon PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	50
Şekil 15. Kandan yaş tahmini metilasyon paneli ile çalışılmış örnek bir elektroforegram görüntüsü.....	50
Şekil 16. ASPA geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği.....	58
Şekil 17. C1orf132 geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği	58
Şekil 18. CCDC102B geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği.....	59
Şekil 19. Cg07082267 geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği.....	59

Şekil 20. ELOVL2 geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği.....	60
Şekil 21. FHL2 geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği.....	60
Şekil 22. TOM1L1 geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği.....	61
Şekil 23. RASSF5 geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği	61



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo I.: Kanser yolakları ve metillenen genler.....	26
Tablo II.: Yaş tahmininde kullanılan hedef genler.....	42
Tablo III. Metilasyon PCR bileşenleri.....	43
Tablo IV. Metilasyon PCR reaksiyonu koşulları.....	43
Tablo V. Saflaştırma işlemi PCR bileşenleri	44
Tablo VI. Saflaştırma işlemi PCR koşulları.....	44
Tablo VII. SNaPshot PCR bileşenleri.....	45
Tablo VIII. SNaPshot PCR koşulları.....	45
Tablo IX. Saflaştırma İşlemi-PCR bileşenleri	45
Tablo X. Saflaştırma İşlemi-PCR koşulları.....	46
Tablo XI. Formamid-Liz120 karışımı ve kapiller elektroforez örnek hazırlaması.....	46
Tablo XII. Kapiller elektroforez koşulları.....	47
Tablo XIII. DNA izolatları ve DNA miktarları.....	48
Tablo XIV. Çalışma grubu kan örneklerine ait metilasyon değerleri.....	52
Tablo XV. Çalışmada elde edilen korelasyon değerleri	59
Tablo XVI. Çalışma grubu kronolojik ve DNA metilasyon yaşı.....	62
Tablo XVII: Çalışma grubunun hata değerlerinin farklı yaş grupları ve lösemi tipleri açısından karşılaştırılması.....	66
Tablo XVIII. T-Testi(Grup Analizi).....	67

EKLER

EK 1: Etik Kurul Onayı.....	91
EK 2: Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu Protokolü.....	92
EK 3: DNA Miktar Tayini Protokolü	93
EK 4: Bisülfıt Dönüşümü Protoklü.....	94
EK 5: AgaroZ Jel Hazırlama Protokolü	96



KISALTMALAR

ALL: Akut Lenfositik Lösemi

AML: Akut Miyeloid Lösemi

Bç: Baz Çifti

CpG: Sitozin-Fosfat-Guanin (Cytosine-Phosphate-Guanine)

DNAm: DNA Metilasyon

DNMT: DNA metiltransferaz

KLL: Kronik Lenfositik Lösemi

KML: Kronik Miyeloid Lösemi

MAE: Hatanın Mutlak Ortalaması

MAD: Ortalama Mutlak Sapma (Mean Absolute Deviation)

mtDNA: Mitokondriyal DNA

mRNA: Mesajcı RNA

miRNA: mikroRNA

MZ: Monozigot İkizler

ncRNA: Kodlanmayan RNA(Non-Coding RNA)

RFLP: Rastgele Fragment Uzunluk Polimorfizmi (Randomly Fragment Length Polymorphism)

RMSE: Hata Kareler Ortalamasının Karekökü (Root Mean Square Error)

SAM: S-Adenozil-L- Metiyonin

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)

STR: Kısa Ardışık Tekrarlar (Short Tandem Repeat)

TKI: Tirozin Kinaz İnhibitörü

VLCFA: Çok Uzun Zincirli Yağ Asidi (Very Long Chain Fatty Acid)



ÖZET

Yaş, birçok adli olgunun aydınlatılmasında önemli bir parametredir. Geleneksel olarak kemik ve dişlerden yaş tahmini yapılmaktadır. Son yıllardaki epigenetik çalışmalarda DNA metilasyonunun yaşlanma ilişkisi keşfedilmiş ve yaş tahmini için yüksek doğruluk oranları olan modeller geliştirilmiştir.

Kanser hastalığı, DNA'daki mutasyonlar ve epigenetik modifikasyonları da içeren karmaşık bir yapıya sahiptir. Metilasyon ile kanser hastalığı arasında çok fazla dalgalanmaların görülmesi öngörülemez metilasyon profillerin oluşması yaş tahmini için bir zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa-Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü AR-GE laboratuvarında geliştirilen 8 CpG bölgesini içeren yaş tahmin paneli ile lösemi hastalarının metilasyon yaşının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada 47 lösemi hastasına ait kan örneklerinden 8 CpG bölgesi (ELOVL2, ASPA, TOM1L1, C1orf132, RASSF5, FHL2, CCDC102B ve cg07082267) üzerinden SNaPshot yöntemi kullanılarak metilasyon profilleri belirlenerek yaş tahmini yapıldı. Yaş tahmin sonuçlarına göre lösemi hastalarında MAE değeri olarak $\pm 9,71$ yıl, RMSE değeri olarak $\pm 13,18$ yıl sonucunu elde edildi.

Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler lösemi hastalarında DNA metilasyonuna dayalı yaş tahmininin anlamlı bir fark oluşturduğunu göstermektedir. Adli olgularda DNA metilasyonu ile yaş tahmini yapıldığında şüphelilerin hastalık geçmişleri göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar Kelimeler: DNA Metilasyonu, Yaş tahmini, Kanser, Lösemi

SUMMARY

Age is an important parameter in the clarification of many forensic cases. Traditionally, age is estimated from bones and teeth. In recent years, the relationship between DNA methylation and aging has been discovered in epigenetic studies and models with high accuracy rates have been developed for age estimation.

Cancer is a complex disease involving mutations and epigenetic modifications in DNA. The occurrence of unpredictable methylation profiles is a challenge for age prediction as there are many fluctuations between methylation and cancer disease.

In this study, we aimed to evaluate the methylation age of leukemia patients with an age prediction panel including 8 CpG regions developed in the R&D laboratory of Istanbul University-Cerrahpaşa-Institute of Forensic Medicine and Forensic Sciences.

In the study, age estimation was performed by determining methylation profiles using the SNaPshot method over 8 CpG regions (ELOVL2, ASPA, TOM1L1, C1orf132, RASSF5, FHL2, CCDC102B, and cg07082267) from blood samples of 47 leukemia patients. According to the age estimation results, MAE value was ± 9.71 years and RMSE value was ± 13.18 years in leukemia patients.

In conclusion, our data show that there is a significant difference in age estimation based on DNA methylation in leukemia patients. When age estimation is performed by DNA methylation in forensic cases, the disease history of suspects should also be taken into consideration.

Keywords: DNA Methylation, Age estimation, Cancer, Leukemia

1. GİRİŞ

Genetik biliminin kökeni Mendel'in 19 yüzyıldaki çalışmalarına dayanmaktadır. Bunu takip eden yüzyılda Watson ve Crick DNA'nın moleküler yapısının keşfetmişlerdir. DNA teknolojileri tıp, zirai, gen mühendisliği, antropoloji, evrim, adli bilimler gibi birçok bilimsel alanda kullanılmaktadır. Adli bilimlerde DNA uygulamaları ilk yıllarda biyolojik materyal incelemeleri kan grubu veya protein eşleşmelerine dayanırken 90lı yıllardan sonra DNA analizlerine doğru gelişim göstermiştir (1).

Botstein ve arkadaşları 1980'de yaptıkları çalışmada DNA üzerinde kişilere göre farklılıklar gösteren bölgeler keşfetmişlerdi. Farklı büyüklükte olan bu bölgeleri restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP-Restriction fragment length polymorphism) olarak adlandırmışlardır. İleri ki yıllarda RFLP teknolojisini kişilerin tanımlanması için kullanılabileceği düşünülerek DNA parmak izi çalışmaları yapılmıştır. Ancak bu yöntemin yerini kısa bir süre sonra Kısa Ardışık Tekrar dizilerinin (STR-Short Tandem Repeat) keşfedilmesi ile yeni bir döneme girilmiştir (2,3).

STR lokusları, 2-10 baz çiftlik uzunlukta tekrarlar içeren DNA dizileridir. STR lokuslarının küçük miktarda DNA'dan dahi analizi yapılabilir. STR analizlerinde tekrar sayılarının kişiye göre değişkenlik gösterdiği için adli bilimlerde önemli bir ayrıcalık olmuştur. (4).

Günümüzde DNA'dan kişiye ait fenotip bilgilerini elde etmeye dair çalışmalarla DNA'nın "moleküler görgü tanığı" olarak kullanılması mümkün hale gelmiştir. Adli DNA fenotipleme, STR profilini eşleştirmenin mümkün olmadığı durumlarda mevcut genetik materyalden kişinin profiline ait bilgi edinmemizi sağlamaktadır. Bu alanda Tek Nükleotid Polimorfizm (SNP-Single Nucleotide Polymorphism) lokusları analiz edilerek

biyocoğrafik soy, nesep, yüz tipi, ten, göz ve saç rengi ve şekli gibi özellikler hakkında veri elde etmek mümkündür (1,5,6).

Adli bilimlerde diğer bir önemli parametre yaş bilgisi olmuştur. Yaş tahmini ile ilgili birçok biyolojik materyalle morfolojik ve moleküler düzeyde çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan en geleneksel yöntem kemik ve dişlerden yaş tahmini yapılmasıdır. Kemik ve diş olgunlaşması fizyolojik, çevresel ve patojenik etkilere bağlı olarak kişilere göre değişkenlik göstermektedir. Toplu mezar veya iskelet kalıntılarında kemiklerin sınıflandırılıp yaş tayini yapılması yaygın kullanılan bir yöntemdir. Bu amaçla iskelet ve diş örneklerinin radyografileri incelenir. Diğer bir kemikten yaş tahmini diş kalsifikasyonu, içsel ve dışsal etkenlerden en az düzeyde etkilenmesi nedeniyle iskeletten yapılan yaş tahminine göre daha yakın sonuçlar alınmaktadır (7,8). Ancak kemik materyali her olay yerinde bulunan bir delil olmadığı göz önünde tutulmalıdır. Bu yöntemle alternatif olarak mitokodriyal DNA (mtDNA) delesyonların, d-aspartik asit, glikasyon ürünlerinin miktarları ve telomer uzunlukları gibi birçok biyolojik materyal üzerinden analizler gerçekleştirilmiştir. Analiz sürecindeki zorluklar ve düşük doğruluklar oranları bu yöntemlerin sınırlılıkları olarak karşımıza çıkmaktadır(9–11).

Epigenetik mekanizmaların aydınlatılmasıyla, biyolojik devamlılığa tek etki eden unsurun DNA olmadığı anlaşılmıştır. Epigenetik mekanizmaların biyolojik sistemler ve süreçler ile etkileşim içinde olduğu anlaşılmıştır. Bu mekanizmalar arasında metilasyon parametreleri birçok değişkeni etkilemektedir. Metilasyon analizleri vücut sıvılarının ve dokularının tanımlanması, bireyin yaşı veya monozigot ikizler arasındaki farklılığı anlamaya kadar birçok unsorda ayırıcı parametre olarak kullanılabilir(12). Metilasyonun yaşlanmaya olan etkisi birçok bilimsel çalışmada incelenmiştir. Epigenetik yaş markırları, biyolojik yaşlanma için güçlü biyobelirteçler olarak kullanılabilir (13,14). DNA metilasyon (DNAm) yaşının bilinmesiyle adli bilimlerde adli fenotiplemesine yaş

parametresi eklenerek şüpheli olmayan veya tanınmayacak haldeki bozulmuş cesetlerin moleküler resmi çizilebilir. Böylece adli olgunun soruşturulmasında yeni bilgiler edinilebilir(11).

Metilasyon analizlerinin diğer bir önemli olduğu başlık ise kanser biyolojisidir. Kanser, DNA dizilimindeki mutasyonlardan kaynaklı olabileceği gibi DNA üzerinde etkisi olan epigenetik mekanizmalardaki düzensizliklerden de kaynaklanabilmektedir. Metilasyonun gen düzeyinde etkisine bakacak olursak genomun yapısal bütünlüğünü korumak ve genin ifade edilmesi gibi görevleri olduğu bilinmektedir (15).

Bu çalışmanın amacı DNA metillenme seviyelerinde farklılıklarından yararlanarak lösemi hastalarında yaş tahmini yapılması ve lösemi hastalarının kronolojik yaşları ile karşılaştırarak kanserin DNA metilasyonuna etkisinin belirlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda kan örneklerinde yaşla ilişkili yüksek korelasyon gösteren CpG lokuslarında bulunan toplam 8 CpG bölgesi (ELOVL2 (chr6:11044661), ASPA (chr17:3476273), C1orf132 (chr1:207823715), cg07082267, FHL2 (chr2:105399282), CCDC102B (chr18:68772183), RASSF5 (chr1:206507531), TOM1L1 (chr17:54899387)) çalışılarak lösemi hastalarında yaş tahminleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerden yola çıkarak olay yerinden elde edilen şüpheliye ait örneğin, kişinin kanser hastası olması durumunda, kullanılacak paneldeki sapma oranı belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

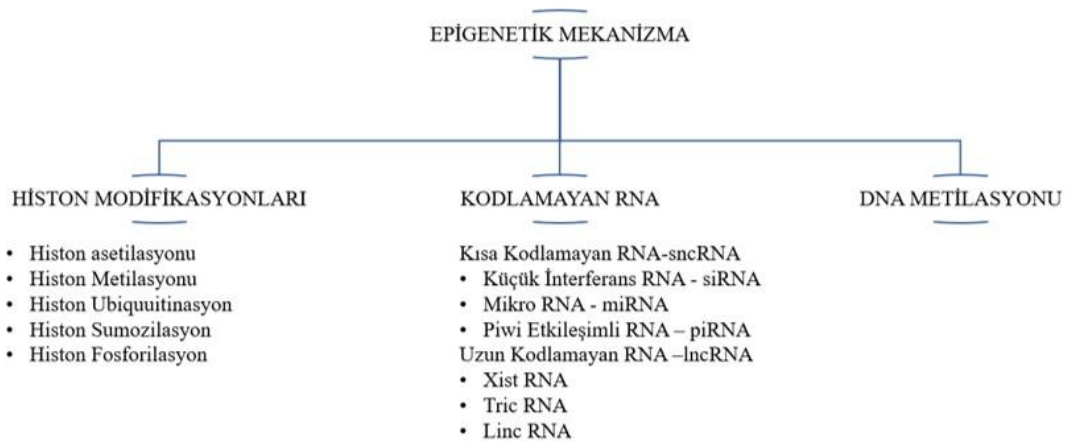
2.1. EPIGENETİK

Eski Yunanca'da $\epsilon\pi\acute{\iota}$ -(epi) öneki -üstünde, üzerinde, ötesinde, öncesinde; $\Gamma\acute{\epsilon}\nu\epsilon\sigma\iota\varsigma$ (Genesis) ise -doğuş, köken, yaratılış veya oluşum anlamlarında kullanılmaktadır. Epigenesis veya epigenetik terimini ilk olarak Aristoteles kullanmıştır. Aristoteles'in epigenesis teorisine göre canlının şekli ve yapısı döllenmeden sonra doğuma kadar geçen sürede oluşmaktaydı. 1942'de Conrad Waddington tarafından ise ilk kez bir bilim dalı olarak nitelendirilmiştir. Holiday ve Pugh, sitozin-guanin dinükleotidlerinin (CpG) metilasyonu üzerine çalışmış ve DNA'nın metilasyon modifikasyonları üzerine hipotezler geliştirdiler. Daha sonra memelilerde X kromozomu inaktivasyonu ve genomik dalgalanmalar üzerine yapılmış çalışmalar epigenetiğe verilen önemin artmasını sağlamıştır. Bugün yapılan epigenetik tanımı 1990'larda şekillenmeye başlanmış ve günümüzde çeşitli epigenetik mekanizmaların oluşumu ve etkileri hala daha aydınlatılmaya çalışılmaktadır(16–18).

Epigenetik, DNA üzerinde dizilim değişmeksizin genomik ifadeyi etkileyen mekanizmaları incelemektedir. Epigenetik, DNA dizisinin ifade edilip edilmemesi üzerinden gen ifadelerini değiştiren mekanizmaların incelenmesiyle bireysel farklılıkların oluşmasında diğer bir unsur olarak karşımıza çıkmaktadır. Epigenetik mekanizmalar, embriyonik dönemden yaşam sonuna kadar sürmekte ve genetik, fizyolojik ve çevresel değişikliklerden etkilenmektedir. Ökaryotik hücrelerde DNA, gen ifadesi kontrolünün sağlanabilmesi için çekirdekte yüksek derecede kontrol edilen paketlenmiş bir formda kromatin yapısında bulunur. Kromatin, DNA replikasyonu sırasında açılır ve transkripsiyon faktörlerinin kalıp zincire bağlanması sağlanır. Mevcut DNA dizisi, nükleotid dizilimine ek olarak epigenetik işaretlerle birlikte çoğaltılır ve bu şekilde her bir replikasyonda hücreden

hücreye korunur. Böylece epigenetik işaretler bölünmeden kaynaklı bir hücre artışında diğer hücreye de korunarak aktarılır (19–22).

Epigenetik mekanizmaların insanlar üzerindeki önemli etkilerinden biri de hastalıklarla olan ilişkisidir. Birçok hastalık ile epigenetik mekanizmaların etkileşim halinde olması hem neden hem de çözüm yolu olarak karşımıza çıkmaktadır. (21). Kanser gibi hastalıklara DNA’da meydana gelen mutasyonların yanı sıra epigenetik değişimlerin sebep olduğu yönünde de ifadeler bulunmaktadır. Özellikle bu mekanizmalar arasında histon modifikasyonu, kodlamayan RNA’lar ve en çok bilineni DNA metilasyonu bulunmaktadır (Şekil 1) (19).

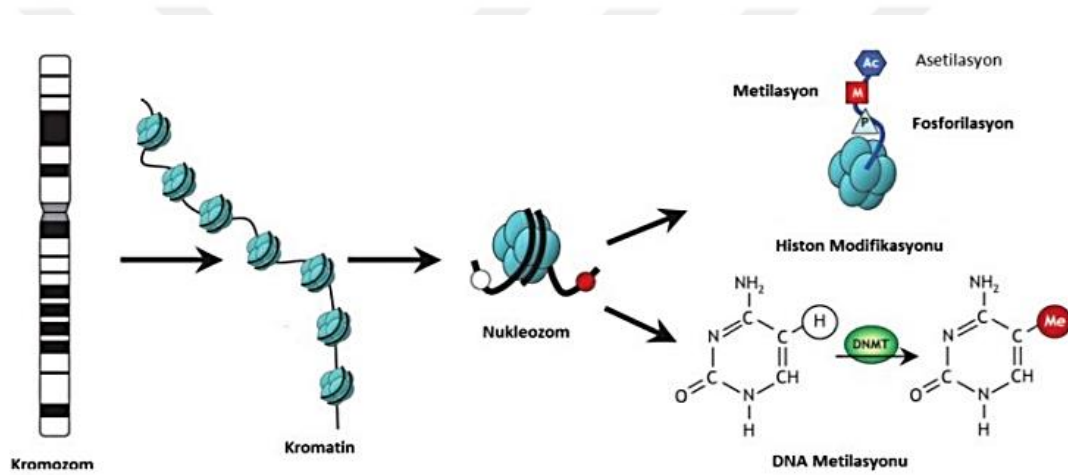


Şekil 1. Epigenetik mekanizmalar

2.1.1. Histon Modifikasyonu

Histon proteinleri, ökaryotik hücrelerde DNA paketlenmesinde sorumlu olan proteinlerdir. Yüksek oranda artı yüklü aminoasit (lizin ve arjinin) içerdiği için eksi yüklü DNA’ya sıkıca tutunur. Histon proteinleri 5 tiptir ve bunlar; H1, H2A, H2B, H3, H4 olarak adlandırılmıştır(16,17).

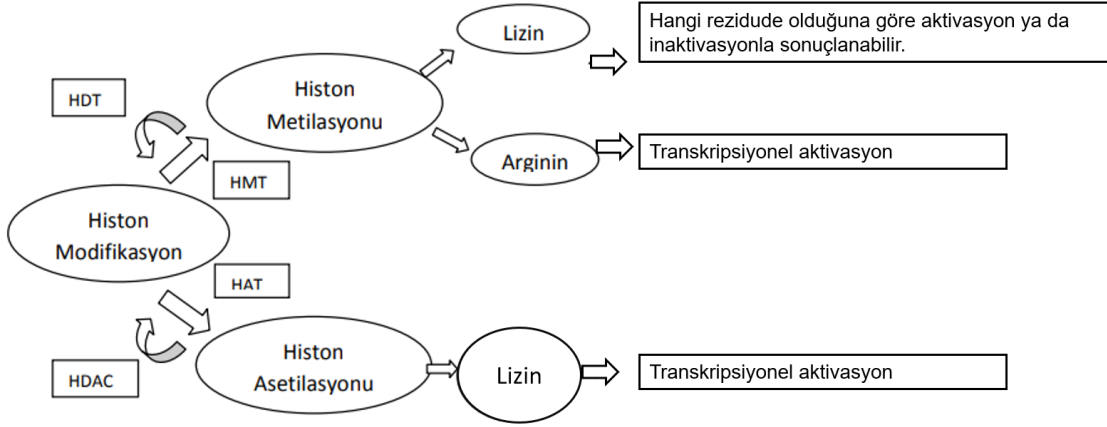
Histonların post-translasyonel modifikasyonları, histon metiltransferaz (HMT) ve demetilaz, histon asetiltransferaz(HAT), histon asetilaz(HDAC) ve fosforilasyon işaretleyicileri gibi birçok enzim birbiri ile uyum içinde çalışır(Şekil 2). Buna ek olarak histon değişiminde görevli yapılar, kanser ile ilişkili olan genlerin düzenlenmesine yardımcı olan Polycomb sistem (PcG) ve aktive edici Trithorax (TrxG) gibi grup kompleksleri ile birlikte hareket eder. Bu kovalent yapıların transkripsiyon araçlarının kromatine ulaşılabilirliğini etkilemesi nedeniyle gen aktivasyonunda etkili olduğu düşünülmektedir (23,24).



Şekil 2. Histon modifikasyon mekanizmaları (25)

Histondaki değişimler DNA'nın transkripte olması üzerinde çeşitli etkiler yaratmaktadır. Histon asetilasyonu transkripsiyonda doğrudan bir etkiye sahiptir. Asetilasyon histondaki belirli noktalarda bulunan aminoasitlere asetil grupların (-COCH₃) eklenmesi işlemidir. Deasetilasyonda bağlı olan asetil grupların uzaklaştırılmasıdır. Asetillenme histonların DNA'ya daha az bağlanması için biçim değiştirmesine neden olur bu da transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanıp transkripte olmasını kolaylaştırır (Şekil 3). Tam tersi durumda deasetilasyonda histonlar DNA'ya daha sıkı bağlanarak o kısmın transkripte olmasını engellemektedir (16,26,27).

Histon proteinlerini oluşturan aminoasitlere bir veya daha fazla metil grubu ($-CH_3$) eklenmesi işlemine histon metilasyonu denir. Histon metillenmesi bağlandığı bölgede genin aktivitesini belirler ve epigenetik düzenlemede rol oynar (Şekil 3).



Şekil 3. Histon asetilasyon ve metilasyon şeması (25)

Histon fosforilasyonu protein kinazlar ve fosfatazlar tarafından histon deasetilazlara serin, treonin ve tirozin rezidlerinden fosfat gruplarının (PO_4) eklenmesidir. Fosforilasyon, protein fonksiyonunu düzenlemek için kullanılan yaygın bir modifikasyondur(25).

2.1.2. Kodlamayan RNA'lar

Kodlamayan RNA'lar (Non-coding RNA-ncRNA), proteine dönüşümü olmayan RNA molekülleri için kullanılan bir ifadedir. Ama bu durum ncRNA'ların bilgi içermediği veya işlevi olmadığı anlamına gelmez. Bu moleküler yapılar, RNA'ların %98'ini oluşturur ve bunların %70'lik bir kısımlarını da intronlar oluşturur. Son yıllarda yeni potansiyel biyolojik düzenleyiciler olduğu yönündeki çalışmalar dikkat çekmektedir. Uzunluklarına göre sınıflandırılan kodlamayan RNA'ların 200 nükleotitten az olanlarına kısa kodlamayan RNA, fazla olanlarına ise uzun kodlamayan RNA denilmektedir (28).

Yapılan çalışmalara göre ncRNA'ların gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev aldığı ve böylelikle hücre farklılaşması, hücre döngüsü, onkogenlerin anormal ekspresyonu

ve tümör süpresör genlerin ifadesi gibi süreçlerde önemli işlevleri olduğu anlaşılmıştır. (29). Özellikle uzun ncRNA'ların(lncRNA) kanser gelişimde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Etki mekanizması tamamen açıklığa kavuşmamış olsa da lncRNA'lar hem protein kodlayan hem de kodlamayan genleri kontrol edebilir ve böylelikle kanser genleri ile etkileşime girebilir(29,30).

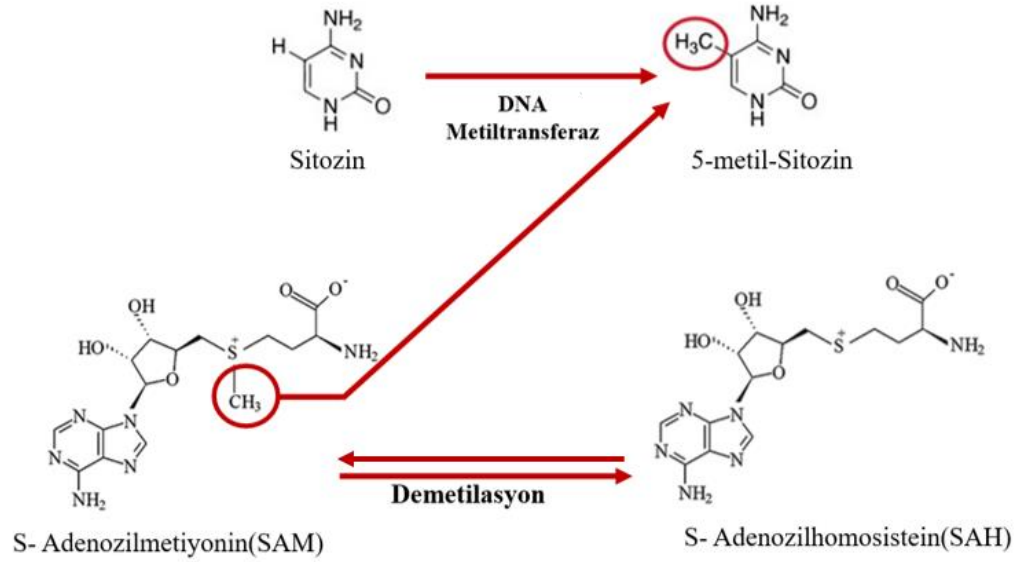
2.1.3. DNA Metilasyonu

Genetik materyal olan DNA'nın keşfedilmesi ile nükleotidler ve türevleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Rollin Hotchkiss'in kağıt kromatografi yöntemi kullanarak dana timusundan modifiye sitozin keşfetmiş ve bunun normal sitozinden ve urasilden farklı olduğunu gözlemlemiştir. Bu sitozinin, 5-metil sitozin (5mC) olduğu ve DNA'da doğal olarak bulunabileceğini savunmuştur. Başlarda DNA metilasyonunun gen ekspresyonunda belirleyici olduğu düşünülse de zamanla metilasyonun gen düzenlenmesinde belirleyici bir mekanizma olduğu anlaşılmıştır(31).

DNA metilasyonu, insan genomundaki normal gelişim için büyük önem taşıyan epigenetik mekanizmalardan biridir. DNA'daki sitozinlerin 5. karbonuna metil grubu (CH₃) kovalent olarak bağlanır. Bu tepkimede görevli olan enzim grubu metil transferazlardır (DNMT) ve metil grubunu ise S-adenozil-Lmetiyonin (SAM)'den alarak sitozinin 5. karbonuna transfer ederler (20,21,32) (Şekil 4).

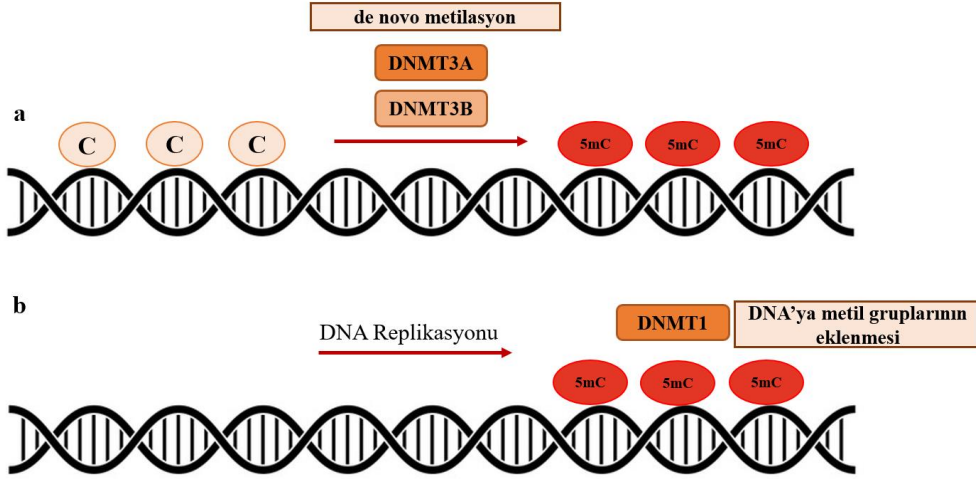
DNA üzerinde metillenmiş sitozin-guanin dinükleotidlerin bulunduğu bölgeler CpG adacıkları olarak nitelendirilir. CpG adacıkları genellikle genlerin promotor bölgelerinde yerleşim göstermektedir. İnsan genomunda yaklaşık olarak 28 milyon CpG adacığı bulunduğu ve bunların %50-60 arasındaki bir kısmı promotor bölgelerinde olduğu düşünülmektedir. Organizmanın gelişimi ve hayati durumu için sürekli olarak ifade edilmesi gereken "housekeeping" ve düzenleyici genlerdeki CpG adacıkları metilasyona

karşı dirençli bölgeler olmasına karşın tekrar dizileri ve transpozonlar gibi heterokromatin bölgelerindeki CpG adacıklarında ise DNA metilasyon oranı yüksektir. (21).



Şekil 4. Sitozin nükleotidinin metilasyon ve demetilasyonu

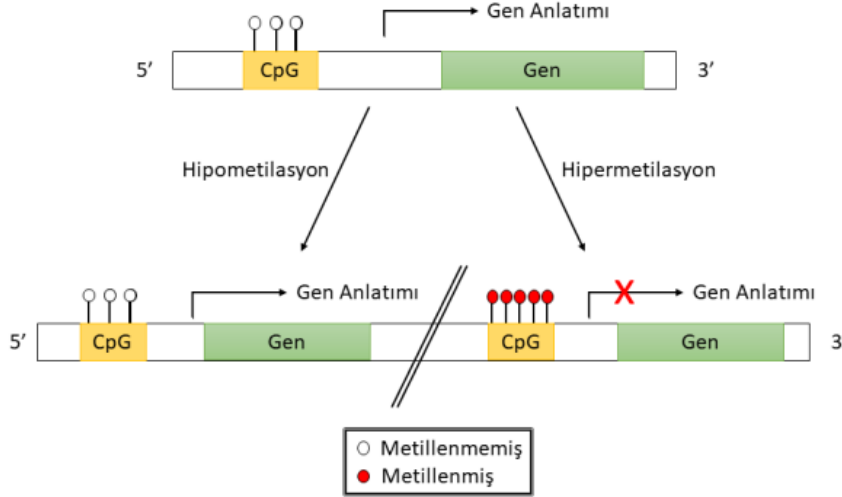
Metilasyon mekanizmasının katalizleyen enzim olan DNMT enzim ailesinde bilinen beş DNA metiltransferaz bulunmaktadır. Bunlar DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L'dir. Bu grupta önem arz edenler ise DNMT3A ve DNMT3B enzimleri 'de novo' metil transferazlar, ilk metilasyon bölgelerinin oluşmasından ve DNMT1 metillenmiş DNA dizinin yeni zincirlere aktarılmasında sorumlu enzimleridir (20,33) (Şekil 5). DNMT3A ve DNMT3B enzimleri aynı görevi yapıyor olsalar da farklı dokularda ifade edilir. DNMT3A her dokuda ifade edilirken DNMT3B; tiroit testis ve kemik iliği hariç diğer dokularda daha az bulunur (31,34,35).



Şekil 5. DNA metil transferazların fonksiyonları

Promotör bölgesinde metilasyon değerlendirilirken iki farklı durum karşımıza çıkar (Şekil 6). Bunlardan biri hipometilasyon, gen ekspresyonunda ve genomik kararsızlıkların engellenmesini sağlayan düşük metilasyondur. Diğeri ise hipermetilasyon, görevi ise transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını engelleyerek, bu elementlerin genom üzerinde hareket etmesi kısıtlar ve kromozomda gen susturulmasını sağlamaktadır (35,36).

Promotor bölgesinde bulunan CpG adacıklarında meydana gelen bir metilasyon seviyesi o genin ifade edilip edilmemesine karar vermektedir. X kromozomunda bulunan ve uzun dönem baskılanması gereken genler, imprinted genler ve gametlerde ifade olması gereken genler ve dokuya özgül ifade edilmesi gereken genler duruma bağlı olarak hipometilasyon veya hipermetilasyona uğramaktadır (21,31).



Şekil 6. CpG adalarında hipometilasyon ve hipermetilasyon şeması(37)

2.2. Adli Bilimlerde Epigenetik Yaklaşım Kullanımı

Adli bilimlerde DNA, biyocoğrafik soy belirleme, olay yerinden elde edilen DNA örneklerinin eşleştirilmesi, fenotipik özelliklerin tespit edilmesi gibi birçok alanda önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle şüphelisi olmayan vakalarda (DNA eşleştirmesi yapılamayacak durumlarda) DNA'yı konuşurmak diyebileceğimiz fenotipik özelliklerin (saç, göz, ten rengi vb.) belirlenmesine yönelik InDEL ve SNP gibi belirteçlerin belirlenmesi ve tanımlanması çalışmaları adli bilimler için büyük önem arz etmektedir(38).

Fizyolojik ve fenotipik süreçlerin tek yönetim merkezi DNA dizilerin olmadığı epigenetik mekanizmaların DNA üzerinde ifade yeteneğini etkilediği yönündeki çalışmalar bize başka bir pencere aralamıştır. Özellikle en çok çalışılan ve tanımlanan mekanizma olan metilasyon mekanizması bireyin tıbbi durumu ile ilgili bilgi verebilecek güçte bir parametre olmasının yanı sıra yaşlanma ile bağlantısı ve hücreler arası farklılık sebebiyle adli bilimlerde ilgi görmüştür. Tek yumurta ikizlerinde dahi farklı metilasyon profillerini görülmesi suçu aydınlanma adına yeni bir seçenek sunmaktadır. Adli genetikte epigenetik

uygulamalar vücut sıvılarının ve dokularının tanımlanması, monozigotik ikizlerin ayrımı ve yaş tahmini olmak üzere üç ana başlıkta değerlendirilmektedir(39–42).

2.2.1. Vücut Sıvılarının ve Dokularının Tanımlanması

Adli bir olguda olay yerinin çözümlemesi, olayın aydınlatılması için önemli bir faktördür. Olay yerinde en çok rastlanan biyolojik deliller vücut sıvıları ve dokularıdır. Kan, semen ve tükürük gibi çeşitli biyolojik materyallerin tanımlanması hücreye özgü enzim ve antijenlerin enzimatik ve immünolojik reaksiyonlarına dayanır. Buna ek olarak eser miktarda hedef materyal ile yapılan serolojik testlerin veya protein bazlı yöntemlerin yorumlanması zorken, kan veya menstrual kan arasındaki farklılık bu testlerde anlaşılamamaktadır. Bu nedenle delilin tam kaynağını tespit etmek konusunda ise farklı biyobelirteçlerin kullanılmasına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır (43,44).

Son yıllarda mRNA (mesajcı RNA)'nın vücut sıvılarının tanımlanmasında kullanılabileceğine dair çalışmalar yapılmıştır. mRNA, proteinlerin oluşturulması için DNA'dan aldığı dizini ribozoma aktarmak ile görevlidir. Bundan yola çıkarak dokulara spesifik olan mRNA'ların olduğu ve vücut sıvılarını tanımlamada kullanılabileceği görülmüştür. Ancak mRNA belirtecinin vücut sıvısı veya doku tanımlamasında kullanılabilmesi için dokuya özgün olması, stabilitesinin bozulmaması veya gen ekspresyon seviyelerinin çeşitli faktörlere bağlı olarak farklılık göstermemesi gerekmektedir. Bu nedenle kullanılacak belirteçlerin aktivite etkinliği bilinmesi gerekmektedir. Tek zincirli yapısından ötürü düşük stabiliteye sahip olmasından ötürü de çabuk bozulması bu uygulamanın sınırlılığı olarak karşımıza çıkmaktadır (44–46).

Diğer bir vücut sıvısı veya doku tanımlama için kullanılan RNA türü ise miRNA(mikro RNA)'dır. miRNA, 20-25 baz uzunluğunda olup mRNA'nın bozulmasında ve protein translasyonunun inhibisyonunda aktif rol oynar. mRNA'ya göre daha stabil

olması ve dokuya özgü olması sebebiyle doku ve vücut sıvılarının tanımlanmasında kullanılan bir parametredir. 1800'den fazla insana ait miRNA kaydedilmiştir (45,46). DNA üzerinde metilasyon etkilerine dayanarak genlerin hücre tiplerinde ifadesinin değişmesinden dolayı hücre tanımlamasında kullanılabilir.(43).

Frumkin ve arkadaşları, metilasyon profillerine dayanarak venöz ve menstural kan, tükürük semen ve deri epidermisini tanımlamışlardır (47). Wasserstrom ve arkadaşlarının ise farklı doku sıvısı örnekleri içerisinde semen örneğinin tanımlanmasına yönelik yapmış olduğu çalışmada metilasyon profilleri ile semen sıvısını belirlemişlerdir (48).

Adli amaçlı DNA metilasyonu analizinde vücut sıvısı tanımlaması için belirli doku veya vücut sıvısına özgü DNA miktarı ve kalitesi, yöntemin doğruluğu, güvenilirliği, istatistiksel olarak ayırım gücü önemlidir. Yöntemin rutin olarak uygulanabilmesi için bunlara ek olarak zaman ve maliyet olarak da avantajlı olması gerekmektedir (49).

2.2.2. Monozigotik İkizler

Monozigotik ikizler (MZ) aynı zigottan gelişen iki birey olduğundan genetik bilgi olarak aynı DNA dizilimine sahiptir. Dolayısıyla monozigotik ikizlerin STR profillerinde bir farklılık gözlenmez. Ancak MZ'lerde farklı DNA metilasyonu görülmektedir (42,50).

Fraga ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada farklı yaş ve cinsiyet gruplarına ait MZ'lerin DNA ve histon metillenme değerlerinin analiz edilmesi üzerine erken yaşlarda ikizlerin metilom haritasında anlamlı bir farklılık yokken ileri yaşlarda önemli derecede farklı seviyelerde metilasyon ölçümleri yapmıştır. Bu çalışma DNA metilasyonunun monozigot ikizlerde dahi yaşa bağlı olarak ciddi farklılıklar oluştuğunu göstermiştir (51).

Vidaki ve arkadaşları, 53 monozigot ikizden aldığı 106 kan örneğinde metilasyon yaşının farklılık gösterip göstermediğini test etmiş ve ikiz çiftler arasında ortalama $2,65 \pm 2,37$ yıl gibi bir farklılık tespit etmiştir (52).

2.2.3. Yaş Tahmini

Yaşlanma, canlı organizmaya ait biyolojik faaliyetlerin değişiklik göstermesine bağlı olarak ölüme kadar süren doğal bir süreçtir. Yaşlanma süreci herkes için aynı olmayıp genetik ve yaşamsal farklılıklara göre değişkenlik göstermektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda DNA metilasyonu ve yaşlanma yeni doğan veya çocukluk çağında tamamen genetik faktöre dayandığı yönünde kanıtlar sunulmaktadır. Ancak erişkin ve yaşlı insanlarda çevresel faktörlerin etkisini arttırmasıyla, alışkanlıklarda metilom haritalarında etki gösterir (33,53–56).

Biyolojik süreçler birçok sistemin bir arada çalışması ile düzenlenir ve zamanla bu sistemlerde meydana gelen düzensizlikler hastalık ve yaşlılık faktörlerini oluşturur. Son zamanlarda yaşlanmayı anlamlandırmak için yapılan moleküler çalışmalarda görülmüştür ki epigenetik mekanizmalar, kanser ve birçok hastalıkla ilişkili olduğu gibi yaşlanmayı etkileyen bir faktör olarak da etki göstermektedir. Birçok çalışma CpG adalarında yaşa bağlı olarak artan hipermetilasyon oranlarını ve beraberinde genom düzeyinde metilasyon kaybını teyit etmişlerdir (57–59).

Yaş; antropoloji, adli tıp, pediatri ve ortopedi gibi birçok alanda önem taşımaktadır. Özellikle adli bilimlerde yaş tayini isteğe bağlı veya mahkeme kararı doğrultusunda gerçekleştirilmektedir. Mağdur, şüpheli veya bilinmeyen bir kişinin yaşının bilinmesi yaşı evlilik, cezai ehliyet ve askere alınma gibi durumları karşılayacak yaş aralığında olup olmadığını tespit etmek için Türk Ceza ve Türk Medeni Kanunu çerçevesinde önem arz etmektedir (37,60).

Yaş tahmini;

- Kimliği bilinmeyen mülteci, sığınmacılar ve belgesiz yasadışı göçmenler
- İnsan kaçakçılığı ve seks işçileri,

- Çocuk evlilikleri ve istismarı,
- Doğum kaydı olmayan evlat edinilen çocuklar,
- Çocuk suçlular ve pornografisi,
- Askerlik yaşı
- Spor müsabakaları (Olimpiyatlar vb.) gibi yasa ve kurallar çerçevesinde bağlayıcılığı olan durumlarda önem arz etmektedir (61).

Yaş kavramını ele aldığımızda kronolojik yaş ve biyolojik yaş iki farklı değer ile karşılaşırız. Doğumdan itibaren geçen her yıl kronolojik yaşta değişiklik oluştururken biyolojik yaşa etki eden unsurlar çeşitli ve daha karmaşık olabilir. Bireysel farklılıklar ve çevresel alışkanlıklar biyolojik yaşın artı veya eksi yönde değişim göstermesine neden olmaktadır (34). Kemik ve dişlerden yaş tespiti uygulaması adli bilimlerde kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Kemiklerden yaş tespitinde radyografik görüntülemeye sıklıkla yararlanılır. Kemiklerde diafiz ve epifiz bölgelerindeki kemikleşme derecesine bakılarak kemik yaşı tespiti yapılmaktadır. Dişlerin morfolojisine ve dişte biriken metal seviyesine bakılarak yaş tahmini uygulamaları yapılmaktadır. Bunlara ek olarak kemik iliğinde hematopoietik hücre seviyesine göre yaş tayini uygulamaları üzerine çalışmalar yapılmıştır (62–64).

Olay yerinde kemik ve diş deliline rastlandığı zaman (feth-i kabir, yangın olguları, toplu mezarlar gibi) bu örneklerden klasik yöntemler ile yaş tahmini yapılabilir. Ancak çoğu olay yerinde (cinayet, cinsel saldırı vb.) kemik örneğine ulaşmak zor iken biyolojik delillere ve dolayısıyla DNA örneğine ulaşmak mümkündür. DNA'ya dayalı analizlerde STR, SNP ve mtDNA, DNA polimorfizmleri kullanılarak kimliklendirme yapılmaktadır (1).

Son yıllarda genetik kimliklendirmenin yanı sıra kişilerin yaş tahmini moleküler seviyedeki belirteçler ile de yapılmaktadır. MtDNA'nın 4977 baz çifti(bç) delesyonu ve

telomer kısalmasıdır. Buna ek olarak aspartik asit reaminasyonu ve ileri glikasyon endprodüksiyonunda protein değişimlerinden kaynaklı analizlerde yaş tahmininde kullanılan iki belirteçtir (10).

Mitokondri hücre için enerji (ATP) üreten bir organeldir. Bunun içinde glikoz ve lipitleri oksitleyerek süperoksit, perhidroksil, ve hidrojen peroksit gibi radikal birikimi gözlenir. MtDNA'daki deformasyonlara oksidatif radikal birikimi neden olmaktadır. Mitokondriyal delesyonlar yaşla birlikte çeşitli dokularda gelişen hücresel bir olaydır (9). Meissener ve ark. postmortem örneklerde mtDNA'nın 4977 bç delesyonuna bağlı ölüm yaşı tespiti üzerine çalışmıştır. Ancak belirli yaş aralığında delesyonların tespit edilememesi ve tekrarlanabilirliği ile ilgili durumlardan ötürü kullanışlı bir yöntem değildir(10).

Telomerler, kromozomların uç bölgelerinde bulunan memeli canlılarda TTAGGG şeklinde dizine sahip tekrar gruplarıdır. Telomerler kromozom uçlarında bulunarak DNA kaybına engel olur ve kromozom stabilitesini korurlar. Telomer kısalması ise her hücre bölünmesi sırasında replikasyon sonrasında uç kısımlarda kayıplar olması nedeniyle meydana gelmektedir ve her hücre bölünmesinde bu kayıplar artmaktadır. Telomer kayıpları yaşlanma ve tümör ile ilişkilendirilmiştir (9,65,66). Yaş tahmini için yapılan çalışmalar düşük doğruluk seviyesi ve yüksek miktarda bozulmamış DNA'ya ihtiyaç duyması gibi sorunlardan dolayı adli bilimlerde kullanılamamıştır (9).

Memelilerde protein sentezinde aktif olan aminoasitler L-aminoasit formundadır ve artan yaşa bağlı olarak proteinlerde D-amino asit formu da gözlenir. Özellikle aspartil ve asparaginil kalıntıları D-aspartik asit zamanla artmaktadır. Moleküler düzeyde yaş tahmini için aspartik asit rasemizasyonu iyi bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Aspartik asit rasemizasyonuna dayalı yaş tahmini için en ideal doku diş dentinidir ve dişlerde her yıl

ortalama %0,1 D-aspartik asit birikimi olduğu belirtilmiştir(8). Yüksek doğruluk oranına sahip olmasına karşın delile ulaşım sınırlıdır (8,9).

İleri glikasyon son ürünleri (AGEs) indirgeyici şekerlerin metabolik türevleri enzim katalizlemesine gerek duymadan protein glikasyonun ile proteinlerle etkileşime girer. Proteinlerin yanı sıra nükleik asit, fosfolipidler glikoziller ile tepkimeye girer. Kantitatif immünohistokimya değerlerinde yaşla birlikte pozitif sinyallerin arttığı gözlemlenmiştir. AGE tabanlı yaş tahmini, heterojenlik ve belirgin bir standart oluşturulamaması nedeniyle kullanışlı değildir (9).

Gelişen analiz yöntemleri ve teknoloji, DNA analizine dayalı veri analizi kalitesini arttırmıştır. Özellikle epigenetik mekanizmaların aydınlatılmasıyla birlikte yaş tahmini için yeni perspektifler edinilip araştırmalara devam edilmektedir.

2.2.3.1. DNA Metilasyonu ile Yaş Tahmini

Horvath, DNA metilasyonuna dayalı yaşlanmayı tespit etmek için çeşitli dokulara ait 353 CpG bölgesini içeren çoklu doku yaş tahmin panelini geliştirmişlerdi. 353 CpG bölgesinin 193'ünde yaşla beraber bir pozitif korelasyon görülürken 160'ında negatif korelasyon gözlemiştir. Bu paneli farklı hasta dokularda (prostat, AML, meme kanseri gibi) yaş tahmin farkının değişimleri üzerine de test etmiştir. Bu çalışmasıyla Horvath yaşla birlikte değişen DNA modellerine epigenetik saat ifadesini ilk kez kullanmıştır (58).

Hannum ve arkadaşları, genom çapında metilasyon profilleri ile yaşlanma arasındaki ilişkiyi anlamlandırmak için geniş çaplı bir analiz yapmıştır. Analizler sonucunda 71 metilasyon belirtecinin yüksek oranla doğru yaş tahmini yapılmasında kullanılabileceğini tespit etmiştir. Her bireyin yaşlanma hızının aynı olmadığı ve bazı

faktörler anlamlı bir fark oluşturmazken bazı faktörlere dayanarak genellemeler yapılabileceği sonucuna varmıştır (55).

Weidner ve arkadaşları, ITGA2B (cg25809905), ASPA (cg02228185) ve PDE4C(cg17861230) genlerindeki 3 gen bölgesindeki metilasyon seviyeleri 151 kan örneği üzerinden bisülfid-pirodizileme yöntemi ile analiz etmişlerdir. Bu çalışmada $\pm 5,4$ yıl sapma ile bir yaş tahmin modeli geliştirmişlerdir (67).

ELOVL2 (ELOVL fatty acid elongase 2-ELOVL Yağ Asidi Uzatma 2) geninin yaşla birlikte artan metilasyon oranıyla yaş tahmini için en çok kullanılan gen olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir(68–71). ELOVL2 geni, çoklu doymamış yağ asidi ve çok uzun zincirli yağ asidi (VLCFA- Very Long Chain Fatty Acid) biyosentezinde görevli proteini kodlar. Membran lipidlerinin ve lipid aracılı reaksiyonlara göre öncüllerinin oluşumunda farklı zincir uzunluğuna sahip VLCFA'ların sentezinde aktif rol oynar. Diyabetle ilişkilendirilen bir gen olan ELOVL2, yaşla birlikte pozitif yönde artan bir metilasyon oranı gözlenir (72).

Zbiec-Piekarska ve arkadaşları, ELOVL2, C1orf132, TRIM59, KLF4 ve FHL2 dahil 5 metilasyon belirtecinin kandan analizi yaparak çoklu regresyon modelinde $\pm 3,9$ yıllık bir sapma ile yaş tahmini yapmıştır (73). Aynı grubun başka bir çalışmasında ise ELOVL2 genine ait 7 CpG noktasını birbiriyle kıyaslamıştır. Sonuç olarak aynı gen üzerinde bulunmasına rağmen farklı noktaların yaş tahmininde farklı sapmalar gösterdiğini tespit etmiştir (68)

Park ve arkadaşları, kan örneklerinden yapılan ELOVL2 (cg16867657), CCDC102B (cg19283806), ZNF423 (cg04208403) gen bölgelerini eş zamanlı olarak değerlendirerek kişilerin yaş tahminini $\pm 3,1$ yıl sapma ile yapılabileceğini tespit etmişlerdir (71).

Sukawutthiya ve arkadaşları, ELOVL2 geninin üzerindeki farklı 9 CpG adasının hem canlı hem de postmortem kan örneklerinden pirosekans yöntemiyle kıyaslamasını yapmıştır. Sonuçlar genin genel metilasyonuna dayalı olarak 0,8-0,9 arasında korelasyon gösterdiğini doğrulamıştır. Gen üzerinde bulunan iki CpG noktasının diğer noktalara kıyasla daha yüksek korelasyon gösterdiğini tespit etmiştir (74).

Her bireyin yaşlanması aynı olmadığı gibi tek etken de genetik faktörler değildir. Beslenme tercihleri, sigara-alkol kullanımı, fiziksel aktivite seviyesi gibi alışkanlıklardan kaynaklı bu farklılığı epigenetik sürüklenme olarak adlandırmışlardır (40,75).

2.2.3.1.1. DNA Metilasyonu Analizinde Kullanılan Yöntemler

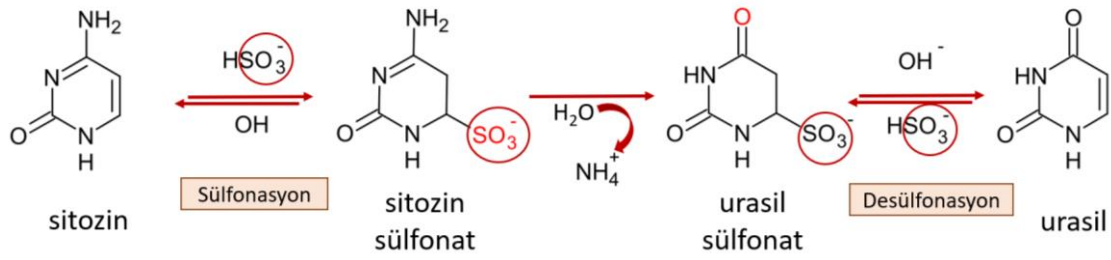
DNA metilasyon seviyelerinin belirlenmesinde, genellikle üç farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunlar; metilasyona duyarlı enzim uygulaması, protein antikor iş birliğine dayalı yöntem ve sodyum bisülfid dönüşümü yöntemidir (76,77).

Metilasyona duyarlı enzim uygulamasında spesifik bölgelerde metilasyon bölgesini tanıyarak DNA'yı parçalar. Bu yöntemde enzimin duyarlılığına bağlı olarak sonuçlar farklı yorumlanabilmektedir. Buna ek olarak enzimlerin kısıtlı bölgelere olan duyarlılığı uygulama için büyük bir sınırlılık getirmektedir (76,77).

Protein-antikor etkileşimi; DNA'nın baz yapısını korunarak protein çökelmesine dayanan bir yöntemdir. Bu yöntemde DNA metilasyonu geniş çaplı analiz edilebilirken kısıtlı bölgelerden analiz için uygun değildir (77).

Sodyum bisülfid dönüşümü yönteminde CpG bölgelerinin ham kalitatif hem de kantitatif analizi yapılabilmektedir. Bu işlemi denatüre DNA'nın düşük pH ve yüksek sıcaklıkla birlikte sodyum bisülfid iyonları ile etkileşimi olayıdır. Reaksiyonda sitozin sülfonasyon işlemi ile önce sitozin sülfonata daha sonra urasil sülfonata dönüşür. Son

olarak desülfonasyon basmağı ile urasile dönüşümü sağlanır (Şekil 7). Yani metillenmemiş sitozinleri(C) urasile deamine ederek PCR’da timin(T) olarak eşleştirmesini katalizler. Metillenmiş sitozin(5mC) ise sitozin olarak karşımıza çıkar. Sonuç olarak metillenmiş sitozin ve metillenmemiş sitozin C/T oranıyla tespit edilerek metilasyon seviyesi hesaplanabilir (76–78).



Şekil 7. Sodyum bisülfid işleminde metillenmemiş sitozinin urasile dönüşümü

Günümüzde metilasyona dayalı analiz çalışmalarında bisülfid dönüşümü tercih edilmektedir. Bunun nedeni, uygun koşullarda yapıldığında, metillenmemiş sitozinlerin urasile dönüşüme oranı %99’dur. Bazı durumlarda bu yöntemle DNA’nın kalitesine bağlı olarak bazı promotor bölgelerinde aynı performans görülmeyebilir (77).

2.3. KANSER

Kanser, geçmişten günümüze insan sağlığını tehdit eden hastalıklar arasında önemli bir yer tutmaktadır. Tıp tarihi boyunca da bu nedenle en çok araştırılan hastalık grubu olduğunu söylemek mümkündür. Günümüz teknolojileri ile erken tanı ve tedavi yöntemleri kansere karşı bize mücadele edebilme imkânı vermiştir. Ancak bazı kanser türlerinin tamamen iyileştirilmesi veya hastalıkla birlikte yaşayabilmek mümkün olsa da kanser hala ciddiyetini koruyan bir hastalık olmaya devam etmektedir (79).

İlk defa Hipokrat tarafından (M.Ö. 460-377) vücut yüzeyinde meydana gelen genellikle kırmızı, sıcak ve ağrılara neden olan iyileşmeyen şişliklere “karkinos” ya da

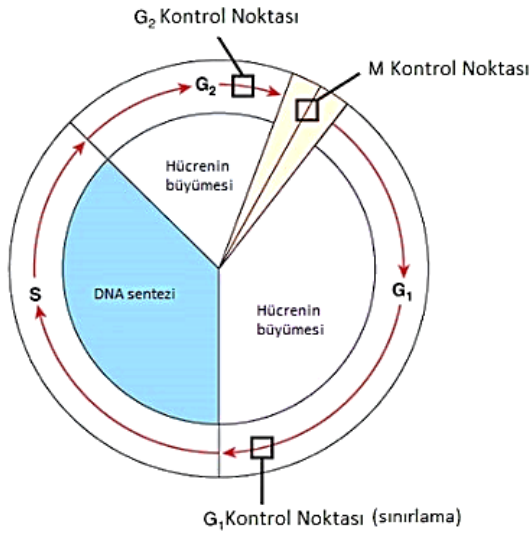
“karkinoma” ifadesini kullanmıştır. Eski Yunan tıp biliminde vücutta oluşan şişkinliklerin nedeni olarak vücuttaki sıvı dengesinin bozulması neden gösterilmiştir. Galen (M.S. 2 yy) tümörleri doğaya uygun (gebelik), doğayı aşan(hipertrofi), ve doğaya karşı olan (malign tümörler) şeklinde üç grupta sınıflandırmıştır. Türk tıp tarihinde ise Tarsuslu Osman Hayri Efendi’nin “Kenzüsıhhatül Ebdaniye” adlı eserin tümörlerin fizyolojisine dair küçük yumru büyüklüğünde, ağırlı ve etrafı damarlı bir oluşum şeklinde tasvir edip “seretan” adı vermiştir. Şerafeddin Sabuncuoğlu’nun “Cerrahiye-i İlhaniye” adlı eserinden notlarında ise seretan ile ilgili cerrahi işlemlere yer vermiştir (80).

2.3.1. Kanser Genetiği

Kanser, hücrenin çeşitli sebeplerden ötürü kontrolsüz bir biçimde çoğalması olarak ifade edilebilir. Hücre bölünmesi, yaşam evreleri ile belirli bir düzen içerisinde gerçekleşir ve bu evrelerin bozulması durumunda anormal hücre bölünmeleri meydana gelir. Anormal hücre artışının altında genetik olarak DNA’da meydana gelen mutasyonlar, tümör baskılayıcı genlerin aktif olmaması, onkogenlerin ifade edilmesi ve DNA onarım mekanizmalarında bozukluklar gibi sebepler yer almaktadır. Ayrıca günümüzde artan doğal veya doğal olmayan kanserojen maddelerin yaygın kullanımı, radyasyon, bakteriyel veya viral patojenler ise genetik olmayan sebepler arasında gösterilmektedir. Bu nedenler, hücrede yaşam döngüsü rutinini etkiler ve hücre bölünmesi basamağı kendini devamlı tekrar eder (15,81).

Hücre döngüsü hücrenin büyüüp çoğalmasını içeren bir süreçtir. Sağlıklı hücrelerde bölünme sayısı sınırlıdır ve sonunda apoptozis denilen kontrollü hücre ölümüyle hücre yok olur. Sağlıklı bir hücrenin bölünme sürecini kontrol altında tutan iki evre vardır. (Şekil 8) Bunlardan biri G1 fazı, hücrenin genetik materyali olan DNA replikasyonunun başlatılmasının sağlar. Diğer G2 fazı, bu evrede DNA replikasyonu tamamlanmış ve

hücrede protein ve RNA sentezi devam etmektedir. Bu iki evrenin sonuna doğru kontrol mekanizmaları hücrenin doğru şekilde süreci tamamlayıp tamamlamadığını denetler ve duruma göre apoptoz işlemi başlatılır (82–84).



Şekil 8. Hücre Döngüsü

Kanserin nedenleri arasında genetik mutasyonlar da yer almaktadır. Genler ve meydana gelen mutasyonların kanser oluşumuna neden olduğu veya yatkınlık oluşturduğuna dair birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin; BRCA1 ve BRCA2 genlerinde meydana gelen mutasyonların meme ve over kanserinde, TP53 genin meydana gelen mutasyonlarda farklı kanser türlerinde tespit edilmiştir. Kanser çalışmalarında sıkça kullanılan TP53 geninin meydana gelen tümörlerde neredeyse yarısına yakınında ortak olarak mutasyona uğradığı gözlemlenmiştir (57).

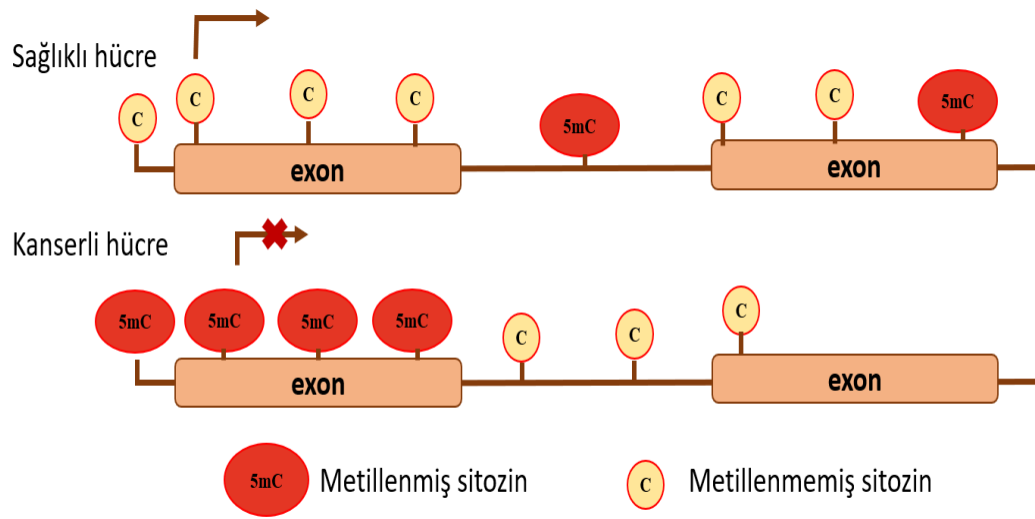
2.3.2. DNA Metilasyonunun Kanser ile İlişkisi

DNA metilasyonu genlerin ifadesinde önemli rol oynayan mekanizmalardan biridir. Yaşla birlikte meydana gelen hastalıklardan biri olan kanserin metilasyon ile olan etkileşimi üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Tümör hücrelerinde meydana gelen delesyon,

amplifikasyon ve mutasyon gibi değişiklikler ile birlikte anormal metilasyon seviyeleri de karakteristik bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sebeple metilasyon analizleri tümör veya kanser tanımlama testi olarak kullanılabilecek bir parametre olarak umut vadetmektedir (57,85).

Hipometilasyon veya genomik metilasyon kaybı kanserin erken evrelerinde sıkça görülen bir değişimdir. Sağlıklı hücrelerde ifade edilmesi gereken genlerin promotör bölgelerinde artman metillenme genin ifade edilmesinin bloke eder (Şekil 9). Aynı şekilde hipermetile olması gereken onkogenler bulunmaktadır ve bu genlerin hipermetilasyonu genin ifade edilmesinin önüne geçmektedir. Ama değişen metilasyon profillerinde bu genlerin hipometile olması durumunda onkogenler ifade edilir. Bu sebeple kanser hücrelerinde hiper-hipo metilasyon değişimi karakteristik olarak gözlenmektedir. Bu hücrelerde onkogenlerin ifadesi artarken, DNA tamir mekanizması, hücre sinyalizasyon ve apoptozis ile ilgili genlerin anormal hipermetile olduğu ve transkripsiyonel olarak sessizleştiği görülür (56,85). Costello ve arkadaşları, kanser hücrelerinde de novo metilasyon veya anormal hipermetilasyon seviyelerinde dokulara göre farklılıkların olduğunu belirtmişlerdir (86).

İnsanlarda meydana gelen tümörlerin %50'sinden fazlası TP53 tümör baskılayıcı gende meydana gelen mutasyondan dolayı, bunların ise %24'ü, CpG adacıklarında meydana gelen C-T dönüşümünden kaynaklıdır. TP53 geninde meydana gelen hipermetilasyon, genin kendini ifade edememesi anlamına gelmektedir. Böyle durumlarda oluşacak tümör hücrelerine karşı yanıt oluşamayacağından kişinin kanser hastalığına yakalanması yüksek ihtimal dahilindedir (57). Diğer bir mutasyona uğrayan veya metilasyon mekanizmasıyla ifadesi kısıtlanan mekanizmada metiltarnsferazlardır. En sık görülen anormal modifikasyonlar DNMT3A ve DNMT3B'de meydana gelmektedir (85).



Şekil 9. Kanserde metilasyon değişimi

Farklı kanser türlerinde farklı bölgelerde hipo ve hiper-metilasyon değişimleri gözlenmektedir. Metilasyon analizi kanser tanısında belirteç olarak kullanılabilir (Tablo I).

Tablo I. Kanser yolları ve metillenen genler (81)

Kanser ile ilişkili yollar	Metile olan genler
DNA tamir	MGNT, MHL1, BRCA1, FNACF
Hücre siklusu	R6, p16, p15, p14, cyclin E, cyclin D2
Sinyal İletimi	RASSF1, LKB1/STK11, APC
Detoksifikasyon	GSTP1
Hormonal Cevap	RARB2, ER, PR
Apoptozis	DAPK1, caspaz-8
Metastaz	CDH1, CDH13,
Transkripsiyon	Runx3, Twist, Era, ERB, PR, RAR, vit d reactor

2.4. LÖSEMİ

Kan, insan vücudunda önemli görevler üstlenmiş yaşamsal bir vücut sıvısıdır. Kanda bulunan alyuvarlar dokular arasında besin ve oksijen taşınmasında, lökositler bağışıklık sisteminin bir elemanı olarak vücut savunmasında, trombositler kan pıhtılaşmasında görev alır.

Lösemi, hematopoietik hücrelerde meydana gelen genetik transformasyonlara bağlı olarak gelişen bir malign hastalık grubudur. Halk ağzında kan kanseri veya kemik iliği kanseri olarak bilinmektedir. 19. yy. başlarında John Hughes Bennett incelediği klinik bir vakada mikroskop altında incelediği kan örneğinde artan lökosit hücreleri ve bu hücrelerin oluşumunda farklılık gözlemlemiştir. Bu olgu incelemesi kronik miyeloid lösemi hastalığına dair yapılan ilk incelemedir. Daha sonra Virchow (1821-1902), farklı şikayetleri olan bir hastanın kanında yaptığı mikroskobik incelemede, artmış lökosit sayısı ve hücre oluşumunda değişimler gözlemiştir. Bu vakada kronik lenfositik lösemi olarak incelenen ilk olgudur. 1857’de Nikolaus Friedreich tarafından incelenen bir klinik olguda hastalığın semptomlarının görülmesi ve hastanın ölümü arasında geçen sürenin kısa ve hastalığın hızlı seyirde olması akut lösemi tanımlaması yapılmıştır. 1877’de Paul Ehrlich kan hücrelerindeki farklılığı ortaya koyan boyama yöntemini bulması ile beyaz kan hücrelerinin sınıflandırılması yapılmıştır. Bu yeni buluş, lösemi hastalığının hücre tipine göre sınıflandırılmasını sağlamıştır (80).

Lösemi teşhisi için periferik kan analizleri (tam kan ve blast sayımı, hücre morfolojisi ve kan sayımı), immünofenotipik analizler, genetik analizler ve kemik iliği biyopsisi gibi testler yapılmaktadır. Lösemi tanımlamalarında antijene bağlı olarak immünofenotipleme yapılmasında kullanılan flow sitometri (FSM), özgül antikor

yardımıyla lösemi ve lenfomalarda fenotipleme yapılması mümkündür. Lösemi tipinin bilinmesi teşhis ve uygun tedavi için önem arz eder (87).

Son yıllarda birçok hastalık grubu için epigenetik terapötik ilaçlara yönelim artmıştır. Günümüzde DNA metiltransferaz inhibitörleri (5-azasitidin ve 5-aza-2 deoksitidin) klinik uygulamalarda kullanılmaktadır(88,89). Diğer bir ilaç grubu ise hedefe yönelik olan inhibitör veya reaktörlerdir. BCL2 inhibitörü olan venetoclax, hipometile ajanlar (HMA), azasitidin (AZA) veya desitabin (DEC), AML grubunda kullanılmakta olan ilaç grubundadır (90). BCL2 proteini antiapoptotik protein grubunda olup BCL2 geni tarafından transkripte edilir. BCL2 proteini farklı protein kompleksleri ile birlikte mitokondri üzerinden sitokrom salınımı yoluyla apoptosizi kontrol eder. Birçok kanser tipi ve genetiği çalışmasında bu gen ve ürünlerinin etki mekanizması üzerine de çalışılmıştır. Bu gende meydana gelen mutasyon veya metilasyon ile aktivitesinin değişmesi kanser oluşumunda ve tedaviye cevap verme noktasında önemli bir durum teşkil eder (91–93).

Lösemi hastalığının kategorize edilmesinde iki faktör ön plandadır. Bunlardan biri hücre tipi (miyeloid veya lenfosit) diğeri ise hastalığın belirtilerinin gözlemlendiği zaman (akut veya kronik) dilimidir.

2.4.3. Akut Lösemi

Akut lösemiler genç, olgunlaşmamış miyeloid veya lenfoid hücrelerinin kemik iliğinde, periferik kanda ve diğer dokularda birikimi ile meydana gelen malign bir hastalıktır. Bu hücreler farklılaşma özelliklerini kaybetmiştir. Bu hücre tiplerinin olgunlaşmaları miyeloblast veya lenfoblast düzeyindedir (94).

Akut lösemilerin birçoğu sporadik olarak ortaya çıksa da kimyasallar, radyasyon ve tütün gibi çevresel faktörlerin tetiklemesi de mümkündür. Ayrıca bazı genetik sendromlar

(Down sendromu, Fanconi anemisi, Klinefelter sendromu vb.) akut lösemi riskinde artışa ve daha önceden alınan kemoterapi tedavilerinde advers etkilere neden olabilir (94)

2.4.3.1. Akut Miyeloid Lösemi (AML)

Akut miyeloid lösemi (AML), sağlıklı hücrelere göre çoğalma hızı artmış, apoptosiz oranı düşük hücrelerin kontrolsüz ve klonal çoğalması ile ortaya çıkan ve kemik iliğini etkileyen bir kanser türüdür(88). AML tanısı için kemik iliği ve periferik kan analizi (tam kan ve blast sayımı) yapılır. Periferik yaymada gözlemlenen yoğun miyeloblast hücreleri tanı için önemlidir. AML çoğunlukla yetişkinlerde (%90) ve daha az çocuklarda (%15-20) görülen bir akut lösemi tipidir (95,96).

AML'nin ortaya çıkışında genetik faktör olarak kromozom anormallikleri, gen mutasyonları ve onkogen aktivitesi görülmektedir. Kromozom anomalileri arasında t(8,21), t(15,17), inv(16), trizomi 8 ve 5 veya 7. kromozomda parça veya tamamen silinmesi gibi sitogenetik anomaliler vardır. Gen mutasyonlarından başlıcalarına HOX gen ailesi, çekirdek bağlayıcı faktör (CBF), retionik asit reseptör α (RAR- α) olarak sayılabilir. Ayrıca doğrudan onkogen aktivitesi sağlayan mutasyonlarda sık karşılaşılan durumlar arasındadır. Bunlar arasında FLT3, KIT, N-RAS, FES, FOS, GATA-1, JUN B, MPL, MYC, p53, PU1, RB, WT1, WNT, NPM1 ve CEPBA genler sayılabilir (97,98).

Epigenetik modifikasyonlar, normal fizyolojik sürecin bir parçası olduğu gibi AML için de önemli bir patogeneze mekanizmasıdır. Anormal DNA metilasyonu, histon metilasyonu/asetilasyonu gibi anormalliklerin AML oluşumunda ve gelişiminde önemli yer tutmaktadır(95). Özellikle promotor bölgelerinde metilasyon artışı sık görülen bir olaydır ve hastalığın zamanla tekrarlaması da mümkündür (89,94). Bu bölgelerin tümör baskılayıcı genleri (p53 geni) kapsaması durumunda hastalık kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (89).

Genetik ve epigenetik çalışmalarla tedavi yöntemleri çok olsa da hala daha AML çok değişken bir seyri olan ve yüksek ölüm oranına sahip hastalıklar arasındadır ve sağ kalım istatistiği %50'nin altındadır (99).

2.4.3.2.Akut Lenfositik Lösemi (ALL)

Akut lenfositik lösemi (ALL), B veya T lenfositlerin farklılaşmadığı, anormal proliferasyon ile kemik iliği, lenf bezi, timüs ve dalakta klonal lösemik hücre birikiminin gözlemlendiği bir kanserdir. Sağlıklı bireylerde lenfosit ve miyeloid hücreleri, hemostazi sağlamak için belirli bir aralıkta normal seviyelerde kabul edilirken bu dengede bir hücre grubunda meydana gelen aşırı çoğalma diğer hücre gruplarının dengesinin değişimi anlamına gelmektedir. Özellikle çocukluk çağında %80 oranla en sık görülen lösemi tipidir (100).

ALL tanısı için hücre morfolojisine, immünofenotipik ve genetik analizler temel alınır. ALL oluşumu sebepleri arasında kromozomal translokasyon(t(12;21) ve t(9;22)) veya anormal kromozom sayıları öncü lenfosit hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar bulunmaktadır. ALL hastalık unsuru olan hücre tipi ve evrelerine göre sınıflandırılmaktadır. Hastalık kaynağı B lenfositler kaynaklı ise B-ALL ve hastaların %80'nin üzerinde görülen tiptir. T lenfositlerden kaynaklı olanda T-ALL olarak ifade edilir bu da daha az bir oranla (%20) karşımıza çıkmaktadır (101). Farklı mutasyon ve kromozomal değişimler farklı lenfosit hücrelerinde meydana gelmektedir. Bu sebeple B ve T lenfositik lösemilerin farklı genetik parametreleri vardır. B-ALL'de çoğunlukla hiperdiploidi görülürken daha az oranda hipodiploidi görülmektedir. Sıklıkla görülen genetik mutasyonlar ise; t(9;22)(q34;q11) - BCR-ABL1, t(v;11q23)-MLL mutasyonu, t(12;21)(p13;q22)-ETV6-RUNX1(TEL-AML1), t(5;14)(q31;q32) IL3-IGH, t(1;19)(q23;p13.3)-EA2-PBX1(TCF3-PBX1) ve t(5;14)(q31;q32) HOX11 ve TXL3 birleşimi olan HOX11L3 şeklindedir. T-

ALL'de BCR-ABL1 füzyonu yerine t(9;9)(q34.1;q34.3)-ABL1-NUP214(nucleoporin) füzyonu görülmektedir. Diğer bir gen bölgesi olan NOTCH1'de meydana gelen mutasyonlar, HOX11(TLX1), HOX11L2(TLX3), LYL1, TAL1 ve MLL düzensizlikleri görülmektedir. TAL1 mutasyonları çocukluk çağı T-ALL'de en sık görülen mutasyondur (102–105).

2.4.4. Kronik Lösemiler

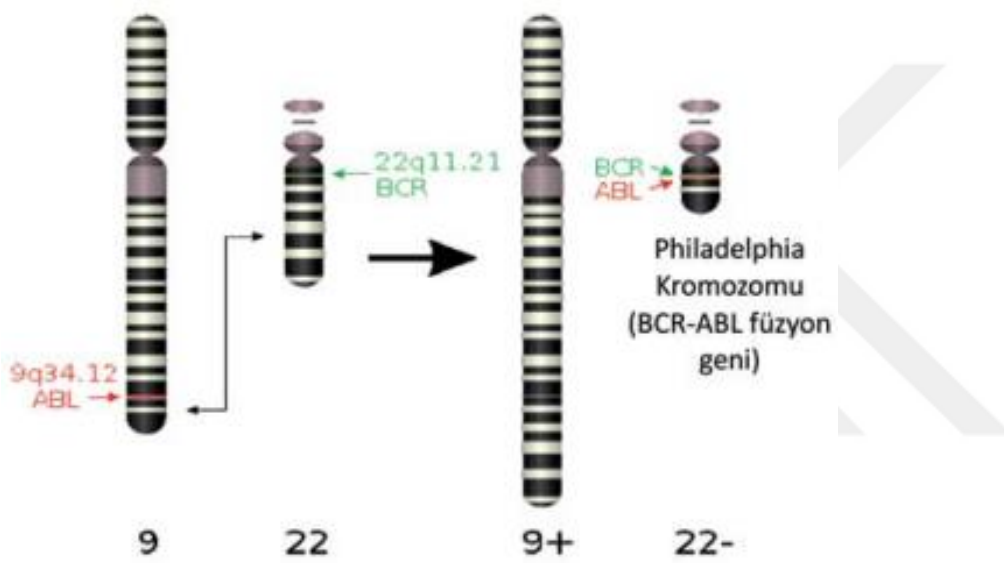
Kronik lösemilerin hastalık başlangıcı ile belirtilerin kendisini göstermesi arasında geçen zaman dilimi uzundur. Hastalığın yavaş seyri akutta görülen belirtilerin şiddetine nazaran daha hafif gözlenmektedir. Bu durum tedavide başarı şansını arttırmaktadır.

Akut lösemilerde olduğu gibi kronik lösemilerde de tümör baskılayıcı genlerde metillenmeye gen susturulması veya onkogenlerin hipometilasyona bağlı olarak ifade edilme durumu yaygın görülen nedenler arasındadır. Genom boyunca gen bölgelerinin metilasyonu metiltransferazlar (DNMT'ler) ile düzenlenmektedir. Yapılan çalışmalar DNMT3A'ya dayalı malignitelerde mutasyona uğrayan bölgenin metiltransferaz domaini üreten R882 kodonunda meydana geldiği yönündedir. Bu noktada meydana gelen mutasyon metiltransferazın oligomer yapısında bozulmaya neden olmaktadır (106–108).

2.4.4.1. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

Kronik miyeloid lösemi (KML), lösemi hastalığının keşfedilen ilk tipi ve genetik mutasyona bağlı olarak tespit edilen ilk hematopoetik klonal bozukluktur. Hematopoetik miyeloid hücrelerin aşırı üretimi ve periferik kanda artan trombosit hücrelerinin neden olduğu bir malign hastalıktır. Hastalığın tanısının koyulmasında tam kan sayımı, periferik yayma, kemik iliği biyopsisi, immünofenotiplendirme gibi testler istenmektedir. Hastaların çoğunda gün içinde yorgunluk, gece ateşlenmesi veya terlemesi, kilo kaybı ve abdominal şişkinlik ve iştahsızlık gibi şikayetler görülmektedir (109).

KML’de sıklıkla karşılaşılan bir durum $t(p;22)(q34;q11)$ karşılıklı kromozomal translokasyonu veya Ph (Philadelphia) kromozomu görülmesidir (Şekil 10). ABL ve BCR genlerinin füzyonu olan bu kromozom kronik miyeloid malignitesine sebep olan faktörlerden biri olduğu düşünülmektedir. Ph kromozomu onkogenik bir protein kodlayarak hem biyolojik sinyal yollarını hem de genom stabilitesini etkilemektedir. Ayrıca BCR-ABL füzyon protein çeşitliliğine bağlı olarak tedavi ve cevap farklılığı olmaktadır. KML’den başka Ph karışık akut lösemi tipinde de görülmektedir (92,109–111).



Şekil 10. Philedelphia (Ph) kromozomunun oluşum şeması (109)

KML hastalarının çoğunluğu asemptomik olan kronik evredeyken teşhis edilir. Tedavi şansı yüksek ve hastalar günlük yaşam rutinlerine dönebilmektedir. Hastalık bu evrede tedavi edilmediği veya hasta tedaviye yanıt vermediği durumda hızlanmış evresine geçer. Bu evrede blast ve promiyelosit hücrelerinde artış görülür. Blastik evrede yoğun blast hücreleri hem kanda hem de kemik iliğinde gözlemlenmektedir (109,111,112).

DNA metilasyonunun KML üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. KML gibi kanserlerde, gen ifadesi (transkripsiyon) ve hücresel işlevleri kontrol eden genetik değişiklikler meydana gelir. KML’de tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerinde

hipermetilasyon gözlenir. Öte yandan, onkogenlerin promotör bölgelerinde hipometilasyon gözlenir. Bu durum, onkogenlerin normalden daha yüksek seviyelerde ifade edilmesine ve hücre büyümesinin artmasına neden olabilir (113,114). Bu epigenetik değişiklikler, KML'nin gelişimine katkıda bulunan faktörlerdir. Ancak tam mekanizma ve KML'nin diğer moleküler ve genetik değişiklikleri hakkındaki tam anlayışımız hala devam etmektedir ve araştırmalar bu alanda devam etmektedir.

Kanser ilaçlarına duyarlılık gösteren genlerin ve moleküler yolların keşfedilmesi ve geri dönüşümlü epigenetik yolların aydınlatılmasıyla direk geni veya gen işleyişini hedef alan ilaçların kullanılması kanser tedavisinde yeni bir devrin önünü açmıştır. KML hastalığının tedavisinde yaygın olarak tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) başarılı bir tedavi yöntemi olmasına karşın hastaların ilacı birden kesmesine bağlı olarak hastalığın zamanla tekrar nüksetmesi karşılaşılan bir durumdur (112,113,115).

2.4.4.2.Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)

Kronik lenfositik lösemi (KLL) yetişkinler arasında en yaygın lösemi grubudur. Lenfositlerin kan, kemik iliği ve lenfoidal organlarda birikmesi şeklinde tanımlanır. Lenfositik lösemilerin %90-95'i B-lenfosit kaynaklı ve %5-10 T-lenfosit ve doğal katil hücrelerinden kaynaklanan lösemilerdir. KLL hastalarında CD19, CD20, CD23 ve CD5 antijenlerinin ekspresyonunda artış görülürken CD22, CD79b, FMC7 antijenleri için tam tersi gözlenmektedir (116,117).

Hastaların %80'ine yakın bir çoğunluğu asemptomik evrede anormal kan sayımından ötürü teşhis edilir. İleri evrede hastaların şikayetleri arasında hepatomegali veya splenomegali, soluk ten, halsizlik, sebepsiz kanamalar, bitmeyen enfeksiyonlar bulunmaktadır. KLL bağışıklık sistemi hücrelerinin etkilendiği bir hastalık olması

nedeniyle hasta bireyler sürekli enfeksiyon ve benzeri rahatsızlıklara açık, tehlike durumundadır(112,116,118).

KLL vakalarında genel kanser olgularında da görüldüğü gibi altta yatan prognozu belirleyen genetik anormallikler de mevcuttur. Yapılmış çalışmalar da KLL hastalarında en sık görülen yapısal anormalliklerin yaygın olandan daha az yaygın olana ve olumlu prognozdan agresif prognoza doğru sıraladığımızda şu şekildedir.

- Del13q14; vakalarda en yaygın (%50-60) görülen anormalliktir. miR15-a ve miR16-1 mikroRNAları etkileyerek apoptoz ve hücre döngüsü regülasyonunda aktif çalışan genlerin ekspresyonunu azaltır. Hastalarda ilerleyici olmayan iyi bir prognoz görülmektedir.
- Trizomi12; Olumlu veya orta şiddetli hastalarda görünen bir anormalliktir.
- 11q22-q23 kromozom delesyonu; ATM ve/veya BIRC3 genlerinin işlevini kaybetmesi demektir. Hastalarda yüksek lenfadenopati ve agresif prognoz görülmektedir.
- Del17p13; bu delesyon TP53 geninin işlevi üzerine olumsuz durum geliştirir ve çoğunlukla 17p delesyonlu hastaların TP53 geninde de mutasyon görülür. Bu duruma karşılık hastalığın tedavisinde karşı direnç ve agresif bir prognoz gözlenmektedir.
- SNP dizilerinde tespit edilen kopya sayısı; çok seyrek görülmekle birlikte bazı gen bölgelerinde gözlenen kayıplar şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Tüm genom analizlerinde bu durumu saptamak mümkündür (119–121).

KLL ve DNA metilasyonu ile ilişkili olarak yürütülen çalışmalarda özellikle enhansır ve promotör bölgelerinde hipometilasyon ve transkripsiyonel uzuma bölgelerinde hipermetilasyon durumu gözlenmektedir. Metilasyon profillemesi için kullanılan

mikrodizileme ve tüm genom bisülfıt dizilimi analizlerine dayanarak elde edilen sonuçlara göre B hücreli KLL'de; toy B hücresi benzeri KLL(n-KLL), hafıza B hücresi benzeri KLL(m-KLL) ve ara KLL(i-KLL) üç farklı epigenetik alt sınıf tanımlanmaktadır. Bu epigenetik sınıflandırma prognostik bir temel oluştursa da henüz klinik seviyede önem seviyesi doğrulanmamıştır (120,122,123).

2.5. Adli Bilimlerde Yaş Tahmininde Kansere İlişkili Çalışmalar

Olay yeri incelemelerinde en çok rastlanılan deliller arasında kan önemli bir yer edinmiştir. Başlarda kan grupları ile yapılan karşılaştırmalara daha sonra DNA örneklerinin karşılaştırılması da eklenmiştir. Şüpheli veya suçlu kişilerin sağlıklı bireyler olabileceği gibi hasta bireylerde olabilir. Özellikle lösemi gibi kan hücrelerinin sayısını ve metilasyon profilini etkileyen bir hastalığa sahip birey için yaş tahmini sağlıklı bireylerle aynı olup olmadığını tespit etmek için karşılaştırma çalışmaları yapılmalıdır.

Horvath, DNA metilasyonuna dayalı yaş tahmini çalışmalarının öncülerindedir. Horvath ve arkadaşları, çoğu doku ve hücre tipini içeren DNA metilasyon yaşı tahmin etmeyi sağlayan 353 CpG bölgesini içeren çok dokulu bir yaş tahmincisi geliştirdi. Geniş bir örneklem spektrumunda çalışılarak doku ve hücrelerin yaş tahmini sapmalarını incelediler. Yaş tahmincisini geliştirmek için 51 farklı doku ve hücre tipi (tam kan, mononükleer hücre, serebellar örnekler, kolon, adipoz, tükürük, karaciğer gibi) ve 82 ayrı grupta 7.844 örnek analiz ettiler. 353 CpG bölgesine dayalı DNAm yaşı hesaplamalarında modelleme grubunda 2,9 yıl test grubunda 3,6 yıl sapma ile iyi bir performans görülmüştür. Ek olarak bu CpG saatini farklı hastalık ve kanser tiplerinde (AML, meme kansinomu, yumurtalık kanseri, prostat, tiroid hücreli kansinomu, böbrek kansinomu ve böbrek renal kansinomu) de test etmişlerdir. Çalışma verilerinde genel olarak DNAm yaşı ile kanser hatlarında büyük yaş farklılıkları olabileceğini gözlemlemişlerdir (41).

Park ve arkadaşları, yaşa bağlı DNA metilasyon belirteçlerinin tanımlanması ve değerlendirilmesi amacıyla yaptıkları çalışmada Koreli 765 kişilik sağlıklı kişiyi kapsayan örneklem grubunda yapmış oldukları çalışmada ZNF423 (cg04208403), ELOVL2 (cg16867657), CCDC102B (cg19283806) lokusa dayalı yaş tahmin modelinde geliştirmişlerdi. Bu modelde ortalama mutlak sapma (Mean Absolute Deviation-MAD) değeri olarak modelleme grubunda (N=535) 3,1 yıl, test grubunda (N=230) 3,3 yıl olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada Kanseri Genom Haritası (The Cancer Genome Atlas-TCGA) veri tabanının elde ettikleri AML verilerinde de analizler yapılmıştır. AML hastalarında üç bölgeye ait korelasyon değerlerinin (ZNF423 (-0,132); ELOVL2(0,145); CCDC102B(-0,236)) çok düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Buna dayanarak metilasyon değerine bağlı korelasyon ile yaş ilişkisinin kaybolduğu görülmüştür (124).

Spolnicka ve arkadaşları, ELOVL2, C1orf132, TRIM59, KLF14, ve FHL2 genlerinde bulunan CpG bölgelerinin metilasyon profillerine göre oluşturdukları modelde, 3,9 yıl MAD değeri ile iyi bir sonuç yakalamıştır. Çalışmada 39 KLL hastasında da bu model test edilmiş fakat 13,5 yıl sapma ile doğruluk oranını düşük olduğu gözlenmiştir. KLL' nin DNA metilasyonunda öngörülmez sonuçlara neden olduğu için bu hasta grubundan kandan güvenilir bir şekilde metilasyon yaş tahmini yapmanın mümkün olamayacağını tespit etmişlerdir (125).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, kanda yüksek korelasyon gösterdiği saptanan gen bölgelerindeki CpG adacıklarındaki metilasyon değerleri sağlıklı ve lösemi hastalarında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Kanda; ELOVL2 (chr6:11044661), ASPA (chr17:3476273), C1orf132 (chr1:207823715), FHL2 (chr2:105399282), cg07082267, CCDC102B (chr18:68722183), RASSF5(chr1:206507531), TOM1L1(chr17:54899387) lokusları üzerinden lojistik regresyon modeli ile yaş tahmini yapılmıştır.

3.1 Kullanılan Gereçler

3.1.1. Ekipman

- Ependorf / Brand otomatik pipetleri (2.5 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)
- Vorteks(Weightlab Instruments)
- Kuru ısıtıcı blok (Bio TDB100-Biosan)
- Florometre (Qubit 4-Thermo Fisher)
- Mikrosantrifüj
- Thermal döngü cihazı (SimpliAmp™ Thermal Cycler-Applied Biosystems™)
- DNA/RNA UV biyogüvenlik kabini (Kabin UVT/T-MAR-Grand Bio)
- Bilgisayar kontrollü genetik analizatör 310 (ABI PRISM® 310)
- Buzdolabı
- Derin Dondurucu

3.1.2. Ticari Kitler ve Harici Mazlemeler

- E.Z.N.A. ® Tissue DNA Kit - Omega
- Quantit™ dsDNA HS Kit (High sensitive) Assay - Invitrogen
- EZ.® DNA Methylation-Gold™ Kit – ZymoResearch
- AmpliTaq Gold DNA Polymerase with buffer II ve MgCl₂
- Loading Buffer (Bromophenol Blue)
- Exonuclease I – ThermoFisher Scientific
- SNaPshot Multipleks Kit – Applied Biosystem™ ThermoFisher Scientific
- rAPid Alkaline Phosphatase (rAPid AP) – ThermoFisher Scientific
- Hi-Di™ (Highly deionized) Formamide - Thermo Fisher Scientific
- GeneScan™ LIZ120 dye Size Standard - ThermoFisher
- POP-4 Polimer (Performance Optimized Polymer 4) – Applied Biosystems

3.2. Deney Aşaması

Çalışma sürecinde takip edilen basamaklar aşağıdaki gibidir.

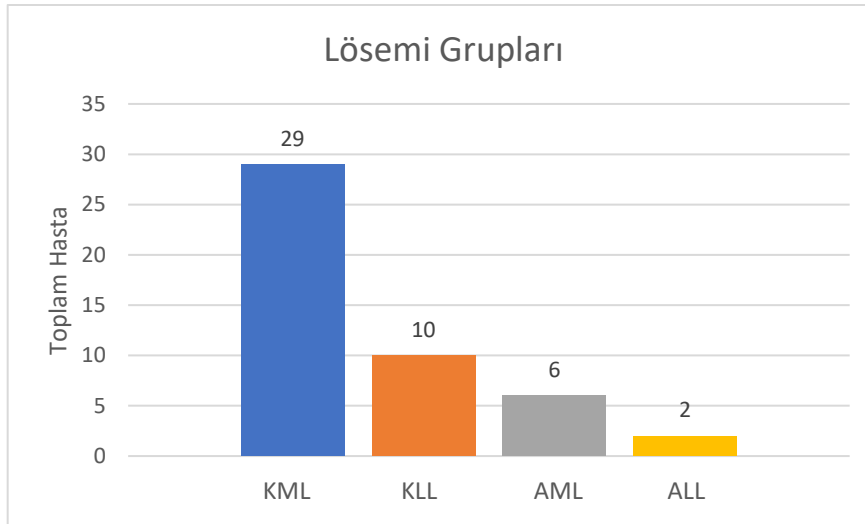
- Örnek toplama
- DNA izolasyonu ve DNA miktar tayini
- Bisülfid dönüşümü
- Metilasyon PCR
- Agaroz jel elektroforezi

- PCR ürünlerinin saflaştırılması
- SNaPshot reaksiyonu (mini dizileme) ve SNaPshot ürünlerinin saflaştırılması
- PCR ürünlerinin ABI PRISM® 310 cihazı ile analizi
- Verilerin analizi ve yaş hesaplaması

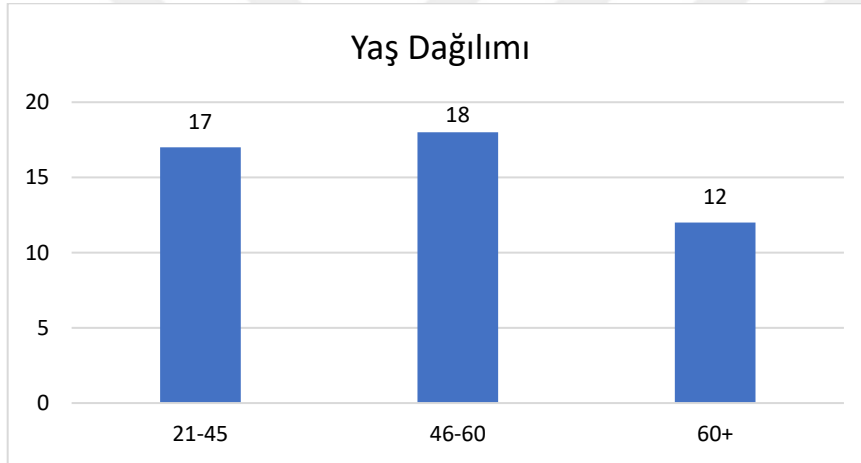
3.2.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışma T.C. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilerek *Sayı: E-59491012-604.01.02-208534* sayılı kararı ile uygun bulunmuştur (EK 1). Çalışma grubu için İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Dahiliye Anabilim Dalı, Hematoloji Polikliniğinde takipte olan veya tedavisi devam eden lösemi tanılı hastalar arasında 21-89 yaş aralığında olup Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunu imzalayan 47 lösemi tanılı gönüllüden kan örnekleri toplanmıştır. Hastaların ilaç kullanımı bilgisi (hipometile ajan ve trozin kinaz inhibitörü vs.) Tablo XVI' da belirtilmiştir.

Çalışmada akut-kronik ve miyeloid-lenfositik lösemi gruplarının her birini temsilen gönüllüler bulunmaktadır. Örnek dağılımı KML grubu 29, KLL grubu 10, AML grubu 6 ve ALL grubu 2 hasta içermektedir (Şekil 12). Yaşlara göre örnek dağılımı ise 21-45 yaş arası 17 kişi, 46-60 yaş aralığı 18 kişi ve 60 yaş üstünde ise 12 birey bulunmaktadır (Şekil 13).



Şekil 11: Çalışma grubunun lösemi tiplerine göre dağılımı



Şekil 12: Çalışma grubunun yaş aralığına göre dağılımı

Çalışmada model grubu, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa-Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü AR-GE laboratuvarında çalışılan “Kana Özgü Metilasyon Paterninden yararlanarak Kronolojik Yaş Tahmini” başlıklı projenin sonuçlarından alınmıştır.

3.2.2. DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

DNA izolasyonu işleminde E.Z.N.A Tissue DNA kit kullanılmıştır. Silika temelli kit, hücrelerin parçalanıp DNA'nın açığa çıkmasından sonra filtreli kolonlarda DNA'nın yıkanıp saflaştırılması ve izole edilen DNA'nın elüsyon ile filtreden ayrılarak kazanımına bağlı bir uygulamadır. Kan örneklerinden izolasyon protokolü EK 2'te, belirtilmiştir.

İzole edilen DNA'nın miktarını belirlemek içinde Qubit 4 cihazı (ThermoFisher Scientific) ve Quantit™ dsDNA HS (High sensitive) Assay-Invitrogen kiti kullanıldı. Miktar tayini protokolü EK 3'te belirtilmiştir.

3.2.3. Bisülfid Dönüşümü

Sodyum bisülfid dönüşümü metillenmemiş sitozinlerin urasile dönüşüp PCR'da timiin olarak çoğalmasını sağlayan metilasyon analizlerinin altın standardı olarak kabul edilen bir işlemdir. Bu işlem için EZ®DNA-Methylation-Gold Kit™ (ZymoResearch) kullanıldı. Bisülfid dönüşümünde takip edilen protokol EK 4'te belirtilmiştir.

3.2.4. PCR

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik AR-GE Laboratuvarında geliştirilen kan örneğine ait 8 lokuslu, multipleks paneline ait CpG noktaları çalışılmıştır (Tablo II.).

Tablo II. Yaş tahmininde kullanılan hedef genler

Gen Bölgesi	CpG ID	GRCh38 Kromozom Pozisyonu	Çalışmadaki Kodu
ELOVL2	cg21572722	chr6:11044661	S1
ASPA	cg02228185	chr17:3476273	S2
C1orf132	none	chr1:207823715	S4
None	cg07082267	chr16:85395429	S5
CCDC102B	cg19283806	chr18:68722183	S9
RASSF5	cg08128734	(GRCh37)chr1:206685423	S17
TOM1L1	cg27210390	chr17:54901222	S20
FHL2	cg06639320	chr2:105399282	S6

3.2.4.1. PCR Koşulları

Tablo II.'de bulunan CpG bölgelerinin çoğaltmak için primerlerden bir primer karışımı hazırlandı. Tablo III.'deki PCR bileşenleri kullanılarak bisülfite dönüşümü yapılmış DNA örneklerindeki hedef bölgeler çoğaltıldı. Her çalışmada pozitif ve negatif kontrol örnekleri kullanıldı. Çalışma için SimpliAmp™ Thermal Cycler(Thermo Fisher Scientific) cihazı kullanıldı. Reaksiyon için Tablo IV.'te verilmiş koşullar uygulandı.

Tablo III. Metilasyon PCR bileşenleri

PCR Bileşenleri	Miktar (µl)
Buffer (1X)	1.5 µl
MgCl₂	3.9 µl
dNTPs	1 µl
Taq Gold	0.3 µl
Primer Mix	1.5 µl
dH₂O	3 µl
DNA Örneği	1.5 µl
Total	12,7 µl

Tablo IV. Metilasyon PCR reaksiyonu koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü
95 °C	11 dk.	
94 °C	20 sn.	34 Döngü
59 °C	1 dk.	
72 °C	30 sn.	
72 °C	7 dk.	
4 °C	∞	

3.2.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR aşamasında DNA'nın çoğalıp çoğalmadığının görmek için örnekler agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jel hazırlama protokolü EK 5'te belirtilmiştir.

3.2.4.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR işleminde tüp içerisinde kalan bağlanmamış primer ve dNTP'lerin uzaklaştırılması için saflaştırma işlemi yapıldı. Primerlerin uzaklaştırılması için EXO1(Ekzonükleaz 1) ve dNTP uzaklaştırmak için raPid AP (raPid alkalın fosfataz) kullanıldı. PCR bileşenleri Tablo V. ve PCR koşulları Tablo VI.'deki gibidir.

Tablo V. Saflaştırma işlemi PCR bileşenleri

PCR Bileşenleri	Miktar
PCR ürünü	2.5 µl
EXO1	0.25 µl
raPid AP	0.75 µl

Tablo VI. Saflaştırma işlemi PCR koşulları

Sıcaklık	Süre
37 °C	45 dk.
80 °C	15 dk.
4 °C	∞

3.2.4.4. SNaPshot Reaksiyonu

Tek baz uzaması (SBE, Single Base Extension) temeline dayanan bir yöntemdir. Spesifik nükleotid için tasarlanmış olan primerlerin bağlanmasıyla bu noktaya karşılık gelen ddNTP'nin bağlanması ile dizileme sonlanır. Bu çalışmada SBE reaksiyonu için SNaPshot™ Multipleks Kit (ThermoFisher Scientific) kullanıldı. Reaksiyon primer karışımı hazırlandı ve PCR tüpü içeriği Tablo VII.'daki hazırlanmıştır. PCR cihazında uygulanan protokol Tablo VIII.'de belirtilmiştir.

Tablo VII. SNaPshot PCR bileşenleri

PCR Bileşenleri	Miktar
PCR ürünü	2 µl
SNaPshot	1 µl
Primer Karışımı	1.5 µl
Total	4,5 µl

Tablo VIII. SNaPshot PCR koşulları

Sıcaklık	Süre	
96 °C	10 sn.	30 Döngü
52 °C	5 sn.	
60 °C	30 sn.	
4 °C	∞	

3.2.4.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

SNaPshot reaksiyonu sonrasında tüpteki serbest floresan işaretli ddNTP'lerin ışıma yaparak elektroforezde analizi zorlaştırmaması için SAP enzimi kullanılarak pasif hale getirildi. Saflaştırma işlemi için SNaPshot PCR tüpünün üzerine SAP eklendi (Tablo IX.). PCR cihazında uygulanan protokol Tablo X.'da belirtilmiştir.

Tablo IX. Saflaştırma işlemi PCR bileşenleri

PCR Bileşenleri	Miktar
PCR ürünü	4.5 µl
SAP	1 µl

Tablo X. Saflaştırma işlemi PCR koşulları

Sıcaklık	Süre
37 °C	80 dk.
85 °C	15 dk
4 °C	∞

3.2.4.6. Kapiller Elektroforez

PCR ürünlerinin kapiller elektroforezde görüntülenebilmesi için hazırlık işlemine tabi tutuldu. Cihaza yüklenecek örnekler için Formamid-Liz120 karışımı hazırlandı ve her bir tüp tabloya göre hazırlandı (Tablo XI). Ön hazırlık işlemi yapılan PCR ürünleri ABI PRISM® 310 ve ABI PRISM® 3130xl genetik analizör cihaza yüklendi.

Tablo XI. Formamid-Liz120 karışımı ve kapiller elektroforez örnek hazırlaması

Formamid-Liz120 Karışımı		Elektroforez bileşenleri	
Formamid	10 µl	PCR Ürünü	1.5 µl
Liz120	0.3 µl	Formamid-Liz120 Karışımı	9.5 µl

Örnekler cihazda POP-4 polimeri ile 36 cm uzunluğundaki kapiller kullanılarak, DS-02 matriksi ve E5 modülüne göre Tablo XII’de belirtilen koşullarla analiz edildi.

Tablo XII. Kapiller elektroforez koşulları

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

3.3. Veri Analizi

Çalışılan örneklerin belirlenen CpG lokusundaki sitozin ve timin piklerinin RFU değerleri belirlenerek Şekil 13'teki formüle göre metilasyon oranları Microsoft Excel (Microsoft 365 ProPlus) programında hesaplandı.

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

Şekil 13. Metilasyon oranı hesaplama formülü

Çalışma grubuna ait metilasyon oranları ile kronolojik yaşlar arasındaki ilişki değerlendirilerek Microsoft Excel programın korelasyon katsayıları formülü [$t_H = r / \sqrt{(1-r^2/n-2)}$] ile hesaplandı ve lineer regresyon grafikleri çizildi.

Analiz sonucunda elde edilen yaş tahmin formülü ile tahmini yaş değerleri elde edildi. Çalışma grubundan elde edilen yaş tahminlerine dair mutlak hata ile model grubunun mutlak hataları arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığı t-test ile analiz edildi. Tüm analizler IBM SPSS 21.0 (2021) programı ile yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmada 47 lösemi hastasının kan örneklerindeki metilasyon profilleri laboratuvarımızda geliştirilen 8 CpG lokusu (ELOVL2, ASPA, C1orf132, cg07082267, FHL2, CCDC102B, RASSF5, TOM1L1) çalışılarak belirlendi. Daha sonra kana özgü metilasyon paterninden yararlanarak kronolojik yaş tahmini modelinde lösemi hastalarında yaş tahmini yapıldı.

4.1. DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

47 kişiye ait kan örneklerinden izole edilen DNA izolatlarının miktarları belirlendi. Cihazda yapılan ölçümler sonucunda DNA miktarları Tablo XIII'deki gibidir. DNA miktarları en az 2.28 ng/μl en çok 270 ng/ μl ortalama 38,8 ng/μl DNA elde edilmiştir.

Tablo XIII. DNA izolatları ve DNA miktarları

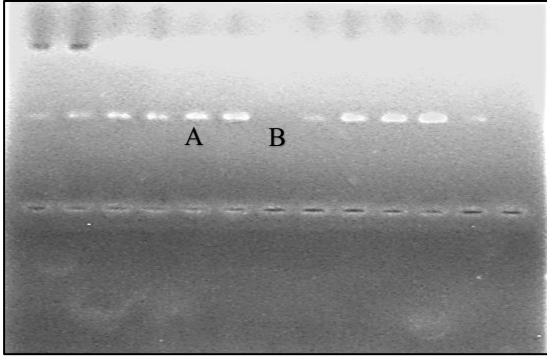
Örnek Sırası	Örnek Kodu	DNA Miktarı(ng/μl)	Örnek Sırası	Örnek Kodu	DNA Miktarı(ng/μl)
1	L21-M-01	26.0	25	L22-M-26	12.7
2	L21-M-02	26.8	26	L22-M-27	5.60
3	L21-M-03	49.9	27	L22-M-28	11.2
4	L21-M-04	35.8	28	L22-M-29	270.0
5	L21-M-05	31.8	29	L22-M-30	20.6
6	L21-M-06	20.6	30	L22-M-31	22.2
7	L21-M-07	22.8	31	L22-M-32	28.4
8	L21-M-08	37.2	32	L22-M-33	80.6
9	L21-M-09	68.4	33	L22-M-34	40.4
10	L21-M-10	28.6	34	L22-M-35	53.0
11	L21-M-11	30.8	35	L22-M-36	57.0

Örnek Sırası	Örnek Kodu	DNA Miktarı(ng/μl)	Örnek Sırası	Örnek Kodu	DNA Miktarı(ng/μl)
12	L21-M-12	20.8	36	L22-M-37	27.8
13	L21-M-13	29..6	37	L22-M-38	41.6
14	L21-M-14	21.4	38	L22-M-39	38.6
15	L21-M-15	27.2	39	L22-M-40	25.2
16	L21-M-17	39.0	40	L22-M-41	26.6
17	L22-M-18	5.60	41	L22-M-42	91.4
18	L22-M-19	59.6	42	L22-M-43	39.4
19	L22-M-20	6.12	43	L22-M-44	49.0
20	L22-M-21	50.0	44	L22-M-45	56.0
21	L22-M-22	50.0	45	L22-M-46	47.7
22	L22-M-23	23.8	46	L22-M-47	6.96
23	L22-M-24	60.2	47	L22-M-48	2.28
24	L22-M-25	40.6			

4.2. Bisülfıt Dönüşümü ve PCR Aşaması

47 kişiye ait DNA örneklerinin bisülfıt dönüşüm işleminden sonra kan panelinde 8 çift CpG primeri kullanılarak 10 ng/μl DNA ile PCR yapıldı. Bisülfıt işleminin başarılı olduğunu görmek için metilasyon PCR aşamasından DNA örnekleri agaroz jelde yürütüldü.

Negatif örneklerde ışıma görülmezken pozitif sonuçlarda parlama görüldü. (Şekil 14)

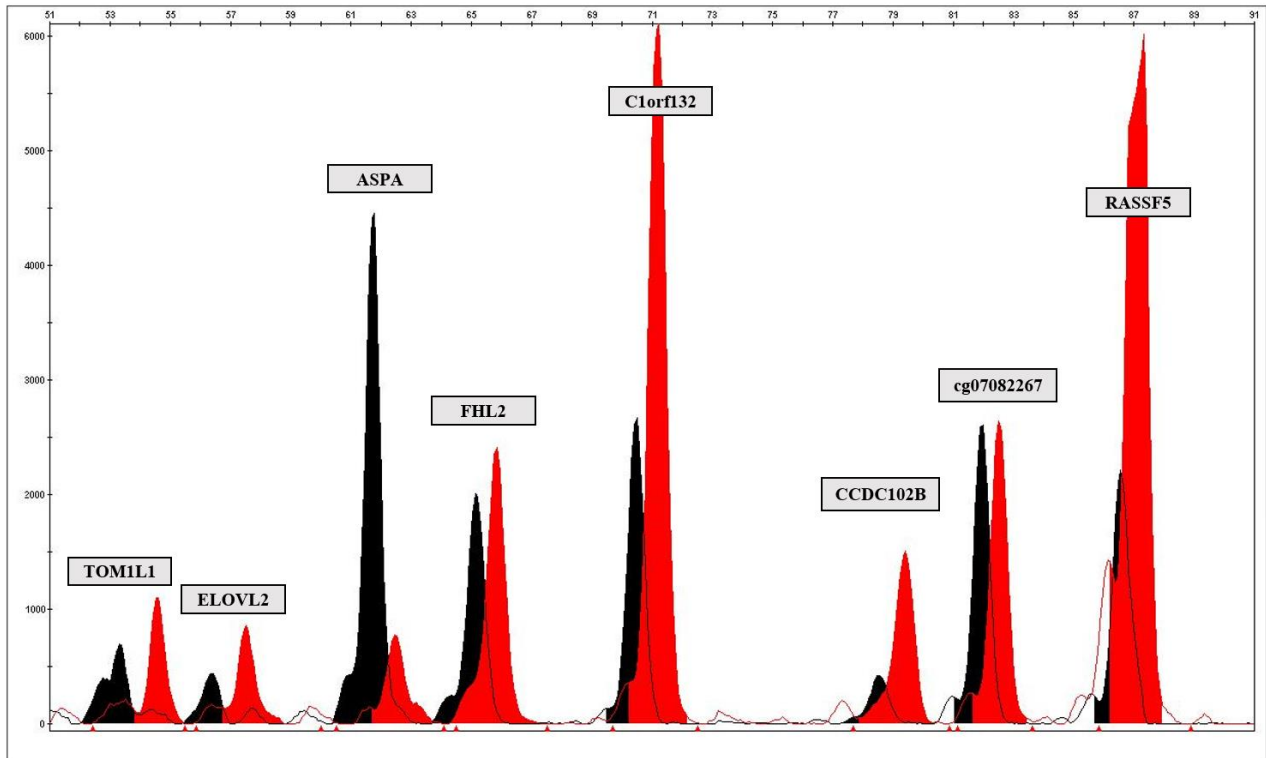


Şekil 14. Metilasyon PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

(A:pozitif örnek, B:negatif örnek)

4.3. Kapiller Elektforez Aşaması

ABI PRISM®310’da yürütülen örneklerin okunması Gene Mapper v4.0 programı kullanılarak yapıldı. Kapiller elektforez cihazında yürütülen bir örneğin görüntüsü Şekil 15’te verilmiştir.



Şekil 15. Kandan yaş tahmini metilasyon panelinin örnek bir elektroforegram görüntüsü

4.4. İstatistiksel Analiz

4.4.1. Metilasyon Değerleri

Her örnek çalışıldıktan sonra Şekil 13’de verilen formül ile Microsoft Excel programında metilasyon değerleri elde edilmiştir. Her örneğe ait lokuslara göre metilasyon değerleri Tablo XIV’de belirtilmiştir.



Tablo XIV. Çalışma grubu kan örneklerine ait metilasyon değerleri

Örnek Türü	Kronik Miyeloid Lösemi-KML Grubu Örnekleri							
Örnek	TOM1L1	ELOVL2	ASPA	FHL2	C1orf132	CCDC102B	cg07082267	RASSF5
L21-M-12	0,301	0,169	0,533	0,327	0,212	0,101	0,362	0,340
L21-M-17	0,269	0,138	0,553	0,240	0,266	0,113	0,453	0,382
L22-M-41	0,453	0,099	0,508	0,262	0,227	0,064	0,391	0,299
L22-M-43	0,368	0,142	0,527	0,226	0,232	0,118	0,340	0,260
L21-M-3	0,317	0,219	0,486	0,285	0,265	0,168	0,484	0,386
L21-M-7	0,186	0,150	0,521	0,268	0,232	0,089	0,390	0,256
L21-M-5	0,370	0,262	0,556	0,380	0,236	0,157	0,473	0,419
L22-M-25	0,268	0,157	0,583	0,248	0,380	0,100	0,364	0,301
L22-M-36	0,147	0,095	0,206	0,170	0,351	0,020	0,419	0,487
L21-M-6	0,280	0,193	0,564	0,315	0,229	0,133	0,425	0,424
L22-M-45	0,250	0,118	0,741	0,207	0,203	0,085	0,352	0,511
L21-M-8	0,210	0,118	0,595	0,295	0,163	0,090	0,346	0,278

Örnek	TOM1L1	ELOVL2	ASPA	FHL2	C1orf132	CCDC102B	cg07082267	RASSF5
L21-M-4	0,321	0,216	0,609	0,300	0,211	0,075	0,387	0,333
L22-M-23	0,215	0,144	0,523	0,282	0,241	0,114	0,269	0,215
L22-M-22	0,203	0,158	0,483	0,275	0,167	0,095	0,311	0,184
L22-M-21	0,214	0,163	0,580	0,284	0,186	0,118	0,348	0,278
L22-M-35	0,191	0,221	0,463	0,316	0,125	0,093	0,278	0,186
L22-M-37	0,696	0,162	0,647	0,366	0,204	0,055	0,483	0,254
L22-M-31	0,184	0,136	0,591	0,313	0,261	0,059	0,284	0,248
L22-M-32	0,207	0,017	0,817	0,087	0,256	0,088	0,379	0,159
L21-M-10	0,307	0,320	0,747	0,444	0,161	0,142	0,348	0,309
L21-M-14	0,262	0,271	0,690	0,389	0,184	0,108	0,398	0,389
L22-M-46	0,213	0,169	0,379	0,435	0,124	0,057	0,295	0,144
L21-M-2	0,107	0,022	0,810	0,174	0,095	0,068	0,229	0,173
L21-M-9	0,271	0,297	0,540	0,402	0,146	0,071	0,444	0,272
L21-M-11	0,229	0,288	0,544	0,446	0,149	0,077	0,320	0,218

Örnek	TOM1L1	ELOVL2	ASPA	FHL2	C1orf132	CCDC102B	cg07082267	RASSF5
L22-M-42	0,509	0,028	0,855	0,097	0,145	0,087	0,340	0,186
L21-M-15	0,296	0,263	0,586	0,405	0,314	0,042	0,326	0,378
L22-M-30	0,223	0,210	0,535	0,333	0,197	0,039	0,326	0,210

Örnek Türü	Akut Miyeloid Lösemi (AML) Grubu Örnekleri							
Örnek	TOM1L1	ELOVL2	ASPA	FHL2	C1orf132	CCDC102B	cg07082267	RASSF5
L22-M-48	0,135	0,167	0,364	0,201	0,144	0,075	0,486	0,371
L22-M-26	0,142	0,026	0,880	0,166	0,281	0,092	0,540	0,551
L22-M-44	0,250	0,118	0,741	0,207	0,203	0,057	0,352	0,289
L22-M-47	0,137	0,174	0,298	0,201	0,084	0,026	0,223	0,231
L22-M-27	0,073	0,566	0,561	0,182	0,161	0,380	0,495	0,431
L22-M-20	0,293	0,141	0,438	0,376	0,082	0,038	0,343	0,139

Örnek Türü	Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) Grubu Örnekleri							
Örnek	TOM1L1	ELOVL2	ASPA	FHL2	C1orf132	CCDC102B	cg07082267	RASSF5
L21-M-1	0,284	0,242	0,781	0,343	0,215	0,149	0,382	0,187
L22-M-24	0,202	0,197	0,309	0,389	0,260	0,244	0,240	0,184
L22-M-33	0,334	0,204	0,746	0,250	0,056	0,103	0,561	0,192
L22-M-39	0,173	0,128	0,450	0,324	0,182	0,081	0,295	0,134
L21-M-13	0,249	0,208	0,524	0,472	0,203	0,066	0,348	0,187
L22-M-29	0,251	0,160	0,389	0,560	0,014	0,301	0,771	0,223
L22-M-40	0,506	0,244	0,504	0,393	0,080	0,120	0,357	0,127
L22-M-38	0,135	0,279	0,585	0,498	0,056	0,241	0,132	0,068
L22-M-18	0,460	0,248	0,320	0,407	0,214	0,239	0,218	0,179
L22-M-19	0,096	0,017	0,678	0,179	0,080	0,022	0,471	0,178

Örnek Türü		Akut Lenfositik Lösemi (ALL) Grubu Örnekleri						
Örnek	TOM1L1	ELOVL2	ASPA	FHL2	C1orf132	CCDC102B	cg07082267	RASSF5
L22-M-28	0,384	0,127	0,767	0,148	0,363	0,074	0,573	0,257
L22-M-34	0,257	0,151	0,627	0,287	0,160	0,085	0,280	0,176

4.4.2. Korelasyon ve Lineer Regresyon Grafikleri

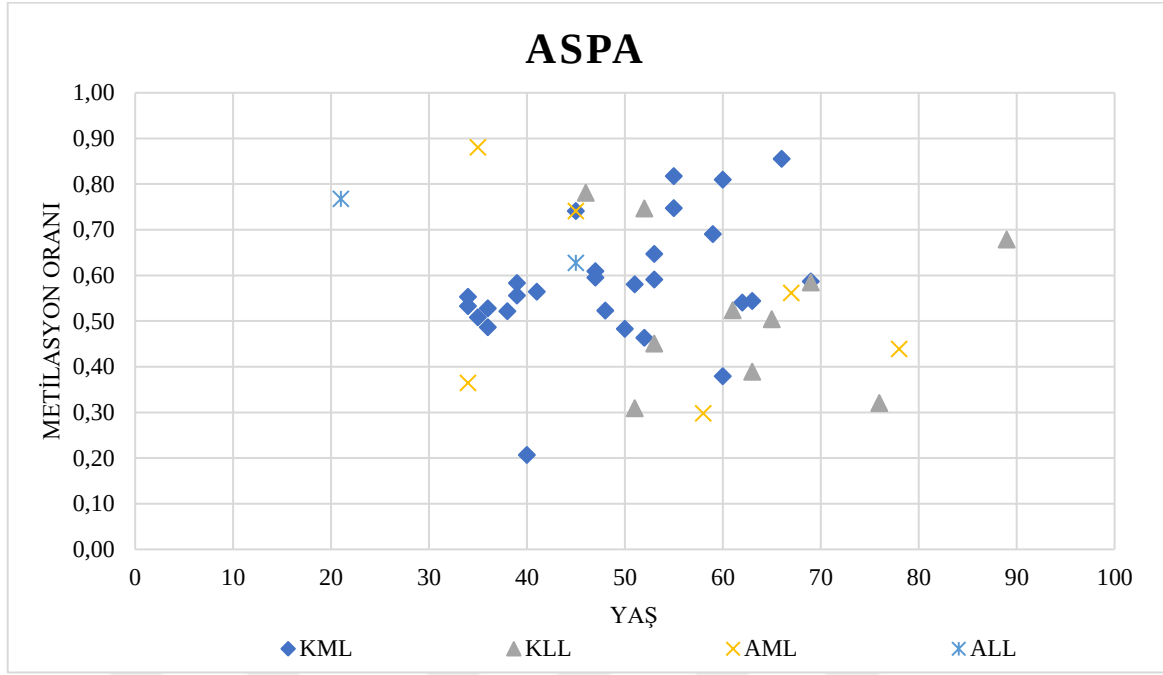
Microsoft Excel programında çalışma grubunun kronolojik yaş ile metilasyon değerleri hesaplanarak korelasyon değerleri belirlendi (Tablo XV). Her bir CpG noktasına için çalışma grubuna ait lineer regresyon grafikleri Şekil. 16-23 arasında verilmiştir.

Tablo XV. Çalışmada elde edilen korelasyon değerleri

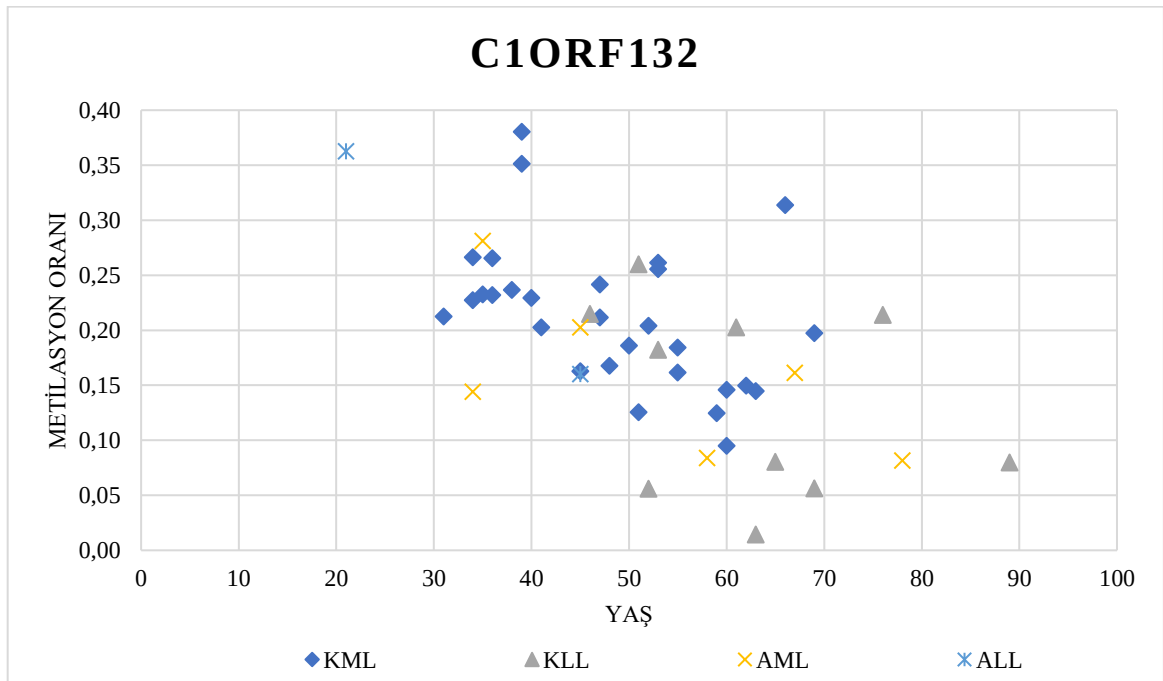
Gen Bölgesi	Kromozom Pozisyonu	Lösemi Örnekler N=47	KML Kor. N=29	KLL Kor. N=10	AML Kor. N=6
TOM1L1	Chr17:54901222	-0,403	-0,080	-0,097	0,282
ELOVL2	Chr6:11044661	0,314	0,182	-0,405	0,473
ASPA	Chr17:3476273	-0,159	0,328	-0,090	-0,388
FHL2	Chr2:105399282	0,520	0,266	-0,134	0,686
C1orf132	Chr1:207823715	-0,50	-0,452	-0,349	-0,672
CCDC102B	Chr18:68772183	0,259	-0,443	-0,126	0,250
cg07082267	Chr16:85395429	-0,769	-0,442	-0,033	-0,444
RASSF5	Chr1:206685423	-0,408	-0,494	-0,149	-0,630

(**Not:** ALL grubu için örnek sayısı azlığından korelasyon değeri hesaplanmadı.)

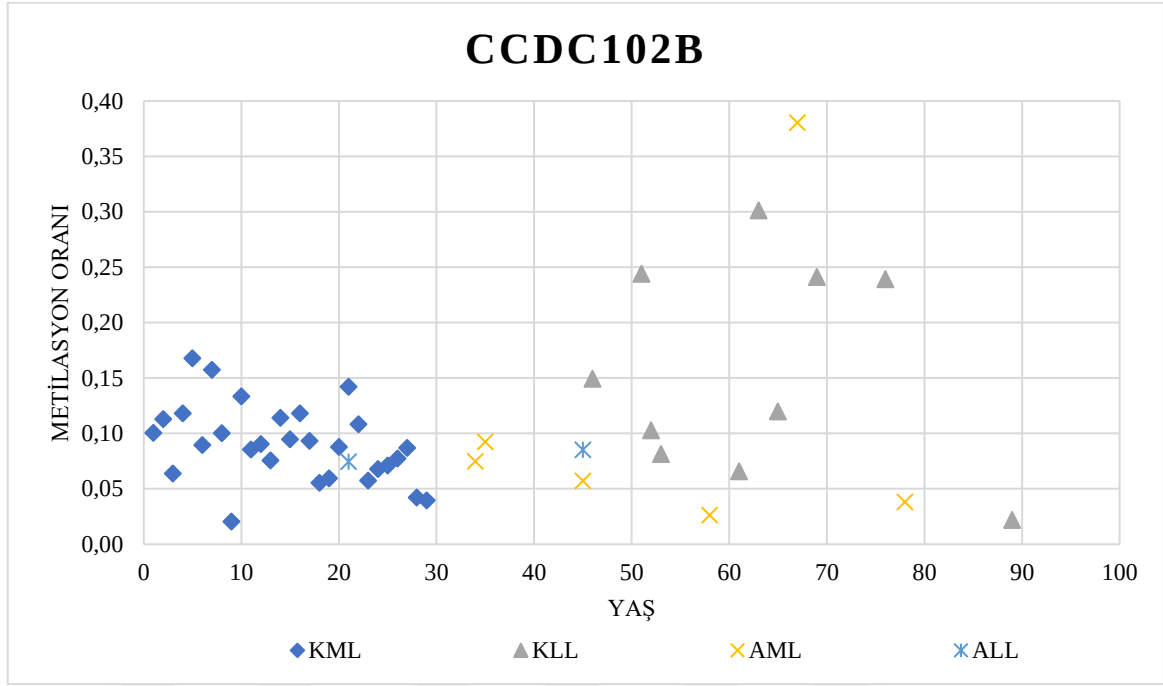
Lösemi örneklerinin tümünü (N=47) değerlendirdiğimizde TOM1L1, ASPA, C1orf132, cg07082267, RASSF5 lokuslarında negatif korelasyon değerleri görülürken ELOVL2, FHL2 CCDC102B lokuslarında pozitif korelasyon değerleri görülmektedir (Tablo XV, Şekil 16-23). (Tablo XV).



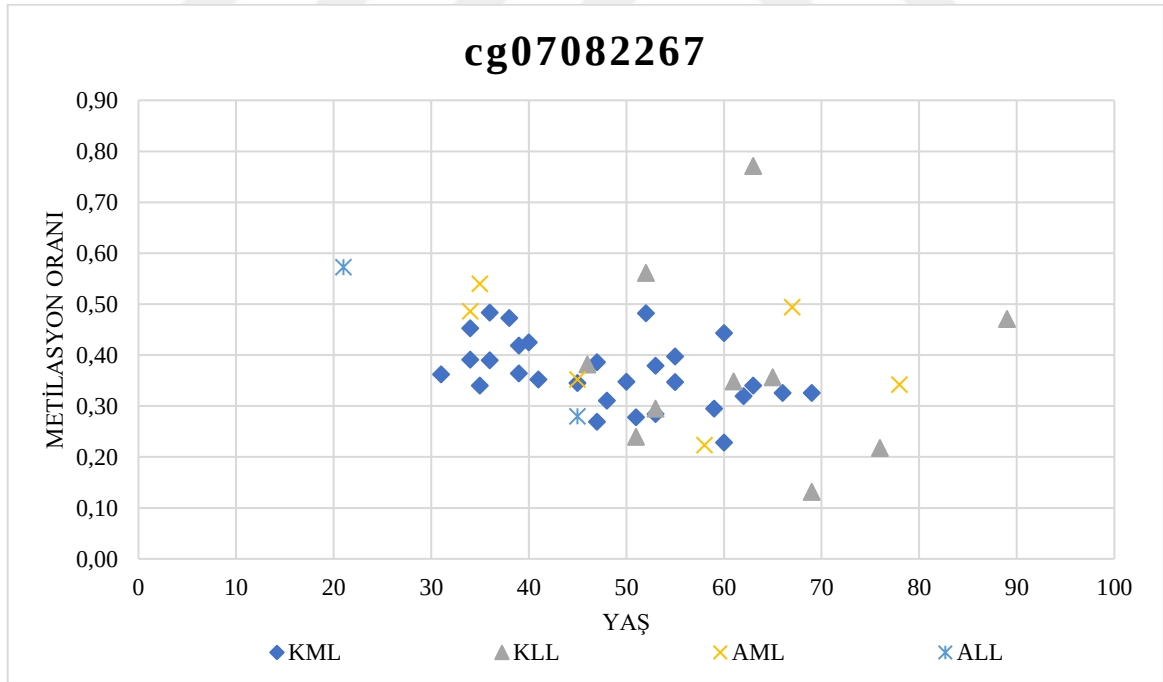
Şekil 16. ASPA geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği



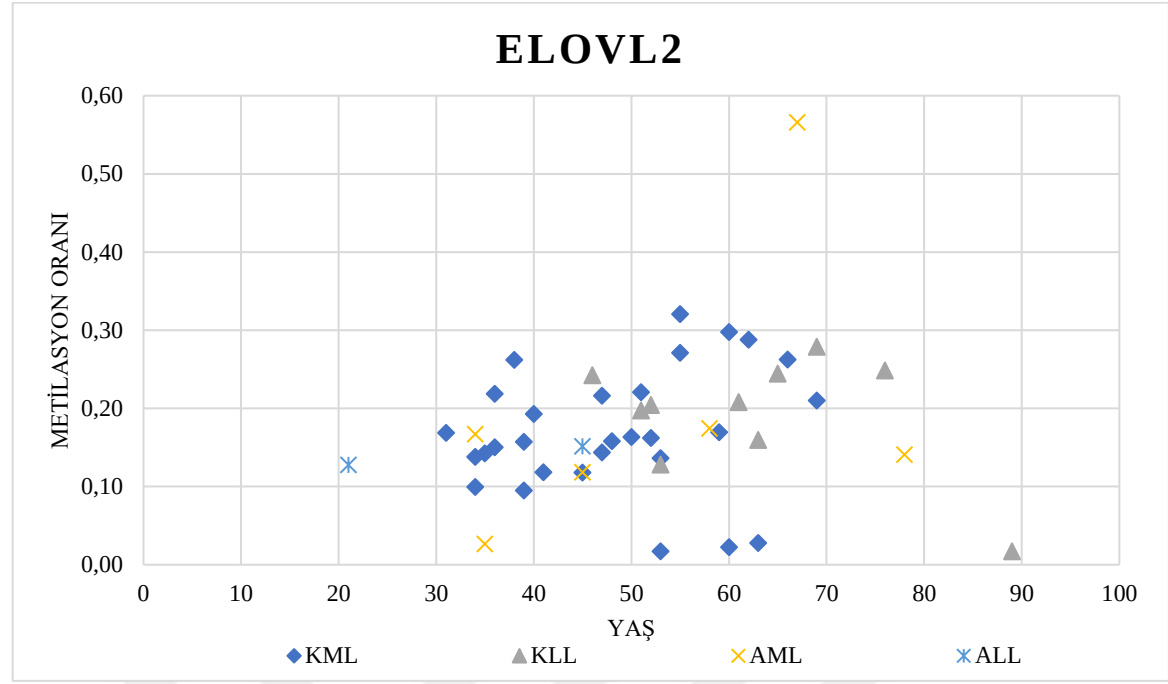
Şekil 17. C1orf132 geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği



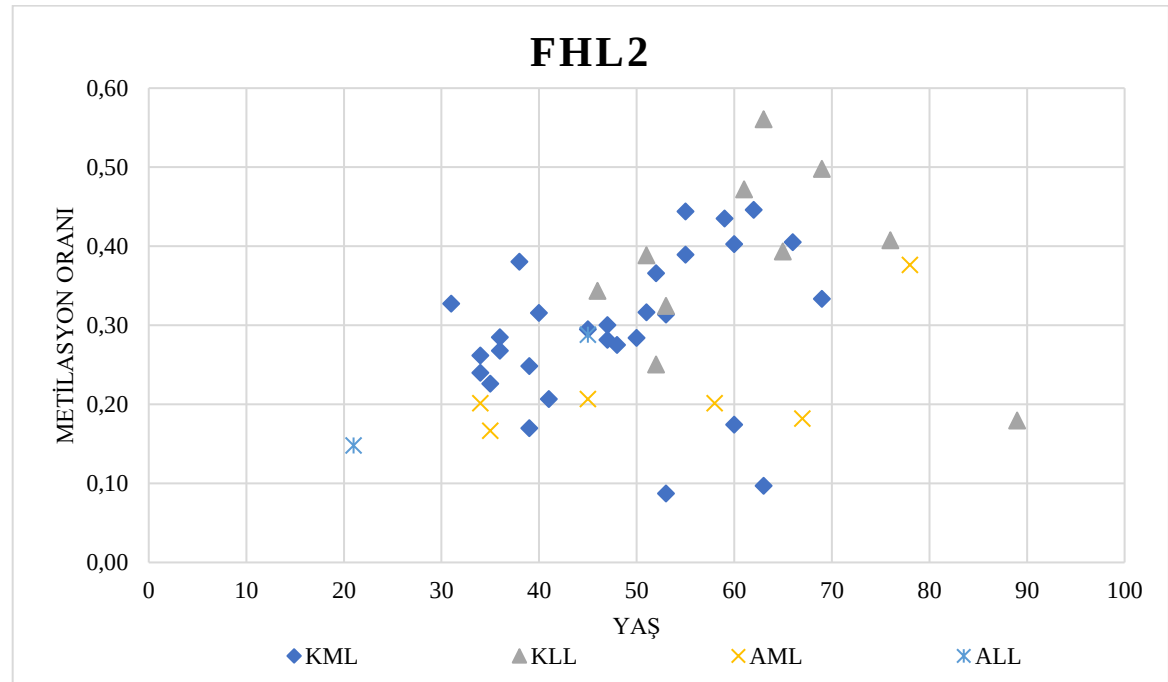
Şekil 18. CCDC102B geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği



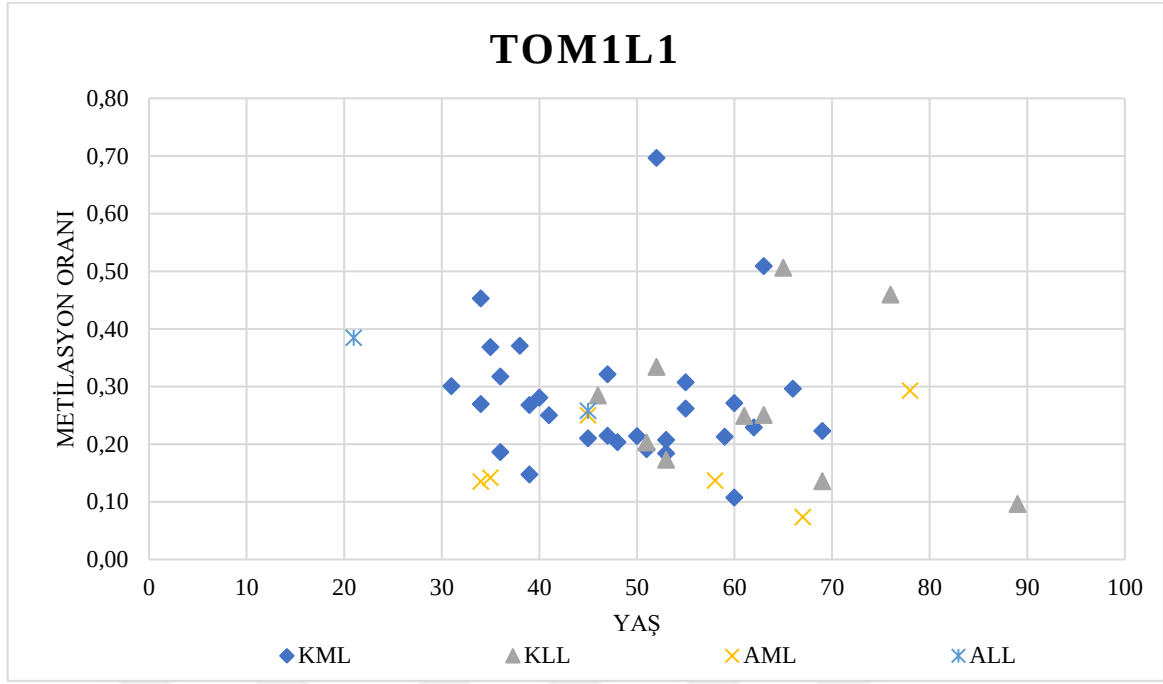
Şekil 19. Cg07082267 lokusunda yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği



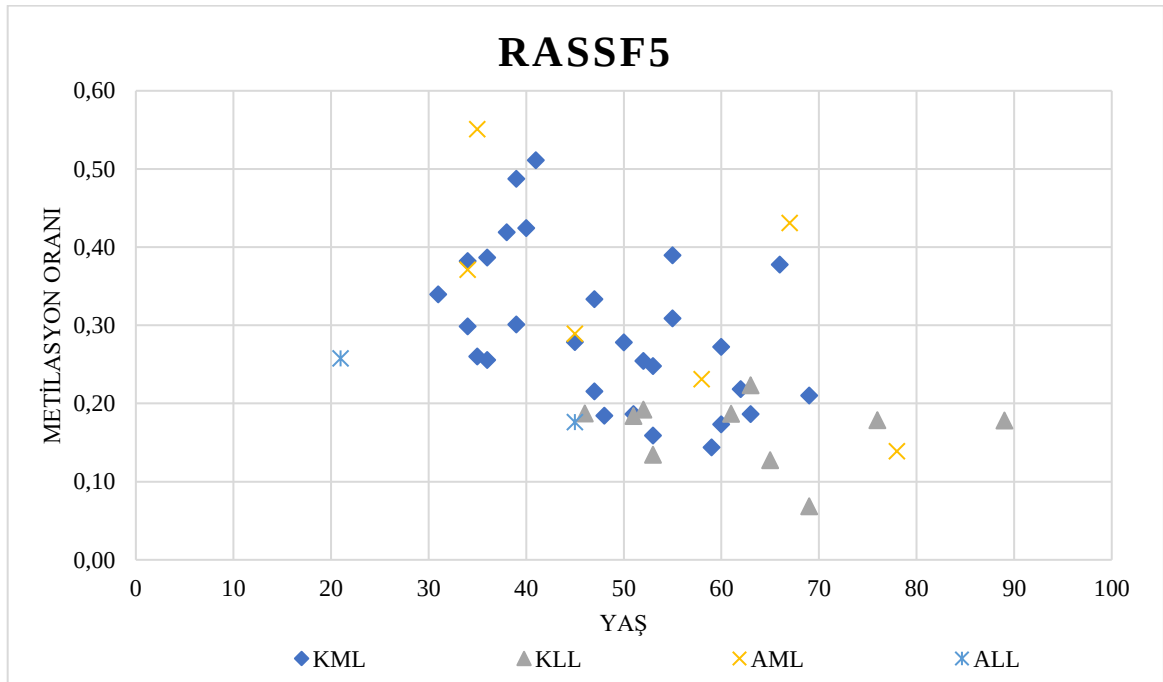
Şekil 20. ELOVL2 geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği



Şekil 21. FHL2 geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği



Şekil 22. TOM1L1 geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği



Şekil 23. RASSF5 geninde yer alan CpG lokusuna ait lösemi alt gruplarının lineer regresyon grafiği

4.4.3. Yaş Tahmini

Çalışmamızda yaş tahmini “Kana Özgü Metilasyon Paterninden yararlanarak Kronolojik Yaş Tahmini” projesinin sonuçlarından çok değişkenli lineer regresyon modeli ile üretilen aşağıdaki formül ile hesaplandı. Her örnek için elde değerler Tablo XVI’de görülmektedir.

$$\text{Yaş tahmini formülü: } 67,861 + (56,877 * \text{FHL2} + 24,531 * \text{ELOVL2} + 5,212 * \text{TOM1L1}) - (63,923 * \text{CCDC102B} + 31,280 * \text{ASPA} + 29,328 * \text{C1orf132} + 29,723 * \text{RASSF5} + 4,489 * \text{cg7082267})$$

Kaynak: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü,

Tablo XVI. Çalışma grubu kronolojik ve DNA metilasyon yaşı

KML Grubu					
Kod	Cinsiyet	Yaş	Tanı Tarihi	İlaç	DNAm Yaşı
L21-M-12	Kadın	31	2012	Nilotinib*	51,1
L21-M-17	Kadın	34	2021	İmatinib	40,6
L22-M-41	Kadın	34	2019	İmatinib	50,28
L22-M-43	Kadın	35	2005	İmatinib	46,01
L21-M-3	Erkek	36	2015	İmatinib	50,18
L21-M-7	Kadın	36	2016	İmatinib	49,58
L21-M-5	Erkek	38	2007	-	48,90

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

KML Grubu					
Kod	Cinsiyet	Yaş	Tanı Tarihi	İlaç	DNAm Yaşı
L22-M-25	Kadın	39	2022	Methotrexate	18,25
L22-M-36	Erkek	39	2022	-	46,18
L22-M-6	Erkek	40	2006	İmatinib	44,57
L22-M-45	Erkek	41	2001	İmatinib	32,48
L21-M-8	Erkek	45	2012	İmatinib	49,64
L21-M-4	Erkek	47	2012	İmatinib	50,18
L22-M-23	Erkek	47	2019	İmatinib	50,19
L22-M-22	Kadın	48	2005	İmatinib	55,50
L22-M-21	Erkek	50	2013	İmatinib	48,16
L22-M-35	Erkek	51	2019	İmatinib- Nilotinip*	61,36
L22-M-37	Kadın	52	2018	Dasatinib	56,77
L22-M-31	Kadın	53	2006	Dasatinib	51,42
L22-M-32	Erkek	53	2007	-	29,22
L21-M-10	Erkek	55	2008	İmatinib	54,64
L21-M-14	Kadın	55	2012	İmatinib	50,75

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

KML Grubu					
Kod	Cinsiyet	Yaş	Tanı Tarihi	İlaç	DNAm Yaşı
L22-M-46	Erkek	59	2003	İmatinib	73,10
L21-M-2	Kadın	60	2008	İmatinib	40,23
L21-M-9	Erkek	60	2002	Nilotinib*	63,66
L21-M-11	Kadın	62	2015	İmatinib	67,21
L22-M-42	Kadın	63	2007	İmatinib	33,10
L21-M-15	Erkek	66	2007	İmatinib	55,96
L22-M-30	Erkek	69	2017	İmatinib	60,40
KLL Grubu					
L21-M-1	Erkek	48	2012	İbrutinib	47,3
L22-M-24	Kadın	51	2019	-	56,44
L22-M-33	Kadın	52	2014	-	49,07
L22-M-39	Erkek	53	2013	-	60,40
L21-M-13	Kadın	61	2017	-	67,45
L22-M-29	Erkek	63	2016	-	63,03
L22-M-40	Erkek	65	2017	-	67,71

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

KLL Grubu					
Kod	Cinsiyet	Yaş	Tanı Tarihi	İlaç	DNAm Yaşı
L22-M-38	Erkek	69	2005	-	65,76
L22-M-18	Erkek	76	2005	Klorambusil	61,65
L22-M-19	Erkek	89	2016	Klorambusil	46,92
AML Grubu					
L22-M-48	Erkek	34	2022	Desitabin	50,40
L22-M-26	Kadın	35	2022	Methotrexate	18,25
L22-M-44	Erkek	45	2019	-	40,88
L22-M-47	Kadın	58	2022	Desitabin	62,99
L22-M-27	Erkek	67	2022	-	30,86
L22-M-20	Erkek	78	2021	Azasitidin*	70,04
ALL Grubu					
L22-M-28	Erkek	21	2022	-	31,80
L22-M-34	Kadın	45	2021	-	53,05

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

Tablo XVI’ da lösemi alt gruplarında çalışılan örneklere ait kronolojik yaş ve DNAm yaşı verilmiştir. Bu tabloda çoğu lösemi hastasında gerçek yaşından farklı bir metilasyon yaşına sahip olduğu görülmektedir.

Tablo XVII: Çalışma grubunun hata değerlerinin farklı yaş grupları ve lösemi tipleri açısından karşılaştırılması

Yaş Grupları	n	MAE (Yıl)	RMSE (Yıl)
		(Mutlak Ortalama Hata)	(Hata kareleri ortalamasının karekökü)
21-45	17	9,95	11,16
40-60	18	6,68	9,18
60 +	12	13,91	19,42
Lösemi (Genel)	47	9,71	13,18
KML	29	9,13	11,54
KLL	11	8,62	14,68
AML	7	8,64	18,09

Tablo XVIII: T-Testi (Grup Analizi)

Grup	N	Ortalama	Standart Sapma	t	df	p
Hata						
Model	100	4,067	4,053	-4,109	54,949	,000
Lösemi	47	9,71	9,004			

Model ve çalışma grubundaki elde edilen yaş tahminlerinin arasındaki farkın karşılaştırılması için t-test sonuçları Tablo XVIII’de verilmiştir. Model ve çalışma grubunun ortalama hata değerleri karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklı olduğu bulunmuştur($p=0,000$). Çalışma grubundaki ortalama hata (9,71) model grubundaki ortalama hatadan (4,067) daha yüksektir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Metilasyon, epigenetik mekanizmalar içinde en çok çalışılan ve anlaşılan mekanizmadır. Özellikle yaşlanma ile ilişkili olduğunun keşfedilmesiyle adli bilimlerde önemi artmıştır. Klasik yaş tayin yöntemlerinin kullanılmadığı vakalarda biyolojik belirteçler ile yaş tahminin bir alternatif olarak kullanılabilmesi umut vadetmektedir. DNA metilasyonuna dayalı yaş tahmini, diğer biyolojik belirteçler (telomer uzunluğu, MtDNA'nın 4977 bp delesyonu, aspartik asit rasemizasyonu, AGEs, DNAm vb.) içerisinde yüksek yaş tahmini doğruluğu ve DNA stabilitesi gibi faktörlerden ötürü ön plana çıkmıştır(6).

Bu tez çalışmasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsünde geliştirilen kandan DNA metilasyonu ile yaş tahmini paneli lösemi hastalarında test edilmiştir. Panelin içerisinde ELOVL2 (chr6:11044661), ASPA (chr17:3476273), C1orf132 (chr1:207823715), cg07082267 (chr16:85395429), CCDC102B (chr18:68722183), RASSF5 (chr1:206685423), TOM1L1 (chr17:54901222) ve FHL2 (chr2:105399282) olmak üzere sekiz CpG bölgesi yer almaktadır. Çalışmamızda 47 lösemi tanısı konmuş çeşitli yaş gruplarından (en düşük yaş;21, en yüksek yaş;89) ve farklı lösemi tiplerindeki (AML, ALL, KML ve KLL) hastalarının kan örneklerinde 8CpG lokusu için metilasyon profilleri belirlenerek yaş tahmini yapıldı.

ELOVL2 geni ELOVL gen ailesinin bir üyesi olup 6. kromozom üzerinde bulunmaktadır. Yağ asidi uzaması, çoklu doymamış asitlerinin (PUFA) ve çok uzun zincirli yağ asitlerinin (VLCFA) biyosentezinde görevlidir. Li ve arkadaşlarının çalışmasında endoplazmik retikulum ve mitokondri organellerindeki stres arttıkça ELOVL2 gen ekspresyonunda düşüş gözlenmiştir (126). Bu durum ELOVL2'de yaşla birlikte metilasyon

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

artışını desteklemektedir. ELOVL2 geninin metilasyon durumu epigenetik saatin %70'ini açıklamaktadır (126,127).

ELOVL2 geninde buluna birden fazla CpG belirteci birçok çalışmada kullanılmış ve hangi lokusun daha iyi korelasyon gösterdiği ile ilgili literatürde yer almıştır. Zbiec-Piekarska ve arkadaşları (2015) 2-75 yaş aralığındaki 427 kan örneğinde ELOL2 genine ait yedi lokusu (Chr6: 1144661, Chr:11044655, Chr:11044644, Chr:11044642, Chr:11044640, Chr:11044634 ve Chr:000006) incelemiştir. Yedi lokus içerisinde en yüksek korelasyon 0,913 ile Chr:000006 pozisyonu ve ikinci olarak 0,88 ile Chr:11044640 pozisyonu hasta grubun yaş varyasyonunu yaklaşık %83'ünü açıklayabildiği belirtilmiştir (68). Sukawutthiya ve arkadaşları, ELOVL2 geni üzerinde farklı CpG bölgelerinin test ettiklerinde cg21572722 lokusu için farklı yaş gruplarında farklı korelasyon değerleri saptanmıştır. Yaşı 21-40 arası olan hasta grubunda cg21572722 lokusu 0,7-0,9 aralığında en yüksek değerini bulmuşlardır (128).

Çalışmamızda ELOVL2 geninde bulunan cg21572722 CpG noktası çalışılmıştır. Bu lokus için lösemi grubunda 0,314 (KML;0,182, AML;0,473) korelasyon değeri ile hipermetilasyon göstermektedir. Fakat KLL hastalarında -0,405 korelasyon katsayısı ile hipometilasyon görülmektedir (Tablo XIV). Zbiec-Piekarska aynı CpG noktasında 0,828 korelasyon değeri elde etmiştir (68). Cho ve arkadaşları (2017), Kore popülasyonunda bu CpG bölgesine ait korelasyon değerini 0,86 olarak bulmuştur(129). Freire-Aradas ve arkadaşları EpiTYPER sistemi ile çalışmalarında en güçlü korelasyonu ELOVL2 (cg21572722) CpG bölgesinde 0,97 olarak belirlemişlerdir (130). Bu çalışmalar sağlıklı bireyler üzerinde elde edilen veriler olmakla birlikte Park ve arkadaşları sağlıklı bireylerde test ettikleri yaş modellemesini AML hastalarında da test etmiştir. Park ve arkadaşları sağlıklı bireylerden oluşan 765 kişilik bir örneklem grubu içinde cg21572722 CpG noktasında 0,79 korelasyon değeri tespit etmiştir. Ayrıca AML hastası kişilerde bu CpG

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

bölgesine ait R değerini 0,1458 olarak bulmuştur (71). Lau ve arkadaşları (2020) 450K Human Methylation BeadChip çalışmalarında ELOVL2 geni için korelasyon değerini 0,73 olarak bulmuştur (131). Aliferi ve arkadaşları Illumina mikroarray teknolojisi ile çalışmalarında 0,79 korelasyon değeri elde etmiştir (132).

ASPA (Aspartoasilaz) 17. Kromozom üzerinde ve N-asetil L-aspartik asidin (NAA) aspartat ve asetata dönüşümünü katalizleyen bir enzim kodlar. Özellikle Canvan hastalığı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir(133). ASPA için birçok çalışmada yüksek korelasyon değerleri not edilmiştir. Weidner ve arkadaşları (2014), 0-78 yaş aralığının dört farklı çalışmanın verilerini birleştirerek elde ettikleri sonuçlarda ASPA için tespit ettikleri korelasyon değeri -0,88 olarak belirlemişlerdir (67). Freier-Aradas ve arkadaşları, cg02228185 CpG noktası için, yetişkinlerde (19-101 yaş) yaptığı çalışmada -0,775 korelasyon, çocuk ve gençleri kapsayan (0-18 yaş) çalışmasında ise -0,503 korelasyon değeri saptamıştır (130,134). Çalışmamızda literatüre uygun olarak ASPA geni negatif yönde korelasyon göstermiştir. Genel lösemi grubunda elde edilen korelasyon oranı -0,159 ile düşüktür. Lösemi alt gruplarında KML; 0,328, KLL; -0,090 ve AML; -0,388 korelasyon katsayısı (Tablo XIV) ile farklı metilasyon durumları görülmektedir (Şekil 16). Bu durum lösemi hastalarında öngörülemez metilasyon değişimlerinden kaynaklı olabilir (135,136)

C1orf132/MIR29B2CHG, 1. Kromozom üzerinde bulunan bir RNA genidir. Yaş tahmin çalışmaları bu genin ümit vadettiğini göstermiştir. Feng ve arkadaşları (2018), 15-75 yaş aralığında 390 bireyin dahil olduğu çalışmalarında C1orf132 geninin de içinde olduğu 9 CpG bölgesi ile bir modelleme çalışması yapmıştır. Çalışmada C1orf132 için elde ettiği korelasyon değeri -0,86 şeklindedir (137). Freire-Aradas ve arkadaşları (2016), EpiTYPER sistemi ile çalışmalarında C1orf132 geni için tespit ettiği korelasyon değeri -0,95 şeklindedir (130). Spolnicka ve arkadaşları (2018) hematopoetik kök hücre nakli yapılan hastalarda yaptığı çalışmada C1orf132 lokusu 0,96 korelasyon katsayısı ile bu

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

lokusun donör yaşını taklit ettiğini tespit etmiştir(138). Çalışmamızda C1orf132 için çalışma grubunda -0,50 korelasyon değerleri elde edilmiş ve literatüre uygun olarak negatif korelasyon göstermektedir. Lösemi alt gruplarında KML; -0,452, KLL; -0,349 ve AML; -0,672 korelasyon katsayıları elde edildi (Tablo XIV). Metilasyon grafiklerine bakıldığında her grup için hipometilasyon durumu görülür (Şekil 17).

CCDC102B (Coiled-Coil Domain Containing Protein), 18. Kromozom üzerinde yer alır. İnterfaz evresinde, sentrozom bütünlüğünü korumak için sentriyollerin proksimal uçlarında lifler oluşturarak bölünme evresinde hücre için önemli bir görev üstlenir (139). Freire ve arkadaşları (2016), EpiTYPER sistemi ile çalışmalarında CCDC102B için korelasyon değerini -0,889 olarak tespit etmiştir (130) . Park ve arkadaşları (2016), kore popülasyonunda kan örneklerinden SNaPshot yöntemi ile çalışmış oldukları yaş tahmin çalışmalarında, CCDC102B için korelasyon değerini -0,72 olarak tespit etmişlerdir(124). Zbiec-Piekarska ve arkadaşları (2015), CCDC102B için korelasyon değerini -0,81 olarak tespit etmiştir (73). Lau ve arkadaşları (2020) 450K Human Methylation BeadChip çalışmalarında CCDC102B için korelasyon değerini -0,71 olarak bulmuştur (131). Aliferi ve arkadaşları Illumina mikroarray teknolojisi ile çalışmalarında -0,82 korelasyon değeri elde etmiştir (132).

Çalışmamızda CCDC102B'ye ait korelasyon değerleri çalışma grubunda 0,259 iken lösemi alt gruplara bakıldığında KML'de -0,443, KLL'de -0,126 ve AML'de 0,25 korelasyon katsayısı elde edilmiştir (Tablo XIV). Lösemi grupları arasındaki metillenme durumunda meydana gelen farklılık farklı lösemi gruplarının epigenetik mekanizmaları farklı yönde etkilediğini düşündürmektedir. Bu durum Wilop ve arkadaşlarının AML hastalarında metilasyon profili çalışmasında elde ettiği metilasyon profilleri tersine yönde değişim gösterdiği ve öngörülür olmadığı sonucuyla benzerdir (135). Bunun nedenleri

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

arasında kanser hücrelerinde DNMT enzimlerini kodlayan genlerinin anormal çalışması veya mutasyon durumu gösterilebilir (140).

FHL2(Four and a Half LIM Domain), 2. Kromozom üzerinde yer alan bu gen hücre içi sinyal iletiminde görev aldığı tespit edilmiştir. FHL2 geninin birçok dokuda ifade edildiği ve hücre içerisinde düzenleyici mekanizmalar ile iş birliği içinde çalıştığı görülmüştür. Kanser üzerine yapılan bazı çalışmalar FHL2'nin tümör baskılayıcı mekanizmaları düzenleyerek tümör baskılayıcı fonksiyonu olduğunu göstermiştir. Bazı çalışmalarda FHL2'nin uyarılmış varyasyonlarının tümör hücrelerinde daha fazla ifade edildiğini göstermiştir. Buda bizi kanser hücreleri için onkogenik aktivite gösterdiği sonucuna ulaştırmaktadır. AML ve MDS hastalarının bir kısmında FHL2'nin aşağı regülasyonu görülmüştür. Hasta bireylerde sağlıklı kişiler kıyasla daha az aktivite göstermektedir. Bu durum FHL2 geninin promotör bölgesinde metilasyon oranının artması ile açıklanabilir. (141–144).

Yaşlanma ilgili çalışmalar bu genin en yüksek hipermetilenmiş genler arasında olduğunu göstermiştir. Freire ve arkadaşları (2016), EpiTYPER sistemi çalışmalarında, FHL2 için korelasyon değeri 0,97 bulmuşlardır (130). Park ve arkadaşları (2016), SNaPshot yöntemi ile çalıştıkları yaş tahmin çalışmaların FHL2 geninde buldukları korelasyon değeri 0,752 şeklindedir(124). Lau ve arkadaşları (2020) 450K Human Methylation BeadChip çalışmalarında FHL2 geni için korelasyon değerini 0,76 olarak bulmuştur (131). Aliferi ve arkadaşları Illumina mikroarray teknolojisi ile çalışmalarında 0,81 korelasyon değeri elde etmiştir (132). FHL2 geni için elde ettiğimiz korelasyon değeri çalışma grubunda 0,57 şeklindedir. Lösemi alt gruplarına da bakıldığında KML; 0,266, KLL; -0,134 ve AML'de 0,686 korelasyon değerleri (Tablo XIV) elde ederek farklı metilasyon eğrileri gözlemledik (Şekil 21). FHL2 lokusu için tümör hücrelerinde baskılandığı yönünde ve baskılanmayıp onkogenik aktiviteyi düzenlediğine dair iki teori

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

mevcuttur. Gruplara göre oluşan farkın nedenini bu iki teoriden olduğunu varsayıyoruz(141).

TOM1L1 (Target Of Myb1 Like 1 Membrane Trafficking Protein) 17. Kromozom üzerinde yer alır. Sinyal yolların yer alan bir adaptör proteindir ve fosforillendiğinde çeşitli sinyal proteinleriyle etkileşime girer(145,146). Bocklandt ve arkadaşlarının (2011) ikizlerin tükürük örneklerinden metilasyon yaşı çalışmasında TOM1L1 lokusu için -0,68 korelasyon değeri bulmuştur. Freire-Aradas ve arkadaşları (2018), EpiTYPER sistemi ile gençleri kapsayan çalışmalarında TOM1L1 geni için tespit ettiği korelasyon değeri -0,50 şeklindedir(134). Çalışmamızda TOM1L1 için çalışma grubunda 0,40 korelasyon değeri saptanmıştır. Lösemi alt gruplarında KML; -0,080, KLL; -0,097 ve AML; 0,282 korelasyon katsayısı ile yine farklı metilasyon durumları görülmektedir(Tablo XIV)(Şekil 22). Wilop ve arkadaşlarının AML hastalarında farklı metilasyon profillerini gözlemleri ile benzer bir şekilde TOM1L1 lokusu içinde diğer gruplardan farklı yönde bir metilasyon profili gözlemledik (135).

RASSF5 (Ras Association Domain Family Member 5), 1. Kromozom üzerinde yer alır. GDP/GTP moleküler anahtarı olarak faaliyet gösteren GTP bağlayıcı bir protein kodlar. Çeşitli hücresel süreçleri yönetmek için farklı moleküller ile etkileşim içinde çalışarak hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozu gibi süreçleri yönetir. Kanseri hücrelerinde RAS'ın promotör bölgesinde anormal metilasyon ile gen inaktive edilir(147). RAS hipermetilasyonu, miyeloid maligniteler (AML ve KML) ile ortak görülen bir durum olarak kaydedilmiştir (148,149). Oysa çalışmamızda miyeloid lösemilerde hipometilasyon gözlenmiştir. Bunun nedeni ile ilgili genelleme yapabilmek için daha geniş bir grupta çalışmak gerekir. Ayrıca mutasyon görülen RAS genlerinde onkogenik aktivite görülmektedir. RASSF5, hücre yaşlanmasında rol oynayan TP53 ve RB1 aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynar (148,149). Çalışmamızda RASSF5'de korelasyon değeri olarak

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

çalışma grubunda elde edilen değer -0,40 şeklindedir. Lösemi alt gruplarında KML; -0,494, KLL; -0,149 ve AML; -0,603 korelasyon katsayısı ile aynı yönlü metilasyon durumları görülmektedir (Şekil 22). RASSF5 geninin bir proto-onkogen olması farklı lösemi gruplarında farklı davranışlar gösterebileceği yönünde düşündürmektedir. Aliferi ve arkadaşları Illumina mikroyarray teknolojisi ile çalışmalarında -0,76 korelasyon değeri elde etmiştir (132).

Cg07082267 CpG bölgesi 16. Kromozom üzerinde RP11-680G10.1 lokusu yakınında bulunan ve henüz karakterize edilmemiş bir protein kodlayan bir noktadır. Freire ve arkadaşları cg07082267 CpG noktası için EpiTYPER yöntemiyle yaptıkları çalışmada 19-101 yaş aralığında -0,85 ve 2-18 yaş arasında -0,74 korelasyon değeri saptamıştır (130). Lau ve arkadaşları (2020) 450K Human Methylation BeadChip çalışmalarında için korelasyon değerini -0,61 olarak bulmuştur (131). Çalışmamızda cg07082267 lokusu için çalışma grubunda elde ettiğimiz korelasyon değeri -0,769 şeklindedir. Lösemi alt gruplarında korelasyon değerleri KML; -0,442, KLL; 0,033 ve AML'de -0,444 şeklindedir. Bu CpG lokusunun henüz anlamlandırılmış bir işlevi olmaması sebebiyle lösemi alt gruplarındaki farklılığın anlamlı bir ilişkiye dayandırılıp dayandırılmayacağı belirsizdir. Literatüre geçmiş çalışmalarda löseminin metilasyon profilindeki değişimlerde öngörülür olmadığına dikkat çekilmektedir (135).

Hannum kanser dokuda yaşlanmanın sağlıklı dokuya kıyasla %40 daha fazla olduğunu tespit etmiştir(40). Lösemi metilasyon profillerine bakıldığında erken dönem artan metilasyon seviyeleri dikkat çekmektedir. Lösemide metilasyon belirteçleri üzerine yapılmış çalışmalar, hastalarda istikrarlı bir profil olmadığını ve hem hasta bazında hem grup kıyaslamalarında heterojenitenin oldukça fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanında literatürde AML tipinde metilasyon değişiminde artışı daha fazla olduğu

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

belirtilmiştir. Bu durumda genel olarak kişinin kronolojik yaşı ile metilasyon yaşı arasında büyük farklılıklar görünebilir. (13,41,150).

Bu çalışmada test edilen lokuslar arasında ASPA, CCDC102B, cg07082267 ve TOM1L1 lokuslarında kontrol örneklerinde kıyasla korelasyon farkı fazladır. Bu lokusların birebir hastalık üzerinde baskılama veya aktive etme gibi bir fonksiyonu olmamasına karşın korelasyon değerlerinde anlamlı derecede farklılık gözlenmiştir. Birçok literatür çalışmasında löseminin öngörülemez DNA metilasyon profillerinin oluşmasına neden olduğuna vurgu yapılmıştır. Bu lokuslardaki metilasyon oranı değişimi yaş tahmini için beklenenden daha farklı tahminler yapılmasına neden olmaktadır.

5.1. Yaş Tahmini Değerlendirilmesi

Metilasyon bireysel farklılıklar, yaşam ve çevresel koşullara bağlı olarak geri dönüşümlü çok değişkeni bir mekanizma olması sebebiyle kanser gibi bir hastalık öngörülemez sonuçların oluşumunu tetikleyebilir. Lösemi gruplarında metilasyon heterojenitesi fazla olduğundan yaş farkının da fazla olması beklenen bir sonuçlardan biridir (40,41,67,151).

Çalışmamızda yer alan 8 CpG (ELOVL2, ASPA, C1orf132, cg07082267, CCDC102B, RASSF5, TOM1L1 ve FHL2) lokusunun model grubunda analiz edildikten sonra elde edilen yaş tahmin formülü ile çalışma grubundaki gönüllülerin, Microsoft Excel programında metilasyon yaşı (DNAm) hesaplandı (Tablo XVI). Model grubunun MAE değeri $\pm 4,067$ yıl çalışma grubunda ise $\pm 9,71$ yıl olarak bulundu (Tablo XVIII). Hasta grubu içerisinde MAE değerinden daha fazla yaş sapmaları da gözlenmiştir. KML grubunda iki hastada (L21-M-2 ve L22-M32) 20 yaş üzerinde daha genç yaş tahmini yapılmıştır. KLL grubunda bir hastada 40 yaşın üzerinde daha genç bir yaş tahmini ve AML grubunda iki hastada (L22-M-26 ve L22-M-27) 15 ile 37 yaş daha genç tahminler elde edildi. Wagner

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

DNA değişikliklerinin uyarılmış pluripotent kök hücrelerde yeniden programlanıp neredeyse mevcut durumun tersine çevrildiğini ve bu durumun gençleşme olarak karakterize edildiğini belirtmiştir(152). Elimizdeki yüksek farkla daha genç yaş tahminlerinin nedenini bu durumla ilişkilendiriyoruz.

Spolnicka ve arkadaşları (2016), hematopoetik kök hücre nakli olan bireyler üzerinde yaptığı çalışmada donör ve alıcıların metilasyon yaşlarını çalışmıştır. Çalışmasında donörlerin yaşını $\pm 3,9$ yıl ile hastaların nakil öncesi yaşını $\pm 12,3$ fark ile tespit etmişlerdir(153). Spolnicka ve arkadaşlarının KLL hastalarında yaş tahmini çalışmasında ise KLL hastaların %79,5 oranında yüksek yaş tahmini tespit edilmiştir. KLL'nin metilasyon mekanizmasına karmaşık etkisi güvenilir bir yaş tahminin yapmanın mümkün olmadığı sonucuna varmıştır(136). Çalışmamızda KLL grubu (N=11) hastalarda $\pm 8,62$ yıl hata ile yaş tahmini yapıldı (Tablo XVII). Bu hata değeri diğer lösemi türleri ile benzer bir şekilde gözlenmiştir. Löseminin olağan olmayan metillenme profilleri doğru yaş tahminde bulunmanın önünde engel olduğunu doğruladık.

Park ve arkadaşları (2016), Human Methylation 450 BeadChip tekniği ile yaş tahmini çalışmasını AML hastalarında değerlendirdiğinde yaşla korelasyon ilişkisinin ortadan kalktığını bulmuştur (124). Wagner ve arkadaşlarının yaşa bağlı DNA metilasyon belirteçlerinin malign değişimi ile ilgili çalışmasında, 194 AML hastasının DNA metilasyon profilinde 99 CpG modeli ve Horvath'ın 353 CpG modelinde test ettiğinde elde ettiği sonuçlar 99 CpG bölgesinin olduğu modelde ± 21 yıl, Horvath modelinde ise ± 10 yıl sapma ile metilasyon yaşı tahmini yapmıştır (152). Benzer şekilde çalışmamızda hasta bazında baktığımızda akut lösemi olup yeni teşhis konmuş bazı hastalarda yaş sapmasının kronik hastalardan daha fazla olduğu görülmüştür (Tablo XVI). L22-M48, L22-M26 ve L22-M-27 kodlu hastalarda ortalama hata değeri olan $\pm 9,71$ yılın üstünde sapma görülmüştür.

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

Hasta grubunda 3 farklı yaş aralığı belirleyip yaş gruplarının da değerlendirmesi yapıldığında 21-45 yaş aralığında hasta bireylerin yaş sapma yüzdelерinin (%28,9) daha fazla olduğu görülmüştür. Bu karşın 60 yaş üstündeki hastaların çoğunda DNA metilasyon yaşını kronolojik yaştan daha küçük tahmin ettiği görüldü (Tablo XVII). Bu durumu Wagner'in çalışmasında değindiğı uyarılmış pluripotent kök hücrelerin metilasyon durumunu tersine çevrilmesi ile açıklamak mümkün olabilir (67).

Yaş farkının değışimiyle ilgili değerlendirilen diğer bir parametre hastaların tedavi için kullandığı ilaçların metilasyon etkisiydi. Hasta grubundaki bazı hastalar ilaç tedavisi almadan takip edilmekteydi ve 3 hasta hipometile ajan (azasitidin ve klorombusil) ve 30 hasta tirozin kinaz inhibitörleri (ibrutinib, imatinib, nilotinib, dasatinib ve desitabin) ile tedavileri devam etmekteydi (Tablo XVI). Çalışma içerisinde tedavi desteğı alan ve almayan hastalar karşılaştırıldığında tirozin kinaz inhibitörü türevi ilaç kullanan hastalarda anlamlı bir yaş tahmini yapılamamıştır. Hipometile ajan (azasitidin, ve klorombusil vb.) ile tedavi gören üç hasta (L21-M-9, L21-M-12 ve L22-M-20) kronolojik yaşlarından daha genç yaş tahmini yapılmıştır (Tablo XVI). Hastaların teşhis edildiğı zaman dilimine bakıldığında ise yaş farkı ve hastalık süre ile ilgili anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. Fakat elimizde verilere göre kronik lösemilerde farkın akut lösemilere nazaran daha fazla olduğunu söylemek mümkündür. Bu durumu daha iyi ele almak için daha geniş ve kronik ve akut lösemilerin eşit dağılım gösterdiği bir veri kümesinde değerlendirilmelidir.

Bu çalışmada DNA metillenme seviyelerinde farklılıklarından yararlanarak lösemi hastalarında yaş tahmini yapmak kronolojik yaşları ile karşılaştırılarak kanserin DNA metilasyonu üzerindeki değışimi anlaşılmaaya çalışılmıştır. Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü'nde geliştirilen kandan DNA metilasyon paneli lösemi hastalarının yaş tahmini değerlendirilmesi yapıldı. Lösemi alt gruplarına baktığımızda birbirine yakın MAE değeri kaydetdik (Tablo XVII). Ayrıca iki

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

grupta hesaplanan DNAm yaşlarının arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($t=4,109$, $p=0.000$) görüldü (Tablo XVIII). Her ne kadar küçük bir örneklem grubuyla çalışsak da çalışmalarımız beklentimiz doğrultusunda olup, lösemi hastalarında çoğunlukla DNAm yaşının kronolojik yaştan çok farklı çıktığı görülmüştür.

Sonuçların daha geniş yaş aralığında ve daha fazla hastayı kapsayacak şekilde çalışılması durumunda değerlendirme kriterleri için daha doğru yargılara varmak mümkün olacaktır. Özellikle olay yerinde sıkça rastlanan biyolojik delillerden biri olan kan için bakıldığın metilasyona dayalı yaş tahmin umut verici olsa da lösemi gibi kandaki metilasyon profilinin etkileyen hastalıkların olduğu da unutulmamalıdır. Bu yüzden bu panel kullanıldığında şüpheli profilleri de hastalık geçmişleri de göz önünde bulundurulmalıdır.

6. KAYNAKÇA

1. Filoglu G, Sah I, Dogan M, Nalcaoglu S, Tavaci I, Bulbul O, et al. Application of next generation sequencing in forensic science [Yeni nesil dizilemenin adli bilimlerde kullanimi]. *Medicine Science | International Medical Journal*. 2017;1.
2. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis4 RW. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. Vol. 32, *Am JHum Genet*. 1980.
3. Hochmeister MN. DNA Technology in Forensic Applications. Vol. 16, *Aspects Med*. 1996.
4. Filoglu G, Sah I, Dogan M, Nalcaoglu S, Tavaci I, Bulbul O, et al. Application of next generation sequencing in forensic science [Yeni nesil dizilemenin adli bilimlerde kullanimi]. *Medicine Science | International Medical Journal*. 2017;1.
5. Bülbül Ö, Filoğlu G. Biyocoğrafik Soy Tahmini ve Adli Bilimlerde Kullanımı. *Adli Tıp Bülteni*. 2019;24(2):131–40.
6. Vidaki A, Kayser M. Recent progress, methods and perspectives in forensic epigenetics. Vol. 37, *Forensic Science International: Genetics*. Elsevier Ireland Ltd; 2018. p. 180–95.
7. Brotons A, Remy F, Foti B, Philip-Alliez C. Concordances and correlations between chronological, dental and bone ages: A retrospective study in French individuals. *Forensic Sci Int*. 2022 Feb 1;331.
8. Akay G, Atak N, Güngör K, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi A, Ağız Ve Diş Sağlığı Eğitim Hastanesi T, Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi G, et al. Adli Dişhekimliğinde Dişler Kullanılarak Yapılan Yaş Tayini Yöntemleri Age Estimation Methods Using Teeth in Forensic Odontology. Vol. 39, *EÜ Dişhek Fak Derg*. 2018.
9. Meissner C, Ritz-Timme S. Molecular pathology and age estimation. Vol. 203, *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd; 2010. p. 34–43.
10. Meissner C, Von Wurmb N, Schimansky B, Oehmichen M. Estimation of age at death based on quantitation of the 4977-bp deletion of human mitochondrial DNA in skeletal muscle [Internet]. Vol. 105, *Forensic Science International*. 1999. Available from: www.elsevier.com/locate/forsciint
11. Vidaki A, Daniel B, Court DS. Forensic DNA methylation profiling - Potential opportunities and challenges. Vol. 7, *Forensic Science International: Genetics*. 2013. p. 499–507.
12. Kader F, Ghai M. DNA methylation and application in forensic sciences. Vol. 249, *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd; 2015. p. 255–65.

13. Lin Q, Wagner W. Epigenetic Aging Signatures Are Coherently Modified in Cancer. *PLoS Genet.* 2015 Jul 1;11(6).
14. McCartney DL, Min JL, Richmond RC, Lu AT, Sobczyk MK, Davies G, et al. Genome-wide association studies identify 137 genetic loci for DNA methylation biomarkers of aging. *Genome Biol.* 2021 Dec 1;22(1).
15. Ayaz GB, Şahin Ö, Ayaz U, Özdemir SM. Epigenetik ve Kanser. *Madde, Diyalektik ve Toplum* . 2019;2(1):94–103.
16. Can Mİ, Aslan A. Epigenetik Mekanizmalar ve Bazı Güncel Çalışmalar. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi* [Internet]. 2016;6(2):445–4526. Available from: <http://fbd.beun.edu.tr>
17. Martin C, Zhang Y. Mechanisms of epigenetic inheritance. Vol. 19, *Current Opinion in Cell Biology*. 2007. p. 266–72.
18. Holliday R. Epigenetics: A historical overview. Vol. 1, *Epigenetics*. Taylor and Francis Inc.; 2006. p. 76–80.
19. Akkiprik M, Dirican E, Güllü Amuran G, Özer A, Üniversitesi M, Fakültesi T, et al. Kanserde Genetik Üstü (Epigenetik) Mekanizmalar Epigenetic Mechanisms in Cancer. Vol. 27, 112 | *Türk Nöroşir Derg.* 2017.
20. Kader F, Ghai M. DNA methylation and application in forensic sciences. Vol. 249, *Forensic Science International*. Elsevier Ireland Ltd; 2015. p. 255–65.
21. Güler C, Peynircioğlu BB. DNA Metilasyonu ve Hastalıklarla İlişkisi. 2016;2016(2):61–8.
22. Vidaki A, Kayser M. Recent progress, methods and perspectives in forensic epigenetics. Vol. 37, *Forensic Science International: Genetics*. Elsevier Ireland Ltd; 2018. p. 180–95.
23. Huang Y, Yan J, Hou J, Fu X, Li L, Hou Y. Developing a DNA methylation assay for human age prediction in blood and bloodstain. *Forensic Sci Int Genet.* 2015 Aug 7;17:129–36.
24. Shen H, Laird PW. Interplay between the cancer genome and epigenome. Vol. 153, *Cell*. Elsevier B.V.; 2013. p. 38–55.
25. Yokuş B. Epigenom ve Epigenetik. 2013;5–13. Available from: <http://www.dicle.edu.tr/bolum/Muh/veteriner/dergi/>
26. Shen H, Laird PW. Interplay between the cancer genome and epigenome. Vol. 153, *Cell*. Elsevier B.V.; 2013. p. 38–55.
27. Güler C, Balcı B. DNA Metilasyonu ve Hastalıklarla İlişkisi. 2016.
28. Güzelgül F, Aksoy K. Kodlanmayan Rna'ların İşlevi ve Tıpta Kullanım Alanları. 2009.
29. Guzel E. Tumor Suppressor and Oncogenic Role of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *North Clin Istanbul.* 2019;

30. Mattick JS, Makunin I v. Non-coding RNA. Vol. 15 Spec No 1, Human molecular genetics. 2006.
31. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. Vol. 38, Neuropsychopharmacology. 2013. p. 23–38.
32. İzmirli M, Tufan T, Alptekin D, Vakıf Üniversitesi B, Fakültesi T, Biyoloji Anabilim Dalı T, et al. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi Archives Medical Review Journal DNA Metilasyonu DNA Methylation. Vol. 21, Archives Medical Review Journal). 2012.
33. Bell CG, Lowe R, Adams PD, Baccarelli AA, Beck S, Bell JT, et al. DNA methylation aging clocks: Challenges and recommendations. Genome Biol. 2019 Nov 25;20(1).
34. Kader F, Ghai M. DNA methylation and application in forensic sciences. Vol. 249, Forensic Science International. Elsevier Ireland Ltd; 2015. p. 255–65.
35. Li S, Tollefsbol TO. DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses. Vol. 187, Methods. Academic Press Inc.; 2021. p. 28–43.
36. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. Vol. 38, Neuropsychopharmacology. 2013. p. 23–38.
37. Şimşek SZ. YAŞ TAYİNİNDE DNA METİLASYON BELİRTEÇLERİNİN KULLANIMI VE OPTİMİZASYONU. [İstanbul]: Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü; 2020.
38. Chaitanya L, Breslin K, Zuñiga S, Wirken L, Pośpiech E, Kukla-Bartoszek M, et al. The HIrisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. Forensic Sci Int Genet. 2018 Jul 1;35:123–35.
39. Choung CM, Lee JW, Park JH, Kim CH, Park HC, Lim SK. A forensic case study for body fluid identification using DNA methylation analysis. Leg Med. 2021 Jul 1;51.
40. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sadda SV, et al. Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. Mol Cell. 2013 Jan 24;49(2):359–67.
41. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types [Internet]. Vol. 14, Genome Biology. 2013. Available from: <http://genomebiology.com/14/10/R115>
42. Gringras P, Chen W. Mechanisms for differences in monozygous twins [Internet]. 2001. Available from: www.elsevier.com/locate/earlhumdev
43. Choung CM, Lee JW, Park JH, Kim CH, Park HC, Lim SK. A forensic case study for body fluid identification using DNA methylation analysis. Leg Med. 2021 Jul 1;51.

44. Gomes I, Kohlmeier F, Schneider PM. Genetic markers for body fluid and tissue identification in forensics. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2011 Dec;3(1).
45. Sijen T. Molecular approaches for forensic cell type identification: On mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers. *Forensic Sci Int Genet.* 2015 Aug 19;18:21–32.
46. Gomes AQ, Nolasco S, Soares H. Non-coding RNAs: Multi-tasking molecules in the cell. Vol. 14, *International Journal of Molecular Sciences.* 2013. p. 16010–39.
47. Frumkin D, Wasserstrom A, Budowle B, Davidson A. DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2011 Nov;5(5):517–24.
48. Wasserstrom A, Frumkin D, Davidson A, Shpitzen M, Herman Y, Gafny R. Demonstration of DSI-semen - A novel DNA methylation-based forensic semen identification assay. *Forensic Sci Int Genet.* 2013 Jan;7(1):136–42.
49. Lee JE, Lee JM, Naue J, Fleckhaus J, Freire-Aradas A, Neubauer J, et al. A collaborative exercise on DNA methylation-based age prediction and body fluid typing. *Forensic Sci Int Genet.* 2022 Mar 1;57.
50. Xiang Z, Yang Y, Chang C, Lu Q. The epigenetic mechanism for discordance of autoimmunity in monozygotic twins. Vol. 83, *Journal of Autoimmunity.* Academic Press; 2017. p. 43–50.
51. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins [Internet]. 2005. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0500398102
52. Vidaki A, Ballard D, Aliferi A, Miller TH, Barron LP, Syndercombe Court D. DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet.* 2017 May 1;28:225–36.
53. McCartney DL, Min JL, Richmond RC, Lu AT, Sobczyk MK, Davies G, et al. Genome-wide association studies identify 137 genetic loci for DNA methylation biomarkers of aging. *Genome Biol.* 2021 Dec 1;22(1).
54. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. Vol. 19, *Nature Reviews Genetics.* Nature Publishing Group; 2018. p. 371–84.
55. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada SV, et al. Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol Cell.* 2013 Jan 24;49(2):359–67.
56. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types DNA methylation age of human tissues and cell types. 2013;

57. Mc Auley MT. DNA methylation in genes associated with the evolution of ageing and disease: A critical review. Vol. 72, Ageing Research Reviews. Elsevier Ireland Ltd; 2021.
58. Horvath H, Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types [Internet]. Vol. 14, Genome Biology. 2013. Available from: <http://genomebiology.com//14/10/R115>
59. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sadda SV, et al. Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. Mol Cell. 2013 Jan 24;49(2):359–67.
60. Demirkıran DS. Methods for age estimation. Dicle Medical Journal/Dicle Tıp Dergisi [Internet]. 2014 Mar 1;41(1):238–43. Available from: <http://dergipark.gov.tr/doi/10.5798/diclemedj.0921.2014.01.0410>
61. Márquez-Grant N. An overview of age estimation in forensic anthropology: Perspectives and practical considerations. Vol. 42, Annals of Human Biology. Taylor and Francis Ltd; 2015. p. 308–22.
62. Demirkıran DS. Methods for age estimation. Dicle Medical Journal/Dicle Tıp Dergisi [Internet]. 2014 Mar 1;41(1):238–43. Available from: <http://dergipark.gov.tr/doi/10.5798/diclemedj.0921.2014.01.0410>
63. Çetli E, Tatar D, Özkoçak V. Adli Bilimlerde DNA Parmak İzine Adli Genetik ve Adli Antropolojik Bakış. BEU Journal of Science. 2019;8(4):1545–56.
64. Smith DEM, Humphrey LT, Cardoso HFV. Age estimation of immature human skeletal remains from mandibular and cranial bone dimensions in the postnatal period. Forensic Sci Int. 2021 Oct 1;327.
65. Delmonico L, Silvestre RT, Chantre-Justino M, Dormund KA, Ribeiro GB, Ornellas MHF, et al. Measuring Telomere Length: A Timeline Review on the State-of-Art Techniques. In: Encyclopedia of Infection and Immunity. Elsevier; 2022. p. 259–75.
66. Blasco MA. Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging Telomeres ± telomerase ± mouse models ± cancer ± aging ± DNA repair [Internet]. Available from: www.urbanfischer.de/journals/ejcb
67. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, et al. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. Genome Biol. 2014 Feb 3;15(2).
68. Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, Makowska Z, Spas A, Parys-Proszek A, et al. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. Forensic Sci Int Genet. 2015;14:161–7.
69. Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, Van de Voorde W, Decorte R. A selective set of DNA-methylation markers for age determination of blood,

- teeth and buccal samples. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2015 Dec 1;5:e144–5.
70. Smeers I, Decorte R, Van de Voorde W, Bekaert B. Evaluation of three statistical prediction models for forensic age prediction based on DNA methylation. *Forensic Sci Int Genet.* 2018 May 1;34:128–33.
 71. Park JL, Kim JH, Seo E, Bae DH, Kim SY, Lee HC, et al. Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use. *Forensic Sci Int Genet.* 2016 Jul 1;23:64–70.
 72. Li X, Wang J, Wang LY, Gao Y, Feng G, Li G, et al. Lipid metabolism dysfunction induced by age-dependent DNA methylation accelerates aging. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Dec 1;7(1).
 73. Zbieć-Piekarska R, Spolnicka M. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Sci Int Genet.* 2015 Aug 7;17:173–9.
 74. Sukawutthiya P, Sathirapatya T, Vongpaisarnsin K. A minimal number CpGs of ELOVL2 gene for a chronological age estimation using pyrosequencing. *Forensic Sci Int.* 2021 Jan 1;318.
 75. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins [Internet]. 2005. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0500398102
 76. Harrison A, Parle-McDermott A. DNA methylation: A timeline of methods and applications. Vol. 2, *Frontiers in Genetics*. 2011.
 77. Vidaki A, Daniel B, Court DS. Forensic DNA methylation profiling - Potential opportunities and challenges. Vol. 7, *Forensic Science International: Genetics*. 2013. p. 499–507.
 78. Singer BD. A practical guide to the measurement and analysis of DNA methylation. Vol. 61, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. American Thoracic Society; 2019. p. 417–28.
 79. Rajawat J, Misra G. Overview of cancer assessment, diagnostics, and therapeutics. In: *Protocol Handbook for Cancer Biology*. Elsevier; 2021. p. 1–6.
 80. Atıcı E. Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk Onkoloji Dergisi.* 2007;22(4):197–204.
 81. Gürel Ç, Feyda Nursal A, Yigit S. Epigenetik ve Kanser. *Türkiye Klinikleri* [Internet]. 2016;2(1):45–51. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/309357812>
 82. Özbayer C. Circadian clock, cell cycle and cancer. *Dicle Medical Journal / Dicle tıp Dergisi.* 2011 Dec 1;38(4):514–8.

83. Pazarbaşı A, Kasap M. Pazarbaşı A, Kanser Genetiği. 2003.
84. Heuvel S van den. Cell-cycle regulation. WormBook : the online review of C. elegans biology. 2005. p. 1–16.
85. Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H. DNA methylation in cancer and aging. Vol. 76, Cancer Research. American Association for Cancer Research Inc.; 2016. p. 3446–50.
86. Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns [Internet]. 2000. Available from: <http://genetics.nature.com>
87. Aydın A, Özerol İH. Lösemi ve Lenfomaların İrdelenmesi ve Teşhisinde Flow Sitometrik İmmün Tip Tayini. 1996.
88. Anak S, Uysalol E. Acute Myelogenous Leukemia (AML). Tuberculin Skin Test in Children. 2013 Apr 15;12(4):153–8.
89. Wilop S, Fernandez AF, Jost E, Herman JG, Brümmendorf TH, Esteller M, et al. Array-based DNA methylation profiling in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 2011 Oct;155(1):65–72.
90. Molica M, Breccia M, Foa R, Jabbour E, Kadia TM. Maintenance therapy in AML: The past, the present and the future. Vol. 94, American Journal of Hematology. Wiley-Liss Inc.; 2019. p. 1254–65.
91. Liu H. Emerging agents and regimens for AML. Vol. 14, Journal of Hematology and Oncology. BioMed Central Ltd; 2021.
92. Gupta P, Ashar Y V., Ashby CR, Lin L, Chen ZS. The Oncogenic Protein, Breakpoint Cluster (BCR)-Abelson Kinase (ABL) and Chronic Myelocytic Leukemia (CML): Insight Into the Drug Resistance Mechanisms and Approaches for Targeting BCR-ABL in CML. In: Comprehensive Pharmacology. Elsevier; 2022. p. 312–28.
93. Rostami M, kharajo RS, Parsa-kondelaji M, Ayatollahi H, Sheikhi M, Keramati MR. Altered expression of NEAT1 variants and P53, PTEN, and BCL-2 genes in patients with acute myeloid leukemia. Leuk Res. 2022 Apr 1;115.
94. Okikiolu J, Dillon R, Raj K. Acute leukaemia. Medicine. Vol. 49:5. Elsevier; 2021. 274–281 p.
95. Kon Kim T, Gore SD, Zeidan AM. Epigenetic Therapy in Acute Myeloid Leukemia: Current and Future Directions. Vol. 52, Seminars in Hematology. W.B. Saunders; 2015. p. 172–83.
96. Ley T j. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. New England Journal of Medicine [Internet]. 2013 May 30;368(22):2059–74. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1301689>

97. Melnick AM. Epigenetics in AML. Vol. 23, Best Practice and Research: Clinical Haematology. 2010. p. 463–8.
98. Shlush LI, Mitchell A. AML evolution from preleukemia to leukemia and relapse. Vol. 28, Best Practice and Research: Clinical Haematology. Bailliere Tindall Ltd; 2015. p. 81–9.
99. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. Vol. 31, Blood Reviews. Churchill Livingstone; 2017. p. 63–76.
100. Albayrak HM, Oğur G, Abur Ü. Akut Lenfoblastik Lösemi ve Genetik Belirteçler [Internet]. 2016. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/317560738>
101. Pillai PM, Carroll WL. Acute lymphoblastic leukemia. In: Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology [Internet]. Elsevier; 2022. p. 413–38. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128216712000040>
102. Yiallourous M. Akut Lenfoblastik Lösemi. In 2019. Available from: www.kinderkrebsinfo.de
103. Oğur G, Albayrak HM. Akut Lenfoblastik Lösemi ve Genetik Belirteçler. 2016;1(1):133–40. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/317560738>
104. Navarrete-Meneses M del P, Pérez-Vera P. Epigenetic alterations in acute lymphoblastic leukemia. Boletín Médico Del Hospital Infantil de México (English Edition). 2017 Jul;74(4):243–64.
105. Aldoss I, Forman SJ, Pullarkat V. Acute Lymphoblastic Leukemia in the Older Adult [Internet]. Vol. 15, J Oncol Pract. 2019. Available from: <https://doi.org/10.1097/JOP.000000000000010>
106. Demir V, Kahraman S, Katgi A, Pişkin Ö, Hayri Özsan G, Demirkan F, et al. Araştırma Kronik Lenfositik Lösemi Hastalarının Genel Klinik Değerlendirilmesi GENERAL CLINICAL EVALUATION OF THE CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA PATIENTS. 2012.
107. Şirin N, Aydın B, Pehlivan M, Sercan HO. Investigation of R882H Mutation in the Gene Coding DNA Methyl Transferase 3A (DNMT3A) in Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2020;
108. Gupta P, Ashar Y V., Ashby CR, Lin L, Chen ZS. The Oncogenic Protein, Breakpoint Cluster (BCR)-Abelson Kinase (ABL) and Chronic Myelocytic Leukemia (CML): Insight Into the Drug Resistance Mechanisms and Approaches for Targeting BCR-ABL in CML. In: Comprehensive Pharmacology. Elsevier; 2022. p. 312–28.

109. Kırkızlar O. Chronic Myeloid Leukemia. 2012; Available from: <http://hematoloji-onkoloji.turkiyeklinikleri.com/>
110. Melo J v. 2 BCR-ABL gene variants. 1997.
111. Cortes J, Pavlovsky C, Sauße S. Chronic myeloid leukaemia. Vol. 398, The Lancet. Elsevier B.V.; 2021. p. 1914–26.
112. Edlefsen K. Leukemia, Chronic. In: Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition. Elsevier Inc.; 2013. p. 232–4.
113. You RI, Ho CL, Hung HM, Hsieh YF, Ju JC, Chao TY. Identification of DNA methylation biomarkers in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells. Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences. 2012 Mar;4(1–2):12–5.
114. Heller G, Topakian T, Altenberger C, Cerny-Reiterer S, Ziegler B, Datlinger P, et al. Next Generation Sequencing Identifies DNA Methylation Patterns Indicative of Disease Progression in Ph+ CML. Blood. 2014 Dec 6;124(21):4526–4526.
115. Savona M, Talpaz M. Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. Vol. 8, Nature Reviews Cancer. 2008. p. 341–50.
116. Scarfò L, Ferreri AJM, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia. Vol. 104, Critical Reviews in Oncology/Hematology. Elsevier Ireland Ltd; 2016. p. 169–82.
117. Szymczyk A, Długosz-Danecka M, Hus I. Chronic lymphocytic leukemia. In: Encyclopedia of Biomedical Gerontology. Elsevier; 2019. p. 400–6.
118. Szymczyk A, Długosz-Danecka M, Hus I. Chronic lymphocytic leukemia. In: Encyclopedia of Biomedical Gerontology. Elsevier; 2019. p. 400–6.
119. Karakuş S. Kronik Lenfositör Lösemide Tanı ve Prognoz. 2009.
120. Delgado J, Villamor N, Nadeu F, Campo E. Chronic lymphocytic leukemia: Pathology and genetics. In: Encyclopedia of Cancer. Elsevier; 2018. p. 405–17.
121. Wooten M, Bradley K. B-Cell Chronic Lymphoid Leukemias. In: Atlas of Diagnostic Hematology. 2020. p. 177–210.
122. Wojdacz TK, Amarasinghe HE, Kadalayil L, Beattie A, Forster J, Blakemore SJ, et al. Clinical significance of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia patients: Results from 3 UK clinical trials. Blood Adv. 2019 Aug 27;3(16):2474–81.
123. Bartholdy BA, Wang X, Yan XJ, Pascual M, Fan M, Barrientos J, et al. CLL intraclonal fractions exhibit established and recently acquired patterns of DNA methylation. Blood Adv. 2020 Mar 10;4(5):893–906.

124. Park JL, Kim JH, Seo E, Bae DH, Kim SY, Lee HC, et al. Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use. *Forensic Sci Int Genet.* 2016 Jul 1;23:64–70.
125. Spólnicka M, Zbieć-Piekarska R, Karp M, Machnicki MM, Własiuk P, Makowska Ż, et al. DNA methylation signature in blood does not predict calendar age in patients with chronic lymphocytic leukemia but may alert to the presence of disease. Vol. 34, *Forensic Science International: Genetics.* Elsevier Ireland Ltd; 2018. p. e15–7.
126. Li X, Wang J, Wang LY, Gao Y, Feng G, Li G, et al. Lipid metabolism dysfunction induced by age-dependent DNA methylation accelerates aging. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Dec 1;7(1).
127. Sliker RC, Relton CL, Gaunt TR, Slagboom PE, Heijmans BT. Age-related DNA methylation changes are tissue-specific with ELOVL2 promoter methylation as exception. *Epigenetics Chromatin.* 2018 May 30;11(1).
128. Sukawutthiya P, Sathirapatya T, Vongpaisarnsin K. A minimal number CpGs of ELOVL2 gene for a chronological age estimation using pyrosequencing. *Forensic Sci Int.* 2021 Jan 1;318.
129. Cho S, Jung SE, Hong SR, Lee EH, Lee JH, Lee SD, et al. Independent validation of DNA-based approaches for age prediction in blood. *Forensic Sci Int Genet.* 2017 Jul 1;29:250–6.
130. Freire-Aradas A, Phillips C, Mosquera-Miguel A, Girón-Santamaría L, Gómez-Tato A, Casares De Cal M, et al. Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system. *Forensic Sci Int Genet.* 2016 Sep 1;24:65–74.
131. Lau PY, Fung WK. Evaluation of marker selection methods and statistical models for chronological age prediction based on DNA methylation. *Leg Med.* 2020 Nov 1;47.
132. Aliferi A, Sundaram S, Ballard D, Freire-Aradas A, Phillips C, Lareu MV, et al. Combining current knowledge on DNA methylation-based age estimation towards the development of a superior forensic DNA intelligence tool. *Forensic Sci Int Genet.* 2022 Mar 1;57.
133. Wang Q, Viola RE. Reexamination of aspartoacylase: Is this human enzyme really a glycoprotein? *Arch Biochem Biophys.* 2014 Apr 15;548:66–73.
134. Freire-Aradas A, Phillips C, Girón-Santamaría L, Mosquera-Miguel A, Gómez-Tato A, Casares de Cal MÁ, et al. Tracking age-correlated DNA methylation markers in the young. *Forensic Sci Int Genet.* 2018 Sep 1;36:50–9.

135. Wilop S, Fernandez AF, Jost E, Herman JG, Brümmendorf TH, Esteller M, et al. Array-based DNA methylation profiling in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2011 Oct;155(1):65–72.
136. Spólnicka M, Zbieć-Piekarska R, Karp M, Machnicki MM, Własiuk P, Makowska Ż, et al. DNA methylation signature in blood does not predict calendar age in patients with chronic lymphocytic leukemia but may alert to the presence of disease. Vol. 34, *Forensic Science International: Genetics*. Elsevier Ireland Ltd; 2018. p. e15–7.
137. Feng L, Peng F, Li S, Jiang L, Sun H, Ji A, et al. Systematic feature selection improves accuracy of methylation-based forensic age estimation in Han Chinese males. *Forensic Sci Int Genet*. 2018 Jul 1;35:38–45.
138. Spólnicka M, Pośpiech E, Peplowska B, Zbieć-Piekarska R, Makowska, Pięta A, et al. DNA methylation in ELOVL2 and C1orf132 correctly predicted chronological age of individuals from three disease groups. *Int J Legal Med*. 2018 Jan 1;132(1):1–11.
139. Xia Y, Huang N, Chen Z, Li F, Fan G, Ma D, et al. CCDC102B functions in centrosome linker assembly and centrosome cohesion. *J Cell Sci*. 2018 Dec 1;131(23).
140. Kon Kim T, Gore SD, Zeidan AM. Epigenetic Therapy in Acute Myeloid Leukemia: Current and Future Directions. Vol. 52, *Seminars in Hematology*. W.B. Saunders; 2015. p. 172–83.
141. Habibe JJ, Clemente-Olivo MP, de Vries CJ. How (Epi)genetic regulation of the LIM-domain protein FHL2 impacts multifactorial disease. Vol. 10, *Cells*. MDPI; 2021.
142. Lu W, Yu T, Liu S, Li S, Li S, Liu J, et al. FHL2 interacts with iASPP and impacts the biological functions of leukemia cells [Internet]. 2017. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
143. Kleiber K, Strebhardt K, Martin Bernd T. Structure and Function of FHL2 in Tumor Cells and its Role as a Putative Cancer Target. 2007.
144. Cao CY, Mok SWF, Cheng VWS, Tsui SKW. The FHL2 regulation in the transcriptional circuitry of human cancers. Vol. 572, *Gene*. Elsevier; 2015. p. 1–7.
145. Wang T, Liu NS, Seet LF, Hong W. The emerging role of VHS domain-containing Tom1, Tom1L1 and Tom1L2 in membrane trafficking. Vol. 11, *Traffic*. 2010. p. 1119–28.
146. Cabral-Dias R, Lucarelli S, Zak K, Rahmani S, Judge G, Abousawan J, et al. Fyn and TOM1L1 are recruited to clathrin-coated pits and regulate Akt signaling. *Journal of Cell Biology*. 2022 Apr 4;221(4).

147. Li S, Teng J, Li H, Chen F, Zheng J. The Emerging Roles of RASSF5 in Human Malignancy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017 Mar 30;18(3):314–22.
148. Pearn L, Fisher J, Burnett AK, Darley RL. The role of PKC and PDK1 in monocyte lineage specification by Ras. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4461–9.
149. Bomben R, Dal-Bo M, Benedetti D, Capello D, Forconi F, Marconi D, et al. Expression of mutated IGHV3-23 genes in chronic lymphocytic leukemia identifies a disease subset with peculiar clinical and biological features. *Clinical Cancer Research*. 2010 Jan 15;16(2):620–8.
150. Koch CM, Wagner W. Epigenetic aging signature to determine age in different tissues [Internet]. Vol. 3. 2011 [cited 2023 Apr 29]. Available from: www.impactaging.com
151. Weidner CI, Ziegler P, Hahn M, Brümmendorf TH, Ho AD, Dreger P, et al. Epigenetic aging upon allogeneic transplantation: The hematopoietic niche does not affect age-associated DNA methylation. Vol. 29, *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2015. p. 985–8.
152. Wagner W, Weidner CI, Lin Q. Do age-associated DNA methylation changes increase the risk of malignant transformation? *BioEssays*. 2015 Jan 1;37(1):20–4.
153. Spólnicka M, Piekarska RZ, Jaskuła E, Basak GW, Jacewicz R, Pięta A, et al. Donor age and C1orf132/MIR29B2C determine age-related methylation signature of blood after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Vol. 8, *Clinical Epigenetics*. Springer Verlag; 2016.

7. EKLER

EK 1: Etik Kurul Onayı

İÜC Tarih ve Sayı: 11.10.2021-208534



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



Sayı : E-59491012-604.01.02-208534

Konu : Yüksek Lisans Öğrencisi Bio.Kadriye
CAN'ın etik kurul kararı A-28

11.10.2021

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 02.09.2021 tarih, E-13022260-302-14.06-173894 sayılı yazı

Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nda görevli **Dr.Öğr.Üyesi Özlem BÜLBÜL**'ün yürütücülüğünde **Yüksek Lisans Öğrencisi Bio.Kadriye CAN**'ın yardımcılığında "**DNA Metilasyonu ile Yaş Tahmininin Lösemi Hastalarında Değerlendirilmesi**" başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri **05 Ekim 2021** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla; etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

Prof. Dr. Ali Metin KAFADAR
Dekan a.
Dekan Yardımcısı

Ek:

- 1- 1 dosya elden teslim edilecektir.
- 2- NOT:Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun ve Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Desteği onay belgesinin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BS4R8MTTJ3 Pin Kodu :26972

Adres:İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL

Telefon:0 (212) 414 30 00 Faks:(212) 632 00 25

e-Posta:ctfpersonel@istanbul.edu.tr Web:https://www.istanbul.edu.tr

Kep Adresi:istanbul@hs01.kep.tr

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/istanbul-cerrahpaşa-universitesi-ebys?eD=BS4R8MTTJ3&eS=208534>

Bilgi için: Güler SOYDANER

Unvanı: Memur

Dahili: 60130



EK 2: Kan örneklerinden DNA İzolasyonu Protokolü (E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit, Omega)

- 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü içerisine 400 µl PBS koyuldu. Svab PBS içöerisinde 15 dk bekletildi.
- Tüpe 25 µl ProteinazK ve 250 µl BL Buffer eklendi ve 15 sn vortekslendi.
- Isıtıcı blokta 70 °C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- 250 µl etanol(%96-100) eklendi ve 15 sn vortekslendi.
- Mikrosantrifüj tüpündeki süpernatant HiBind® DNA minispin kolona aktarıldı ve 12.000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Filtrat içeren tüp yeni boş bir tüple değiştirildi.
- Kolona 500 µl HBC Buffer eklendi. 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj edilip toplama tüpü yenilendi.
- Kolona 700 µl DNA Wash Buffer eklendi. 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj edilip toplama tüpü yenilendi.
- Kolona 700 µl DNA Wash Buffer eklendi. 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj edilip toplama tüpü yenilendi.
- Kolon boş olarak 14.000 rpm’de 2 dk daha santrifüj edildi.
- HiBind® DNA minispin kolon, 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Kolona 100 µl Elution Buffer eklendi. Oda ısında 2 dk beklendi.
- 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Kolon atılıp DNA izolatu uzun süreli saklamak için parafilmlelenip -20 °C’de muhafaza edildi.

EK 3: DNA Miktar Tayini Protokolü (Quant-it™ dsDNA HS(High Sensitive) Assay, Invitrogen)

- Her örnek için karışım yapıldı. Karışım içerisinde ise 199 µl Quant-it™ dsDNA HS Buffer ve 1 µl Quant-it™ Reagent bulunmaktadır.
- Öncelikler cihazın kalibrasyonu için S1 ve S2 standartları kullanıldı. Standart için PCR tüplerine 190 µl karışım eklendi ve üzerine 10 µl S1 ve S2 ayrı ayrı eklendi.
- Her bir örnek içinse tüplere 199 µl karışım koyuldu ve üzerine 1 µl DNA örneğinden eklendi.
- Cihaza önce standartlar okutularak kalibrasyon eğrisi elde edildi.
- Örnekler sırayla cihaza yerleştirilip ölçümleri yapıldı.

EK 4: Bisülfıt Dönüşümü Protoklü (EZ DNA Methylation Gold™ Kit, Zymo Research)

- DNA örnekleri 10 ng/μl olacak şekilde seyreltilip 20 μl alınarak PCR tüpüne aktarıldı.
- Örneklerin üzerine 130 μl CT Conversion Reagent pipetaj yapılarak aktarıldı ve minispın yapıldı.
- Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. Tablodaki koşullara göre inkübasyona bırakıldı.

Termal Döngü Cihazı Koşulları

Sıcaklık	Süre
98°C	10 dk
64 °C	2.5 saat
4 °C	∞

- ME spin kolonları toplama tüpüne koyulur ve 600 μl M-Binding Buffer kolona eklenir.
- Üzerine inkübe edilmiş DNA örneği aktarılır ve el ile aşağı-yukarı yavaşça karıştırılır. 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildi.
- Kolona 100 μl M-Wash Buffer eklenerek 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi.
- Kolona 200 μl M-Desulphonation Buffer kolona eklenip oda ısısında 15 dk inkübe edildi.
- 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi.
- Kolona 200 μl M-Wash Buffer eklendi ve 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi.
- Kolona 200 μl M-Wash Buffer eklendi ve 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi.

DNA Metilasyon ile Lösemi Hastalarında Yaş Tahmini

- ME Spin kolon 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Kolona 10 µl ME Elution Buffer eklendi ve 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi.
- ME Spin kolon atılıp DNA izolatu parafilmlelenip -20 °C’de muhafaza edildi.



EK 5: Agaroze Jel Hazırlama Protokolü

- 10X TBE (Tris-Borat-EDTA) ana stoğu hazırlandı. Hassas terazi ile 108 g Tris Baz, 55 g Borik asit, 7,5 g EDTA tartılıp üzerine 1 L distile su eklenmiştir. Çözeltinin pH'sı 8.3 olacak şekilde ayarlanmıştır.
- Elektroforez tamponu için 10X TBE tamponundan 100 ml alınıp üzeri 900 ml distile su ile tamamlandı. Böylece tampon 10X'den 1X'e seyreltilmiş oldu.
- Hassas terazi ile tartılmış 0.5 g agar üzerine 50 ml 1X TBE tampon eklendi.
- Karışım mikrodalgada ısıtıldı.
- Üzerine 2.5 µl RedSafe Nucleic Acide Staining karışıma eklendi
- Elektroforez kasetine taraklar yerleştirilip agaroze jel aktarıldı.
- Tamamen kalıp haline gelmesi için 20 dk beklendi.
- Donmuş jel kasetten çıkarılıp elektroforez cihazına yerleştirildi. Üzerini kaplayacak kadar 1X TBE tamponu eklendi.
- Parafilm üzerine 0.5 µl Bromofenol koyuldu. 1.5 µl PCR ürüne boya ile pipetaj yapıp kuyulara yüklendi.
- 90 V'ta 20 dk elektroforez cihazında yürütüldü.
- Yürütme sonrası jel UV ışık kaynağında incelendi.