

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

Danışman
Doç. Dr. Selda MERCAN

METİLASYON-HİDROKSİ METİLASYON TAYİNİ İÇİN LC-MS/MS İLE YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOG ALEYNA İLHAN
İSTANBUL, 2022

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

Danışman
Doç. Dr. Selda MERCAN

METİLASYON-HİDROKSİ METİLASYON TAYİNİ İÇİN LC-MS/MS İLE YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOG ALEYNA İLHAN
İSTANBUL, 2022

Bu tez T.C. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşı Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 35402

ÖNSÖZ

Bu çalışmayı başarılı bir şekilde bitirebilmemde en büyük payı olan, her türlü sorumu ve sıkıntımı dinleyip bana destek olan, sorularıma karşı bitmeyen bir sabırla cevap veren ve değerli bilgilerini benimle paylaşan değerli hocam **Doç. Dr. Selda MERCAN'a**,

Laboratuvar aşaması ve sonraki birçok aşamada bana çok yardımları dokunan, sorduğum sorulara benim de her şeyi anlamamı sağlayacak şekilde cevap veren, her türlü bilgisini bana büyük bir cömertlikle sunup, daima yanımda olan **Arş. Gör. Merve KULOĞLU GENÇ'e**,

Laboratuvar aşamasında ve sonraki birçok sorumda bana her daim yardımcı olan ve desteklerini hiç esirgemeyen Kimyager **Tuğba TEKİN BÜLBÜL**, Biyolog **Murat YAYLA** ve Öğr. Gör. **Ömer KARATAŞ'a**,

Deney aşamasında bana çok yardımcı olan, her sıkıştığımda tüm sorularımı cevaplayan ve bana her zaman destek olan **Sümeyye Zülal ŞİMŞEK'e**,

Aynı yollardan geçtiğim, yeri geldiğinde oturup sorunlara birlikte çözüm aradığım, manevi olarak desteklerini hep arkamda hissettiğim sevgili arkadaşlarım **İpek GÜREL**, **Melis IŞIK** ve **Özgür DAYANIR'a**,

En son olarak da, onların desteği olmadan bunları başaramazdım diyebileceğim ve hayatımın her aşamasında tam destek yanımda olduklarını bildiğim başta sevgili **Annem** ve **Ablalarım** olmak üzere tüm **Aileme**,

En içten teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Aleyna İLHAN

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER ve DENKLEMLER DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
Özet ve Anahtar Kelimeler	1
Summary	4
1. Giriş ve Amaç	7
2. Genel Bilgiler	10
2.1. Genetik Bilimi	10
2.1.1. DNA'nın keşfi ve gelişimi	12
2.2. Epigenetik	16
2.2.1. Epigenetik mekanizmalar.....	21
2.2.2. DNA metilasyonu	24
2.2.3. DNA hidroksimetilasyonu	27
2.3. Metilasyon Analizinde Kullanılan Yöntemler.....	29
2.3.1. Genom çapında yapılan metilasyon analizlerinde kullanılan yöntemler	30
2.3.1.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-ultraviyole (HPLC-UV).....	30
2.3.1.2. Kromatografik yöntemler	30
2.3.1.3. Enzim bağlı immünosorbent analizi (ELISA) temelli yöntemler	31

2.3.1.4. Luminometrik metilasyon analizi (LUMA).....	31
2.3.1.5. AFLP ve RFLP	32
2.3.2. İlgilenilen spesifik genlerin metilasyon analizi	33
2.3.2.1. PCR ve dizileme	33
2.3.2.2. Pirosekanslama	33
2.3.2.3. Metilasyon-spesifik PCR	34
2.3.3. Diferansiyel olarak metillenmiş bölgelerin analizi	34
2.3.3.1. Bisülfid dizileme	35
2.4. LC-MS/MS	36
2.5. Validasyon Çalışması	42
2.5.1. Seçicilik/Spesifiklik	43
2.5.2. Tespit Limiti ve Tayin Limiti (LOD ve LOQ).....	43
2.5.3. Doğrusallık ve Ölçüm Aralığı.....	44
2.6. DNA Metilasyonu ve Adli Bilimler	44
2.6.1. Yaş tayini	45
2.6.2. Olay yerinde vücut sıvısı tespiti	47
2.6.3. Monozigotik ikizlerin birbirinden ayırt edilmesi	49
2.6.4. Epigenetik analizlerle yapılan diğer bazı uygulamalar	50
3. Gereç ve Yöntem	55
3.1. Deneyde Kullanılan Gereçler	55

3.1.1. Ekipman	55
3.1.2. Ticari kitler.....	56
3.1.3. Ticari kit haricinde kullanılan malzemeler	56
3.1.4. Standart maddeler	56
3.2. Deney Aşaması	56
3.2.1. Örneklerin toplanması.....	57
3.2.2. DNA izolasyonu ve miktar tayini	58
3.2.2.1. <i>E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek) ile kan/tükürük örneklerinden DNA izolasyonu</i>	58
3.2.2.2. <i>Quant-it™ dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen) ile miktar tayini</i>	61
3.2.3. Hidroliz aşaması.....	62
3.2.4. Standart maddelerin ana ve ara stok çözeltilerinin hazırlanması	63
3.2.5. Stok çözeltiler kullanılarak standart maddelerin iyon belirleme çalışmalarının yapılması	64
3.2.6. Referans standart maddeler ile MeOH kalibrasyonu oluşturulması	65
3.2.7. DNA standart set ile kalibrasyon oluşturulması	67
3.2.8. Doğrusallık ve çalışma aralığı	69
3.2.9. Seçicilik.....	70
3.2.10. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ).....	70
3.2.11. Kan ve tükürük numunelerinin LC-MS/MS ile analizi.....	70

3.2.12. LC-MS/MS analiz parametreleri.....	71
3.2.13. Verilerin analizi ve sonuçların değerlendirilmesi	73
4. Bulgular.....	74
4.1. Örneklerin DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini.....	74
4.2. 5-mdC, 5-hmdC ve dC'nin İyon Belirleme Çalışmaları.....	75
4.3. Doğrusallık	78
4.4. Standartlar ve Örneklerle Ait Kromatogramlar	84
4.5. Seçicilik	93
4.6. Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)	93
4.7. %Metilasyon ve %Hidroksimetilasyon Değerleri	93
5. Tartışma ve Sonuç.....	101
6. Kaynaklar	111
EKLER.....	119
ÖZGEÇMİŞ.....	125

ŞEKİLLER ve DENKLEMLER DİZİNİ

Şekil 1: Mendel'in 1865 tarihli notlarında kullandığı üç formül (15)	11
Şekil 2: DNA yapısının ilk önerisi (13)	13
Şekil 3: Deoksiribonükleik asit (DNA) polinükleotid zinciri (13)	14
Şekil 4: Waddington'ın Klasik Epigenetik Manzarası (19).	18
Şekil 5: Dolly koyununun klonlanması (13)	19
Şekil 6: Epigenetik alanındaki gelişmelerin kronolojisi (18).	20
Şekil 7: Epigenetik Modifikasyonlar (22)	22
Şekil 8: Epigenetik gen düzenlemesinin üç temel mekanizması (23).....	24
Şekil 9: DNA metilasyonu (25)	25
Şekil 10: Metilasyon ve demetilasyon (38).	27
Şekil 11:TET ile hidroksimetilasyon yoluyla önerilen aktif demetilasyon mekanizması (24).....	28
Şekil 12: LC-MS/MS çalışma mekanizması (28)	37
Şekil 13: LC-MS/MS analiz aşamaları (30)	39
Şekil 14: Yaşlanma sırasında meydana geldiği düşünülen epigenetik değişikliklerin özeti (34)..	46
Şekil 15: Yaşlanma sırasında DNA metilasyon değişikliklerinin özeti (34)	46
Şekil 16: Epigenetik uygulamaların cevap verdiği sorular (37)	51
Şekil 17: Kuru ısıtıcı blok (Biosan Bio TDB-100)	60
Şekil 18: Mikrosantrifüj (Unicfuges-5)	60
Şekil 19: Vorteks cihazı (Weightlab Instruments WN-V2800).....	61
Şekil 20: Termal Isıl Döngüleyici (Techne Genius FGENO5TD)	63
Şekil 21: LC-MS/MS cihazı (Shimadzu LCMS-8045).....	71
Şekil 22: 5-metil-2'-deoksisitidin kütle spektrumu	76
Şekil 23: 2'-deoksi-5-(hidroksimetil)sitidin kütle spektrumu	77

Şekil 24: 2-deoksisitidin kütle spektrumu	77
Şekil 25: IS (ephedrine-d3) kütle spektrumu	78
Şekil 26: 2-deoksisitidin DNA kalibrasyonu	79
Şekil 27: 2-deoksi-5-hidroksimetilsitidin DNA kalibrasyonu	79
Şekil 28: 5-metil-2-deoksisitidin DNA kalibrasyonu	80
Şekil 29: 2-deoksisitidin MeOH kalibrasyonu.....	80
Şekil 30: 2-deoksi-5-hidroksimetilsitidin MeOH kalibrasyonu.....	81
Şekil 31: 5-metil-2-deoksisitidin MeOH kalibrasyonu	81
Şekil 32: dC, 5hmdC ve 5mdC için MeOH kalibrasyonunda yürütülen boş MeOH örneğine ait kromatogramlar	85
Şekil 33: dC, 5hmdC ve 5mdC için MeOH kalibrasyonunda yürütülen kör numune (blank)'ye ait kromatogramlar	86
Şekil 34: dC, 5hmdC ve 5mdC için MeOH kalibrasyonunda yürütülen 5ng/mL'lik konsantrasyondaki DNA referans standartlarına ait kromatogramlar	87
Şekil 35: dC, 5hmdC ve 5mdC için DNA kalibrasyonunda yürütülen boş MeOH örneğine ait kromatogramlar	88
Şekil 36: dC, 5hmdC ve 5mdC için DNA kalibrasyonunda yürütülen kör numune (blank)'ye ait kromatogramlar	89
Şekil 37: dC, 5hmdC ve 5mdC için DNA kalibrasyonunda yürütülen %0.2'lik konsantrasyondaki DNA referans standartlarına ait kromatogramlar	90
Şekil 38: dC, 5hmdC ve 5mdC için : A-XY-3 kodlu gönüllünün kan örneği kromatogramı.....	91
Şekil 39: dC, 5hmdC ve 5mdC için: A-XY-3 kodlu gönüllünün tükürük örneği kromatogramı ..	92
Şekil 40: Kan ve tükürük örnekleri arasındaki ilişkiyi gösteren %mdC grafiği	96
Şekil 41: Kan ve tükürük örnekleri arasındaki ilişkiyi gösteren %hmdC grafiği	96

Şekil 42: Kan ve tükürük örneklerinde ortalama %metilasyon&hidroksimetilasyon sütun grafiği	97
Şekil 43: Yaş grupları arasındaki ilişkiyi gösteren ort. %mdC sütun grafiği	97
Şekil 44: Yaş grupları arasındaki ilişkiyi gösteren ort. %hmdC sütun grafiği	98
Şekil 45: Kan örneklerinde %mdC için MeOH ve DNA kalibrasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren çizgi grafiği	98
Şekil 46: Tükürük örneklerinde %mdC için MeOH ve DNA kalibrasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren çizgi grafiği	99
Şekil 47: Tükürük örneklerinde %hmdC için MeOH ve DNA kalibrasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren çizgi grafiği	99
Şekil 48: Kan örneklerinde %hmdC için MeOH ve DNA kalibrasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren çizgi grafiği	100
 Denklem 1: %metilasyon hesaplama formülü.....	73
Denklem 2: %hidroksimetilasyon hesaplama formülü	73

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo I. Validasyon parametreleri (67)	43
Tablo II. Hidroliz için gerekli olan bileşenlerin hazırlanması	62
Tablo III. Hidroliz için termal ısı döngüleyici sıcaklık programı	63
Tablo IV. MeOH kalibrasyonu için gerekli bileşenlerin hazırlanması	66
Tablo V. Standart setlerin hidrolizi için gerekli olan bileşenlerin hazırlanması	68
Tablo VI. DNA standart set kalibrasyonu için gerekli bileşenlerin hazırlanması	69
Tablo VII. LC-MS/MS sistemindeki analiz için gerekli bileşenlerin hazırlanması	71
Tablo VIII. Kromatografik sistem özellikleri	72
Tablo IX. Sıvı kromatografi sisteminin akış programı	72
Tablo X. Katılımcıların tükürük örneklerinden elde edilen DNA miktarları	74
Tablo XI. Katılımcıların kan örneklerinden elde edilen DNA miktarları	75
Tablo XII. 5-metil-2'-deoksisitidin ardışık kütle spektrometresi koşulları	76
Tablo XIII. 2'-deoksi-5-(hidroksimetil)sitidin ardışık kütle spektrometresi koşulları	76
Tablo XIV. 2-deoksisitidin ardışık kütle spektrometresi koşulları	77
Tablo XV. IS (ephedrine-d3) ardışık kütle spektrometresi koşulları	78
Tablo XVI. Gerçek örneklerin iki farklı kalibrasyon eğrisinden elde edilen ortalama pik alanları	82
Tablo XVII. dC, 5mdC ve 5hmdC'nin her iki kalibrasyondaki alıkonma zamanları	92
Tablo XVIII. MeOH ve DNA kalibrasyonlarına ait doğrusal aralık, LOD ve LOQ değerleri	93
Tablo XIX. Gerçek örneklerin %metilasyon-hidroksimetilasyon sonuçları	95
Tablo XX: Kan ve tükürük örneklerinde %mdC&hmdC	96

KISALTMALAR DİZİNİ

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
5caC	5-karboksilsitozin
5fC	5-formilsitozine
5hmdC	5-(hidroksimetil)-2'-deoksisitidin
5mdC	5-metil-2'-deoksisitidin
ADP	Adenozin difosfat (Adenosine diphosphate)
AFLP	Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (amplified fragment length polymorphisms)
Ark	Arkadaşları
BER	Baz eksizyon onarımı (Base excision repair)
BWS	Beckwith-Wiedemann sendromu
CH ₃	Metil grubu
CpG	Sitozin-Fosfat-Guanine (Cytosine-Phosphate-Guanine)
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dC	2'-deoksisitidin
ddH ₂ O	Deiyonize su
dG	2'deoksiguanozin
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metiltransferaz enzimi

dsDNA	Çift zincirli DNA (Double stranded DNA)
ECoRI	Escherichia coli restriksiyon endonükleaz
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent analizi
FA	Formik asit
H ₂ O	Su
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPLC-UV	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-ultraviyole
IncRNA	Uzun kodlamayan RNA
IS	İç standart
LC-ESI-MS/MS	Sıvı kromatografisi elektrosprey iyonizasyon-ardışık kütle spektrometresi
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi
LOD	Tespit limiti
LOQ	Tayin limiti
LUMA	Luminometrik metilasyon analizi
MeOH	Metanol
miRNA	Mikro RNA
ml	Mililitre
MRM	Çoklu reaksiyon izleme modu
mRNA	Mesajcı RNA
msn	Milisaniye
ncRNA	Kodlanmayan RNA (Non-coding RNA)
ng	Nanogram

NGS	Yeni nesil dizileme
°C	Santigrat derece
OH	Hidroksi grubu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PFOS	Perflorooktan sülfonat
PWS	Prader-Willi sendromu
Q1	Birinci kuadrupol
Q2	İkinci kuadrupol
Q3	Üçüncü kuadrupol
qPCR (rt-pcr)	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
r	Korelasyon katsayısı
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
RT	Alıkonma zamanı (Retention time)
SAM	S-Adenozil Metiyonin
SD	Standart sapma
siRNA	Kısa enterferans yapan RNA
sn	Saniye
STR	Kısa tekrar dizileri (Short tandem repeat)
TDM	Terapötik ilaç izleme
tDMRs	Dokuya özgü metilasyon profilleri
TET	On-onbir translokasyon proteini

U	Ünite (Unit)
USS	Ultra saf su
WGBS	Tüm genom bisülfıt dizilimi



Özet ve Anahtar Kelimeler

20.yüzyılın ortalarında hayatımıza girmiş olan “epigenetik” terimi, günümüzde giderek önemini artırmaya devam etmektedir. Başlarda yalnızca genler ile fenotipi ortaya çıkaran gen ürünleri arasındaki nedensel etkileşimleri inceleyen bir bilim dalı olarak tanımlanan epigenetik, bilimin ve teknolojinin gelişimiyle birlikte birçok alanda canlı mekanizmasının bir parçası olarak ortaya konmuştur. Epigenetik mekanizmalar arasında en çok çalışılan mekanizma metilasyondur.

İncelenen deoksiribonükleik asit (DNA) metilasyon düzeyleri, insan genomundaki farklı dokular veya farklı bireyler arasındaki ayrımın yapılmasına olanak sağlamaktadır. Ayrıca şimdiye kadar birçok hastalıkla ilişkisi ortaya konulmuş olan metilasyon, hastalıkların temel mekanizmalarının çözümlenmesinde ve kişiye özgü tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Birçok bilim dalında önemli bir yeri olan DNA metilasyonu, adli bilimler için de oldukça değerlidir. Yapılan DNA metilasyon analizleri sayesinde adli bilimler için, yaş tayini, olay yerinde vücut sıvısı teşhisi ve monozigotik ikizleri birbirinden ayırma gibi uygulamalar yapılabilmektedir.

Günümüze kadar global DNA metilasyon düzeylerini saptamaya yönelik birçok yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilmiş olan yöntemlerin arasında sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) duyarlılık, tekrarlanabilirlik ve maliyet açısından diğer yöntemlere göre üstünlüğünü ortaya koymaktadır. Bu projenin amacı LC-MS/MS’in avantajlarından faydalanarak, DNA metilasyon düzeylerinin ölçülmesi için her açıdan kazanım sağlanan bir yöntem geliştirmektir. Bu amaç doğrultusunda, 45 yaş altı ve 45 yaş üstü olmak üzere iki ayrı yaş grubuna ait toplamda 14 gönüllü bireyden kan ve tükürük örnekleri alınarak, DNA izolasyonu

E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Kit protokolüne göre gerçekleştirildi. Bu örnekler geliştirilmiş olan LC-MS/MS yöntemi ile birlikte analiz edildi.

Yapılan çalışmanın bulgularına göre $\%mdC = (mdC/dC + mdC + hmdC) * 100$ ve $\%hmdC = (hmdC/dC + mdC + hmdC) * 100$ formülleri kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucu kan örneklerindeki (n=11) ortalama metilasyon düzeyi $\%3.132 (\pm 0.619)$ ve hidroksimetilasyon düzeyi $\%0.080 (\pm 0.089)$ olarak bulunurken; tükürük örneklerinde (n=14) ortalama metilasyon düzeyi $\%4.186 (\pm 0.729)$ ve hidroksimetilasyon düzeyi $\%0.038 (\pm 0.024)$ bulundu. Kan örnekleri ile karşılaştırıldığında, global DNA metilasyon düzeylerinin tükürük örneklerinde daha yüksek oranlarda olduğu görüldü ($p=0.0066$). Buna karşılık hidroksimetilasyon düzeylerinde iki materyal arasında anlamlı bir fark olmamakla birlikte, kan örneklerinde bu düzeyler daha yüksek değerlerde bulundu ($p=0.207$). İki biyolojik materyal arasındaki $\%mdC$ - $hmdC$ düzeylerinde tespit edilen farklılıklar, bu iki materyalin analizlerde birbirinin yerine kullanılamayacağını göstermektedir. Çalışmanın doğrusalılık çalışmasında, MeOH ve DNA olmak üzere iki matriks arasındaki ilişki *Student's t-test* ile araştırıldı ve aralarında anlamlı bir fark görülmedi ($\%5mdC$ kan için $p=0.887$; tükürük için $p=0.875$) ($\%5hmdC$ kan için $p=0.488$; tükürük için $p=0.424$). Bu durum her iki matriksin de DNA metilasyon/hidroksimetilasyon analizi için uygun olduğunu göstermektedir. Tükürük ve kan örneklerinin kendi içerisinde mdC ve $hmdC$ değerleri arasındaki ilişki *Student's t-test* ile incelendi. Test sonucunda hem kan hem tükürük örnekleri kendi içerisinde mdC ve $hmdC$ için anlamlı bir farklılık gösterdi (kanda mdC - $hmdC$ için $p=0.0005$; tükürükte mdC - $hmdC$ için $p=0.00004$). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, hem kan hem tükürük örnekleri için, mdC ve $hmdC$ düzeylerinin karşılaştırılabilir olmadığı söylenebilir.

Bu alışmada LC-MS/MS kullanılarak, insan vucudunun farklı dokularındaki DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeylerinin eş zamanlı olarak ve 5 dk gibi kısa bir süre içerisinde analiz edilmesine olanak sağlayan bir yöntem geliştirildi. Biyolojik materyal olarak tercih edilen kan ve tükürük örnekleri hem kendi ilerinde hem de birbirleri arasında incelenerek ileriki çalışmalar için önemli olabilecek bulgular elde edildi. Böylelikle gelecekteki epigenetik araştırmalar için yol gösterici olan ve bu çalışmaların analitik sistemler yardımıyla gerçekleştirilmesine olanak sağlayan kromatografik bir yöntem geliştirildi.

Anahtar Kelimeler: Epigenetik, DNA Metilasyonu, DNA Hidroksimetilasyonu, LC-MS/MS, Adli Toksikoloji

Summary

The term “epigenetics”, which entered our lives in the middle of the 20th century, continues to increase its importance today. Epigenetics, which was initially defined as a branch of science that only studies the causal interactions between genes and gene products that reveal the phenotype, has been revealed as a part of the living mechanism in many areas with the development of science and technology. Among all of the epigenetic mechanisms, DNA methylation is the most studied mechanism until now.

Analysis of DNA methylation levels allow differentiation between different tissues or different individuals in the human genome. In addition, methylation, which has been associated with many diseases so far, plays an important role in the analysis of the basic mechanisms of diseases and in the development of personalized treatment methods. DNA methylation, which has an important place in many sciences, is also very valuable for forensic sciences. With DNA methylation analysis studies, applications such as age determination, body fluid identification in crime scenes and separating monozygotic twins are able to be done for forensic sciences.

Up to this date, many methods have been developed to determine global DNA methylation levels. Among the developed methods, LC-MS/MS demonstrates its superiority over other methods in terms of sensitivity, reproducibility and cost. The aim of this project is to develop an all-round method for measuring DNA methylation levels by taking advantage of LC-MS/MS. For this purpose, blood and saliva samples were taken from 14 volunteers in two different age groups (under 45 years old and over 45 years old) and DNA isolation was performed by E.Z.N.A. ® Tissue DNA Kit protocol. These samples were analyzed together with the developed LC-MS/MS method.

According to the findings of this study, as a result of the calculations which was done using the formulas $\%mdC = (mdC/dC + mdC + hmdC) * 100$ and $\%hmdC = (hmdC/dC + mdC + hmdC) * 100$,

the mean methylation and hydroxymethylation levels in blood samples (n=11) was found to be %3.132 (± 0.619) and %0.080 (± 0.089) respectively; the mean methylation and hydroxymethylation levels in saliva samples (n=14) was %4.186 (± 0.729) and %0.038 (± 0.024) respectively. Compared to blood samples, global DNA methylation levels were found to be higher in saliva samples ($p=0.0066$). On the other hand, although there was no significant difference between the two materials, hydroxymethylation levels were higher in blood samples ($p=0.207$). The differences in %mdC-hmdC levels between the two biological materials show that these two materials can't be used as a surrogate for each other in analysis. The relationship between two matrices, MeOH and DNA, which was used for linearity studies, was studied by *Student's t-test*. As a result of the test, there was no significant difference [(%mdC $p=0.887$ (blood); $p=0.875$ (saliva))] [%hmdC $p=0.488$ (blood); $p=0.424$ (saliva)]. This indicates that both matrices are suitable for DNA methylation/hydroxymethylation analysis. The relationship between mdC and hmdC values was examined by *Student's t-test*, separately in saliva and blood samples. As a result of the test, both blood and saliva samples showed a significant difference for mdC and hmdC ($p=0.0005$ in blood for mdC-hmdC; $p=0.00004$ in saliva for mdC-hmdC). When these results are evaluated, it can be said that mdC and hmdC levels are not comparable for both blood and saliva samples.

In this study, a method was developed which allows simultaneous analysis of DNA methylation and hydroxymethylation levels in different tissues of the human body, in such a short amount of time like 5 minutes using LC-MS/MS. Blood and saliva samples were examined both among themselves and among each other and findings that may be important for future studies were obtained. Thus, a chromatographic method has been developed that guides future epigenetic studies and allows these studies to be carried out with the help of analytical systems.

Keywords: Epigenetics, DNA Methylation, DNA Hydroxymethylation, LC-MS/MS, Forensic Toxicology



1. Giriş ve Amaç

Geçmişten günümüze kadar yapılmış olan birçok araştırma ve çalışma sayesinde, genetik materyalimiz olan DNA'nın kimyasal ve moleküler yapısı her ne kadar anlaşılmış olsa da son yıllarda elde edilen bulgular sayesinde artık her genetik olayın DNA ile sınırlı kalmadığı bilinmektedir. Bir canlının yaşamını sürdürebilmesi için çevresel uyaranlara uygun tepkiler göstermesi ve mevcut koşullara uyum sağlaması gerekir. Bu süreci doğru bir şekilde ilerletebilmek için embriyodan başlayarak yaşamın sonuna kadar geçen süreçte, gen ifadelerinde bazı değişiklikler gerçekleşir (1). Gen bazında gerçekleşen tüm bu değişiklikleri içine alan terim, 1940'ların başında Conrad Waddington tarafından 'epigenetik' olarak tüm dünyaya tanıtılmıştır (2).

Günümüzde "epigenetik" terimi genel olarak, mitotik ve / veya mayotik olarak kalıtsallık gösteren ve DNA dizisinde değişiklik gerektirmeyen gen fonksiyonunda oluşan değişimlerle ilgili yapılan çalışmaların yürütüldüğü bir bilim dalı olarak kabul edilmektedir (2). Epigenetik değişiklikler, tekli genlere eklenen kimyasal bileşiklerin rol oynadığı çeşitli epigenetik mekanizmalarla yürütülmektedir (3). Bu zamana kadar yapılan çalışmalarla birçok epigenetik oluşum mekanizması tanımlanmıştır ve çalışmalar devam ettikçe de yeni mekanizmalar keşfedilmeye devam edilecektir.

İşleyişi en iyi bilinen ve üstüne birçok çalışma yapılan epigenetik mekanizma DNA metilasyonudur. DNA metiltransferazları tarafından katalize edilen DNA metilasyonu, transkripsiyonun epigenetik olarak susturulmasında kilit bir oyuncu olarak kabul edilir (4). Bu mekanizma ağırlıklı olarak sitozin bazlarının art arda sıralandığı bir DNA bölgesine bir metil grubunun (CH_3) eklenmesi veya çıkarılması ile oluşmaktadır (5). Belirli bir gene metil grupları eklendiğinde, bu gen kapatılır veya susturulur ve o genden protein üretilemez (3).

DNA metilasyonu adli bilimler için çok önemli olan, adli uygulamalarda epigenetik belirteç testlerini kullanma üzerine yapılan araştırma ve çalışmalarla her geçen gün önemini daha da artıran bir belirteçtir (6). Epigenetik testler, kantitatif sonuçlar sağladığından, ayrıca ribonükleik asit (RNA) ve protein belirteçleri gerektiren yöntemlerden daha uzun kararlılık gösterdiğinden daha iyi bir metodoloji olma ihtiyacını karşılamaktadır. Bu avantajlarla birlikte DNA metilasyon analizleri ile adli bilimler için, yaş tayini, olay yerinde vücut sıvısı identifikasyonu ve monozigotik ikizleri birbirinden ayırma gibi uygulamalar yapılabilmektedir (7,8,9). Fakat genelde metilasyon analizi için kullanılması gereken yöntemler uğraştırıcı ve pahalı olmakta, ayrıca kararlılık ve yeniden üretilebilirlik açısından eksiklikler içermektedir. Bu nedenle çalışmamızda LC-MS/MS yöntemi tercih edilerek bu eksiklikleri gidermek amaçlanmaktadır.

Günümüze kadar yapılmış olan birçok çalışmayla birlikte, global DNA metilasyon düzeylerini saptamaya yönelik çok sayıda yöntem geliştirilmiştir ve bunların arasında LC-MS/MS (Sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi) de yer almaktadır (10). LC-MS/MS, literatürde daha önce belirtilmiş ve kullanılmakta olan yöntemlerle karşılaştırıldığında oldukça kesin ve hassas sonuçlar vermektedir. Bundan dolayı bu yöntem, global DNA metilasyon analizi için altın standart olarak kabul edilmektedir (11).

Bu çalışmada LC-MS/MS kullanılarak, insan vücudunun farklı dokularındaki DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeylerinin eş zamanlı olarak araştırılması için bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Biyolojik materyal olarak kan ve tükürük tercih edilmiş, hem aynı doku içindeki hem de dokular arasındaki korelasyon, metilasyon ve OH-metilasyon düzeyleri açısından incelenmiştir. Böylece bu iki biyolojik materyalin epigenetik araştırmalarda birbirlerinin alternatif olarak kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Ayrıca dokulardaki metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeyleri de karşılaştırılarak, her iki epigenetik uç nokta için anlamlı bir ilişkinin olup olmadığı araştırılmıştır (12). Böylelikle kromatografik bir yöntem geliştirilerek

epigenetik araştırmaların analitik sistemler yardımı ile araştırılmasına yeni bir boyut kazandırılmıştır.



2. Genel Bilgiler

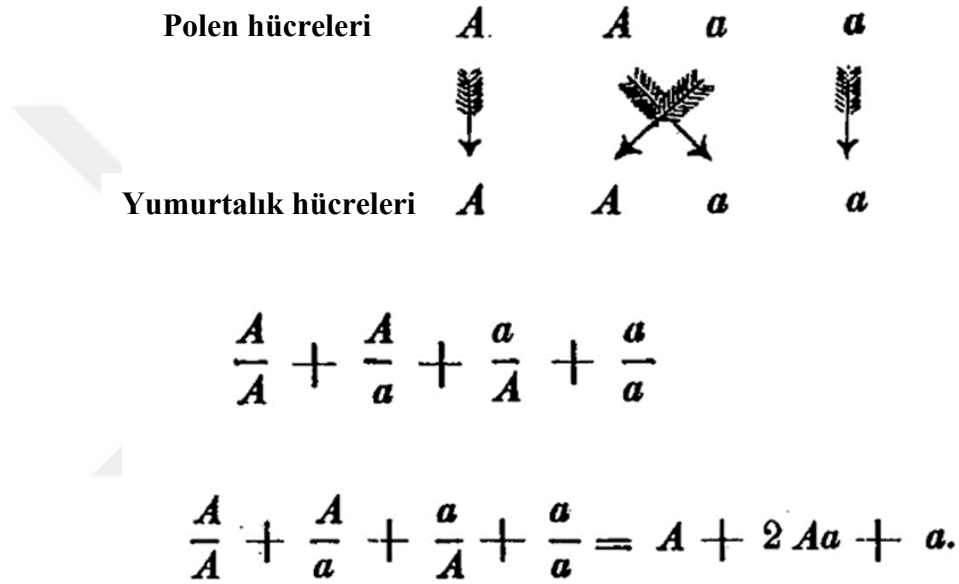
2.1. Genetik Bilimi

Genetik, genel anlamda kalıtımın ve spesifik anlamda ise genlerin incelendiği çalışmaları bünyesinde barındıran bilim dalıdır (13). Bu nedenle genetikten bahsederken bu alanın, varyasyon ve kalıtım bilimi olduğu söylenebilir. Kalıtım (heredity) terimi ise orjinal olarak hereditatem kelimesinden türetilmiştir ve Latince “mirasçı olma durumu” anlamına gelmektedir. İlk kez 1530’lu yılların başlarında kullanılmış olan bu terim genel anlamıyla, ebeveynlerin sahip olduğu fiziksel özelliklerin ve genetik bilginin gelecek nesillere aktarılma sürecini ifade etmektedir (14).

Genetik teriminin tarihte ilk defa kullanıldığı zamana gitmek istenilirse, 1905 senesi doğru bir tercih olacaktır. Bu terim ilk defa İngiliz bir biyolog olan William Bateson tarafından, meslektaşı Adam Sedgwick'e yazdığı bir mektupta, kalıtım ve varyasyon bilimini tanımlamak için kullanılmıştır. Bateson, “genetik” terimini Yunan dilinde “doğurmak” anlamına gelen “genno” kelimesinden türetmiştir (14). Bateson 1906 yılında Cambridge’de kendisi için oluşturulan makamı adlandırmak için “genetik” kelimesini kullanmayı önermişti ancak Bateson’un makamına “biyoloji makamı” adı verildi. Buna karşılık Bateson, o yıl üçüncüsü düzenlenen Uluslararası Bitki Hibridizasyonu Konferansı’nda, Mendel yasalarından temel alan bu yeni bilim dalının “genetik” olarak adlandırılması önerisini tekrar ortaya attı ve bu sefer önerisi kabul edildi (15).

Genetiğin kökleri bulunmak istenilirse, Gregor Mendel’in bitki melezleşmesini konu alarak kaleme aldığı 1865 tarihli notlarına bakılabilir. Temelinde Mendel’in keşiflerine dayanan bu bilim, genel anlamda bir kalıtım bilimi olma amacıyla ve o zamana göre bütünüyle yeni olan gen, genotip, fenotip gibi biyolojik kavramların ortaya çıkarılmasıyla tanınmaktadır. O zamanlar genlerin fiziksel veya kimyasal doğası hakkında hiçbir şey bilinmemesine rağmen, Mendel’in özelliklerin ayrı birimler olarak kalıtıldığından şüphelenerek ortaya attığı fikirler mevcut kalıtım anlayışının

geliştirilmesinde oldukça önemli olmuştur. Genetikteki tüm mevcut araştırmaların izi, Mendel'in özelliklerin kalıtımını yöneten yasaları keşfetmesine kadar uzanabilir. 1910'lu yıllardaki Mendel genetiği, kromozomal kalıtım teorisiyle kaynaşarak günümüzde "klasik genetik" olarak adlandırılan bir alanı oluşturmuştur (15).



Şekil 1: Mendel'in 1865 tarihli notlarında kullandığı üç formül (15)

Mendel'in genetik bilimin köklerini oluştururken kullandığı üç formül yukarıda gösterilmektedir (Şekil 1). Bu formülleri açıklamak istersek: İki ebeveyn sırasıyla A tipine ve a tipine aittir (örneğin sarı ve yeşil bezelye). A tipi, a'ya baskındır. İlk formül, döllenme sırasında ne olduğunu göstermektedir: polen hücreleri yumurtalık hücreleriyle ilişkilidir. Temsil edilen dört kombinasyon da eşit olasılıklıdır. İkinci formül zigottaki sonucu temsil etmektedir (pay: erkek orjin; payda: dişi orjin). Üçüncü formül, soydaki üç tipin oranlarını gösterir: iki saf ebeveyn formu (A ve a), ve bir melez form Aa. Aralarında çaprazlanırsa, bu Aa tekrar saf ve melez soy karışımı verecektir. İkinci formül Mendel'in genetik ruhuna ne kadar yakın olduğunu gösteriyor olsa da,

üçüncü formül onun genotip ve alel gibi kavramlara sahip olmadığını göstermektedir. Eğer bu kavramlara sahip olsaydı denklemin ikinci üyesi “ $AA + 2Aa + aa$ ” şeklinde olacaktı (15).

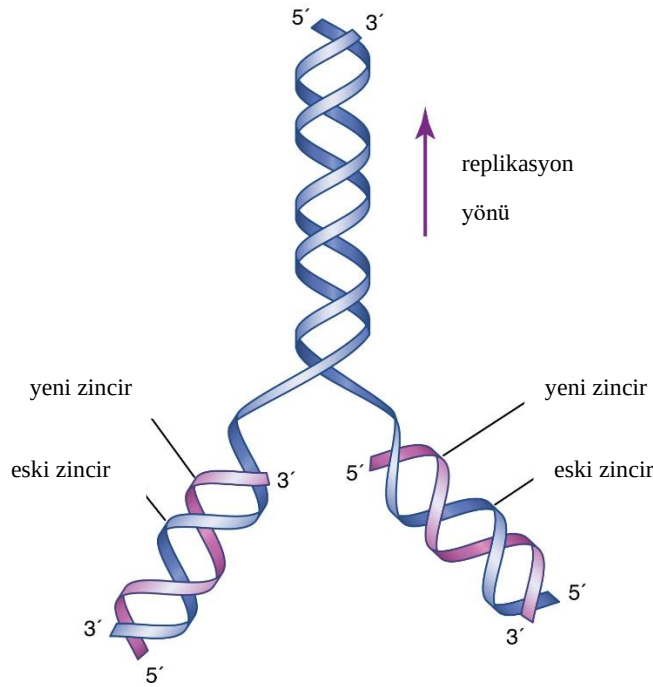
Kalıtımın en temel biriminin “genler” olduğu bilinmektedir. Genler için, belirli proteinleri kodlayan DNA parçaları tanımlamasını yapabiliriz. Genler kalıtım yoluyla ebeveynden çocuğa geçer ve böylelikle çocuktaki görünüş ve davranışlara karar veren sürecin en önemli parçası haline gelir (14). Bu çerçevede gen, eşzamanlı olarak bir işlev ve aktarım, yeniden birleştirme ve mutasyon birimidir. 1950'lerin başına kadar, genin bu kavramları birbiriyle çakışmış olsa da kalıtım temelinin DNA olduğu anlaşıldığında bu karmaşa çözülmüştür (15).

Genetik bilimi, biyolojinin temel taşlarından birini oluşturmakta, tarım, tıp ve biyoteknoloji gibi diğer birçok alanla örtüşmektedir. Uygarlığın başlangıcından bu yana, insanlık kalıtımın etkilerinin farkına varmış ve kalıtım ilkelerini ekili ürünlerin ve evcil hayvanların iyileştirilmesi gibi günlük uygulamalar için kullanmıştır. Örneğin, 6.000 yıldan daha eski bir Babil tabletinde, atların soy ağaçları ve olası kalıtsal özellikleri ile ilgili bilgilerin yer aldığı görülmüştür. Diğer bazı eski oymalarda ise hurma ağaçlarının çapraz tozlaşması anlatılmıştır. Bilinen bilgilere karşılık kalıtımın çoğu mekanizması, genetiğin sistematik bir bilim olarak ilerlemeye başladığı 19. yüzyıla kadar bir sır olarak kalmıştır (13).

2.1.1. DNA'nın keşfi ve gelişimi

Yirminci yüzyılın ortaları, DNA araştırmalarındaki en temel keşiflerden bazılarına tanıklık etmiştir. 1944'te Oswald T. Avery, Colin MacLeod ve Maclyn McCarty, genetik bilginin taşıyıcısının daha önce yaygın olarak inanıldığı gibi proteinler değil DNA olduğunu öne süren dönüm noktası niteliğindeki makaleyi yayınlamışlardır. Bu on yılın başında Erwin Chargaff, DNA'nın baz bileşiminin türler arasında farklılık gösterdiğini, ancak her tür içinde bazların her

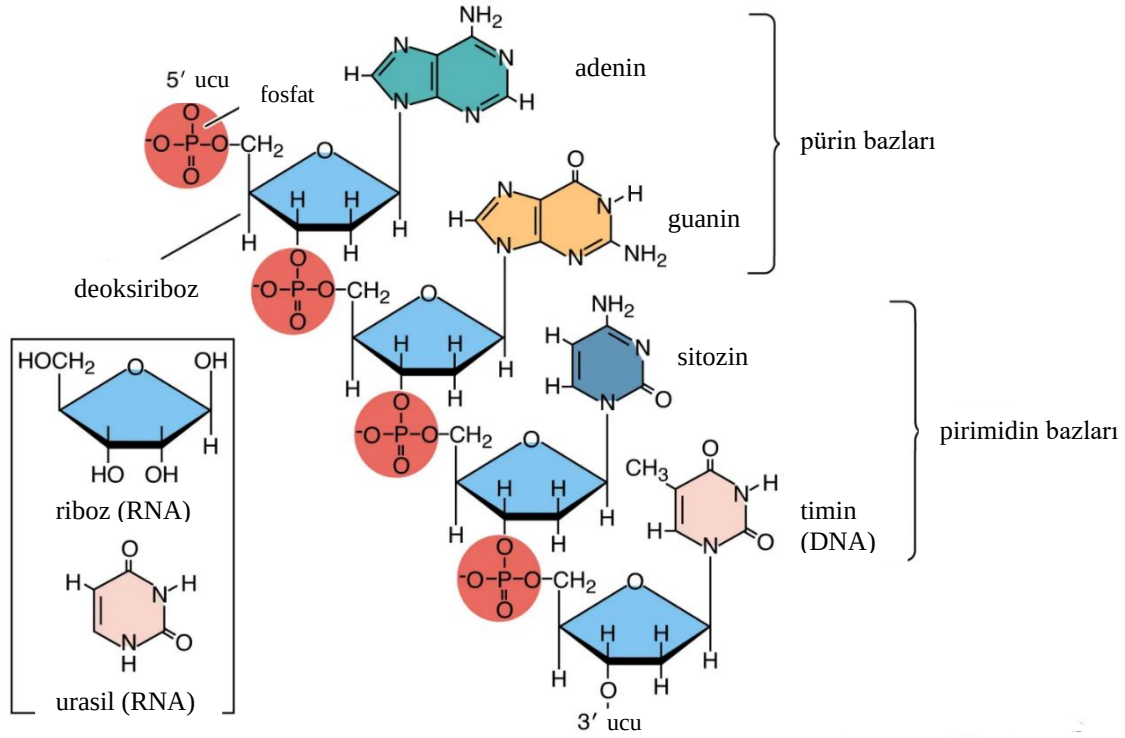
zaman belirli oranlarda bulunduğunu keşfetmiş, timin bazları ile aynı sayıda adenin bazının ve guanin bazları ile aynı sayıda sitozin bazının bulunduğunu bildirmiştir. 1952 yılında DNA genetik bir materyal olarak Alfred Hershey ve Martha Chase tarafından kabul edilmiştir (16). Bir yıl sonra, 1953 senesinde Amerikalı genetikçi ve biyofizikçi James D. Watson ve İngiliz biyofizikçiler Francis Crick ve Maurice Wilkins tarafından, DNA yapısı için öne sürülen çift sarmallı bir model (Şekil 2) tasarlandığında önemli bir dönüm noktasına ulaşılmıştır (13).



Şekil 2: DNA yapısının ilk önerisi (13)

DNA yapısı ile ilgili yapılan bu atılım, İngiliz bilim insanı Rosalind Franklin ve Maurice Wilkins'in gerçekleştirdiği DNA molekülünün X-ışını kırınımı çalışmalarıyla, molekülün sarmal yapısına ışık tutulması sayesinde mümkün olmuştur. Çift sarmal modeli, DNA'nın tamamlayıcı ipliklerini ayırarak ve bunları yeni DNA moleküllerinin sentezi için şablonlar olarak kullanarak kendi kendini kopyalama yapabildiğini göstermiştir. DNA'nın iç içe geçmiş zincirlerinin her

birinin, nükleotid adı verilen ve dört tipi olduğu bilinen bir kimyasal grup zinciri olduğu öne sürülmüştür. Proteinler amino asit dizileri olduğundan, belirli bir DNA nükleotid dizisinin bir amino asit dizisi ve dolayısıyla protein yapısı için bir kod içerebileceği önerilmiştir (13,16).



Şekil 3: Deoksiribonükleik asit (DNA) polinükleotid zinciri (13)

Şekil 3'te DNA'nın polinükleotid zincirinin bir kısmı gösterilmektedir. Küçük çerçevedeki görselde ise RNA'da karşılık bulan pentoz şekeri ve pirimidin bazı gösterilmiştir (13).

DNA replikasyonu için önerilen yarı korunumlu ayrılma modeli, ilk kez 1958 yılında Amerikalı moleküler biyolog Matthew Meselson ve Amerikalı genetikçi Franklin W. Stahl tarafından deneysel olarak gösterilmiştir. 1961'de Crick ve Güney Afrikalı biyolog Sydney Brenner, genetik kodun "kodon" adı verilen üçlü nükleotitlerle okunması gerektiğini ortaya çıkarmıştır. Amerikalı genetikçi Charles Yanofsky, bir gen içindeki mutant bölgelerin

konumlarının, karşılık gelen proteinin amino asit dizisindeki değiştirilmiş amino asitlerin konumlarıyla mükemmel bir şekilde eşleştiğini göstermiştir. 1966 yılında 64 olası üçlü kodlama biriminin (kodon) tamamının genetik kodu ve kodladıkları spesifik amino asitler, Amerikalı biyokimyacılar Marshall Nirenberg ve Har Gobind Khorana tarafından ortaya çıkarılarak genetik kod çözümlenmiştir (13,16). Birçok organizmada yapılan müteakip çalışmalar, DNA'nın çift sarmal yapısının, replikasyon modunun ve genetik kodun, bitkiler, hayvanlar, mantarlar, bakteriler ve virüsler dahil olmak üzere hemen hemen tüm organizmalarda aynı olduğunu göstermiştir. 1961'de Fransız biyolog François Jacob ve biyokimyacı Jacques Monod bakteriyel genlerin, düzenleyici proteinlerin genin kodlama bölgesinin hemen yukarı akıştaki bir bölgeye bağlanma eylemini gerçekleştirmesiyle aktif ve pasif hale getirilebileceğini göstererek gen düzenlemesi için prototip model oluşturmuşlardır (13).

Böylece, yaklaşık 20 yıllık bir süre zarfında DNA'nın birçok sırrı ortaya çıkarılmıştır. Bu atılımların önemi, DNA araştırmalarının bu olaylar gerçekleşmeden 75 yıl önce, 1869'da Johann Friedrich Miescher tarafından DNA'nın keşfiyle başlamış olduğu gerçeğini çoğu zaman gölgede bırakmaktadır (16).

1868/69 yılının kışında, İsviçreli bir doktor olan Friedrich Miescher, lökositlerin kimyasal bileşimi üzerinde DNA'nın keşfine yol açan deneyler yapmıştır. Miescher, deneylerinde, bilinmeyen bir maddenin çökeltisini fark etmiş ve bu madde üzerinde incelemeler yapmıştır. İzolasyon prosedürü sırasındaki özellikleri ve proteaz sindirimine karşı direnci, yeni maddenin bir protein veya lipid olmadığını göstermiştir. Bu maddenin temel bileşiminin analizleri, proteinlerin aksine, büyük miktarlarda fosfor içerdiğini ve Miescher'in daha sonra onayladığı gibi kükürt içermediğini ortaya çıkarmıştır. Böylece Miescher yeni bir molekül keşfettiğini fark etmiştir. Bu molekülü nukleustan izole ettiği için, bu moleküle günümüzdeki tanımında hala korunan bir isim

olan nüklein adını vermiştir. Miescher daha sonraki çalışmalarında, nükleinin tüm çekirdeklerin karakteristik bir bileşeni olduğunu göstermiş ve bu maddenin organelin işleviyle ayrılmaz bir şekilde bağlantılı olduğunu kanıtlayacağını varsaymıştır. Ayrıca Miescher, bu molekülün kalıtsal özelliklerin iletilmesinde bir rolü olabileceğini bile düşünmüş, ancak daha sonra bu fikri reddetmiştir (16).

2.2. Epigenetik

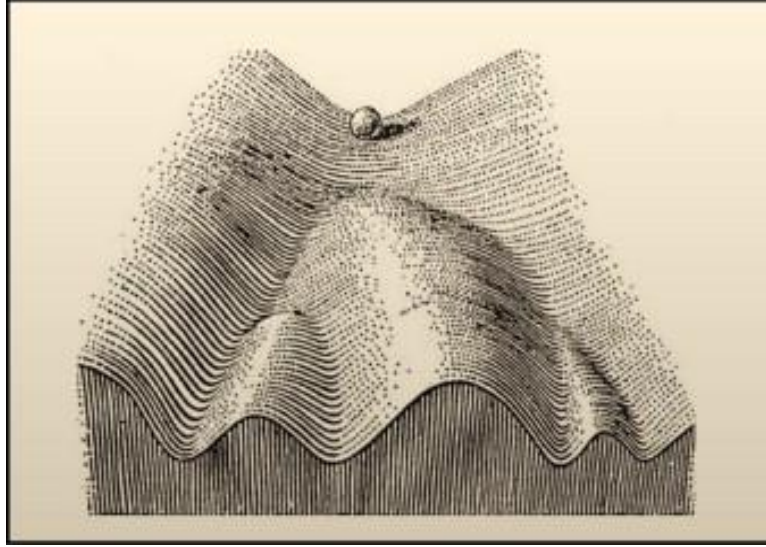
Modern anlamıyla, “epigenetik” kelimesi, genlerin ekspresyonunu doğrudan etkileyen, ancak DNA dizisindeki değişikliklere indirgenemeyen modifikasyonların incelenmesini ifade etmektedir. Bu modifikasyonlar için mevcut örnekler, nükleotidlerin metilasyonu ve histonların konfigürasyonundaki değişikliklerdir. Her iki durumda da bu değişiklikler, genlerin ifadesini değiştirmektedir (15,46). Bu değişikliklerin ortak özelliği kararlı olmasıdır ancak bu kararlılık daha az veya daha çok seviyede olmak üzere değişiklik göstermektedir. Dolayısıyla bazı epigenetik modifikasyonlar bir nesilden diğerine aktarılabilirken; bazıları kalıtılabilir özellikte değildir (15).

Modern epigenetik görüşümüzün kökeni bu terimi, gelişim sırasında genotip ve fenotip arasındaki farklılığı tanımlamak için Aristoteles'in epigenez fikrinden yararlanarak ortaya çıkaran Waddington'a kadar gitmektedir. O zamandan beri epigenetiğin anlamı, her geçen gün artan moleküler kavrayışları yansıtacak şekilde rafine edilmiştir. Epigenetik artık daha yaygın anlamıyla gen ifadesinde, değiştirilmiş DNA dizisinden kaynaklanmayan, genellikle DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve nükleozom konumlandırma gibi kromatindeki değişiklikler sonucu ortaya çıkan kalıtsal değişiklikleri ifade etmektedir (17).

18. yüzyıla kadar, preformasyon teorisi ile, yeteneklerin ve biyolojik farklılıkların bir tanrı tarafından belirlendiği ve bireysel karakterlerin döllenme ile başlayıp sonrasında değişmez bir halde kaldığı ileri sürülmüştür. Bu teoriye, Darwin'in teorileri ve Kant tarafından öne sürülen, çevrenin kesinlikle fenotip değişikliklerde bir faktör olarak yer aldığı düşüncesi ile karşı çıkmıştır. Bu durum, dolayısıyla evrim kavramının tanımlanmasına yol açmıştır. 1865'te Mendel'in ilkeleri, 1869'da DNA molekülünün izolasyonu ve yaklaşık bir yüzyıl sonra DNA'nın çift sarmal yapısının çözülmesi, genetik ve kalıtımın evrensel ilkelerinin oluşturulmasını sağlamıştır (18).

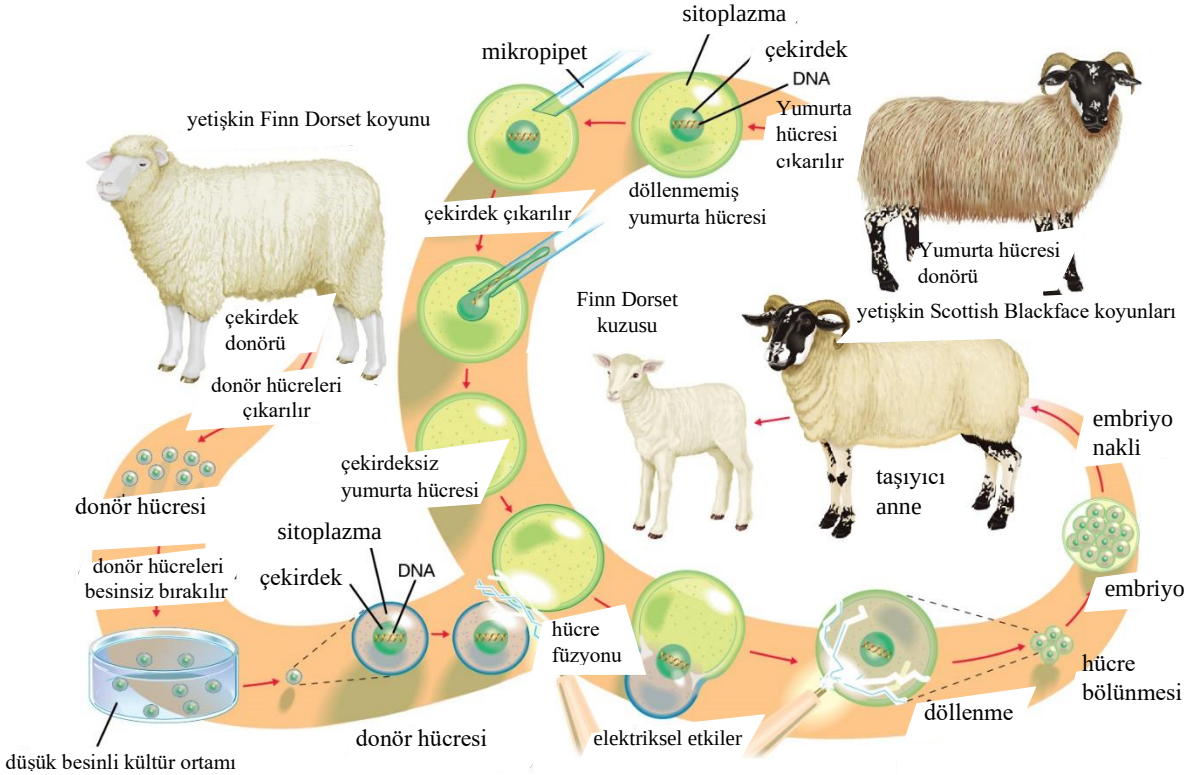
Gelişim biyolojisi alanında çalışmalarını sürdüren Conrad H. Waddington, gen ve protein ekspresyonu arasındaki bağlantılara odaklanan yeni bir biyoloji dalını özetlemek için ilk defa epigenetik kelimesini kullanmıştır (18). Tarihsel olarak “epigenetik” kelimesi, genetik ilkelerle açıklanamayan olayları tanımlamak için kullanılmış ve Waddington, epigenetiği “fenotipi meydana getiren genler ve ürünleri arasındaki nedensel etkileşimleri inceleyen biyoloji dalı” olarak tanımlamıştır. Böylece yıllar boyunca, bazıları tuhaf ve açıklanamaz olarak kabul edilen sayısız biyolojik fenomen, epigenetik kategorisine dahil edilmiştir (19).

Waddington 1957 yılında, gelişim sırasında hücresel karar verme sürecini temsil etmek için epigenetik bir manzara kavramını önermiştir (Şekil 4). Bir topun, yüzeyin pürüzlülüğü nedeniyle farklı yollar izleyebileceğini söyleyen Waddington'ın bu benzetmesinde top bir hücreyi ifade ederken; yüzeydeki pürüzler hücre içi ve hücre dışı çevresel etkiler anlamında kullanılmıştır (18,19). Böylece bu dinamik görsel metafor ile, hücrenin belirli izin verilen yörüngeleri yol alabildiği ve bu şekilde farklı sonuçlara yol açabildiği anlatılmak istenmiştir (19).



Şekil 4: Waddington'ın klasik epigenetik manzarası (19).

1980’lerde, farklı birkaç grup araştırmacı canlı dölleme ve embriyogenez oluşturmak için gerekli olan, hem erkek gamet genomu hem de dişi gamet füzyonunun gerekliliğini tanımlamıştır. Bu bildiri, özellikle anne veya ebeveyn kalıtımı ile ilgili olarak düzenlenen “baskılı genlerin” varlığını gün ışığına çıkarmıştır (18). Bu süreç, bir yetişkin somatik hücreden çekirdeksiz bir yumurtaya bir çekirdeğin transferinden sonra klonları elde etmenin yüksek zorluklarını açıklamıştır; üstelik bu işlem, 1997 yılında Wilmut ve arkadaşlarının yayınladıkları çalışmaya ve Dolly koyununun klonlanmasına kadar imkansız olarak kabul edilmekteydi (Şekil 5). Bu çalışmayı, çok sayıda farklı türde binlerce klonlanmış hayvanın yaratılması ve 2018’de bimaternal ve bipaternal farelerin üretimi izlemiş, ancak bu hayvanlarda ciddi kusurlar olduğu gözlenmiştir (13,18). Aslında, DNA’nın genel organizasyonu yaklaşık olarak 20. yüzyılın ortalarında anlaşılmış olsa da epigenetik alanının tam olarak zirve yapması 1990-2000 yıllarında, epigenetik işaretlerle ilgili spesifik enzimlerin, yazar ve silicilerin tanımlanmasına izin veren tam klonlama ve biyokimyasal tekniklerin oluşturulmasıyla birlikte çok daha sonraki yıllarda gerçekleşmiştir (18).



Şekil 5: Dolly koyununun klonlanması (13)

Epigenetik geniş anlamda, genotip ve fenotip arasında bir köprü işlevi gören, temeldeki DNA dizisini değiştirmeden bir lokus veya kromozomun nihai sonucunu değiştiren bir fenomen olarak bilinmektedir. Örneğin, çok hücreli bir organizmadaki hücrelerin büyük çoğunluğu aynı genotipi paylaşırsa da organizma gelişimi, farklı gen ekspresyonu profilleri ve hücresel fonksiyonlara sahip çeşitli hücre tipleri üretmektedir. Bu nedenle hücresel farklılaşma, genetik kalıtımdaki değişikliklerden ziyade, büyük ölçüde Waddington'ın "epigenetik manzara" tanımındaki değişiklikler tarafından yönetilen bir epigenetik fenomen olarak düşünülebilir (Şekil 4). Daha spesifik olarak, epigenetik, DNA'nın Watson-Crick baz eşleşmesinde değişiklik olmaksızın, gen ekspresyonunda veya hücresel fenotipte potansiyel olarak kararlı ve ideal olarak meydana gelen kalıtsal herhangi bir değişikliğin incelenmesi olarak tanımlanabilir (19).

Epigenetik günümüzde biyoloji biliminin en aktif araştırma alanlarından biridir. Bu alan hücrel farklılaşma ve gelişme, metabolizma, hastalıklar, fenotipik değişkenlik, kalıtım, evrim, davranışlar ve hatta kültür gibi çok çeşitli biyolojik fenomenlerin incelenmesini içerir. Epigenetiğin ne olduğu anlayışı, Conrad H. Waddington tarafından epigenetiğin, verilerin genetik ve embriyolojiye entegre edilmesine izin veren bir tür kavramsal araç olarak tanımlamasından bu yana gelişmiştir. Tarihsel olarak moleküler, gelişimsel ve evrimsel biyolojideki ilerlemeler boyunca gelişen epigenetik günümüzde, kullanıldığı biyolojik disipline bağlı olarak farklı anlamlara sahip çok yönlü bir kavram haline gelmiştir (20).

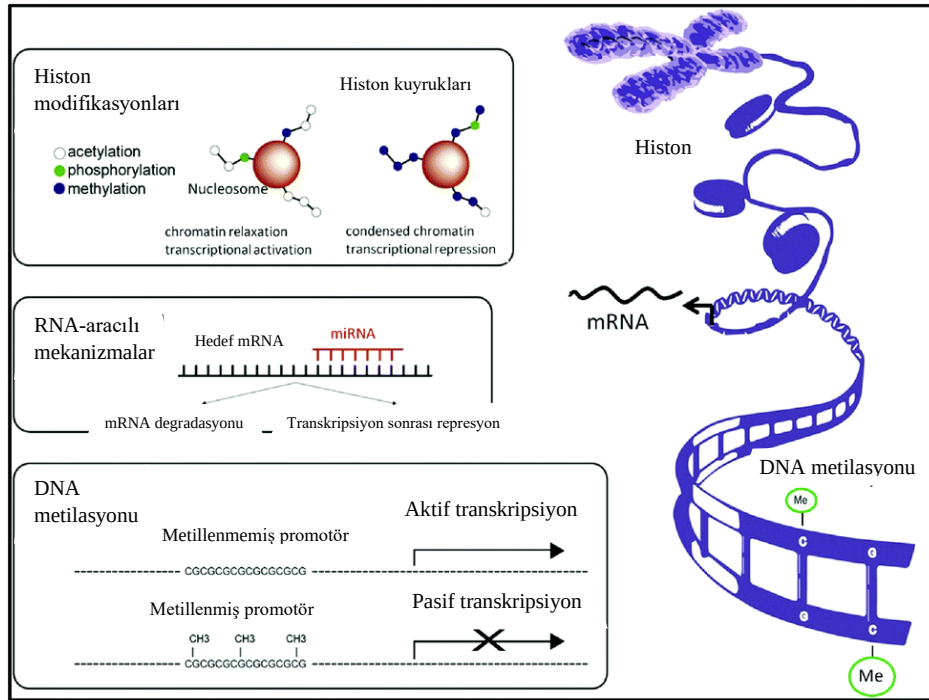
2.2.1. Epigenetik mekanizmalar

Epigenetik, bir önceki bölümde ayrıntılı olarak açıklandığı gibi DNA dizisinde oluşan değişikliklerden ziyade kromozomdaki değişimler yoluyla meydana gelen gen ifadesindeki kalıtsal ve kararlı değişikliklerin incelenmesidir. Epigenetik mekanizmalar DNA dizisini doğrudan değiştirmemesine rağmen, DNA bazlarının kimyasal modifikasyonları ve DNA'nın paketlenildiği kromozomal üstyapıdaki değişiklikler yoluyla gen ekspresyonunu düzenleyebilir (21).

Epigenetik mekanizmalar, bir hücre içinde gen ekspresyonu ve susturmayı düzenleyen bir kontrol katmanı oluşturur. Bu kontrol, dokular arasında farklılık göstermekte ve hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Ek olarak, epigenetik modifikasyonlar tarafından yönlendirilen hücreler arasındaki gen ekspresyonundaki farklılıklar, spesifik hücre tiplerinin benzersiz fonksiyonları ile sonuçlanır. Genom çapında DNA kalıpları ve histon modifikasyonları erken gelişim sırasında oluşturulmakta ve çoklu hücre bölünmeleri boyunca korunmaktadır (21).

DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlamayan RNA (ncRNA) ile ilişkili gen susturma olmak üzere üç farklı epigenetik mekanizma tanımlanmıştır (Şekil 7). DNA

metiltransferaz enzimleri tarafından katalize edilen DNA metilasyonu, sitozin-guanin dizisi (CpG) içindeki sitozin nükleotidine doğrudan bir metil grubunun eklenmesi ile gerçekleşir. CpG adaları, özellikle promotör bölgelerdekiler olmak üzere, DNA metilasyonu için ortak hedeflerdir. Yapılan çalışmalar sayesinde gen promotör bölgelerinin yaklaşık %70'inin CpG adaları içinde bulunduğu bildirilmiştir. Bir promotör bölgesindeki metillenmiş sitozinler, gen baskılayıcı proteinleri kullanarak DNA ile transkripsiyon faktörleri arasındaki etkileşimi azaltır. Sitozin metilasyonu ayrıca heterokromatin oluşumunu yönlendirir, böylelikle oluşan nükleozom sıkışması da transkripsiyonel makinelerin DNA ile etkileşime girmesini önler. Bu nedenle, promotör bölgelerdeki DNA metilasyonu, gen sessizleşmesine neden olur. Bu epigenetik mekanizma aynı zamanda dokuya özgü gen regülasyonu, genomik damgalama ve X kromozomu inaktivasyonunda da önemli bir rol oynamaktadır (21).

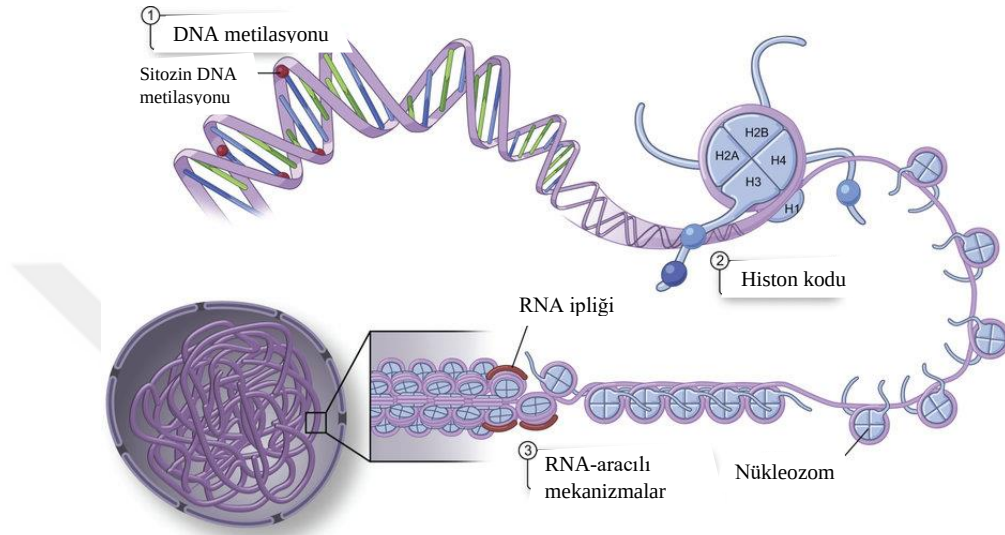


Şekil 7: Epigenetik Modifikasyonlar (22)

İkinci epigenetik mekanizma, histon proteinlerinin translasyon sonrası modifikasyonlarıdır. Bu modifikasyonlar, her biri nükleozomlardaki DNA-histon etkileşimlerini değiştiren enzim katalizli asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon gibi mekanizmaları içermektedir. Histon asetilasyonu genellikle DNA-histon etkileşimlerini zayıflatan pozitif yüklü lizin kalıntıları meydana gelir, böylece kromatini açar ve transkripsiyonu kolaylaştırır. Histon metilasyonu, histon protein yükünü değiştirmedikten, ayrıca lizine 1-3 metil grubunun ve arginine 1-2 metil grubunun eklenmesini gerçekleştirebildiğinden dolayı daha karmaşıktır. Histon fosforilasyonu, histon kuyruğuna negatif bir fosfat grubunun eklenmesini içerir, ancak DNA hasarına yanıtta ve sonraki onarımında rol oynayan H2A(X) fosforilasyonu dışında işlevi hakkında pek bir şey bilinmemektedir. Histon asetilasyonunun gen ekspresyonu üzerindeki nispeten açık etkisinin yanı sıra, diğer histon modifikasyonlarının etkileri karmaşıktır ve yakındaki DNA moleküllerinin durumundan büyük ölçüde etkilenir (21).

En son açıklanan epigenetik mekanizma, kodlamayan RNA ile ilişkili gen susturmadır. Kodlamayan bir RNA (ncRNA), kopyalanan ancak proteinlere çevrilmeyen işlevsel bir RNA molekülüdür (21,48). Bir zamanlar genomun israfı olarak kabul edilmelerine karşılık son görüşler, ncRNA moleküllerinin epigenetik gen ekspresyonunda çok önemli bir rol üstlendiğini ve kodlanmış proteinlerdeki bu tür benzerliğe rağmen türler ve insan popülasyonları arasındaki fenotipteki büyük farkı açıkladığını öne sürmektedir. Ayrıca bazı hastalıkların oluşum temelinde ncRNA'lar üzerinde meydana gelen bozuklukların yattığı söylenmektedir (47). Önemli ncRNA molekülleri, 30'dan az nükleotit içeren mikroRNA'ları (miRNA) ve kısa enterferans yapan RNA'ları (siRNA) ve 200 nükleotit veya daha uzun olan uzun kodlamayan RNA'ları (lncRNA) içerir (21,48). Epigenetikteki rollerinin tam kapsamı üzerinde hala çalışılıyor olursa da, ncRNA'ların gen susturmaya ek olarak DNA metilasyonuna ve histon modifikasyonlarına

katıldığını gösteren kanıtlar vardır. siRNA'ların ve lncRNA'ların her ikisinin de heterokromatin oluşumuyla gen ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (21).



Şekil 8: Epigenetik gen düzenlemesinin üç temel mekanizması (23).

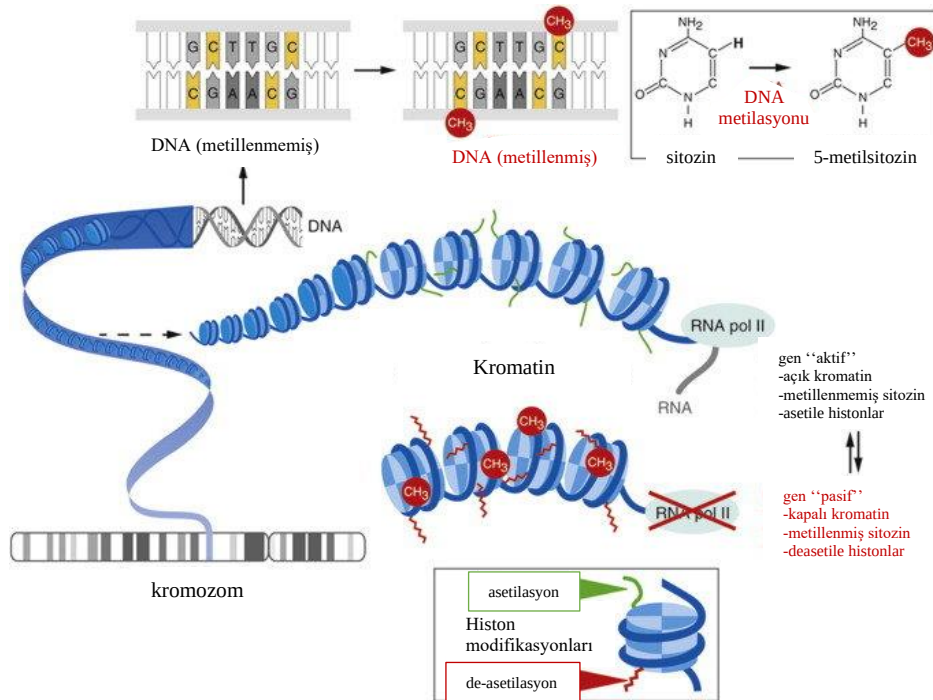
Gen ekspresyonu yukarıdaki bölümde anlatıldığı üzere, Şekil 8’de gösterilen bu üç birbirinden farklı ancak oldukça ilişkili epigenetik mekanizmalar tarafından desteklenmektedir (23).

2.2.2. DNA metilasyonu

DNA metilasyonu günümüzde belki de en iyi çalışılan epigenetik işarettir (41). Genom içindeki bir sitozinin 5' pozisyonunun metilasyonu, enzimatik DNA metiltransferaz ailesi tarafından gerçekleştirilir. Böylece bu süreç sonucunda 5-metilsitozin (5-mC) oluşur. Bir karbon metabolizması yolağında üretilen ve modifikasyona uğramış bir amino asit olan S-adenosilmetiyonin (SAM), bu reaksiyonda metil grubunu bağışlayan moleküldür (24,50).

Genellikle "beşinci baz" olarak adlandırılan 5-metilsitozin, hücre tipine bağlı olarak insan genomundaki sitozin bazlarının tahmini olarak %4-6'sı oranında bulunmaktadır (24,51).

Son yıllarda insan DNA'sında CpG bağlamı dışında gerçekleşmiş olan metilasyon süreçleri rapor edilmiş olmasına rağmen, DNA metilasyonu çoğunlukla CpG dinükleotidleri kapsamında meydana gelmektedir. İnsan genomu, metillenmiş veya metillenmemiş halde bulunan yaklaşık 30 milyon CpG dinükleotidi içerir. CpG nükleotidlerinin yoğun tekrarlarına CpG adacıkları denilmekte ve bu tekrarlar genom boyunca meydana gelmektedir (24). Bir genin promotör bölgesinde yer alan CpG adalarının metilasyonu, proteinleri genin promotörüne toplayan ve böylece transkripsiyonu bloke eden metil-CpG bağlayıcı proteinlerin bağlanması nedeniyle genellikle o genin transkripsiyonu ile ters ilişkilidir (Şekil 9). Kromatin yapısında meydana gelen değişiklikler sonucunda genler sessiz hale getirilir veya aktive edilerek ifade olması sağlanır (42,43).

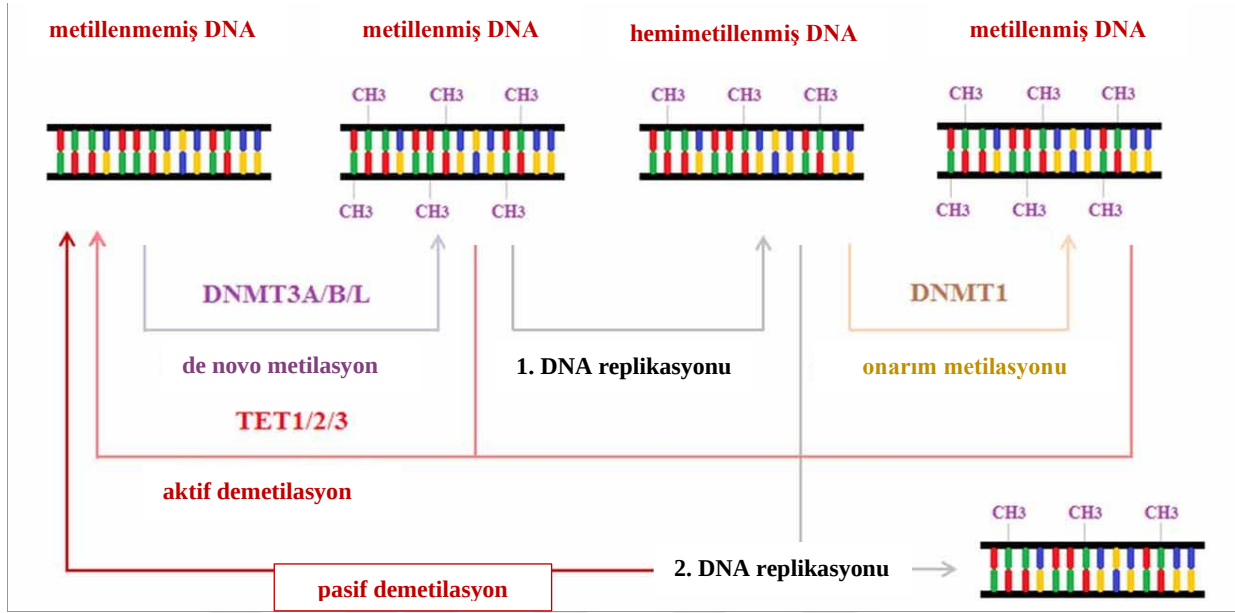


Şekil 9: DNA metilasyonu (25)

Metilasyonun sürdürülmesi, hücre bölünmesi boyunca somatik hücrelerin yapısal ve işlevsel kimliklerinin sürekliliğini sağlamak için oldukça önemlidir. Hücre döngüsünün S fazı sırasında, DNA metiltransferaz enzimi (DNMT), ubikuitin benzeri proteinlerin yardımıyla yarı metillenmiş CpG'lere ulaşır, böylece yeni sentezlenen her DNA dizisi, tamamlayıcı dizisi başına metillenebilir. Böylece, her replikasyondan sonra, metilasyon modelinin simetrisi onarılır (38).

Metilasyon kalıpları stabil olmasına rağmen, aktif ve pasif demetilasyon olarak adlandırılan iki mekanizma ile silinebilirler. Pasif demetilasyon, onarımda meydana gelen bir hatayı temsil eder ve öncelikli olarak işlevsel DNMT1/UHRF1'in yokluğunda meydana gelir. Metilasyonun simetrisi yeniden kurulamazsa, metilasyon replikasyonlar yoluyla kaybolur. Bu süreç replikasyona bağlı seyreltme olarak adlandırılır (38).

Aktif demetilasyona, TET1, TET2 ve TET3 olmak üzere üç izoform olarak var olan on-onbir translokasyon (TET) proteini aracılık eder. Dioksijenazların bu alt ailesi, 5mC'nin hidroksimetilsitozine (5hmC), 5-formilsitozine (5fC) ve son olarak 5-karboksilsitozine (5caC) oksidasyonunu katalize eder. Bu dönüşüm, iki aşama yoluyla tam demetilasyona doğru atılan ilk adımdır. İlk mekanizmada, DNMT1, 5hmC, 5fC ve 5acC metilasyonuna karşı daha az etkilidir; bu nedenle, TET'in oksidatif aktivitesi pasif seyreltmeyi teşvik edebilir. İkinci yolda, 5fC ve 5acC, timin DNA glikosilaz ile DNA'dan kesilebilir ve ortaya çıkan lezyon, modifiye edilmemiş bir sitozin üreterek, baz eksizyon onarımı (BER) yolu ile derhal onarılır. Metilasyon ve demetilasyon mekanizmalarına genel bir bakış Şekil 10'da verilmiştir (38).



Şekil 10: Metilasyon ve demetilasyon (38).

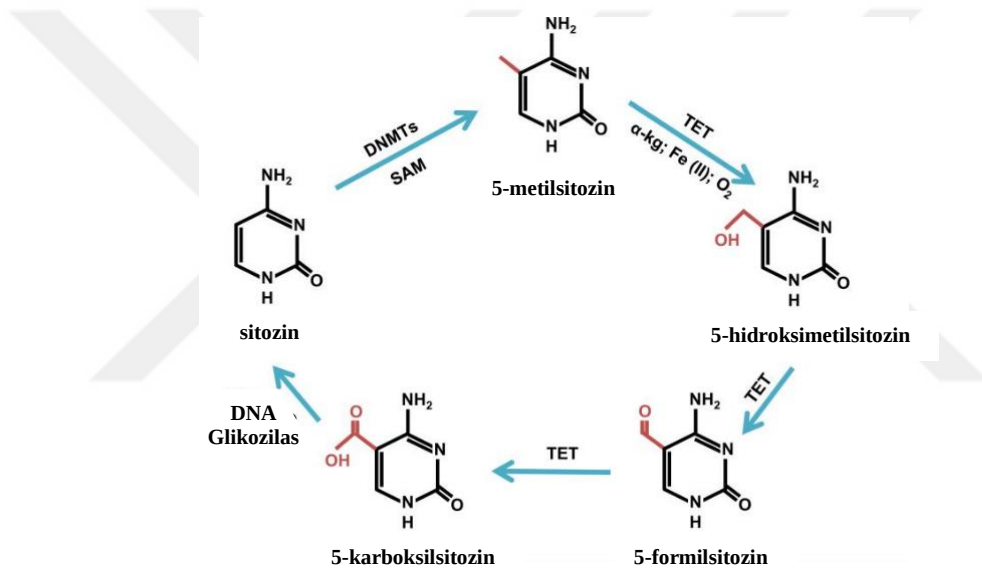
2.2.3. DNA hidroksimetilasyonu

Son zamanlarda, sitozin bazlarından metil gruplarının çıkarılmasında bir oyuncu olarak 5-hidroksimetilsitozin adı verilen yeni bir epigenetik işaret önerilmiştir. Hidroksimetilsitozin (5-hmC), 5-mC'ye benzer gen transkripsiyonundaki potansiyel düzenleyici rolü nedeniyle "altıncı baz" olarak anılmaktadır. Memeli DNA'sında sitozinlerin %1'den azı hidroksillenir ve en yüksek düzeye merkezi sinir sistemi sahip olmakla birlikte, hidroksillenme düzeyi dokuya göre değişmektedir (33).

Embriyonik kök hücreler de yüksek 5-hmC seviyelerine sahiptir, ancak bu seviyeler farklılaşma sırasında azalır. 5-hmC'nin en yaygın olarak kabul edilen işlevi, metil grubunun 5-mC'den çıkarılmasında bir ara madde olarak görev alması ve böylece sitozini değiştirilmemiş formuna geri döndürmesidir. Metil gruplarının sitozin kalıntılarından uzaklaştırılması mekanizması, mevcut epigenetik araştırmalarda büyüyen bir konudur. Metil işaretlerinin hücre

bölünmesinden sonra yeni hücrede değiştirilmediği ve değiştirilmemiş bir sitozin ile sonuçlandığı pasif demetilasyon dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar önerilmiştir (33).

İlginç bir şekilde, metilsitozinin hidroksetilmetilsitosine dönüştürülmesinden sorumlu olan aynı enzim ailesi, daha sonra bir DNA glikozilaz tarafından kesilen metilsitosini 5-formilmetilsitosine ve 5-karboksilmetilsitosine de dönüştürebilir (Şekil 11). Bu enzimler, aşağıda tartışıldığı gibi TET enzimleri olarak adlandırılır (24).



Şekil 11: TET ile hidroksetilasyon yoluyla önerilen aktif demetilasyon mekanizması (24)

Bir gen promotörü veya CpG adası içindeki sitozinlerin hidroksetilasyonu, sitozinlerin metilasyonu için tarif edilen modele zıt bir şekilde, o genin transkripsiyonundaki bir artışla ilişkilidir. Bu nedenle, hidroksetilasyonun kendi içinde gen transkripsiyonunun bir düzenleyicisi olarak hareket edebileceği öne sürülmüştür. Hidroksetilasyonun gen transkripsiyonunda bir değişikliğe neden olabileceği mekanizma, DNA'dan metil bağlayıcı proteinlerin salınması yolu ile gerçekleşmektedir (24). Bu 5-mC bağlayıcı proteinlerin çoğu, metilsitozin hidroksetil edildikten sonra artık DNA'ya bağlanmayacaktır. Bu proteinler daha sonra DNA'dan ayrışır ve belki de o

genin transkripsiyonel durumunu değiştirir. 5-hmC'nin kalıcılık ve kalıtsallığı henüz açıklığa kavuşturulmamış olsa da, bu epigenetik işaretin DNA'da mevcut olduğu süre göz önüne alındığında gen transkripsiyonunun etkilenebileceği düşünölmektedir (24).

2.3. Metilasyon Analizinde Kullanılan Yöntemler

DNA metilasyon analizi, araştırmacıların gen regölasyonu hakkında değerli bilgiler edinmelerine ve potansiyel biyobelirteçleri belirlemelerine yardımcı olmaktadır. Yapılmış olan birçok çalışma sonucunda kanser, Beckwith-Wiedemann sendromu (BWS), Prader-Willi sendromu (PWS), ve bağımlılık gibi hastalıklar da dahil olmak üzere birçok hastalığın oluşum sürecinde anormal DNA metilasyonu durumlarının yer aldığı bildirilmiştir (44,45,49). Ayrıca obezite ve diyabet gibi kalıtsal olduğu bilinen hastalıkların temelinde de yine metilasyon kaynakları, sebepler arasında yer almaktadır (52,53). DNA metilasyonunun aynı zamanda kuraklığa, aşırı sıcaklıklara ve diğer çevresel değişikliklere verilen tepkilere ilişkin yapılan agrigenomik araştırmalara da sıklıkla konu olduğu bilinmektedir (26).

Biyolojik örneklerin DNA metilasyon düzeylerini belirlemek için literatürde yer alan birçok farklı yöntem vardır. Bu yöntemlerin çeşitliliği epigenetik alanının gün geçtikçe gelişmeye devam etmesiyle birlikte artmaktadır. Her yöntemin kendine göre bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu durum göz önüne alındığında belirli bir amaca yönelik araştırmayı yürötmek için en uygun yöntemi seçmek zor bir iştir (27).

DNA metilasyon analizi için bir yöntem seçerken: Çalışmanın amacı, eldeki DNA örneklerinin miktarı ve kalitesi, yöntemin maliyeti ve kolay uygulanabilirliği, özel ekipmanların mevcudiyeti ve benzeri faktörler göz önünde bulundurulmalıdır (27).

2.3.1. Genom çapında yapılan metilasyon analizlerinde kullanılan yöntemler

Metilasyon analizinde kullanılan yöntemlerden bahsedilecek olan bu ilk bölümde, genom çapındaki DNA metilasyonu düzeyleri analiz edilmek istenildiğinde tercih edilen birkaç yöntemden bahsedilecektir.

2.3.1.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-ultraviyole (HPLC-UV)

1980'de Kuo ve meslektaşları tarafından geliştirilen HPLC-UV tekniği, hidrolize DNA örneklerinde deoksisitidin (dC) ve metillenmiş sitozin (5mC) miktarını ölçmek için oldukça önemli olan bir tahlil yöntemi olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, bu yöntemin avantajları, özel laboratuvar ekipmanı ihtiyaı ve analiz yapılabilmesi için nispeten yüksek miktarlarda (3-10 µg) DNA örneğine gerek duyulması ile oldukça sınırlıdır. Yöntemin prosedürü, DNA'nın kendisini oluşturan nükleosit bazlarına hidrolize edilmesi, 5mC ve dC bazlarının kromatografik olarak ayrılması ve ardından bu fraksiyonların ölçülmesi olarak ilerlemektedir. Sürecin sonunda her numune için 5mC/dC oranı hesaplanarak, çalışmadaki deney ve kontrol grupları arasında karşılaştırma yapılabilir (27).

2.3.1.2. Kromatografik yöntemler

Açık adı sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi olan LC-MS/MS, çok daha küçük miktarlarda hidrolize DNA numunesi gerektirmesi ile HPLC-UV'ye alternatif olan bir yaklaşımdır. Tüm sitozin kalıntılarının yaklaşık olarak %2 ila %5'inin metillendiği memeli DNA'sı durumunda LC-MS/MS, %0.05-10 arasında değişen metilasyon seviyelerini tespit etmesi açısından doğrulanmıştır ve bu yöntemin toplam sitozin kalıntılarının yaklaşık %0.25'i kadar küçük örnekler arasındaki farklılıkları güvenle tespit edebildiği bilinmektedir. Bu da global DNA metilasyonundaki yaklaşık %5 civarında bir farklılığa karşılık gelir (27).

Prosedür rutin olarak 50-100 ng DNA örneği gerektirir, ancak literatürde 5 ng gibi çok daha küçük miktarların da başarılı bir şekilde profillendirildiği görülmüştür. Bu yöntemin bir diğer önemli yararı, düşük kaliteli DNA'dan olumsuz olarak etkilenmemesidir. Bununla birlikte, uzmanlık gerektiren bir yöntem olduğu ve LC-MS/MS sisteminin her laboratuvarında yaygın olarak bulunmaması nedeniyle metilasyon analizi için çok sık kullanılamamış bir yöntemdir (27).

2.3.1.3. Enzim bağı immünosorbent analizi (ELISA) temelli yöntemler

DNA metilasyon düzeyinin hızlı bir şekilde değerlendirilmesini sağlayan, hepsi ELISA temelli olan ve ticari olarak temin edilebilen birçok kit vardır. ELISA temelli testler tipik olarak yüksek değişkenliğe sahiptir; bu nedenle DNA metilasyonunun yalnızca kaba tahmini için uygundur. Bununla birlikte, global DNA metilasyonundaki büyük değişikliklerin tanımlanmasına iyi hizmet eden, hızlı ve kolay uygulanabilir yöntemlerdir (27).

Bu yöntemde kısaca, DNA numunesi bir ELISA plakası üzerinde yakalanır ve metillenmiş sitozinler, sıralı olarak şu şekilde inkübasyon adımlarıyla saptanır: (1) 5mC'ye karşı bir birincil antikor; (2) etiketli bir ikincil antikor; ve sonra (3) kolorimetrik/fluorometrik saptama reaktifleri (27).

2.3.1.4. Luminometrik metilasyon analizi (LUMA)

LUMA tekniği 2006 yılında Karimi ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Bu yöntem parçalanmış DNA ipliklerinin çıkıntılı uçlarını doldurmak için paralel ve müteakip olan pirosekanslama reaksiyonlarında gerçekleştirilen iki DNA restriksiyon parçalama reaksiyonunun bir kombinasyonunu kullanır. Parçalama reaksiyonunun biri CpG metilasyonuna duyarlı olan enzim HpaII ile gerçekleştirilirken; paralel olarak gerçekleşen reaksiyon, metilasyona duyarlı olmayan ve tüm CCGG bölgelerinde kesim yapacak olan MspI enzimini kullanır. Escherichia coli

restriksiyon endonükleaz (EcoRI) enzimi, her iki reaksiyona da iç kontrol olarak dahil edilir. Hem MspI hem de HpaII, DNA bölünmesinden sonra 5'-CG çıkıntıları üretirken, EcoRI 5'-AATT çıkıntıları üretir ve bunlar daha sonra pirosekanslama tabanlı uzatma testiyle doldurulur (27).

Ölçülen ışık sinyali HpaII/MspI oranı olarak hesaplanır ve bu oran numunede bulunan metillenmemiş DNA miktarı ile orantılıdır. Pirosekanslama reaksiyonunda eklenen nükleotidlerin dizisi bilindiğinden dolayı, yöntemin özgüllüğü çok yüksek, değişkenlik ise düşüktür. Bu faktör global DNA metilasyonundaki küçük değişiklikleri saptamak için oldukça önemlidir. LUMA yöntemi nispeten az miktarda DNA (250-500 ng) gerektirmekte ve çok az değişkenlik göstermektedir. Ayrıca DNA girdi miktarındaki değişkenliği hesaba katan bir dahili kontrol avantajına sahiptir. Bununla birlikte, tam enzimatik sindirimin gerçekleşmesini sağlamak için analiz edilecek olan DNA'nın yüksek kalitede olması şarttır (27).

2.3.1.5. AFLP ve RFLP

Diferansiyel olarak metillenmiş parçaların tespiti, geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP), restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) veya her ikisinin bir kombinasyonunu kullanan protokoller ile gerçekleştirilebilir (27).

Bu yöntemlerin en büyük sıkıntısı, küresel DNA metilasyonunun yalnızca küçük bir yüzdesini değerlendirebilme kapasitesine sahip olmalarıdır. Ayrıca, birden fazla DNA bandının iyi bir şekilde çözülmesinin sağlanması gibi teknik sorunlar da bu yöntemlere dezavantaj oluşturmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemler DNA metilasyonunu hızlı bir şekilde değerlendirmenin düşük maliyetli yollarındandır. Başka bir avantaj olarak bu yöntemler, DNA dizi

kompozisyonları hakkında sınırlı bilgi olsa veya hiç bilgi olmasa bile herhangi bir tür için uygulanabilmektedir (27).

2.3.2. İlgilenilen spesifik genlerin metilasyon analizi

Bu bölümde, spesifik gen ve bölgelerin DNA metilasyonunu analiz etmek için kullanılabilecek yöntemlerden bahsedilecektir. Bir sonraki bölümde ayrıca bahsedilecek olan bisülfıt dönüşümü, bu yöntemlerin birçoğunun ilk adımını oluşturmaktadır.

2.3.2.1. PCR ve dizileme

Bisülfıt-dönüşümü yapılmış olan DNA, dizilemenin ardından ilgilenilen bölgenin amplifikasyonu için kullanılabilir. Primerler “<http://www.urogene.org/methprimer>” adresindeki primer tasarlayıcı kullanılarak CpG adası çevresinde tasarlanır ve bisülfıt-dönüşümü yapılmış olan DNA’nın PCR amplifikasyonu için kullanılır. Elde edilen PCR ürünleri klonlanabilir ve dizilenebilir. Son yıllardaki gelişmeler yaşanmadan önce bu yöntem, ilgili CpG adasındaki spesifik CpG bölgelerinin metilasyon durumunu belirlemenin tek yolu olarak bilinmekteydi. Bazı durumlarda, numuneler arasındaki metilasyon farklılıkları büyük olduğunda (>%50), doğrudan PCR ürününün dizilenmesi yolu da bir alternatiftir. Bu yöntemin bazı dezavantajları şu şekildedir: Spesifik olmayan amplifikasyon probleminin üstesinden gelmek için genellikle yuvalanmış PCR uygulaması gereklidir, primer tasarımı ve amplifikasyonu DNA’nın karmaşıklığının azalması nedeniyle genellikle problemlidir ve bisülfıt ile muamele edilmiş DNA’dan elde edilen uzun parçaların amplifikasyonu zordur (27).

2.3.2.2. Pirosekanslama

Pirosekanslamada özgün primerler tasarlanır veya bir kit olarak satın alınır. PCR ürünleri elde edilir ve kısa okumalı pirosekanslamada reaksiyonu (~100 bp) gerçekleştirilir. Metilasyon

düzeyi dizilenmiş bölge içerisindeki her bir CpG bölgesi için birleştirilmiş deoksiguanozin trifosfat (dGTP) ve deoksiadenozin trifosfat (dATP) sinyal yoğunluklarına göre tahmin edilir. Elde edilen sonuç niceldir ve bu teknik, metilasyondaki oranı %5'e kadar inebilen küçük farklılıkları bile tespit eder. Pirosekanslama, kanser gibi yalnızca bir bölümün diferansiyel olarak metillenmiş bir gene sahip olduğu numuneler için iyi bir yöntemdir (27).

2.3.2.3. Metilasyon-spesifik PCR

Bisülfid-dönüştürülmüş DNA kullanan bir başka klasik yöntem, metilasyona özgü PCR'dir. Bu yöntemde metillenmiş ve metillenmemiş DNA'nın amplifikasyonunu destekleyen birer çift olmak üzere iki çift primer tasarlanmaktadır. Her numune için iki gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) reaksiyonu gerçekleştirilir ve bağıl metilasyon, Ct değerlerinin farkına dayalı olarak hesaplanır. Birden fazla örneğin aynı anda profillenmesi için kullanılabilecek hızlı bir yöntemdir. Bariz dezavantajı ise, bir seferde sadece bir veya iki CpG bölgesinin metilasyon durumunun değerlendirilmesidir. Metilasyona özgü primerlerin tasarımına yönelik program “<http://www.urogene.org/methprimer>” adresinde bulunabilir (27).

2.3.3. Diferansiyel olarak metillenmiş bölgelerin analizi

Bu noktaya kadar açıklanmış olan yöntemler, analiz edilen numunenin/örneklerin DNA metilasyon durumundaki genel değişiklikleri belirlemek için kullanılabilir. Ancak, diferansiyel olarak metillenmiş belirli gen veya bölgelerin hangi yöntemler kullanılarak analiz edilebildiği bu bölümde anlatılacaktır.

2.3.3.1. Bisülfıt dizileme

Bisülfıt dizileme tekniği, DNA metilasyon çalışmalarında oldukça önemli bir yöntem olarak kabul edilir. DNA'nın bisülfıt muamelesi, sitozinin urasile deaminasyonuna aracılık eder ve bu dnüşürölmüş kalıntılar, PCR amplifikasyonu ve takip eden Sanger dizileme analizi ile timin olarak okunacaktır. Bununla birlikte, 5 mC kalıntıları bu dönüşüme karşı dirençlidir ve dolayısıyla dönüşüm geçirmeyerek sitozin olarak okunacaktır. Bu nedenle, işlenmemiş bir DNA örneğinden okunan Sanger dizilimi ile aynı örneğın bisülfıt muamelesi sonrasındaki halini karşılaştırmak, metillenmiş sitozinlerin saptanmasını sağlar. Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojisi yardımıyla, bu yaklaşıım DNA metilasyon analizinde tüm genomu genişletilebilir (27).

Bisülfıt dizilemenin uygulanması zor olabilir. Bisülfıt dönüşümü, genom karmaşıklığını üç nükleotide indirger ve bu nedenle, NGS sonrası dizi hizalaması daha zor bir görev haline gelir. Ek olarak, bisülfıt dönüşümü, karmaşıklığın azalmasıyla birlikte, uzun fragmanların amplifikasyonunu zorlaştıran ve potansiyel olarak kimerik ürünlerin üretilmesiyle sonuçlanabilen DNA fragmentasyonuna yol açar (27).

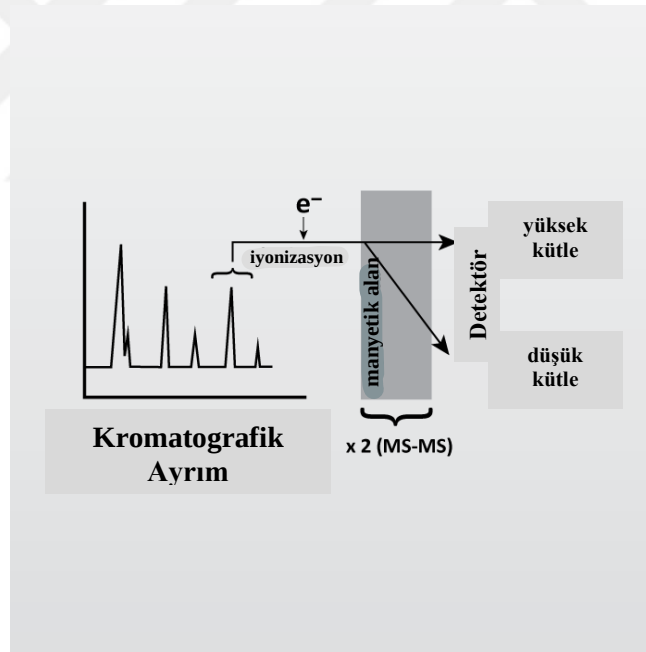
Tahmini DNA metilasyon seviyesi buna bağlı olduğundan, metillenmemiş sitozinlerin tam dönüşümünü sağlamak çok önemlidir. Bu nedenle, bisülfıt reaksiyonları için kontrolleri dahil etmenin yanı sıra, dizilemeden sonra tamamlanmamış dönüşümün bir göstergesi olan CpG dışı bölgelerdeki sitozinlerin varlığına dikkat etmek de önemlidir. Elde edilen oran, numuneden izole edilen tüm DNA'nın anlık görüntüsü olduğundan, DNA metilasyon seviyesinin dikkatli bir şekilde yorumlanmasında, hücre popölasyonunun homojenliği dikkate alınmalıdır. Değişken metilasyon durumuna sahip karışık bir hücre popölasyonu bir seyreltme etkisine sahip olacak ve bu nedenle metilasyon seviyesini etkileyecektir. Tüm genom bisülfıt dizilemesinden metillenmiş DNA'nın bir alt popölasyonuna geçtiğimizde hizalama sorunu azaltılabilir (27).

Tüm genom bisülfıt dizilimi (WGBS), bisülfıt dönüşümünün varlığı dışında tüm genom dizilimine benzemektedir. Bu yöntem mevcut tüm yöntemlerin en kapsamlısıdır. Tek sınırlama, maliyet ve NGS verilerinin analizindeki zorluklardır. Daha önce de bahsedildiği gibi, metillenmemiş sitozinler, bisülfıt muamelesinden sonra timin haline gelir ve sadece üç bazdan oluşan DNA'nın bir araya getirilmesi çok zordur. Yakın zamana kadar var olan bir diğer sınırlama, WGBS için önemli miktarda DNA gerekmesiydi ancak protokolün, adaptör ligasyon adımının bisülfıt tedavisi sonrasına ertelenecek şekilde modifiye edilmesi, WGBS'nin rutin olarak yaklaşık 30 ng ve hatta bazı durumlarda 125 pg gibi daha az miktarlarda DNA kullanılarak gerçekleştirilmesine olanak vermiştir. Bununla birlikte, genomun sadece küçük bir kısmı diferansiyel olarak metillenme potansiyeline sahip olduğundan, normalde WGBS gerekli değildir. Genomun 5 mC ile zenginleştirilmiş fraksiyonunun dizilenmesi yalnızca daha ucuz bir yaklaşım olmakla kalmamakta, aynı zamanda dizileme kapsamını ve dolayısıyla diferansiyel olarak metillenmiş bölgeleri ortaya çıkarmada kesinliği arttırmaya da izin vermektedir (27).

2.4. LC-MS/MS

Bir önceki bölümde DNA metilasyon analizi için kullanılabilecek birçok yöntemden bahsedilmiştir. Bu yöntemlerin çoğu maliyet, duyarlılık ve tekrarlanabilirlik açısından sıkıntı yaratmakta ve bazı yönlerden eksiklikler göstermektedir. Epigenetik alanıyla ilgilenen araştırmacılar, metilasyon analizi için her açıdan ideal standartlara erişebilecek bir yöntem geliştirmek için çalışmalara devam etmektedir. Elde edilmiş olan bazı bulgular sonucu LC-MS/MS'in bu boşluğu doldurabileceği ve metilasyon analizinde altın standart olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Kısaca LC-MS/MS olarak adlandırılan sistemin açılımı sıvı kromatografisi-tekrarlı kütle spektrometresidir. Bu sistem, Şekil 12'de şematize edildiği üzere, Sıvı

Kromatografisi (LC) ile Kütle Spektrometresi (MS) ünitelerinin bir araya getirilmesiyle oluşmaktadır. LC-MS/MS sistemi, analitlerin hem kalitatif hem de kantitatif bir şekilde analiz edilmesine imkan vermektedir. Bu yöntem sayesinde eser miktarlardaki maddelerin analizinde, kan, tükürük ve idrar gibi biyolojik numunelerin analizlerinde yüksek duyarlılık ve doğruluk ile sonuçlar almak mümkün olmaktadır (11, 40). En hassas metotlardan biri olarak karşımıza çıkan LC-MS/MS'in DNA metilasyon analizlerinde kullanılması çok doğru ve yerinde bir seçim olacaktır (11). LC-MS/MS sağladığı avantajlar sayesinde biyoteknoloji, toksikoloji, adli tıp ve farmakoloji gibi birçok farklı alanda; gıda ve çevre analizleri, atık suda kirlilik tayini ve benzeri gibi uygulamalarda kullanılmaktadır (39, 40).



Şekil 12: LC-MS/MS sisteminin çalışma mekanizması (28)

LC-MS-MS, sıvı kromatografisinin ayırma gücü ile kütle spektrometrisinin oldukça hassas ve seçici olan kütle analizi yeteneği ile birleştiren güçlü bir analitik tekniktir (Şekil 12). Terapötik

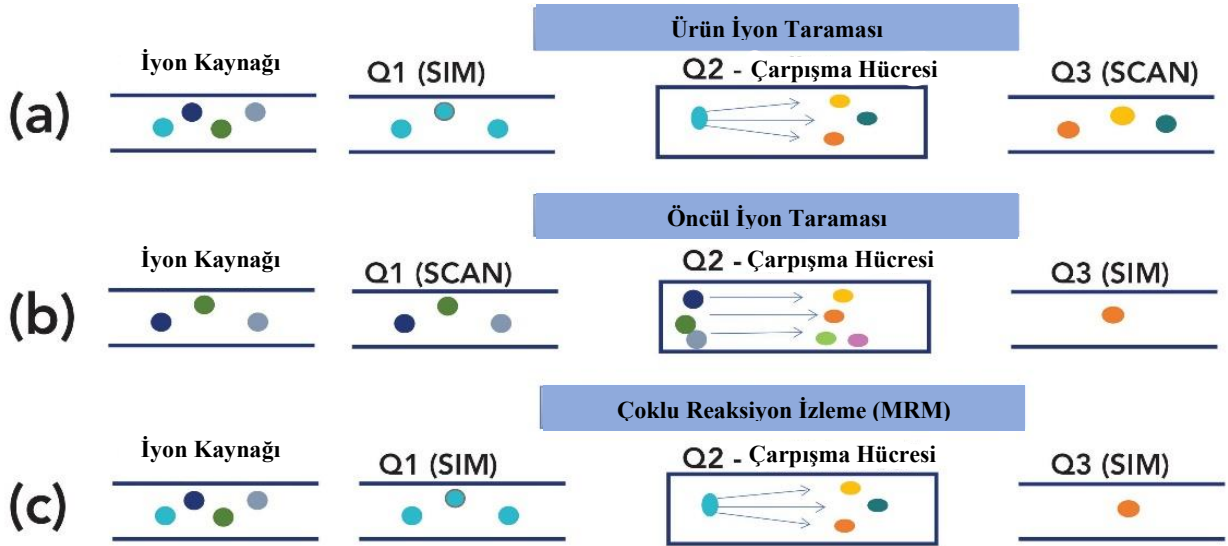
ilaç izleme (TDM), toksikoloji, endokrinoloji, pediatri, mikrobiyoloji ve gelişmekte olan proteomik alanı dahil olmak üzere çok çeşitli alanlarda klinik uygulamalara sahiptir (29).

İlgilenilen analitleri içeren bir numune çözeltisi, yüksek basınçta akan bir mobil faz tarafından sabit bir faz boyunca (LC kolonu) pompalanır. Numunenin bileşenleri, durağan faz ve mobil faz arasındaki kimyasal etkileşim, LC kolonu boyunca farklı göç oranları ortaya çıkararak ayırmayı etkiler. Sabit faz ve mobil faz kombinasyonlarının çok çeşitli şekillerde yapılabilmesi, bir ayırmanın her amaca ve zorluğa çözüm oluşturacak şekilde özelleştirilmesine olanak tanır (29).

LC kolonundaki elüsyondan sonra, hareketli faz kütle spektrometresine yönlendirilir. Bir LC/MS/MS sisteminde yer alan kütle spektrometresi, LC kolon sıvılarının nebulize edildiği, desolvatlandığı ve iyonize edilerek yüklü parçacıklar oluşturduğu bir iyonizasyon kaynağına sahiptir. Bu yüklü parçacıklar daha sonra elektromanyetik alanlar uygulayarak bir dizi kütle analizörü (dört kutuplu) aracılığıyla yüksek vakum altında göç eder. Spesifik bir kütle/yük öncül iyonunun (veya ana iyonun), diğer tüm kütle/yük oranlı parçacıklar hariç tutularak, birinci kuadrupolden(Q1) geçmesi hedeflenir. Çarpışma hücresinde, seçilen kütle/yük iyonları daha sonra bir soy gazla çarpışma yoluyla ürün iyonlarına parçalanır. Üçüncü kuadrupol(Q3), spesifik ürün iyon parçalarını hedeflemek için kullanılır. Elde edilen izole ürün iyonları daha sonra bir elektron çoğaltıcı ile kantite edilir. İyonların öncül iyondan ürün iyonuna geçişi, ilgili bileşiğin yapısına oldukça özgüdür ve bu nedenle yüksek derecede seçicilik sağlar (29).

Çoklu reaksiyon izleme (MRM) modunda hem Q1 hem de Q3, tek iyon analizi için ayarlanır. Tam tarama kütle spektrumuna veya bir ürün iyon taramasına dayalı olarak, Q1'den bir parça seçilir ve ardından, Q3 taramasında görüldüğü üzere Q2'deki daha fazla parçalanmaya dayalı olarak, Q3'ten tek bir parça seçilir. Bu uygulama muhtemelen en nihai seçiciliği sağlamaktadır, çünkü iki bileşiğin, hatta yakından ilişkili izomerlerin, öncül iyon fragmanından ürün iyon fragmanına doğru

aynı geçişlere ve kolonda aynı (veya yakın) alıkonma sürelerine sahip olma olasılığı büyük ölçüde azaltılmaktadır. MRM ayrıca her iki boyutta da gürültüyü önemli ölçüde azaltarak oldukça düşük tespit sınırları sağlamaktadır. Şekil 13’de öncül iyon taraması, ürün iyon taraması ve MRM modu şematize edilmiştir (30).



Şekil 13: LC-MS/MS sisteminin analiz aşamaları (30)

Bu tekniğin gücü, LC'nin birçok çeşitli bileşik için etkili olan ayırma gücü ile MS'in ilgilenilen her bileşiğin benzersiz kütle/yük (m/z) geçişlerine dayalı olarak yüksek derecede hassasiyet ve seçicilik ile bileşikleri kantite edebilme yeteneğinin birleştirilmesinde yatmaktadır (28). LC-MS/MS'in avantajları arasında aşırı duyarlılık önemli bir yer tutmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarla, bu yöntem için tespit sınırının yalnızca 4 ng genomik DNA olduğu bildirilmiştir. Ayrıca LC-MS/MS analizi diziye bağımlı bir yöntem olmadığı için herhangi bir türün DNA'sını analiz etmek için de kullanılabilir. Öte yandan analizin sağladığı esneklik, LC-MS/MS yönteminin farklı varyasyonları kullanılarak elde edilen 5mC seviyelerinin güvenilir bir şekilde kıyaslanabilmesine de olanak sağlamaktadır (11).

Li ve arkadaşları (ark.) (2011), periferel kanda global DNA metilasyon seviyelerini doğru ve kesin bir şekilde belirleyebilmek için hızlı ve ekonomik bir LC/MS-MS yöntemi geliştirmişlerdir. DNA izolasyonu ve hidrolizinin ardından pozitif modda Sıvı Kromatografisi Elektrosprey İyonizasyon-Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-ESI-MS/MS) ile analiz yapılarak metillenmiş 2'-deoksisitidin (5MedC)'in 2'-deoksiguanozin (dG)'e oranını tespit etmişlerdir. Numune olarak karmaşık biyolojik örnekler kullanılırken filtrasyon basamağının, doğru ölçümler için kritik bir adım olduğu ve analizin hassasiyetini koruduğu bildirilmiştir (31).

Peng ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada LC-ESI-MS/MS ile çeşitli biyolojik materyallerde global DNA metilasyonunu incelemişlerdir. Biyolojik numunelerden ekstrakte edilen genomik DNA, enzimler tarafından tamamen hidrolize edilmiş ve daha sonra analiz için LC/MS'e enjekte edilmiştir. Global DNA metilasyon oranı, dC ve 5-mdC konsantrasyonları kullanılarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem ayrıca, perflorooktan sülfonata (PFOS) maruz kalan normal insan karaciğer hücresi L-02'deki global DNA metilasyon oranlarını ve 10 hepatoselüler karsinom hastasının ve kontrol olarak 10 sağlıklı katılımcının plazma örneklerini araştırmak için kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucu iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu durum genomik DNA metilasyonunun insanlarda karaciğer kanserinin oluşumu ve gelişimi ile yakından ilişkili olabileceğini göstermiştir. Geliştirilen yöntemin, DNA metilasyon analizinde yalnızca büyük miktarda DNA (örneğin hücre hatları, dokular) içeren biyolojik numuneler için değil, aynı zamanda son derece az miktarda DNA içerenler (örneğin plazma) için de yaygın olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (32).

A.Tammen ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, yaşlanma ile metilasyon arasındaki ilişki incelenmek istenmiştir. LC/MS-MS kullanılarak DNA'daki 5'-metil-2'-deoksisitidin ve 5'-hidroksimetil-2'-deoksisitidin'i ölçmek için bir yöntem oluşturulmuş ve bu

yöntem genç ve yaşlı C57Bl/6 erkek farelerin karaciğer dokularında metillenmiş veya hidroksimetillenmiş toplam sitozin yüzdesini ölçmek için kullanılmıştır. Sonuçta, yaşlı farelerin hepatik DNA'sında, gençlere göre daha yüksek seviyelerde hidroksimetilasyon olduğu belirlenmiştir. 5'-metilsitozinde seviyelerinde ise önemli bir değişiklik saptanmamıştır. Bu çalışma sonucunda, LC/MS-MS yöntemiyle DNA hidroksimetilasyonu ölçümü yapılmasının, yaşlanmanın yeni bir biyolojik belirteci olabileceği belirtilmiştir (33).

Godderis ve ark. (2015), tarafından yapılan çalışmada, farklı dokulardaki insan DNA'sında 5mC ve 5hmC seviyelerinin eşzamanlı olarak ölçülebilmesi için hızlı ve hassas bir LC-MS/MS yönteminin uygulanması rapor edilmiştir. Biyolojik materyal olarak kan ve tükürük numuneleri kullanılmıştır. Sağlıklı gönüllülerden toplanan numuneler sonucu yapılan çalışmada metilasyon ve hidroksimetilasyon epigenetik belirteçleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Global DNA metilasyonunun ortalama değerinin, tükürük örneklerinde (ortalama %4.61), kan örneklerine kıyasla (ortalama %5.70) anlamlı bir şekilde ($P = 0.001$) daha düşük olduğu görülmektedir. Hidroksimetilasyon için ise bu durumun tam tersi geçerlidir. Global hidroksimetilasyon, tükürük örneklerinde (ortalama %0.036), kan örneklerine (ortalama %0.027) kıyasla anlamlı bir şekilde ($P = 0.001$) daha yüksektir. Erkek ve kadın kıyaslandığında ise global DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeylerinde önemli farklılıklar gözlenmemiştir. Daha sonra kan ve tükürükteki %DNA metilasyonunu ile yine kan ve tükürükte %DNA hidroksimetilasyonunu karşılaştırılmış fakat iki doku arasındaki her iki epigenetik uç nokta için anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. Dolayısıyla, bu iki örnek karşılaştırılabilir görünmemektedir (12).

Nakagawa ve ark. (2019), LC/MS-MS'te kararlılık ve standardizasyon eksiklikleri nedeniyle ortaya çıkan sınırlamaları yok ederek, küresel DNA metilasyon düzeylerinin son derece doğru ölçümlerini garanti eden sağlam bir yöntem geliştirmeyi amaçlamışlardır. Yapılan çalışmada biyolojik materyal olarak üç insan pankreas karsinoma hücre hattı, üç insan kolorektal karsinoma

hücre hattı ve beş insan meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem üç açıdan incelenmiştir. Bunlardan birincisi, hassas bir kantifikasyonun gerçekleşmesini engelleyen sodyum eklentilerini en aza indirgeyerek, en temiz sonucun alınmasını sağlayacak olan çözücü koşullarının tespiti. Farklı çözücü ve farklı konsantrasyonlarla yapılan denemeler sonucu en iyi koşulun %0.1'lik amonyum bikarbonat ile olduğu görülmüştür. İkincisi, daha önce yapılmış olan çalışmalarda kullanılmamış kolonları kullanarak LC ile nükleositlerin ayrılması işleminin iyileştirilmesidir. Sonuçta Acquity UPLC BEH fenil kolonu en uygun kolon olarak seçilmiştir. Üçüncüsü ise mdC oranı kullanılarak oluşturulan kalibrasyon sayesinde ölçüm sonuçlarındaki belirsizliği azaltmada elde edilen başarıdır. Bu faktörler göz önüne alındığında, bu çalışmada oluşturulan LC-MS/MS tabanlı analiz protokolünün, düşük metilasyon düzeyli nükleositlerin doğru ölçümü için, daha önce bildirilen protokollerden daha üstün olduğu görülmüştür. Bu çalışmada geliştirilen yöntem, DNA metilasyonunun ölçülmesi işleminin kısa bir süre içinde (8 dakika) yapılmasını sağlamaktadır. Ayrıca ölçümlerin yüksek derecede tekrarlanabilirlik özelliğine sahip olması da bu yöntemin büyük bir getirisi (10).

2.5. Validasyon Çalışması

Validasyon, bir diğer adıyla geçerli kılma, bir yöntemin ulusal ve uluslararası standartlara dayanarak uygunluğunun onaylanması ve istatistiksel olarak yorumlanmasıyla bu uygunluğun kanıtlanması için gerekli olan tüm aşamaları içeren bir süreçtir (67,68).

Validasyon çalışması analiz için yeni bir yöntem geliştirildiğinde, standart bir yöntem laboratuvarında ilk kez uygulanacağına, var olan bir yöntemin prosedüründe bir değişikliğe gidildiğinde veya performans açısından bir farklılık gözlemlendiğinde yapılmaktadır (67,68).

Validasyon çalışmasının tamamlanabilmesi için değerlendirilmesi gereken parametreler Tablo I’de yer almaktadır.

Tablo I. Validasyon parametreleri (67)

Seçicilik/Spesifiklik
Tespit Limiti ve Tayin Limiti (LOD ve LOQ)
Doğrusallık ve Ölçüm Aralığı
Doğruluk a. Kesinlik - Tekrarlanabilirlik - Ara kesinlik - Tekrar üretilebilirlik b. Gerçeklik - Sapma - Geri kazanım
Sağlamlık
Analitik Duyarlılık

2.5.1. Seçicilik/Spesifiklik

Validasyon basamaklarından olan seçicilik, yöntem ile aranan analitin diğer analitlerin bulunduğu örnek içinde ayırt edebilme yeteneğini belirtmektedir. Yöntemin analiz edilmek istenen maddeye karşı özgünlüğünü gösterir (68).

2.5.2. Tespit Limiti ve Tayin Limiti (LOD ve LOQ)

Tespit limiti (LOD), örnek içerisinde ilgilenilen maddeye ait varlığın saptanabildiği en düşük konsantrasyon değeridir. Tayin limiti (LOQ) ise örnek içerisindeki varlığı saptanan maddenin miktar olarak net bir şekilde tayin edildiği en düşük konsantrasyonu ifade etmektedir (68). LOD

ve LOQ ile ilgili hesaplamalar, kör numunelere ait sonuçlar, yöntemin standart sapması veya analitik sistemin sinyal/gürültü oranı kullanılarak yapılabilmektedir (68).

2.5.3. Doğrusallık ve Ölçüm Aralığı

Doğrusallık terimi, ölçüm sonuçlarının belirli konsantrasyon aralıkları içerisinde konsantrasyon değerleri ile doğrusal bir artış göstermesini ifade etmektedir. Eurachem Rehberi baz alındığında, yapılan ölçümler 3 tekrarlı olarak en az 6 noktada gerçekleştirilmelidir. Grafikselleştirilen sonuçlardan doğrunun denklemi belirlenir ve korelasyon katsayısı (r) hesaplanır. Kalibrasyonun doğrusal olduğunu kanıtlayan parametre, korelasyon katsayısının ≥ 0.99 olmasıdır (68). Kantitatif analizlerde bir çalışma aralığı da belirlenmelidir. Çalışma aralığı içerisindeki en düşük değer LOQ olurken; en yüksek değer çalışılan analite göre değişkenlik gösterebilmektedir (68).

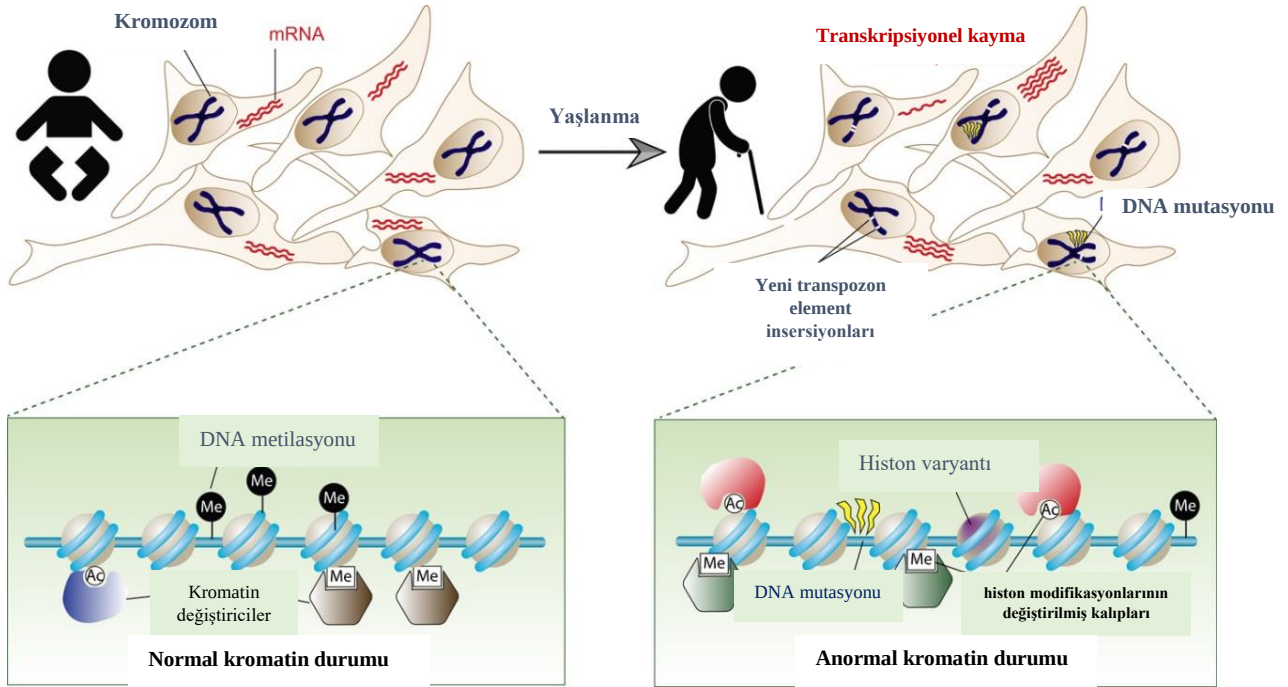
2.6. DNA Metilasyonu ve Adli Bilimler

Kişilerin yaşı, beslenme biçimi, sigara tüketme durumları, kullandıkları uyuşturucu/ilaçlar, yaşadıkları kirlenmiş çevre ve hatta sahip oldukları travmatik bir şiddet geçmişi varsa bunların hepsinin bilgisinin yer aldığı genom sayesinde şüpheli profilini oluşturabilmek mümkün olabilir. Bu olasılık, çeşitli moleküler mekanizmalar aracılığıyla çevresel faktörlerin gen aktivitesi üzerine etkilerini inceleyen bilim dalı olan epigenetik sayesinde var olmuştur. Epigenetik programlama fetal dönemde başlar, bir nesilden diğerine aktarılabilir ve kişinin yaşamı boyunca da değişmeye devam eder. Geçmişten günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda en çok yer edinen epigenetik modifikasyon DNA metilasyonudur. DNA metilasyon profillerinin bireyler üzerindeki spesifitesi anlaşıldıktan sonra bu profiller, sağlık bilimleri alanında biyobelirteç olarak kullanılmaya başlanmıştır. Dolayısıyla birçok bilim dalını kendi bünyesinde barındıran Adli Bilimler alanı da bu gelişmelerden faydalanmıştır. DNA metilasyonundan yararlanarak adli uygulamalarda kullanılmak

üzere epigenetik belirteç testleri geliştirilmekte, bu konu üzerine yapılan araştırma ve çalışmalar her geçen gün daha da ilerlemektedir. Yapılan bu çalışmalar sayesinde Adli Bilimlerde yaş tayini, farklı doku ve vücut sıvılarının teşhisinin yapılması, monozigotik ikizlerin birbirinden ayırt edilmesi gibi uygulamalar mümkün olmaktadır. Ayrıca yapılacak çalışmalar sonucunda spesifik belirteçlerin geliştirilmesi, bireyin sağlık durumu, beslenme şekli ve çevresel etkilere maruziyeti gibi diğer faktörler de belirlenebilir hale gelecektir. DNA metilasyon profilleri, yapılmış olan birçok çalışmada da belirtildiği gibi, Adli Bilimler için oldukça değerli ve kullanışlı bir parametredir.

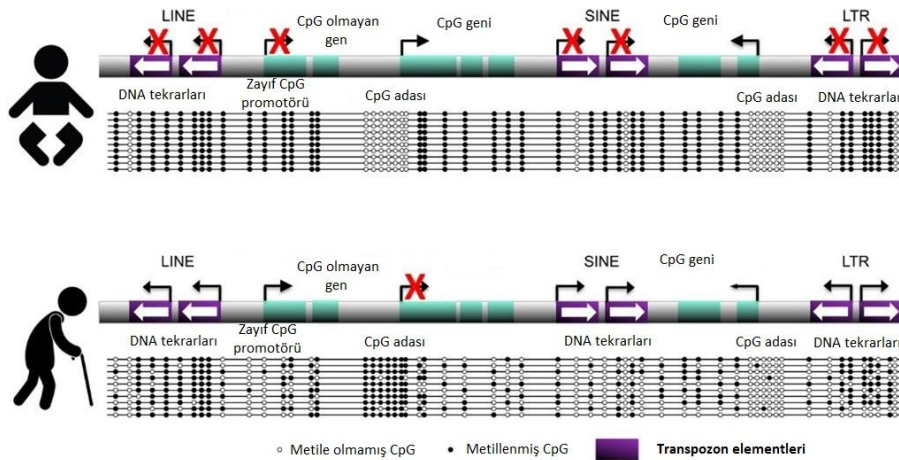
2.6.1. Yaş tayini

Bir olay yerinde bulunan biyolojik materyalden bireyin yaşını tahmin etme kabiliyeti, adli soruşturmalarda çok önemli bir değere sahiptir. Olayla ilgisi olduğu düşünülen kişinin cezai sorumluluğu, işlediği fiilin sonuçlarını kavrama yeteğine sahip olup olmadığı ve hukuki ehliyeti gibi konularda yaş tespiti çok önemli bir uygulama haline gelmektedir (54). Yaşlanma süreci epigenetik profiller de dahil olmak üzere diğer birçok moleküler modifikasyonla da ilişkili olan karmaşık bir süreçtir (Şekil 14). Adli olaylarda yaş tayininin yapılabilmesi, en iyi bilinen epigenetik mekanizma olan DNA metilasyonuna dayanmaktadır (7).



Şekil 14: Yaşlanma sırasında meydana geldiği düşünülen epigenetik değişikliklerin özeti (34)

Genom çapında yapılmış olan çeşitli metilasyon analizleri, ilerleyen yaşla birlikte küresel DNA metilasyon seviyelerinde önemli bir azalmanın olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 15). Dolayısıyla DNA metilasyon seviyelerini tespit etmeye yönelik geliştirilen yeni metodolojiler sayesinde bir bireyin yaşı belirlenebilir (7).



Şekil 15: Yaşlanma sırasında DNA metilasyon değişikliklerinin özeti (34)

Biyolojik materyaller arasında olan kan, olay yerlerinde sıklıkla karşılaşılmaması ile en önemli biyolojik kanıtlar arasındadır. Bireylerin profilleri, kısa ardışık tekrarları (STR) profillemeye yoluyla elde edilebilir ancak bireyin yaşı gibi ek bilgilerin açığa çıkarılması yürütülen soruşturma için oldukça önemli ipuçları sağlayacaktır. Görgü tanığının bile bulunmadığı adli vakalarda şüpheli bireyin yaşını tahmin etmek, potansiyel şüpheli sayısını indirgeyecek ve hatta bazı durumlarda masum kişilerin şüpheli konumuna düşmesini engelleyecektir (7).

Vidaki ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, bir kan örneğindeki DNA metilasyonundan yaş tahmini yapabilmek için en uygun CpG alanlarının tanımlanması amaçlanmıştır. Bir CpG bölgesi, DNA dizisindeki sitozin ve guanin nükleobazlarının yan yana bulunduğu bir alandır. Yapılan çalışmada 16 CpG bölgesi kullanılarak, ortalama 4-6 yıllık olası hatayla doğru yaş tahmini sağlayan bir yaş tahmini modeli oluşturulmuştur. Ayrıca çalışmadan elde edilen sonuçlar, bu yöntemin daha geniş bir yaş aralığına uygulanma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (7).

Metilasyon temelli yaş tahmini yöntemlerinin uygulanması adli açıdan düşünüldüğünde, olay yerlerinden elde edilen biyolojik materyallerin düşük nicelik ve kalitede olması aşılması gereken en büyük engel olacaktır. Bu nedenle, numune açısından sıkıntı çekildiğinde bile biyolojik materyaldeki önerilen CpG bölgelerini analiz edebilen, doğru, güvenilir ve hassas bir yöntem geliştirmek esastır (7).

2.6.2. Olay yerinde vücut sıvısı tespiti

Olay yerlerinden elde edilen vücut sıvıları adli vakalardaki en önemli kanıt türleri arasında sayılmaktadır. Bir biyolojik materyalin türü ve kökeninin belirlenmesi suç mahallerinde vuku bulan olayın anlaşılması ve çözülmesi açısından da yardımcı olabilmektedir. Vücut sıvılarını

teşhis edebilme kabiliyeti adli araştırmalar için çok önemlidir, çünkü deri hücrelerinden gelen DNA masum bir temas veya transferden kaynaklı olabileceken; vücut sıvılarının varlığı bir suçun gerçekleştiğinin işareti olabilir (8).

Çoğu zaman olay yerlerinde vücut sıvılarını belirlemek zor bir iş haline gelebilir. Bir materyal üzerinde bulunan lekenin diğer sıvılara benzemesi veya iz seviyelerinin görselleştirme ya da serolojik testler yoluyla saptanmaya elverişsiz oluşu bu işi zorlaştıran nedenlerdendir. Epigenetik testler kantitatif sonuçlar sağladığından, ayrıca RNA ve protein belirteçleri gerektiren yöntemlerden daha uzun kararlılık gösterdiğinden daha iyi bir metodoloji olma ihtiyacını karşılayabilir (8).

Tüm genom üzerinde yapılan çalışmalar sayesinde, genomda dokuya özgü metilasyon profilleri (tDMRs) olarak adlandırılan kromozom parçalarının olduğu keşfedilmiştir. Bu parçalar her dokuya spesifiktir ve özgü olduğu dokuya ait farklı metilasyon modelleri içermektedir. Dolayısıyla vücut sıvılarının teşhisinde önemli bir araç olarak kabul edilmiş ve birçok araştırmacının çalışmalarına konu olmuştur (8).

Lee ve ark. (2012) tarafından, vücut sıvısı teşhisinde dokuya özgü DNA metilasyon profillerinin potansiyeli üzerine bir çalışma yapılmıştır. DACT1, USP49, HOXA4, PFN3 ve PRMT2 genleri için beş tDMR seçilmiş ve bu tDMR'ler için DNA metilasyon profilleri kan, tükürük, meni, adet kanı ve vajinal sıvı DNA'sı kullanılarak bisülfid dizilemesi ile üretilmiştir. DACT1 ve USP49 için tDMR'ler semene özgü hipometilasyon gösterirken; HOXA4, PFN3 ve PRMT2 için tDMR'lerin vücut sıvısının tipine göre değişen derecelerde metilasyona sahip olduğu bulunmuştur. DACT1 ve USP49 tDMR'ler için metilasyona özgü PCR kullanan ön testler, bu iki belirtecin sperm hücreleri de dahil olmak üzere semen numunelerini tanımlamak için başarıyla kullanılabileceğini göstermiştir (35).

Silva ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada; sperm, tükürük ve kan için spesifik DNA metilasyon kalıpları üreten üç CpG bölgesi tanımlanmıştır. Meni, tükürük ve kan materyallerine spesifik olan DNA metilasyon kalıplarını kullanarak, numunenin türünü tanımlamak için kullanılabilen ZC3H12D (meni), BCAS4 (tükürük) ve cg06379435 (kan) dokuya özgü epigenetik belirteçler geliştirilmiştir. Bu belirteçlerin etkinliğini saptamak için, bu belirteçlerin adli analizlerdeki koşullarını ve sınırlamalarını belirleyen çalışmalar yapılmıştır. Bulunan belirteçlerin insana özgünlük konusunda gayet başarılı olduğu ve düşük konsantrasyonlar için bile tutarlı sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Uygulanan bu yöntem, numuneler ısıyla bozulduğunda ve inhibitörler eklendiğinde de etkili olmuştur (8).

Gauthier ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada, dokuya özgü DNA metilasyonuna dayalı vücut sıvılarının teşhisi için multipleks bir epigenetik yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma için tükürük, kan, vajinal epitel veya meniden gelen DNA'nın kökenini ayırt edebilen bir dizi genetik lokus kullanılmıştır. Belirteçler, BCAS4, CG06379435, VE_8 ve ZC3H12D, birlikte amplifiye edildikten sonra pirosekanslama yoluyla dizilenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda seçilen belirteçlerin her birinin dokuya özgü ayırım yapabildiği ortaya konmuştur. Belirteçler tek bir biyolojik materyal için pozitif sonuç verirken; diğerleri için negatif sonuç verecek şekilde tasarlanabilmiştir. Bununla birlikte, en başta bu çalışmanın amacı olan multipleks yöntem geliştirme konusunda başarıya ulaşamamıştır (36).

2.6.3. Monozigotik ikizlerin birbirinden ayırt edilmesi

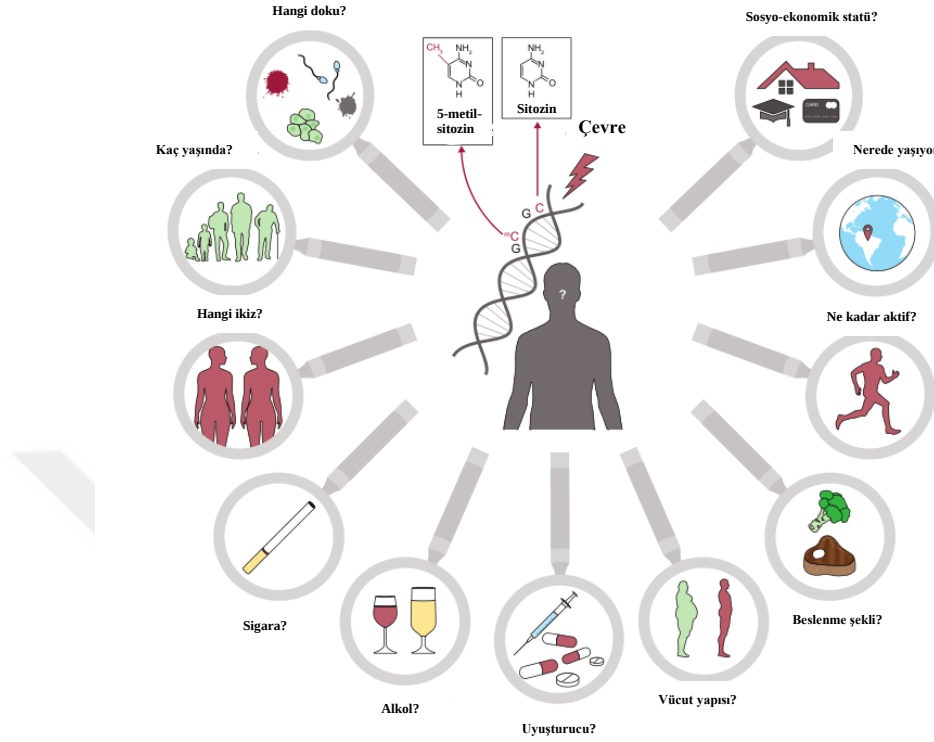
Monozigotik ikiz olan iki şüphelinin ayrımının yapılması gereken suç davalarında, epigenetik belirteç testlerinin kullanılması büyük fayda sağlayabilir. Monozigotik ikizler tek bir döllenmiş yumurtadan geliştikleri için aynı gen dizisine sahiptirler ve bu yüzden DNA dizi analiziyle bu

ikizlerin ayrımının yapılması mümkün değildir. Bununla birlikte, monozigotik ikizler hem lokus-spesifik DNA metilasyonu hem de genomları arasında değişiklik gösteren tüm DNA metilasyonları gibi epigenetik farklılıklar sayesinde teşhis edilebilirler. Bu konuyla ilgili olarak standart tespit metotlarının geliştirilmesi halen devam etmektedir (9).

Xu ve ark. (2015) tarafından, monozigotik ikizlerde LINE-1 elementlerinin (transpozonlar) metilasyon seviyeleri saptanarak, bunların teşhis için kullanımının değerlendirilmesi üzerine bir çalışma yapılmıştır. LINE elementleri, ökaryotik canlıların genomlarında çok fazla sayıda bulunan genetik parçalardır. İnsanların genomu dahilinde 500.000'den fazla LINE bulunmaktadır. Diğer bir deyişle insan genomunun %17'si bu genetik elementlerden oluşur. Bu nedenle de LINE-1'in metilasyon seviyeleri, tüm genomun metilasyon seviyesini temsil edebilecek konumdadır. Yapılan çalışma ile, metilasyon belirteci olarak LINE-1 kullanıldığında çalışmada yer alan monozigotik ikizlerin arasında %12.61 oranında ayrım yapılabildiği bulunmuştur. Bu sonuçlar epigenetik belirteçlerin monozigotik ikizleri teşhis etmede kullanılabileceğini kanıtlar niteliktedir ancak daha yüksek bir ayrım gücü elde edebilmek için diğer metilasyon belirteçlerinin de kullanılması gerekecektir (9).

2.6.4. Epigenetik analizlerle yapılan diğer bazı uygulamalar

İnsan genetik varyasyonu, adli bilimler için önemli bir kaynak oluşturmaya karşın, adli olarak bakıldığında her türlü soruya cevap verememektedir. Bu noktada devreye epigenom girmektedir. Epigenom hem var olan değişmez genom hem de diğer değişkenler arasında bağlantı kurduğu için aracı işlevi görmektedir. Dolayısıyla aksi halde cevaplanamayan sorular, çoğu DNA metilasyonu tabanlı olan epigenetik uygulamalar sayesinde cevap bulmaktadır. Epigenetik uygulamalar sayesinde cevaplanabilen bazı sorular Şekil 16'da gösterilmektedir (37).



Şekil 16: Epigenetik uygulamaların cevap verdiği sorular (37)

Sigara kullanımının sağlığa oldukça zararlı olduğu bilinmesine rağmen günümüzde halen daha birçok insan sigara kullanmaktadır. Bir adli vakanın olay yerinden elde edilen biyolojik materyallerden, donörün sigara alışkanlığı bilgisinin elde edilebiliyor olması, soruşturmanın seyri açısından oldukça önemli olabilir. Literatürden elde edilen bilgiler ışığında, sigara kullanımının DNA hasarına, telomer kısalmasına ve DNA metiltransferaz ekspresyonundan kaynaklı oluşan epigenetik değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (37).

Epigenom çapında sigara kullanımıyla ilişkili DNA metilasyon profillerini belirlemeyi amaçlayan ilk çalışma kan kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonucunda F2RL3 olmak üzere tek bir CpG belirteci bulunmuştur. Daha sonraları aynı amaçla yapılan ve binlerce bireyin örneklem

grubunda yer aldığı çalışmalar sonucunda ise AHRR, ALPP2 , GFI1, GPR15 ve MYO1G dahil olmak üzere birçok gende sigarayla ilişkili çeşitli CpG'ler tanımlanmıştır (37).

Sigara kullanımıyla ilişkili yapılan epigenetik çalışmalarda dikkat edilmesi gereken bir nokta, pasif içiciliktir. Sonuçta bireyin anne karnındayken maternal kullanımdan dolayı sigaraya maruz kalması veya doğumdan sonraki yaşamında da sigara içilen ortamlarda bulunması, bu bireyin epigenomunda sigara kullanımıyla ilişkilendirilen benzer değişiklikleri ortaya çıkaracaktır. Dolayısıyla bu durum gelecek çalışmalarda göz önünde bulundurulmalıdır (37). Sigara kullanımıyla birlikte alkol kullanımı da adli soruşturmalarda önemli bir faktör olabilmektedir. Olaya karışan bireylerin alkol tüketim alışkanlıklarının belirlenmesi soruşturmanın gidişatı için önemli olacaktır. Kan, idrar ve saç materyalinde alkol metabolit tespitine olanak sağlayan toksilojik testler bulunmaktadır ancak bu testler ne sıklıkta ve ne miktarda alkol tüketildiği gibi alışkanlıklara ilişkin sorulara yanıt veremez (37).

Düzenli alkol tüketen bireyler ile alkol tüketmeyen bireyler arasında hem genetik hem de çevresel faktörler nedeniyle farklı DNA metilasyonu profilleri görülmektedir. Kronik alkoliklerde global kandaki metilasyonda önemli bir artış gözlenirken; çeşitli genlerin alkole bağımlı bireylerde farklı şekilde metillendiği gösterilmiştir, ancak bu bulgu diğer çalışmalarda henüz tekrarlanmamıştır. Alkol kullanımıyla ilgili yapılan ilk epigenom çapındaki çalışma sonucunda, alkolik bireylerdeki birçok CpG bölgesinde hipermetilasyon profilleri görülmüştür (37). Sigara kullanımıyla ilgili dikkat edilmesi gereken nokta olarak yukarıda belirtilmiş olan durumlar alkol için de geçerlidir. Alkol ilişkili epigenetik çalışmalar yapılırken, bireyin anne karnındayken maternal kullanıma maruz kalmış olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (37).

Yasadışı madde kullanımı ülkeler arasında değişik oranlarda seyretmekle birlikte, yetişkinler arasında yaygın olarak görülen bir durumdur ve bu nedenle adli vakalara karışmış olan bireyleri

karakterize etmek açısından önemlidir. Esrar, kokain ve amfetaminler yaygın olarak kullanılan yasadışı maddeler arasında yer almaktadır. Bu maddelerin kullanımına bağlı epigenetik değişikliklerle ilgili çoğu çalışma, hayvan modellerinde gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalarda kromatin yapısı ve histon modifikasyonlarına odaklanılmıştır. Madde kullanımına bağlı DNA metilasyon değişiklikleri, son zamanlarda hayvanların beyin bölgelerinde ve sinir hücrelerinde araştırılmıştır. Kronik eroin veya kokain tedavisini takiben fare beyni ve karaciğerinde global metilasyon seviyelerinde farklılıklar görülmezken; metamfetamin bağımlılığını takiben insan beynindeki sonuçlarda çelişki çıkmıştır. Esrar bağımlı bireyler, sigara içenlerde de saptanmış olan, kanda değişmiş CB1 metilasyon profilleri göstermiştir. Yaklaşık 200 eroin bağımlısının yer aldığı bir çalışmada, kanda değişmiş OPRM1 metilasyonuna rastlanmış, ancak bölge spesifik değişikliklerin az olduğu (<%4) ve popülasyon farklılıklarının görüldüğü belirtilmiştir. Şimdiye kadar görülen bu küçük metilasyon farklılıkları, ilişkilendirme çalışmaları için daha fazla sayıda bireyin çalışmalara dahil edilmesi gerektiğini göstermektedir. Epigenetik bağlamdaki değişikliklerin sadece beyinde mi ön görüldüğünü veya bunların kan gibi adli açıdan daha önemli dokularda da saptanıp saptanamadığını belirlemek için ileride yapılacak olan çalışmalara ihtiyaç vardır (37).

Bir bireyin beslenme alışkanlıklarını tahmin etmek, vejetaryan olmak gibi özel durumların varlığında veya coğrafi konum, gelenek ve din gibi faktörlerle ilişkili olabilecek spesifik yiyecekler tüketildiğinde, araştırılan bireyi saptamak açısından oldukça önemli bir yaklaşım olabilmektedir. Bireylerin beslenme alışkanlıklarındaki farklılıklar, vücuda karbonhidrat, protein, yağ, vitaminler ve mineraller dahil olmak üzere makro ve mikro besin maddelerin alımını sağlamaktadır. Örneğin folat ve B vitaminlerini içeren mikro besinlerin, epigenetik süreçte ikincil metil donörleri olarak kilit bir rol oynadığı görülmektedir (37). Beslenme alışkanlıkları ile ilgili epigenom çapındaki ilk

Çalışmalardan biri sonucunda, anne karnındayken kıtlık gibi bir olay yaşamanın, kişinin yaşamı boyunca etkili olacak metilasyon değışikliklerine neden olduğu gösterilmiştir (37). Genel olarak beslenme şekli, değışken kalıpları ve süreçleri içeren karmaşık bir süreçtir. Farklı makro ve mikro besinler arasında karşılıklı ilişkilerin olup olmadığı ve gözlemlenen epigenomik etkilerin belirli bir gıda türü veya besin maddesi için ne kadar benzersiz olduğu henüz bilinmemektedir. Ancak yapılacak olan yeni çalışmalarla birlikte beslenme alışkanlıklarının adli uygulamalarda kullanım potansiyeline sahip olduğu düşünölmektedir (37).

3. Gereç ve Yöntem

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, AR-GE Laboratuvarı ve Adli Toksikoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma için kullanılan ekipman, malzeme ve kitlerin listesi aşağıdaki bölümlerde belirtilmiştir.

3.1. Deneyde Kullanılan Gereçler

3.1.1. Ekipman

- Eppendorf / Brand otomatik pipetler (2.5 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)
- Vorteks karıştırıcı (Weightlab Instruments WN-V2800)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan Bio TDB-100)
- Florometre (Invitrogen Qubit 4-Thermo Fisher)
- Mikrosantrifüj (Unicfuges-5)
- Masa üstü santrifüj (Hettich 320R)
- Buzdolabı (Vestel)
- Derin dondurucu (Delta)
- Evaporatör (HyperVAP HV300)
- Sıvı kromatografisi (Shimadzu Nexera-i LC-2040C)
- Ardışık kütle spektrometresi (Shimadzu LCMS-8045)
- Termal ısı döngüleyici (Techne Genius FGENO5TD)
- Analitik kolon (Restek Raptor Biphenyl 2.7µm 100 x 2.1 mm)
- Analitik hassas terazi (Mettler Toledo XPE205)
- Cam malzemeler (Isolab)

3.1.2. Ticari kitler

- E.Z.N.A.[®] Tissue DNA izolasyon kiti (Omega Bio-Tek)
- Quant-it[™] dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen)
- DNA Degradase Plus[™] (ZymoResearch)
- 5-Methylcytosine & 5-Hydroxymethylcytosine DNA Standard Set (ZymoResearch)

3.1.3. Ticari kit haricinde kullanılan malzemeler

- Etil alkol (%96) (Merck)
- Formik asit (%98-100) (Merck)
- Metanol (%100) (Merck)
- Amonyum format (Sigma-Aldrich)
- Ultra saf su (Milli-Q)

3.1.4. Standart maddeler

- 5-Metil-2'-Deoksisitidin (EtnaLab)
- 5-(Hidroksimetil)- 2'-Deoksisitidin (EtnaLab)
- 2'-Deoksisitidin (EtnaLab)

3.2. Deney Aşaması

Çalışma süreci literatürden elde edilen sistem parametreleri, uygun kolon sıcaklığı ve standart moleküllerin parçalanma iyonları gibi bilgiler kullanılarak LC-MS/MS ile bir yöntem geliştirilmesiyle başladı. Örneklerin toplanmasından sonra DNA izolasyonu ve miktar tayini yapıldı. Tüm örneklerin ve DNA standart setinin hidrolizi gerçekleştirildi. Standart çözeltiler ve

DNA standart set ile ayrı ayrı iki kalibrasyon oluşturuldu. Numunelerin analizi yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

3.2.1. Örneklerin toplanması

Bu çalışma için 01.12.2020 tarihli ve A-23 karar no'lu İ.Ü.-C. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu kararı (EK-1) sonrasında, “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (EK-2)”nu imzalayarak DNA örneklerinin bilimsel çalışmalarda kullanılması için rıza gösteren İ.Ü.-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü öğrencileri ve gönüllülerinden oluşan 14 kişiden (n= 9 kadın, n=5 erkek) 14 adet kan ve 14 adet tükürük örneği olmak üzere toplamda 28 örnek toplandı. Örneklem grubundaki kişiler sigara kullanmama durumlarına dikkat edilerek çalışmaya dahil edildi. Ayrıca bu kişilerin aralarında akrabalık ilişkisi bulunmamasına dikkat edildi. Çalışma için yaş dağılımı, 45 yaşın altında 7 sağlıklı birey ve 45 yaşın üstünde 7 sağlıklı bireyden oluşan iki grup olarak belirlendi. Örneklem grubu içerisinde minimum yaş 24; maksimum yaş 58 ve medyan 44.5 olarak belirlendi. Örnekler cinsiyet durumuna göre, kadınlar için “A-XX-sıra numarası”, erkekler için ise “A-XY-sıra numarası” olarak kodlandı. Gönüllülerden, örnek alımından en az 8 saat önceki süreç boyunca yemek ve içmekten kaçınmaları ve tükürük numuneleri alınmadan önce ağızlarını durulamaları istendi. Toplam 14 gönüllüden, enstitü hemşiresi tarafından K3 Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) içeren hemogram tüplerine 2 mL periferik kan örneği alındı. Tükürük örnekleri ise 15 mL'lik falkon tüpler içerisine, miktarları 5mL olacak şekilde alındı. Numunelerin hepsi kısa süreli kullanım için +4°C, uzun süreli kullanım için -20°C'ye kaldırıldı. Sonrasında her bir örnek için DNA izolasyonu ve miktar tayini gerçekleştirildi, örneklerin hidrolizi yapıldı. Analiz öncesinde LC-MS/MS ile yöntem geliştirildi. Sırasıyla standart çözeltiler ve DNA standart set karışımı ile kalibrasyon çalışmaları yapıldı. Son olarak ise numunelerin analizi gerçekleştirildi.

3.2.2. DNA izolasyonu ve miktar tayini

Çalışmamız için toplanan örneklerin DNA izolasyonu, E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek) kullanılarak gerçekleştirildi. Kullanılan bu kit tüm kan, bukkal svap, tükürük ve diğer çeşitli vücut sıvıları olmak üzere birçok biyolojik kaynaktan DNA izolasyonu gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. İzolasyon için tercih edilen bu yöntem, belirli optimal koşullar altında numune içerisindeki DNA'nın spesifik ancak geri dönüşümlü olarak spin kolona bağlanması ve böylece protein ve diğer maddelerin uzaklaştırılması temeline dayanmaktadır. Son aşamada elüsyon tamponu kullanılarak spin kolona bağlanmış halde bulunan DNA, filtreden geri elde edilir.

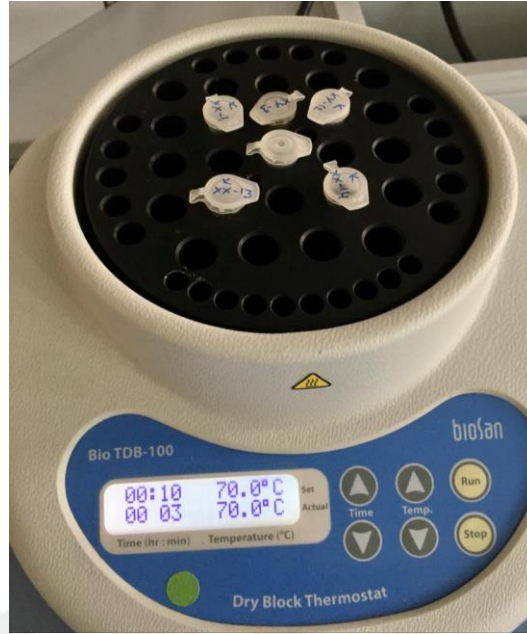
İzole edilen DNA numunelerinin miktar tayini için Quant-itTM dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen) kiti kullanıldı ve Qubit 4 florometre ile (Thermo Fisher) ölçüm gerçekleştirildi. Bu florometrik yöntem sayesinde, numunelerin miktar tayini hassas ve doğru bir şekilde yapılabilmektedir. İzolasyon ve miktar tayini için izlenen protokoller aşağıda ayrıntılı bir şekilde açıklandı.

3.2.2.1. E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek) ile kan/tükürük örneklerinden DNA izolasyonu

1. Isıtıcı blok 70°C'ye ayarlandı.
2. Kit oda sıcaklığında (25°C) bulunduruldu.
3. 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne 250 µL EDTA'lı kan/tükürük numunesi eklendi. (Örnek 250 µL'den az ise, PBS ile tamamlanır.)
4. Tüpe 25 µL Proteinaz K eklendi.
5. 250 µL BL tamponu eklendi ve 15 sn. vortekslendi.
6. 70°C'de 10 dk. inkübe edildi.

7. Üzerine 250 µL Etanol (%96-100) eklendi ve 15 sn. vortekslendi.
8. Mikrosantrifüj tüpündeki lizat HiBind® mini spin kolona aktarıldı.
9. 12.000 rpm' de 1 dk. santrifüj edildi. (Tüpteki lizat bitene kadar santrifüj aşaması tekrar edilir.)
10. Filtrat içeren tüp atıldı. Yeni toplama tüpü eklendi.
11. Kolona 500 µL HBC tamponu eklendi.
12. 14.000 rpm' de 30 sn. santrifüj edildi. Altındaki toplama tüpü atılıp, yeni toplama tüpü toplandı.
13. Kolona 700 µL DNA yıkama tamponu eklendi.
14. 14.000 rpm' de 30 sn. santrifüj edildi. Altındaki filtrat döküldükten sonra toplama tüpü kurulanıp tekrar kullanıldı.
15. Kolona 700 µL DNA yıkama tamponu eklendi.
16. 14.000 rpm' de 30 sn. santrifüj edildi. Altındaki filtrat döküldükten sonra toplama tüpü kurulanıp tekrar kullanıldı.
17. Kolon boş olarak, 14.000 rpm' de 2 dk. santrifüj edildi.
18. HiBind® mini spin kolonu, 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı.
19. 100 µL Elüsyon tamponu eklendi. (Elüsyon tamponu verimi artırmak için 70°C' de ısıtılmış olmalıdır.)
20. 2 dk. oda sıcaklığında (25°C) bekletildi.
21. 14.000 rpm' de 1 dk. santrifüj edildi.
22. Spin kolon atılıp, izolatlar parafilmelendi. Uzun süreli saklama için -20°C' ye kaldırıldı.

Örneklerden DNA izolasyonu prosedürü gerçekleştirilirken kullanılan kuru ısıtıcı blok Şekil 17'de, mikrosantrifüj ise Şekil 18'de gösterilmektedir.



Şekil 17: Kuru ısıtıcı blok (Biosan Bio TDB-100)



Şekil 18: Mikrosantrifüj (Unicfuges-5)

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

1. Qubit® 4.0 florometrenin kalibrasyonunu yapmak amacıyla 2 adet standart kullanıldı.
2. Her bir örnek için Quant-it™ dsDNA HS tamponu çözeltisinden 199 µL ve üzerine 1 µL Quant-it™ ayracı eklenip çalışma çözeltisi hazırlandı.
3. Hazırlanan karışım çözeltisinden standartlar için 190 µL alınıp, üzerine S1(Standart 1) ve S2 (Standart 2) çözeltilerinden 10 µL eklendi.
4. Örneklerin analizi için karışım çözeltisinden 199 µL alındı ve üzerine 1 µL DNA örneği eklendi. Tüpler birkaç sn. vortekslendi.
5. Vortekslenen tüpler oda sıcaklığında 2 dakika (dk) inkübe edildi.
6. Standart 1 ve Standart 2 sırasıyla analiz edilerek florometrenin kalibrasyonu yapıldı.
7. Örnekler florometreye yerleştirilerek ölçüm gerçekleştirildi.
8. DNA miktarları otomatik olarak hesaplandı.

Prosedürde yer alan basamaklarını gerçekleştirmek için kullanılan vorteks karıştırıcı Şekil 19'da gösterilmektedir.



Şekil 19: Vorteks karıştırıcı (Weightlab Instruments WN-V2800)

3.2.3. Hidroliz aşaması

1. DNA örnekleri 20 ng/ μ L'ye seyreltildi.
2. 95°C'de 3 dk denatürasyon ve sonrasında buz alimünyum blok üzerinde soğutma yapıldı
3. 10X DNA degradase plus tamponu, DNA degradase plus ve steril distile su sırasıyla 2.5/1/1.5 μ L oranlarında karıştırılarak çözelti hazırlandı.
4. DNA hidrolizi, 5 ünite (U) (1 μ L) enzim içeren 5 μ L hacmindeki çözeltinin ilavesiyle 25 μ L total reaksiyon hacmiyle gerçekleştirildi. 20 ng/ μ L konsantrasyonda DNA içeren bir numune için hazırlanması gereken hidroliz reaksiyonunun planı Tablo II'de verilmiştir.

Tablo II. Hidroliz için gerekli olan bileşenlerin hazırlanması

Bileşen	Bir örnek başına bileşen miktarı (μ L)
DNA örneği (20 ng/ μ L)	2 μ L
10X DNA Degradase Plus™ tamponu	2.5 μ L
DNA Degradase Plus™ (5 ünite/ μ L)	1 μ L
Deiyonize su (ddH ₂ O)	19.5 μ L
Total Reaksiyon Hacmi	25 μ L

5. Hazırlanan reaksiyon tüpleri aşağı-yukarı ve vurma hareketleriyle karıştırıldı.
6. Tüpler 37°C'de inkübe edildi.
7. 2 saat inkübasyon sonrasında reaksiyon tüpleri, enzimi inaktive etmek için 30 dk boyunca 70°C'de ısıtıldı. Hidroliz için termal ısı döngüleyicide takip edilen sıcaklık programı Tablo III'de verilmiştir.

Hidroliz basamaklarındaki işlemleri gerçekleştirmek için kullanılan termal ısı döngüleyici Şekil 20'de gösterilmektedir.



Şekil 20: Termal ısıt döngüleyici (Techne Genius FGENO5TD)

Tablo III. Hidroliz için termal ısıt döngüleyici sıcaklık programı

Sıcaklık	Süre (dakika)
95°C	3 dk
37°C	120 dk
70°C	30 dk

3.2.4. Standart maddelerin ana ve ara stok çözeltilerinin hazırlanması

LC-MS/MS sisteminde yapılacak analizler için, ticari referans standart maddeler mutlak metanol (MeOH) içerisinde çözülerek 5-metil-2'-deoksisitidin (5mdC), 5-(hidroksimetil)-2'-

deoksisitidin (5hmdC) ve 2'-deoksisitidin (dC) stok çözeltileri hazırlandı. İlk basamakta her standart maddeden hassas terazide 1 mg tartılıp, mikropipet kullanılarak 1 mL MeOH ile tamamlanarak vial içerisinde 1000 µg/mL konsantrasyonda ana stoklar hazırlandı.

İkinci basamak olarak hazırlanmış her bir ana stoktan 10 µL alınıp, toplamda 10 mL çözelti olacak şekilde 9990 µL MeOH ile tamamlanarak 1 µg/mL konsantrasyonda ara stoklar elde edildi.

En son olarak 1 µg/mL ara stoktan 100 µL alınıp, 900 µL MeOH ile tamamlanarak, iyon tanımlama için gerekli olan 100 ng/mL konsantrasyonda çözeltiler elde edildi.

3.2.5. Stok çözeltiler kullanılarak standart maddelerin iyon belirleme çalışmalarının yapılması

Bir önceki aşamada hazırlanmış olan stok çözeltiler, analitik kolonu çıkarılmış olan LC-MS/MS sistemine tek tek yüklenerek iyon belirleme çalışmaları yapıldı. Mobil faz olarak [formik asit (FA) (%98-100) + su] (A) / [metanol (%100) + formik asit (%98-100)] (B) kullanıldı. 5hmdC, 5mdC ve dC stok çözeltileri farklı enjeksiyon hacimleriyle birlikte analiz edilerek, bu maddelerin precursor (öncül) iyonları bulundu. Precursor iyonları bulunduktan sonra çözeltilere -10 ve -40 arasında değişen voltaj değerleri uygulanarak maddelerin parçalanması sonucu ortaya çıkan product (ürün) iyonlar incelendi.

Analiz sonucu yüksek yanıt veren voltaj değerleri dikkate alınarak product iyonlar belirlendi. Analizin son basamağı olarak ise çoklu reaksiyon izleme (MRM) işlemi yapıldı. Bu işlemde yüksek duyarlılıkta kantitasyon gerçekleştirmek amacıyla maddelere özgü ve daha önceki basamaklarda tanımlanmış olan iyonlar izlendi ve böylece özgüllük artırılmış oldu.

3.2.6. Referans standart maddeler ile MeOH kalibrasyonu oluşturulması

İyon belirleme çalışmaları sonrasında referans standart maddeler ile, blank haricinde 12 farklı kalibrasyon noktası belirlenerek kalibrasyon çalışmaları yapıldı. Ana stoğu 125 ng/mL olarak bulunan iç standart özeltisi Ephedrine-d₃, total karışım hacmindeki konsantrasyonu 10 ng/mL olacak şekilde hesaplandı. Hesaplamalar dahilinde blank dahil her bir kalibrasyon noktası için hazırlanan çözeltiye 80 µL IS eklendi. Blank çözeltisine yalnızca IS ve MeOH eklendi. Daha sonrasında referans standart maddeler ile bir standart karışım hazırlandı. Belirlenen konsantrasyon değerleri dikkate alınarak her bir çözelti için alınması gereken standart karışım miktarı hesaplandı. Belirlenen miktarlarda standart karışım eklendikten sonra kalibrasyon çözeltisinin total hacmi 1000 µL olacak şekilde MeOH ile tamamlama yapıldı. Her bir kalibrasyon noktası için gerekli bileşenlerin nasıl hazırlandığı Tablo IV’de yer almaktadır.

Tablo IV. MeOH kalibrasyonu için gerekli bileşenlerin hazırlanması

Kalibrasyon Noktaları	Hazırlama Yöntemi
0. Nokta (Blank)	80 µL IS + 920 µL MeOH
1. Nokta (0.005 ng/mL)	80 µL IS + 919.5 µL MeOH +0.5 µL (10 ng/mL) std karışım
2. Nokta (0.01 ng/mL)	80 µL IS + 919µL MeOH +1 µL (10 ng/mL) std karışım
3. Nokta (0.02 ng/mL)	80 µL IS + 918 µL MeOH +2 µL (10 ng/mL) std karışım
4. Nokta (0.05 ng/mL)	80 µL IS + 915 µL MeOH +5 µL (10 ng/mL) std karışım
5. Nokta (0.1 ng/mL)	80 µL IS + 910µL MeOH +10 µL (10 ng/mL) std karışım
6. Nokta (0.2 ng/mL)	80 µL IS + 900µL MeOH +20 µL (10 ng/mL) std karışım
7. Nokta (0.5 ng/mL)	80 µL IS + 870µL MeOH +50 µL (10 ng/mL) std karışım
8. Nokta (1 ng/mL)	80 µL IS + 820 µL MeOH +100 µL (10 ng/mL) std karışım
9. Nokta (2 ng/mL)	80 µL IS + 720 µL MeOH +200 µL (10 ng/mL) std karışım
10. Nokta (5 ng/mL)	80 µL IS + 915 µL MeOH + 5µL (1 µg/mL) std karışım
11. Nokta (10 ng/mL)	80 µL IS + 910 µL MeOH + 10µL (1 µg/mL) std karışım
12. Nokta (20 ng/mL)	80 µL IS + 900 µL MeOH + 20µL (1 µg/mL) std karışım

*std: standart

3.2.7. DNA standart set ile kalibrasyon oluşturulması

Referans standart maddelerin LC-MS/MS sistemindeki iyon tanımlama çalışmaları yapıldıktan sonra %100'lük DNA standart set ile kalibrasyon çalışmaları yapıldı. DNA standart set, her biri 897 baz çifti uzunluğunda lineer çift zincirli DNA (dsDNA) içeren metilsitozin, hidroksimetilsitozin ve sitozin DNA standartlarından oluşmaktadır. Bu standartların hepsi aynı baz dizilimine sahiptir. Aralarındaki tek fark, sitozin DNA standartının %100'lük oranda modifiye edilmemiş sitozinleri; metilsitozin DNA standartının %100'lük oranda 5-metilsitozinleri ve hidroksimetilsitozinin ise %100'lük oranda 5-hidroksimetilsitozinleri içeriyor olmasıdır. Bu üç standartın her biri 50 ng/ μ L konsantrasyonda ve 40 μ L hacimdedir.

DNA standart setlerinin LC-MS/MS sistemine tanıtılabilmesi için öncelikle her bir sete ticari kit kullanılarak hidroliz işlemi uygulandı. Setlerin her biri ayrı olarak 3 vialde hidroliz edildi. Son DNA konsantrasyonu 20 ng/ μ L ve total hidroliz hacmi 25 μ L olacak şekilde her bir setten alınması gereken örnek miktarı 10 μ L olarak belirlendi.

Hidrolizi gerçekleştirmek için satın aldığımız ticari kitin üreticisinin protokolüne göre her bir reaksiyon başına kullanılması gereken enzim ve tampon miktarı ile son hacmin 25 μ L olacağı göz önünde bulundurularak, her bir standartın hidroliz çözeltisi hazırlandı (Tablo V) ve hidroliz daha önce bahsedilmiş olan basamaklar dahilinde gerçekleştirildi (Bkz. 3.2.3).

Tablo V. Standart setlerin hidrolizi için gerekli olan bileşenlerin hazırlanması

Bileşen	Bileşen Miktarı (µL)
Standart DNA (5-mdC, 5-hmdC, dC)	10 µL
DNA Degradase Plus™	1 µL
10X DNA Degradase Plus™ tamponu	2.5 µL
ddH ₂ O	11.5 µL
Total hidroliz hacmi	25 µL

Hazırlanan hidroliz çözeltileri 2 saat boyunca 37°C’de inkübe edildikten sonra enzimin inaktive olması için 30 dk 70°C sıcaklıkta bekletildi. Hidroliz işlemleri tamamlanan üç standartın her biri 5 µL iç standart (Ephedrine-d3) ve 7.5 µL distile su ilavesiyle LC-MS/MS sistemindeki analiz için hazırlandı. Analiz sonrası her bir standart DNA’da görülmesi gereken spesifik maddelerin pikleri elde edildi (metilasyon için 5-mdC; OHmetilasyon için 5-hmdC; modifiye edilmemiş sitozin için dC).

Hidrolizi tamamlanan DNA standart setlerinden bir karışım elde edilerek %5’lik DNA karışım seti hazırlandı. %5’lik DNA karışım seti hazırlamak için her bir standarttan 1.25 µL alındı, 5 µL IS eklendi ve total hacim 25 µL olacak şekilde 16.25 µL distile su ile tamamlandı.

%5’lik DNA karışım setin analizinden elde edilen sonuçlara göre kalibrasyon için seçilmesi gereken konsantrasyon noktaları belirlendi ve %0.2-0.3-0.5-1-2-3-5 noktalarında kalibrasyon çalışması yapıldı. Belirlenen yüzdelerde hazırlanan DNA standart karışım setlerinin yanında, yalnızca iç standart (IS) içeren blank çözelti de analiz edilerek kalibrasyon için kullanıldı (Tablo VI). Blank çözelti 5 µL IS ve 20 µL distile su kullanılarak 25 µL total hacimde hazırlandı.

Tablo VI. DNA standart set kalibrasyonu için gerekli bileşenlerin hazırlanması

Kalibrasyon Noktaları	Hazırlama Yöntemi
0. Nokta (Blank)	5 µL IS + 20 µL distile su
1. Nokta (%0.2)	%5'lik karışım çözeltisinden 1 µL + 5 µL IS + 19 µL distile su
2. Nokta (%0.3)	%5'lik karışım çözeltisinden 1.5 µL + 5 µL IS + 18.5 µL distile su
3. Nokta (%0.5)	%5'lik karışım çözeltisinden 2.5 µL + 5 µL IS + 17.5 µL distile su
4. Nokta (%1)	%5'lik karışım çözeltisinden 5 µL + 5 µL IS + 15 µL distile su
5. Nokta (%2)	%5'lik karışım çözeltisinden 10 µL + 5 µL IS + 10 µL distile su
6. Nokta (%3)	%5'lik karışım çözeltisinden 15 µL + 5 µL IS + 5 µL distile su
7. Nokta (%5)	her bir standarttan 1.25 µL (3.75 µL) + 5 µL IS + 16.25 µL distile su

3.2.8. Doğrusallık ve çalışma aralığı

LC-MS/MS sisteminde yürütülecek doğrusallık çalışmaları kapsamında MeOH kalibrasyonunda 0.05, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 ve 20 ng/mL olmak üzere her bir analit için 12 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanarak, sadece iç standart içeren kör numunelerle birlikte 6 tekrarlı olacak şekilde ölçüm yapıldı. DNA standart set ile yapılan kalibrasyonda %0.2, 0.3, 0.5, 1, 2, 3 ve 5 olacak şekilde 7 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanarak, sadece iç standart içeren kör numunelerle birlikte 3 tekrarlı olacak şekilde ölçüm yapıldı. İki kalibrasyon eğrisi için de doğrunun denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplandı. Korelasyon katsayısı için ölçüt ≥ 0.99 olarak kabul edildi.

3.2.9. Seçicilik

LC-MS/MS sisteminde yürütülecek seçicilik çalışmaları için sadece MeOH içeren örnek ile metanol içerisinde çözdürülen dC, hmdC ve mdC ara stok çözeltilerinin pikleri karşılaştırıldı. Bu sayede çözücü kaynaklı bir girişimin olup olmadığı değerlendirildi.

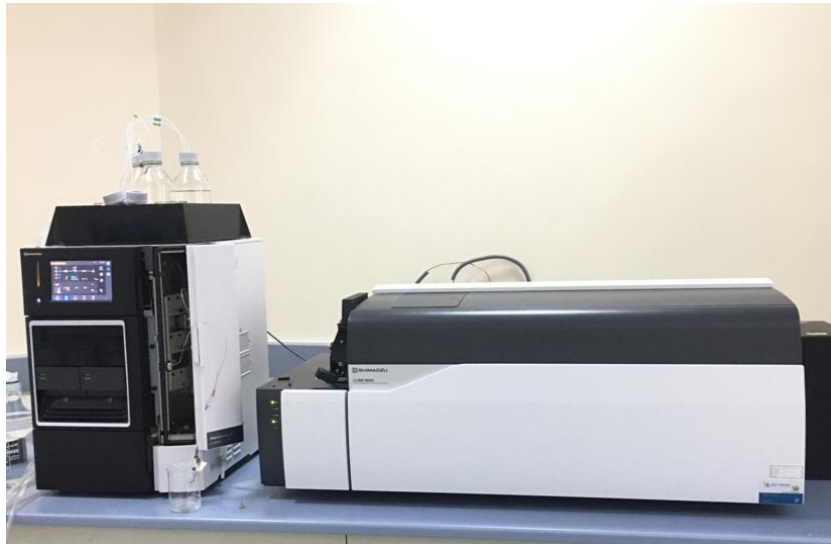
3.2.10. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ)

LC-MS/MS sisteminde geliştirilecek yöntemin tespit ve tayin limiti çalışmaları için MeOH ve DNA setleri ile oluşturulan kalibrasyonda belirlenen doğrusal aralığın en düşük noktası ve daha düşük limitleri analiz edildi. Sinyal/gürültü seviyeleri izlenerek en düşük konsantrasyonlarda analiz yapıldı (n=5).

Ölçüm sonuçları sonrası sinyal/gürültü ile tespit ve tayin limiti hesaplama formüllerinden yararlanılarak hesaplama yapıldı. TURKLAB Rehber 01'e sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon LOD, 10 olduğu konsantrasyon LOQ olarak kabul edildi (68).

3.2.11. Kan ve tükürük numunelerinin LC-MS/MS ile analizi

DNA numuneleri LC-MS/MS sistemi ile analiz edildi. Kısaca bahsetmek gerekirse, E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek) ile daha önce bahsedilen basamaklarla izole edilen DNA örnekleri DNA Degradase Plus™ (ZymoResearch) kiti ile hidroliz edildi. Hidroliz sonrası her bir örneğe vialler içerisinde IS (Ephedrine-d3) ve ddH₂O eklenerek, örnekler LC-MS/MS analizi için hazır hale getirildi (Tablo VII). Analiz için kullanılan LC-MS/MS sistemi Şekil 21'de gösterilmektedir. Örneklerin hazırlanması süreci boyunca gün ışığına maruziyetten kaçınıldı ve hazırlanan örnekler kısa süreli kullanım için +4°C'de; uzun süreli kullanım için ise -20°C'de muhafaza edildi.



Şekil 21: LC-MS/MS sistemi (Shimadzu LCMS-8045)

Tablo VII. LC-MS/MS sistemindeki analiz için gerekli bileşenlerin hazırlanması

Bileşen	Bileşen Miktarı (µL)
Hidrolize DNA örneği	12.5 µL
İç standart (Ephedrine-d3)	5 µL (10 ng/mL)
ddH ₂ O	7.5 µL
Total vial hacmi	25 µL

3.2.12. LC-MS/MS analiz parametreleri

Çalışmada Shimadzu LC-MS/MS 8045 marka sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometresi sistemi kullanıldı. LC-MS/MS analizi için Raptor Biphenyl 2.7µm 100 x 2.1 mm (Restek) LC kolonu kullanıldı. Kromatografik sistem özellikleri Tablo VIII’de, sıvı kromatografi sisteminin akış programı ise Tablo IX’da verildiği gibidir. Analiz pozitif ESI modunda gerçekleştirildi ve MRM yöntemi kullanıldı. Bütün örnekler birer kez hidroliz edildi ve sonrasında sistemde üçer kez

analiz edildi. Numune hazırlama ve analiz sırasındaki olası hataları ortaya çıkarmak için %100'lük DNA standartları da örneklerle birlikte analiz edildi. Her bir örnek hem MeOH hem DNA matriksi ile geliştirilen kantitatif yöntemde ayrı ayrı analiz edildi.

Tablo VIII. Kromatografik sistem özellikleri

Mobil faz A	%0.1 FA ve 2mM Amonyum Format içeren ultra saf su (USS)
Mobil faz B	%0.1 FA ve 2mM Amonyum Format içeren MEOH
Analiz süresi (dk)	5
Akış hızı (mL/dk)	0.35
Enjeksiyon hacmi (µL)	2
Kolon fırını sıcaklığı (°C)	50
Kolon	Raptor Biphenyl 2.7µm 100 x 2.1 mm (Restek)

Tablo IX. Sıvı kromatografi sisteminin akış programı

Dakika	Akış (mL/dk)	Mobil Faz B (%)
0.00	0.35	10
0.50	0.35	40
0.80	0.35	60
1.00	0.35	80
2.00	0.35	100
2.01	0.35	10
2.02	0.3	10
4.99	0.35	10

3.2.13. Verilerin analizi ve sonuçların değerlendirilmesi

LC-MS/MS sistemindeki tüm verilerin analizi LabSolutions versiyon 5.109 yazılımı ile, istatistiksel analizler ise Microsoft Excel (Sürüm 2204) programı ile gerçekleştirildi. Gerçek örneklerin MeOH ve DNA matriksinde gerçekleştirilen kalibrasyonlar ile analizi sonrasında aşağıda gösterilen Denklem 1-2 dahilinde yüzde olarak DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon hesaplaması yapıldı (33,65). Daha sonra her bir matriks ve biyolojik materyal arasında anlamlı bir farklılığın olup olmadığını görmek için, elde edilen sonuçlara *Student's t-test* uygulandı. Yaş grupları arasındaki ilişki de yine *t-test* kullanılarak incelendi. Uygulanan testler %95 güven aralığında gerçekleştirildi. Yapılan *t-test* sonucunda elde edilen p değerinin 0,05'ten küçük olması karşılaştırılan gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu; değer 0,05'ten büyük olması ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı şeklinde yorumlandı.

$$\% \text{Metilasyon} = \left(\frac{5\text{mdC pik alanı}}{5\text{mdC} + 5\text{hmdC} + \text{dC pik alanları}} \right) \times 100$$

Denklem 1: %metilasyon hesaplama formülü (33,65)

$$\% \text{Hidroksimetilasyon} = \left(\frac{5\text{hmdC pik alanı}}{5\text{mdC} + 5\text{hmdC} + \text{dC pik alanları}} \right) \times 100$$

Denklem 2: %hidroksimetilasyon hesaplama formülü (33,65)

4. Bulgular

45 yaşın altında 7 ve 45 yaşın üstünde 7 olmak üzere toplam 14 sağlıklı bireyin (n=9 kadın, n=5 erkek) dahil olduğu çalışmamızda, örneklem grubunun yaş ortalaması 42.9'dur (24-58 yaş aralığında). Sigara kullanmadıkları bilinen ve aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan bu 14 bireyin kan ve tükürük örnekleri toplanarak çalışmaya dahil edildi.

4.1. Örneklerin DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

E.Z.N.A. ® Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek) izolasyon kiti ile tükürük örneklerinden izole edilen DNA'nın ortalama konsantrasyonu 43.4 ng/μL'dir (13-200 ng/μL arasında). Tablo X'da tükürük örneklerinden elde edilen DNA konsantrasyonları gösterilmektedir.

Tablo X. Katılımcıların tükürük örneklerinden elde edilen DNA miktarları

Örnek sırası	Örnek kodu	Yaş	DNA miktarı (ng/μL)	Örnek sırası	Örnek kodu	Yaş	DNA miktarı (ng/μL)
1	A-XX-1	24	15 ng/μL	8	A-XX-8	48	15.6 ng/μL
2	A-XY-2	33	13 ng/μL	9	A-XX-9	48	30.2 ng/μL
3	A-XY-3	30	55.6 ng/μL	10	A-XX-10	51	30 ng/μL
4	A-XX-4	33	57.2 ng/μL	11	A-XY-11	54	63.4 ng/μL
5	A-XX-5	29	17.7 ng/μL	12	A-XY-12	56	21.2 ng/μL
6	A-XY-6	39	200 ng/μL	13	A-XX-13	56	25.6 ng/μL
7	A-XX-7	41	38.4 ng/μL	14	A-XX-14	58	25.2 ng/μL

Aynı kit kullanılarak periferik kan örneklerinden izole edilen DNA'nın ortalama konsantrasyonu ise 39.9 ng/μL'dir (16.5-70.6 ng/μL arasında). Tablo XI'de kan örneklerinden elde

edilen DNA konsantrasyonları gösterilmektedir. LC-MS/MS sistemindeki analiz öncesi gerçekleştirilen hidroliz aşamasında örnekler 20 ng/ μ L'ye seyreltilerek kullanıldı.

Tablo XI. Katılımcıların kan örneklerinden elde edilen DNA miktarları

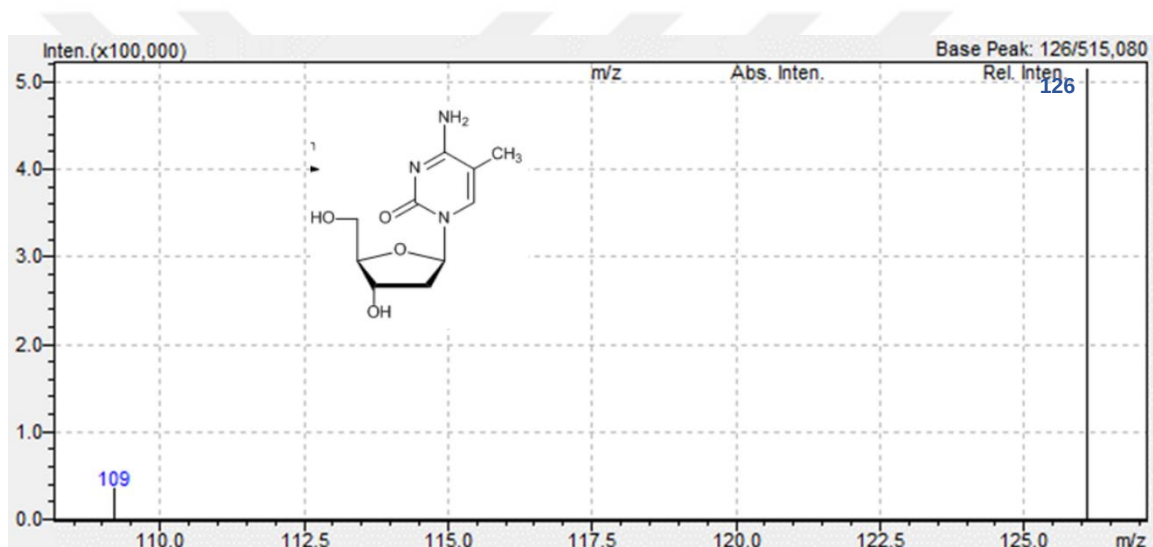
Örnek sırası	Örnek kodu	Yaş	DNA miktarı (ng/ μ L)	Örnek sırası	Örnek kodu	Yaş	DNA miktarı (ng/ μ L)
1	A-XX-1	24	16.5 ng/ μ L	8	A-XX-8	48	51.8 ng/ μ L
2	A-XY-2	33	76.2 ng/ μ L	9	A-XX-9	48	70.6 ng/ μ L
3	A-XY-3	30	23 ng/ μ L	10	A-XX-10	51	30.4 ng/ μ L
4	A-XX-4	33	51.6 ng/ μ L	11	A-XY-11	54	27 ng/ μ L
5	A-XX-5	29	29.8 ng/ μ L	12	A-XY-12	56	29.8 ng/ μ L
6	A-XY-6	39	43 ng/ μ L	13	A-XX-13	56	5.68 ng/ μ L
7	A-XX-7	41	22.6 ng/ μ L	14	A-XX-14	58	32 ng/ μ L

4.2. 5-mdC, 5-hmdC ve dC'nin İyon Belirleme Çalışmaları

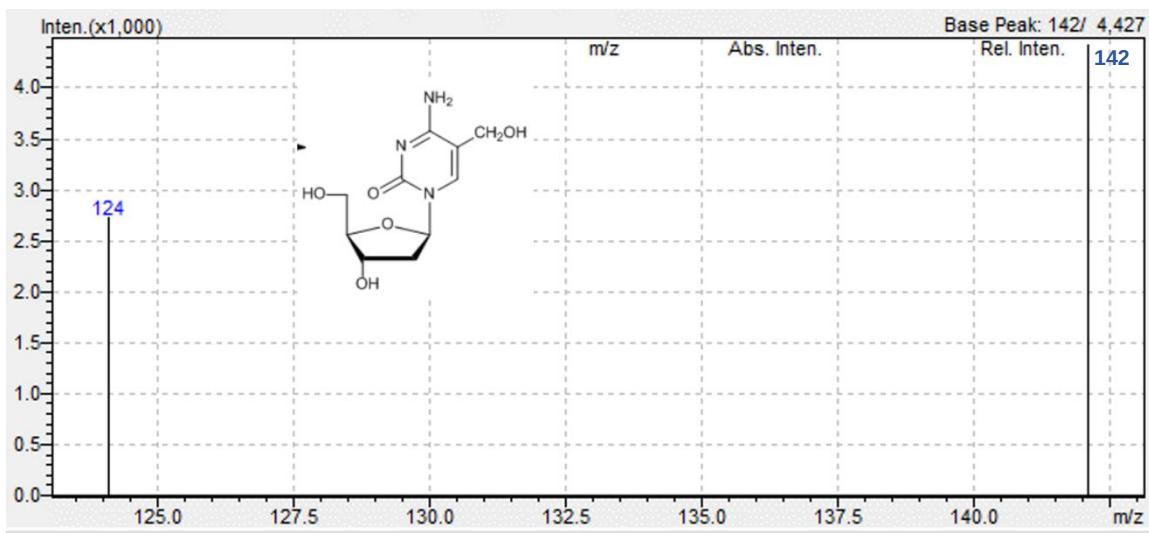
Ara stokları hazırlanan standart maddelerin ve iç standartın LC-MS/MS sistemindeki iyon belirleme çalışmaları sonucu analitlerin öncül (precursor) ve ürün (product) iyonları bulundu ve MRM çalışmaları yapıldı. İyon belirleme çalışmalarının sonuçları 5-mdC için Tablo XII'de; 5-hmdC için Tablo XIII'de; dC için Tablo XIV'de ve IS için Tablo XV'de gösterildiği gibidir. Şekil 22, 23, 24 ve 25'de ise product (ürün) iyon taraması sonucu elde edilen spektrumlar gösterilmektedir.

Tablo XII. 5-metil-2'-deoksisitidin ardışık kütle spektrometresi koşulları

Ch	Precursor m/z	Product m/z	Dwell Time (msn)	Q1 Pre Bias (V)	CE	Q3 Pre Bias (V)
Ch1	242.2000	126.1000	61.0	-10.0	-10.0	-22.0
Ch2	242.2000	109.2000	61.0	-10.0	-37.0	-20.0

**Şekil 22:** 5-metil-2'-deoksisitidin kütle spektrumu**Tablo XIII.** 2'-deoksi-5-(hidroksimetil)sitidin ardışık kütle spektrometresi koşulları

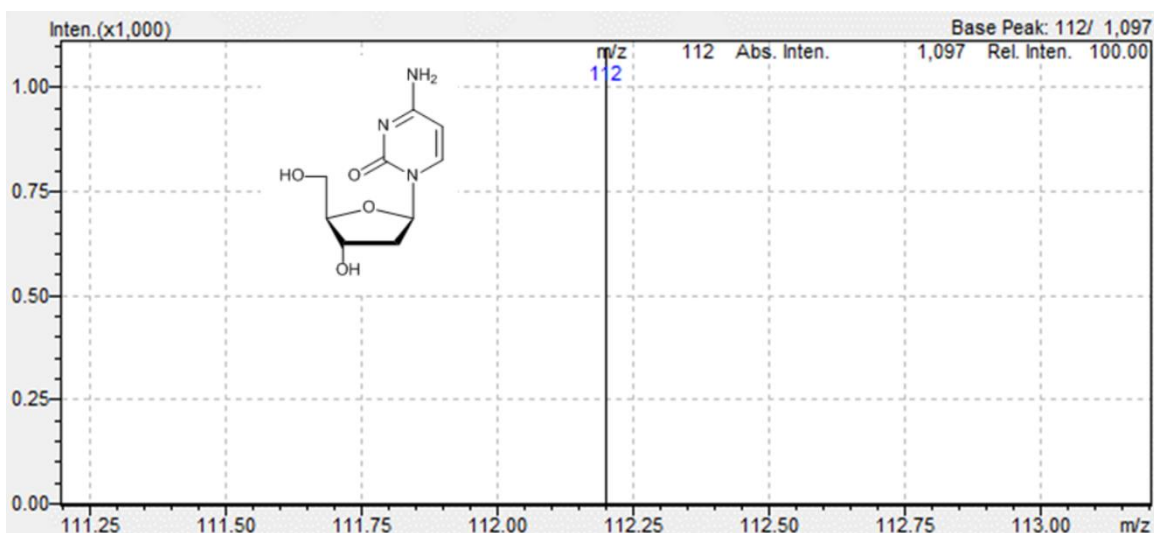
Ch	Precursor m/z	Product m/z	Dwell Time (msn)	Q1 Pre Bias (V)	CE	Q3 Pre Bias (V)
Ch1	258.2000	142.1000	61.0	-14.0	-10.0	-25.0
Ch2	258.2000	124.2000	61.0	-20.0	-21.0	-23.0



Şekil 23: 2'-deoksi-5-(hidroksimetil)sitidin kütle spektrumu

Tablo XIV. 2-deoksisitidin ardışık kütle spektrometresi koşulları

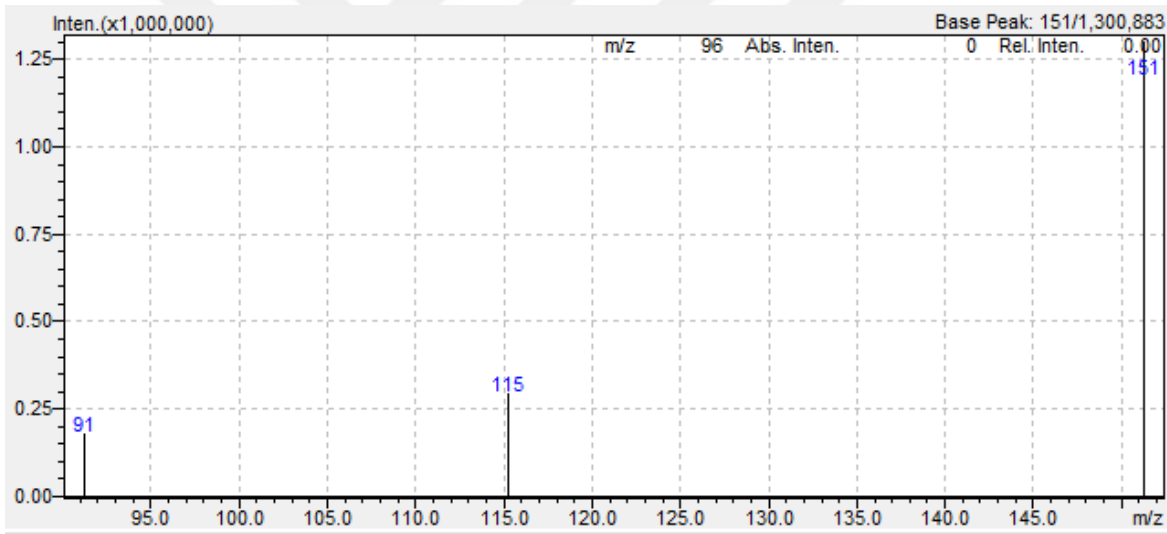
Ch	Precursor m/z	Product m/z	Dwell Time (msn)	Q1 Pre Bias (V)	CE	Q3 Pre Bias (V)
Ch1	228.3000	112.2000	124.0	-15.0	-10.0	-21.0



Şekil 24: 2-deoksisitidin kütle spektrumu

Tablo XV. IS (ephedrine-d3) ardışık kütle spektrometresi koşulları

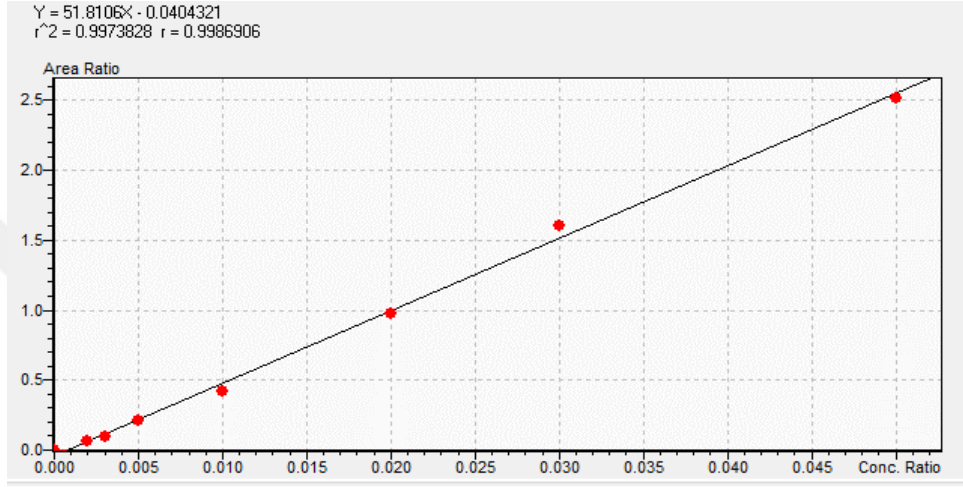
Ch	Precursor m/z	Product m/z	Dwell Time (msn)	Q1 Pre Bias (V)	CE	Q3 Pre Bias (V)
Ch1	169.0000	151.3000	40.0	-15.0	-14.0	-10.0
Ch2	169.0000	115.2000	40.0	-14.0	-26.0	-21.0
Ch3	169.0000	91.2000	40.0	-14.0	-35.0	-17.0

**Şekil 25:** IS (ephedrine-d3) kütle spektrumu

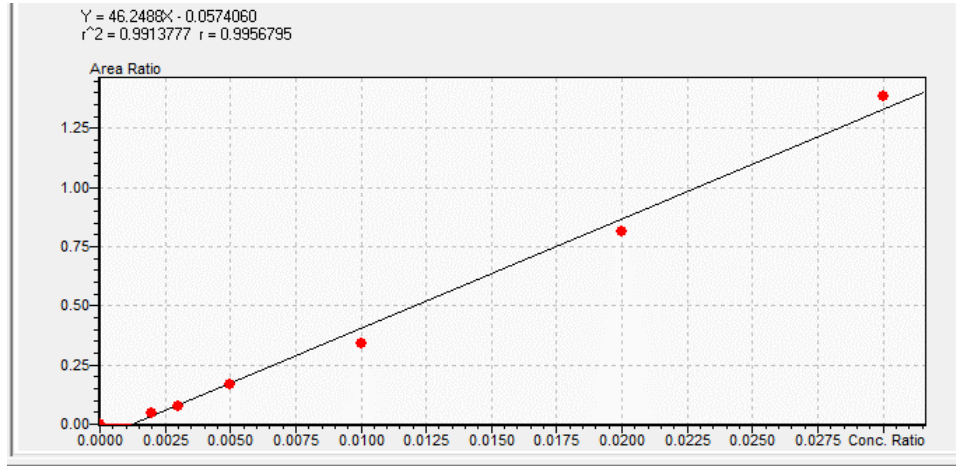
4.3. Doğrusallık

Doğrusallık çalışmaları için DNA ve MeOH olmak üzere iki farklı matriks kullanıldı. MeOH çözeltisinde ve DNA matriksinde hazırlanan her bir kalibrasyon noktası 3'er tekrarlı olacak şekilde analiz edildi. Doğrusallık çalışmalarında korelasyon katsayısı için kabul edilebilir limit ≥ 0.99 olarak kabul edildi. DNA matriksindeki kalibrasyon eğrileri dC için %0.2-0.3-0.5-1-2-3-5; 5-hmdC ve 5-mdC için %0.2-0.3-0.5-1-2-3 noktalarında oluşturuldu. dC, 5-hmdC ve 5-mdC için DNA

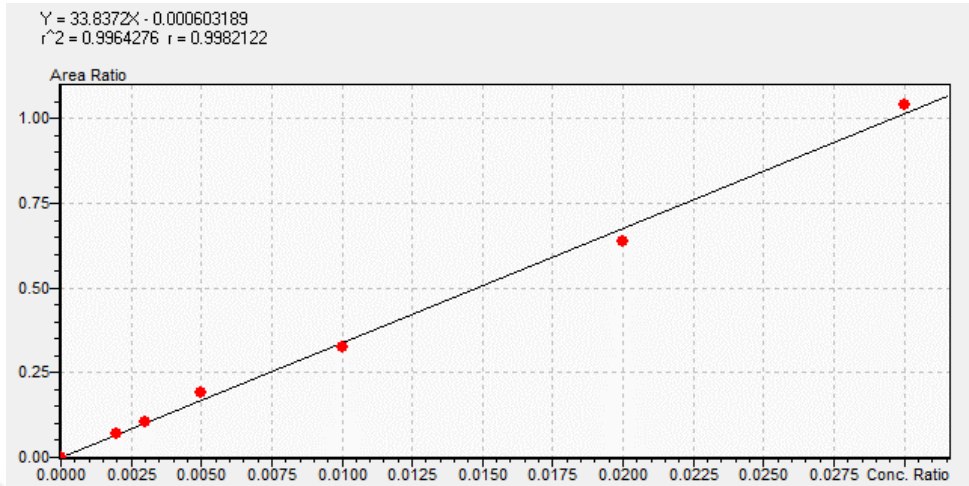
matriksindeki kalibrasyon eğrileri Şekil 26-27 ve 28’de gösterilmektedir. Tüm standartlar için korelasyon katsayısı minimum 0.9956 maksimum 0.9986 ve ortalama 0.9975 olarak hesaplandı.



Şekil 26: 2-deoksisitidin DNA kalibrasyonu

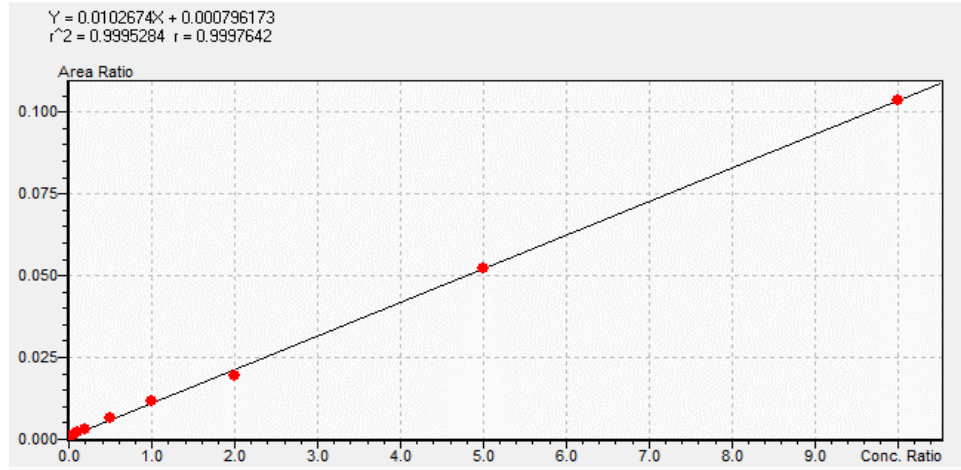


Şekil 27: 2-deoksi-5-hidroksimetilsitidin DNA kalibrasyonu

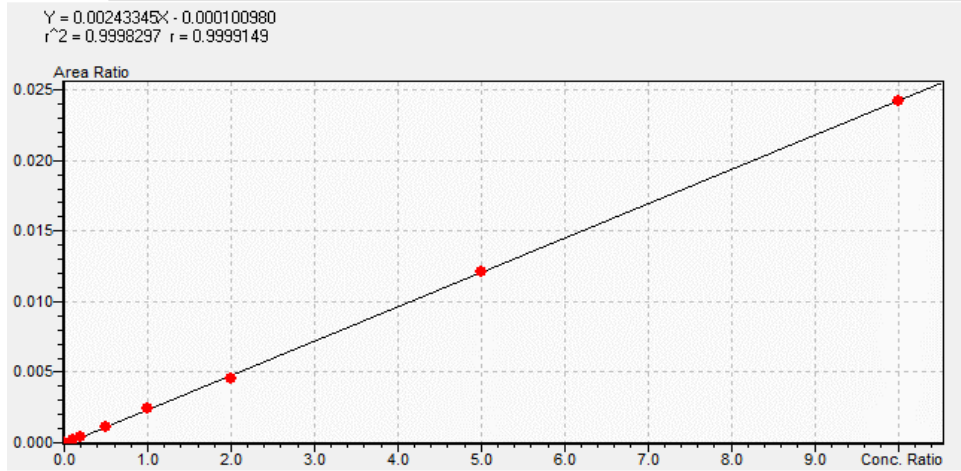


Şekil 28: 5-metil-2-deoksisitidin DNA kalibrasyonu

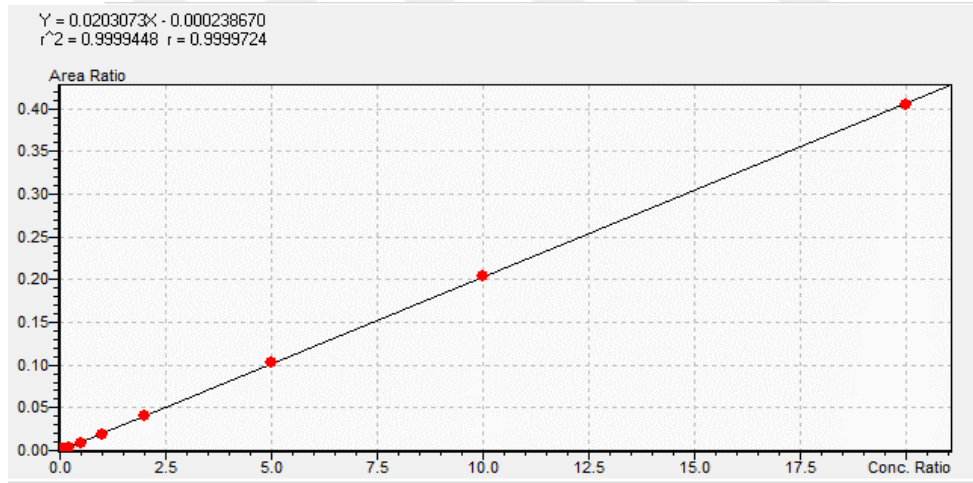
MeOH matriksindeki kalibrasyon eğrileri dC için 0.05-10 ng/ml; 5-hmdC için 0.1-10 ng/ml ve 5-mdC için 0.05-20 ng/ml aralığında oluşturuldu. dC, 5-hmdC ve 5-mdC için MeOH matriksindeki kalibrasyon eğrileri Şekil 29-30 ve 31’de gösterilmektedir. Tüm standartlar için korelasyon katsayısı minimum 0.9997 maksimum 0.9999 ve ortalama 0.9998 olarak hesaplandı.



Şekil 29: 2-deoksisitidin MeOH kalibrasyonu



Şekil 30: 2-deoksi-5-hidroksimetilsitidin MeOH kalibrasyonu



Şekil 31: 5-metil-2-deoksisitidin MeOH kalibrasyonu

Üçer tekrarlı olarak çalışılan gerçek örneklerin MeOH ve DNA matriksi içerisindeki kalibrasyon sonuçları Tablo XVI’de gösterilmektedir.

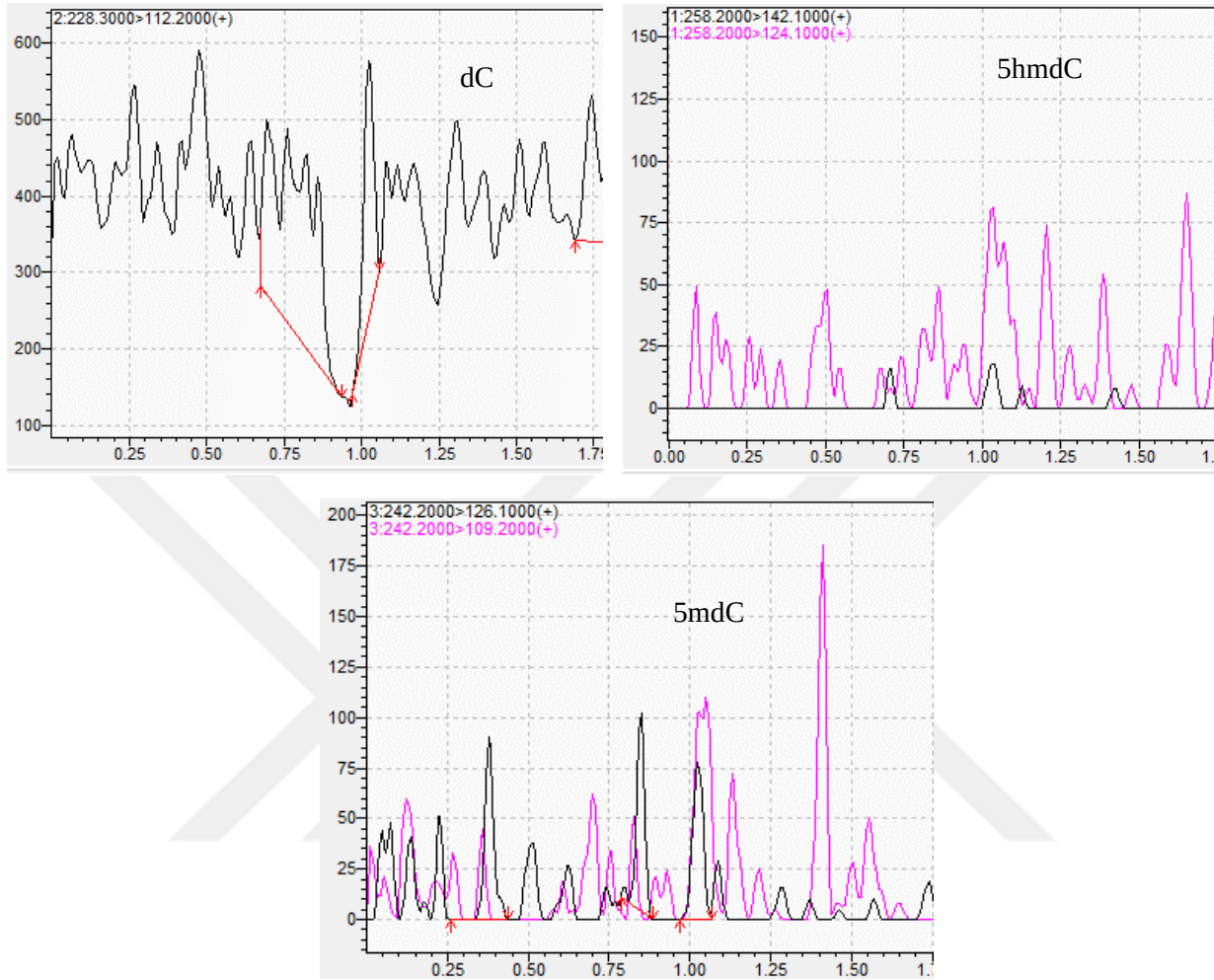
Tablo XVI. Gerçek örneklerin iki farklı kalibrasyon eğrisinden elde edilen ortalama pik alanları

Örnek Kodu	Yaş	Örnek Türü	2-deoksisitidin		2-deoxy-5-hidroksimetilsitidin		5-metil-2-deoksisitidin		Ephedrine-d3 (IS)	
			MEOH Kalibrasyonu ortalama pik alanı (n=3)	DNA Kalibrasyonu ortalama pik alanı (n=3)	MEOH Kalibrasyonu ortalama pik alanı (n=3)	DNA Kalibrasyonu ortalama pik alanı (n=3)	MEOH Kalibrasyonu ortalama pik alanı (n=3)	DNA Kalibrasyonu ortalama pik alanı (n=3)	MEOH Kalibrasyonu ortalama pik alanı (n=3)	DNA Kalibrasyonu ortalama pik alanı (n=3)
A-XX-1	24	kan	42.574	64.348	192	0	1.348	2.094	2.931.416	3.143.014
		tükürük	144.698	199.485	204	125	5.240	6.022	1.605.388	1.838.554
A-XY-2	33	kan	10.265.901	6.557.607	12.485	12.255	226.635	160.791	3.330.256	3.502.886
		tükürük	22.989.585	25.034.869	5.471	6.943	1.037.385	1.180.092	1.255.962	1.404.983
A-XY-3	30	kan	5.590.296	5.593.709	7.295	6.786	184.214	186.506	1.821.125	2.104.147
		tükürük	28.746.838	27.273.505	9.772	10.795	1.115.133	1.134.177	2.191.783	2.272.923
A-XX-4	33	kan	6.557.461	6.238.258	17.726	16.589	182.922	177.006	4.207.254	4.039.071
		tükürük	23.277.493	24.348.736	8.573	8.947	799.305	863.570	3.023.442	3.185.917
A-XX-5	29	kan	4.736.520	5.462.965	9.860	11.402	117.426	138.163	2.130.866	2.449.217
		tükürük	8.010.671	8.196.951	2.789	2.609	215.542	240.942	2.639.638	2.891.305
	39	kan	*	*	*	*	*	*	*	*

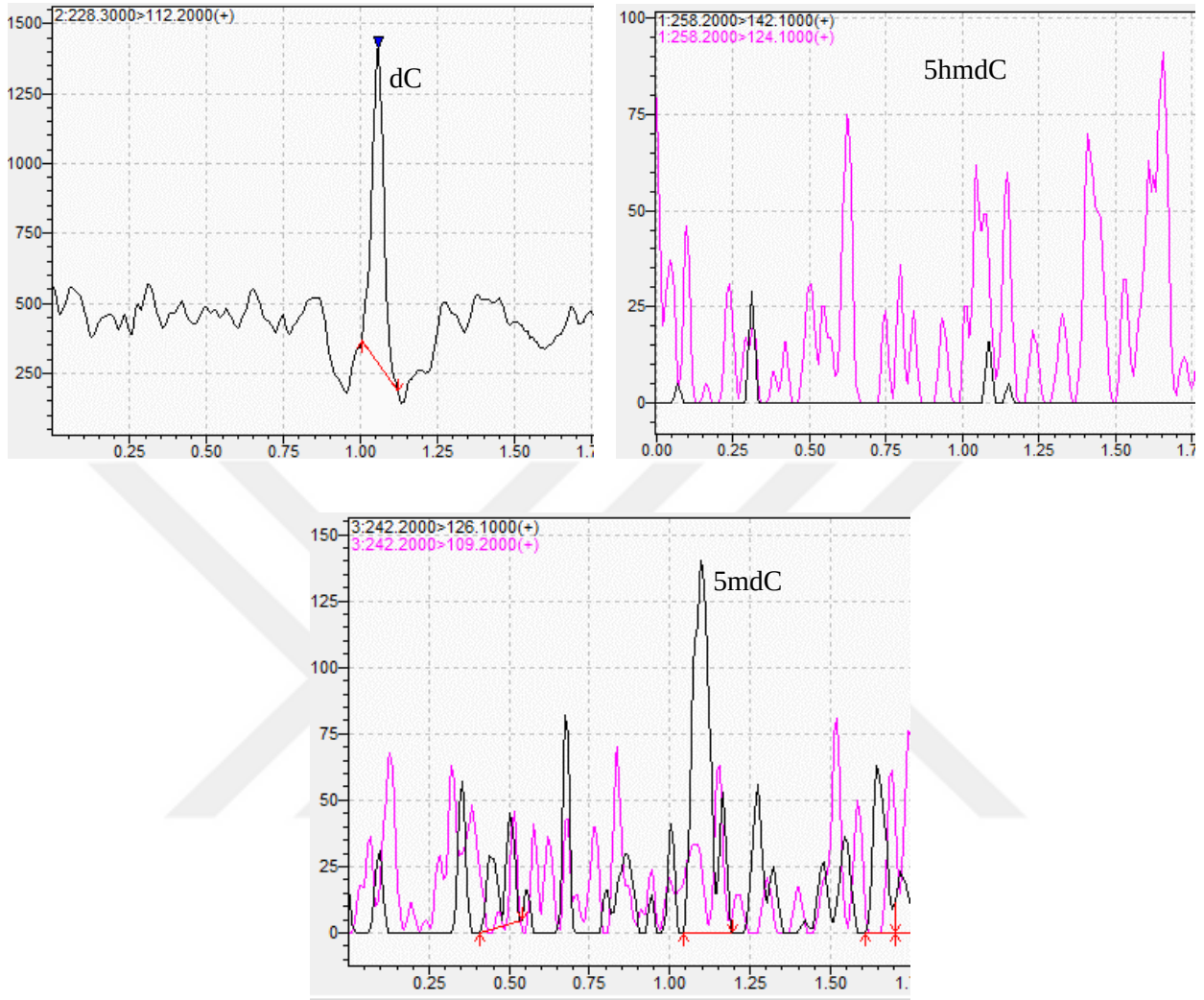
A-XY-6		tükürük	8.630.291	8.883.132	2.556	2.568	450.746	478.534	3.051.801	3.071.368
A-XX-7	41	kan	*	*	*	*	*	*	*	*
		tükürük	15.207.642	14.881.424	4.499	4.539	646.017	627.914	2.945.926	3.388.273
A-XX-8	48	kan	2.737.387	3.020.004	813	637	140.674	153.328	1.881.012	2.049.833
		tükürük	63.908	79.229	199	100	3.987	4.506	3.849.455	2.625.083
A-XX-9	48	kan	5.979.495	6.640.158	1.913	2.265	188.030	214.845	1.967.577	2.164.168
		tükürük	34.153.928	33.469.797	11.999	11.340	1.365.735	1.393.989	2.812.025	2.848.654
A-XX-10	51	kan	6.555.019	7.161.208	1.007	1.146	195.671	216.362	2.826.052	3.150.101
		tükürük	30.901.049	29.352.995	7.592	7.508	1.187.295	1.191.555	3.076.312	3.008.782
A-XY-11	54	kan	5.796.815	6.549.908	858	971	184.934	203.872	2.103.859	2.269.296
		tükürük	14.272.868	12.320.098	3.678	3.174	702.240	622.284	2.864.939	2.588.334
A-XY-12	56	kan	4.763.426	5.554.317	877	1.029	176.334	200.222	2.326.604	2.604.752
		tükürük	24.032.526	19.662.819	6.469	5.603	1.023.486	916.104	1.806.854	1.674.915
A-XX-13	56	kan	*	*	*	*	*	*	*	*
		tükürük	42.023.593	34.665.805	9.442	7.596	2.037.416	1.776.561	1.503.055	1.384.860
A-XX-14	58	kan	3.243.089	3.322.537	577	676	99.745	105.636	2.850.336	3.039.281
		tükürük	34.691.236	27.521.526	10.526	8.881	1.570.989	1.251.603	1.968.802	1.730.070

4.4. Standartlar ve Örneklerle Ait Kromatogramlar

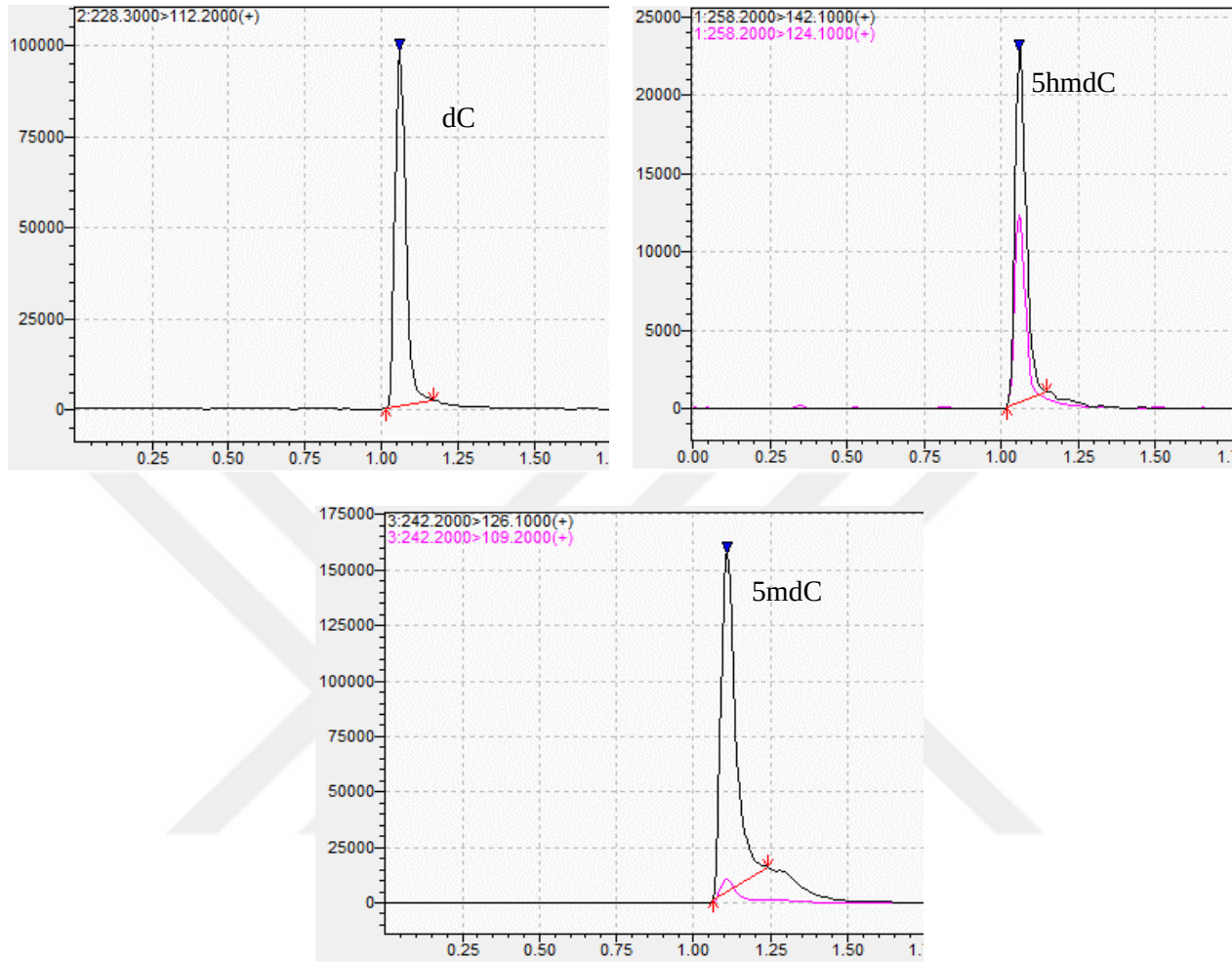
Kalibrasyon çözeltileri ve DNA örnekleri MRM modunda analiz edildi ve benzersiz ürün (product) iyonların tepe noktasına dayalı bir veri işleme gerçekleştirildi. dC, 5hmdC ve 5mdC için Şekil 32’de MeOH kalibrasyonunda yürütülen boş MeOH örneğine ait kromatogramlar; Şekil 33’de MeOH kalibrasyonunda yürütülen kör numune (blank)’ye ait kromatogramlar ve Şekil 34’de MeOH kalibrasyonunda yürütülen 5ng/mL’lik konsantrasyondaki DNA referans standartlarına ait kromatogramlar yer almaktadır. dC, 5hmdC ve 5mdC için Şekil 35’de DNA kalibrasyonunda yürütülen boş MeOH örneğine ait kromatogramlar; Şekil 36’da dC, 5hmdC ve 5mdC için DNA kalibrasyonunda yürütülen kör numune (blank)’ye ait kromatogramlar ve Şekil 37’de DNA kalibrasyonunda yürütülen %0.2’lik konsantrasyondaki DNA referans standartlarına ait kromatogramlar yer almaktadır. Şekil 38’de A-XY-3 kodlu gönüllünün kan örneğinin ve Şekil 39’da ise tükürük örneğinin kromatogramı yer almaktadır.



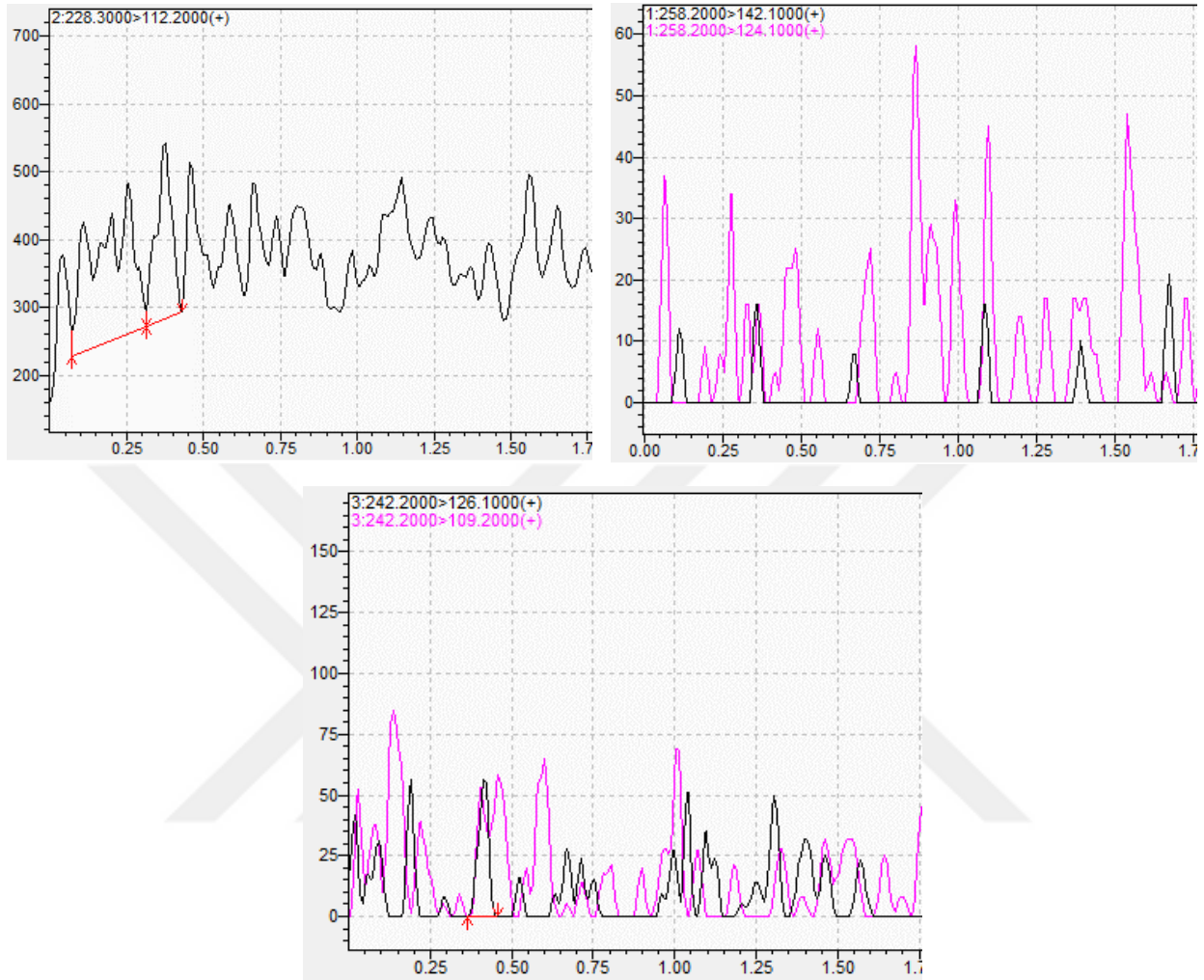
Şekil 32: dC, 5hmdC ve 5mdC için MeOH kalibrasyonunda yürütülen boş MeOH örneğine ait kromatogramlar



Şekil 33: dC, 5hmdC ve 5mdC için MeOH kalibrasyonunda yürütülen kör numune (blank)'ye ait kromatogramlar



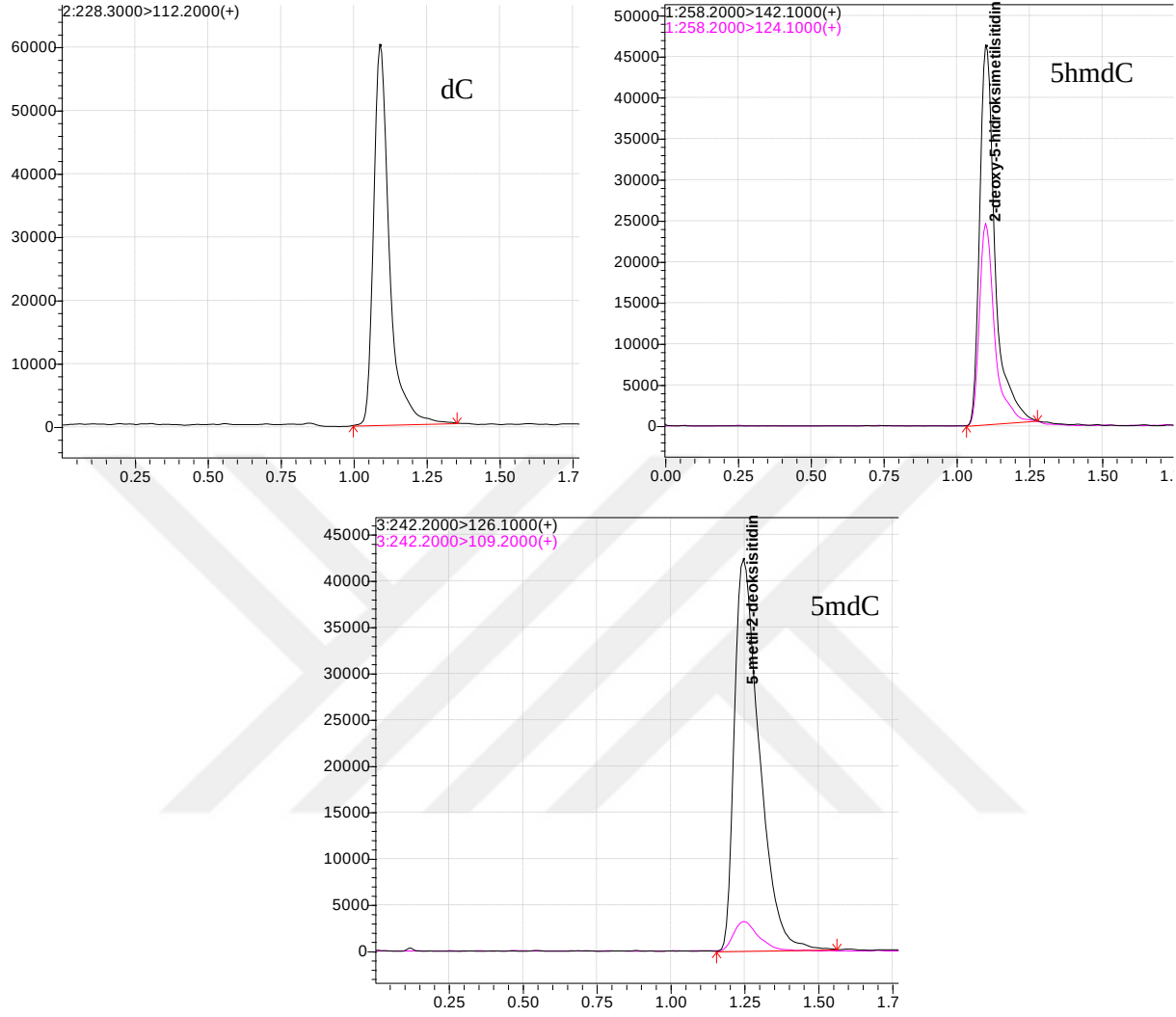
Şekil 34: dC, 5hmdC ve 5mdC için MeOH kalibrasyonunda yürütülen 5ng/mL’lik konsantrasyondaki DNA referans standartlarına ait kromatogramlar



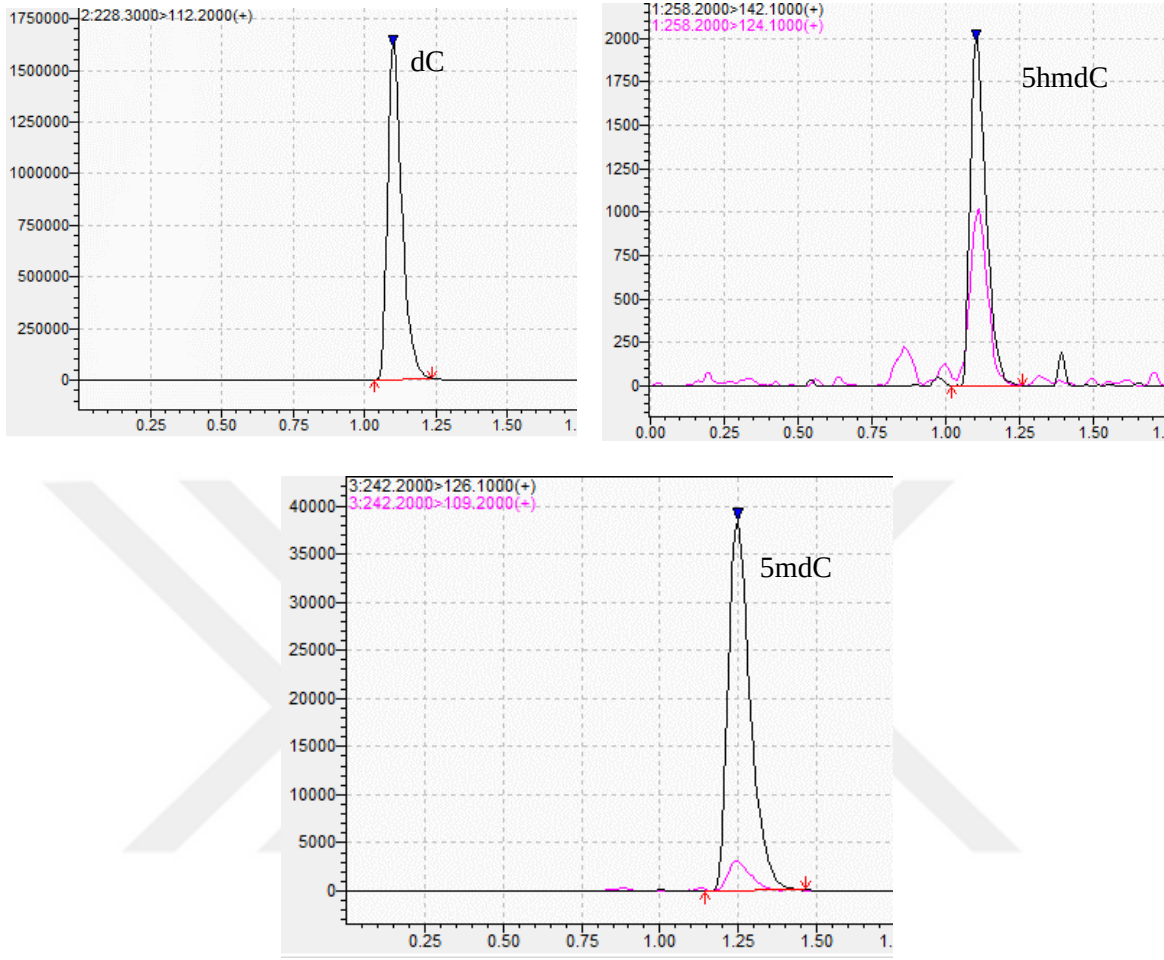
Şekil 35: dC, 5hmdC ve 5mdC için DNA kalibrasyonunda yürütülen boş MeOH örneğine ait kromatogramlar



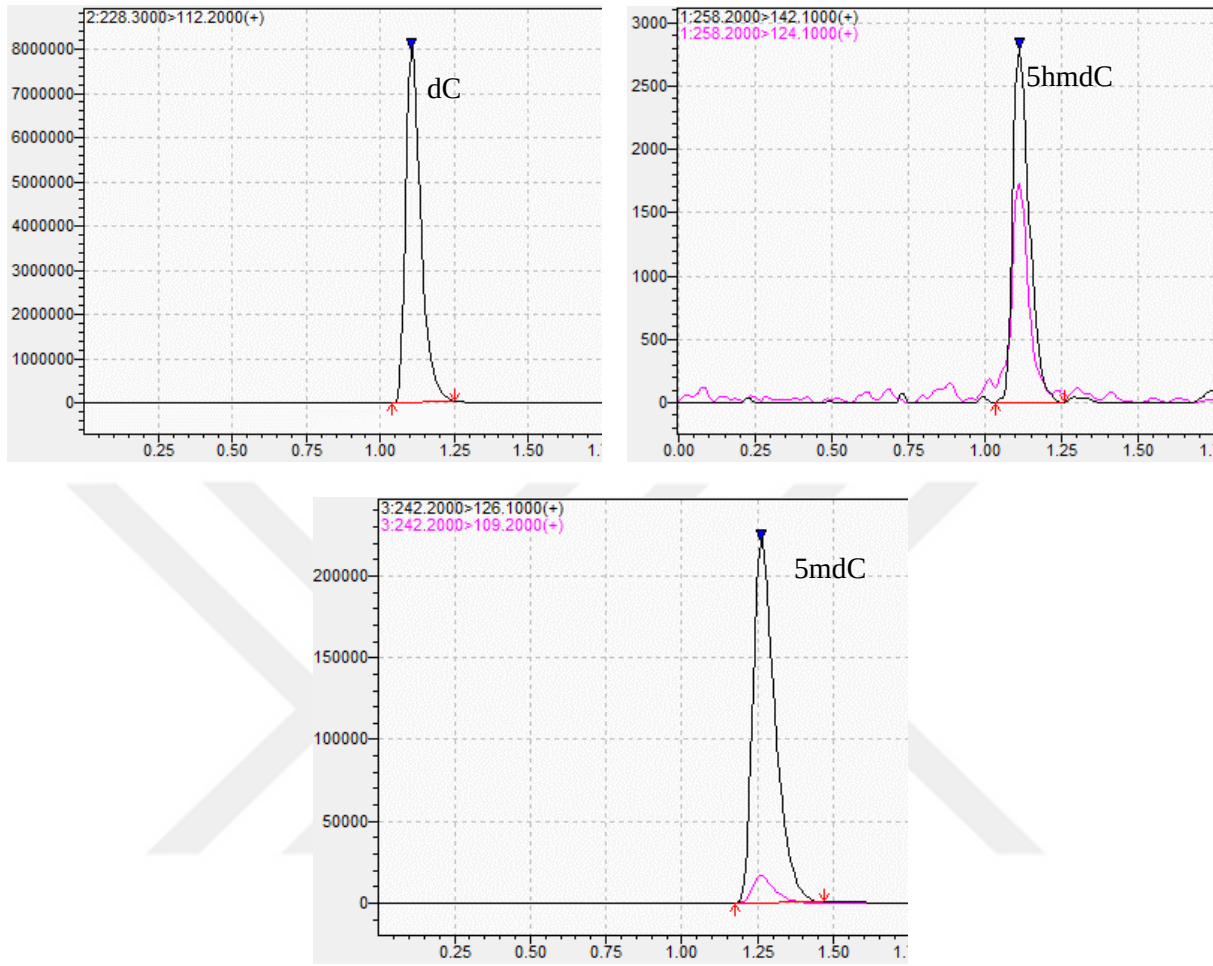
Şekil 36: dC, 5hmdC ve 5mdC için DNA kalibrasyonunda yürütülen kör numune (blank)'ye ait kromatogramlar



Şekil 37: dC, 5hmdC ve 5mdC için DNA kalibrasyonunda yürütülen %0.2'lik konsantrasyondaki DNA referans standartlarına ait kromatogramlar



Şekil 38: dC, 5hmdC ve 5mdC için : A-XY-3 kodlu gönüllünün kan örneği kromatogramı



Şekil 39: dC, 5hmdC ve 5mdC için: A-XY-3 kodlu gönüllünün tükürük örneği kromatogramı

Hem MeOH hem DNA matriksinde yürütülen standart maddelerin alıkonma zamanları (RT-retention time) ile ilgili veriler Tablo XVII’de gösterilmektedir.

Tablo XVII. dC, 5mdC ve 5hmdC’nin her iki kalibrasyondaki alıkonma zamanları

RT/Analit	dC	5mdC	5hmdC	Ephedrine-d ₃
MEOH Kalibrasyonu ortalama RT (dk) (n=6)	1.058 (±0.001)	1.108 (±0.002)	1.061 (±0.002)	3.168 (±0.003)
DNA Kalibrasyonu ortalama RT (dk) (n=3)	1.091 (±0.001)	1.245 (±0.002)	1.101 (±0.001)	3.163 (±0.003)

4.5. Seçicilik

Seçicilik çalışmaları için sadece MeOH içeren örnek ile metanol içerisinde çözündürülen dC, hmdC ve mdC ara stok çözeltilerinin pikleri karşılaştırıldı. Çözücünün analitler için herhangi bir girişime neden olmadığı görüldü (Şekil 32,35).

4.6. Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

TURKLAB Rehber 01'e göre, S/N=3 ve S/N=10 olan konsantrasyonlar sırasıyla LOD ve LOQ değerleri olarak belirlendi ve bu konsantrasyonlar yeniden hazırlanarak kontrol edildi. Tüm değerler Tablo XVIII'de gösterilmektedir.

Tablo XVIII. MeOH ve DNA kalibrasyonlarına ait doğrusal aralık, LOD ve LOQ değerleri

Analit	MeOH Kalibrasyonu (ng/mL)			DNA Kalibrasyonu (%)		
	Doğrusal Aralık	LOD	LOQ	Doğrusal Aralık	LOD	LOQ
dC	0.05-10	0.01	0.02	0.2-5	*	0.2
mdC	0.1-10	0.05	0.1	0.2-3	*	0.2
hmdC	0.05-20	0.02	0.05	0.2-3	*	0.2

*DNA kalibrasyonunda LOD çalışmaları gerçekleştirilememiştir.

4.7. %Metilasyon ve %Hidroksimetilasyon Değerleri

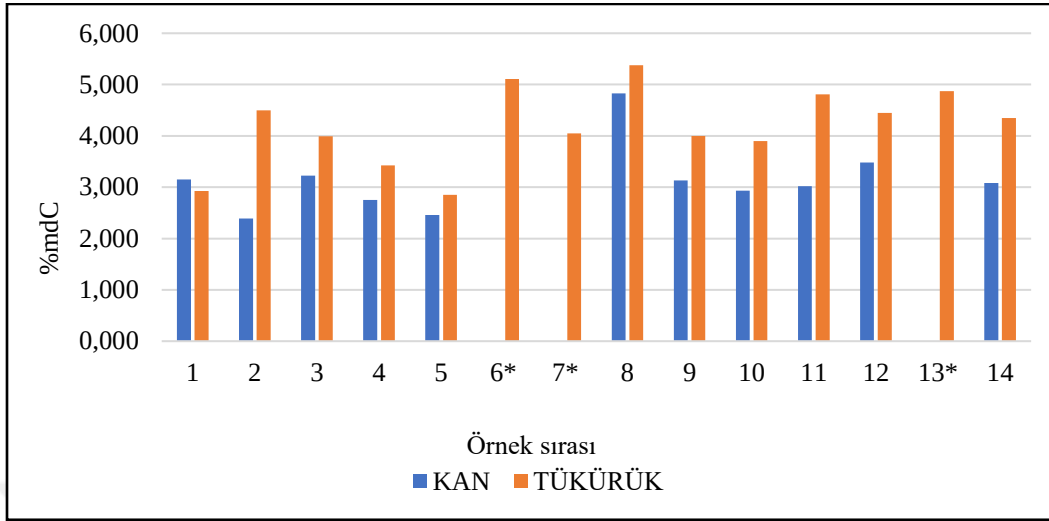
Bölüm 3.2.10'da belirtilen formüller ile her bir örnek için hesaplanan %metilasyon-%hidroksimetilasyon sonuçları ve iki biyolojik materyalin %mdC ve %hmdC değerleri arasındaki ilişkiyi incelemek için uygulanan *t-test* sonuçları Tablo XIX'de gösterilmektedir. Kan ve tükürük örneklerindeki %mdC oranlarını gösteren grafik Şekil 40'da; %hmdC oranlarını gösteren grafik ise Şekil 41'de yer almaktadır. Kan ve tükürük örneklerindeki %mdC&hmdC ortalamaları, standart

sapma ve min-max değerleri Tablo XX’de gösterilmektedir. Şekil 42’de kan ve tükürük örneklerinde ortalama %metilasyon&hidroksimetilasyon değerlerinin sütün grafiği yer almaktadır. Yaş grupları arasındaki %mdC ve %hmdC değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren grafikler sırasıyla Şekil 43 ve Şekil 44’de yer almaktadır. MeOH ve DNA kalibrasyonları arasındaki ilişkiyi kan örneklerinde %mdC açısından gösteren grafik Şekil 45’de; %hmdC açısından gösteren grafik Şekil 46’da yer almaktadır. Aynı Şekilde MeOH ve DNA kalibrasyonları arasındaki ilişkiyi tükürük örneklerinde %mdC açısından gösteren grafik Şekil 47’de; %hmdC açısından gösteren grafik ise Şekil 48’de gösterilmektedir.

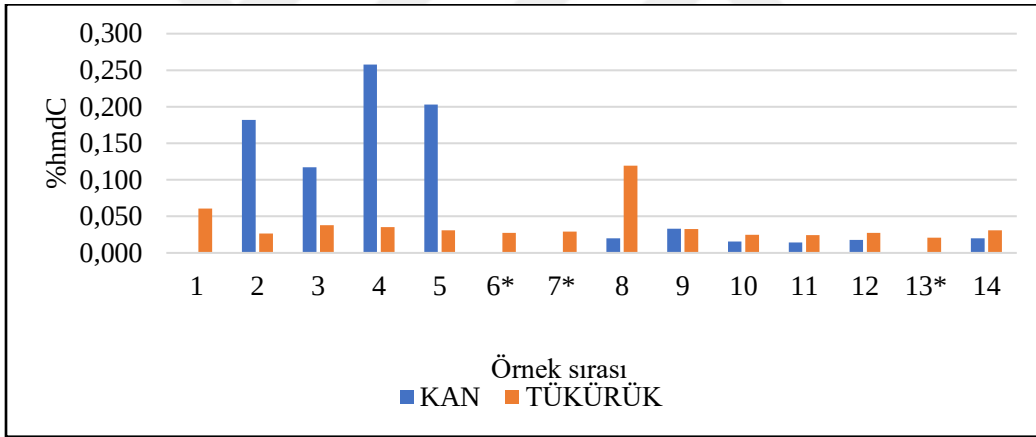
Tablo XIX. Gerçek örneklerin %metilasyon-hidroksimetilasyon sonuçları

Örnek Kodu	Yaş	Örnek Türü	% METİLASYON		% HİDROKSİMETİLASYON	
			MeOH kalibrasyonu	DNA kalibrasyonu	MeOH kalibrasyonu	DNA kalibrasyonu
A-XX-1	24	kan	3.055	3.152	0.435	0.000
		tükürük	3.490	2.928	0.136	0.061
A-XY-2	33	kan	2.157	2.389	0.119	0.182
		tükürük	4.317	4.500	0.023	0.026
A-XY-3	30	kan	3.186	3.223	0.126	0.117
		tükürük	3.733	3.991	0.033	0.038
A-XX-4	33	kan	2.707	2.752	0.262	0.258
		tükürük	3.319	3.424	0.036	0.035
A-XX-5	29	kan	2.414	2.462	0.203	0.203
		tükürük	2.619	2.855	0.034	0.031
A-XY-6	39	kan	*	*	*	*
		tükürük	4.962	5.110	0.028	0.027
A-XX-7	41	kan	*	*	*	*
		tükürük	4.074	4.047	0.028	0.029
A-XX-8	48	kan	4.886	4.831	0.028	0.020
		tükürük	5.855	5.375	0.292	0.119
A-XX-9	48	kan	3.048	3.133	0.031	0.033
		tükürük	3.844	3.997	0.034	0.033
A-XX-10	51	kan	2.898	2.932	0.015	0.016
		tükürük	3.699	3.900	0.024	0.025
A-XY-11	54	kan	3.091	3.018	0.014	0.014
		tükürük	4.688	4.807	0.025	0.025
A-XY-12	56	kan	3.569	3.479	0.018	0.018
		tükürük	4.084	4.450	0.026	0.027
A-XX-13	56	kan	*	*	*	*
		tükürük	4.623	4.874	0.021	0.021
A-XX-14	58	kan	2.983	3.081	0.017	0.020
		tükürük	4.331	4.349	0.029	0.031
t-test p değeri			0.012	0.007	0.289	0.207

*A-XY-6, A-XX-7 ve A-XX-13 kodlu kan örnekleri çalışılmadı.



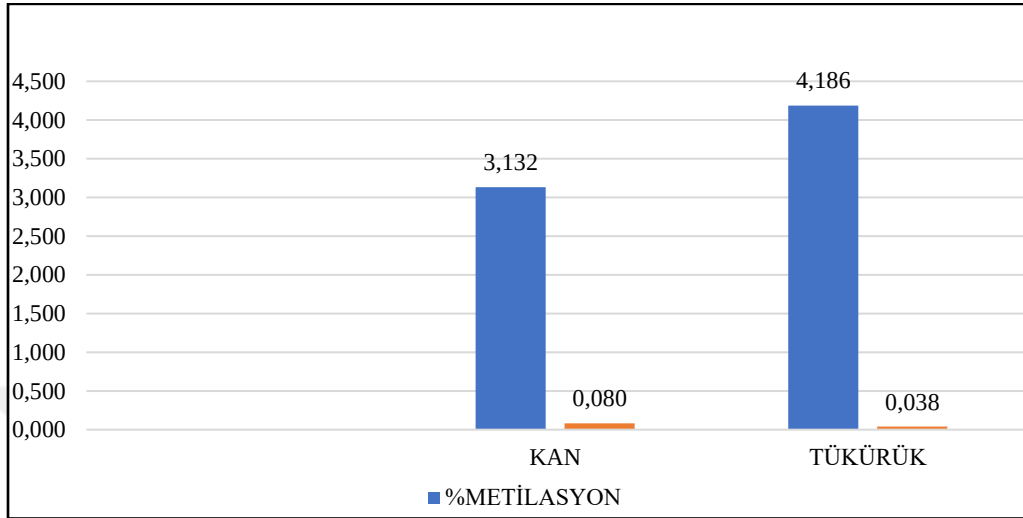
Şekil 40: Kan ve tükürük örnekleri arasındaki ilişkiyi gösteren %mdC grafiği



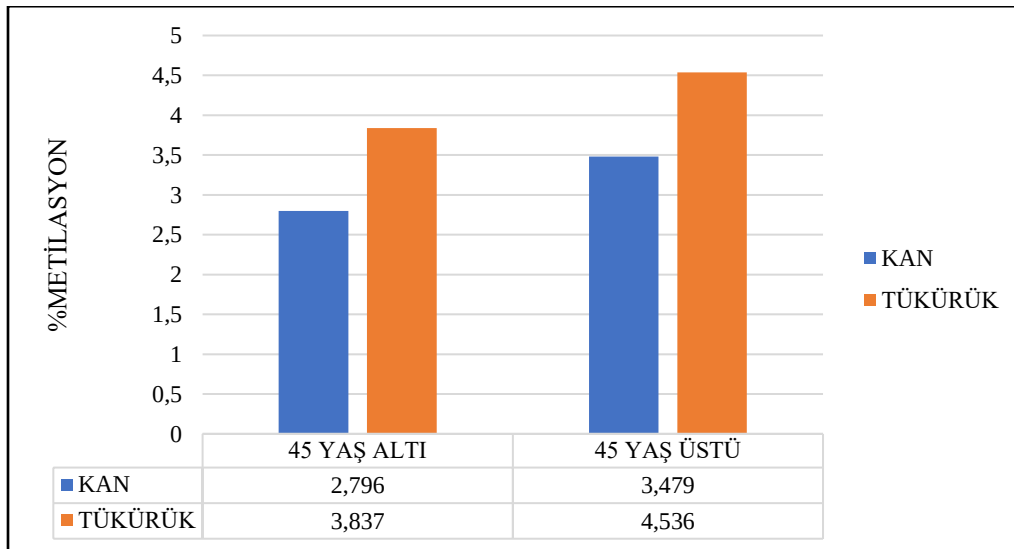
Şekil 41: Kan ve tükürük örnekleri arasındaki ilişkiyi gösteren %hmdC grafiği

Tablo XX: Kan ve tükürük örneklerinde %mdC&hmdC

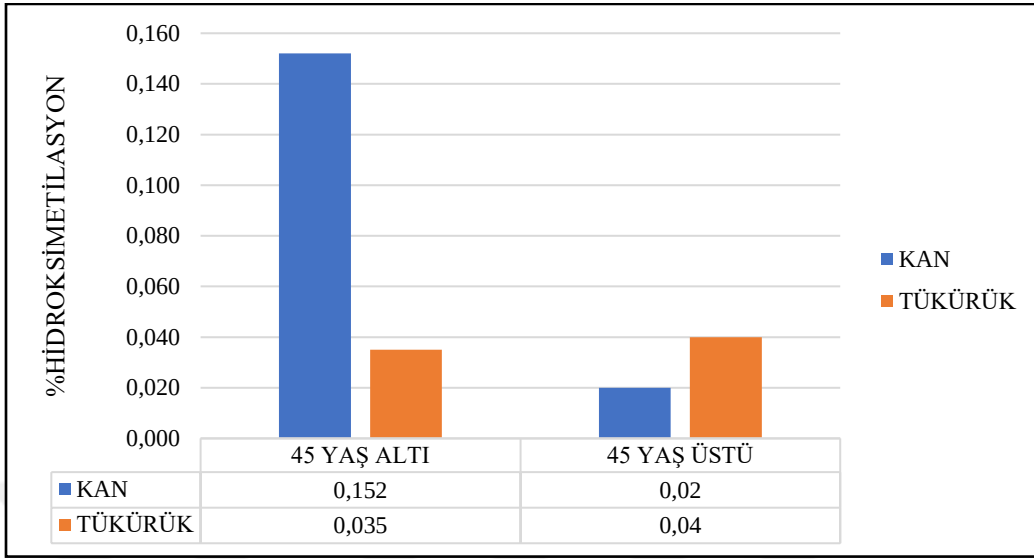
	ORTALAMA	STANDART SAPMA	MİNİMUM	MAKSİMUM
Kan %mdC (n=11)	3.132	0.619	2.389	4.831
Tükürük %mdC (n=14)	4.186	0.729	2.855	5.375
Kan %hmdC (n=11)	0.080	0.089	0.00	0.258
Tükürük %hmdC (n=14)	0.038	0.024	0.021	0.119



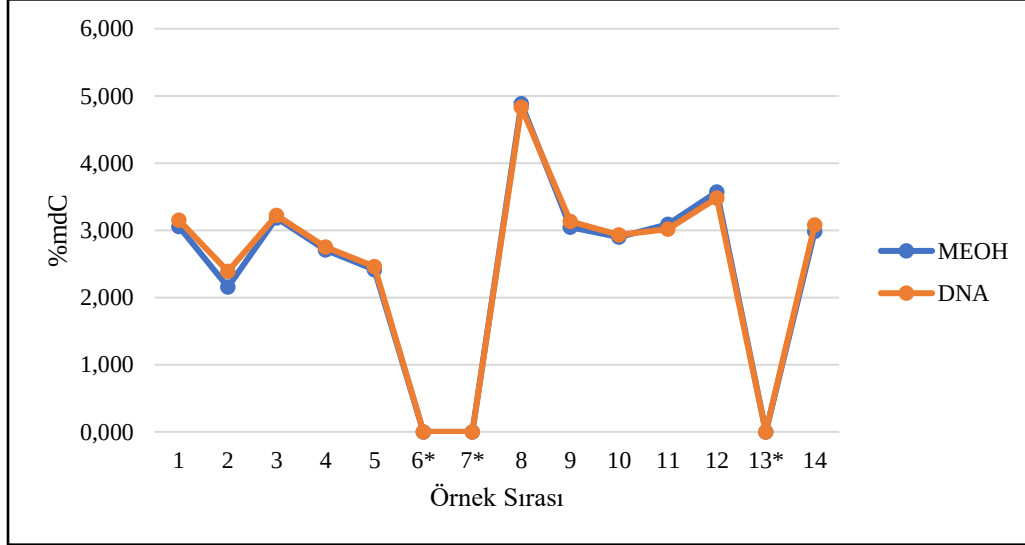
Şekil 42: Kan ve tükürük örneklerinde ortalama %metilasyon&hidroksimetilasyon sütun grafiği



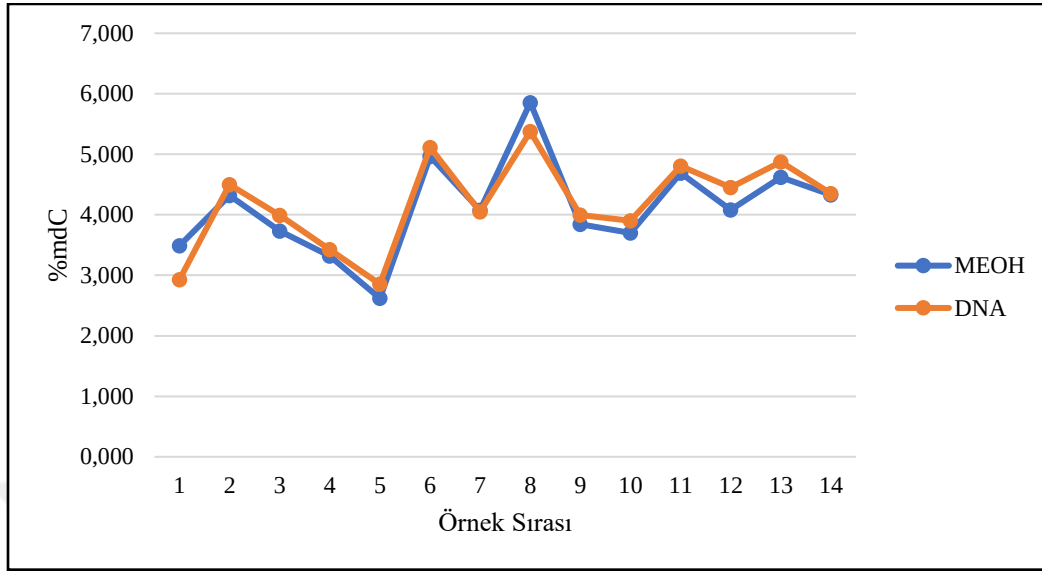
Şekil 43: Yaş grupları arasındaki ilişkiyi gösteren ort. %mdC sütun grafiği



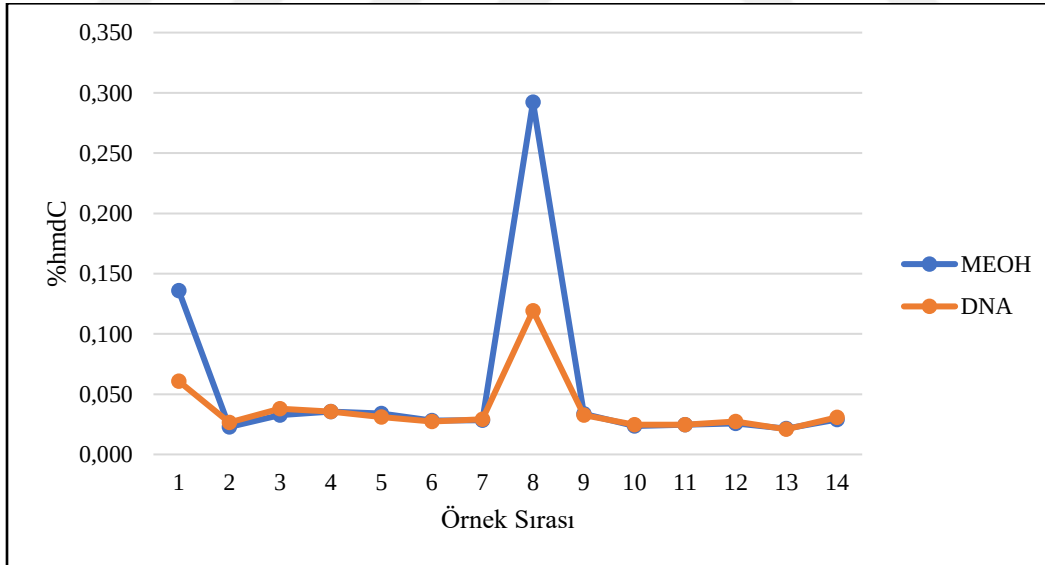
Şekil 44: Yaş grupları arasındaki ilişkiyi gösteren ort. %hmdC sütun grafiği



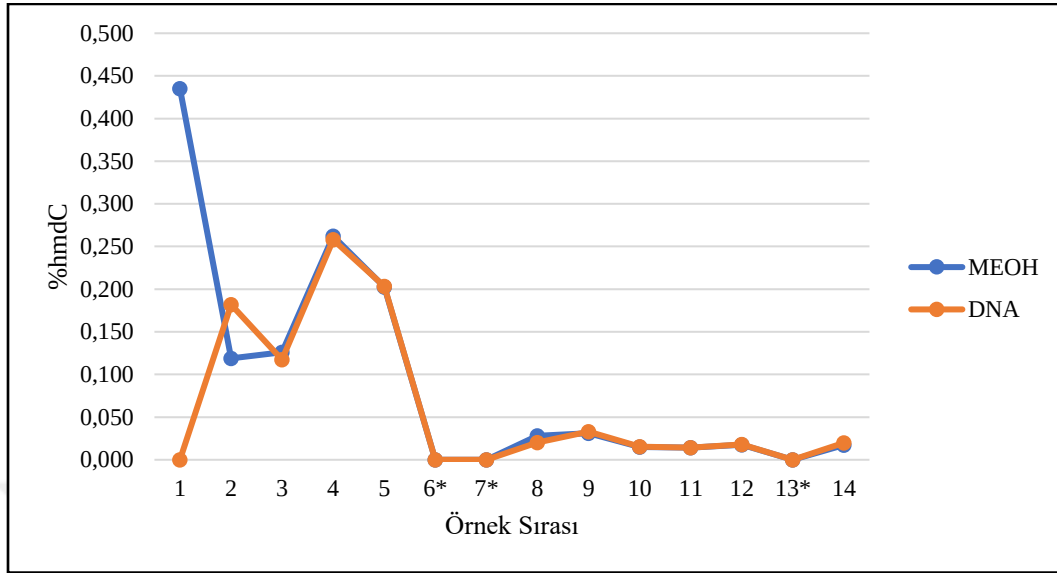
Şekil 45: Kan örneklerinde %mdC için MeOH ve DNA kalibrasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren çizgi grafiği



Şekil 46: Tükürük örneklerinde %mdC için MeOH ve DNA kalibrasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren çizgi grafiği



Şekil 47: Tükürük örneklerinde %hmdC için MeOH ve DNA kalibrasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren çizgi grafiği



Şekil 48: Kan örneklerinde %hmdC için MeOH ve DNA kalibrasyonları arasındaki ilişkiyi gösteren çizgi grafiği

5. Tartışma ve Sonuç

Genomik DNA'nın yapısında bulunan sitozin bazlarının 5'karbon atomuna, DNA metil transferazlar aracılığıyla CH₃ grubunun eklenmesi ile gerçekleşen mekanizmaya metilasyon denilmektedir. DNA metilasyonu geçmişten günümüze kadar yapılmış olan tüm epigenetik araştırmalarında en çok konu edilen ve dolayısıyla da hakkında en çok bilgi sahibi olunan epigenetik mekanizmadır (55).

İnsan genomundaki CpG dinükleotitlerinin yaklaşık %70 kadarı metile olmuş durumdadır. CpG adacıklarının sahip olduğu metilasyon düzeyleri her doku için spesifik ve bu durum metilasyonu önemli bir belirteç haline getirmektedir. DNA metilasyonunu araç olarak kullanan analizler sayesinde yaş tahmini, olay yerinden vücut sıvısı tespiti, monozigotik ikizlerin birbirinden ayırt edilmesi gibi uygulamalar yapılabilmekte ve böylece DNA metilasyonu diğer bilimlerin yanında adli bilimler için de önemli bir hale gelmektedir (56,57).

DNA metilasyonu analizi için günümüze kadar yapılan çalışmalarda birçok yöntem önerilmiş olup, literatürde yer alan çalışmalar sayesinde bu yöntemlerin her birinin avantaj ve dezavantajları ortaya konmuştur (58). Çoğu yöntemde ortak olan bazı dezavantajlar; yüksek maliyet, uzun analiz süresi, düşük kararlılık ve tekrar üretilebilirlik açısından eksikliklerdir (59). Bahsedilen bu dezavantajları ortadan kaldıracak bir yöntem arayışına, yakın tarihte yapılmış olan çalışmalar sayesinde LC-MS/MS ile son verilmiştir. LC-MS/MS, literatüre bakıldığında DNA metilasyonu analizi konusunda altın standart olarak anılmaktadır.

Literatür araştırması yapıldığında, yurt dışında örnek çalışmaları görülen ve metilasyon analizindeki başarısı anlaşılan LC-MS/MS, metilasyon analizi konusunda ülkemizde henüz kullanılmamıştır. Bu konuya yer veren bir çalışma bulunmamaktadır. Yöntemin avantajları ve birçok araştırmacı tarafından altın standart olarak nitelendirildiği göz önüne alındığında, ülkemizde

bu yöntemin kullanılmaması büyük bir boşluk olarak değerlendirilmektedir. Yaptığımız çalışma ile LC-MS/MS kullanılarak DNA metilasyon ve hidrokümetilasyon analizi için bir yöntem geliştirilmesi ve böylece çalışmamızın ülkemizde ileride yapılacak çalışmalar için yol gösterici olması amaçlandı.

Yöntem geliştirme aşamasında literatür taraması yapılarak, konu hakkında yapılmış olan çalışmalar araştırıldı. Metilasyon analizini farklı biyolojik materyallerde gerçekleştiren çalışmaların deneysel basamakları ve tercih edilen malzemeler göz önüne alınarak, yöntem parametreleri en iyi sonuçlar alacak şekilde seçildi. Literatürden elde edilen, metilasyon analizi için uygun LC analitik kolonu, sistem parametreleri, uygun kolon sıcaklığı ve standart moleküllerin parçalanma iyonları hakkındaki bilgiler kullanılarak bir yöntem geliştirildi.

Çalışmamız için gönüllü olan 14 sağlıklı bireyden (n=9 kadın, n=5 erkek) kan ve tükürük örnekleri toplandı. Toplamdaki 28 adet örnekten E.Z.N.A. ® Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek) izolasyon kiti ile DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA numunelerinin miktarı Quant-it™ dsDNA HS (High sensitive) Assay (Invitrogen) kiti kullanılarak, Qubit 4 florometre (Thermo Fisher) ile ölçüldü. Tükürük örneklerinden en fazla 200 ng/μL ve en az 13 ng/μL olmak üzere, ortalama 43.4 ng/μL konsantrasyonda DNA izolatu elde edildi (Tablo X). Kan örneklerinden ise en fazla 70.6 ng/μL ve en az 16.5 ng/μL olmak üzere, ortalama 39.9 ng/μL konsantrasyonda DNA izolatu elde edildi (Tablo XI). İzolasyon sonrası DNA numunelerine DNA Degradase Plus™ (ZymoResearch) hidroliz kiti ile hidroliz işlemi uygulandı, sonrasında örnekler vial içerisinde IS ve distile su ilavesiyle analize hazır hale getirildi. Örnekler dC, mdC ve hmdC standart maddeleri ve 5-Methylcytosine & 5-Hydroxymethylcytosine DNA standart seti kullanılarak kalibrasyonu yapılan LC-MS/MS sistemine 2 μL hacimde enjekte edildi. Örnek hazırlama sırasında yapılan olası

hataları ortadan kaldırmak, yöntemin koşullarını standart hale getirmek ve kesin sonuçlar alabilmek için Ephedrine-d₃ maddesi iç standart olarak kullanıldı.

Literatür araştırması yapıldıktan sonra çalışmamız için iç standart olarak 2'-deoxycytidine-¹⁵N₃ molekülünün (C₉H₁₃*N₃O₄) kullanılabileceği görüldü (60) fakat yapılan piyasa araştırmasından sonra, bütçe yetersizliğinden dolayı alternatif bir iç standart arayışına girildi. Analitik bir sistemde kullanılacak iç standartın kimyasal olarak ilgilenilen maddeye benzemesi ve stabil olması gerekir (61). Ayrıca iç standart olarak kullanılan molekül, örnekteki bileşenlerle girişim yapmamalıdır ve sistemdeki analiz sonucu ilgilenilen maddeye benzer tepkiler vermelidir (61). Bu önemli bilgiler göz önüne alınarak, elimizdeki imkanlar dahilinde ephedrine-d₃ molekülü (C₁₀H₁₅NO) iç standart olarak seçildi (62). Sistem üzerinde yapılan denemelerle ephedrine-d₃ molekülünün örneklerimizdeki bileşenlerle girişim yapmadığı ve dolayısıyla bu seçimin uygun olduğu ortaya çıkarıldı.

Ara stokları hazırlanan standart maddelerin ve iç standartın LC-MS/MS sistemindeki iyon belirleme çalışmaları sonucu maddelerin öncül (precursor) ve ürün (product) iyonları bulundu. Öncül ve ürün iyonlar sırasıyla dC için 228.3000→112.2000; hmdC için 258.2000→142.1000 ve 258.2000→124.2000; mdC için 242.2000→126.1000 ve 242.2000→109.2000 olarak belirlendi. Her bir standart madde için çalışmamızda elde edilen bu veriler **Li ve ark (2011), Peng ve ark. (2012), Tsuji ve ark. (2014) ve Le ve ark (2011)**, tarafından DNA metilasyon ve hidroksimetilasyonuyla ilgili gerçekleştirilen benzer çalışmaların bulgularıyla da uyuşmaktadır (31,32,64,65).

Kalibrasyon çalışmaları DNA matriksinde dC için %0.2-0.3-0.5-1-2-3-5; 5-hmdC ve 5-mdC için %0.2-0.3-0.5-1-2-3 noktalarında gerçekleştirildi. Tüm standartlar için 0.9956-0.9986 arasında korelasyon katsayısı elde edildi ve ortalama 0.9975 olarak hesaplanarak kalibrasyon uygun

bulundu. MeOH matrisindeki kalibrasyon eğrileri dC için 0.05-10 ng/mL; 5-hmdC için 0.1-10 ng/mL ve 5-mdC için 0.05-20 ng/mL aralığında oluşturuldu. Tüm standartlar için 0.9997-0.9999 aralığında korelasyon katsayısı elde edildi ve ortalama 0.9998 olarak hesaplanarak kalibrasyon uygun bulundu. Elde edilen bu veriler ile yöntemin her iki matriste de doğrusallığı kanıtlandı.

Seçicilik çalışmaları için sadece MeOH içeren örnek ile metanol içerisinde çözdürülen dC, hmdC ve mdC ara stok çözeltilerinin pikleri karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucu çözücünün analitler için bir pik oluşturmadığı görüldü. Dolayısıyla bu durum çözücünün herhangi bir girişime neden olmadığını ve seçiciliğin olduğunu kanıtlamaktadır.

Sinyal/gürültü oranlarına göre değerlendirilen LOD ve LOQ tayinlerine göre hesaplanan değerler MeOH kalibrasyonunda dC için LOD 0.01 ng/mL, LOQ 0.02 ng/mL; mdC için LOD 0.05 ng/mL, LOQ 0.1 ng/mL ve hmdC için LOD 0.02 ng/mL, LOQ 0.05 ng/mL bulundu. DNA standart set ile oluşturulan kalibrasyonda her üç madde için de (dC, mdC, hmdC) LOQ değerleri %0.2 olarak bulundu. Elimizde daha düşük konsantrasyonlara inebilmek için yeterli malzeme bulunmadığından LOD çalışmaları DNA kalibrasyonunda gerçekleştirilemedi (Bkz. Tablo XVI).

Kok ve ark (2007) tarafından, kandaki global DNA metilasyonunu LC-ESI-MS/MS ile analiz etmeye dayalı olarak yapılan çalışmanın bulgularında, lineer kalibrasyon eğrileri dC için 0.111–4.422 ng/mL ($r=0.9983$) ve mdC için 0,0048-0,1936 ng/mL ($r=0.9991$) aralığında elde edilmiştir. Hem dC hem mdC için LOD 0.2 ng/mL, LOQ ise >0.65 ng/mL olarak belirlenmiştir.

(69). **Peng ve ark. (2012)** tarafından yapılan, LC-MS/MS ile biyolojik materyallerden DNA metilasyonuna bakılan çalışmada LOD ve LOQ değerleri sinyal/gürültü oranı sırasıyla 3 ve 10 katı kabul edilerek hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucu dC için LOD 0.017 ng/mL ve LOQ 0.05 ng/mL; 5-mdC için LOD 0.07 ng/mL ve LOQ 0.20 ng/mL olarak belirlenmiştir (32). Bu iki

çalışmanın verileri kendi çalışmamızla karşılaştırıldığında; bizim çalışmamızın hem dC hem mdC için daha düşük LOD ve LOQ değerlerine sahip olduğu görülmektedir.

Zhang ve ark. (2012) tarafından yapılan, HILIC-MS/MS kullanılarak eş zamanlı olarak DNA metilasyon ve hidroksimetilasyonunun incelendiği çalışmada $LOD=3*SD$, $LOQ=10*SD$ olacak şekilde kabul edilerek hesaplanan LOD değerleri dC, mdC ve hmdC için sırasıyla 0.001 ng/mL, 0.045 ng/mL ve 0.057 ng/mL olarak; LOQ değerleri ise 0.002 ng/mL, 0.09 ng/mL ve 0.1 ng/mL olarak belirtilmiştir (63). Bu çalışmanın verileri kendi çalışmamızla karşılaştırıldığında; dc ve 5mdC analitleri için elde edilen LOD ve LOQ değerlerinin, bizim çalışmamızdaki değerlerden daha düşük olduğu görülmektedir. Bununla birlikte 5hmdC için bulunan LOD ve LOQ ise bizim çalışmamızda daha düşük değerlerdedir.

Çalışmamızda kalibrasyon sonrası elde edilen pik alanlarına ait veriler her bir örnek için bölüm 3.2.12’de verilen formüller kullanılarak hesaplandı. Sonrasında her bir örnekten elde edilen %mdC ve %hmdC değerlerinin her bir matriks ve biyolojik materyal için ortalama değerlerinin hesaplaması yapıldı. Elde edilen bulgular Tablo XIX’da gösterilmektedir. Bu tabloda gösterilen ortalama %metilasyon ve %hidroksimetilasyon değerleri MeOH ve DNA kalibrasyonu açısından incelendiğinde, bu değerlerin birbirine yakın olduğu görülmektedir. İki kalibrasyon faktörü arasındaki ilişki *Student’s t-test* ile araştırıldı. Yapılan test sonucunda MeOH ve DNA kalibrasyonundan yapılan hesaplamalarla elde edilen değerler arasında anlamlı bir farklılık çıkmadığı görüldü (%5mdC kan için $p=0.887$; tükürük için $p=0.875$) (%5hmdC kan için $p=0.488$; tükürük için $p=0.424$). İki kalibrasyon arasında anlamlı bir farklılık çıkmamasına karşın, DNA kalibrasyonundan elde edilen veriler literatür ile daha uyumlu bulunduğu için diğer bütün değerlendirmeler DNA kalibrasyonu ile elde edilen veriler kullanılarak yapıldı. Çalışmamızda iki farklı kalibrasyon yöntemi kullanılması, yapılan çalışmanın bir avantajı olarak karşımıza

çıkmaktadır. Bu sayede benzer konularda çalışma yapmak isteyen araştırmacılara, çalışmamızın bulgularını referans alarak ilerleme olanağı doğmaktadır.

Elde edilen bulgular sonucunda; kan örnekleri (ort %3.132) ile karşılaştırıldığında, global DNA metilasyon düzeylerinin tükürük örneklerinde daha yüksek oranlarda olduğu görüldü (ort %4.186). Yapılan *Student's t-test* sonucunda kan ve tükürük örneklerinin %mdC düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulundu ($p=0.0066$). Buna karşılık hidrosimetilasyon düzeylerinin ise kan örneklerinde daha yüksek değerlerde çıktığı görüldü (ortalama %0.080). Bununla birlikte %hmdC açısından yapılan *Student's t-test* sonucunda bu iki biyolojik materyal arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p=0.207$). Kan ve tükürük arasında farklı düzeylerde sonuçlar elde edilmesinin en büyük nedeninin, tükürük ve kan materyallerinin her ikisinin de farklı işlev ve yarı ömre sahip, dış etkenlere duyarlılığı farklı olan çeşitli hücre tiplerini içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (12).

Hesaplamalar sonucu tükürük örnekleri için elde edilen %mdC ve %hmdC değerleri literatürdeki verilerle uyum göstermektedir. **Godderis ve ark. (2015)** tarafından yapılan çalışmada ($n=14$) tükürük örnekleri için ortalama %4.61 mdC ve %0.036 hmdC değerleri kaydedilirken; yaptığımız çalışmada bu değerler sırasıyla %4.19 ve %0.038 olarak bulunmuştur (12).

Tükürük örneklerinden elde edilen bulgular ve literatür bilgisi arasında yakalanan bu uyum, kan örnekleri için bulunamadı. **Godderis ve ark. (2015)** tarafından yapılan çalışmada ($n=14$) kan örnekleri için ortalama %5.70 mdC ve %0.027 hmdC değerleri kaydedilirken; bu değerler yaptığımız çalışmada sırasıyla %3.13 mdC ve %0.080 hmdC olarak bulundu (12). Kan örneklerinden çıkan sonuçların literatür bilgisi ile uyumlu olmamasının, kan örneklerinin uzun bir süredir saklanıyor olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. **Gosselt ve ark. (2020)** tarafından yapılan ve global DNA metilasyonu&hidrosimetilasyonunun hangi saklama koşulları ve

sıcaklıklarda stabil olduğunu araştıran çalışma, hipotezimizi doğrular niteliktedir. Bu çalışmada kan örneklerinde global DNA metilasyonu düzeylerinin -20°C 'de 12 aya kadar saklama sürecinde kararlı kaldığı fakat 12 ay sonrasında, -20°C 'de saklanan DNA örneklerinde ortalama global DNA metilasyonu düzeylerinin düştüğü gözlemlenmiştir. 18 aylık bir saklama süreci sonunda, DNA örneklerinde ortalama global DNA metilasyonu ilk baştaki haline kıyasla %6,1'lik bir azalma göstermiştir. Bununla birlikte DNA hidroksimetilasyon düzeylerinin ise -20°C 'de 12 ay ve sonrası bir saklama süreci geçiren kan örneklerinde %12.5'lik bir artış gösterdiği belirtilmiştir (66).

İki biyolojik materyal (kan ve tükürük) arasındaki ilişki hem mdC hem hmdC açısından incelendiğinde; %mdC değerleri arasında anlamlı bir fark görülürken ($p=0.007$), %hmdC değerleri arasında anlamlı bir fark görülemedi ($p=0.207$). Bu bulguyu değerlendirirken hidroksimetilasyon düzeylerinin insan genomunda metilasyona kıyasla çok daha düşük değerlerde olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu durum ayrıca numune sayısı ile de alakalı olabileceği için bu konunun araştırılacağı ileriki çalışmalarda daha büyük bir örneklem grubu tercih edilebilir.

Tükürük ve kan örneklerinin kendi içerisinde mdC ve hmdC değerleri arasındaki ilişki *Student's t-test* ile incelendi. Test sonucunda hem kan hem tükürük örnekleri kendi içerisinde mdC ve hmdC için anlamlı bir farklılık gösterdi (kanda $p=0.0005$; tükürükte $p=0.00004$). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde hem kan hem tükürük örnekleri için mdC ve hmdC düzeylerinin karşılaştırılabilir olmadığı söylenebilmektedir. Buna karşılık ileriki çalışmalar için daha doğru bir değerlendirme yapmak amacıyla, daha büyük bir örneklem grubu tercih edilebilir.

Kan ve tükürük örnekleri kendi içerisinde ayrı ayrı hem mdC hem hmdC düzeyleri için yaş grupları (45 yaş altı ve üstü) açısından incelendiğinde; kan örneklerinde %mdC açısından yaş grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamışken ($p=0.13$), %hmdC açısından anlamlı bir fark bulundu ($p=0.04$). Tükürük örneklerinde ise hem %mdC hem %hmdC açısından yaş grupları

arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.08$; $p=0.75$). Buna karşılık yapılan çalışmada örnek sayısı az olduğu ve yaş aralığı çok geniş olmadığı için (min. 24- max. 58), bu bulguların daha kesin bir çerçevede değerlendirilmesi açısından örneklem grubu daha büyük ve yaş aralığı çok daha geniş olan bir çalışma yapılmalıdır.

Kok ve ark (2007) tarafından, LC-ESI-MS/MS ile global DNA metilasyon analizi yapılan çalışmanın bulgularında total analiz süresi 15 dk olarak yer almaktadır (69). **Zhang ve ark. (2012)** tarafından, eş zamanlı olarak global DNA metilasyonu ve hidroksimetilasyonu seviyelerini belirleme konusunda yapılan çalışmada, HILIC-MS/MS sisteminde analiz için geçen süre 14 dk olarak belirtilmiştir (63). **Tammen ve ark. (2013)** tarafından LC-MS/MS kullanılarak yapılan, DNA hidroksimetilasyonu ile yaşlanma arasındaki bağlantıyı araştıran çalışma sonucundan belirtilen analiz süresi yine 14 dk'dır (24). **Nakagawa ve ark. (2019)** tarafından, LC-MS/MS kullanılarak global DNA metilasyonunun kantitatif analizinin yapılması ve yöntemin optimize edilmesi amacı ile yapılan çalışma sonucunda sistemdeki tek bir analiz için sürenin 8 dk olduğundan bahsedilmiştir (10). Aynı şekilde **Tsuji ve ark. (2014)** tarafından yapılan, genomik DNA'daki modifiye olmuş sitozin oranlarını değerlendirmek için LC-MS/MS sisteminin kullanıldığı çalışmada da analiz süresi yine 8 dk olarak belirtilmiştir (64). Gerçekleştirdiğimiz çalışma sonucunda ise LC-MS/MS sisteminde her bir analiz için gereken süre 5 dk gibi kısa bir süredir. Yukarıda literatürden verilen örnekler göz önüne alındığında, çalışmamızın nispeten daha kısa bir analiz süresine sahip olması çok büyük bir avantajdır. Bu kısa analiz süresi sayesinde çok sayıdaki örneklerle çalışılan bir araştırmada büyük vakitlerin kaybedilmesi önlenmiş olacaktır.

Çalışmanın kısıtlılıkları değerlendirildiğinde; çalışmamızda kullanılmak üzere toplanan 14 adet kan ve 14 adet tükürük olmak üzere toplamdaki 28 adet örneğin yalnızca 25 adeti çalışmada yer aldı. Bunun nedeni DNA Degradase Plus™ (ZymoResearch) hidroliz kiti içerisinde yer alan

DNA degradase plus enziminin miktar açısından yeterli gelmemesidir. Projemiz için tahsis edilen bütçe gerekli olan her malzemenin alınabilmesi için kurulan plan dahilinde kullanıldığından, hidroliz kiti satışa sunulan en cüzi haliyle satın alındı. En optimum hidroliz prosedürünü oluşturmak için asıl çalışmadan önce denemelerin de gerçekleştirilmesi dolayısıyla elimizdeki enzim gerçek örneklerden üçüne yetmedi. Bundan dolayı başta 28 örnek olarak planlanan çalışmamıza, 25 örnek ile devam edildi. Ayrıca yine aynı sıkıntı nedeniyle örneklerin hidrolizi yalnızca birer tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Bu durum bizim çalışmamızın kısıtlılığıdır. İleride gerçekleştirilecek olan çalışmalar için yöntemin tam validasyonu açısından örneklerin hidroliz prosedürleri en az üçer tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmelidir.

Godderis ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada LC-MS/MS kullanılarak, sağlıklı gönüllülerden alınan kan ve tükürük örneklerinde global DNA metilasyonu ve hidroksimetilasyonu analizi yapılmıştır. Bu çalışmada yer alan gönüllülerin her biri 45 yaşın altında yaşlara sahiptir. Çalışmanın bulgular kısmında yaş faktörünün sonuçlar üzerinde bir etkisinin olmadığı fakat çalışmada bir yaş sınırı olduğu hususunda kesin bir yargıya varılamayacağı belirtilmiştir (12). Godderis ve ark. tarafından yapılan bu çalışmada eksik olan yaş grupları arasındaki karşılaştırmayı yapabilmek ve daha kesin sonuçlar elde etmek için yaş aralığını genişletmek amacıyla, çalışmamızda yer alan gönüllülerin yaş aralığı 45 yaşın altında ve üstünde olmak üzere iki grup olarak belirlendi. İki grup arasında sınır olarak 45 yaşın baz alınması, örneklem grubumuzdaki ortalama yaşın ~43, medyanın 44.5 olması ve 45 yaş altı için Godderis ve ark. tarafından yapılan çalışmadaki verilerin referans olarak değerlendirilebilecek olmasıdır. Ayrıca yine aynı çalışmanın bulgularında cinsiyet faktörünün biyolojik materyallerdeki DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeyleri için anlamlı bir farklılık yaratmadığı çıkarımı yapılmıştır. Bu çalışma referans alınarak çalışmamıza dahil edilen gönüllülerin cinsiyet açısından dağılımına önem verilmedi (12).

Bu çalışmanın amacı DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeylerinin eş zamanlı olarak analiz edilmemesine olanak sağlayacak analitik bir yöntem geliştirmektir. Tüm dünyada metilasyon analizleri için altın standart olarak tanınan LC-MS/MS, ülkemizde bu amaçla henüz kullanılmamıştır. Bu durumun yapılan çalışmalar için büyük bir dezavantaj olduğu düşünüldüğünden, yaptığımız çalışma ile ülkemizdeki bu boşluk doldurulmaya çalışıldı.

Çalışmamızda, kan ve tükürük olarak iki farklı biyolojik materyaldeki DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeylerinin eş zamanlı olarak analiz edilmesine olanak sağlayan bir LC-MS/MS yöntemi geliştirildi. Kan ve tükürük materyallerinin epigenetik araştırmalarda birbirlerinin alternatifi olarak kullanılabilirliği değerlendirilerek, ileriki çalışmalar için önemli olabilecek bulgular ortaya kondu. Böylelikle literatür bilgisi ile uyumlu sonuçların ortaya çıktığı, analiz süresi kısa (5 dk), düşük tayin limitli, doğrusallık ve seçiciliğe sahip olan bir yöntem geliştirildi ve gelecekteki epigenetik araştırmalar için yol gösterici olacak çıkarımlar ortaya kondu.

Çalışmamızda geliştirdiğimiz yöntemin valide hale gelebilmesi için tüm validasyon parametrelerinin çalışılması gerekir. Elde edilen bütün bulguların daha doğru şekilde yorumlanabilmesi için daha geniş yaş aralığında ve daha fazla kişi ile çalışılmalıdır. Ayrıca kan ve tükürük için olduğu gibi diğer farklı biyolojik materyaller de çalışılarak, bu materyallerin metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeyleri hakkındaki literatür bilgisi genişletilebilir. Çalışmamızda sigara kullanmayan, sağlıklı bireylere yer verilmiş ve sağlık açısından bir inceleme yapılmamıştır. İleriki çalışmalar için örneklem grubunda böyle bir ayırım da yapılarak çalışmanın bulguları genişletilebilir. Bu çalışma, ülkemizde LC-MS/MS kullanılarak DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon analizinin yapıldığı ilk çalışma olup, geliştirilen yöntemin yukarıda bahsettiğimiz hususlar dahilinde yapılan yeni çalışmalarla ülkemizde metilasyon analizi için kullanılabilecek rutin bir yöntem haline gelebileceği düşünülmektedir.

6. Kaynaklar

1. Yokuş, B. Epigenom ve epigenetik . Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2013; (1) , 5-13 . Alıntı: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/duvetfd/issue/31342/342248>.
2. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. Seminars in reproductive medicine 2009; 27(5), 351–357.
3. <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/howgeneswork/epigenome> (Son Erişim Tarihi: 3 Eylül 2021).
4. Jin, B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?. Genes & cancer 2011; 2(6), 607–617.
5. Weinhold B. Epigenetics: the science of change. Environmental health perspectives 2006; 114(3), A160–A167.
6. <https://www.azolifesciences.com/article/What-is-Forensic-Epigenetics.aspx> (Son Erişim Tarihi: 4 Eylül 2021)
7. 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 science international: Genetics 2017; 28, 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.02.009>
8. Silva DSBS, Antunes J, Balamurugan K, Duncan G, Alho CS, McCord B. Developmental validation studies of epigenetic DNA methylation markers for the detection of blood, semen and saliva samples. Forensic Science International: Genetics 2016; 23, 55–63. doi:10.1016/j.fsigen.2016.01.017
9. Xu J, Fu G, Yan L, Craig JM, Zhang X, Fu L ve ark. LINE-1 DNA methylation: A potential forensic marker for discriminating monozygotic twins. Forensic Science International: Genetics 2015; 19, 136–145. doi:10.1016/j.fsigen.2015.07.014

10. Nakagawa T, Wakui M, Hayashida T, Nishime C, Murata M. Intensive optimization and evaluation of global DNA methylation quantification using LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2019; 411. doi:10.1007/s00216-019-02115-3.
11. Liu J, Hesson L, Ward R. Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for the Measurement of Global DNA Methylation and Hydroxymethylation. *Journal of Proteomics & Bioinformatics* 2013; 01. 10.4172/jpb. S2-005.
12. Godderis L, Schouteden C, Tabish A, Poels K, Hoet P, Baccarelli AA, Van Landuyt K. Global Methylation and Hydroxymethylation in DNA from Blood and Saliva in Healthy Volunteers. *BioMed research international*, 2015, 845041. Alıntı: <https://doi.org/10.1155/2015/845041>
13. Winchester, A. (2020, Mayıs 15). genetics. *Encyclopedia Britannica*. Alıntı: <https://www.britannica.com/science/genetics>
14. https://www.bioexplorer.net/history_of_biology/genetics/ (Son Erişim Tarihi: 21 Ocak 2022)
15. Gayon J. From Mendel to epigenetics: History of genetics. *Comptes rendus biologies* 2016; 339(7-8), 225–230. Alıntı: <https://doi.org/10.1016/j.crv.2016.05.009>
16. Dahm, R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics* 2007; 122(6), 565–581. doi:10.1007/s00439-007-0433-0
17. Harvey ZH, Chen Y, Jarosz DF. Protein-Based Inheritance: Epigenetics beyond the Chromosome. *Molecular cell* 2018, 69(2), 195–202. Alıntı: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.030>
18. Peixoto P, Cartron PF, Serandour AA, Hervouet E. From 1957 to Nowadays: A Brief History of Epigenetics. *International journal of molecular sciences* 2020; 21(20), 7571. Alıntı: <https://doi.org/10.3390/ijms21207571>

19. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A landscape takes shape. *Cell* 2007;128:635–638. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.006.
20. Nicoglou A, Merlin F. Epigenetics: A way to bridge the gap between biological fields. *Studies in history and philosophy of biological and biomedical sciences* 2017, 66, 73–82. Alıntı: <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2017.10.002>
21. Al Aboud NM, Tupper C, Jialal I. Genetics, Epigenetic Mechanism. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls 2022 Ocak . Alıntı: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532999/>
22. Syedmoradi L, Esmaeili F, Norton M. Towards DNA methylation detection using biosensors. *The Analyst* 2016; 141. 5922-5943. doi: 10.1039/c6an01649a.
23. Yan M, Matouk C, Marsden P. Epigenetics in the Vascular Endothelium. *Journal of applied physiology* 2010; 109. 916-26. doi: 10.1152/jappphysiol.00131.2010.
24. Tammen SA, Friso S, Choi SW. Epigenetics: the link between nature and nurture. *Molecular aspects of medicine* 2013; 34(4), 753–764. Alıntı: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.018>
25. Mukherjee K, Twyman R, Vilcinskas A. Insects as models to study the epigenetic basis of disease. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2015; 431. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.009.
26. <https://www.illumina.com/techniques/popular-applications/epigenetics/dna-methylation-analysis.html> (Son Erişim Tarihi: 15 Şubat 2022)
27. Kurdyukov S, Bullock, M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology* 2016; 5(1), 3. Alıntı: <https://doi.org/10.3390/biology5010003>
28. <https://www.eag.com/techniques/mass-spec/lc-ms-ms/> (Son Erişim Tarihi: 19 Şubat 2022)

29. <https://www.aacc.org/cln/articles/2015/july/liquid-chromatography-tandem-mass-spectrometry> (Son Erişim Tarihi: 19 Şubat 2022)
30. <https://www.chromatographyonline.com/view/flying-high-with-sensitivity-and-selectivity-gc-ms-to-gc-ms-ms> (Son Erişim Tarihi: 19 Şubat 2022)
31. Li X, Franke AA. High-throughput and cost-effective global DNA methylation assay by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2011; 703(1), 58–63. doi:10.1016/j.aca.2011.07.014
32. PENG SY, Zhang J, Tian M, WANG ZL, Shen H. Determination of Global DNA Methylation in Biological Samples by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 2012; 40. 1201–1206. doi:10.1016/S1872-2040(11)60566-5.
33. Tammen SA, Dolnikowski GG, Ausman LM, Liu Z, Kim KC, Friso S, Choi SW. Aging alters hepatic DNA hydroxymethylation, as measured by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of cancer prevention* 2014; 19(4), 301–308. Alıntı: <https://doi.org/10.15430/jcp.2014.19.4.301>
34. Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. *Sci Adv.* 2016;2(7):e1600584. doi:10.1126/sciadv.1600584
35. Lee HY, Park MJ, Choi A, An JH, Yang WI, Shin KJ. Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. *International journal of legal medicine* 2012;, 126(1), 55–62. Alıntı: <https://doi.org/10.1007/s00414-011-0569-2>
36. Gauthier QT, Cho S, Carmel JH, McCord BR. Development of a body fluid identification multiplex via DNA methylation analysis. *ELECTROPHORESIS* 2019; 40: 2565-2574. Alıntı: <https://doi.org/10.1002/elps.201900118>

37. Vidaki A, Kayser M. From forensic epigenetics to forensic epigenomics: Broadening DNA investigative intelligence. *Genome Biology* 2017; 18. doi: 10.1186/s13059-017-1373-1.
38. Lacal I, Ventura R. Epigenetic Inheritance: Concepts, Mechanisms and Perspectives. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2018; 11. doi:10.3389/fnmol.2018.00292
39. Eser B, Sepici Dinçel A. Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Journal of Health Services and Education* 2018; 2(2): 51-57. doi: 10.26567/JOHSE.2018250150
40. <https://arum.ogu.edu.tr/Sayfa/Index/72/sivi-kromatografi-kutle-spektrometresi-lc-msms> (Son Erişim Tarihi: 12 Mayıs 2022)
41. Fauque P. Ovulation induction and epigenetic anomalies. *Fertility and Sterility* 2013; 99(3): 616–23. Alıntı: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.047>
42. Orcan S. Epigenetik ve Epigenomik (2006) [PDF belgesi]. Alıntı: https://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_epigenetik.pdf
43. Kürtüncü M, Eraksoy M. Multipl Skleroz: Epigenetik Bir Hastalık Olabilir mi? *Nöropsikiyatri Arşivi* 2008; 45: 15-20.
44. İzmirli M. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. *Van Tıp Dergisi* 2013; 20(1): 48-51.
45. Bora G, Yurter HE. Epigenetik Hastalıklar ve Tedavi Yaklaşımları. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2007; 38: 48-54. Alıntı: <https://studylibtr.com/doc/1004952/epigenetik-hastaliklar-ve-tedavi-yaklasimlari>
46. Güneş S, Kulaç T. Epigenetiğin Spermatogenezdeki Rolü. *Turkish Journal of Urology* 2013; 39(3): 181-187. doi:10.5152/tud.2013.037
47. Akkaya ZY, Dinçer P. Tedavi Yaklaşımlarında Yeni BirDönem: Kodlamayan RNA’lar ve hastalıklar. *Marmara Medical Journal* 2013; 26: 5-10. doi: :10.5472/MMJ.2012.02596

48. Güzelgöl F, Aksoy K. Kodlanmayan Rna'ların İşlevi ve Tıpta Kullanım Alanları. Archives Medical Review Journal 2009;18(3): 141-155. Alıntı: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/25402>
49. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature 2004; 429(6990):4 57-463. doi:10.1038/nature02625
50. İzmirli M, Tufan T, Alptekin D. DNA Metilasyonu. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi (Archives Medical Review Journal) 2012; 21(4): 274-282. Alıntı: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/aktd/issue/2210/29389>
51. Nestler EJ. Epigenetic mechanisms of drug addiction. Neuropharmacology 2014; 76 Pt B(0):259-268. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.004
52. Güçlü Geyik F, Erginel Unaltuna N. Obezitede Epigenetik Mekanizmalar. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi 2014; 3 (6) , 7-16 . Alıntı: <https://dergipark.org.tr/en/pub/iudtaed/issue/8975/111957>
53. Eser BE, Yazgan ÜC, Gürses SA, Aydın M. Diabetes Mellitus ve Epigenetik Mekanizmalar. Dicle Tıp Dergisi 2016; 43 (2): 375-382. doi: 10.5798/diclemedj.0921.2016.02.0700
54. Baransel Isır A. Adli Hekimlikte Yaş tayini. Koç S, Can M, editörler. Birinci Basamakta Adli Tıp. İstanbul: İstanbul Tabip Odası, 2009; 222-234.
55. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. 2002;16(1):6-21. doi:10.1101/gad.947102
56. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. Nat Rev Genet. 2013;14(3):204-220. doi:10.1038/nrg3354
57. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(6):3740-3745. doi:10.1073/pnas.052410099

58. Gupta R, Nagarajan A, Wajapeyee N. Advances in genome-wide DNA methylation analysis. *Biotechniques*. 2010;49(4):iii-xi. doi:10.2144/000113493
59. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*. 1982;10(8):2709-2721. doi:10.1093/nar/10.8.2709
60. <https://www.eurisotop.com/2-deoxycytidine> (Son Erişim Tarihi: 18 Mayıs 2022)
61. Hışıl Y. Kromatografide iç standart tekniği. *Gıda* 1985 Mart; 10(2): 105-110. Alıntı: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/78808>
62. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/d3-Ephedrine> (Son Erişim Tarihi: 18 Mayıs 2022)
63. Zhang L, Zhang L, Zhou K, Ye X, Zhang J, Xie A ve ark. Simultaneous determination of global DNA methylation and hdyroxymethylation levels by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Biomolecular Screening* 2012; 17(7), 877-884.
64. Tsuji M, Matsunaga H, Jinno D, Tsukamoto, Suzuki N, Tomioka Y. A validated quantitative liquid chromatography-tandem quadropole mass spectrometry method for monitoring isotopologues to evaluate global modified cytosine ratios in genomic DNA. *Journal of Chromatography B* 2014; 953-954, 38-47.
65. Le T, Kim K, Fan G, Faull KF. A sensitive mass spectrometry method for simultaneous quantification of DNA methylation and hydroxymethylation levels in biological samples. *Analytical Biochemistry* 2011; 412, 203–209. doi: 10.1016/j.ab.2011.01.026
66. Gosselt HR, Griffioen PH, van Zelst BD, Oosterom N, de Jonge R, Heil SG. Global DNA (hydroxy)methylation is stable over time under several storage conditions and temperatures. *Epigenetics* 2021;16(1):45-53. doi:10.1080/15592294.2020.1786318

67. Eurachem. Analitik Metotların Amaca Uygunluğu, Metodun Geçerli Kılınması ve İlgili Konular için Laboratuvar Kılavuzu 2.baskı (Türkçe Çeviri), 2018
68. Yılmaz A., TURKLAB Rehber 01: Kimyasal analizlerde metot validasyonu ve verifikasyonu (2013) 2. Revizyon, Kalibrasyon ve Deney Laboratuvarları Derneği, İstanbul
69. Kok RM, Smith DE, Barto R, Spijkerman AMW, Teerlink T, Gellekink HJ ve ark. Global DNA methylation measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: analytical technique, reference values and determinants in healthy subjects. Clin Chem Lab Med 2007;45(7):903-911. doi:10.1515/CCLM.2007.137

EKLER**EK-1 Etik Kurul Onay Formu**

EK-2 Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

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

1. “Metilasyon-Hidroksi Metilasyon Tayini İçin LC-MS/MS İle Yöntem Geliştirilmesi” adlı bu çalışma bir araştırma olup, akademik amaçla yapılmaktadır.

2. Araştırmanın amacı:

DNA metilasyonu adli bilimler için de çok önemli olan, adli uygulamalarda epigenetik belirteç testlerini kullanma üzerine yapılan araştırma ve çalışmalarla her geçen gün önemini daha da artıran bir belirteçtir. Fakat genelde metilasyon analizi için kullanılması gereken yöntemler uğraştırıcı ve pahalı olmakta, ayrıca kararlılık ve yeniden üretilebilirlik açısından eksiklikler içermektedir. Bu nedenle yapılacak olan çalışmada LC-MS/MS yöntemi tercih edilerek bu eksiklikleri gidermek amaçlanmaktadır. Bu çalışmada LC-MS/MS kullanılarak, insan vücudunun farklı dokularındaki DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeylerinin eş zamanlı olarak araştırılması için bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Biyolojik materyal olarak kan ve tükürük tercih edilecek, hem aynı doku içindeki hem de dokular arasındaki korelasyon, metilasyon ve OH-metilasyon düzeyleri açısından incelenecektir. Böylece bu iki biyolojik materyalin epigenetik araştırmalarda birbirlerinin alternatif olarak kullanılabilirliği değerlendirilecektir. Ayrıca dokulardaki metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeyleri de karşılaştırılarak, her iki epigenetik uç nokta için anlamlı bir ilişkinin olup olmadığı araştırılacaktır. Böylelikle kromatografik bir yöntem geliştirilerek epigenetik araştırmaların analitik sistemler yardımı ile araştırılmasına yeni bir boyut kazandırılmış olacaktır.

3. Araştırmada uygulanacak tedaviler:

Araştırmanın deneysel kısmında, 14 gönüllüden alınacak kan ve tükürük örneklerinin çalışılması planlanmaktadır. Gönüllülerden kan ve tükürük örneği almak dışında hiçbir müdahale yapılmayacak veya tedavide bulunulmayacaktır.

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

Gönüllülere herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.

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

Araştırma sırasında gönüllülere invaziv yöntemler uygulanmayacaktır. Araştırmada, çalışmaya rıza gösteren 14 kişiden enstitü hemşiresi tarafından K3 EDTA'lı hemogram tüplerine 2 ml periferik kan örneği ve tükürük örneği alınacaktır.

6. Gönüllünün sorumlulukları:

Gönüllünün bu çalışmayla ilgili kan ve tükürük örneği vermekten başka hiçbir yükümlülüğü yoktur.

7. Araştırmanın deneysel kısımları:

Bu çalışmada, çalışmaya rıza gösteren gönüllülerden oluşan 14 kişiden alınan kan ve tükürük örnekleri kullanılacaktır. Araştırmanın laboratuvar aşamasında ise Toplanan örneklerden ticari kit kullanılarak DNA izolasyonu yapılacaktır. Daha sonra hazırlanan örnekler LC-MS/MS'de analiz edilecektir.

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

Gönüllüden kan ve tükürük örneği alınacaktır. Kan ve tükürük örneği alınmasının hiçbir riski yoktur.

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

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

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

Gönüllüye herhangi bir girişim ya da tedavide bulunulmayacaktır.

11. İlgi mevzuat gereğince gerekiyorsa, gönüllüye verilecek tazminat veya sağlanacak tedaviler:

Gönüllülere yapılacak işlem tükürük örneği ve kan örnekleri almak olup bu işlem sırasında katılımcılarda doğabilecek hukuki ve mali riskleri proje yürütücüsü olarak tamamen üstlendiğimi bildiririm.

12. Varsa, gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler hakkındaki bilgiler:

Gönüllüler için herhangi bir ulaşım, yemek veya başka bir masraf ödenmeyecektir.

13. Gönüllünün araştırmaya katılımının isteğe bağlı olduğu ve gönüllünün istediği zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkını kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebileceği veya araştırmadan çekilebileceği:

Gönüllünün araştırmaya katılımı isteğe bağlı olup, istediği zaman herhangi bir yaptırıma maruz kalmaksızın araştırmadan çekilebilecektir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcı araştırma dışı bırakılabilir.

14. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimlerinin bulunabileceği, ancak bu bilgilerin gizli tutulacağı, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla gönüllü veya yasal temsilcisinin söz konusu erişime izin vermiş olacağı:

İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Bakanlık ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimleri olaaktır. Ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.

15. İlgili mevzuat gereğince gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanamayacağı; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliğinin gizli kalacağı:

İlgili mevzuat gereğine gönüllünün kimliği ile ilgili kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanamayacağı; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliği gizli kalacaktır.

16. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya yasal temsilcisinin zamanında bilgilendirileceği:

Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya yasal temsilcisinin zamanında bilgilendirileceğini taahhüt ederim.

17. Gönüllünün araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler ile bunlara günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları:

Gönüllünün araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir bilgi temin edebilmesi için proje yürütücüsü Doç. Dr. SELDA MERCAN'na ait günün 24 saatinde ulaşabileceği email adresi:

18. Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:

Gönüllünün biyolojik örneğinden herhangi bir nedenle DNA elde edilememesi durumunda katılım sona erdirilir.

19. Gönüllünün araştırmaya devam etmesi için öngörülen süre:

Gönüllüden kan ve tükürük örneği alındıktan sonra hiçbir sorumluluğu olmayacaktır. Gönüllünün biyolojik örnekleri çalışma süresince (18 ay) saklanacak olup, çalışma sonuçlanınca imha edilecektir.

20. Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı:

Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı, çalışmaya rıza gösteren yaklaşık 14 kişi olacaktır.

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

Gönüllülerden alınacak olan kan ve tükürük örneğinden DNA izolasyonu yapılacak ve LCMS/MS kullanılarak, metilasyon ve hidroksi metilasyon profilleri elde edilecektir. Araştırmacı tarafından gönüllülerden tıbbi personel yönetiminde ve denetiminde gerekli örnekler alınacaktır. Çalışma, İ.Ü Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü öğrenci laboratuvarında yapılacaktır ve gönüllülerden alınacak biyolojik materyal araştırma konusu olan çalışmanın optimizasyonu için kullanılacaktır.

22. Biyolojik materyallerin analizlerinin yurtdışında yapılıp yapılmayacağı hususunun açıklanması:

Biyolojik materyallerin analizleri kesinlikle yurtdışında yapılmayacak olup; çalışma, İ.Ü.C. Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü laboratuvarlarında yapılacaktır.

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

24. “Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.” İfadesi gönüllünün kendi el yazısı ile yazılacaktır.

25. Gönüllünün adı / soyadı / imzası / tarih

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

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

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

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

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

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

““Metilasyon-Hidroksi Metilasyon Tayini İçin Lc-Ms/Ms İle Yöntem Geliştirilmesi”” adlı araştırma kapsamında alınan kan ve tükürük örneğinin (Gönüllü tarafından uygun olan şık işaretlenmelidir)

- ☐ Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.”

Gönüllünün Adı:

Yetkin Araştırmacının Adı:

Gönüllünün Soyadı:

Yetkin Araştırmacının İmzası:

Gönüllünün Doğum Tarihi:

Sigara Kullanımı ☐ **Alkol Kullanımı** ☐

Gönüllünün İmzası:

Tarih:

30. Ayrıca, BGOF, gönüllü veya kanuni temsilcisinin yasal haklarını ortadan kaldıracak bir hüküm veya ifade içeremez ayrıca araştırmacıyı, kurumu, destekleyici veya bunların temsilcilerini kendi ihmallerinden kaynaklanan herhangi bir yükümlülüğünden kurtaracak hüküm veya ifade taşıyamaz.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Aleyna İLHAN

Doğum Yeri ve Tarihi:

E-posta :

Eğitim Bilgileri

2019-2022: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü (Tezli Yüksek Lisans Programı)

2015-2019: Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (Lisans Programı)

İş Tecrübesi

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, (Temmuz-Ağustos) 2018, Stajyer.