

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

Danışman
Doç. Dr. Gönül Filoğlu

YAŞ TAYİNİNDE KULLANILAN DNA METİLASYON BELİRTEÇLERİNİN
YAPAY OLUŞTURULMUŞ OLAY YERİ KAN ÖRNEKLERİNDE
UYGULANABİLİRLİĞİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG BÖRTE MÜGE ŞAŞMAZ

İSTANBUL, 2024

ÖNSÖZ

Tezime başladığım günden itibaren bilgi birikimini benimle paylaşan ve yanımda olan danışman hocam Doç. Dr. Gönül Filoğlu'na,

Laboratuvar deneyleri süresince her daim yanımda olan ve benimle beraber çalışan Laborant Hüsamettin Kılıç ve Molelökler Biyolog Zehra Abik'e, aynı zamanda laboratuvar aşamalarını öğreten ve bilgi birikimini benimle paylaşan Biyolog Kadriye Can'a,

Örnek hazırlama sürecinde ve her daim yanımda olan Özel İzmir Ege Laboratuvarı çalışanlarına ve tüm gönüllülerime,

Tez yazım süreci ve tüm akademik hayatım boyunca hep yanımda olmuş, moralimi yükseltmiş ve beni motive etmiş olan Biyolog Mehtap Özbek ve Dr. Ozan Şentürk, Seçil Uyar ve tüm arkadaşlarıma,

Tüm destekleri ile hep yanımda durmuş olan canım annem Şükran Şaşmaz, canım ablam Begüm Yeşildağ ve tüm aileme,

Bu kariyeri ve mesleği seçmemde en büyük etkisi olan, başarılarını okuyarak büyüdüğüm ve kalbimde hep bir yara olarak kalacak olan, uzaktan da olsa en büyük motivasyon kaynağım olan babam Doç. Dr. Ergun Şaşmaz'a sonsuz teşekkür ederim.

Börte Müge ŞAŞMAZ

İstanbul, Ocak, 2024

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER	iv
TABLolar DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vii
ÖZET VE ANAHTAR KELİMEler	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. ADLİ GENETİK VE DNA.....	7
2.2. EPİGENETİK	9
2.2.1. EPİGENETİK MEKANİZMALAR.....	11
2.2.2. DNA METİLASYONU	14
2.3. YAŞLANMA VE ADLİ BİLİMLERDE YAŞ TAYİNİ	16
2.3.1. DNA METİLASYONU İLE YAŞ TAYİNİ	18
2.4. ADLİ OLAY YERİ ÖRNEKLERİ.....	20
2.5. FARKLI MATRİKSLERDEN DNA İZOLASYONU	20
2.6. DNA DEGRADASYONU	21
2.6.1. ÇEVRESEL FAKTÖRLER VE DNA DEGRADASYONUNUN ADLİ ÖRNEKLERE ETKİSİ22	
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Deneyde Kullanılan Araç, Gereç ve Malzemeler	27
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	27
3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler	28
3.2. Yapay Olay Yeri Numunelerinin Hazırlanması.....	28
3.2.1. Fayansların Hazırlanması	28
3.2.2. Kumaşların Hazırlanması	29
3.2.3. Bıçakların Hazırlanması	30
3.2.4. Çevresel Koşulların Uygulandığı Örneklerin Hazırlanması.....	30
3.2.5. Kontrol Grubunun Hazırlanması	31
3.3. Uygulanan Laboratuvar Aşamaları	31
3.3.1. DNA İzolasyonu.....	31
3.3.2. Florometrik Yöntem ile DNA Miktar Tayini	35
3.3.3. Bisülfid Dönüşüm Protokolü.....	36
3.3.4. PCR Aşamaları.....	37
3.3.5. Agaroz Jel Elektrophorezi.....	39
3.3.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	40
3.3.7. SNaPshot Reaksiyonu.....	40
3.3.8. SNaPshot Ürünlerinin Saflaştırılması.....	41
3.3.9. PCR Ürünlerinin Kapiler Elektrophorezi	42
3.3.10. Verilerin Analizi ve Yaş Hesaplanması.....	42
4. BULGULAR	44
4.1. DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini	44

4.2. Bisülfid Dönüşümü ve PCR Aşaması	45
4.3 Kapiller Elektroforez Aşaması.....	46
4.4 İstatiksel Analiz.....	47
4.5. Yaş Tahmini	54
4.6. Çevresel Faktörlerin Etkisi.....	56
4.6.1. UV Etkisi	56
4.6.2. Sıcaklık Etkisi.....	58
4.6.3. İndigo Etkisi	60
4.6.4. Hümik Asit Etkisi	63
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	66
5.1. Yüzeylerarası Farklılıklar ve Bekleme Süresinin Yaş Tahmin Paneline Etkisi.....	68
5.2. İnhibitörlerin DNA Metilasyonu Yaş Tahmin Paneline Etkileri	69
5.3. UV ve Isı'nın DNA Metilasyonu Yaş Tahmin Paneline Etkileri.....	72
6. KAYNAKLAR.....	75
EKLER	88
ÖZGEÇMİŞ	89

ŞEKİLLER

Şekil 1: DNA'nın Yapısı (18)	8
Şekil 2: Epigenetik Mekanizmalar (30)	10
Şekil 3: Epigenetik Mekanizmaların Şematik Gösterimi (35)	12
Şekil 4: Histon Modifikasyonları (38).....	13
Şekil 5: DNA Metilasyonu (53)	15
Şekil 6: DNA Metilasyonunda CpG Adacıkları (57)	15
Şekil 7: Fayans Örneklerinin Görüntüsü.	29
Şekil 8: Kumaş Örneklerinin Görüntüsü.	29
Şekil 9: Bıçak Örneklerinin Görüntüsü.	30
Şekil 10: Metilasyon oranı hesaplama formülü.....	42
Şekil 11: Agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	46
Şekil 12: Kapiler elektroforez sonucu multipleks yaş paneline ait elde edilen T2023-XX-01 numaralı örneğin elektroforegram görüntüsü.....	47
Şekil 13: T2023-XY-02 numaralı örneğin 15 dakikalık UV maruziyeti elektroforegram görseli.	57
Şekil 14: T2023-XY-01 numaralı örneğin 30 dakikalık UV maruziyeti elektroforegram görseli.	57
Şekil 15: T2023-XX-03 numaralı örneğin 60 dakikalık UV maruziyeti elektroforegram görseli.	58
Şekil 16: T2023-XY-01 numaralı örneğin 95 °C'ye 10 dakikalık maruziyeti elektroforegram görseli.	59
Şekil 17: T2023-XY-02 numaralı örneğin 95 °C'ye 15 dakikalık maruziyeti elektroforegram görseli.	60
Şekil 18: T2023-XX-01 numaralı örneğin 4mM indigo elektroforegram görseli.....	61
Şekil 19: T2023-XX-03 numaralı örneğin 10mM indigo elektroforegram görseli.....	62
Şekil 20: T2023-XX-01 numaralı örneğin 50mM indigo elektroforegram görseli.....	62
Şekil 21: T2023-XY-02 numaralı örneğin 100mM indigo elektroforegram görseli.....	63
Şekil 22: T2023-XY-02 numaralı örneğin 100 ng/μL hümkik asit elektroforegram görseli.	64
Şekil 23: T2023-XX-03 numaralı örneğin 125 ng/μL hümkik asit elektroforegram görseli.	65

TABLolar DİZİNİ

Tablo I: Kullanılan inhibitör konsantrasyonları	31
Tablo II: Termal Döngü Cihazı Koşulları	36
Tablo III: Yaş tahmininde kullanılan gen bölgeleri	38
Tablo IV: PCR’da kullanılan bileşenler ve miktarları.....	38
Tablo V: PCR Koşulları	39
Tablo VI: Saflaştırma İşlemi -PCR Bileşenleri ve PCR koşulları.....	40
Tablo VII: SNaPshot PCR Bileşenleri	41
Tablo VIII: SNaPshot PCR Koşulları	41
Tablo IX: 2. Saflaştırma İşlemi-PCR Bileşenleri.....	41
Tablo X: Saflaştırma İşlemi-PCR Koşulları.....	41
Tablo XI: Formamid-Liz120 Karışımı ve Kapiller Elektrophorez Örnek Hazırlaması.....	42
Tablo XII: Kapiler Elektrophorez Koşulları	42
Tablo XIII: DNA İzolatları ve DNA Miktarları.....	45
Tablo XIV: Taze Kanların Metilasyon Değerleri.....	49
Tablo XV: Fayans Örneklerin Metilasyon Değerleri	49
Tablo XVI: Bıçak Örneklerinin Metilasyon Değerleri.....	50
Tablo XVII: Kumaş Örneklerinin Metilasyon Değerleri	51
Tablo XVIII: Farklı Sürelerde UV Işınlara Maruz Bırakılmış Örneklerin Metilasyon Değerleri.....	52
Tablo XIX: Farklı Sürelerde 95 °C’ye Maruz Bırakılmış Örneklerin Metilasyon Değerleri ..	52
Tablo XX: Farklı Konsantrasyonlarda İndigo İlave Edilmiş Örneklerin Metilasyon Değerleri	53
Tablo XXI: Farklı Konsantrasyonlarda Hüyük Asit İlave Edilmiş Örneklerin Metilasyon Değerleri.....	53

Tablo XXII: Kontrol Grubu Kronolojik yaş ve DNA Metilasyon Yaşı.....	54
Tablo XXIII: T2023-XX-01 Numaralı Örneklerin Kronolojik Yaş ve DNA Metilasyon Yaşı	54
Tablo XXIV: T2023-XY-02 Numaralı Örneklerin Kronolojik Yaş ve DNA Metilasyon Yaşı	55
Tablo XXV: T2023-XX-03 Numaralı Örneklerin Kronolojik Yaş ve DNA Metilasyon Yaşı	55
Tablo XXVI: UV’de Bekletilen Örneklerin DNA Metilasyon Yaşı Karşılaştırması.....	56
Tablo XXVII: 95 °C’ye Maruz Bırakılan Örneklerin DNA Metilasyon Yaşı Karşılaştırması	59
Tablo XXVIII: İndigo İlave Edilen Örneklerin DNA Metilasyon Yaşı Karşılaştırması	61
Tablo XXIX: Hümik Asit İlave Edilen Örneklerin DNA Metilasyon Yaşı Karşılaştırması....	64

KISALTMALAR

ATP: Adenozin Trifosfat

Bç: Baz Çifti

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

DNA_m: DNA Metilasyonu

mRNA: mesajcı RNA

miRNA: mikroRNA

ncRNA: non-coding RNA

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

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)

STR: Kısa Ardışık Tekrarlar (Short Tandem Repeat)

ÖZET VE ANAHTAR KELİMELEER

Son zamanlarda birçok alanda kullanılan epigenetik mekanizmalardan biri DNA metilasyonudur. Adli araştırmalarda, DNA metilasyonu doku/hücre tipi tanımlaması, cinsiyet tayini, yaş tahmini ve monozigotik ikizlerin ayırt edilmesinde kullanılabilmektedir. Son yıllarda yaş tahminiyle ilgili çeşitli araştırmacılar tarafından farklı vücut dokularına özgü yaş tahmin panelleri geliştirilmiştir. Bu çalışmalarda geliştirilen panellerin genellikle farklı çevresel koşullarda çalışılarak olay yerinden gelen örneklerin profillemeye başarıısı test edilmektedir. Çünkü adli vakalarda toplanan biyolojik deliller genellikle eser miktarda, uzun süre beklemiş ve çeşitli çevresel faktörler nedeniyle bozunmuş DNA içerebilmektedir.

Bu tez çalışmasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa-Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü AR-GE laboratuvarında geliştirilen 8 CpG bölgesini içeren yaş tahmin panelinin yaşı farklı 3 kişiden alınan kan örnekleri ile 3 farklı yüzeyde farklı sürelerde bekletilen örneklerdeki başarıısı ve UV, ısı gibi çeşitli çevresel faktörlerin sınır aralıklarının bulunmasının yanında PCR inhibitörlerinin önemli konsantrasyon miktarları tespit edilmiştir. Tasarlanan tüm bu örnekler, geliştirilmiş olan 8 CpG bölgesi (ELOVL2, ASPA, TOM1L1, C1orf132, RASSF5, FHL2, CCDC102B ve cg07082267) yaş tayin modeli ile SNaPshot yöntemi kullanılarak metilasyon profilleri belirlenerek yaş tahmini yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre 6 aya kadar farklı yüzeylerde beklemiş örneklerden yaş tahmin analizi yapılabildiğı, 30 dakika UV'ye maruziyette bir örnek için lokus kayıpları görülmesinden kaynaklı yaş tahmini yapılamamasına rağmen diğere iki örnekte kayıp olmadığı için yaş tahmini yapıldığı, 60 dakika UV'ye maruziyette bir örnek hariç yaş tahmini yapılamadığı, 95 °C'ye 15 dakikalık maruziyette de lokus kayıpları nedeniyle yaş tahmini yapılamadığı görülmüştür. 4mM'dan 100mM'lık indigo konsantrasyonuna kadar çalışılan her konsantrasyonda yaş tahmini yapılırken, hüyük asidin 125 ng/µL konsantrasyonu ve üstünde konsantrasyonlarda yaş

tahmini yapılamamıştır. 100ng/μl hümik asit konsantrasyonunda ise sonuç alınmasına rağmen yaş tahminindeki sapma oranı yüksek olduğu için güvenilir bir sonuç alınamamıştır.

Sonuç olarak elde edilen veriler göz önüne alındığında 6 ay boyunca bekleyen örneklerden sonuç alınabilmektedir. İnhibitörlerin etkisine baktığımızda ise hümik asidin az miktardaki konsantrasyonları bile büyük etki gösterirken indigoda yüksek konsantrasyonlarda dahi sonuç alınabilmiştir. 95 °C'lik ısıya maruziyet ise yaş tahmin analizini UV'ye oranla daha fazla etkilemektedir. Farklı çevresel faktörler açısından daha kapsamlı bir çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: DNA Metilasyonu, Yaş Tayini, Olay Yeri Örnekleri, Çevresel Koşullar

SUMMARY

One of the epigenetic mechanisms that has been used in many fields recently is DNA methylation. In forensic research, DNA methylation can be used in tissue/cell type identification, gender determination, age estimation and discrimination of monozygotic twins. In recent years, age estimation panels specific to different body tissues have been developed by various researchers regarding age estimation. The panels developed in these studies are generally tested under different environmental conditions to test the profiling success of samples from the crime scene. Because biological evidence collected in forensic cases often contains trace amounts of DNA that has been stored for a long time and has been degraded due to various environmental factors.

In this thesis study, the success of the age estimation panel containing 8 CpG sites developed in the R&D laboratory of Istanbul University-Cerrahpaşa-Forensic Medicine and Forensic Sciences Institute on blood samples taken from 3 people of different ages and samples kept on 3 different surfaces for different periods of time and the success of various environmental factors such as UV and heat. In addition to finding limit ranges, significant concentrations of PCR inhibitors have been determined. The age of all these designed samples was estimated by determining their methylation profiles using the SNaPshot method with the developed age determination model with 8 CpG sites (ELOVL2, ASPA, TOM1L1, C1orf132, RASSF5, FHL2, CCDC102B and cg07082267).

According to the results obtained, age estimation analysis was performed on samples stored on different surfaces for up to 6 months. Although age estimation could not be made for one sample due to locus losses observed in 30 minutes of UV exposure, age estimation was made in the other two samples because there was no loss. It was observed that after 60 minutes of exposure to UV, age estimation could not be made except for a single sample, and after 15 minutes of exposure to 95 °C, age estimation could not be made due to locus losses. While age estimation

was made at every concentration examined from 4 mM to 100 mM indigo concentration, age estimation could not be made at humic acid concentrations of 125 ng/μL and above. Although results were obtained at a humic acid concentration of 100ng/μl, a reliable result could not be obtained due to the high rate of deviation in age estimation.

Considering the data obtained, results can also be obtained from samples kept for 6 months. When we look at the effect of inhibitors, even small concentrations of humic acid have a great effect, while results can be obtained even at high concentrations of indigo. Exposure to 95 °C heat affects age estimation analysis more than UV. It is thought that a more comprehensive study should be conducted in terms of different environmental factors.

Keywords: DNA Methylation, Age Determination, Crime Scene Samples, Environmental Conditions

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1940’larda Conrad Waddington tarafından ortaya atılan epigenetik kavramı, genlerin çalışmasını etkileyen fakat DNA yapısında herhangi bir değişiklik gözlemlenmeyen ve gen ekspresyonunu kontrol eden mekanizmalar olarak bilinmektedir (1,2). Çevresel faktörler sonucunda, DNA’nın metilasyonu, çeşitli histon modifikasyonları ve düzenleyici kodlamayan RNA moleküllerinin ekspresyonu (miRNA) gibi epigenetik mekanizmaların katılımıyla popülasyonda bir fenotip spektrumu oluşturulur. Bu mekanizmaların bireylerarası farklılık göstermesi nedeniyle birçok bilimsel alanda yapılan çalışmaların odağına girmeyi başarmıştır (3).

Epigenetik mekanizmaların keşfinden sonra birçok bilim dalında yeni bir çalışma alanı oluşturduğu gibi adli bilimlerin de birçok alanında kullanılmaya başlanmıştır. Adli toksikoloji, adli antropoloji, yaş tayini, soy tayini, monozigot ikizlerin ayrımı, kişinin yaşam alışkanlıkları ve vücut sıvılarının kimliklendirilmesi gibi adli bilimler açısından önem taşıyan birçok alanda epigenetik çalışmalardan yararlanıldığı bilinmektedir (3).

En önemli epigenetik mekanizmalardan biri olan DNA metilasyonu, DNA metiltransferaz (DNMT) enzimi ile CpG adalarında bulunan sitozine bir metil grubunun eklenmesi ile gerçekleşir. CpG adacıklarının metillenmesi ile transkripsiyon faktörlerinin ve transkripsiyon mekanizmalarının fonksiyonu engellendiğinden ilgili gen susturularak ifadesi engellenir (3,4,5).

Epigenetik mekanizmalar fetal dönemde başlar ve yaşam boyunca devam eder. İnsanlar yaşlandıkça, farklı çevresel faktörlere maruz kalmaları sonucunda epigenetik profilleri değişmektedir. (6,7). Son yıllarda yaş tayininde kullanılan birçok gen bölgesindeki CpG alanlarındaki DNA metilasyon seviyelerinin analizine dayalı yaş tayinine yönelik birçok panel ve kit geliştirilmiştir (8,9). Geliştirilen bu panel ve kitlerin adli araştırmalarda aktif olarak kullanılabilmesi için geçerliliklerinin yapılması ve uygulanabilirliğinin ölçülmesi

gerekmektedir. Bu alanda yürütülen çalışmalar genelde seçilen epigenetik belirteçlerin duyarlılığı, insan özgüllüğü ve stabilitesi ile ilgili veri elde etmek, koşullarını ve sınırlamalarını belirlemek için gelişimsel doğrulama çalışmaları yapılması yönündedir. Özellikle de adli örnekler simüle edilip, geliştirilen panelin bozunmuş örneklerdeki başarısını ölçmek adli çalışmalar için büyük önem taşımaktadır. Çünkü adli numuneler genellikle çevresel ve kimyasal saldırılara maruz kalır ve PCR inhibitörleri olarak işlev görebilecek safsızlıklar barındırabilir. Bu nedenle kontrole ve validasyona dayalı çalışmalar, geliştirilen panelin güvenilirliği ve kullanılabilirliği açısından önemlidir (10,11,12,13).

Bu tez çalışmasında, İ.Ü.C Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli genetik AR-GE Laboratuvarında geliştirilen DNA metilasyonu ile yaş tayini panelinin çeşitli çevre koşulları ile degrade olmuş örneklerdeki profillemeye başarısını ölçmektir. Bunun için farklı yaş gruplarında olan bireylerden kan numuneleri toplanarak adli vaka örnekleri simüle edilmiştir (kumaş üstünde, kesici materyal üstünde, çarşaf üstünde vb.). Toplanan örnekler çeşitli çevre koşulları ile (UV, inhibitörler, ısı vb.) degrade edilmiş ve sonrasında analiz edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen veriler yorumlanmış ve geliştirilen panelin adli vakalarda kullanılabilirliği tartışılmıştır.

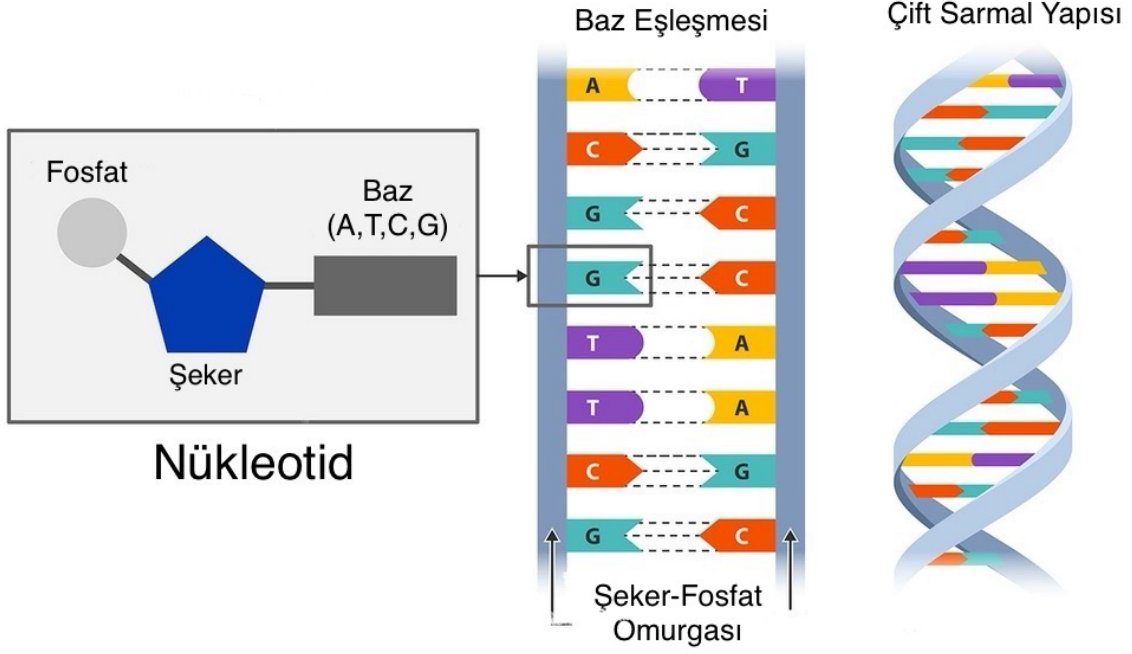
2. GENEL BİLGİLER

2.1.ADLİ GENETİK VE DNA

Adli bir vaka olduğunda en temel amaç, olayı çözümlmek ve suçluları tespit etmektir. Bu nedenle de farklı bilim dallarının ışığında geliştirilen çeşitli yöntem ve tekniklerle adli vakalar çözümlenebilmektedir. Bu alanda en efektif şekilde kullanılan bilim dallarından biri de genetik bilimidir. Adli genetik kapsamında yapılan ve keşfedilen her yeni buluş, adli bilimlerin de olayları çözüp failleri bulmasını hızlandırmaktadır.

Bir adli olgunun çözümlenmesi, ancak olay yerinde bulunan delillerin ışığında gerçekleştirilir. Parmak izi, atış artıkları, iz deliller ve en önemlisi de DNA delillerinin analizi ile fail tespit edilmektedir. Adli genetik açısından en önemli olan deliller ise DNA içeren delillerdir ve elde edilen DNA delillerinden bir DNA profili çıkarmak adli genetikçinin temel amaçlarından biridir (14,15).

Ökaryotlarda hücre çekirdeğinde bulunan DNA, çift sarmallı yapısıyla negatif yüklü bir polinükleotiddir. Bu iki iplik hidrojen bağlarıyla birbirine bağlıdır. DNA'nın temel bileşenleri 5 karbonlu bir şeker olan deoksiriboz, fosfat grubu ve azotlu organik bazlardır (Adenin, Guanin, Sitozin ve Timin) (16,17) (Şekil 1).



Şekil 1: DNA'nın Yapısı (18)

DNA, çevresel etmenler nedeni ile bozunmaya müsait olup çeşitli fiziksel ajanlara ve kimyasal reaksiyonlara maruz kalmaktadır. DNA analizi, suçlar, kitlesel felaketler ve terör saldırıları gibi çeşitli olaylarda insan kimliğinin belirlenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (17). Gelişen teknoloji, yöntem ve teknikler ile kişinin az miktarda bile olsa DNA'sının bulunması ile kimliklendirme yapıp suçlunun tespiti sağlanabilmektedir (15,19,20,21). DNA analizindeki ilerlemeler ve mevcut belirteçlerin sayısının artmasıyla, yüksek oranda hasar görmüş kanıt örneklerinden başarılı DNA profilleri elde edilebilir (22). Fakat şüpheli birinin olmadığı vakalarda elde edilen DNA profili ile karşılaştırılma yapılamamaktadır. O yüzden suçlu tespiti için elde edilen DNA delillerinden fail ile ilgili daha fazla bilgi edinmek gerekmektedir. Son dönemlerde SNP ve DNA metilasyon belirteçleri alanında çalışmalar artmıştır. SNP belirteçleri ile kişinin fiziksel özellikleri (saç rengi, ten rengi, göz rengi, saç yapısı) belirlenmektedir. DNA metilasyon belirteçlerindeki gelişmeler ile kişinin yaşı tayin edilebilmektedir. Tüm bu belirteçler ile belirli bir suçlu olmamasına rağmen şüpheli havuzu daraltılabilir. Bu nedenle DNA ile ilgili yapılan her keşif adli bilimler açısından da önemlidir (23,24,25).

2.2.EPİGENETİK

Yeni bir bilim dalı olmasına rağmen epigenetiğin keşfinden sonra bilim camiasının gözleri epigenetik araştırmalara ve yeni keşiflere yönelmiştir. Epigenetik üzerine yapılan araştırmalar ve keşifler adli bilimlerde de birçok konuyu yeniden araştırmaya itmiştir. Yaş tayini, monozigot ikizlerin ayrımı ve vücut sıvılarının kimliklendirilmesi gibi birçok adli bilimler için önem taşıyan konularda epigenetiğin yeri ve öneminin büyük olduğu görülmektedir.

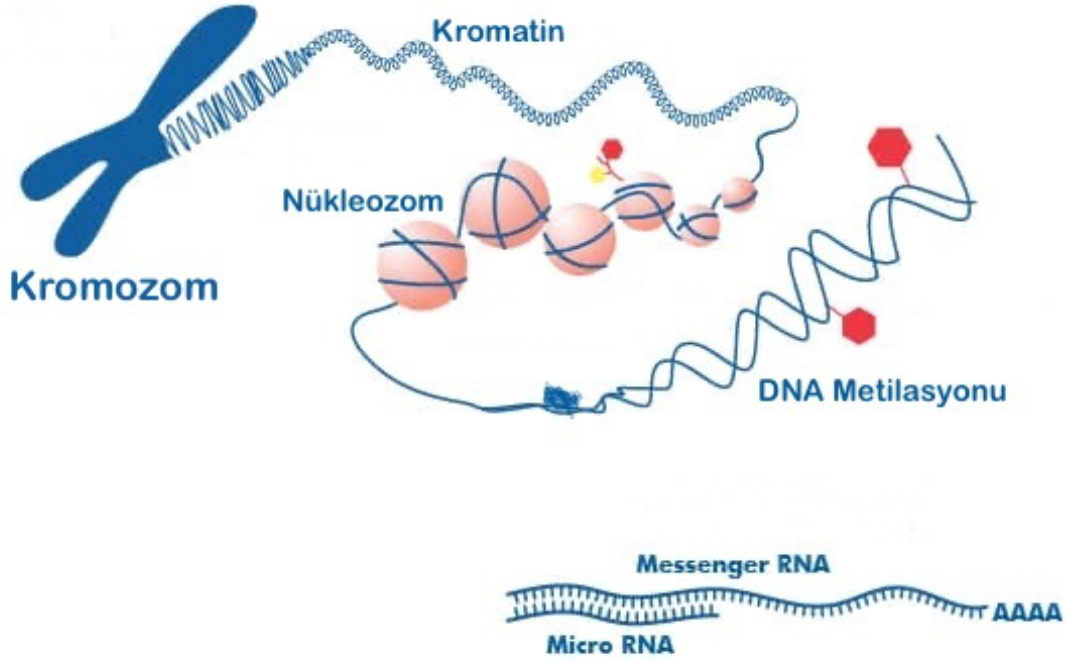
Epigenetik kavramı ilk olarak 1940’larda Conrad Waddington tarafından, gelişim esnasında genotipin fenotipi nasıl oluşturduğunu inceleyen bilim dalı olarak tanımlanmıştır (1,2).

Epigenetik, çevre ve genomu birbirine bağlayan köprüdür ve kısaca DNA dizilimindeki değişikliklerle açıklanamayan gen işlevinde kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanabilir (4).

Diğer bir deyişle, genlerin çalışmasını etkileyen fakat DNA yapısında herhangi bir değişiklik gözlemlenmeyen ve gen ekspresyonunu kontrol eden mekanizmalardır. Bu mekanizmalar, genlerin susturulması veya aktive edilmesinde önemli rollere sahiptir (2). Bu modifikasyonlar kalıtsaldır ve mutasyonlardan farklı olarak geri dönüşümlü olmalarıdır. Kişinin sahip oldukları yaşam alışkanlıkları (beslenme, spor yapma, sigara kullanımı, alkol tüketimi, bağımlılıklar vb.) bireyler arası farklılık gösterir (24,26).

Çevresel faktörler, DNA’nın kovalent modifikasyonu (metilasyon), histonlar ve mikroRNA’lar (miRNA’lar) gibi düzenleyici kodlamayan RNA moleküllerinin ekspresyonu gibi epigenetik mekanizmaların katılımıyla popülasyonda bir fenotip spektrumu oluşturur. Epigenetik mekanizmalardan biri olan DNA’nın metilasyonu, transkripsiyon faktörlerine ve transkripsiyon mekanizmasına bir engel oluşturur. Histon proteinlerinin translasyon sonrası modifikasyonları ise kromatinin yoğunlaşmasını etkiler ve böylece farklı modifikasyonlar ile heterokromatin ve ökromatinleri oluşturur. Kodlanmayan RNA’lardan olan miRNA’lar ise post transkripsiyon aşamasında hedef mRNA’ların bozunmasına yol açarak gen ekspresyonunu belli düzeyde engeller (27) (Şekil 2). Aynı zamanda bu mekanizmalar sayesinde embriyogenez aşamasında

farklı doku ve hücrelerin oluşması sağlanır (24,25,28). Hücrelerin hayatta kalması, büyümesi ve farklılaşması, spesifik genlerin epigenetik durumundaki değişiklikler tarafından düzenlenir (26,29).



Şekil 2: Epigenetik Mekanizmalar (30)

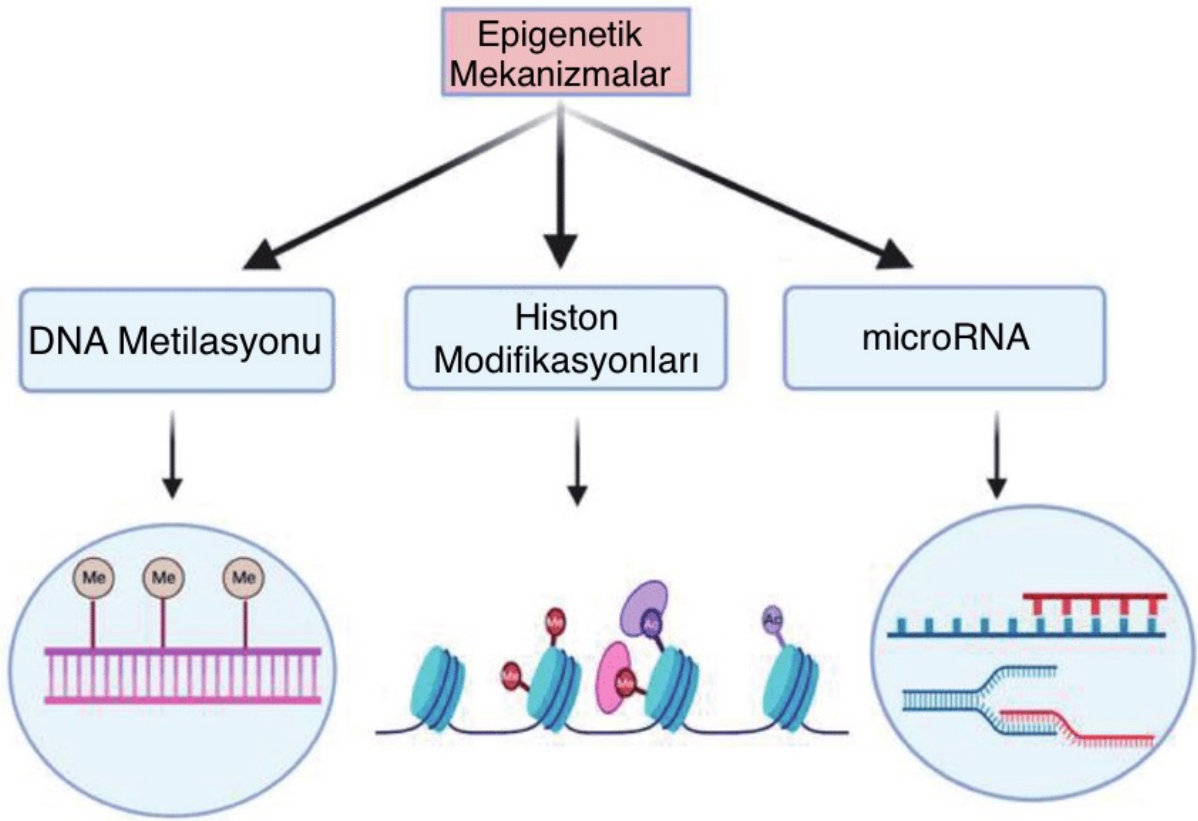
Epigenetik, adli bilimlerde doku tanımlanması ve yaş tayininde kullanıldığı gibi olay yerine yapay olarak bırakılmış sentetik DNA'ların tespitinde de kullanılmaktadır. Sentetik DNA'lar epigenetik profiller ve metilasyon profilleri içermediğinden epigenetik analizler ile ayırt edilebilir (24,31).

Gelecekte, olay yeri izlerinden bir 'Epigenomik Parmak İzi' oluşturulması ve adli vakaların çözümlenmesinin bu izler sayesinde yapılacağı düşünülmektedir (29). Aynı zamanda elde edilen DNA delillerinden kişinin alkol, sigara kullanımı, uyuşturucu bağımlılıkları ve beslenme gibi alışkanlıklarının tespit edileceği düşünülmektedir (24,32).

2.2.1. EPIGENETİK MEKANİZMALAR

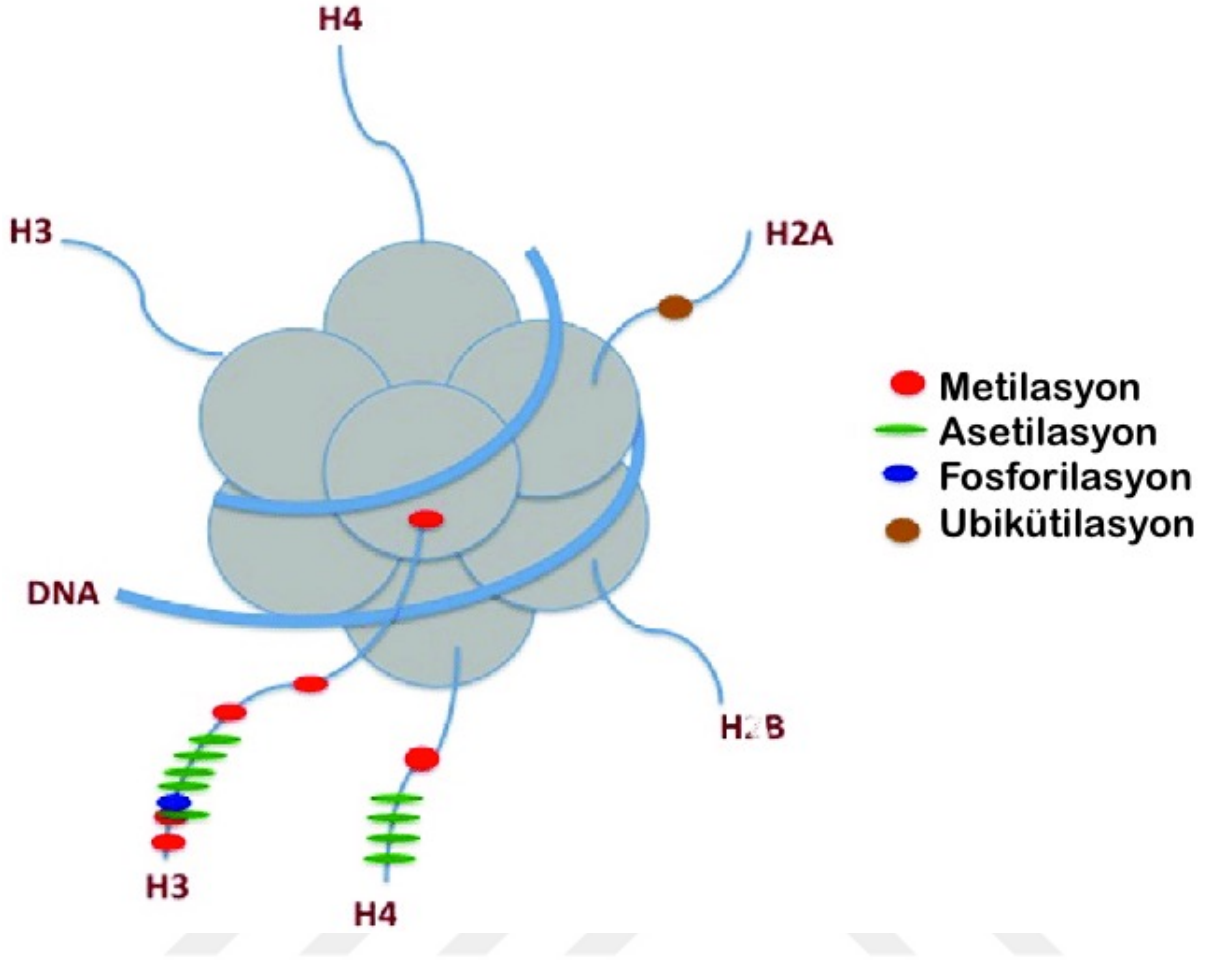
Epigenetik mekanizmaların ana işlevi, genlerin susturulması veya aktive edilmesidir. Epigenetik mekanizmalar, nükleozomlar arası aralıkları ve yoğunlaşma derecelerini kontrol eder, böylece genin aktif olup olmama durumu belirlenir. Kromatinin inaktive edilmiş, yoğunlaştırılmış olmasından kaynaklı genlerin susturulduğu ve böylece genlerin transkripsiyonunun olmadığı bölgeler *heterokromatin* olarak adlandırılır. Yoğunlaştırılmamış, açık durumda olan, genlerin aktivitesine olanak tanıyan ve böylece genlerin transkripsiyona müsait olduğu bölgeler ise *ökromatin* olarak adlandırılır. Kromatinler, heterokromatin ve ökromatin bölgeler arasında birçok farklı şekilde bulunur. Bu aralıkların düzenlenmesi spesifik genlerin etrafındaki ve aynı zamanda genik olmayan bölgelerdeki kromatin, bir takım kompleks biyokimyasal süreçler ile kontrol edilir. Bunlar, histonların çeşitli modifikasyonları (metilasyon, asetilasyon, ubikütilasyon, fosforilasyon), DNA metilasyonu, kromatin modellemede görev alan geniş protein aileleri ve kodlanmayan RNA'lardır (33) (Şekil 3).

Epigenetik mekanizmalar kapsamında gerçekleşen bu modifikasyonlar, modifikasyonun doğasına ve çeşitli amino asit modifikasyonuna bağlı olarak hem gen susturma hem de gen aktivasyonu ile ilişkilidir (2,34). Epigenetik mekanizmalar hem transkripsiyonel hem de posttranskripsiyonel seviyede gen ekspresyonunu düzenler. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin yapısı gen ekspresyonunu kontrol ederken, interferans RNA'lar gen ekspresyonunu transkripsiyon sonrası modüle etmektedir (5). Gerçekleşen epigenetik mekanizmalar sonucunda transkripsiyon aşaması ya baskılanır ya da aktive olur.



Şekil 3: Epigenetik Mekanizmaların Şematik Gösterimi (35)

DNA, histon proteinleri (H2A, H2B, H3 ve H4) ile sıkıca paketlenmiş halde bulunmaktadır. Histon proteinlerinin N-terminal ucuna eklenen çeşitli biyokimyasal gruplar ile meydana gelen yapısal değişiklikler histon modifikasyonları olarak adlandırılmaktadır. (24,36) Histon modifikasyonlarından histon proteininin asetilasyonu, pozitif yüklerinin kaybına neden olarak, histonlar ile DNA arasındaki afiniteyi azaltır. Bu nedenle, histon asetilasyonu transkripsiyonu artırabilirken histon deasetilasyonu transkripsiyonu baskılayabilir (37) (Şekil 4).



Şekil 4: Histon Modifikasyonları (38)

Başka bir epigenetik mekanizma olan kromatinin yeniden düzenlenmesi, ATP'nin hidrolizi sayesinde çıkan enerji ile nükleozomların hareket etmesi, histon modifikasyonları ve kromatin düzenleyicilerin kontrolünde gerçekleşir (24,28).

Kodlanmayan RNA'lar ise translasyon aşamasında proteine dönüşmeyen ama gen ekspresyonunu kontrol eden mekanizmalardır. Uzun ncRNA, mikroRNA, küçük interferans RNA ve piwi etkileşimli RNA kodlanmayan RNA'lar olarak bilinmektedir (24,39). Kodlanmayan RNA'lardan en önemlisi miRNA'lardır. miRNA'lar hedeflenen mRNA'lara bağlanarak ya translasyonlarını inhibe eder ya da bozulmalarına neden olur (33).

Epigenetik süreçler arasında damgalama, yeniden programlama, gen susturma, X kromozomu inaktivasyonu ve karsinogenez yer alır (15,26,40,41). X Kromozomu inaktivasyonu, erken embriyogenezde rastgele seçilen bir X kromozomunun heterokromatizasyon geçirerek inaktif olmasıdır. Bu süreç DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu sayesinde gerçekleşmektedir (2,42,43).

Kromatin yapı değişiklikleri veya histon modifikasyonları gibi diğer epigenetik modifikasyonlara kıyasla, DNA metilasyonu hem in vitro stabilite hem de gerekli DNA miktarları açısından yüksek hassasiyet nedeniyle adli bilimlerde diğer epigenetik mekanizmalara oranla daha çok tercih edilmektedir. Adli araştırmalarda, diferansiyel DNA metilasyon profilleri doku/hücre tipi tanımlaması, cinsiyet tayini ve yaş tahmini ayrıca monozygotik ikizleri ayırt etmek için çalışılmaktadır (44-48).

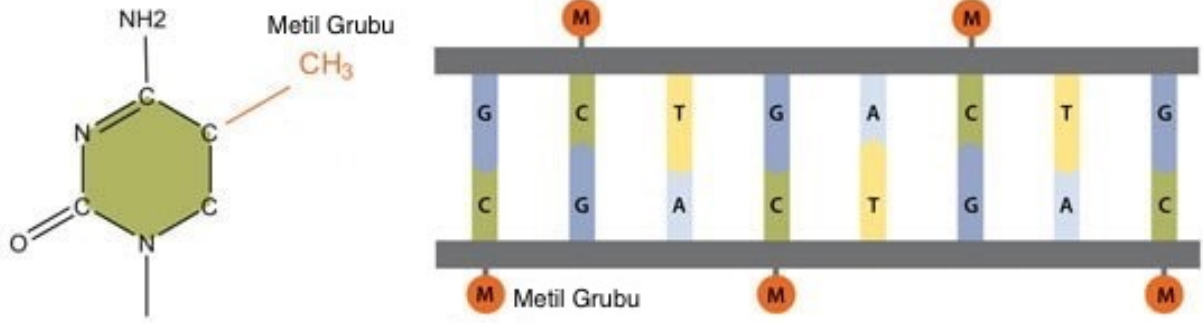
DNA metilasyonuna aşağıdaki başlıkta daha ayrıntılı olarak değinilmiştir.

2.2.2. DNA METİLASYONU

En önemli epigenetik mekanizmalardan olan DNA metilasyonu, en çok çalışılan epigenetik mekanizmadır. DNA metiltransferaz (DNMT) enzimi ile CpG adacıklarında bulunan sitozine bir metil grubunun ilave edilmesi ile gerçekleşir. DNA metilasyonu, gen anlatımının düzenlenmesinde kullanılan ve embriyo döneminden başlayıp yaşam boyunca devam eden en önemli epigenetik belirteçtir (15,24) (Şekil 5).

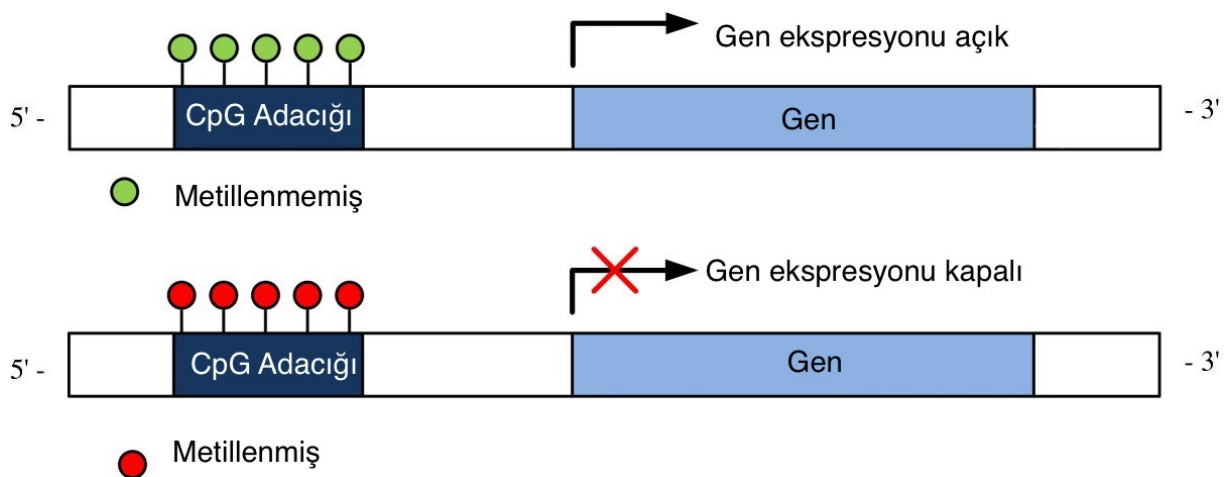
Metilasyon reaksiyonu, bir moleküle metil grubunun (CH_3) enzimatik olarak eklenmesidir. DNA'nın metilasyonu, DNA metiltransferaz enzimi sayesinde sitozin nükleotidinin 5' ucuna metil eklenmesi ile olur. DNA'ya eklenen metil grubunun kaynağı S-Adenozil Metiyonin (SAM)'dir (24,49). DNA metilasyonu, bakterilerde immün tanımda yer alırken, ökaryotlarda genomun yapısını ve ekspresyonunu düzenler. Omurgalılarda metilasyon tüm genom boyunca

meydana gelirken, bitkiler ve omurgasızlar sadece spesifik genomik elementlerin hedeflendiği mozaik metilasyon modelleri oluşturmaktadır. DNA metilasyonu, uzamayı değil transkripsiyon başlangıcını bloke eder (22, 50, 51, 52).



Şekil 5: DNA Metilasyonu (53)

CpG adacıkları, 1000bç uzunluğunda ve gen anlatımının başlangıcı olan promotör bölgelerce zengin alanlardır. DNA metilasyonu, CpG adacıklarındaki sitozinin metillenmesi ile gerçekleşmektedir (24,54). İnsan genomunda, toplam CpG'nin %70-80'i metillenmiştir ve metillenmemiş CpG'nin çoğu, genlerin 5' ucundaki CpG adasında kümelenmiştir (55,56). CpG adalarının metillenmesi gen susturma ile ilişkilidir (4,5) (Şekil 6).



Şekil 6: DNA Metilasyonunda CpG Adacıkları (57)

Değişken DNA metilasyonunun altında yatan faktörler arasında hücre farklılaşması, yaşlanma, genetik çeşitlilik, diyet, sigara kullanımı, güneş ışığı, UV radyasyonu, patojen enfeksiyonu, egzersiz, alkol tüketimi, stres vb. çevresel maruziyetler yer alır (55).

DNA metilasyon profilleri, CpG adacıklarındaki metil gruplarının analizi ile oluşturulmaktadır. DNA metilasyonu gen transkripsiyonu üzerinde baskılayıcı bir etki yaparken (hipermetilasyon) DNA'nın demetilasyonu (hipometilasyon) ise transkripsiyonu aktive eder (33).

DNA metilasyonunun bireysel yaşam tarzı, fiziksel görünüm üzerine etkileri olduğu gibi kişinin sosyoekonomik durumu, beslenmesi, fiziksel aktivitesi, sigara ve alkol kullanımı, uyuşturucu gibi çeşitli bağımlılıkları ile ilgili bilgileri de açığa çıkardığı bilinmektedir. Bu nedenle kişinin DNA metilasyon profilinden kişi ve kişinin hayatı ile ilgili bilgiler edinilmektedir. Adli olgular açısından bakıldığında da olay yerinde bulunan biyolojik bir delilin analizi ile suçları çözmek ve şüpheli havuzunu daraltmak için yararlı bir belirteç haline gelmiştir (22, 44, 58, 59, 60).

2.3.YAŞLANMA VE ADLİ BİLİMLERDE YAŞ TAYİNİ

Yaşlanma, biyokimyasal süreçler ve genetik yollar ile düzenlenip kontrol edilen, çevresel faktörlerin de etkisi ile doğal olarak meydana gelen, hücre, doku, organ ve sistem düzeyinde yapısal ve işlevsel değişimler şeklinde gözlenen, engellenemeyen, evrensel bir süreçtir. Yaşlılık sürecinde fizyolojik bütünlük azalır ve işlev göremez hale gelir (24, 25, 61, 62, 63).

Her canlı için gerçekleşen bu süreç, bireyler arasında fenotip olarak farklılık göstermektedir. Bu yaşlılıkta görülen fenotipik farklılıkların nedeni kişilerin genetik altyapıları, sosyal çevresi ve yaşam tarzı gibi faktörlerden kaynaklıdır. Kişilerin doğumdan itibaren geçen yıllar (kronolojik yaş) aynı olmasına rağmen, biyolojik yaşlarında farklılıklar görülebilir (25, 29, 64). Yaşlanma sürecini araştıran Lopez-Otín (2013) ve arkadaşları, yaşlanmanın dokuz özelliğini belirlemişlerdir. Bu özellikler genomik istikrarsızlık, telomer yıpranması, epigenetik

değişiklikler, proteostaz kaybı, düzensiz beslenme, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, hücresel yaşlanma, kök hücre tükenmesi ve hücreler arası iletişimin değişmesi şeklinde sayılabilir. Bu özellikler birbiriyle bağlantılı olup yaşlanma sürecine ve ortaya çıkan fenotipe birlikte katkıda bulunurlar (25,55,63).

Adli bilimler için yaş tayini, önemli olup herhangi bir şüphelinin olmadığı durumlarda delillerin analizi ile yaş tayin edilerek şüpheli havuzu daraltılır. Kimliği belirlenemeyen cesetlerin yaşı bulunarak kişinin arandığı aralık küçültülür. Göçmenlik veya mültecilik hukuk davaları (kişilerin kimliğinin ve yaşının net olmadığı durumlarda), yaşayan fakat yaşı bilinmeyen kişilerin yaşlarının doğrulanması ve antropolojik çalışmalar olmak üzere birçok alanda kullanılır (11, 22, 25, 65- 68).

Geleneksel olarak, adli tıpta yaş tahmini insan kemiklerinin ve dişlerinin morfolojisinin incelenmesiyle gerçekleştirilmektedir. Fakat bu analiz, iskelet kalıntılarının bulunduğu vakalarla sınırlıdır ve deneyimli uzmanlar tarafından yapılmalıdır. Bu nedenle birçok araştırmacı, suç mahallinde bulunan çeşitli dokular ve vücut sıvıları gibi biyolojik materyallerden yaş tahminine odaklanmıştır (11,69).

Yaş tahmininde kullanılmak üzere çeşitli biyolojik belirteçler belirlenmiştir. Telomer kısalması, sinyal bileşimli T reseptör eksizyon döngüsü (sjTREC'ler), ileri glikasyon ürünlerinin birikimi, aspartik asit rasemizasyonu ve DNA metilasyonu bu belirteçler arasındadır. Bu belirteçlerin yaşla bağlantısı bilindiği gibi çoğunun düşük doğruluk ve belirli dokularda görülmesi nedeniyle uygulamadaki potansiyeli sınırlıdır. Aynı zamanda adli laboratuvarlarda uygulanmasını zorlaştıran teknik problemler mevcuttur (3,25,70,71,72). Bu belirteçler arasında en umut verici yaş tahmini biyobelirteci olarak DNA metilasyonu görülmektedir (22).

2.3.1. DNA METİLYASYONU İLE YAŞ TAYİNİ

Yaş, adli soruşturmalar için en değerli özelliklerden biridir, çünkü bilinmeyen bir kişinin görünümüne dair ipuçları verebilir ve olası şüpheli sayısını azaltabilir. Bu nedenle yaş tayininde kullanılmak üzere birçok biyolojik belirteç belirlenmiştir; fakat uygulamadaki zorluklar ve düşük doğruluk göstermeleri nedeni ile çoğu tercih edilmemektedir. Keşfedilen belirteçler arasında en çok umut veren DNA metilasyon belirteçleridir. Son zamanlarda yapılan birkaç çalışmada, insanlarda kronolojik yaşı tahmin etmek için yaşla yüksek oranda ilişkili olan birden fazla CpG bölgesinde metilasyon ölçümleri kullanılmaya başlanmıştır (55).

Çünkü epigenetik modeller fetal dönemden başlar ve yaşam boyu da devam eder. Bu nedenle yaş analizlerinde bir belirteç olarak kullanılabilir (24). Ayrıntılı bir şekilde araştırılan DNA metilasyonunun, erken yaşamda artıp, ileri yaşamda ise kayıplar gösterdiği belirlenmiştir. İnsanlar yaşlandıkça, epigenetik yapıları farklı çevresel faktörlere maruz kalmaları sonucunda değişmektedir (6,7). Bu değişimler epigenetik sürüklenme ve epigenetik saat terimleriyle açıklanmaktadır. Epigenetik sürüklenme, DNA metilasyonunun aktarılması ve sürdürülmesi sırasında gerçekleşen küçük hataların rastlantısal olarak birikmesinden kaynaklanır. Kronolojik olarak aynı yaşta olan kişiler arasında görülen epigenom uyumsuzluklardır. Kişiden kişiye değişen yaşam biçimi, sigara kullanımı, beslenme alışkanlıkları ve fiziksel aktivite gibi faktörlerden kaynaklı olduğu bilinmektedir (22,73,74). Epigenetik saat ise, kişiler arası yaş kaynaklı gözlenen DNA metilasyon modellerindeki farklılıklardır (22,3, 55, 24).

Yapılan birçok çalışma sonucunda Horvath ve arkadaşları, açık erişim kaynakları aracılığıyla elde edilen 51 farklı doku türünü de içeren 7844 veri setini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada numuneler, tam genom metilasyon dizileri kullanılarak analiz edilmiş ve aynı zamanda çok değişkenli regresyon analizi kullanılarak modellenmiştir. Yapılan araştırmanın sonucunda ise

353 CpG bölgesini hedefleyen bir model elde edilmiş ve çalışmada 3,5 yıllık bir hata payı olduğu görülmüştür (47, 75).

Fakat genom çapında bir DNA metilasyon analizi, önemli miktarda DNA, zaman ve çaba gerektirmektedir. Yalnızca birkaç CpG bölgesini kullanan bir analiz yönteminin, genom çapında elde edilen metilasyon profili kadar doğruluk sağlayabilmesi, adli vakalar için oldukça önemlidir. Zbiec-Piekarska ve arkadaşları (78), ELOVL2 geninde iki CpG kullanarak, 6.85 yıllık bir tahmin hatası ve 5.03 yıllık kronolojik yaştan ortalama mutlak sapma (MAD) ile kan için bir yaş tahmin modeli bildirmiştir. Daha sonrasında, ELOVL2, C1orf132, TRIM59, KLF14 ve FHL2 genlerinin beş CpG'sinden oluşan bir modelin, kronolojik yaşı 3,9 olan bir MAD ile kanda gelişmiş bir tahmin doğruluğuna sahip olduğunu da göstermişlerdir (77). Park ve arkadaşları da (76) ayrıca ELOVL2, ZNF423 ve CCDC102B genlerinin üç CpG'sini kullanarak kan için yaş tahmini modeli bildirmiş ve oluşturulan bu modelle kronolojik yaştan 3,4 yıllık sapmayla bir tahmin doğruluğu sağlamıştır (76,77,78,79).

Her araştırma sonucunda yaş ile bağlantılı genler ve CpG bölgeleri keşfedilmeye devam etmektedir. Diploid insan genomunun tümü potansiyel olarak değişebilen oldukça fazla CpG içerdiği düşünüldüğünde, DNA metilasyon varyasyonunun tamamı potansiyel olarak muazzam olduğu için keşfedilmeye devam etmektedir (22,80). Kısacası adli tıp ve genetik alanlarındaki birçok araştırmacı, DNA metilasyon analizinin, kronolojik yaştan 5 yıldan daha az bir ortalama mutlak sapma (MAD) doğruluğu ile yaşı tahmin etmenin en güvenilir yöntemi olduğunu bildirmiştir (72,76,77). Bu nedenle DNA metilasyonu özellikle yaş tahmini için önemli ve hala geliştirilmeye açık bir biyobelirteçtir.

2.4. ADLİ OLAY YERİ ÖRNEKLERİ

Adli bir olay gerçekleştiğinde olay yerinden toplanan deliller, olayın çözülmesi için önemlidir. Olay yerinden toplanan deliller çoğunlukla, eser miktarda, birden fazla kişiye ait, karmaşık ve çevresel koşullar nedeni ile degrade olmuş delillerdir. Ayrıca bu deliller, olay yerinde uzun süre kalıp çeşitli çevresel etmenlere (ısı, nem, UV gibi) maruz kalabilir. Bu nedenle analizi oldukça zordur. Elde edilen delildeki DNA miktarının az olması, birden fazla kişinin DNA profilini içermesi ve dış etmenler nedeni ile degrade olması analizini zorlaştırmaktadır (10, 24, 44).

Olay yerinden toplanan delillerin analizinin başarılı bir şekilde yapılması önemlidir. Çünkü toplanan deliller ile bir şüpheliyi veya mağduru teşhis edebilir ve masum bir insanı temize çıkarabilecek DNA kanıtı içerebilir. Aynı zamanda olay yerinden toplanan biyolojik içerikli delillerin türünün ve kaynağının belirlenmesi de olayın nasıl gerçekleştiği konusunda yardımcı olur (10).

Günümüzde gelişen teknoloji ile olay yerinde bulunan az miktardaki DNA'dan bile DNA profilleri oluşturmak mümkündür. Fakat başarılı bir DNA profili elde etmenin önündeki en önemli engel, DNA'nın bulunduğu yerde ne kadar süre kaldığı ve çevresel etmenlerle ne kadar degrade olduğudur. Özellikle de dış mekanlarda gerçekleşen vakalarda bu faktörlerin etkisi daha fazla gözlemlenmektedir (81).

2.5.FARKLI MATRİKSLERDEN DNA İZOLASYONU

Olay yerinde bulunan biyolojik deliller genellikle çeşitli yüzeylerde bulunmaktadır. Sıklıkla ahşap, fayans gibi yüzeylerde, bıçak gibi metal yüzeylerde ve çeşitli kumaş türlerinde bulunan biyolojik örnekler adli vakaların aydınlatılması için analiz edilir. Fakat bu yüzeyler, analiz için zorlayıcı olabilmektedir. Yüzeyin yapısı ve içeriği DNA izolasyonunu ve sonrasında analizini

zorlaştırır. DNA izolasyonunun amacı yeterli miktarda ve kalitede DNA elde etmektir. Ancak adli olgularda az miktarda ve farklı yüzeylerden alınan örneklerden yeterli miktarda DNA'nın eldesi adli bilimciler için zorlayıcı olabilmektedir (24).

DNA izolasyonu, çeşitli kimyasal, fiziksel ve enzimatik yöntemler ile hücrenin parçalanması ve diğer moleküllerin uzaklaştırılması ile DNA'nın elde edilmesi işlemidir (84).

Ekstraksiyon olarak da bilinen bu işlem, temel olarak 3 basamaktan oluşmaktadır. İlk aşama hücrenin parçalanması olan liziz aşamasıdır. Bu basamaktaki amaç, hücrenin çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler ile parçalanması ve hücre içi materyalin açığa çıkmasıdır. Sonraki aşama ise proteinlerin denatürasyonudur. Kısaca ana amaç DNA-protein kompleksini bozmaktır. Son aşama ise saf DNA eldesi için DNA'yı diğer moleküllerden ayırmak ve DNA'nın çözünmesini sağlamaktır (85).

Adli bilimlerde kullanılan izolasyon yöntemleri, Chelex, FTA, fenol kloroform yöntemi ve solid faz olarak bilinen manyetik boncuklar vb. yöntemler olarak sayılabilir (24).

2.6.DNA DEGRADASYONU

Degradasyon, kimyasal bir bileşiğin daha az kompleks bir bileşiğe dönüşmesi olarak tanımlanmaktadır. DNA da degrade olmaya müsait bir yapıdadır. Çünkü vücut içindeki stabilizasyonu dış ortamda korunamadığından dış faktörlerin etkisiyle degrade olur. Degradasyon nedenleri arasında, UV ışınları, nem, ısı, ortamdaki mikrobiyolojik ajanlar ve inhibitörler gibi faktörler örnek verilebilir. DNA degrade olduğunda uzun zincirler parçalanır. Bu parçalanma süreci ekstrem şartlara uzun maruziyetlerde daha da kötü hale gelir. Degradasyon arttıkça DNA daha küçük parçalara bölünür. DNA parçacıkları 200-300 bp'nin altına düşmesi DNA analizinde yapılan PCR'ın başarısını etkilemektedir. Bu nedenle DNA ile yapılan çalışmalar zorlayıcı olabilmektedir (86,87,88).

2.6.1. ÇEVRESEL FAKTÖRLER VE DNA DEGRADASYONUNUN ADLİ ÖRNEKLERE ETKİSİ

Adli olgularda toplanan biyolojik deliller genellikle çeşitli yüzeylerden toplanır ve DNA içerdiği için olayın aydınlatılması için önemlidirler. Fakat DNA, vücut dışında stabilitesini koruyamadığı için fiziksel ajanların ve kimyasal reaksiyonların etkisi ile degrade olmaya açıktır. Olay yerinden toplanan deliller de çeşitli çevresel etmenlere uzun süreli maruz kalmış olabilir. Bundan dolayı adli soruşturmalar genellikle yüksek düzeyde bozunmuş DNA'ların analizini gerektirir (17).

DNA'nın degrade olma nedenleri;

1. Zaman
2. Sıcaklık
3. İklim Koşulları
4. Nem
5. Oksitleyici Ajanlar (Hidrojen peroksit, çamaşır suyu vb.)
6. Mikrobiyolojik Ajanlar
7. UV ışınları
8. İnhibitörler şeklinde özetlenebilir (86,87).

DNA'nın ortamda bekleme süresi enzim aktiviteleri açısından önemlidir. Ayrıca uzun süre dış ortamda bulunması diğer degradasyon faktörlerinin etki etmesi için zaman sağlar. Dış ortamda uzun süre kalan DNA, mikroorganizmalar tarafından bozunmaya uğrar. Maruz kaldığı güneş ışığı, sıcaklık veya UV gibi etmenler de degradasyonu artırır. Aynı zamanda çeşitli inhibitörlere maruziyet süresi de artar. O yüzden DNA'nın bir ortamda uzun süre bulunması, degrade olma oranı ve analizinin zorlaşması açısından istenmeyen bir durumdur (89,90).

DNA, yüksek sıcaklıklara maruz kaldığında denatürasyon hızı artar. Aynı zamanda kimyasal bağların zayıflamasına neden olur. Reaksiyonlarda hızlanma görülür. Uzun süreli güneş ışığına maruziyette pirimidinler arası çapraz bağlar etkilenir (86). Yüksek sıcaklıkta olduğu gibi ortamın yüksek nemli olması da mikroorganizmaların çoğalmasına neden olur. Mikroorganizmalarda bulunan nükleazlar, polinükleotit zincirindeki fosfodiester bağını kırarak DNA'yı küçük parçalara ayırır (24,91).

Üzerinde durulması gereken bir diğer önemli faktör ise genel hava durumunun DNA üzerindeki etkisidir. Çeşitli hava koşulları ve iklim değişikliklerinin DNA'nın dış ortamdaki kararlılığı üzerine etkisi araştırılmaya başlanmıştır. Singapur'daki tropik koşullar altında yapılan bir araştırmada, DNA'nın kalıcılığı ile yağmur miktarı arasında olumsuz bir bağlam olduğu görülmüştür. Yağış miktarına bağlı olarak DNA'nın ortamda kalıcılığı azalmaktadır (81,92).

DNA, 200-310nm arası ultraviyole ışığa maruz kaldığında nükleik asitlerde hasar meydana gelir. DNA zincirlerinin kırılması, zincirler arası çapraz bağlanmalar, pirimidin dimerlerinin (T-T, T-C) oluşması, pirimidinlerin hidrasyonu, komşu bazların dimer oluşturması gibi birçok etmen nedeniyle DNA'nın kopyalanması engellenir ve PCR'daki verim azalır (89).

Genel olarak, UV radyasyonunun DNA üzerindeki yıkıcı etkileri iyi bilinmektedir ve DNA'nın yüzeylerden uzaklaştırılması için kullanılmaktadır. Bununla birlikte, güneş kaynaklı UV ışığının, Poetsch ve arkadaşlarının (2022) yaptığı çalışmanın sonuçlarıyla da doğrulandığı gibi, DNA hasarına direkt UV ışığına oranla etkisi daha azdır (81,93,94).

Olay yerinden toplanan delillerin kalitesini düşüren ve analizi zorlaştıran bir diğer önemli etmen ise PCR inhibitörleridir. Ortamda inhibitörler bulunduğunda DNA polimerazın aktivitesi kısıtlanır veya engellenir. PCR inhibitörleri, organik ve inorganik maddeler olabilir. Bir materyal birden çok inhibitör barındırdığı gibi aynı inhibitör farklı materyaller üzerinde de

bulunabilir. İnhibitörler ortamdan uzaklaştırılmadığı takdirde PCR’da başarılı bir amplifikasyon gerçekleşemez. Çünkü inhibitörler, PCR reaksiyonunda kullanılan bütün bileşenleri inhibe edebilir. Aynı şekilde DNA izolasyonu aşamasında da hücre lizisini engelleyebilir veya nükleik asitleri bozabilir. İnhibisyonun miktarı ve maruziyeti bu noktada önemlidir. Yoğun bir inhibisyon olduğunda alel kayıpları ve yanlış negatif sonuçlara yol açabilir. Hafif bir inhibisyonda ise DNA miktarında yanlış tahminler ve alellerde küçük kayıplar gözlenebilir (17, 24, 95).

İnhibitörler, giysilerde, saçta, kan lekelerinde, idrardaki ürede, dışkıda bulunan kompleks polisakkaritlerde, yanak sürüntülerinde, formaldehitte sabitlenmiş dokularda, kemikteki kondroitin sülfat zincirlerinde ve toprak gibi çok çeşitli materyallerde bulunabilir (24,95,96,97,98). Aynı zamanda kot kumaşlarında bulunan indigo, deri giysilerde bulunan tannik asit, ağır metaller, yiyeceklerdeki organik bileşikler, kandaki hematin, dış ortamdaki polenler ve toprakta bulunan hümik asit bilinen inhibitörler arasındadır (24).

Çürüme sürecinde üretilen bir dizi madde olan hümik bileşikler, toprakta, doğal sularda ve güncel çökeltilerde DNA’yı kirleten maddeler olarak değerlendirilmektedir (95). Toprakta bulunduğu için hümik asit, önemli ve üstünde durulması gereken bir inhibitördür. Çünkü dış mekanlarda gerçekleşen adli vakalarda analizi en zorlaştırıcı etmen olarak karşımıza hümik asit çıkmaktadır. Oldukça etkili olan hümik asidin 0,08 mg/ml’si en hassas Taq polimerazı inhibe etmek için yeterlidir. Yüksek molekül ağırlıklı hümik bileşikler, DNA saflaştırma prosedürlerinde en inatçı safsızlığa sahiptir. Hümik asitler, DNA’daki fosfat gruplarına benzer bir fizikokimyasal yapıda olduğu için saflaştırma adımlarında adsorpsiyon bölgeleri için DNA ile rekabete girerler. Aynı zamanda Taq polimerazın işlevi için önemli olan magnezyum iyonlarıyla şelat oluşturabilir. Hümik asitlerin, DNA ile başka bir benzerliği ise negatif yüklü olmasıdır. Bu da jelde yürütme esnasında DNA’lara oranla da daha düşük kütleli olduğu için

DNA'dan daha hızlı hareket ederler ve jelde görünümünü engellerler. Hümik asitler, tanen gibi serbest fenolik gruplara sahip diğer oligomerik bileşikler ile oksitlenerek DNA polimerazına kovalent olarak bağlanan ve onu etkisiz hale getiren kinonları da oluşturur. Ayrıca hümik asit, DNA erime sıcaklığı noktasını (T_m) daha yüksek sıcaklıklara da kaydırır (95).

Kollajen ve hematin, Taq polimeraz enzim aktivitesini etkiler. Tannik asit (çoğunlukla deride bulunan bir madde), hem doğrudan bağlanma yoluyla DNA inaktivasyonuna hem de Taq polimeraz inhibisyonuna neden olur (95,99).

DNA'ları degrade eden bir diğer önemli çevresel faktör ise mikrobiyolojik ajanlardır. Canlı veya ölü DNA'yı barındıran herhangi bir çekirdekli hücre/doku, proteinlerin, karbonhidratların, lipidlerin, eser elementlerin yanı sıra suyun da zengin kaynağıdır ve dolayısıyla mikroorganizmaların büyümesi için de uygun bir ortam sağlar. Mikrobiyal bozunma, kimi PCR amplifikasyonuna veya amplifikasyon olmamasına, heterozigot pik dengesizliği, insan dışı kaynaklardan DNA kontaminasyonu ve mikrobiyal yan ürünler tarafından DNA'nın bozunması gibi istenmeyen sonuçlara neden olur (91). Kontamine örneklerde, canlı mikroorganizmaların sindirim enzimleri salgılaması ve bakteriyel hücre ölümü sonrasında ortama salınan proteinler DNA'da zincir kırıklarına sebep olur (89).

Aynı zamanda kanda bulunan hemoglobin, insanlarda en çok bulunan demir deposudur ve bu nedenle mikroplar için demir kaynağı görevi görür (104).

Çoğu durumda, zorlu çevre koşullarına uzun süre maruz bırakılan çeşitli maddelerden kan örnekleri toplanmaktadır. Kan lekeleri ya bozulmuş halde toplanır ya da daha sonraki işlemleri engelleyecek kadar büyük miktarda PCR inhibitörü içerirler (91, 100- 103).

Ek olarak, kan lekeli giysiler mikrobiyal bozunmaya daha yatkındır çünkü giyim tekstilleri hem cilt mikropları hem de çevresel mikro-flora ile yakın temas halindedir. Doğal besinlerin varlığı ve bunların ter bileşenlerini adsorbe etme yetenekleri nedeniyle doğal liflerde mikropların artan büyümesi gözlemlenmiştir. Birçok selüloolitik bakteri ve mantar, selüloz liflerini parçalama yeteneğine sahiptir. Bununla birlikte, sentetik elyaftan yapılmış giysiler, polietilen tereftalat (PET) varlığı nedeniyle mikrobiyal kontaminasyona daha az eğilimlidir. Bu nedenle kan lekeli giysiler, hem kan hem de kumaş kaynaklı mikroplar için mevcut olan besinler nedeniyle daha yüksek mikrobiyal bozulma riski altındadır (91).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Genetik AR-GE Laboratuvarında geliştirilen kan örneğine ait 8 lokuslu multipleks panelinin, farklı sürelerde ve farklı yüzeylerde beklemiş, çeşitli çevresel koşullara maruz bırakılarak degrade olmuş kan örneklerindeki başarısı incelenmiştir. Kanda yüksek korelasyon gösterdiği saptanan gen bölgelerinde bulunan CpG adacıklarındaki ELOVL2 (chr6:11044661), ASPA (chr17:3476273), C1orf132 (chr1:207823715), FHL2 (chr2:105399282), cg07082267, CCDC102B (chr18:68722183), RASSF5(chr1:206507531), TOM1L1(chr17:54899387) lokusları çalışılmıştır. Çeşitli yüzeylerde oluşturulan kan lekelerinden örnekler alınarak bu lokuslar üzerinden yaş tahmini yapılmıştır.

3.1.Deneyde Kullanılan Araç, Gereç ve Malzemeler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

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

3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler

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

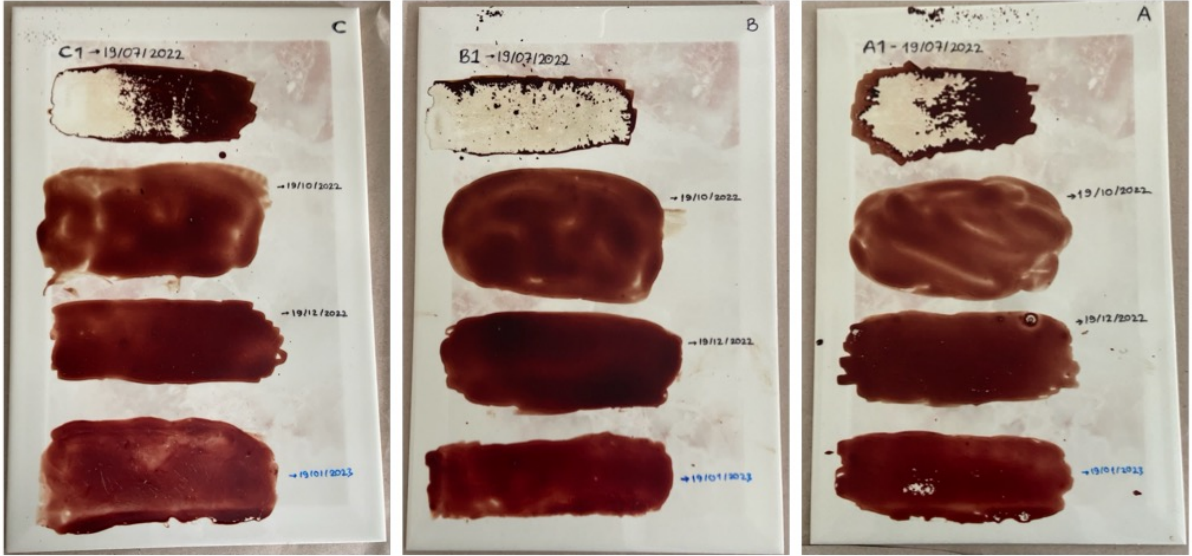
3.2.Yapay Olay Yeri Numunelerinin Hazırlanması

Bu çalışma, T.C. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilerek, E-86669574-302.14.01-351954 sayılı kararı ile çalışılması uygun bulunmuştur. Çalışma için; Bilgilendirilmiş Onam Formu’nu imzalayan, 2 kadın ve 1 erkek olmak üzere yaşları farklı 3 gönüllüden enjektör yardımı ile 2ml venöz kan toplanmıştır. Alınan kan örneklerinin koagülasyon süreci başlamadan farklı yüzeylere kan lekeleri uygulanmıştır.

3.2.1. Fayansların Hazırlanması

Her bir gönüllü için ayrı fayans olmak üzere 3 fayans kullanılmıştır. İşlem öncesi fayanslar iyice yıkanmış ve %96’lık etanol ile temizlenmiştir. 0,5 ml kan, fayansa ince bir tabaka olacak

şekilde yayılmıştır. 6 ay, 3 ay, 1 ay ve taze örnek olacak şekilde 4 farklı sürede oda koşullarında bekletilmiştir. Hazırlanan fayans örneklerinin görüntüsü Şekil 7’de görülmektedir.



Şekil 7: Fayans Örneklerinin Görüntüsü.

3.2.2. Kumaşların Hazırlanması

Kumaş olarak kullanılacak olan pamuklu çarşaf, eşit üç parçaya bölünmeden önce yıkanmıştır. Her gönüllü için ayrı parçalar kesilmiştir. 0,5ml kan, çarşaf üzerine dökülmüştür. 6 ay, 3 ay, 1 ay ve taze örnek olacak şekilde 4 farklı sürede oda koşullarında bekletilmiştir. Hazırlanan kumaş örneklerinin görüntüsü Şekil 8’de görülmektedir.



Şekil 8: Kumaş Örneklerinin Görüntüsü.

3.2.3. Bıçakların Hazırlanması

Her gönüllü için ayrı bıçak kullanılmıştır. Bıçaklar işlem öncesi %96'lık etanol ile temizlenmiştir. Daha sonrasında 0,5ml kan, bıçak üzerine ince bir tabaka olacak şekilde yayılmıştır. 6 ay, 3 ay, 1 ay ve taze örnek olacak şekilde 4 farklı sürede oda koşullarında bekletilmiştir. Hazırlanan bıçak örneklerinin görüntüsü Şekil 9'da görülmektedir.



Şekil 9: Bıçak Örneklerinin Görüntüsü.

3.2.4. Çevresel Koşulların Uygulandığı Örneklerin Hazırlanması

Gönüllülerden EDTA'lı tüpe alınan kan örnekleri izole edilerek farklı sürelerde ayrı ayrı UV ve yüksek ısıya maruz bırakılmıştır. Ayrıca kullanılacak inhibitörler (indigo, hümkik asit) farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak 1. PCR reaksiyonuna eklenmiştir. İnhibitörler ile yapılan çalışmanın konsantrasyonları Tablo I'de belirtilmiştir.

Tablo I: Kullanılan inhibitör konsantrasyonları

Hümik Asit (ng/ µL)	İndigo (mM)
100	4
125	10
250	50
500	100

3.2.5. Kontrol Grubunun Hazırlanması

Kontrol grubu çalışması için her gönüllüden 2'şer EDTA'lı tüpe kan alınmıştır.

3.3. Uygulanan Laboratuvar Aşamaları

Araştırmanın laboratuvar aşamaları aşağıdaki gibidir;

- DNA izolasyonu
- DNA miktar tayini
- Bisülfid dönüşümü
- PCR
- Agaroz jel elektroforezi
- PCR ürünlerinin saflaştırılması
- SNaPshot reaksiyonu (mini dizileme)
- SNaPshot ürünlerinin saflaştırılması
- PCR ürünlerinin kapiler elektroforezi ile analizi
- Verilerin analizi ve yaş hesaplaması

3.3.1. DNA İzolasyonu

Yöntemin temeli, hücreleri parçalayıp DNA içeriğini açığa çıkarmak ve silika temelli kolonlar ile DNA'nın kolona bağlanması ve istenmeyen hücresel materyalden uzaklaştırılması, son olarak da elüsyon buffer ile DNA'nın kolondan ayrılması ile saf DNA elde etmektir. DNA izolasyonu için E.Z.N.A ® Tissue DNA Kit kullanılmıştır.

3.3.1.1. EDTA'lı Kan Örneklerinden DNA İzolasyon Protokolü

1. 1,5 mL'lik eppendorf tüpüne 250 µL EDTA'lı kan konuldu.
2. Üzerine 25 µL Proteinaz K eklendi.
3. 250 µL Buffer BL konuldu.
4. Kapakları kapatılarak 15sn vortekslendi.
5. Ardından 70 °C 'de 10dk inkübe edildi.
6. Sonrasında 250 µL % 96'lık etanol eklendi ve 15sn vortekslendi.
7. 1,5 mL'lik eppendorf tüplerindeki lizat, spin kolona aktarıldı.
8. 12.000 rpm'de 1dk santrifüj edildi.
9. Altındaki filtrat içeren tüp atıldı ve yeni toplama tüpü konuldu.
10. Kolona 500 µL HBC Buffer eklendi.
11. 14.000 rpm'de 30sn santrifüj edildi.
12. Altındaki filtrat içeren tüp atıldı ve yeni toplama tüpü konuldu.
13. Kolona 700 µL DNA Wash Buffer eklendi.
14. 14.000 rpm'de 30sn santrifüj edildi.
15. Altındaki filtrat döküldü, toplama tüpü tekrar kullanıldı.
16. Kolona 700 µL DNA Wash Buffer eklendi.
17. 14.000 rpm'de 30sn santrifüj edildi.
18. Altındaki filtrat döküldü, toplama tüpü tekrar kullanıldı.
19. Kolon boş olarak 14.000 rpm'de 2dk santrifüj edildi.
20. Spin kolonları 1,5 mL'lik eppendorf tüplerine aktarıldı.
21. 80 µL Elution Buffer eklendi ve oda ısısında (25 °C) 2dk bekletildi.
22. 14.000 rpm'de 1dk santrifüj edildi.
23. Spin kolonlar atıldı.
24. İzolatlar parafilmlelenip -20 °C'ye kaldırıldı.

3.3.1.2. Bıçak ve Fayanstan Swap ile Toplanan Örneklerden DNA İzolasyon Protokolü

1. 1,5 mL'lik eppendorf tüpüne 600 µL PBS Buffer konuldu.
2. Steril suyla ıslatılmış steril swap ile numunenin bulunduğu alandan yeteri kadar örnek alındı.
3. Sonrasında swap, PBS Buffer bulunan eppendorf tüpüne konulup yarım saat bekletildi.
4. Aynı swapla yüzeyden tekrar numune alındı ve tekrar PBS Buffer bulunan eppendorfa konuldu.
5. Bir saat 30dk beklendikten sonra üzerine 25 µL Proteinaz K eklendi.
6. 250 µL Buffer BL konuldu.
7. Kapakları kapatılarak 15sn vortekslendi.
8. Ardından 70 °C 'de 10dk inkübe edildi.
9. Sonrasında 250 µL %96'lık etanol eklendi ve 15sn vortekslendi.
10. 1,5 mL'lik eppendorf tüplerindeki lizat, spin kolona aktarıldı.
11. 12.000 rpm'de 1dk santrifüj edildi.
12. Altındaki filtrat içeren tüp atıldı ve yeni toplama tüpü konuldu.
13. Kolona 500 µL HBC Buffer eklendi.
14. 14.000 rpm'de 30sn santrifüj edildi.
15. Altındaki filtrat içeren tüp atıldı ve yeni toplama tüpü konuldu.
16. Kolona 700 µL DNA Wash Buffer eklendi.
17. 14.000 rpm'de 30sn santrifüj edildi.
18. Altındaki filtrat döküldü, toplama tüpü tekrar kullanıldı.
19. Kolona 700 µL DNA Wash Buffer eklendi.
20. 14.000 rpm'de 30sn santrifüj edildi.
21. Altındaki filtrat döküldü, toplama tüpü tekrar kullanıldı.

22. Kolon boş olarak 14.000 rpm’de 2dk santrifüj edildi.
23. Spin kolonları 1,5 mL’lik eppendorf tüplerine aktarıldı.
24. 80 µL Elution Buffer eklendi ve oda ısısında (25 °C) 2dk bekletildi.
25. 14.000 rpm’de 1dk santrifüj edildi.
26. Spin kolonlar atıldı.
27. İzolatlar parafilmlelenip -20 °C’ye kaldırıldı.

3.3.1.3. Çarşafıta Oluşturulan Kurumuş Kan Örneklerinden DNA İzolasyon Protokolü

1. Kumaşlardan 1,5x1,5cm olacak şekilde farklı yerlerden birkaç kesit alındı.
2. 1,5 mL’lik eppendorf tüpüne 600 µL önceden 36°C’de ısıtılmış PBS Buffer konuldu.
3. Alınan kesitler PBS Buffer’da 36°C’de 2 saat bekletildi. 30dk’da bir karıştırıldı.
4. 25 µL Proteinaz K eklendi ve 60°C’de 1 saat inkübe edildi.
5. 14.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
6. 225 µL Buffer BL konuldu ve 15sn vortekslendi.
7. 60 °C ‘de 10dk inkübe edildi. 3 dakikada bir 10sn vortekslendi.
8. 14.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Kumaşlar çıkartıldı.
10. 300 µL isopropanol eklendi ve 15sn vortekslendi.
11. 1,5 mL’lik eppendorf tüplerindeki lizat, spin kolona aktarıldı.
12. 14.000 rpm’de 1dk santrifüj edildi.
13. Altındaki filtrat içeren tüp atıldı ve yeni toplama tüpü konuldu.
14. Kolona 500 µL HBC Buffer eklendi.
15. 14.000 rpm’de 1dk santrifüj edildi.
16. Altındaki filtrat içeren tüp atıldı ve yeni toplama tüpü konuldu.
17. Kolona 700 µL DNA Wash Buffer eklendi.
18. 14.000 rpm’de 1dk santrifüj edildi.

19. Altındaki filtrat döküldü, toplama tüpü tekrar kullanıldı.
20. Kolona 700 µL DNA Wash Buffer eklendi.
21. 14.000 rpm’de 1dk santrifüj edildi.
22. Altındaki filtrat döküldü, toplama tüpü tekrar kullanıldı.
23. Kolon boş olarak 14.000 rpm’de 2dk santrifüj edildi.
24. Spin kolonları 1,5 mL’lik eppendorf tüplerine aktarıldı.
25. Kapakları açık bir şekilde oda ısısında 10dk bekletildi.
26. 50 µL Elution Buffer eklendi ve oda ısısında (25 °C) 5dk bekletildi.
27. 14.000 rpm’de 1dk santrifüj edildi.
28. Spin kolonlar atıldı.
29. İzolatlar parafilmlelenip -20 °C’ye kaldırıldı.

3.3.2. Florometrik Yöntem ile DNA Miktar Tayini

Florometrik miktar tayini 260 nm dalga boyunda ölçüm yaparak yüksek hassasiyet ve doğrulukla DNA miktarı belirlenebilmektedir. İzolasyon sonrası elde edilen DNA’nın miktarını ölçmek için Qubit 4 cihazı (ThermoFisher) ve Quantit™ dsDNA HS (High sensitive) Assay-Invitrogen kiti kullanılmıştır.

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

1. Qubit® 4.0 cihazının kalibrasyonu için 2 adet standart kullanıldı.
2. Quant-it™ dsDNA HS Buffer çözeltisinden 199 µL alınarak 1 µL Quant-it™ Reagent eklendi.
3. Hazırlanan karışım çözeltisinden standartlar için 190 µL, S1(Standart 1) ve S2(Standart 2) çözeltilerinden 10 µL alındı.

4. Örneklerin analizi için karışım çözeltisinden 199 µL alındı ve üzerine 1 µL DNA örneği eklendi.
5. Karışım 2-3 saniye vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
6. İlk olarak Standart 1 ve Standart 2'nin ölçümü yapılarak cihazın kalibrasyonu yapıldı.
7. Örnekler cihaza yerleştirilerek ölçüm yapıldı.

3.3.3. Bisülfıt Dönüşüm Protokolü

Bu yöntem, metillenmemiş sitozinlerin urasile dönüştürülerek PCR basamağında timin olarak çoğalmasını sağlamaktır. Bu basamakta EZ.[®]DNA-Methylation-Gold Kit[™] (ZymoResearch) kullanılmıştır.

EZ DNA Methylation Gold[™] Kit ile bisülfıt dönüşümü

1. DNA örnekleri 10 ng/µl olacak şekilde seyreltilip 20 µl alınarak PCR tüpüne aktarıldı.
2. Örneklerin üzerine 130 µl CT Conversion Reagent pipetaj yapıldı ve minispın yapıldı.
3. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. Tablo II'deki koşullara göre inkübasyona bırakıldı.

Tablo II: Termal Döngü Cihazı Koşulları

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

4. ME spin kolonları toplama tüpüne koyuldu ve 600 µl M-Binding Buffer kolona eklendi.
5. Üzerine inkübe edilmiş DNA örneği aktarıldı ve el ile aşağı-yukarı yavaşça karıştırıldı. 14.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Toplama tüpü değiştirildi.
6. Kolona 100 µl M-Wash Buffer eklenerek 14.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi.

7. Kolona 200 µl M-Desulphonation Buffer kolona eklenip oda ısısında 15 dk inkübe edildi.
8. 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi.
9. Kolona 200 µl M-Wash Buffer eklendi ve 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi.
10. Kolona 200 µl M-Wash Buffer eklendi ve 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi.
11. ME Spin kolon 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
12. Kolona 10 µl ME Elution Buffer eklendi ve 14.000 rpm’de 30 sn santrifüj edildi.
13. ME Spin kolon atılıp DNA izolatu parafilmlenip -20 °C’de muhafaza edildi.

3.3.4. PCR Aşaması

Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Genetik AR-GE Laboratuvarında kan örneği için geliştirilen 8 lokuslu multipleks paneline ait CpG noktaları çalışılmıştır (Tablo III). Çalışılacak gen bölgelerini çoğaltmak için primer karışımı hazırlanarak ve bisülfite dönüşümü yapılmış örneklerin çoğaltılması için gereken diğer bileşenler de eklenerek SimpliAmpTM Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) cihazında uygun koşullarda çalışılmıştır.

Tablo III: Yaş tahmininde kullanılan gen bölgeleri

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

PCR bileşenleri Tablo IV’te belirtilmiştir.

Tablo IV: PCR’da kullanılan bileşenler ve miktarları

Master Mix	7,5 µl
Primer Mix	2 µl
MgCl ₂	1 µl
Taq Gold	0,25 µl
DNA Örneği	2 µl

Uygulanan PCR koşulları Tablo V’te belirtilmiştir.

Tablo V: PCR Koşulları

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

3.3.5. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR aşamasında DNA'nın çoğalıp çoğalmadığını gözlemlemek için çalışılan örnekler, taze hazırlanmış agaroz jele yüklendi ve elektroforez cihazında yürütüldü. Agaroz jelin hazırlanışı ve yürütme için uygulanan basamaklar aşağıdaki gibidir.

1. 10X TBE (Tris-Borat-EDTA) ana stoğu hazırlandı. Hassas terazi ile 108 g Tris Baz, 55 g Borik asit, 7,5 g EDTA tartılıp üzerine 1 L distile su eklenmiştir. Çözeltinin pH'sı 8.3 olacak şekilde ayarlanmıştır.
2. Elektroforez tamponu için 10X TBE tamponundan 100 ml alınıp üzeri 900 ml distile su ile tamamlandı. Böylece tampon 10X'den 1X' e seyreltilmiş oldu.
3. Hassas terazi ile tartılmış 0.5 g agar üzerine 50 ml 1X TBE tampon eklendi.
4. Karışım mikrodalgada ısıtıldı.
5. Üzerine 2.5 µl RedSafe Nucleic Acide Staining karışıma eklendi
6. Elektroforez kasetine taraklar yerleştirilip agaroz jel aktarıldı.
7. Tamamen kalıp haline gelmesi için 20 dk beklendi.
8. Jel kasetten çıkarılıp elektroforez cihazına yerleştirildi. Üzerini kaplayacak kadar 1X TBE tamponu eklendi.

9. Parafilm üzerine 0.5 µl Bromofenol koyuldu. 1.5 µl PCR ürüne boya ile pipetaj yapıp örnek kuyucuklarına yüklendi.
10. 90 V'ta 20 dk elektroforez cihazında yürütüldü.
11. Yürütme sonrası jel UV ışık kaynağında incelenerek değerlendirildi.

3.3.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR sonrasında DNA'yı saf bir şekilde elde etmek için bağlanmamış primer ve dNTP'lerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Primerlerin hidrolizi için EXO1(Ekzonükleaz1) ve dNTP'leri uzaklaştırmak için de raPid AP (raPid alkalın fosfataz) kullanıldı. Saflaştırma için kullanılan PCR bileşenleri ve PCR koşulları Tablo VI'daki gibidir.

Tablo VI: Saflaştırma İşlemi - PCR Bileşenleri ve PCR koşulları

PCR Bileşenleri	Miktar	PCR Koşulları	Süre
PCR ürünü	2.5 µl	37 °C	45 dk.
EXO1	0.25 µl	80 °C	15 dk.
raPid AP	0.75 µl	4 °C	∞

3.3.7. SNaPshot Reaksiyonu

SNaPshot, tek nükleotid uzamasına (SBE, Single Nucleotide Extension) dayanan bir mini dizileme yöntemidir. Spesifik nükleotid için tasarlanmış olan primerlerin bağlanması ve bu noktaya karşılık gelen ddNTP'nin bağlanması ile dizileme sonlanır.

SNaPshot reaksiyonu için SNaPshot™ Multipleks Kit kullanılmıştır. Reaksiyon primer karışımı hazırlanmış ve PCR tüpü içeriği Tablo VII'deki gibi hazırlanmıştır. PCR cihazında uygulanan protokol Tablo VIII'de verilmiştir.

Tablo VII: SNaPshot PCR Bileşenleri

PCR Bileşenleri	Miktar
PCR ürünü	2 µl
SNaPshot	1 µl
Primer Karışımı	1.5 µl

Tablo VIII: SNaPshot PCR Koşulları

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

3.3.8. SNaPshot Ürünlerinin Saflaştırılması

SNaPshot reaksiyonu sonrasında tüpteki bağlanmamış serbest floresan işaretli ddNTP'lerin ışıma yaparak elektroforezde analizi zorlaştırmaması için SAP enzimi kullanılarak pasif hale getirilmiştir. Saflaştırma işlemi için SNaPshot PCR ürününe SAP eklenmiştir. Kullanılan bileşenler Tablo IX'da, uygulanan PCR koşulları da Tablo X'da verilmiştir.

Tablo IX: 2. Saflaştırma İşlemi-PCR Bileşenleri

PCR Bileşenleri	Miktar
PCR ürünü	5.5 µl
SAP	1 µl

Tablo X: Saflaştırma İşlemi-PCR Koşulları

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

3.3.9. PCR Ürünlerinin Kapiler Elektrophorezi

Hazırlığı tamamlanan PCR ürünlerinin kapiler elektrophorezde görüntülenebilmesi için Formamid-Liz120 karışımı Tablo XI'e göre hazırlanmış ve cihaza yüklenmiştir. Örnekler cihazda POP-4 polimeri ile 36 cm uzunluğundaki kapiller kullanılarak, DS-02 matriksi ve E5 modülüne göre Tablo XII'de belirtilen koşullarla analiz edilmiştir.

Tablo XI: Formamid-Liz120 Karışımı ve Kapiller Elektrophorez Örnek Hazırlaması

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

Tablo XII: Kapiler Elektrophorez Koşulları

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

3.3.10. Verilerin Analizi ve Yaş Hesaplanması

Çalışılan örneklerin belirlenen CpG lokusundaki sitozin ve timin piklerinin RFU değerleri kullanılarak Şekil 10'daki formüle göre metilasyon oranları Microsoft Excel (Microsoft 365 ProPlus) programında hesaplanmıştır.

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

Şekil 10: Metilasyon oranı hesaplama formülü

Elde edilen metilasyon oranları panel kullanılarak geliştirilmiş olan yaş tahmin modeline göre aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

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



4. BULGULAR

Bu çalışmada, yaşları farklı üç kişiden alınan kan örnekleri ile farklı süreler ve yüzeylerde beklemiş DNA örnekleri ve farklı inhibitörler, ısı, UV'ye maruz bırakılmış DNA örnekleri 8 CpG lokusu (ELOVL2, ASPA, C1orf132, cg07082267, FHL2, CCDC102B, RASSF5, TOM1L1) için metilasyon profilleri belirlenmiştir. Taze kan örneklerinden elde edilen DNAm yaşları baz alınarak, beklemiş ve bozunmuş DNA örneklerinden elde edilen metilasyon profilleri ile bulunan yaşların karşılaştırılması yapılmıştır.

4.1. DNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

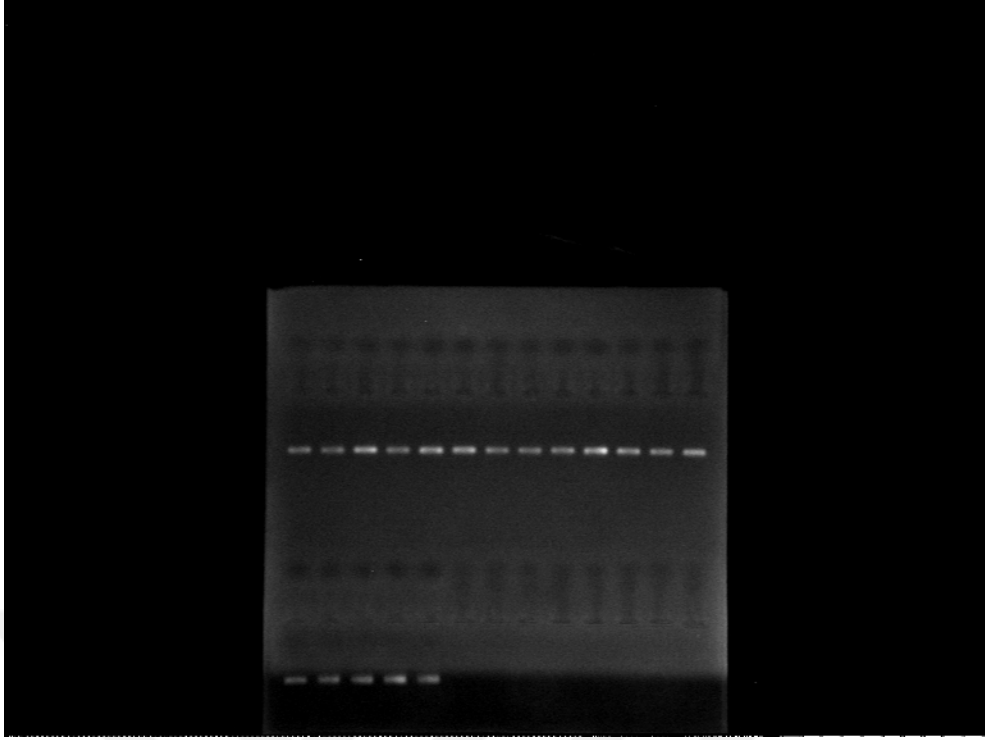
3 kişiden alınıp hazırlanan toplam 39 örneğin izolasyonu yapılarak DNA miktarları belirlenmiştir. Elde edilen DNA miktarları aşağıda bulunan Tablo XIII'te belirtilmiştir. Analiz edilen DNA miktarı en az 1,13 ng/μl olup en fazla 79,2 ng/μl'dir. Farklı yüzeylerde bekletilen ortalama DNA miktarı 4,92 ng/μl 'dir.

Tablo XIII: DNA İzolatları ve DNA Miktarları

Örnek Kodu	DNA Miktarı (ng/ µl)	Örnek Kodu	DNA Miktarı (ng/ µl)
T2023-XX-01	47,6	T2023-XX-02-B1	3,04
T2023-XX-02	79,2	T2023-XX-02-B3	2,26
T2023-XX-03	52,8	T2023-XX-02-B6	2,86
T2023-XX-01-F0	4,64	T2023-XX-03-B0	5,34
T2023-XX-01-F1	5,88	T2023-XX-03-B1	2,28
T2023-XX-01-F3	3,92	T2023-XX-03-B3	4,44
T2023-XX-01-F6	6,82	T2023-XX-03-B6	4,32
T2023-XX-02-F0	3,1	T2023-XX-01-K0	4,72
T2023-XX-02-F1	4,7	T2023-XX-01-K1	12,5
T2023-XX-02-F3	7,02	T2023-XX-01-K3	3,26
T2023-XX-02-F6	5,5	T2023-XX-01-K6	7,4
T2023-XX-03-F0	9,76	T2023-XX-02-K0	1,13
T2023-XX-03-F1	6,1	T2023-XX-02-K1	4,4
T2023-XX-03-F3	5,66	T2023-XX-02-K3	9,5
T2023-XX-03-F6	4,7	T2023-XX-02-K6	2,9
T2023-XX-01-B0	3,18	T2023-XX-03-K0	8,38
T2023-XX-01-B1	1,86	T2023-XX-03-K1	2,12
T2023-XX-01-B3	1,76	T2023-XX-03-K3	11,6
T2023-XX-01-B6	3,55	T2023-XX-03-K6	1,47
T2023-XX-02-B0	5,08		

4.2. Bisülfite Dönüşümü ve PCR Aşaması

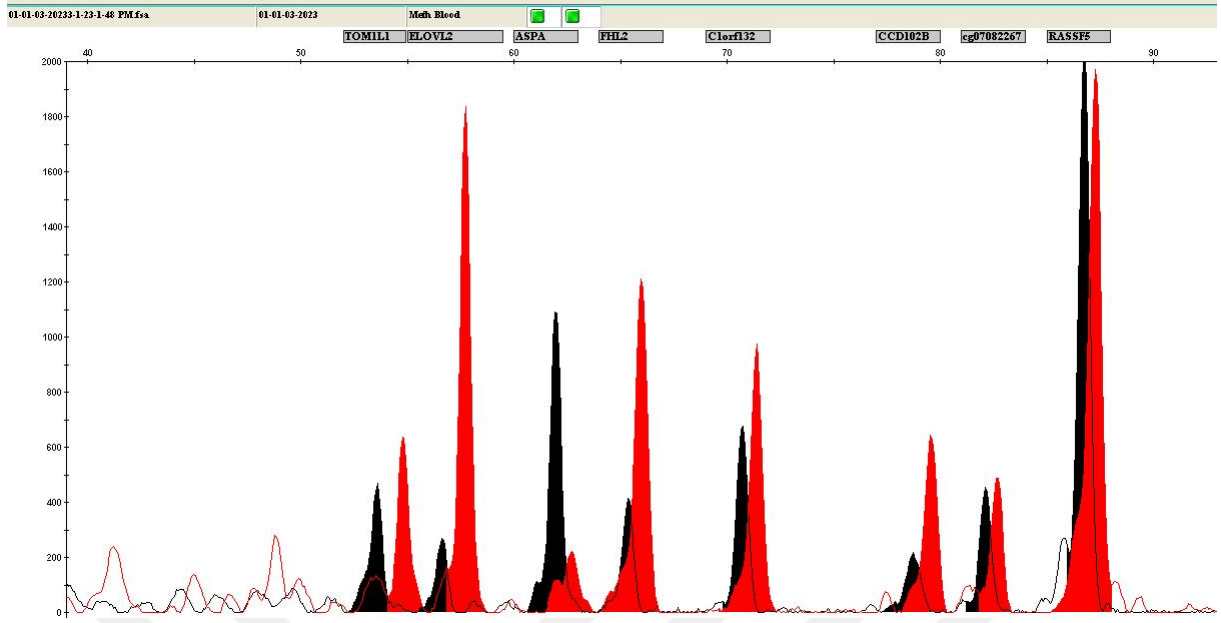
İzolasyonu ve DNA miktar tayini yapılan örneklerin, 10 ng/µl DNA olacak şekilde sulandırılan izolatlara bisülfite dönüşümü yapılmıştır. Daha sonra kan yaş metilasyon panelinin PCR aşaması gerçekleştirilmiştir. PCR sonrası örneklerin çoğalıp çoğalmadığını kontrol etmek için elde edilen DNA örnekleri hazırlanmış olan agaroz jelde yürütülmüştür. UV transillüminatör ile amplifiye olan örneklerde ışımaya görülürken amplifiye olmayan örneklerde herhangi bir ışımaya görülmemiştir. Örnek jel görüntüsü aşağıdaki gibidir (Şekil 11).



Şekil 11: Agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

4.3 Kapiller Elektroforez Aşaması

Saflaştırma ve SNaPshot aşamalarından sonra örnekler ABI PRISM®310'da yürütülerek Gene Mapper v4.0 programı ile analiz edilerek elektroforegram görüntüleri elde edilmiştir. Örnek elektroforegram görseli aşağıdaki gibidir (Şekil 12).



Şekil 12: Kapiler elektroforez sonucu multipleks yaş paneline ait elde edilen T2023-XX-01 numaralı örneğin elektroforegram görüntüsü.

4.4 İstatiksel Analiz

Şekil 10'daki formül ile Microsoft Excel programında, çalışılan her bir örnek için metilasyon değerleri hesaplanmıştır. Her örneğe ait lokuslara göre metilasyon değerleri taze kan, fayans örnekleri, bıçak örnekleri, kumaş örnekleri, UV'ye maruz bırakılmış örnekler, 95°C 'ye maruz bırakılmış örnekler, indigo ilave edilmiş örnekler ve hümitik asit ilave edilmiş örnekler olmak üzere sırasıyla Tablo XIV'ten Tablo XXI'e kadar belirtilmiştir.



Tablo XIV: Taze Kanların Metilasyon Değerleri

Örnek Kodu	TOM1L1	ELOVL2	ASPA	FHL2	C1orf132	CCDC102B	cg07082267	RASSF5
T2023-XX-01	0,31480736	0,08474576	0,75223675	0,17651052	0,30347725	0,17549458	0,36723164	0,3988034
T2023-XY-02	0,21529784	0,14229887	0,587149188	0,205757004	0,194784876	0,131987578	0,304424004	0,24639691
T2023-XX-03	0,207018624	0,160532498	0,516665201	0,232963133	0,211628901	0,093457944	0,255124291	0,184269904

Tablo XV: Fayans Örneklerin Metilasyon Değerleri

Örnek Kodu	TOM1L1	ELOVL2	ASPA	FHL2	C1orf132	CCDC102B	cg07082267	RASSF5
T2023-XX-01-F0	0,32413216	0,11403953	0,75641791	0,14136853	0,37907869	0,15940489	0,3874607	0,38074811
T2023-XX-01-F1	0,32110092	0,09563809	0,74752608	0,19971342	0,33937246	0,20106054	0,38589212	0,35149051
T2023-XX-01-F3	0,32260175	0,06512301	0,78638334	0,13016845	0,23138424	0,13591671	0,36503447	0,32300606
T2023-XX-01-F6	0,34416087	0,07172458	0,64853556	0,11543599	0,24453841	0,14520062	0,33869651	0,26369657
T2023-XY-02-F0	0,24226663	0,13702043	0,59811123	0,22970422	0,18666258	0,12591389	0,29010239	0,24039915
T2023-XY-02-F1	0,210864904	0,08888634	0,510638298	0,155529954	0,149075975	0,129300652	0,264953377	0,206785259
T2023-XY-02-F3	0,23911111	0,12925655	0,58105951	0,22497403	0,1761331	0,10336441	0,28313133	0,34871925
T2023-XY-02-F6	0,22241479	0,13868847	0,57697842	0,23520188	0,16165922	0,07727679	0,33851697	0,40679188
T2023-XX-03-F0	0,21690768	0,15901733	0,53256642	0,25830954	0,21846082	0,09868996	0,26030547	0,20721764
T2023-XX-03-F1	0,20271266	0,14815604	0,55428478	0,25806802	0,24041812	0,07223942	0,2987234	0,26229806
T2023-XX-03-F3	0,20598301	0,1232539	0,44086456	0,13099794	0,16349621	0,06008541	0,22362028	0,15665933
T2023-XX-03-F6	0,21700843	0,1222031	0,44450806	0,1522693	0,1613723	0,07098796	0,24244977	0,16541353

Tablo XVI: Bıçak Örneklerinin Metilasyon Değerleri

Örnek Kodu	TOM1L1	ELOVL2	ASPA	FHL2	C1orf132	CCDC102B	cg07082267	RASSF5
T2023-XX-01-B0	0,32434495	0,095409031	0,724646589	0,191146881	0,30964467	0,159889459	0,436743674	0,369218285
T2023-XX-01-B1	0,315821135	0,051502329	0,766652155	0,147460661	0,261560019	0,18355776	0,374068554	0,343960054
T2023-XX-01-B3	0,35021253	0,064093914	0,723724782	0,129042452	0,26042841	0,165064772	0,363038714	0,320038722
T2023-XX-01-B6	0,318632409	0,076703871	0,773997059	0,135135135	0,256828144	0,158105237	0,326711971	0,334914049
T2023-XY-02-B0	0,22439739	0,15027928	0,618484774	0,250794953	0,206628583	0,143188214	0,319454415	0,260913103
T2023-XY-02-B1	0,255688218	0,132875485	0,58993183	0,221848602	0,209803193	0,1558753	0,35037594	0,250476003
T2023-XY-02-B3	0,229849516	0,124787982	0,546153846	0,193332422	0,215919859	0,135851557	0,316363636	0,213555524
T2023-XY-02-B6	0,260989011	0,141719372	0,578271028	0,165298945	0,175757576	0,149501661	0,341081354	0,211533916
T2023-XX-03-B0	0,219803671	0,161196631	0,534148717	0,230460922	0,234049783	0,090667846	0,282667219	0,191500389
T2023-XX-03-B1	0,210879669	0,155795596	0,491890842	0,219579934	0,189625642	0,089776475	0,303252886	0,18818074
T2023-XX-03-B3	0,209009353	0,157241574	0,533272562	0,232757841	0,202096403	0,100840336	0,306071871	0,196982397
T2023-XX-03-B6	0,217391304	0,14973576	0,506183649	0,224431236	0,179437439	0,100521221	0,264916468	0,187559354

Tablo XVII: Kumaş Örneklerinin Metilasyon Değerleri

Örnek Kodu	TOM1L1	ELOVL2	ASPA	FHL2	C1orf132	CCDC102B	cg07082267	RASSF5
T2023-XX-01-K0	0,304644227	0,100511073	0,672084228	0,181188231	0,263157895	0,201233088	0,376623377	0,413687863
T2023-XX-01-K1	0,332935459	0,073592749	0,787328312	0,157122905	0,294618166	0,153955471	0,331113578	0,344262295
T2023-XX-01-K3	0,345709985	0,062769811	0,690814676	0,148889598	0,246624601	0,138095238	0,343692389	0,359195402
T2023-XX-01-K6	0,328345802	0,112970711	0,737646955	0,19095143	0,302715871	0,169030607	0,377969762	0,379096982
T2023-XY-02-K0	0,2246936	0,112946947	0,535622229	0,161817587	0,151125402	0,127810286	0,294117647	0,232218253
T2023-XY-02-K1	0,227562739	0,153871792	0,588983051	0,238591917	0,179063361	0,148741419	0,334341906	0,237825595
T2023-XY-02-K3	0,240702715	0,138579165	0,606148157	0,229780141	0,197078925	0,153788447	0,307692308	0,236870311
T2023-XY-02-K6	0,243185462	0,084490547	0,527546249	0,146482845	0,103804405	0,116590726	0,30246705	0,239212008
T2023-XX-03-K0	0,20754717	0,196480049	0,501831502	0,280985373	0,249199442	0,103491533	0,256166983	0,179401376
T2023-XX-03-K1	0,215268531	0,170204245	0,505752024	0,242785384	0,179742256	0,081438478	0,313807531	0,211474807
T2023-XX-03-K3	0,226321037	0,158924205	0,530342459	0,23141415	0,207492053	0,087427144	0,290810811	0,199236219
T2023-XX-03-K6	0,156905521	0,132373432	0,496770225	0,204377213	0,216446599	0,081178593	0,245189323	0,194576416

Tablo XVIII: Farklı Sürelerde UV Işınlara Maruz Bırakılmış Örneklerin Metilasyon Değerleri

Örnek Kodu	TOM1L1	ELOVL2	ASPA	FHL2	C1orf132	CCDC102B	cg07082267	RASSF5
T2023-XX-01-15dkUV	0,32784385	0,09051226	0,79481062	0,20757654	0,39871677	0,17583782	0,36423841	0,40870894
T2023-XY-02-15dkUV	0,24899828	0,14716015	0,59801364	0,22722951	0,21411712	0,1305872	0,30920927	0,28549803
T2023-XX-03-15dkUV	0,20171507	0,17477529	0,50780841	0,26600098	0,23467556	0,09064184	0,26773938	0,21182266
T2023-XX-01-30dkUV	0,33054393	0,09029691	0,77800711	0,17241379	0,43375681	0,1783894	0,38035961	0,31120332
T2023-XY-02-30dkUV	0,19704912	0,12945196	0,59066602	0,23117803	0,20534521	0,13483458	0,32228361	0,21425656
T2023-XX-01-60dkUV	0,34944481	0,08949881	0,7985162	0,19514968	0,34102142	0,14091351	0,49367089	0,41200639

Tablo XIX: Farklı Sürelerde 95 °C'ye Maruz Bırakılmış Örneklerin Metilasyon Değerleri

Örnek Kodu	TOM1L1	ELOVL2	ASPA	FHL2	C1orf132	CCDC102B	cg07082267	RASSF5
T2023-XX-01-10dk	0,33200795	0,10577019	0,77563541	0,20993495	0,38022814	0,22014203	0,20328028	0,39545602
T2023-XY-02-10dk	0,22601855	0,158132	0,59585163	0,24364053	0,21154721	0,17170891	0,16132902	0,26960414
T2023-XX-03-10dk	0,20124805	0,18020331	0,52558065	0,23900803	0,21308344	0,13528286	0,09178255	0,19272768
T2023-XX-01-15dk	0,37030887	0,09268293	0,79768376	0,17819706	0,38855133	0,13825836	0,46827795	0,45854271

Tablo XX: Farklı Konsantrasyonlarda İndigo İlave Edilmiş Örneklerin Metilasyon Değerleri

Örnek Kodu	TOM1L1	ELOVL2	ASPA	FHL2	C1orf132	CCDC102B	cg07082267	RASSF5
T2023-XX-01-4mM	0,31903037	0,0842255	0,71187869	0,15773176	0,30029155	0,17318854	0,36624569	0,36739949
T2023-XY-02-4mM	0,22437673	0,14889411	0,56016598	0,20691223	0,17894999	0,12947658	0,29010239	0,24382521
T2023-XX-03-4mM	0,21404616	0,16031632	0,50857901	0,24665643	0,21772345	0,09037901	0,2509821	0,18797858
T2023-XX-01-10mM	0,35893155	0,07784034	0,78054299	0,14997458	0,41329011	0,1799878	0,49393414	0,4178897
T2023-XY-02-10mM	0,26690391	0,14897808	0,61586639	0,22063526	0,20114356	0,12004467	0,3968254	0,41432413
T2023-XX-03-10mM	0,22941751	0,17533537	0,54003724	0,24685896	0,20576132	0,09761388	0,29481834	0,21917298
T2023-XX-01-50mM	0,32354903	0,09521534	0,75868003	0,1843318	0,38159371	0,22071307	0,26083866	0,37778781
T2023-XY-02-50mM	0,22789539	0,14563107	0,59802448	0,2277239	0,19885913	0,15496162	0,2584127	0,25339453
T2023-XX-03-50mM	0,20765165	0,14716188	0,52297439	0,25661054	0,21323281	0,11563877	0,18607318	0,19448219
T2023-XX-01-100mM	0,32975702	0,08742887	0,76283442	0,19597267	0,33017805	0,18631179	0,38871613	0,39268339
T2023-XY-02-100mM	0,24016788	0,13817885	0,57757644	0,22264002	0,16995939	0,13768686	0,30410184	0,2440309
T2023-XX-03-100mM	0,20108696	0,15769414	0,48546137	0,24427406	0,180209	0,10455764	0,12039779	0,21969378

Tablo XXI: Farklı Konsantrasyonlarda Hümkik Asit İlave Edilmiş Örneklerin Metilasyon Değerleri

Örnek Kodu	TOM1L1	ELOVL2	ASPA	FHL2	C1orf132	CCDC102B	cg07082267	RASSF5
T2023-XX-01-100ng/μL	0,35586278	0,08710904	0,75456919	0,20569545	0,31155378	0,27704485	0,29503835	0,41373289
T2023-XY-02-100ng/μL	0,25343439	0,14979502	0,56950673	0,24971327	0,19691345	0,22921523	0,26687469	0,27188286
T2023-XX-03-100ng/μL	0,22397094	0,13553816	0,48331506	0,27180478	0,18822394	0,22029372	0,18050542	0,17604024

4.5. Yaş Tahmini

Bu çalışmada kullanılan yaş tahmini modeli Adli Genetik Ar-Ge laboratuvarında geliştirilen yaş tahmin paneli ve bu panel kullanılarak oluşturulan yaş tahmin modeline göre aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır. Her örnek için bulunan DNAm Yaşı Tablo XXII'den Tablo XXV'e kadar belirtilmiştir.

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

Tablo XXII: Taze Kan Kronolojik yaş ve DNA Metilasyon Yaşı

Örnek	Kronolojik Yaş	DNAm Yaşı
T2023-XX-01	23	24
T2023-XY-02	36	42
T2023-XX-03	49	51

Tablo XXIII: T2023-XX-01 Numaralı Örneklerin Kronolojik Yaş ve DNA Metilasyon Yaşı

Örnek	Kronolojik Yaş (Gerçek Yaş)	DNAm Yaşı	Farklı Yüzeylerdeki DNAm Yaşı
01-Fayans-0.Ay	23	24	22
01-Fayans-1.Ay	23	24	24
01-Fayans-3.Ay	23	24	27
01-Fayans-6.Ay	23	24	31
01-Bıçak-0.Ay	23	24	27
01-Bıçak-1.Ay	23	24	23
01-Bıçak-3.Ay	23	24	26
01-Bıçak-6.Ay	23	24	25
01-Kumaş-0.Ay	23	24	26
01-Kumaş-1.Ay	23	24	25
01-Kumaş-3.Ay	23	24	29
01-Kumaş-6.Ay	23	24	27

Tablo XXIV: T2023-XY-02 Numaralı Örneklerin Kronolojik Yaş ve DNA Metilasyon Yaşı

Örnek	Kronolojik Yaş (Gerçek Yaş)	DNAm Yaşı	Farklı Yüzeylerdeki DNAm Yaşı
02-Fayans-0.Ay	36	42	44
02-Fayans-1.Ay	36	42	44
02-Fayans-3.Ay	36	42	43
02-Fayans-6.Ay	36	42	44
02-Bıçak-0.Ay	36	42	43
02-Bıçak-1.Ay	36	42	41
02-Bıçak-3.Ay	36	42	43
02-Bıçak-6.Ay	36	42	41
02-Kumaş-0.Ay	36	42	43
02-Kumaş-1.Ay	36	42	44
02-Kumaş-3.Ay	36	42	42
02-Kumaş-6.Ay	36	42	44

Tablo XXV: T2023-XX-03 Numaralı Örneklerin Kronolojik Yaş ve DNA Metilasyon Yaşı

Örnek	Kronolojik Yaş (Gerçek Yaş)	DNAm Yaşı	Farklı Yüzeylerdeki DNAm Yaşı
03-Fayans-0.Ay	49	51	50
03-Fayans-1.Ay	49	51	49
03-Fayans-3.Ay	49	51	51
03-Fayans-6.Ay	49	51	51
03-Bıçak-0.Ay	49	51	49
03-Bıçak-1.Ay	49	51	51
03-Bıçak-3.Ay	49	51	49
03-Bıçak-6.Ay	49	51	51
03-Kumaş-0.Ay	49	51	53
03-Kumaş-1.Ay	49	51	52
03-Kumaş-3.Ay	49	51	50
03-Kumaş-6.Ay	49	51	49

4.6. Çevresel Faktörlerin Etkisi

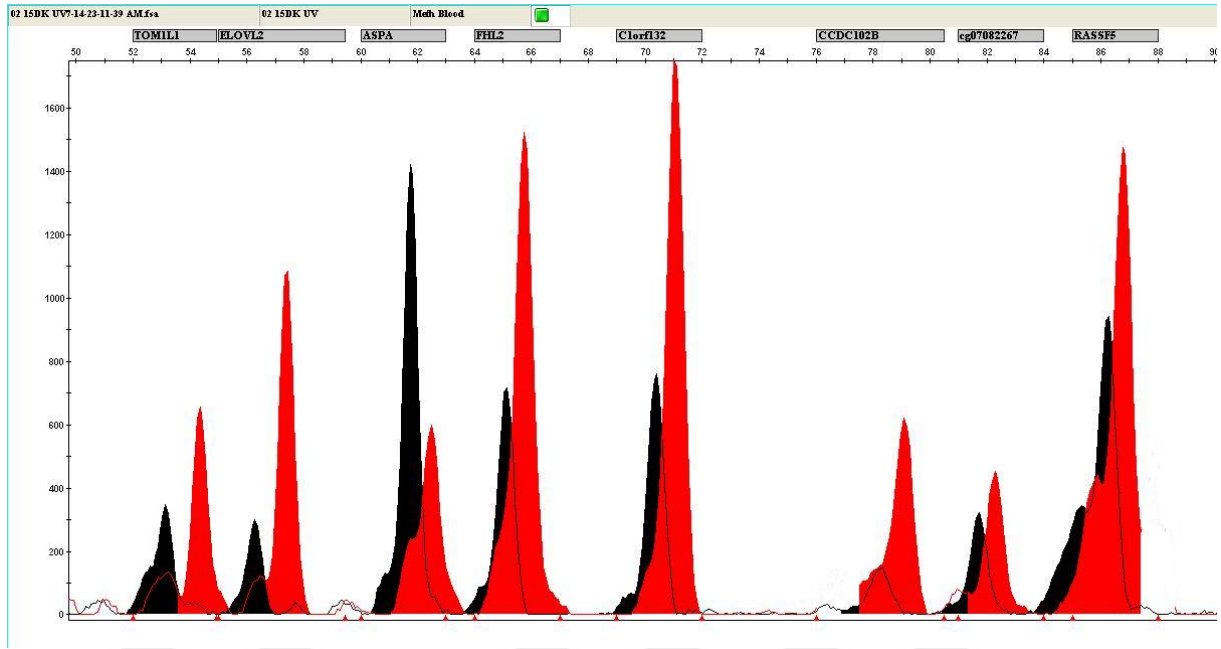
4.6.1. UV Etkisi

Her bir kişi için EDTA'lı kandan izole edilen DNA izolatları 15, 30, 60 dakika olmak üzere DNA/RNA UV biyogüvenlik kabini (Kabin UVT/T-MAR-Grand Bio)'nde UV ışınına maruz bırakılmış ve daha sonrasında bisülfid dönüşümü yapıp analiz edilmiştir. 1. PCR sonrası agaroz jel elektroforezinde DNA bantları her örnek için görülmüştür. Sonrasında kapiler elektroforezde çalışılmıştır. Elde edilen veriler Tablo XXVI'da belirtilmiştir. 15 dakika maruziyette herhangi bir kayıp yaşanmamış olup tam profiller elde edilmiştir. 30 dakikalık maruziyette ise T2023-XX-03 örneğin 2 lokusunda (CCDC102B ve RASSF5) kayıplar olmasından kaynaklı metilasyon verisi elde edilemediği için yaş tayini yapılamamıştır. 60 dakikalık maruziyette ise sadece T2023-XX-01 adlı örnekten yaş tayini yapılmıştır. T2023-XX-02 ve T2023-XX-03 kodlu örneklerde pik kaybı gözlenmiştir. UV maruziyeti elektroforegram görselleri Şekil 13'ten Şekil 15'e gösterilmiştir.

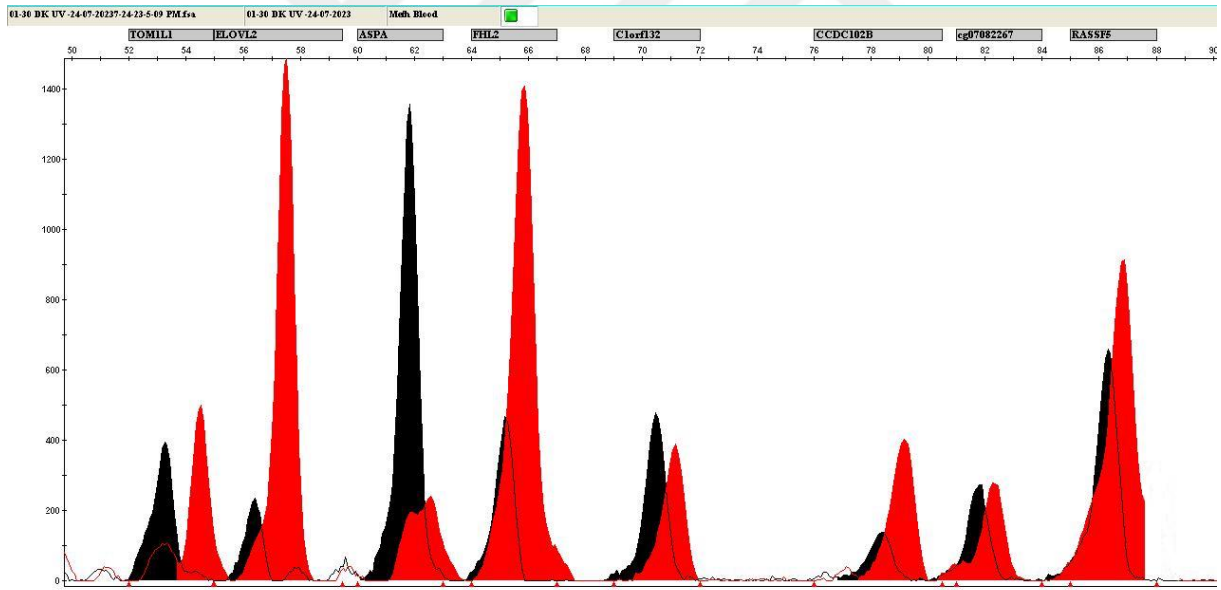
Tablo XXVI: UV'de Bekletilen Örneklerin DNA Metilasyon Yaşı Karşılaştırması

Örnek	UV Süresi	Kontrol Grubu DNAm Yaşı	Farklı sürelerdeki DNAm Yaşı
T2023-XX-01	15 Dakika	24	22
T2023-XX-02	15 Dakika	42	42
T2023-XX-03	15 Dakika	51	52
T2023-XX-01	30 Dakika	24	22
T2023-XX-02	30 Dakika	42	44
T2023-XX-03	30 Dakika	51	X
T2023-XX-01	60 Dakika	24	24
T2023-XX-02	60 Dakika	42	X
T2023-XX-03	60 Dakika	51	X

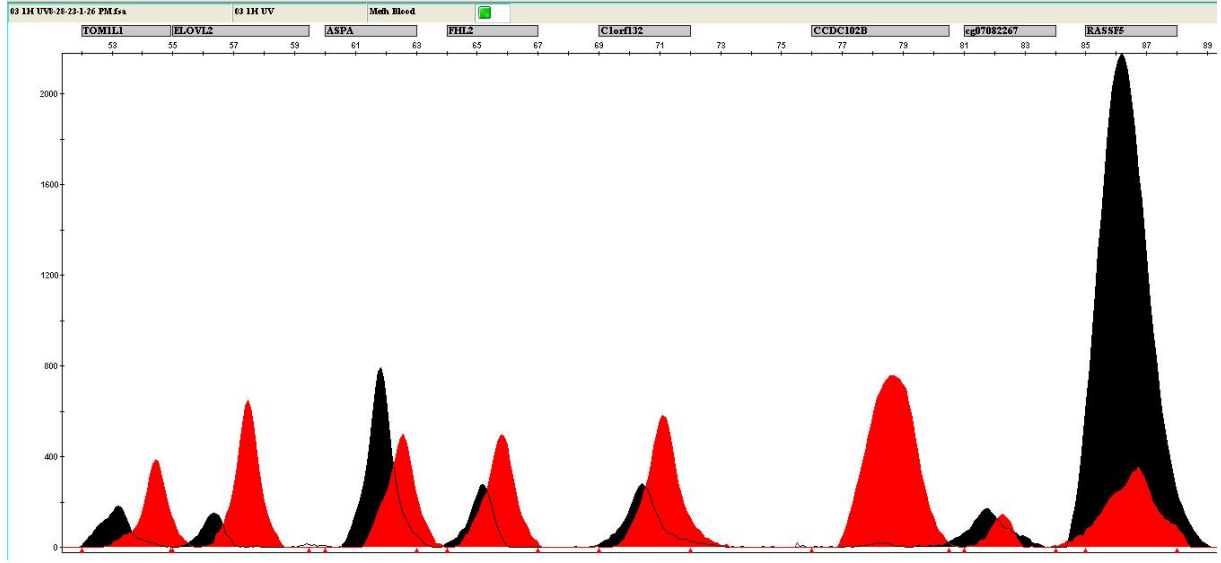
(DNAm yaşı hesaplanamayan örnekler X olarak gösterilmiştir.)



Şekil 13: T2023-XY-02 numaralı örneğin 15 dakikalık UV maruziyeti elektroforegram görseli.



Şekil 14: T2023-XY-01 numaralı örneğin 30 dakikalık UV maruziyeti elektroforegram görseli.



Şekil 15: T2023-XX-03 numaralı örneğin 60 dakikalık UV maruziyeti elektroforegram görseli.

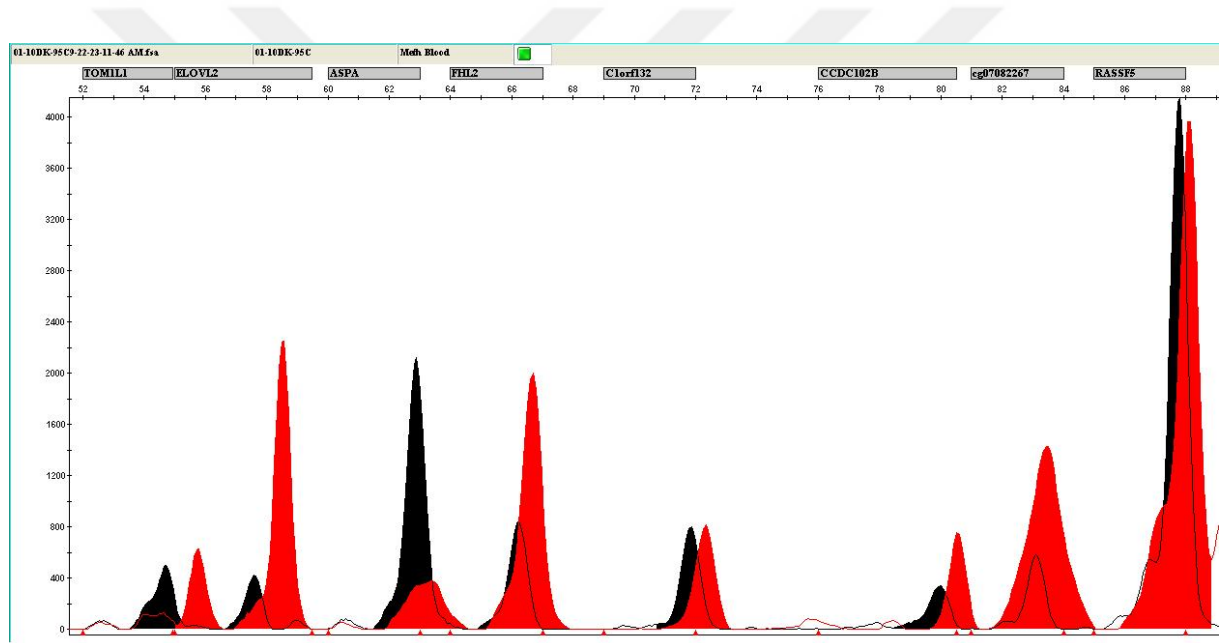
4.6.2. Sıcaklık Etkisi

EDTA'lı kandan izole edilen örneklerin izolatları, 10 ve 15 dakika olmak üzere ısıtıcı blokta 95 °C'ye maruz bırakılmış ve daha sonra bisülfid dönüşümü yapıp analiz edilmiştir. 1. PCR sonrası agaroz jel elektroforezinde DNA bantları her örnek için görülmüştür. Sonrasında kapiler elektroforezde çalışılmıştır. Elde edilen veriler Tablo XXVII'de belirtilmiştir. 10 dakikalık maruziyette tüm örneklerden yaş tayini yapılabilmektedir. Fakat 15 dakikalık maruziyette sadece T2023-XX-01 kodlu örnekten yaş tayini yapılabilmektedir. T2023-XX-02 ve T2023-XX-03 kodlu örneklerin CCDC102B lokusunda pik kaybı gözlenmiştir. 95 °C'ye maruziyeti elektroforegram görselleri Şekil 16 ve Şekil 17'de görülmektedir.

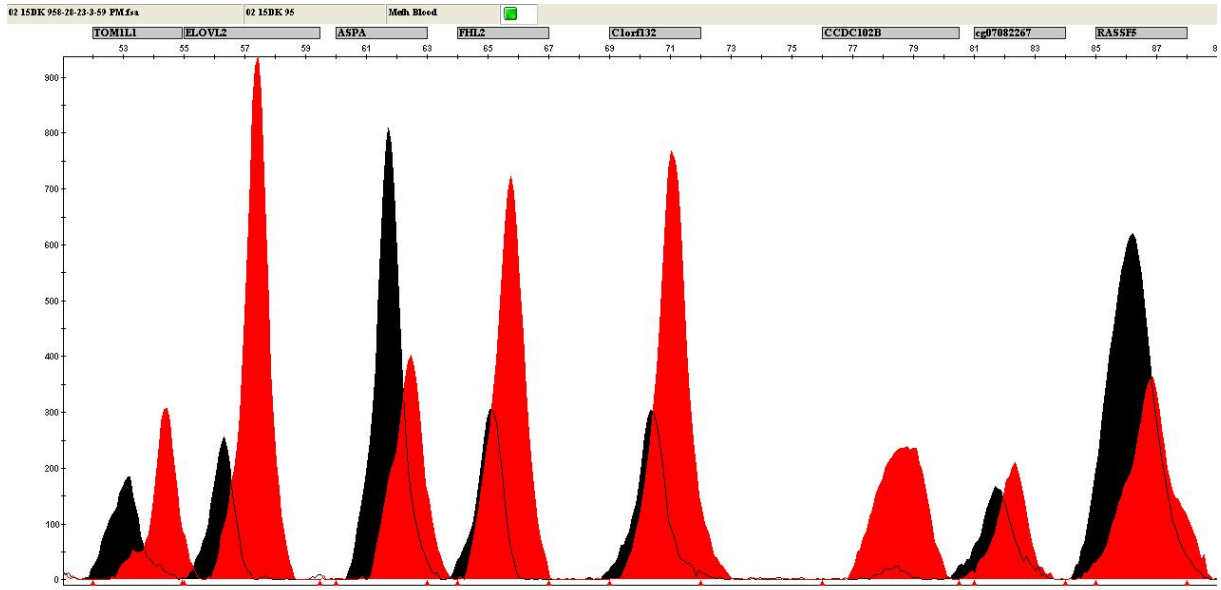
Tablo XXVII: 95 °C'ye Maruz Bırakılan Örneklerin DNA Metilasyon Yaşı Karşılaştırması

Örnek	95 °C'ye Maruziyet Süresi	Kontrol Grubu Yaşı DNAm Yaşı	Farklı sıcaklıklardaki örneklerin DNAm Yaşı
T2023-XX-01	10 Dakika	24	21
T2023-XX-02	10 Dakika	42	42
T2023-XX-03	10 Dakika	51	49
T2023-XX-01	15 Dakika	24	21
T2023-XX-02	15 Dakika	42	X
T2023-XX-03	15 Dakika	51	X

(DNAm yaşı hesaplanamayan örnekler X olarak gösterilmiştir.)



Şekil 16: T2023-XY-01 numaralı örneğin 95 °C'ye 10 dakikalık maruziyeti elektroforegram görseli.



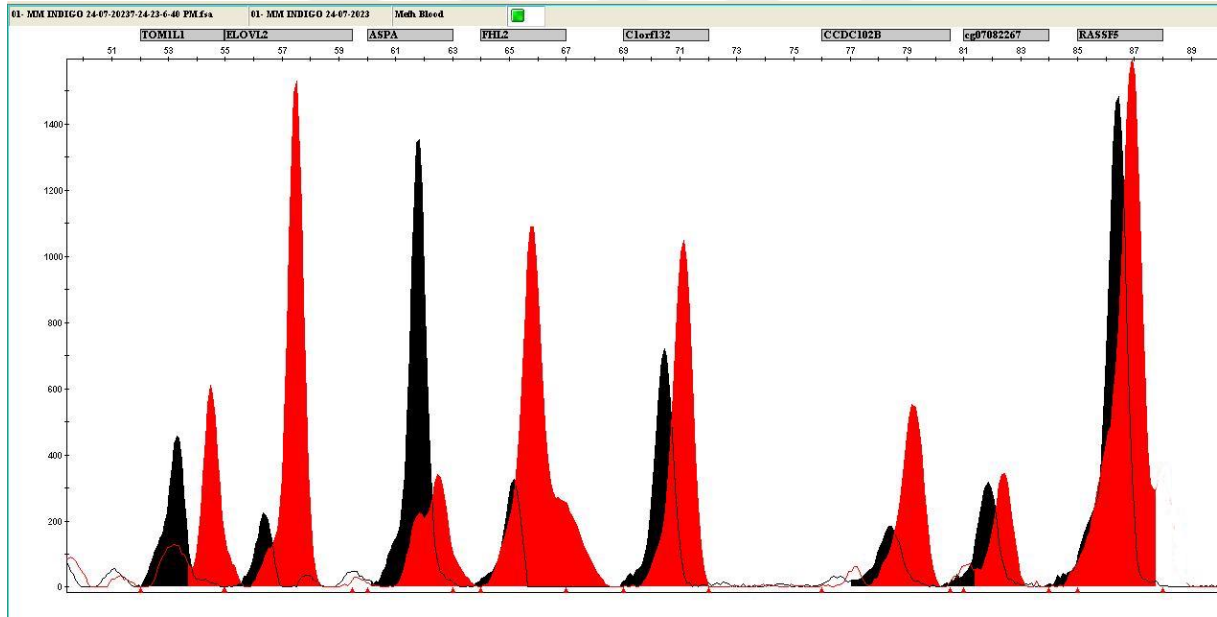
Şekil 17: T2023-XY-02 numaralı örneğin 95 °C'ye 15 dakikalık maruziyeti elektroforegram görseli.

4.6.3. İndigo Etkisi

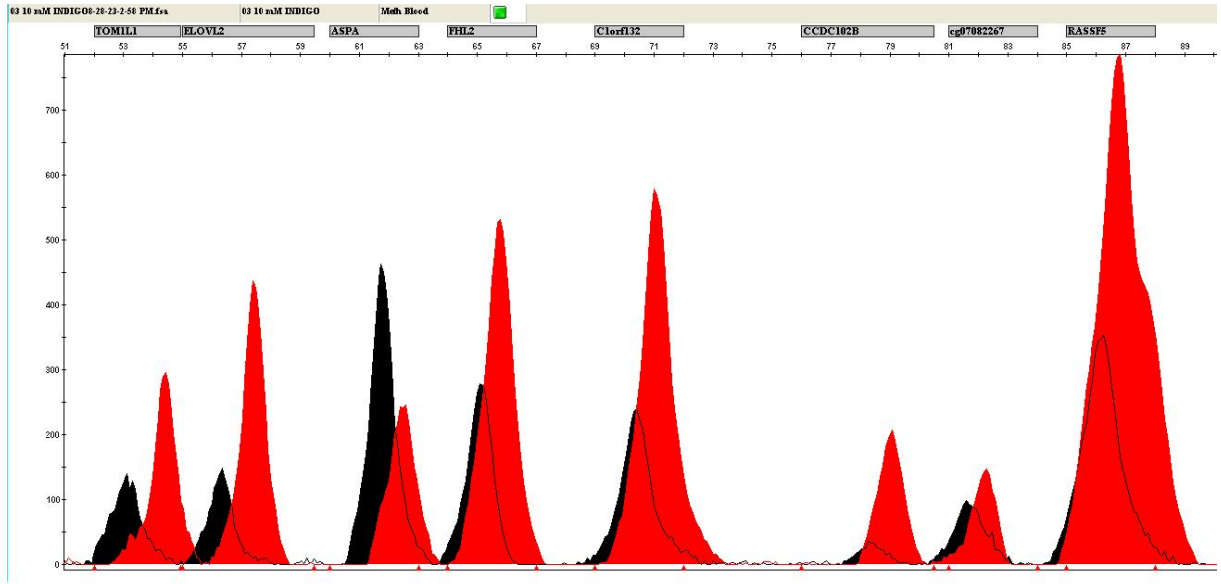
Taze kandan elde edilen izolatlar bisülfid dönüşümü yapıldıktan sonra PCR aşamasında 4, 10, 50 ve 100mM olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 1 µL indigo eklenmiştir. 1. PCR sonrası yapılan agaroz jel elektroforezinde DNA bantları her konsantrasyon için gözlenmiştir. Her konsantrasyonda tam profil elde edilmesine rağmen sapma oranları artmıştır ve elektroforegramda istenmeyen artefakt pikler gözlenmiştir. Veriler Tablo XXVIII'de belirtilmiştir. Elektroforegram görselleri Şekil 18'den Şekil 21'e görülmektedir.

Tablo XXVIII: İndigo İlave Edilen Örneklerin DNA Metilasyon Yaşı Karşılaştırması

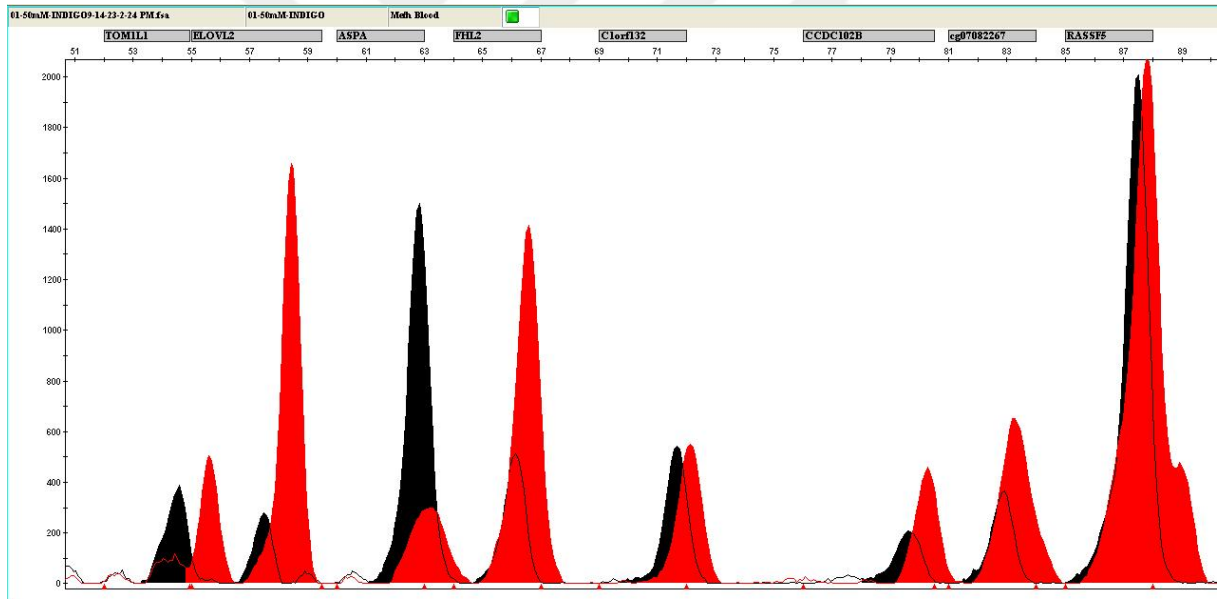
Örnek	Konsantrasyon (mM)	Kontrol Grubu DNAm Yaşı	Farklı konsantrasyonlarda indigo miktarlarındaki DNAm Yaşı
T2023-XX-01	4 mM	24	25
T2023-XX-02	4 mM	42	44
T2023-XX-03	4 mM	51	52
T2023-XX-01	10 mM	24	17
T2023-XX-02	10 mM	42	38
T2023-XX-03	10 mM	51	50
T2023-XX-01	50 mM	24	20
T2023-XX-02	50 mM	42	42
T2023-XX-03	50 mM	51	50
T2023-XX-01	100 mM	24	23
T2023-XX-02	100 mM	42	44
T2023-XX-03	100 mM	51	52



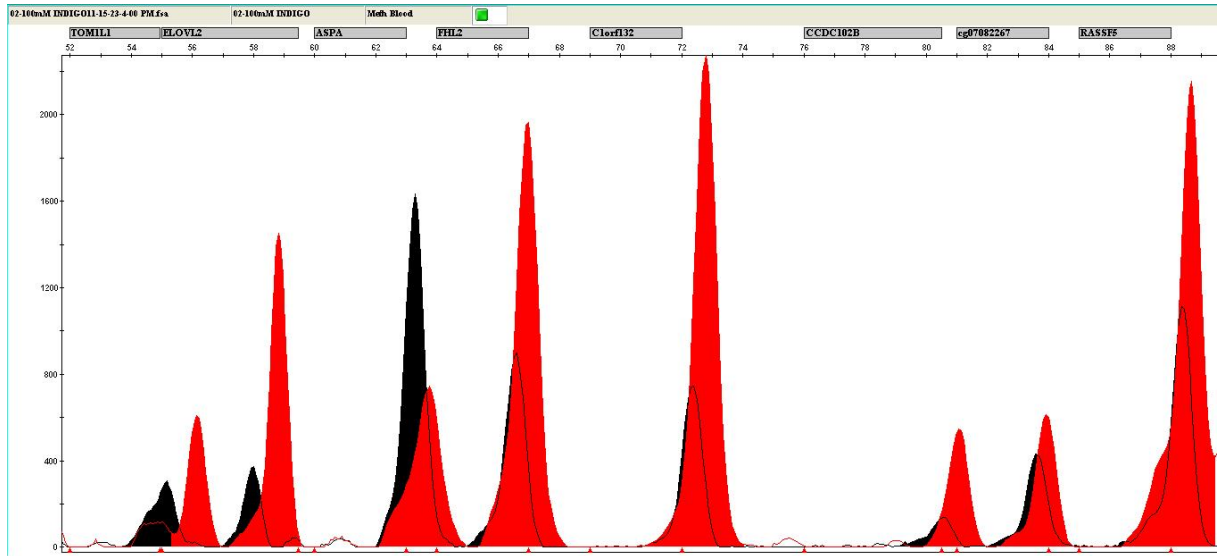
Şekil 18: T2023-XX-01 numaralı örneğin 4mM indigo elektroforegram görseli.



Şekil 19: T2023-XX-03 numaralı örneğin 10mM indigo elektroforegram görseli.



Şekil 20: T2023-XX-01 numaralı örneğin 50mM indigo elektroforegram görseli.



Şekil 21: T2023-XY-02 numaralı örneğin 100mM indigo elektroforegram görseli.

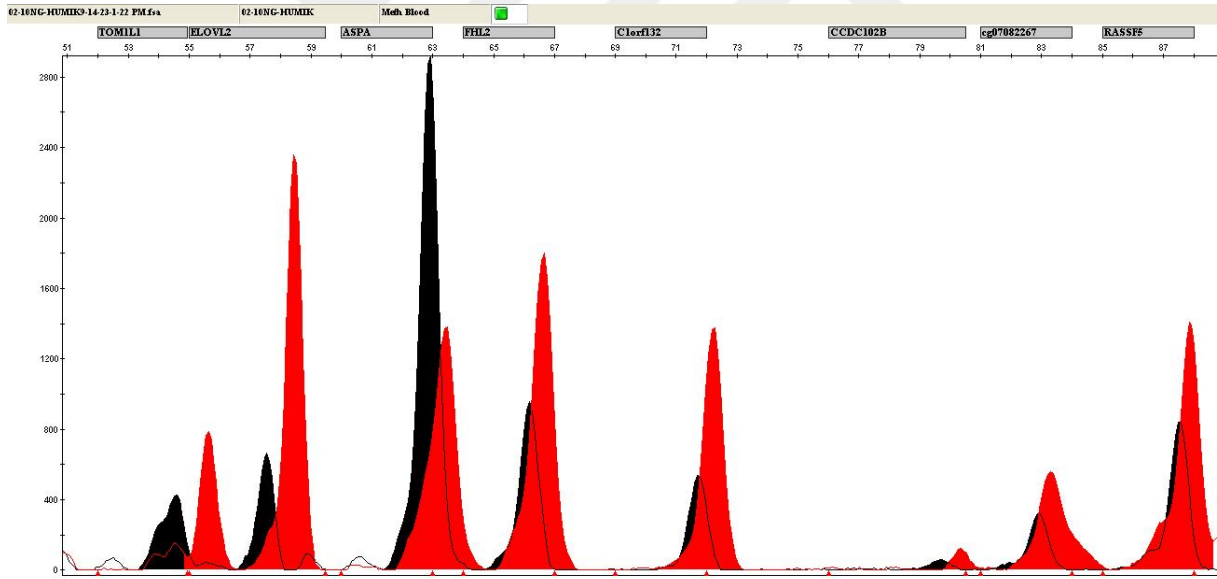
4.6.4. Hümkik Asit Etkisi

Taze kandan elde edilen izolatlar bisülfid dönüşümü yapıldıktan sonra PCR aşamasında 100, 125, 250 ng/μL olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda 1 μL hümkik asit eklenmiştir. 100 ng/μL hümkik asit eklenen örneklerde yaş tayinleri yapılmasına rağmen sapma oranı fazla olduğu tespit edilmiştir. 125 ng/μL hümkik asit eklenen örnekler 1. PCR sonrası yapılan agaroz jel elektroforezinde DNA bantları gözlenirken kapiler elektroforez analizinden sonra pik kayıpları yüzünden yaş tayini yapılamamıştır. 250 ng/μL hümkik asit eklenen örnekler agaroz jel elektroforezinde görüntü vermemiştir. Bu nedenle devam ettirilmemiştir. Veriler Tablo XXIX'da belirtilmiştir. Elde edilen elektroforegram görselleri Şekil 22 ve Şekil 23'te görülmektedir.

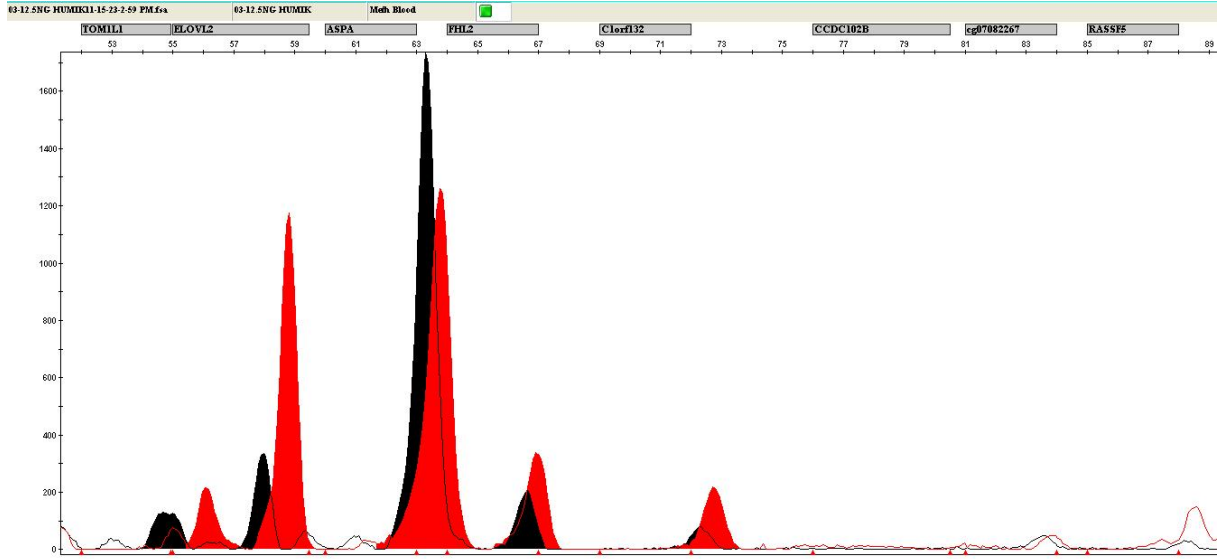
Tablo XXIX: Hümik Asit İlave Edilen Örneklerin DNA Metilasyon Yaşı Karşılaştırması

Örnek	Konsantrasyon (ng/μL)	Kontrol Grubu DNAm Yaşı	Farklı konsantrasyonlarda hümik asit miktarlarındaki DNAm Yaşı
T2023-XX-01	100 ng/μL	24	19
T2023-XX-02	100 ng/μL	42	39
T2023-XX-03	100 ng/μL	51	47
T2023-XX-01	125 ng/μL	24	X
T2023-XX-02	125 ng/μL	42	X
T2023-XX-03	125 ng/μL	51	X
T2023-XX-01	250 ng/μL	24	X
T2023-XX-02	250 ng/μL	42	X
T2023-XX-03	250 ng/μL	51	X

(DNAm yaşı hesaplanamayan örnekler X olarak gösterilmiştir.)



Şekil 22: T2023-XY-02 numaralı örneğin 100 ng/μL hümik asit elektroforegram görseli.



Şekil 23: T2023-XX-03 numaralı örneğin 125 ng/µL hüyük asit elektroforegram görseli.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Adli bilimler açısından önemli bir bulgu olan yaş tayini üzerine yapılan araştırmalar sonucunda en umut veren biyobelirteç DNA metilasyonlarıdır. DNA metilasyon profilleri üzerinden yapılan yaş hesaplamaları ortalama olarak ($\pm$) 5 yıllık bir sapma göstermektedir (72,76,77). Bu çalışmada da İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Adli Genetik AR-GE Laboratuvarında geliştirilen DNA metilasyonu ile yaş tahmini için kan örneğine ait 8 lokuslu multipleks paneli çalışılmıştır. Kanda yüksek korelasyon gösterdiği saptanan gen bölgelerinde bulunan CpG adacıklarındaki ELOVL2 (chr6:11044661), ASPA (chr17:3476273), C1orf132 (chr1:207823715), FHL2 (chr2:105399282), cg07082267, CCDC102B (chr18:68722183), RASSF5(chr1:206507531), TOM1L1(chr17:54899387) lokusları çalışılmıştır. Bu panelin farklı sürelerde ve farklı yüzeylerde beklemiş, çeşitli çevresel koşullara maruz bırakılarak degrade edilmiş kan örneklerindeki profilleme başarısı incelenmiştir. 3 farklı yaş grubundan olan, onam formunu imzalamış 3 bireyden alınan kan numuneleri ile oluşturulan yapay olay yeri örneklerinin analizi, geliştirilmiş olan panelin gerçek adli vakalarda uygulanabilirliği ve güvenilirliği test edilmiştir.

Çalışmada kişilerden alınan taze kanlar analiz edilmiştir. Çıkan yaşlar T-2023-XX01 ve T-2023-XX-03 numaralı örnekte tutarlılık göstermektedir. T-2023-XY-02 numaralı kişinin de çoğu örneğinde yaş tahmin sonuçlarının ($\pm$) 4 aralığında olduğu görülmektedir. Bu kişinin yaşam alışkanlıkları ve sigara tüketimi, yaş tahmin oranındaki sapmaya katkı sağlamış olabileceği düşünülmüştür.

Geçmişten günümüze kadar yapılan çalışmalara bakıldığında, bazı çalışmalarda sigara içme alışkanlığı ve yaşlanma arasında bir bağlantı bulunurken (105,106,107), bazı çalışmalarda ise herhangi bir bağlantı tespit edilmemiştir (108). Bu iki etmen arasında herhangi bir bağlam bulamayan Hamano ve arkadaşları (109) gibi Eipel ve arkadaşları (110) da 22 sigara içen ve

179 sigara içmeyen kişiyi karşılaştırmış ve herhangi bir farklılık tespit etmemiştir. Çalışılan CpG bölgelerinin sigaradan etkilenen bölgeler ile yaş tahmininde kullanılan bölgelerin aynı olması durumunda sigaranın etkileyici bir faktör olabileceği düşünülmektedir.

Cinsiyet farklılığı ve DNA metilasyonu üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında, geniş çapta çalışılmış olmasına rağmen, cinsiyetin yaşla ilişkili DNA metilasyonunu nasıl etkilediği konusunda çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir. Weidner ve ark. (111) ve Zbiec-Piekarska ve ark. (77) tarafından yapılan çalışmalarda, erkekler ve kadınlar arasında yaş tahmini doğruluğunda küçük farklılıklar bulunmuştur. Her iki çalışmada da tahmin edilen yaş, erkeklerde kadınlara göre daha yüksek ve tahmin doğrulukları da kadınlarda daha yüksek olduğu saptanmıştır. Fakat her iki çalışmanın da örneklem büyüklüğünün küçük olmasından kaynaklı, bulunan farkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı fark edilmiştir. Ayrıca İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Adli Genetik Ar-Ge laboratuvarında geliştirilen yaş tahmin paneli çalışmalarında olduğu gibi, DNA metilasyonuna dayalı yaş tahmini üzerine yapılan çalışmaların çoğunda da cinsiyetin DNA metilasyonu üzerinde herhangi bir etkisi tespit edilmemiştir (70, 110, 112,113).

DNA metilasyonlarının az miktarda DNA ile sonuç vermesi belirteç olarak tercih edilmesine olanak sağlar. Bu araştırmada da çalışılan minimum miktar 1,13 ng/μl olarak saptanmış ve tam metilasyon profili alınıp yaş hesaplaması yapılabilmektedir. İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Adli Genetik AR-GE laboratuvarında geliştirilen yaş tahmin paneli çalışmalarında da 1ng/μl ve üstü DNA ile güvenilir yaş tahmini elde edildiği bulunmuştur. DNA metilasyonu ile identifikasyon üzerine yapılan bir çalışmada da tespit limiti 1,25 ng/μl olarak bulunmuştur (114). DNA metilasyon belirteçleri, hem yaş tayini çalışmalarında hem de identifikasyon çalışmalarında az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağladığı görülmüştür.

5.1.Yüzeylerarası Farklılıklar ve Bekleme Süresinin Yaş Tahmin Paneline Etkisi

Olay yerinden elde edilen biyolojik deliller genellikle çeşitli yüzeylerden toplanmaktadır. Kan örneklerinin çeşitli yüzeylerden elde edilmesi ve bu yüzeylerde farklı sürelerde bulunmasının DNA metilasyonu ile yaş tayini analizine etkisini araştırmak bu çalışmadaki hedeflerden biridir. Farklı yüzeylerde bekletilen örneklerden ilk olarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu çalışma için DNA izolasyonu açısından en uygun yüzeyin fayans olduğu tespit edilmiştir. Kumaşın lifli yapısından kaynaklı, izolasyon sonrası elde edilen DNA miktarları fayansa oranla daha düşüktür. Çünkü kan, kumaşın lifli yapısı tarafından absorbe edildiği için izolasyon sırasında örneğin geri kazanımı tam verimle yapılamadığından daha düşük DNA miktarı elde edildiği düşünülmektedir. Bıçak örneklerinde de fayansa oranla daha düşük DNA miktarları elde edilmesinin nedeni metal yüzeyde bulunan inhibitörler kaynaklı olduğu düşünülmüştür (115,116). Fayans ve bıçağın yüzeyi düz ve kuru olduğundan kurumuş kan örnekleri direkt yüzeyden alınabildiği için DNA izolasyonu da tam verimle yapılabilmektedir.

Analiz edilen her yüzey için 6. ay da dahil olmak üzere tüm örneklerden DNA metilasyon profilleri elde edilmiş ve yaş tahminleri yapılmıştır. Fakat genel olarak bakıldığında bekleme süresi arttıkça yaş tahmini sapma oranında da bir artış söz konusu olmuştur. Ayrıca elde edilen DNA miktarı açısından da bekleme süresi arttıkça elde edilen DNA miktarı da bazı yüzeylerde daha düşük elde edilmiştir.

2020 yılında yapılan bir çalışmada 5 yıl keten kumaşta bekletilmiş kan lekelerinden Irisplex sistemi çalışılmış ve sonuç alınarak fenotip tayini yapılmıştır. Fakat bekleme süresine bağlı olarak izolasyon sonrası elde edilen DNA miktarında oldukça fazla azalma görülmüştür. Varılan bu sonuç da bu çalışmanın sonucuyla tutarlıdır (89). Bekleme süresi arttıkça degradasyon miktarı da arttığı için izolasyon aşamasında elde edilen DNA miktarı da azalmıştır. Poetsch ve arkadaşları 2022’de yayınladıkları başka bir çalışmada ise toplanan kan ve tükürük örneklerini kumaş ve plastik olmak üzere 2 farklı yüzeyde 12 aya kadar varan sürelerde oda

koşullarında karanlıkta bekletmişler ve sonrasında STR analizi yapmışlardır. Kan örnekleri için kumaş ve plastikte bekletilen örnekler arasında anlamlı bir farklılık tespit etmemişlerdir. 9 ay bekleyen örneklerden tam profiller elde edilmesine rağmen 12 aylık bekletme sonucunda örneklerin sadece %50'sinden sonuç alınabilmektedir. Sonuç alınamayan çoğu örneğin düşük DNA miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Dış mekan senaryolarının çalışıldığı bu çalışmada iç mekana kıyasla daha düşük tam DNA profilleri elde edildiği belirtilmiştir. Özellikle toprakta bekletilen numunelerin 3 ay sonrasında tam profil elde edemediklerini raporlamışlardır. Bunun nedeni olarak toprakta bulunan mikrobiyal floranın analiz edilecek örnekler ile direkt temasından kaynaklı olduğu düşünülmüştür (81). Bu tez çalışmasında da her yüzeyde ve 6 aylık bekletmede sonuç alınmıştır.

5.2. İnhibitörlerin DNA Metilasyonu Yaş Tahmin Paneline Etkileri

İnhibitörlerin DNA analizlerinde özellikle PCR aşamasında etkili olduğu bilinmektedir. Analiz edilecek DNA'nın çeşitli safsızlıklar içermesi, PCR aşamasındaki başarısızlıklara sebebiyet vermektedir. Çünkü inhibitörler, PCR aşamasında kullanılan her bileşiğe farklı şekillerde etki etmektedir. Bu çalışmada da iki inhibitör (indigo ve hümik asit) çalışılmıştır.

İndigo ile 4 farklı konsantrasyon çalışılmış ve hepsinde tam profil alınmıştır. Kot kumaşında bulunan indigo, adli çalışmalar açısından önemli bir PCR inhibitörüdür. Çünkü olay yerinde kot kumaşı üzerinden sıklıkla DNA örnekleri toplanmaktadır. Bu çalışmada 100mM konsantrasyona kadar DNA metilasyonu yaş tahmini panelinde tam profil alınarak yaş tahmini yapılabilmektedir. Çalışılan diğer bir inhibitör ise hümik asit, toprakta bulunan güçlü bir PCR inhibitörüdür. Adli çalışmalar açısından sağlıklı bir analiz için hümik asit, oldukça büyük bir engel olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışılan 4 farklı konsantrasyonda sadece 100 ng/μl'de tam profil elde edilebilmiştir. Fakat tahmin edilen yaşlarda sapma oranı çok fazla olduğu için

sağlıklı bir tahmin yapılamamıştır. 125 ng/μl'de 1. PCR sonrası yapılan agaroz jel elektroforezinde DNA bantları görülmesine rağmen oldukça fazla pik kaybı gözlenmiş ve yaş tahmini pik/alel kayıplarından dolayı yapılamamıştır. 250 ng/μl'de ise agaroz jelde dahi DNA bantları gözlenmemiştir.

Literatürde inhibitörler ile yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Düvenci A. tarafından çevresel etmenlerin InDel'ler paneli üzerine etkisi çalışılmıştır. 25 ve 50 ng/μl hümik asit ile yapılan analizlerde lokus kayıpları görülmüş 12,5 ng/μl hümik asit ve altında ise tam profiller elde edilmiştir. İndigo da ise 4mM'da sadece bir lokusta kayıp görülmüştür. İndigonun daha yüksek konsantrasyonları çalışılmadığı için 4mM ve üstü konsantrasyonların InDel analizine etkisi bilinmemektedir (117). Çalışmamızdaki konsantrasyonların her iki inhibitör için de yüksek olduğu göz önüne alınırsa indigoda bir kayıp gözlenmemesi ve 100 ng/μl hümik asit konsantrasyonunda sonuç alınması önemlidir. Bu iki çalışma karşılaştırıldığında DNA metilasyon profillerinin InDel'lere göre daha yüksek hümik asit ve indigo inhibitör konsantrasyonlarına maruz kalmasına rağmen DNA metilasyon profilleri elde edilmesi önemli bir bulgudur.

Silva ve arkadaşları tarafından (2016) yapılan bir çalışmada PCR inhibitörlerinin metilasyon düzeyleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızdan farklı olarak inhibitörler, bisülfıt öncesi ve bisülfıt sonrası eklenmiştir. Hematin (0,08 mM) ve hümik asit (0,24 mg/mL) inhibitörleri çalışılmıştır. Bu inhibitörlerin bisülfıt modifikasyonundan önce eklendiğinde tüm numunelerin çoğaldığını ve kontrol örneği metilasyon değerleri ile test edilen diğer örnekler arasında anlamlı bir fark olmadığını gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, bisülfıt modifikasyonundan sonra inhibitörler eklendiğinde amplifikasyon işlemi başarısız olmuş ve pirosekanslama sonuçları negatif kontrol örneğine benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bisülfıt dönüşümü için kullanılan kitin üreticisi (Qiagen, CA) tarafından sağlanan verilere göre, bisülfıt dönüşümünün yanı sıra daha sonraki metilasyon analizi için modifiye edilmiş DNA'nın diğer

maddelerden arınmasını da sağladığı belirtilmiştir. Yıkama adımı muhtemelen PCR inhibitörlerinin bisülfid modifikasyonunu takip eden PCR amplifikasyonu üzerinde fark edilebilir bir etkisinin olmamasını açıklamaktadır. Bulgularındaki bir diğer önemli etmen ise bozunmuş DNA'ya rağmen elde edilen veriler ile pozitif kontrol örnekleri arasındaki veriler arasında anlamlı bir farklılığın gözlenmemesidir. Bu çalışmada varılan en önemli sonuç inhibitör maruziyetinin bisülfid öncesi ve sonrasında olmasının etkisi büyüktür (10). Bu çalışmada da bizim çalışmamızda olduğu gibi hümit asidin bisülfid sonrası eklenmesi ile amplifikasyon işlemi başarısız olmuş ve sonuç alınamamıştır.

Ruiyang ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada ise PCR inhibitörlerine maruz bırakılan DNA örneklerinden STR çalışmışlardır. Hematin, hümit asit, üre ve indigotin gibi çok farklı inhibitör çalışılmıştır. İnhibitör konsantrasyonları arttıkça hem tespit edilen lokusların ortalama yüzdesi hem de ortalama alel tepe yüksekliği azaldığı görülmüştür. 160 ng/mL hümit asit ve 4 000 ng/mL indigo konsantrasyonunda tam profiller elde edilirken, >320 ng/mL hümit asit, >8 000 ng/mL indigo konsantrasyonlarında piklerde düşüş gözlenmiştir (118). Bu çalışma ile bizim çalışmamız karşılaştırıldığında ise daha düşük konsantrasyonlarda çalışılan hümit asit inhibitöründe STR profilleri açısından kayıplar yaşanmıştır. İndigoda da durum benzerdir.

Fan ve arkadaşları (2022) tarafından STR paneli için yapılan validasyon çalışmasında ise, indigo 125 µM, 250 µM, 500 µM ve 1000 µM olmak üzere dört farklı konsantrasyonda çalışılırken, hümit asit içinse 125 ng/µl, 250 ng/µl, 500 ng/µl ve 1000 ng/µl olacak şekilde dört farklı konsantrasyon çalışılmıştır. Hümit asit için PCR inhibisyon etkileri 125-250 ng/µl konsantrasyonlarda belirgin olmadığı bulunmuştur. İndigo 1000 µM konsantrasyonlarda bile PCR'de inhibe edici etkiye sahip olmadığı ancak 1000 ng/µl'de hümit asitte ise tamamen inhibe edici etki göstermiştir (119). Bu çalışmada bizim çalışmamıza oranla daha düşük indigo konsantrasyonları çalışılmış ve indigonun en yüksek konsantrasyonunda dahi herhangi inhibe

edici bir etki görülmemiştir. Bizim çalışmamızda hümik asidin inhibe edici etkisi daha düşük konsantrasyonlarda gözlenmiştir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında ve bu tez çalışmasında da gözlemlendiği gibi hümik asidin düşük konsantrasyonları bile güçlü bir inhibitör etkisi göstermiştir. İndigoda ise 100mM gibi bir konsantrasyonda bile yaş tahminini etkileyecek bir inhibitör etkisi göstermemiştir. Aynı zamanda daha yüksek konsantrasyonlar çalışılmasına rağmen InDel'lere oranla DNA metilasyon profilleri elde edilmiştir.

5.3. UV ve Isı'nın DNA Metilasyonu Yaş Tahmin Paneline Etkileri

Çevresel faktörler açısından incelenmesi gereken bir diğer etmen UV'dir. Güneş ışınlarından kaynaklı gelen UV ışınları göz önüne alındığında dış mekanlarda gerçekleşen adli vakalar için önemli bir etmendir. Aynı zamanda UV'nin yıkıcı etkileri, laboratuvarlarda yüzey temizleme için sıklıkla kullanılmasından kaynaklı bilinmektedir (81). Bu çalışmada 15 dakikalık UV maruziyeti, DNA metilasyon profili ile yaş tahmini açısından bir sorun teşkil etmemiştir. Fakat 30 dakikalık maruziyette T-2023-XX-03 numaralı kişinin metilasyon profilinde pik kaybı görüldüğü için yaş tahmini yapılamamıştır. 60 dakikalık bir maruziyet ise T-2023-XY-02 ve T-2023-XX-03 numaralı bireyler için pik kaybına neden olmuş ve profil elde edilememiştir. Bu nedenle, 30 dakika ve üstü maruziyetlerde sağlıklı bir DNA metilasyon profili elde etmek mümkün olmamıştır.

Sıcaklığın DNA üzerine etkisi bilinmektedir ve birçok çalışma ile de kanıtlanmıştır. Özellikle kan lekelerinin ayrışması, oksidasyonu ve denatürasyonu daha yüksek sıcaklıklarda daha hızlıdır (120). Bu çalışmada 95 °C ısı ile 10 dakikalık bir maruziyet, tam profil elde edilip yaş tahmini yapılmasına engel olmamıştır. Fakat 15 dakikalık bir maruziyet pik kayıplarına neden

olup yaş tahminini mümkün kılmamıştır. Isı ile DNA'nın çift sarmal yapısının bozulduğu ve DNA'nın degrade olup parçalanmaya başladığı bilinmektedir.

Düvenci A. (2020) tarafından yapılan bir araştırmada InDel'ler üzerine UV ve ısı etkileri araştırılmıştır. InDel'ler için 120 dk'lık UV maruziyeti sınır değer olarak belirlenmiş ve lokus kayıpları görülmüştür. 95 °C ısıda ise 30 dakikalık maruziyette lokus kayıpları görülmüştür (117). Bizim çalışmamızda ise 60 dakikalık UV maruziyetinde lokus kayıplarından kaynaklı profil elde edilememiştir. 95 °C ısıya 15 dakikalık maruziyette de yaş tahmini yapılamamıştır. InDel'lerin ısı ve UV maruziyetine DNA metilasyonlarına oranla daha dayanıklı olduğu sonucuna varılmıştır.

Bremmer ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışmada kan lekeleri farklı koşullarda bekletilmiştir. Sıcaklık olarak bakıldığında analiz edilen sadece beş farklı derece (0,4, 22, 37 ve 40 derece) olduğundan kaynaklı, sıcaklığın etkisi üzerine anlamlı ve yeterli bir veri elde edilememiştir (120).

Başka bir çalışmada ise UV etkisini incelemek için DNA örnekleri, bir SpectroLinker™ XL-1500 UV çapraz bağlayıcıda 30, 60, 90, 120 ve 150 saniye boyunca maksimum güçte maruz bırakılmıştır. UV ışığına maruz kalma süresi arttıkça, elde edilen profillerin kalitesi azalmış; daha fazla allelik ve lokus kaybı örneğinin yanı sıra heterozigot pik dengesizlikleri gözlemlenmiştir. Çünkü, UV hasarı zamanla birikerek amplifikasyonu önleyen daha fazla timin dimerine neden olduğu gibi, alellerin tamamının kopyalanmasını engelleyen iplik kopmalarına neden olmaktadır. Spectrolinker™ oluşturduğu DNA hasarı, doğal (güneş ışığı) UV maruziyetinde görülen bozulmadan daha aşırı olduğu raporlanmıştır. Çünkü bu cihaz, ozon tabakasının aksine mutajenik olabilecek UV-B ve UV-C ışınlarını bloke etmemektedir. Başka bir neden ise doğal olarak bozunan örneklerdeki DNA'nın, hücrel bileşenler tarafından korunmasıdır. Çalışmamızda olduğu gibi bu çalışmada da yapay olarak bozulan DNA'nın zaten

ekstrakte edilmiş olması ve dolayısıyla ekstraksiyon işlemi sırasında hücresel bileşenlerin uzaklaştırılması ve geriye yalnızca saflaştırılmış DNA'nın kalması da daha hızlı degradasyon için önemli bir etkidir (121).

Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü AR-GE laboratuvarında kan örnekleri için geliştirilen 8 CpG bölgesini içeren yaş tahmin panelinin, farklı yüzeylerde ve farklı sürelerde beklemiş, çeşitli çevresel koşullar ile degrade olmuş kan örneklerindeki başarısı gözlenmiştir. Pamuklu kumaş, fayans ve bıçak gibi farklı yüzeylerde 0,1,3,6 ay olmak üzere bekletilen kan örneklerinden yaş tahmini yapılmıştır. Taze kan örneklerinden elde edilen DNA izolatları, 15, 30 ve 60 dakika olmak üzere UV'ye maruz bırakılmış ve 60 dakikada lokus kayıplarından kaynaklı yaş tahmini yapılamamıştır. 95 °C'lik ısıya 10 dakikalık maruziyette yaş tahmini yapılırken, 95 °C'ye 15 dakika maruz bırakılmış olan DNA izolatlarında lokus kaybı görülmesi nedeniyle yaş tahmini yapılamamıştır. Bir diğer çevresel faktör olarak çalışılan inhibitörlerde ise hümik asit güçlü bir etki gösterip çalışılan düşük konsantrasyonlarda bile yaş tahmini yapılamazken, indigonun yüksek konsantrasyonlarında dahi yaş tahmini yapılmıştır. Genel olarak, çevresel faktörlerin biyolojik delillere negatif etkisi büyüktür. Degrade DNA ile de sonuç veren bir yaş tahmin paneli geliştirmek, adli bilimciler için önemlidir. Bu çalışmaya bakıldığında DNA metilasyonu ile yaş tahminine farklı yüzeylerin etkisi, farklı sürelerde kan örneklerinin beklemesi, UV, ısı ve inhibitörler gibi çeşitli çevresel faktörlerin çalışılmasının yanı sıra çok çeşitli çevresel faktörlerin olduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle mikrobiyolojik ajanların etkisi, ortamın nem düzeyinin etkisi, toprak yüzeyde bulunan kan numunelerinin analiz başarısı gibi daha birçok çevresel faktör araştırılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

1. Waddington, CH. Organisers and genes. UK Cambridge University Press, Cambridge, 1940.
2. Can Mİ, Aslan A. Epigenetik Mekanizmalar ve Bazı Güncel Çalışmalar. Karaelmas Fen ve Müh. Derg. 2016; 6(2): 445-452.
3. Freire-Aradas A, Phillips CP, Lareu MV. Forensic individual age estimation with DNA: From initial approaches to methylation tests. Forensic Sci Rev. 2017;29(2):121–44.
4. Heil SG. Epigenetic Techniques in Pharmacogenetics. Pharmacogenomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. 2013; vol.1015, Chapter 11.
5. Teijio O. Epigenetic Mechanism in the Regulation of Drug Metabolism and Transport. Pharmacoeugenetics. 2019; Chapter 3.
6. Cencioni C, Spallotta F, Martelli F, Valente S, Mai A, Zeiher A ve ark. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. Int. J. Mol. Sci. 2013; 14 (9) 17643–17663.
7. Steves CJ, Spector TD, Jackson SH. Ageing genes environmentand epigenetics: what studies tell us now, and in the future, Age Ageing 41. 2013; (5) 581–586.
8. William G. The emerging field of forensic epigenetics. Forensic Science International. 2018; (290) 24-25.
9. Cuffari, B. (2020). What is forensic epigenetics? Azo Life Science 10 Aralık 2020 tarihinde <https://www.azolifesciences.com/article/What-is-Forensic-Epigenetics.aspx> web adresinden erişildi.
10. Silva, DSBS. 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.
11. Lee JW. A validation study of DNA methylation-based age prediction using semen in forensic casework samples. Legal Medicine. 2018; (31) 74-77.

12. Jung, S. DNA methylation of the ELOVL2, FHL2, KLF14, C1orf132/MIR29B2C, and TRIM59 genes for age prediction from blood, saliva, and buccal swab samples. *Forensic Science International: Genetics*. 2018; (38) 1-8.
13. Choung, CM. A forensic case study for body fluid identification using DNA methylation analysis. *Legal Medicine*. 2021;(51) 101872.
14. Virkler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene, *Forensic Sci. Int.* 2009; 188, 1–17.
15. Kader F, Ghai M. DNA methylation and application in forensic sciences. *Forensic Science International*. 2015; (249), 255-265.
16. Lindahl T. The croonian lecture, 1996: endogenous damage to DNA, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 1996; 351 (1347),1529–1538.
17. Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA – A review. *Forensic Science International:Genetics*. 2010; (4), 148-157.
18. <https://theory.labster.com/structure-dna/> (Son Erişim Tarihi:03/12/2023).
19. Romeika JM, Yan F. Recent advances in forensic DNA analysis, *J. Forensic Res.* 2013; 12, 1–13.
20. Gunn P, Walsh S, Roux C. The nucleic acid revolution continues – will forensic biology becomes forensic molecular biology? *Front. Genet.* 2014; 5, 1–4.
21. Vidaki A, Daniel B, Court DS. Forensic DNA methylation profiling – potential opportunities and challenges, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 2013; 7, 499–507.

22. Lee HY, Lee SD, Shin K. Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads. BMB Reports. 2016; 49(7), 359-369.
23. Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Magnusson KP ve ark. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. Nat Genet. 2007; 39, 1443-1452
24. Filoğlu G, Altunçul H, Bülbül Ö. Adli Genetik Kimliklendirme. (2023) Seçkin Yayıncılık, İstanbul.
25. Naue J. Getting the chronological age out of DNA: using insights of age-dependent DNA methylation for forensic DNA applications. Genes Genomics. 2023; 45(10): 1239–1261.
26. Vidaki A, Daniel B, Court DS. Forensic DNA methylation profiling – Potential opportunities and challenges. Forensic Science International: Genetics. 2013; 7(5), 499-507.
27. Gomez A, Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics: Its Role in Interindividual Differences in Drug Response. Nature. 2009; vol. 85, number 4.
28. Carlberg C, Molnar F. Human Epigenomics. 2018; February, 1-120.
29. Onofri M, Delicati A, Marcante B, Carlini L, Alessandrini F, Tozzo P ve ark. Forensic Age Estimation through a DNA Methylation-Based Age Prediction Model in the Italian Population: A Pilot Study. Int J Mol Sci. 2023; 24(6): 5381.
30. <https://www.novusbio.com/research-areas/epigenetics> (Son Erişim Tarihi:03/12/2023).
31. Frumkin D, Wasserstrom A, Budowle B, Davidson A. DNA methylation-based forensic tissue identification. Forensic Science International: Genetics. 2011; 5(5):517- 24.

32. Vidaki A, Kayser M. Recent progress, methods and perspectives in forensic epigenetics. *Forensic Science International: Genetics*. 2018; 37(July), 180- 195.
33. Nestler EJ. Epigenetic Mechanisms of Drug Addiction. *Neuropharmacology*. 2014; 76: 259-268.
34. Zhang M. Mechanism of epigenetic inheritance. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2007; 19:266-272.
35. https://www.researchgate.net/figure/Major-players-involved-in-the-propagation-of-epigenetic-mechanisms-in-cells-DNA_fig1_351401190 (Son Erişim Tarihi:03/12/2023).
36. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*. 2011; 21(3), 381-395.
37. Kim I, Han N, Burckart, GJ, Oh JM. Epigenetic Changes in Gene Expression for Drug Metabolizing Enzymes and Transporters. *Pharmacotherapy*. 2014; 34(2): 140-150.
38. https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-histone-modifications-The-methylation-sites-are-represented_fig1_283086163 (Son Erişim Tarihi:03/12/2023).
39. Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016; 937, 3-17.
40. Heyn H, Moran S, Herraes IH, Sayols S, Gomez A, Sandoval J ve ark. DNA methylation contributes to natural human variation, *Genome Res*. 2013; 23, 1363–1372.
41. Tammen SA, Friso S, Choi SW. Epigenetics: the link between nature and nurture, *Mol. Aspects Med*. 2013; 34, 753–764.

42. Skinner MK, Manikkam M, Bosagna CG. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *NIH Public Access*. 2009; 21 (4): 214-222.
43. Petronis A. The origin of schizophrenia: Genetic thesis, epigenetic antithesis, and resolving synthesis. *Biol. Psychiat.* 2004; 55 (10): 965-970.
44. Sabeha, Hasnain SE. Forensic Epigenetic Analysis: The Path Ahead. *Medical Principles and Practice*. 2019; 28: 301- 308.
45. Lee HY, Jung SE, Lee EH, Yang WI, Shin KJ. DNA methylation profiling for a confirmatory test for blood, saliva, semen, vaginal fluid and menstrual blood. *Forensic Sci Int Genet*. 2016; Sep, 24:75–82.
46. Tachibana M. Epigenetic regulation of mammalian sex determination. *J Med Invest*. 2015; 62(1-2):19–23.
47. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*. 2013; 14 (10) 3156.
48. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Sueti F, Ballestar ML ve ark. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Jul; 102(30):10604–9.
49. Singal R, Ginder GD. DNA Methylation. *Blood*. 1999; 93(12), 4059-4070.
50. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature*. 2015; 517, 321-326.

51. Bestor TH. DNA methylation: evolution of a bacterial immune function into a regulator of gene expression and genome structure in higher eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1990; 326, 179-187.
52. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012; 13, 484-492
53. <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/technical-documents/technical-article/genomics/epigenetics/introduction-to-dna-methylation> (Son Erişim Tarihi:03/12/2023).
54. Zhu J, He F, Hu S ve ark. On the nature of human housekeeping genes. *Trends in Genetics.* 2008; 24(10), 418-484.
55. Jung S, Shin K, Lee HY. DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids. *BMB Reports.* 2017; 50(11): 546-553.
56. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002; 16, 6-21
57. <https://bsb-eurasipjournals.springeropen.com/articles/10.1186/1687-4153-2012-12> (Son Erişim Tarihi:03/12/2023).
58. Alegría-Torres JA, Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics.* 2011 Jun;3(3):267–77.
59. Liu C, Marioni RE, Hedman ÅK, Pfeiffer L, Tsai PC, Reynolds LM ve ark. A DNA methylation biomarker of alcohol consumption. *Mol Psychiatry.* 2018 Feb;23(2):422–33.
60. Lee KW, Pausova Z. Cigarette smoking and DNA methylation. *Front Genet.* 2013; Jul;4: 132.

61. Cankurtaran M. Yaşlılık, yaşlanma mekanizmaları, antiaging ve yaşam tarzı değişiklikleri. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, 2005, Antalya.
62. Cevenini E, Invidia L, Lescai F, Salvioli S, Tieri P, Castellani G, Franceschi C. Human models of aging and longevity. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(9):1393–1405.
63. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194–1217.
64. Candore G, Balistreri CR, Listì F, Grimaldi MP, Vasto S, Colonna-Romano G ve ark. Immunogenetics, gender, and longevity. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1089:516–537.
65. Kayser M. Forensic DNA phenotyping: predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes, *Forensic Sci. Int. Genet*. 18 (2015) 33–48.
66. Kayser M, P. de Knijff. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology, *Nat. Rev. Genet*. 12 (2011) 179–192.
67. An JH, Shin KJ, Choi A, Yang WI, Lee HY. DNA methylation-based age estimation in the forensic field, *Forensic Sci. Int. Genet*. 37 (2013) 1–8.
68. Dias HC, Cunha E, Real FC, Manco L. Age prediction in living: Forensic epigenetic age estimation based on blood samples. *Legal Medicine*. 2020; 101763.
69. Xu C, Qu H, Wang G ve ark. A novel strategy for forensic age prediction by DNA methylation and support vector regression model. *Scientific Reports*. 2015; 5(March), 1-10.
70. Zubakov D, Liu F, Kokmeijer I, Choi Y, van Meurs JBJ, van IJcken WFJ ve ark. Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length. *Forensic Sci Int Genet*. 2016; 24:33–43.
71. Tsuji A, Ishiko A, Takasaki T, Ikeda N. Estimating age of humans based on telomere shortening. *Forensic Sci Int*. 2002;126(3):197–199

72. Cho S, Jung S, Hong SR, Lee EH, Lee JH, Lee SD, Lee HY. Independent validation of DNA-based approaches for age prediction in blood. *Forensic Sci Int Genet.* 2017; 29: 250-256.
73. Lee KW, Pausova Z. Cigarette smoking and DNA methylation. *Front Genet.* 2013; 4, 132.
74. Martin GM. Epigenetic drift in aging identical twins. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; USA 102, 10413-10414.
75. Williams G, Horn B. Forensic epigenetics methods and applications. Elsevier, *Epigenetic Methods.* 2020; Chapter 31.
76. Park JL, Kim JH, Seo E, Bae DH, Kim SY, Lee HC ve ark. Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use. *Forensic Sci Int Genet.* 2016; 23:64–70.
77. Zbiec-Piekarska R, Spolnicka M, Kupiec T, Parys-Proszek A, Makowska Z, Paleczka A ve ark. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Sci Int Genet.* 2015; 17:173–179
78. Zbiec-Piekarska R, Spolnicka M, Kupiec T, Makowska Z, Spas A, Parys-Proszek A ve ark. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. *Forensic Sci Int Genet.* 2015; 14:161–167.
79. Maulani C, Auerkari EI. Age estimation using DNA methylation technique in forensics: a systematic review. *Egyptian Journal of Forensic Science.* 2020; 10: 38.
80. Rakyan VK, Down TA, Balding DJ and Beck S. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet.* 2011; 12, 529-541.
81. Poetsch M, Markwerth P, Konrad H, Bajanowski T, Helmus J. About the influence of environmental factors on the persistence of DNA — a long-term study. *International Journal of Legal Medicine.* 2022; 136:687–693.

82. Zubakov D, Hanekamp E, Kokshoorn M, van IJcken W, Kayser M, Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples, *Int. J. Legal Med.* 2008; 122, 135–142.
83. Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic diet: impact on epigenome and cancer, *Epigenomics.* 2011; 3, 503–518.
84. McKiernan HE, Danielson PB. Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. *Molecular Diagnostics.* 2017; Chapter 21: 371-394.
85. İpek Esen Melez. Kan Lekesi Üzerinden Adli Genetiğe Giriş. 2013, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
86. Melez İ. E. (2013). Adli Genetiğe Giriş. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
87. Houck MM, Siegel JA. Adli Bilimlerin Temeli (Fundamentals Of Forensic Science). 2016, Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık.
88. Schneider, P, bender K, Mayr W ve ark. STR analysis of artificially degraded DNA – Results of a collaborative European exercise. 2004; 139(2-3), 123-134.
89. Devranoğlu D. (2019). Bekletilerek Eskitilmiş Kan Örneklerinde Irisplex Sisteminin Stabilitésinin İncelenmesi (Yükseklisans Tezi). İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa, 2019.
90. Hall J, Ballantyne A. Characterization of UVC-induced DNA damage in bloodstains: forensic implications. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004; c. 380(1), ss. 72–83.
91. Dash HR, Das S. Microbial Degradation of Forensic Samples of Biological Origin: Potential Threat to Human DNA Typing. *Molecular Biotechnology.* 2018; 60(2):141-153.

92. Lee LYC, Wong HY, Lee JY, Waffa ZBM, Aw ZQ, Fauzi SNABM ve ark. Persistence of DNA in the Singapore context. *Int J Legal Med.* 2019; 133:1341–1349.
93. Gefrides LA, Powell MC, Donley MA, Kahn R. UV irradiation and autoclave treatment for elimination of contaminating DNA from laboratory consumables. *Forensic Sci Int Genet.* 2010; 4:89–94.
94. Hall A, Sims LM, Ballantyne J. Assessment of DNA damage induced by terrestrial UV irradiation of dried bloodstains: forensic implications. *Forensic Sci Int Genet.* 2014; 8:24–32.
95. Alaeddini R. Forensic implications of PCR inhibition—A review. *Forensic Science International: Genetics.* 2012; 6: 297–305.
96. Larkin A, Harbison S. An improved method for STR analysis of bloodstained denim, *Int. J. Leg. Med.* 1999; 112 (6), 388–390.
97. Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 271 (3) 726–730.
98. Braid MD, Daniels LM, Kitts CL. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation, *J. Microbiol. Methods.* 2003; 52 (3), 389–393.
99. Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR, *J. Forensic Sci.* 2010; 55 (1), 25–33.
100. Barbaro A, Cormaci P, Barbaro A. DNA typing from 15-year-old bloodstains. *International Congress Series.* 2006; 1288, 550–552.

101. Ashwini NK, Manjunath MR, Kusuma KN. Evidentiary value and effects of contaminants on blood group factors in medico-legal grounds. *International Archives of Integrated Medicine*. 2015; 2, 68–72.
102. Dissing J, Søndervang A, Lund S. Exploring the limits for the survival of DNA in blood stains. *Journal of Forensic and Legal Medicine*. 2010; 17, 392–396.
103. Kulkarni UK, Gosavi NR, Kulkarni KV. Effect of ageing and environment of north Maharashtra on ABO grouping substances of blood stain. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences* 2016; 3, 608–611.
104. Pishchany G, Skaar EP. Taste for blood: Hemoglobin as a nutrient source for pathogens. *PLoS Pathogens*. 2012; 8, e1002535.
105. Beach SR, Dogan MV, Lei MK ve ark. Methylomic aging as a window onto the influence of lifestyle: tobacco and alcohol use alter the rate of biological aging. *J Am Geriatr Soc*. 2015;63: 2519–2525.
106. Levine ME, Lu AT, Quach A ve ark. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging*. 2018; 10:573–591.
107. Yang Y, Gao X, Just AC ve ark. Smoking-related DNA methylation is associated with DNA methylation phenotypic age acceleration: the veterans affairs normative aging study. *Int J Environ Res Public Health*. 2019; 16:2356.
108. Quach A, Levine ME, Tanaka T ve ark. Epigenetic clock analysis of diet, exercise, education, and lifestyle factors. *Aging*. 2017;9: 419–446.

109. Hamano Y, Manabe S, Morimoto C ve ark. Forensic age prediction for saliva samples using methylation-sensitive high resolution melting: exploratory application for cigarette butts. *Sci Rep.* 2017;7: 10444.
110. Eipel M, Mayer F, Arent T ve ark. Epigenetic age predictions based on buccal swabs are more precise in combination with cell type- specific DNA methylation signatures. *Aging.* 2016; 8:1034–1044.
111. Weidner CI, Lin Q, Koch CM ve ark. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol.* 2014;15: R24.
112. Al-Ghanmy HSG, Al-Rashedi NAM, Ayied AY. Age estimation by DNA methylation levels in Iraqi subjects. *Gene Rep.* 2021; 23:101022.
113. Refn MR, Kampmann ML, Morling N, Hansen JT, Børsting C, Pereira V. Prediction of chronological age and its applications in forensic casework: methods, current practices, and future perspectives. *Forensic Sciences Research*, 2023; 8, 85–97.
114. Choung CM, Lee JW, Park JH, Kim CH, Park HC, Lim SK. A forensic case study for body fluid identification using DNA methylation analysis. *Legal Medicine*, 2021; 51,101872.
115. Ogdur M, Cakan H, Cevik FE. Investigation of the microorganisms decaying blood evidences. *Medicine*, 2018, 7.1: 173-7.
116. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(6):371-84.
117. Düvenci A. İnsersiyon/ Delesyon (INDEL) Lokuslarına Ait Kimliklendirme Panelinin Geliştirilmesi ve Validasyonu (Doktora Tezi). İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa, 2020.

118. Tao R, Chen C, Sheng X, Xia R, Zhang X, Zhang J ve ark. Validation of the Investigator 24plex QS Kit: a 6-dye multiplex PCR assay for forensic application in the Chinese Han population, Forensic Sciences Research. 2019; 1-9.
119. Fan H, Wang L, Liu C, Lu X, Xu X ve ark. Development and validation of a novel 133-plex forensic STR panel (52 STRs and 81 Y-STRs) using single-end 400 bp massive parallel sequencing. Int J Legal Medicine. 2022 Mar;136(2):447-464.
120. Bremmer RH, Bruin KG, Gemert MJC, Leeuwen TG, Aalders MCG. Forensic quest for age determination of bloodstains. Forensic Science International. 2012; 10; 216(1-3):1-11.
121. Quintin D, Scheinman JE, Adamowicz MS, San Pietro D. Assessment of PowerPlex® Fusion's Ability to Type Degraded DNA. Science & Justice. 2020; 60, 423-431.

EKLER
ETİK KURUL ONAYI



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Börte Müge ŞAŞMAZ

Doğum Yeri ve Tarihi:

E-posta: [XXX](#)

Eğitim Bilgileri

- | | |
|-----------|---|
| 2020-2024 | İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü (Tezli Yüksek Lisans Programı) |
| 2018-2020 | İzmir Ekonomi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Bölümü |
| 2013-2017 | Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü |

Sertifikalar

- | | |
|------|---|
| 2019 | Dokuz Eylül Üniversitesi, Laboratuvar Güvenliği Kursu |
|------|---|

İş Deneyimi

- | | |
|-----------|--|
| 2020-2022 | Özel İzmir Ege Laboratuvarı, Tıbbi Laboratuvar Teknikeri |
|-----------|--|