



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**POSTMORTEM ÖLÜM ZAMANI TAYİNİNDE DNA
METİLASYONUNUN ETKİNLİĞİ**

Abdoulkarim UZABAKIRIHO

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER
ADLİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Danışman

Prof.Dr. Asuman SUNGUROĞLU

2017-ANKARA

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜĞÜ'NE,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “**Postmortem Ölüm Zamanı Tayininde DNA Metilasyonunun Etkinliği**” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafından yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafından yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Abdoukarim UZABAKIRIHO

Tarih: 06/06/2017

İmza: 

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı
Adli Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında

Abdoulkarim UZABAKIRIHO tarafından hazırlanan

“Postmortem Ölüm Zamanı Tayininde DNA Metilasyonunun Etkinliği” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak

OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

23.05.2017



Prof.Dr. H.Sinan SÜZEN
Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Ü. Tıp Fakültesi
Üye



Doç. Dr. Mukaddes GÜRLER
Hacettepe.Ü. Tıp Fakültesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof.Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
KABUL VE ONAY	iii
ÖNSÖZ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
ÇİZELGELER	x
1. GİRİŞ	1
1.1. EPİGENETİK	4
1.1.1. Histon Modifikasyonu	6
1.1.2. RNA İnterferans	9
1.1.3. DNA Metilasyonu	11
1.1.3.1. DNA Metilasyonu Mekanizması	11
1.1.3.2. CpG Adacıkları	12
1.1.3.3. DNA Metiltransferaz Enzimleri	13
1.1.3.4. DNA Metilasyonu ve Gen İfadesi	14
1.1.3.5. DNA Metilasyonu ve Yaşlanma	16
1.1.3.6. DNA Metilasyonu ve İlişkili Hastalıklar	18
1.1.3.6.1. Bağışıklık Sistemi Hastalıkları	18
1.1.3.6.2. Nöropsikiyatrik Hastalıklar	19
1.1.3.6.3. Kanser ve Epigenetik	20
1.1.2. ADLİ BİLİMLERDE DNA METİLYASYONU UYGULAMALARI	22
1.1.2.1. Biyolojik Kaynaklı Doku ve Sıvı Örneklerinin Tayini	23
1.1.2.2. DNA Örneklerini Kimlik Denetimi ve Metilasyon	24
1.1.2.3. Tek Yumurta İkizleri Arasında Metilasyon	25
1.1.2.4. Biyolojik Örneklerden Yaş Tayini ve Metilasyon	26
1.1.2.5. Biyolojik Örneklerden Cinsiyet Tayini ve Metilasyon	28
1.1.2.6. Ölüm Nedeni ve Metilasyon	30
1.1.3. DNA METİLYASYONU ÖLÇÜM TEKNİKLERİ	32
1.1.3.1. Global Metilasyon Analizi	32
1.1.3.2. Gen-Spesifik Metilasyon Analizi	33

2. GEREÇ VE YÖNTEM	34
2.1. Örnek Toplanması	34
2.2. Gerekli Materyaller	36
2.2.1. Alet ve Gereçler.....	36
2.2.2. Kimyasallar	36
2.3. DENEY PROSEDÜRÜ	39
2.3.1. DNA İzolasyonu	39
2.3.2. DNA'nın Kalite ve Miktarının Belirlenmesi	41
2.3.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi.....	41
2.3.2.2. DNA Miktar Tayini	41
2.3.3. DNA Modifikasyonu	42
2.4. İSTATİSTİK ANALİZLER	44
3. BULGULAR	45
4. TARTIŞMA	55
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	60
ÖZET	61
SUMMARY	62
KAYNAKLAR	63
EKLER	71
EK-1. Etik Kurul Onayı	71
EK-2. Bilimsel Çalışma İzni	72
ÖZGEÇMİŞ	73

ÖNSÖZ

Yıllar önce kariyerimi gerçekleştirmek istediğim alan olan Adli Bilimler ile Yüksek Lisans eğitimime başladığım ilk günden itibaren bilgi ve deneyimleriyle bana katkı sağlayan çok değerli Adli Bilimler Enstitüsü öğretim üyelerine, ideallerim doğrultusunda ilerlememde her zaman destek oldukları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın başarıyla gerçekleştirilmesinde her adımda zengin akademik birikimiyle bana yol gösteren danışmanım Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Asman SUNGUROĞLU'na sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez için gerekli Etik kurul Onayı ve Bilimsel Çalışma İzini alınmasında sağladıkları sonsuz destekten dolayı Sayın Prof. Dr. Aslıhan AVCI Hocama çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yürütülmesi için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında olan çalışmalarındaki destekleri ile kıymetli bilgi ve deneyimlerini paylaştığı için Sayın Dr. Tülin ÖZKAN ve Sayın Furkan BALBAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Türkiye'ye ilk geldiğimden beri ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana maddi ve manevi destek olan YTB (Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı)'nin yanı sıra Türk vatandaşlarına sonsuz teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren katkı sağlayan isimlerini tek tek yazamadığım tüm arkadaşlarıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Son olarak varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim anneme ve kardeşlerime teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA: Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

CpG: Sitozin-Fosfo-Guanin

5m-C: 5-metilsitozin

CH₃: Metil grubu

PMA: Postmortem aralığı

ATK: Adli Tip Kurumu

DNMT: DNA metiltransferaz enzimleri

FMR1: Fragile X mental retardation 1

MECP2: Metil-CpG-bağlayıcı protein 2

dk: Dakika

°C: Santigrat derece

%: Yüzde

mg: Miligram

ml: Mililitre

ul: Mikrolitre

RT-PCR: Reverse transkripsiyon-Polimeraz zincir reaksiyonu

ŞEKİLLER

Şekil 1. İnsan üzerindeki epigenetik değişim faktörleri.	4
Şekil 2. Epigenetik mekanizmalar.	5
Şekil 3. Nükleozom sekiz histon protein içerir; H2A, H2B, H3 ve H4 sarılı DNA (gri renki) ile temsil edilir.	6
Şekil 4. RNAi mekanizmasında rol alan miRNA ve siRNA'ların sentez ve etki yolları.....	10
Şekil 5. DNA metilasyonunu mekanizması.....	12
Şekil 6. De novo metilasyonu ve maintenance metilasyonu mekanizmaları.....	13
Şekil 7. DNA metilasyonu yoluyla gen ifadesinin sessizleşmesini gösterir.	14
Şekil 8. DNA metilasyonu ile transkripsiyonun düzenlenmesi.	15
Şekil 9. İnsan psoas kas doku örnekleri.	34
Şekil 10. 21 insan dokulardan elde edilen, DNA izolasyon işleminden sonraki DNA örnekleri.	40
Şekil 11. 5mC DNA ELISA Kiti ile DNA modifikasyonunun prensibi.....	42
Şekil 12. 21 vakadan izole edilen DNA'ya ait jel elektroforez görüntüsü.	45
Şekil 13. Değişen saatlerde zamana bağlı olarak vakalara ait global DNA metilasyon (ng/µl) oranları..	48
Şekil 14. DNA karışımları ile üretilen standart eğri.	48
Şekil 15. Vakalara ait grupları, global DNA metilasyon ortalamaları ve PMA ilişkisi.	51
Şekil 16. Cinsiyet ve global DNA metilasyon ortalamalarının karşılaştırılması.	54
Şekil 17. Hastanede yatan ve aynı gün vefat eden gruplar arasındaki global DNA metilasyon ortalamalarının karşılaştırılması.	54

ÇİZELGELER

Çizelge 1. Bazı özellikleri bakımından miRNA ile siRNA'nın karşılaştırılması.	9
Çizelge 2. Yaşlanma ve uzun ömür ile ilişkili farklılaşan metillenmiş lokusların insan çalışmaları.	17
Çizelge 3. DNA Metilasyonuna Bağlı Yaş Tayini Yapılan Genler.	28
Çizelge 4. İncelenen İnsan Biyometrik Verileri	35
Çizelge 5. Quick-DNA TM Miniprep Plus Kit içeriği.	37
Çizelge 6. 5-mC DNA ELISA Kit içeriği.....	37
Çizelge 7. Negatif Kontrol ve Pozitif Kontrol hazırlaması.....	38
Çizelge 8. Antikor hazırlaması	38
Çizelge 9. Vakalara ait cinsiyet ve istatistik olarak değerlendirilmesi.	45
Çizelge 10. Vakalara ait optik dansite ve DNA (ng/μl) sonuçları.	46
Çizelge 11. Vakalara ait global DNA metilasyon (ng/μl) ve standart sonuçları 47	47
Çizelge 12. Vakalara ait Global DNA metilasyon miktarı (ng/μl) ve global DNA metilasyon yüzdesi.....	49
Çizelge 13. Vakalara ait grupları ve istatistik olarak değerlendirilmesi.....	50
Çizelge 14. Vakalara ait global DNA metilasyon yüzdesi sonuçları ve istatistik olarak değerlendirilmesi.....	50
Çizelge 15. Vakalara ait bildirilen 3 grup için ortalama rank.....	50
Çizelge 16. Vakalara ait bildirilen 3 grup için istatistik Testi.	50
Çizelge 17. Vakalara ait Cinsiyetler arasındaki global DNA metilasyon düzeyinin istatistik olarak değerlendirilmesi.	51
Çizelge 18. Vakalara ait bildirilen cinsiyet için ortalama rank.....	52
Çizelge 19. Vakalara ait bildirilen cinsiyet için istatistiksel Testi.....	52
Çizelge 20. Hastanede yatanların ve aynı gün vefat edenlerin global DNA metilasyon değerleri üzerine etkisi istatistik olarak değerlendirilmesi.....	52
Çizelge 21. Vakalara ait bildirilen hastanede yatanları ve aynı gün vefat edenleri için ortalama rank.....	53
Çizelge 22. Vakalara ait bildirilen hastanede yatanları ve aynı gün vefat edenleri için istatistiksel Testi.	53

1. GİRİŞ

Herkesin bildiği gibi ölüm, yaşamın kaçınılmaz sonudur ve ne zaman gerçekleşeceği kimse tarafından bilinmemektedir. Bir saat değil, bir dakika değil, hatta bir saniye sonra bile hayatta olacağımız kesin değildir. Yapılan araştırmalar dünyada ortalama yılda 50 milyon kişinin öldüğünü göstermektedir (Oğuz, 2013). Türkiye’de ise, ölüm sayısı revize edilen 2014 yılı verisine göre farklı sebeplerle ortalama 391 bin 9 kişi ölmüştür. Bu sayı 2015 yılında %3,6 artarak 405 bin 218 kişi ölmüştür. Ölenlerin %54,8’ini erkekler, %45,2’sini kadınlar oluşturmaktadır (Türkiye İstatistik Kurumu, 2015).

Günlük hayatta en çok rastlanan ölüm nedenleri; biyolojik yaşlanma, kötü beslenme, hastalık, kirlilik, predatörlük, intihar, cinayet, açlık ve kazalardır (Tolou-Ghamari, 2016). Son yıllarda ise, uygarlığın ve teknolojinin gelişmesi ile cinayetin türleri ve suçun işleniş biçimleri fevkalade artmış ve değişmiştir. Bu yüzden polise ve yargıya düşen görevler ve/veya sorumluluklar da artış göstermiştir.

Günümüzde ise, tüm şiddetli ve şüpheli ölüm vakaların soruşturulmalarında ölüm nedeninin yanı sıra ölüm zamanının tayin edilmesi son derece önemli konulardan biridir (Young ve ark., 2013; Vass ve ark., 2013). Çünkü olayların soruşturulması ve faillerin yakalanması hem olay mağdurları hem de toplumsal beklenti açısından önem arz etmektedir (Swift, 2006). Ayrıca, ölüm zamanı tayin edildikten sonra bazı şüpheliler serbest bırakılabilmekte ve tanıkların ifadelerinin doğruluğu tespit edilebilmektedir (Bishop, 2014). Ancak, bugüne kadar tıbbi ve tıbbi olmayan bulguların birlikte değerlendirilmesi ölüm zamanının tayini için % 100 kesin sonuçlar vermemiştir (Sampaio-Silva ve ark., 2013; Mahalakshmi ve ark., 2016). Özellikle cesedin dış ortamda kaldığı, çürümenin başladığı ve ilerlediği durumlarda önemlidir. Postmortem aralığı (PMA)’nı, olay yeri incelemesi bulguları ve otopsi sonuçları ile belirlemek mümkün olabilmektedir (Asante, 2013; Ebuehi ve ark., 2015).

PMA tayininde olay yerindeki koşulların değerlendirilmesi ve ölen şahsın ayrıntılı hikâyesinin alınması gerekmektedir. Ayrıca, postmortem dönemde cesette meydana gelen fiziksel değişiklikler (temel vücut fonksiyonlarının kaybı ve hareketsizlik, ölü soğuması, ölü lekeleri, ölü sertliği, çürüme ve iskeletleşme), entomolojik ve antropolojik bulgular da kullanılmaktadır (Kushwaha ve ark., 2010).

Postmortem dönemde; cesette meydana gelen değişimleri iyice incelenerek ölümün yaklaşık süresini saatlerle ifade edildiği süre kısa postmortem dönem, günlerle-haftalarla ifade edildiği süre orta postmortem dönem, aylarla-yıllarla ifade edildiği süreç ise uzun postmortem dönem olarak sınıflandırılabilir. Ölümün yaklaşık süresini tahmini bu sınıflandırma yardımıyla yapılabilmektedir (Açıkgöz, 2008).

Postmortem dönemde özellikle ilk iki ay içinde ölümün yaklaşık süresinin belirleme tayininde en iyi yöntem böceklerin kullanılmasıdır (Kökdeniz ve Karapazarlıoğlu, 2013). Cesedin üzerindeki bulunan böceklerin gelişim evreleri (yumurta-larva-pupa-ergin) iyice incelenerek ölümden sonra geçen zamanın tahmini yapılabilmektedir (Brundage ve Byrd, 2016; Hancı ve ark., 2002).

Postmortem aralığın aylara-yıllara uzayan son kısmında ölümün yaklaşık süresinin tayini adli antropolojinin ilgi alanına da girmektedir (Açıkgöz, 2008). Son yıllarda da biyolojik yöntemler ve teknik olarak ilerlemelerle birlikte, nükleik asitlerin zamana bağlı degradasyonları ölümün yaklaşık süresini tahmin edilmesinde kullanılmıştır (Vass ve ark., 2013). Ancak, DNA'nın aksine RNA'nın her zaman hazır bulunan ribonükleaz aktivitesi sayesinde ölümden sonra hızlı bir şekilde degrades olduğu bulunmuştur (Bauer ve ark., 2003).

Postmortem dönemde DNA'nın uzun bir süre stabil olduğu bilindiğinden DNA degradasyon düzeyinin tayin edilmesine yönelik çeşitli metotlar kanıtlanmıştır. Ayrıca, şüpheli vakaların soruşturulmasında DNA analizinin yanı sıra DNA metilasyon analizleri de önemlidir (Vidaki ve ark., 2013).

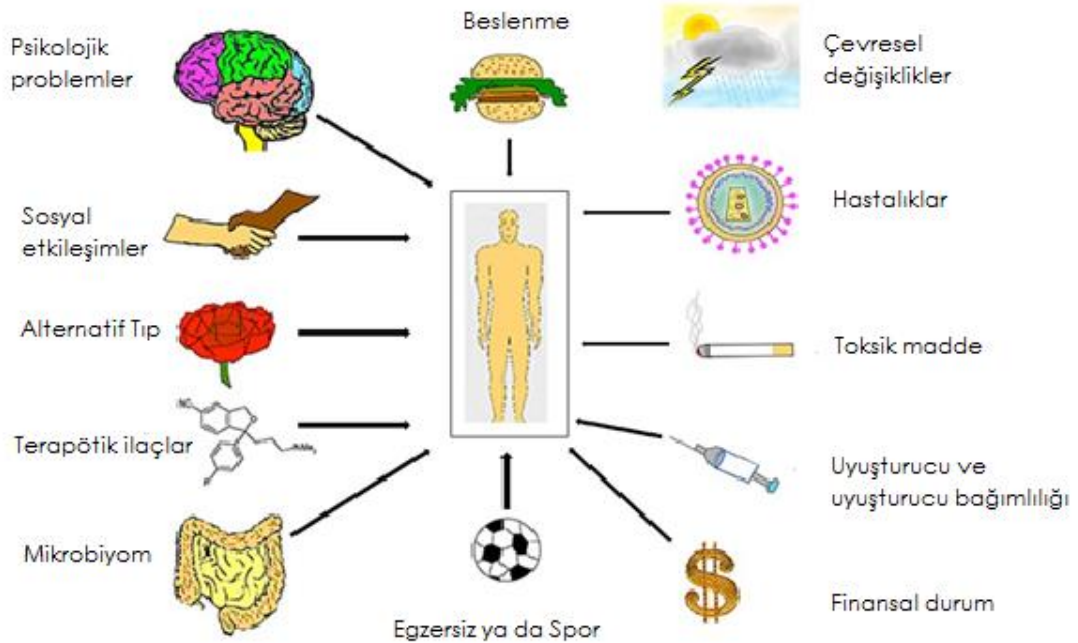
DNA metilasyonu, DNA'ya bir metil grubunun eklenmesidir. Bu özelliği nedeniyle epigenetik koda aittir (Bird, 2002). DNA metilasyon profili düşük miktarda örnek varlığında bile güvenilir sonuçların elde edilmesini sağladığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (Kader ve Ghai, 2015). Ayrıca, şüpheli vakaların açıklanmasında DNA metilasyon profilinin son derece önemli olduğu kanıtlanmıştır. Bunların arasında biyolojik kaynaklı doku ve sıvı örneklerinin belirlenmesi, DNA örneklerinin kimlik denetimi, tek yumurta ikizleri arasında ayırt edilmesi, biyolojik örneklerden; yaş tayini, cinsiyet tayini ve ölüm nedeninin belirlenmesi özetlenmiştir (Vidaki ve ark., 2013).

Bizim çalışmamızda, postmortem dönemde değişen saatlerde zamana bağlı olarak insan kas dokusu örnekleri üzerinde global DNA metilasyon düzeyi analiz edilerek ölüm zamanı tayininde DNA metilasyonun etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bulgularımızın adli bilimlere ve adli tıp uygulamalarına büyük katkı sağlaması beklenmektedir.

1.1. EPİGENETİK

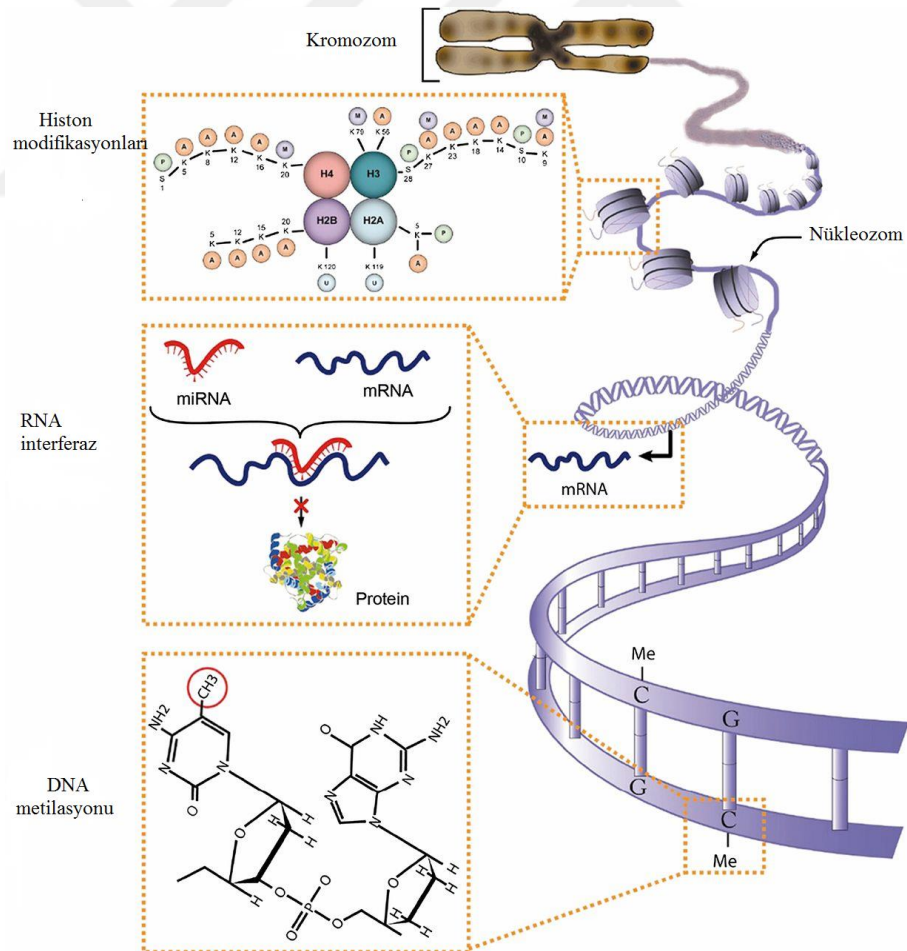
Epigenetik terimi ilk olarak 1950’de Conrad Waddington tarafından keşfedilmiştir. Epigenetik, genotipte bir değişiklik olmaksızın gen ekspresyonundaki değişikliklerin kalıtsal fenotipi oluşturması anlamına gelmektedir. Bu süreçlerde DNA, RNA ve proteinler kimyasal ve yapısal olarak etkilemektedir ancak, gerçek bir DNA dizisinde hiçbir değişiklik gerçekleşmemektedir. Böylece, aynı genetik diziye sahip hücreler, farklı ifade profili sergileyerek değişik fenotipler göstermektedir. Bu modifikasyonlar, hücre bölünmesi (mitoz veya mayoz süreci yoluyla) sırasında meydana gelmektedir (Kader ve Ghai, 2015).

Son yıllarda, genetik biliminde yapılan keşifler ile epigenetik değişikliklerin yeni nesillere aktarılabilceği kanıtlanmıştır (Ci ve Liu, 2015). Başka bir çalışmada ise, çevresel faktörler ve beslenmemizin bile epigenetik değişiklikler yaratabileceği bilinmektedir. Dahası kendi yaşam tarzı tecrübelerimizin çocuklarımızı ve hatta torunlarımızı etkileyebileceği kanıtlanmıştır (Çağlayan ve Turan 2014).



Şekil 1. İnsan üzerindeki epigenetik değişim faktörleri (Kanharkar ve ark., 2014).

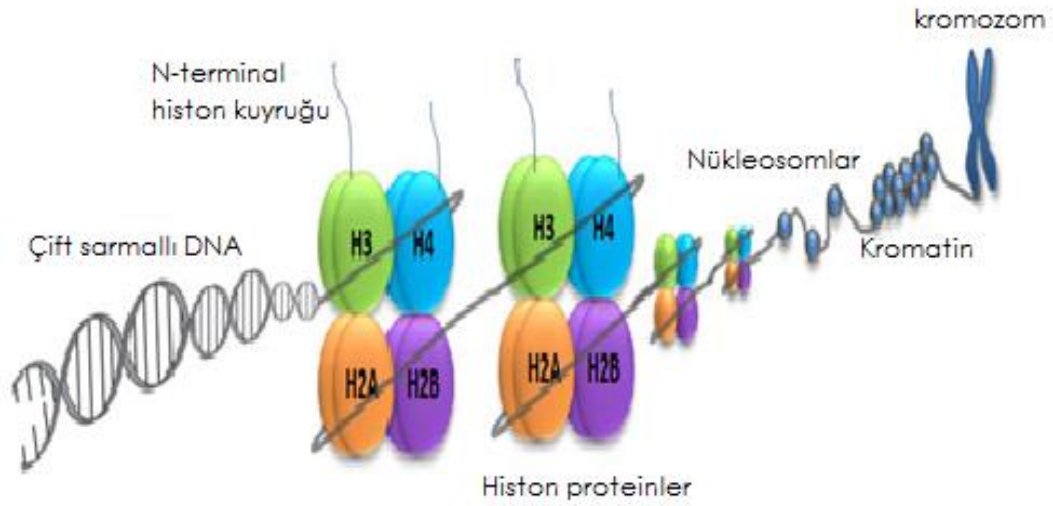
Epigenetiğin DNA yapısını değiştirmeden geni aktive ve pasifize etmesi çeşitli yollardan olmaktadır. Bunların başında DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, RNA interferans ve N kleosom yeniden düzenlenmesi gelmektedir (şekil 2). Bunların hepsi, doğrudan ve dolaylı olarak DNA sekansında değişiklikler olmadan gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Vidaki ve ark., 2013).



Şekil 2. Epigenetik mekanizmalar (Sawan ve ark., 2008).

1.1.1. Histon Modifikasyonu

Histon, bir kromozomda yapısal destek sağlayan bir proteindir (Greer ve Shi, 2012). Hücre çekirdeğindeki DNA moleküllerinin çekirdek içersine sığmasına olanak vermektedir. Histon proteinlerinin etrafını DNA iki kez sarar ve kromozomlara daha yoğun paketlenmesi sağlar. Fiziksel ve fonksiyonel kısıtlamalardan dolayı, hücre içindeki boşlukta genetik materyal iyi bir şekilde paketlenmelidir. Nükleozom, 146 bp DNA'nın 8 histon molekülü içeren oktameri etrafında sarılmasıyla oluşmaktadır. Her histon oktameri içeren dört tip iki birimden oluşur: H3, H4, H2A ve H2B. Histon korları (nükleosomlar) arasında DNA bağlayıcısı histon H1 yer alır (Can ve Aslan, 2016).



Şekil 3. Nükleozom sekiz histon protein içerir; H2A, H2B, H3 ve H4 sarılı DNA (gri renki) ile temsil edilir (<http://www.whatisepigenetics.com/histone-modifications/>, 2017).

Histon modifikasyonları, histonlarda meydana gelen asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon gibi modifikasyonlar kromatin yapısını değiştirerek gen ifadesini regüle eden epigenetik mekanizmalardır. Ancak, en iyi karakterize edilen histon modifikasyonları asetilasyon ve metilasyon'dur (Küçüköğlu, 2013).

Histon metilasyonu, bir histon proteini içindeki bazı amino asitlerin metil grubu eklenerek gerçekleşen modifikasyonudur (Rotili ve Mai, 2011). Hedef bölgelere bağlı olarak, transkripsiyonda sessizleşme ya da aktivasyon neden olabilir. Histon demetilasyonu ise, histon demetilaz ile modifiye edilmiş histon proteinlerinde metil gruplarının koparılmasıdır. Histone proteinlerin metilasyonu veya demetilasyonu gen ekspresyonunu açar ya da kapatır. Histon metiltransferaz (HMT) ve histon demetilaz (HDM) enzimleri ile regüle edilir (Greer ve Shi, 2012).

Histon metiltransferaz (HMTs), histon proteinlerinde metil grubu transferini katalize eder veya kromatin-bağılı transkripsiyon baskılanması ya da aktivasyonu yoluyla histon metilasyonunu düzenlemektedir. Histon demetilaz ile histon metilasyonu kalıcı değişiklik olmadığını gösterir ve daha dinamik bir süreçtir. Histon metilaz aktivasyonu yada inhibisyonunu daha iyi anlamak için spesifik demetilazın kanserin ilerlemesi gibi patolojik süreçlerde rol oynadığı gözlenmektedir (Greer ve Shi, 2012).

Histon asetilasyonu ve histon deasetilasyonu, N-terminal kuyruk lizin kalıntılarının üzerinde ve histon proteinlerinin nükleozom çekirdek yüzeyi üzerine bir asetil grubu (COCH₃) eklenmesi veya çıkarılmasında rol oynamaktadır. Eğer asetil grup eklenirse, o zaman gen ifade edilir, eğer asetil grubu kaldırılır, o zaman RNA polimeraz DNA'ya bağlanmaz ve gen ifadesi susar. Histon asetilasyonu süreci kromatin dinamikleri ve transkripsiyonel, gen susturma, hücre döngüsü ilerlemesi, apoptoz, diferansiyasyon, DNA replikasyonu, DNA onarımı, nükleer ithalat ve nöronal represyonu gibi pek çok hücresel proseslerin düzenlenmesinde görev alır. (Dokmanovic ve ark., 2007).

Histon asetilasyonuna katılan değiştirici enzim, histon asetiltransferaz denir. Onlar histon H3 ve H4 asetilasyon kontrolünde rol oynamaktadır. Histon deasetilazların inhibisyonu tarafından histon H3 asetilasyonu arttırılabilmekte ya da azaltılabilmektedir. Histon deasetilaz, bir histon üzerindeki asetil grupları kaldıran enzimlerin bir sınıfıdır ve DNA ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumludur.

Histon deasetilaz, aynı zamanda sıkı bir şekilde hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre proliferasyonu ve insanın kanser gelişiminde rol oynamaktadır (Ata, 2009; Kuo ve Allis, 1998). Histon deasetilaz, histon lizin kalıntılarından asetil gruplarını hidrolize eder. Histone H3 lizin kalıntıları üzerinde asetillenmiş olup olmadığını algılanması, asetilasyon desenleri daha fazla karakterizasyonu için bilgiler sağlar. Bu şekilde, gen aktivasyonunun epigenetik düzenlenmesinin daha iyi anlaşılması yanı sıra HAT-hedefli ilaçların geliştirilmesine yol açar (Wood ve Shilatifard, 2004).

Fosforilasyon, histon deasetilazlara geri dönüşümlü olarak fosfat gruplarının bağlanmasıdır. Fosfatlar, histon deasetilazlara serin, treonin ve tirozin rezidülerinden bağlanır. Fosforilasyon, protein kinazlar ve protein fosfatazlar tarafından bir reaksiyondur. Ubikitinasyon ise, ubikitin lizin rezidüsü ile bağlanabilen küçük bir proteindir. Üç aşamalı bir enzimatik reaksiyonun oluşumuna neden olur. Bu reaksiyonlar, E1, E2, E3 enzimleri tarafından gerçekleştirilir ve neticesinde, proteinler proteosom yolağına girerek degrade olur (Kuo ve Allis, 1998)

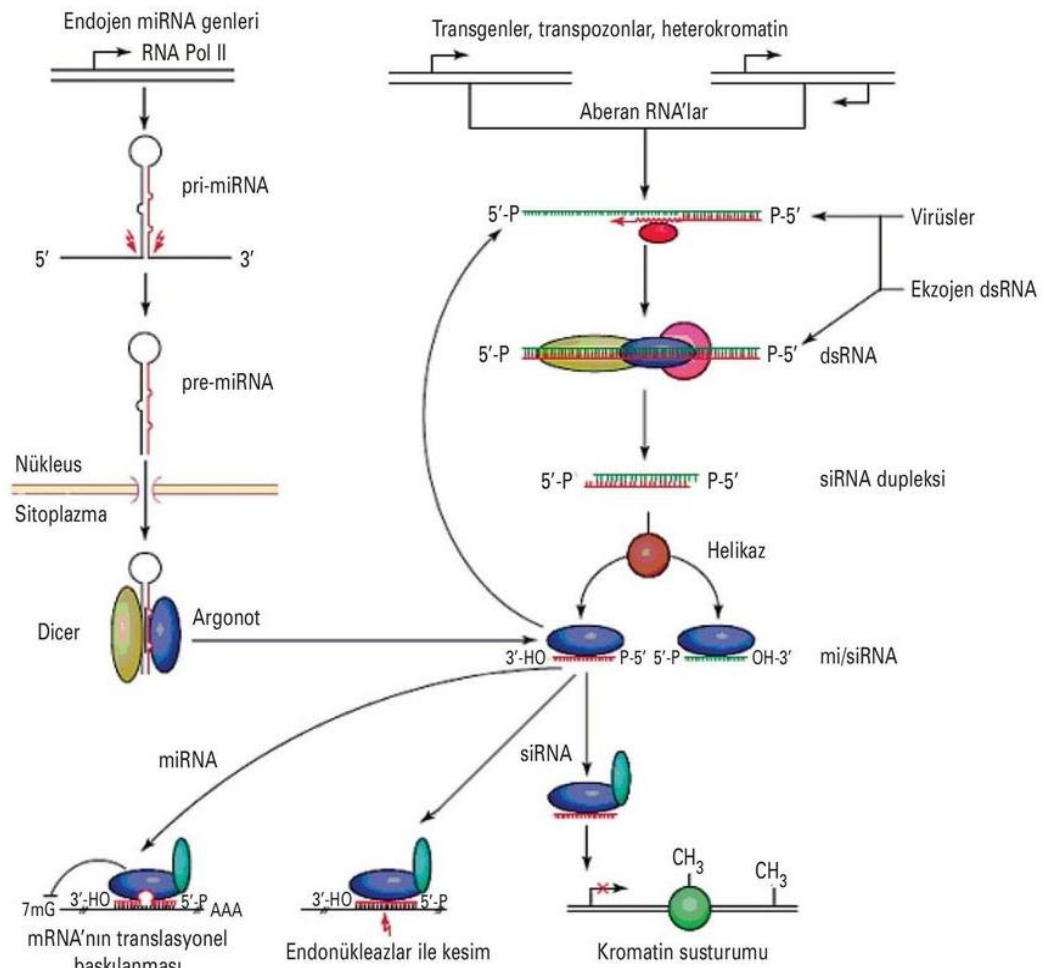
1.1.2. RNA İnterferans

Yüksek organizmalı canlılarda genetik materyal DNA olup DNA'daki bilgi RNA'ya transkribe edildikten sonra RNA'nın da işlevi bu şifreyi proteine çevirmektir. Ancak, RNA'nın %98'den fazlası proteine çevrilemez ve bu çevrilemeyen kısımların da %70'ini intronlar oluşturmuştur (Erdal ve Yılmaz, 2016). RNA interferans (RNAi), memeli hücrelerinde transkripsiyon sonrası gen sessizleştirilme mekanizması olarak bilinmektedir. Bu mekanizma hücrenin hem sitoplazmasında hem de nukleusunda gerçekleşebilir. Nukleusta transkripsiyon aşamasında transkripsiyonun engellenmesi ile gen sessizleştirilmesi sağlanırken; sitoplazmada ise transkripsiyon aşamasında mRNA'ların kesilmesi ve translasyon aşamasında da translasyonun engellenmesi ile gen sessizleştirilmektedir (Bender ve ark., 2016). Hem mikroRNA (miRNA) hem de küçük interferans RNA'sı (siRNA) işlenmek ve fonksiyonel olmak için RNAi yolağını kullanmaktadır. Bunlar küçük, protein kodlamayan ve gen ifadesinin negatif düzenleyicisi olan RNA'lardır. Ayrıca, gelişim, farklılaşma, hücre çoğalması ve apoptoz gibi önemli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol almaktadır (Güzelgöl ve Aksoy, 2009). İnsanlarda 1500'den fazla miRNA olduğu bilinmektedir. Bu kısa RNA dizileri mRNA transkripsiyonuna özgül bir şekilde bağlanarak proteine dönüşmelerine engel olurlar. Böylelikle, hücre proteinlerinin translasyon düzeyini değiştirerek hücre faaliyetleri epigenetik olarak düzenlemiş olurlar. Kanseri gibi birçok hastalıkta normal olmayan miRNA fonksiyonları olduğu görülmektedir (Goodall ve ark., 2013).

Çizelge 1. Bazı özellikleri bakımından miRNA ile siRNA'nın karşılaştırılması (Bodur ve Demirpençe, 2010).

Özellik	miRNA	siRNA
Sentezi	Endojen RNA'lardan	Ekzojen veya Endojen RNA'lardan
Sentez enzimi	RNA polimeraz	RNA bağımlı RNA polimeraz
Esas etki mekanizması	Translasyonun baskılanması	mRNA'nın yıkılması
Normal homeostazda işlevi	Var	Var
Kanser tanı ve prognozunda kullanımı	Var	Yok
Araştırma ve tedavi amacıyla kullanımı	Var	Var

RNA interferans, Dicer adı verilen bir RNase III enzimi tarafından çift zincirli RNA'nın küçük engelleyici RNA'lara (siRNA) kesilmesi ile başlamaktadır. Bu siRNA'lar daha sonra, bir multiprotein-RNA nükleaz kompleksi olan, RNA-indükleyici baskılama kompleksine (RISC) bağlanır. RISC, siRNA'ları komplementer mRNA'yı bulmak için kullanır ve hedef mRNA'yı endonükleolitik olarak keser. Neticede spesifik mRNA'nın azalması uygun proteinlerin azalmasına yol açar.



Şekil 4. RNAi mekanizmasında rol alan miRNA ve siRNA'ların sentez ve etki yolları (Bodur ve Demirpençe, 2010).

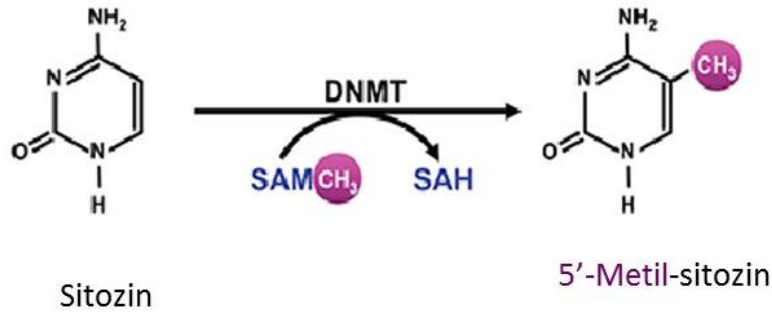
1.1.3. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, hücreler tarafından gen ekspresyonu kontrol etmek için kullanılan bir epigenetik mekanizmadır. DNA metilasyonu normal gelişim için önemli olmasının yanı sıra; embriyonik gelişim, X-kromozom inaktivasyonu, genomik imprinting, tekrar elemanlarının baskılanması, karsinogenezis ve kromozom stabilitesi ile ilişkilidir (Robertson, 2015).

DNA metilasyonu; beslenme, yaşam tarzı ve diğer çevresel faktörlerine bağlı olarak, belirli genlerin ifade olmasını sağlarken belirli genlerin ifadesini de sessizleştirmektedir. Bunu sağlayan mekanizmaların herhangi birindeki bir hata ya da düzensizlik, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya sessizleşmesine neden olarak birçok hastalıklara neden olabilmektedir (Wang ve ark., 2014).

1.1.3.1. DNA Metilasyonu Mekanizması

DNA, hücreyi yöneten bir moleküldür ve hücre içinde solunum, beslenme, üreme, boşaltım gibi yaşamsal faaliyetleri yönetmektedir. DNA metilasyonu, DNA'ya bir metil grubunun eklenmesi anlamına gelmektedir. DNA'nın yapısında dört farklı organik baz vardır. Bunlar adenin (A), timin (T), guanin (G) ve sitozin (S veya C)'dir. DNA'nın metilasyonu, insanlarda ve pek çok memelide yalnızca CpG bölgelerinde gözlenmektedir. Bu süreçte, DNA dizisinde sitozin (C) bazının beşinci karbonuna bir metil (CH₃) grubunun kovalent şekilde DNA metiltransferaz (DNMT) tarafından ilavesi ile 5-metilsitozin (5-mC) yapısı oluşmaktadır (Robertson, 2015). Sitozinin bu metillenmiş hali onun baz eşleşme özelliklerini etkilememektedir. DNA metillenmesi genellikle, promotörlerin çevresinde yüksek sıklıkta CpG dinükleotidi içeren genlerin transkripsiyonel aktivitelerinin azaltılması ile ilişkilidir (Kader ve Ghai, 2015).



Şekil 5. DNA metilasyonunu mekanizması. DNMT enzimler, metil grubu donörü olan S-adenozil-L-metiyonin (AdoMet veya SAM)’den metil grubu alarak sitozinin beşinci karbonuna transfer etmektedir. Sitozine metil(-CH₃) grubunun ilavesi ile 5-metilsitozin (5-mC) oluşmaktadır (Zakhari, 2013).

1.1.3.2. CpG Adacıkları

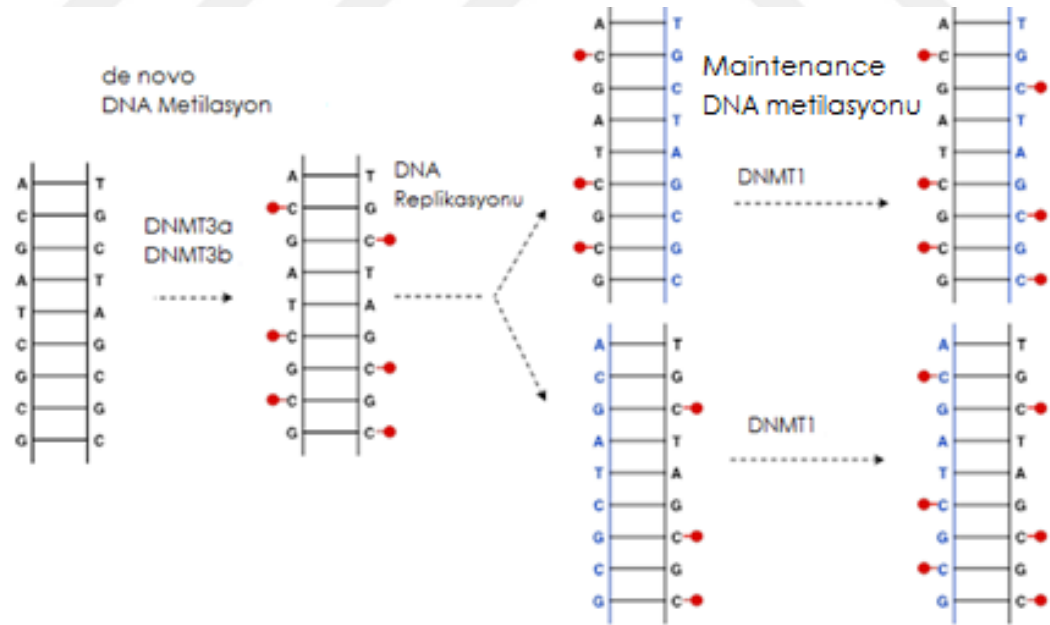
CpG, Sitozin fosfo Guanin anlamına gelmektedir. İnsan genomunda, CpG dinükleotidince zengin bölgelere CpG adacıkları denilmektedir. Genomlarda tüm CpG adacıklar metile değildir. Ancak, çoğunluğu metillenmiştir. Ayrıca, metillenmemiş CpG’ler rastgele dağıtılmamıştır ve genlerin promotörü bölgelerinde, ekzon-1 veya ifade edilmeyen bölgelerde bulunmaktadırlar CpG adacıkları 1-2 kb uzunluğunda kısa DNA bölgeleridir. Genomik bölgede bulunan CpG adacıkları sayısı ile o bölgedeki genlerin sayısı arasında doğru orantılı bir ilişki vardır. İnsan genomunda, yaklaşık olarak 28 milyon CG bölgelerinden oluşmaktadır. Onların yaklaşık % 70-80’i metillenmiştir (Ci ve Liu, 2015).

DNA metillenmesi hem bazı transkripsiyonel aktivatörlerin bağlanmasını engelleyerek, hem de metillenmiş DNA’ya özgül olarak bağlanan represörlerin katılımını sağlayarak, genin ekspresyonunu engellemektedir. Metillenmemiş durumda bulunan CpG adacıklarındaki yeniden metillenmeler, yaşlanma süreci ve kanser gibi bazı hastalıkların ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (Lövkvist ve ark., 2016).

1.1.3.3. DNA Metiltransferaz Enzimleri

DNA metiltransferaz (DNMT), DNA'daki CpG adacıklara metil grubu ekleyen bir enzimdir (Kanzleiter ve ark., 2015). Epigenetik alanında günümüzdeki bilgilere göre ökaryotlarda beş DNMT keşfedilmiştir. Bunların arasında DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, DNMT3L ve DNMT2 gelmektedir. Ancak, en önemli katalitik aktivitelere sahip olan enzimler DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b'dir (Robertson, 2015).

İnsanda karakterize edilen ilk DNMT enzimi DNMT1 aynı zamanda somatik hücrelerde en çok bulunan DNMT'dir. DNMT1 olarak bilinen maintenance DNMT'lar, DNA'daki CpG dinükleotidlerini (CpG adacıkları) substrat olarak kullanır DNMT3a ve DNMT3b, de novo DNMT'lardır. De novo metilasyonda DNMT, metillenmemiş DNA'ya metil ilave ederken maintenance DNMT metillenmiş olan DNA'nın replikasyon sonrasında da devam ettirilmesinden sorumludur (Robertson, 2015).

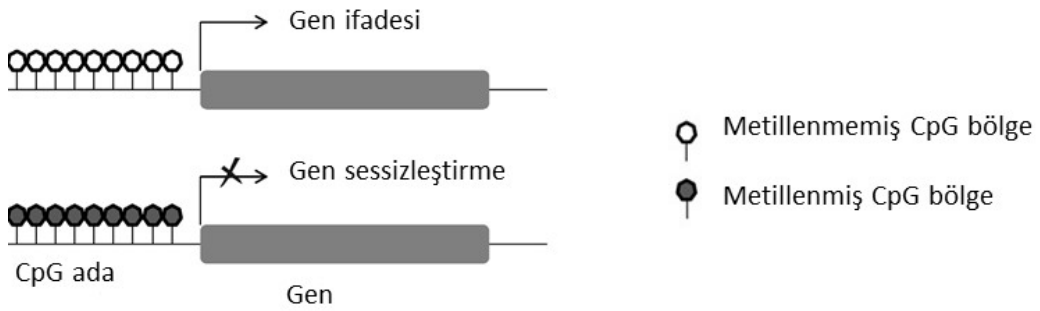


Şekil 6. De novo metilasyonu ve maintenance metilasyonu mekanizmaları (Moison ve ark., 2014).

1.1.3.4. DNA Metilasyonu ve Gen İfadesi

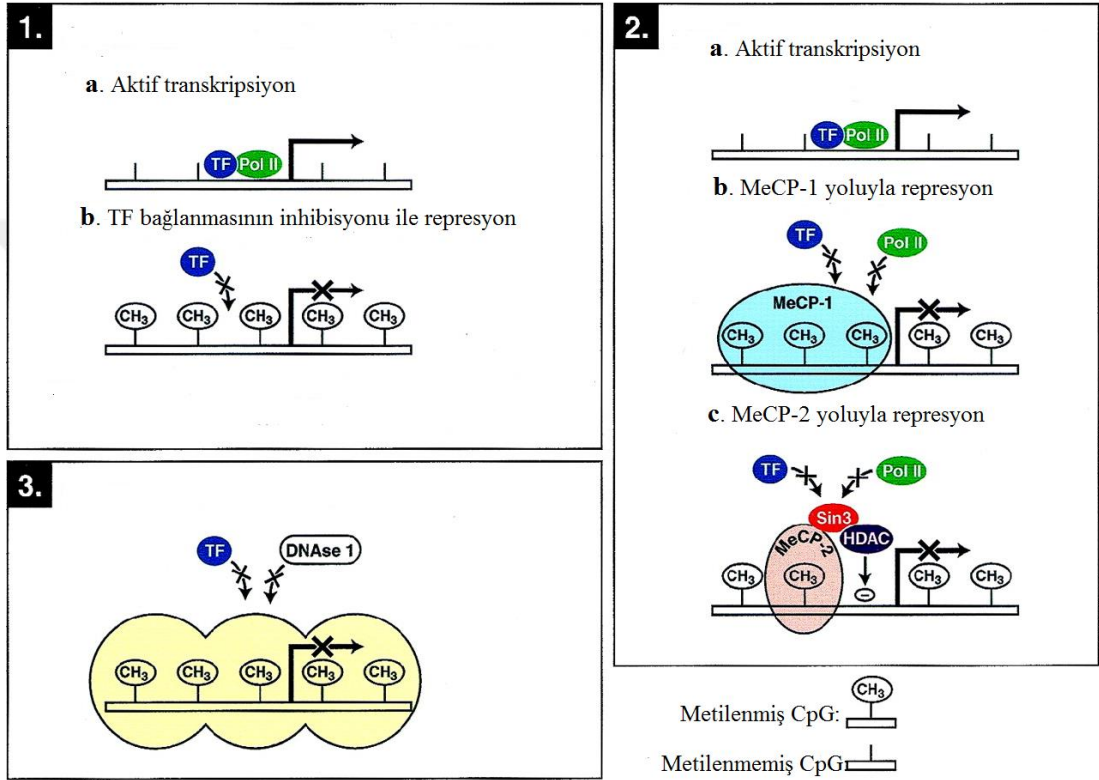
Gen, kalıtımın fiziksel ve fonksiyonel olarak en temel ünitesidir. İnsan genomu yaklaşık 21 bin civarı protein kodlayan genden oluşmaktadır. Ancak, bu genler aynı anda aktive edilmemektedir (Collins ve ark., 2003). Benzer olarak insan yaşamı boyunca bazı genler aktif veya pasif olmaktadır. DNA metilasyonu, gen ifadesinin "açık veya kapalı" oluş mekanizmasını kontrol etmektedir (Vidaki ve ark., 2013).

Sitozin metil grubunun bağlanmasıyla DNA'da oluşan "epigenetik işaret" genlerin hangi hücrede ifade olup, hangi hücrede ifade olmayacağını belirlemiştir (Bock ve ark., 2012). Eğer genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıkları metillenmemişse transkripsiyon faktörlerinin bağlanması sağlanır ve bu durumda gen ekspresyonu gerçekleşir. Eğer sitozin metillenirse CpG ada promotöründeki sitozin metillendiğinde kapalı kromatin formasyonu gözlenmektedir. Bu nedenle, gen transkripsiyon faktörlerinin bağlanması önlenmektedir. Bu durumda, gen kapanır ve basitçe RNA polimeraz DNA'ya bağlanmadığı için RNA ve protein sentezi baskılanır. DNA metilenmesi ile genler de sessizleşme meydana gelmektedir, gen ifadesinin düzenlenmesini olumlu veya olumsuz olarak etkilemektedir (Şekil 7).



Şekil 7. DNA metilasyonu yoluyla gen ifadesinin sessizleşmesini gösterir.

DNA metilasyon ile transkripsiyonun regülasyonularını açıklayan farklı mekanizmalar vardır. Şekil 8’de de gösterilen bu mekanizmaların ilkinde metillenmiş bölgeler transkripsiyon faktörlerini bağlanma bölgelere bağlanan özel represor proteinler yoluyla transkripsiyon baskılanır, üçüncüsünde ise metilasyon nedeniyle oluşan yeni kromozomal düzenlenmeler transkripsiyonu engeller.



Şekil 8. DNA metilasyonu ile transkripsiyonun düzenlenmesi (Singal ve Ginder, 1999).

1.1.3.5. DNA Metilasyonu ve Yaşlanma

Bir insanın hayat döngüsü doğumla başlayıp ölümle son bulması doğanın evrensel bir olgusudur. Bu sebeple yaşlanma; yaşam sürecinin doğal ve kaçınılmaz bir dönemidir. Yaşlanma zamanla hücre ve dokularda ortaya çıkan hasarın sonucudur. Bu hasarlanma yaşamın erken zamanlarında başlayan ve ömür boyu devam eden bir süreçtir (Karan ve Tufan, 2010).

Yaşlanma sürecin ilerleyiş hızı canlının çevre ile olan etkileşimi ve kendi kalıtsal özelliklerine bağlı olarak değişmektedir (Lazarus ve ark., 2015). Bir insan için yaşlanma sürecini etkileyen çevresel faktörlerin başında beslenme alışkanlığı ve kalitesi, içki ve sigara alışkanlığı, yaşanılan ortamın kalitesi gelmektedir. Genetik faktörler ise, farklı metabolik yollarla ilgili birçok gen yaşlanma süreci pozitif ya da negatif yönde etkilemektedir (Çağlayan ve Turan, 2014).

Son yıllarda, epigenetik modifikasyonlar ve yaşlanma arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır (Rodríguez-Rodero ve ark., 2014). Epigenetiğin uzun ömürdeki rolünü anlamak için alternatif bir yaklaşım, yaşlanma süreci boyunca farklı şekilde metilleştirilen ve olağanüstü uzun ömür fenotipiyle ilişkili olan genetik lokusları tanımlamaktır. Özellikle, tüm epigenome ekran teknolojisindeki ilerlemeler, eskime işlemi sırasında farklı şekilde metilasyona tabi tutulmuş birden fazla lokusun tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Bu farklılaşan metillenmiş bölgeler, yaşlanma süreci boyunca ortaya çıkan global epigenetik değişikliklere en duyarlı lokusları temsil edebilir veya erken mortalite şansını artıran hastalık genlerine karşılık gelebilmektedir (Madrignano ve ark., 2012).

İnsan ömrünün epigenetik incelenmesi için değerli bir model monozigot ikiz modelidir. Bu model, araştırmacıların, monozigot ikizleri genetik olarak özdeş olduklarından, yaşlanmaya bağlı fenotiplerde değişkenliğe katkıda bulunan epigenetik mekanizmaların yanı sıra çevresel faktörlerin göreceli katkılarını tanımlamalarını sağlamaktadır (Tan ve ark., 2013).

Çizelge 2. Yaşlanma ve uzun ömür ile ilişkili farklılaşan metillenmiş lokusların insan çalışmaları.

Çalışma (yıl)	Kohort Araştırma	Yöntem	Gözlemler
Fraga <i>et al.</i> (2005)	3-74 yaş arası 40 MZ ikiz çifti	Global epigenetik değişiklikler, in situ hibridizasyon	Yetişken MZ ikizlerinde epigenetik sürüklenmeyi ilk tanımlayan çalışma
Talens <i>et al.</i> (2012)	18-89 yaş arası 230 MZ ikiz çifti	Global ve site-spesifik DNA metilasyonu	Yaşla birlikte global ve lokusa spesifik metilasyonda bireyler arası değişimler artmıştır
Bell <i>et al.</i> (2012)	32-80 yaş arası, 33 MZ çifti ve 43 DZ çifti	Çeşitli yaşa bağlı fenotipler için EWAS	EWAS, yaşla ilişkili fenotip aralığı ile ilişkili olarak farklı şekilde metillenmiş bölgeler tespit etmiştir
Gentilini <i>et al.</i> (2013)	21 kadın yüz yaşını aşmış kimse ve yavruları; Uzun ömürlü ebeveynlerin 21 kontrolü çocuk	EWAS ve uzun ömürlü	Uzun ömür için spesifik DNA metilasyon profilleri tespit edilmiştir.
Sun <i>et al.</i> (2014)	100 çift erkek / kadın nonagenarians / üz yaşını aşmış kimse	EWAS ve uzun ömürlü	Global metilasyonda cinsiyet farkları yoktur. Cinsiyet-spesifik diferansiyel metillenmiş problemler spesifik biyolojik proseslerin zenginleşmesine karşılık gelmiştir
Bocklandt <i>et al.</i> (2011)	21-55 yaş arası, 34 erkek MZ ikiz çifti	Tükürük DNA'larının EWAS'si ve yaşlanma	Lokusları, EDARADD, TOM1L1 ve NPTX2'nin metilasyon seviyeleri yaşa bağlı önemli derecede değişiyor
Hannum <i>et al.</i> (2013)	19-101 yaş arası, 656 kişi	Tam kan DNA'larının EWAS'si ve yaşlanma	71 belirteçin metilasyon seviyeleri epigenetik bir saat olarak kullanılabilir
Koch and Wagner (2011)	130 kişinin eğitim grubu, 16-72 yaş arası. 0-78 yaş arası 766 kişinin geçerlilik grubu	5 farklı doku'nun EWAS'si ve yaşlanma	NPTX2, TRIM58, GRIA2 ve KCNQ1DN ve BIRC4BP ile ilişkili beş CpG bölgesi yaşla değişiyor
Horvath (2013)	0-100 yaş arası sağlıklı dokudan 8000 örnekten oluşan verileri içeren öngörücü grubu	51 doku ve hücre tiplerinin EWAS'si ve yaşlanma	Embriyonik hücreler için DNA metilasyon yaşının sıfır olduğunu ve hücre geçiş sayısında artış ile ilişkili olduğunu göstermiştir
Hernandez <i>et al.</i> (2011)	1-102 yaş arası, 387 kişi	4 beyin bölgesinin EWAS ve yaşlanma	İncelenen tüm beyin dokusunda 10 lokus kronolojik yaş ile anlamlı derecede korele bulundu
Shah <i>et al.</i> (2014)	70-79 yaş arası, 478 kişi; 117 ailenin aile temelli kohort	Kan DNA'larının EWAS'si ve yaşlanma	DNA metilasyon varyasyonu, belirli CpG'ler için iyi korunur ve oldukça kalıtsaldır
DZ: Dizygotik; EWAS: Epigenom çapında analiz; MZ: Monozigotik.			

1.1.3.6. DNA Metilasyonu ve İlişkili Hastalıklar

1.1.3.6.1. Bağışıklık Sistemi Hastalıkları

Vücudumuzun en büyük koruması bağışıklık sistemimizdir. Güçlü bir bağışıklık sistemi hastalıklara karşı bizi kalkan gibi korurken, bağışıklık sisteminin zayıf olması mikropların vücuda rahatça girmesine neden olmaktadır. Bağışıklık sistemini etkileyen 3 faktör yer almaktadır. Bunları genetik yatkınlık, çevresel faktörler ve yaşam tarzı gelmektedir. En yaygın bağışıklık sistemi hastalıklarından bazıları; tip 1 diyabet, lupus eritematoz, çoklu skleroz (multiple skleroz) ve çölyak hastalığıdır (Parham, 2014; Abbas ve ark., 2014).

Son yıllarda yapılan araştırmalar epigenetik düzenlenmenin bozulması bağışıklık sistemini ilgilendiren otoimmün hastalıklar oluşturmaktadır. Örneğin, T-hücrelerinin anormal DNA metilasyonu sonucu oluşan otoimmün bir hastalık olan ve çoklu organ yetmezliği ile karakterize edilen lupus hastalığı oluşturmaktadır. T hücrelerinde oluşan DNA metilasyonu ile bağlantılı hataların oto-antikor üretimi cevabını oluşturduğu düşünülmektedir. Normal olarak, T-hücrelerinde sistemik lupus eritematozus ile ilişkili genler metillenmiştir. Sistemik lupus eritematozuslu T-hücrelerinde ise, tüm genomun global olarak hipometilasyonu ve düşük DNMT1 seviyeleri söz konusudur (Oaks ve Perl, 2014). İmmün yetmezlik, sentromerik kararsızlık ve yüz anomalileri (ICF) sendromu, çok nadir görülen otozomal resesif kalıtıma sahip bir immün yetmezlik hastalığıdır (Al-Herz ve ark., 2014). ICF, en az iki immunoglobulin izotipinin eksik olması sonucu ortaya çıkmaktadır. ICF hastalarının %70'inde DNMT3B geninde oluşan mutasyonların hatalı metilasyonlara yol açtığı görülmüştür. DNMT3B enziminin işlev bozukluğundan dolayı B-hücrelerinde kromozom 1, 16 ve 9 bölgeleri, inaktif X kromozomundaki genlerin ve genomdaki diğer tekrar bölgeleri hipometile olmaktadır. Bu anormal hipometilasyon sonucunda gen ifadesi düzeni değişmektedir (İzmirli ve ark., 2012; Güler ve Peynircioğlu, 2016).

1.1.3.6.2. Nöropsikiyatrik Hastalıklar

Psikiyatrik, otistik ve nörodejeneratif hastalıkların DNA metilasyonunu ilişkili epigenetik bozukluklardan kaynaklanabileceği tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise, DNA metilasyonunun Alzheimer hastalığının potansiyel bir sebebi olabileceği ortaya konulmuştur. Alzheimer'ın belirtileri ortaya çıkmadan önce hastalık oluşturabilecek genlerin metilasyona uğradığı tespit edilmiştir. Otizm ile DNA metilasyonu arasındaki ilişki de yapılan çalışmalar arasındadır. Otistik bireylerde yapılan otopsi çalışmaları metil-CpG-bağlayıcı protein 2 (MECP2) adı verilen ve metilasyona uğrayabilen DNA'yı aktive eden proteinin eksik olduğu tespit edilmiştir (Güler ve Balcı, 2016).

Frajl X sendromu, X kromozomuna bağlı bir hastalık olup kalıtsal zeka geriliğine neden olabilmektedir (Ladd-Acosta ve ark., 2014). Bu hastalık, mRNA transportunda görevli olan “fragile X mental retardation 1” (FMR1) geninin 5'UTR bölgesindeki CGG tekrarlarının 200 kopyadan fazla olması sonucu oluşmaktadır. CGG tekrarlarının normalden fazla olursa, anormal metilasyon durumlarına sebep olabileceği düşünülmüştür. Frajl X sendromu hastaların 5'UTR bölgesindeki uzamış CGG tekrarlarında *de novo* metilasyon (DNMT3A ve DNMT3B) gözlenmiştir (Güler ve Balcı, 2016). Mental retardasyon ve otistik davranışlar ile karakterize olan Rett sendromu, X kromozomu ile ilişkili bir hastalıktır. Bu hastalık X kromozomundaki MeCP2 genindeki mutasyon sonucunda gerçekleşmektedir. Bu genin ürünü CpG bölgelerine bağlanan bir proteindir ve bu bölgeler aynı zamanda metilasyona uğrayan bölgelerdir. MeCP2 yokluğu Rett sendromu ile ilişkilidir (Kinde ve ark., 2016).

DNA metilasyon problemleri neticesinde gerçekleştiği gösterilen diğer hastalıklar olarak Beckwith-Wiedemann sendromu, Prader Willi Sendromu ve Angelman Sendromu sayılabilmektedir. Tüm bunlara ilave olarak metilasyon anomalileri kardiyovasküler hastalıklar ve kanser ile de ilişkili bulunmuştur (Güler ve Balcı, 2016).

1.1.3.6.3. Kanser ve Epigenetik

Hayatımızı sürdürebilmemiz için hücrelerimizin sürekli yenilenmesi yani bölünüp çoğalması gerekmektedir. Ancak, hücreler sürekli olarak bölünemezler çünkü her hücrenin hayatı boyunca belirli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre gerektiği yerde bölünmesini ve gerektiği kadar bölüneceğini bilir. Bu denge genlerimizin kontrolü altındadır. Bazı genler hücrelerin bölünüp çoğalmasını sağlarken bazıları ise aşırı hücre üremesini kontrol eder (Stewart ve Wild, 2014).

Beslenme, hava kirliliği, radyasyon, sigara, çevre kirliliği, gıda katkı maddeleri ve çeşitli toksik maddelerin oluşturduğu hasar gen fonksiyonlarını bozduğu için hücreler aşırı şekilde çoğalmaktadır. Hücrelerin aşırı şekilde çoğalmasını kontrol eden genler ise aktiviteleri azaldığı ya da bu çoğalmalar baş edemediği için kanser meydana gelmektedir. Kanser hücreleri kontrolsüz bölünmekte ve çoğalmaktadır (Stewart ve Wild, 2014).

Kanser hücreleri çoğalıp biriktikçe tümörleri oluşturmaktadır. Kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılarak kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine taşınabilmektedir. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam etmektedirler. Kanser bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilmektedir (Aydoğan ve Uygun, 2011).

Her geçen gün artan kanser çeşitleri ve vakaları, yaş sınırının gittikçe azalması bu hastalığı hepimiz için korkulu bir rüya haline getirmiştir. Tıbbi imkânların az olduğu gelişmekte olan ülkelerde çok az kanser vakaları vardır. Fakat, burada yaşayan insanların gelişmiş ülkelere göç ettikten bir kaç yıl sonra kanser sıklığı artmaktadır (Siegel ve ark., 2016).

Dünyada her yıl milyonlarca kişi kanser hastalığına yakalanmaktadır. Ayrıca, kanser tüm dünyada en çok ölüme neden olan ikinci hastalık grubudur (ilki kalp-damar hastalıkları) (Stewart ve Wild, 2016).

Avrupa Birliği'nin (AB) güncel verisi olan 2013 yılı sonuçları incelendiğinde, Avrupa'daki her dört ölümden birinin kanserden kaynaklandığı görülmektedir. Kanser nedeni ölüm sebeplerinin toplam oranları incelendiğinde, İtalya ve İngiltere'nin %28, İspanya ve Fransa'nın %27 ile üst sıralarda; Bulgaristan'ın %17, Romanya'nın %20 ve Finlandiya'nın %23 ile alt sıralarda yer aldığı dikkati çekmektedir. Türkiye'de ise, bu oran 2013 yılında %21, 2015 yılında ise %20'dir (TÜİK, Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2016).

1983 yılında, yapılan çalışmada kanserin epigenetik ile bağlantılı olan ilk hastalık olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar kolon kanserli hücrelerdeki genlerin normal dokulardakine göre hipometilasyonu olduğunu tespit etmişlerdir. Normale göre hipometilasyonun kromozomlarda karasızlığa yol açtığı ve kanser genlerini aktive ettiği bilinmektedir (Feinberg ve Tycko, 2004).

Genelde tümör baskılayıcı genlerde DNMT düzeyi sıklıkla artmaktadır. Global olarak 5-mC'inde azalma görülmesine karşın bölgesel olarak CpG adacıklarında hipermetilasyon görülmektedir. Böylece, promotor bölgedeki CpG adacıkları çok fazla metillenmesiyle yüzlerce tümör supressor genler sessizleşir ve kontrolsüz hücre bölünmesi engellenemez ve hücre kanserogeneze girer (İzmirli ve ark., 2012).

Genetikten kaynaklanan hastalıkların tedavisi DNA'mız adeta silinmez olduğu için pek mümkün görünmemektedir. Ancak, epigenetik düzenlenmelerin geri döndürülebilir değişiklikler yapması ve bunun hastalıklarla olan ilişkisi yeni tedavi yolları için umut olabilmektedir (Güler ve Peynircioğlu, 2016). Günümüzde, kanser de kemoterapi ve radyoterapi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Kemoterapi ve radyoterapi tümörün büyümesini azaltabilir ama her zaman tümörü yok edememiştir. Yok etse bile tümörün tekrarlama olasılığı vardır (İzmirli, 2012).

1.1.2. ADLİ BİLİMLERDE DNA METİLYASYONU UYGULAMALARI

Adli bilimler, mahkeme ve soruşturmalarda bilimsel ve temel bilgiler sağlayarak Adaletin doğru işleminde önemli rol oynayan bilim dalıdır. Adaletin sağlanmasında bilimsel verilerden her geçen gün daha fazla yararlanılması Adli bilimler dalının önemini gün geçtikçe artırmaktadır. Günümüz hukuk sisteminde deliller için fiziksel muayene büyük bir önem taşımaktadır. Ayrıca, olay yeri inceleme sırasında sanıkla mağdur arasında ki her türlü biyolojik materyalin ve tüm fiziksel materyalin değerlendirilmesi zorunludur. Biyolojik örnekler; kan, tükürük, meni, kemikler, vajinal sıvılar, ter, saç, tırnak ve idrar gibi örnekler genellikle olay yerinde bulunmaktadır (An ve ark., 2012).

Olay yerinde bulunan biyolojik materyallerin tespiti, toplanması, tanımlaması ve analizinin gerçekleştirilmesi son derece önemlidir. Çünkü şüpheli vakaların açıklanmasında araştırmacılara önemli bir destek oluşturarak sonuca çabuk ulaşmamızı sağlamaktadır (Fish ve ark., 2013). Ayrıca, biyolojik örneklerden elde edilen DNA analizi, bir kişinin kimliklendirilmesine yönelik adli bilimlerde kullanılabilecek en güçlü araç olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, gen dizilimindeki farklılıkların dışındaki mekanizmaların neden olduğu, gen işlevinde veya hücresel fenotipte kalıtsal değişiklikler de vardır. Çeşitli hücresel kararlar; hayatta kalma, büyüme ve diferansiyasyon gen ekspresyonu tarafından kontrol edilmektedir. Bunlar epigenetik olgular tarafından değiştirilebilmektedir (Çeppioğlu ve Yurdun, 2015; Virkler ve Lednev, 2009).

Genel olarak, genetik bilgiler bir bireyi kimliklendirir ama epigenetik kanıtlar informatif bilgiler ekleyebilmektedir. Spesifik genler üzerindeki epigenetik düzeyinin nicel olasılığı bilimsel ve tıbbi disiplinlerde geniş bir alan haline gelmiştir. Epigenetik mekanizma da, çelişli vakaların aydınlatılmasında DNA metilasyonu profil analizinin araştırılmaları dikkat çekmektedir (Çeppioğlu ve Yurdun, 2015).

1.1.2.1. Biyolojik Kaynaklı Doku ve Sıvı Örneklerinin Tayini

Olay yerinde vücut sıvılarının bulunması biyolojik örneklerin tipinin ve kaynağının belirlenmesinde, meydana gelen olayların mükemmel göstergeleri olarak kullanılabilir. Örneğin: kan lekesi incelenerek fiziksel mücadele, saldırı veya cinayet olup olmadığı gösterebilmektedir. Meni veya vajinal sıvı tespiti, cinsel saldırının olup olmadığını gösterebilmektedir. Olay yerinde bulunan çeşitli vücut sıvısının, DNA'yı analiz ederek şüphelinin suça karıştığının tespiti kolaylaştırır ve haksız yere mahkum edilmiş olan masum kişiler temize çıkarılabilir (Madi *et al.*, 2012).

Adli bilimlerde, vücut sıvısını tanımlamak için çeşitli yöntemler ve teknikler kullanılmaktadır. Bunların başında ışık kaynağı yöntemleri, kimyasal testler (Luminol, Kastle-Meyer), immünolojik testler (antikor-antijen reaksiyonu), katalitik testler (benzidin, orto-tolidine, leucomalachite, leucocrystal, fenolftalein, asit fosfataz ve alfa-amilaz), spektroskopik ve mikroskopik yöntemler gelmektedir. Bu testlerin, nispeten hızlı ve kolay olduğu ancak çevresel faktörler yüzünden duyarlılığı ve özgürlüğü sınırladığı ortaya çıkarılmıştır. Aslında, serolojiye dayalı metodlar bireylerin biyolojik madde türünü tespitini kolaylaştırır ancak kaynak belirlenmemektedir (Madi ve ark., 2012). Son yıllarda, DNA'nın doku-spesifik metilasyon desenlerinin varlığı gösterilmiştir (Lee ve ark., 2012). Ayrıca, DNA metilasyonu son derece hücre tipine özgüdür ve bu nedenle sadece DNA örnekleri sadece kökenlerini ayırt etmek için kullanılmamaktadır, aynı zamanda numune içindeki çeşitli hücre tiplerinin popülasyonunu ölçmek için de kullanılabilir. Örneğin, DNA, bir vücut sıvısı karışımından izole edildiğinde, hassas bir DNA metilasyon analizi, diğer doku türleri arasında sıvının semen, tükürük veya kan örneği içerip içermediğini ayırt edebilecektir (Frumkin ve ark., 2010; Vidaki ve ark., 2013). Lee ve arkadaşları tarafından 2016'da yayınlanan "Kan, tükürük, meni, vajinal sıvı ve adet kanı üzerinde teyit edici bir test için DNA metilasyon profillemesi" başlıklı bir çalışmada 9CpG belirteçleri kullanılarak farklı doku örnekleri üzerinde olumlu bir şekilde kullanılabileceği bildirilmiştir.

1.1.2.2. DNA Örneklerini Kimlik Denetimi ve Metilasyon

Geçmişte bireyler arası farklılıklar göz önüne alınarak kimliklendirmede kullanılan kan grupları ve enzim analizlerinin yerini bugün polimorfizm açısından avantaj olan DNA polimorfizmleri almıştır. Bu günlerde çeşitli suç türleri (hırsızlık, tecavüz, cinayet, vb.) incelemelerinde kullanılan delillerin DNA analizi, şüphelilerin bulunmasında temel yoldur. Ayrıca, DNA dizisinin incelenmesi, bir kişinin tanımlanması ya da belirli etnik ve fenotipik özelliklerin belirlenmesi için adli bilimlerde kullanılan en güçlü araç olmaktadır (Venter ve ark., 2001).

Olay yerinde elde edilen delillerinin DNA analizine başvurulanan adli inceleme sayısı her geçen gün artmakta ve elde edilen veriler adalet hizmetlerine sunulmaktadır. DNA, hukuk davalarına ilişkin olarak soy bağının belirlenmesinde de etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Genellikle bir olay yerinde bulunan DNA'nın, biyolojik kaynaklı olduğuna inanılmaktadır. Ancak, her zaman doğru olmayabilmektedir. Çünkü uygarlığın ve teknolojinin gelişmesi ile sahte DNA (ya da yapay DNA) delilleri olma olasılığı vardır. Yapay DNA, nesnelerin yüzeylerine uygulanabilir veya gerçek insan dokularına konulmuş olabilmektedir. Konvansiyonel genotip teknikleri doğal ve yapay DNA örneklerini ayırt etmekte başarısızdır. Bu sorunla başa çıkmak için adli bilim araştırmacıları, DNA metilasyon analizi yaparak doğal ve yapay DNA'yı birbirinden ayırmayı sağlayan moleküller ve bilimsel yöntemlerle kimlik doğrulanmasını sağlamıştır (Frumkin ve ark., 2010).

Doğal ya da in vivo şeklinde üretilen DNA'nın yapay DNA'dan veya in vitro DNA'dan farkı; bazı lokuslarının metillenmiş ve diğer lokusların metillenmemiş olmasıdır. İn vivo üretilen DNA'da, spesifik genomik lokuslar metillenmiştir. İn vitro DNA'da ise, yalnız DNA Polimeraz yetersizliği metillenmiş sitosinleri tanımadığından dolayı tüm lokuslar metillenmemiştir. Böylece, sodyum bisülfid modifikasyonu yöntemiyle metillenmiş ve metillenmemiş sitozinler ayırt etmek için kullanılmaktadır (Frumkin ve ark., 2010; Vidaki ve ark., 2013).

1.1.2.3. Tek Yumurta İkizleri Arasında Metilasyon

Eski dönemlerden günümüze kadar, ikizler özellikle tek yumurta ikizleri insanların ilgisini çekmiştir. Tek yumurta ikizleri, bir yumurta hücresi ile bir sperm hücresinin birleşmesi sonucunda bir zigot oluşmaktadır. Doğdukları zaman görüntüleri tıpa tıp aynı olmaktadır. Genetik yapıları ve cinsiyetleri birbirinin aynıdır (Fraga ve ark., 2005). Ancak, parmak izleri aynı değildir (Gordon ve ark.,2012).

Tek yumurta ikizleri, doğumdan itibaren genellikle birbirlerinden hiç ayrılmamaktadır. Özellikle ilk 3 yaşında kadar, yani ilkökul çağlarında beslenme düzenleri ve yaşam tarzları çoğu zaman aynı olmaktadır. Ev dışına çıktıkları zaman bile hep aynı çevre faktörlerden etkisi altında olmaktadır. Eğer çevresel faktörlerden kaynaklanan bir farklılık varsa, tek yumurta ikizlerinin her ikisine de aynı etkiyi yapmış olmaktadır. Ayrıca, yaş ilerledikçe fiziksel özellikler ortaya çıkmaktadır. Ancak, onların DNA'larının yapıları aynı kalmaktadır ve zaman içerisinde genlerinin ifadeleri değişmektedir. Beslenme, yaşam tarzı ve çevresel faktörler bu farklılıklardan birkaçıdır. Son zamanlarda, adli bilimlerde yapılan keşifler bu farklılıklara epigenetik değişikliklerin sebep olduğunu delillerle kanıtlamıştır. (Gordon ve ark., 2012).

Li ve ark. (2011), bisülfıt yöntem kullanarak 22 çift erişkin monozigot ikizinin kan DNA örnekleriyle test yapmışlar ve 27,000 'den fazla CpG bölgeleri de dahil olmak üzere, Illumina'nın İnsan Metilasyon27 Beadchip ile analiz etmişlerdir. Sonuç çok umut verici olmuştur çünkü önemli DNA metilasyon farklılıklarını (377 CpG bölgeleri) açığa çıkarmıştır. Adli vakalarda tek yumurta ikizlerini ayırmak için CpG bölgeler belirteç olarak kullanılabilir. Bu nedenle, STR tiplendirme ve tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) tek yumurta ikizlerini ayırt etmede yetersiz kalmakta, DNA metilasyonu önemli belirteçleri analizleyerek onları ayırt edebilmektedir (Levesque ve ark., 2014).

1.1.2.4. Biyolojik Örneklerden Yaş Tayini ve Metilasyon

Yaş tayini, kişinin sosyal ilişkilerde ve yargıya yansıyan vakalarında son derece önem arz etmektedir. Özellikle okula başlama, cezai sorumluluk, evlenme, emekli olma, kişinin yeteneği ya da performans değerlendirme, memuriyete girme, sürücü belgesi alma gibi durumlarda kişinin yaş tayini gerekmektedir. Adli vakalar da soruşturma boyunca kimliği belirsiz kişiler (şüpheli ya da mağdur), şüpheli bebek ölümü ve kendini ifade edemeyecek durumdaki kişilere yaş tayinin yapılması son derece önemlidir. Dahası, bir hukuki durumdan dolayı, geçerli kimlik belgeleri olmayan bir şüphelinin cezai sorumluluk yaşını doldurmuş olup olmadığını belirlemek önemlidir (Hirschi ve Gottfredson,1983).

Adli vakalarda, bireyin yaş tayini için fiziksel gelişimi ve yaşlanma bulguları gerekmektedir. Bunların başında sekonder seks karakterlerinin gelişimi, konuşma ve ses özellikleri, boy, ağırlık, cilt ve göz değişiklikleri, kıl gelişimi, dişler ve kemik gelişimi gelmektedir. Dahası, radyolojik ve histolojik yöntemler de kullanılarak yaş tayini tespiti edilebilmektedir (Franklin, 2010). Ancak, hastalıklar, çevre faktörleri ve yaşam tarzı yüzünden bu kriterler her zaman % 100 sonuç vermemektedir (Bocklandt ve ark., 2011). Çünkü biyolojik yaş (beden ve ruhun işbirliği ile oluşan gerçek yaşı) kronolojik yaştan (takvim yaşı) bazıları için daha küçük, bazıları için fazla görünürler. Örneğin: 50 kronolojik yaşta olabilir. Ancak, sağlıklı, aktif bir yaşam tarzı ve çevresel faktörler yüzünden vücudunuzun fiziksel görünümü 55 kronolojik yaşlı birine benzeyebilmektedir.

Son yıllarda, bir bireyin yaşını doğru tahmin etmek için insan kanındaki T-hücre DNA düzenlemeleri analizi kullanılmıştır. Çünkü T-hücre sayısı, yaş arttıkça azalmaktadır. Bu yöntem yaş grubunu gerçek yaşlardan daha iyi tahmin etmektedir (Zhao ve ark., 2011).

Hücreler ve dokular gelişimi boyunca diferansiye edilmektedir. Bu nedenle, DNA mutasyonları ve epigenetik değişiklikler ömür boyu gerçekleşen bu süreçte meydana gelebilmektedir. Jones ve arkadaşları tarafından 2015'de yayınlanan "DNA metilasyonu ve sağlıklı insan yaşlanması" başlıklı bir çalışmada global düzeyde DNA metilasyonunun yaşamın ilk birkaç yılı boyunca arttığı ve daha sonra yetişkinlikte ve yaş ilerledikçe azaldığı bildirilmiştir. Böylelikle DNA metilasyonu, yaş tahmin etmek için bir alternatiftir. Çünkü DNA metilasyonu zaman içinde hücre farklılaşması ve değişiklikten sorumlu mekanizmalardan biridir.

Bilim adamları DNA metilasyonu belirteçleri sayesinde yaşa duyarlı olan genomik bölgeleri tespit edebilmektedir (Çizelge 3). Dahası, hücre ve doku numunelerinin kronolojik yaşını hesaplamak için DNA metilasyon profillerinin kullanımını önerilmektedir (Xu ve ark., 2015). Ayrıca, birçok yaşla ilgili DNA metilasyon değişiklikleri de doku türüne bağlıdır (Vidaki ve ark., 2017).

Son zamanlarda, yaşa-bağlı CpG bölgelerinin varlığını keşfedilmiştir. Bu CpG bölgelerinin ya hipermetillenmiş ya da hipometillenmiş olduğu kanıtlanmıştır (Xu ve ark., 2015). Koch ve Wagner (2011) yaptığı araştırmada, 13 farklı hücre tipi ve dokularını kamu veri depolarından (hepsi HumanMethylation27 BeadChip platformu ile kullanılmıştır) alınan birkaç veri kümeleriyle analiz etmiştir. Bu çalışmada, 431 yaş-bağlı hipermetillenmiş ve 25 yaş-bağlı hipometillenmiş CpG bölgeleri tespit edilmiştir. Seçilen CpG bölgelerine dayanarak, tahminler 9.3 yıllık bir ortalama hassasiyetle korele edilmiştir.

Zbieć-Piekarska ve ark. (2015) yapılan insan yaşı tahmini için ELOVL2 belirteçinin DNA metilasyon durumu üzerine bir çalışmada ELOVL2 geninde iki CpG kullanılarak kan için bir yaş öngörme modeli olarak 6,85 yıllık bir tahmin hatası ve 5.03 yıllık kronolojik yaştan itibaren ortalama mutlak sapma (MAD) bildirmiştir. Daha sonra, beş CpG ELOVL2, C1orf132, TRIM59, KLF14 ve FHL2 genlerinden oluşan bir modelin 3.9 yıllık kronolojik yaştaki bir MAD ile kanda daha iyi bir tahmini doğruluğa sahip olduğu gösterilmiştir (Çizelge 3.).

Çizelge 3. DNA Metilasyonuna Bağlı Yaş Tayini Yapılan Genler.

Çalışma (yıl)	Yaşa-bağlı belirteçleri	Doku	Hata (yıl)
Bocklandt ve ark. (2011)	EDARADD, TOM1L1, NPTX2	Tükürük	5.2
Weidner ve ark. (2014)	ITGA2B, ASPA, PDE4C	Kan	4.3
Zbiec-Piekarska ve ark. (2015)	ELOVL2, C1orf132, TRIM59, KLF14, FHL2	Kan	3.9
Huang ve ark. (2015)	ASPA, ITGA2B, NPTX2	Kan	7.9
Hannum ve ark. (2013)	71 CpGs from Illumina's beadchip array	Kan	3.9
Vidaki ve ark. (2017)	NHLRC1, SCGN, CSNK1D (16 CpGs from Illumina MiSeq® platform)	Kan	7.5
Horvath (2013)	353 CpGs from Illumina's beadchip array	Somatik dokular	3.6

1.1.2.5. Biyolojik Örneklerden Cinsiyet Tayini ve Metilasyon

Olay yerinde bulunan biyolojik örneklerden cinsiyetin belirlenmesi, olayın soruşturulması için büyük bir öneme sahiptir. Hepimizin her otozomal genin iki kopyası (aleli) bulunur ve biri annemizden diğeri babamızdan bize miras kalmaktadır. Ancak, bazı genler aktarıldığı ebeveyn kökenine göre farklı tarzda ortaya çıkmaktadır. Babadan devralınan alel imprint gen ise, anneden sadece alel eksprese edilmektedir. Anneden alleli baskın ise, o zaman babadan sadece alel eksprese edilmektedir (Gregg ve ark., 2010).

Genetik materyalin anneden veya babadan kalıtılmasına bağlı olarak farklı ve monoallelik ekspresyon gerçekleşmesine genomik imprinting denir. Genomik imprinting epigenetik bir fenomendir. Genomik imprinting, embriyonun gelişmesinde başlar ve daha sonra organizmanın tüm somatik hücrelerine iletilmesinde rol alır. İmprint (damgalanmış) genler, germ hücrelerinin oluşumu sırasında yumurta ya da sperm hücresinde bulunmalarına bağlı olarak metilasyon ile işaretlenir. Yoğun CpG adacıklarına sahip imprint genlerin en önemli özelliği, farklı allellere-özü olarak metilasyon paterni göstermeleridir. Böylece, embriyoda genin hangi ebeveyninden geldiği DNA metilasyon durumu ile belirlenebilmektedir. Bu kalıtım şekli klasik Mendel kalıtımına (Bağımsız ayrışım prensibi ya da Alellerin ayrışım prensibi) uymamaktadır. Genomik damgalanma sonucu ortaya çıkan etki pozitif veya negatif olabilmektedir (Feinberg ve ark., 2002; Gregg ve ark., 2010).

1991 yılında, ilk imprint genler Igf2 ve Igf2r bulunmuştur. Daha sonra, 100 kb Igf2 geninden H19 bulunmuştur. Igf2 geni yalnız babadan gelen bir kromozom iken, H19 geni sadece maternal kromozomdan eksprese edilen gendir. Böylelikle, adli bilimler uygulamalarda H19 gen ifadesi inceleyerek maternal alel tayini edilebilir ve Igf2 gen ifadesi incelenerek paternal alel tayin edilebilmektedir (Wang ve ark., 2014).

Baskılanmış ekspresyon doku ve gelişim aşamalarının arasında değişebilir iken hatalı baskılama çeşitli hastalık sendromlarının nedenidir. Kalıtılan aleller farklı olarak metillenmişlerdir. Böylece, biyolojik örnekler üzerinden elde edilen spesifik genlerin bir erkek veya bir kadına ait olup olmadığını belirlemek için DNA metilasyonun durumu analiz edilebilmektedir (Kader ve Ghai, 2015).

Normal olarak insanda 46 adet kromozom bulunmaktadır. Her hücrede 23 çift kromozom bulunup bunun iki tanesi cinsiyet kromozomu (X ve Y kromozomu), diğer 22 tanesi otozomal kromozomlardan oluşur. Sağlıklı dişide iki adet XX, erkekte 1 adet X 1 adet Y kromozomu bulunmaktadır. Ancak, dişideki iki adet XX kromozomu hücre fonksiyonları için gerekli değildir. Bu sebeple dişi somatik hücrelerinde sadece bir X kromozomu aktif durumdadır. İkinci X inaktifleşerek kondanse olur ve interfaz hücrelerinde Barr Cisimciği olarak görünmektedir. Normal erkekler Bar cisimciğine sahip değildir. Böylece, olay yerinde bulunan biyolojik materyalların kadına mı erkeğe mi ait olup olmadığının tanımlamak için Barr cisimciği varlığı ile gösterebilmektedir. İnaktive edilecek X kromozomu, baskılayıcı heterokromatin ile paketlenerek bu kromozomun üzerinde bulunan genlerin ifadenmesi önlenmektedir. Ancak, bu değişiklikler, DNA dizisini değiştirmede yapılıır. X kromozomu inaktivasyonu, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu sayesinde sürdürölmektedir. X-inaktivasyonunda, CpG adacıkları ve gen promotor bölgeleri hipermetillenmiştir (Kader ve Ghai, 2015).

1.1.2.6. Ölüm Nedeni ve Metilasyon

İnsanların zamanla güçten düşmesi ve tahribat miktarının sürdürüleemeyecek durum anlaşması sonucundaki ölüm, doğal ölümdür. Bu tür ölümler normal yaşam süresini tamamlamış veya herhangi bir hastalığı olan kişilerde görülen ölüm şeklidir. Fakat, dikkatsizlik, ihmal ya da acemilikten kaynaklanan beklenmedik bir ölüm, kazadır. Dünyada en sık rastlanan kaza türleri şunlardır: uçak kazaları, ev kazaları, trafik kazaları, yangınlar ve elektrik çarpmasıdır (Oğuz, 2013).

Geçmişten günümüze kadar bazı insanlar, karşılaştıkları sorunların çözümü olarak intiharı düşünür. Mesela: aile içi şiddet, boşanma, ebeveyn kaybı, kredi borcu ödeyememe, fakir olma korkusu, finansal kayıplar (kumar bağımlılığı, işten kovulmak, batmak), uyuşturucu kullanımı, depresyon'dan kaynaklı problemler, kronik hastalıklarla yaşamak, düzelemeyecek fiziksel bir acı, çözülemeyen seksüel konular (karşılıksız aşk, aşk acısı, cinsel sorunlar), sürgün'den kaynaklı problemler, umutsuzluk, stres gibi nedenlerden dolayı intihara yeltenilir (Tolou-Ghamari, 2016). İntihar etmeyi düşünen kişi intihar tehditleriyle diğer insanları manipüle etmemek için bu düşüncesini kimseye söylemez ve bu düşüncüyü kimseyle paylaşmaz ve kendine saklar. Günümüzde ise, cinayet işlemenin birçok yolu vardır. Onlar ateşli silah yaralanmaları, bıçaklama, boğma, zehirlleme, yanık, ası, diri gömölme, suda boğulma ve işkencedir (Oğuz, 2013).

Tüm ölüm vakalarında, mutlaka ölümün gerçekleşmiş olduğunun hekim tarafından tespiti gerekmektedir. Herhangi bir tanığı olmayan, beklenmedik ölüm ya da başkalarının rolü olması ihtimali varsa, cesedin gömölmeden önce veya yakılmadan önce otopsi olarak bilinen postmortem muayene yapılmalıdır. Otopsi, cesedin dıştan ve içten tetkik edilmesi, ölüm zamanının ve nedeninin belirlenmesi ayrıca, vücuttaki her bir organın durumunun tetkiki ve incelenmesini kapsar (Hancı, 2002; Oğuz, 2013).

Postmortem biyokimya ve moleküler biyolojinin kullanmanın temel amacı, ölüm prosedüründe yer alan, hücreler ve organların morfolojik ve fonksiyonel değişiklikleriyle korelasyon kurulamayan genel patofizyolojik değişiklikleri açıklayabilmektedir (Babu ve ark., 2015).

Son yıllardaki araştırmalar, çeşitli hastalıkların (kanser gibi) DNA metilasyon seviyelerinde anormal değişikliklerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, promoter bölgedeki bazı genlerin DNA metilasyon durumunun, edinilen çeşitli diatezlere veya ölüm nedenlerine yanıt olarak değişip değişmediğini belirlemek amacıyla çalışmalar yapılmaktadır (Vidaki ve ark., 2013).

1.1.3. DNA METİLAYONU ÖLÇÜM TEKNİKLERİ

Günümüze kadar geliştirilen DNA metilasyonu analiz yöntemleri, DNA dizisindeki sitozinlerle 5-mC'lerin ayırt edilmesi esasına dayanmaktadır. DNA metilasyonu analizi için iki yöntem vardır. Bunlar global metilasyon analizleri ve gen-spesifik metilasyon analizleridir (Güler ve Balcı, 2016).

1.1.3.1. Global Metilasyon Analizi

Global metilasyonunun ölçülmesinde kullanılan en yaygın yöntemlerden yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografisi-kütle-kütle spektrometresi (LC-MS-MS) ve tekrar dizilerinin bisulfit sekanslaması gelmektedir (Lisanti ve ark., 2013). Ayrıca, 5-mC ELISA kiti ile DNA'nın global DNA metilasyon yüzdesi ölçülmektedir. HPLC kantitatif bir yöntem olmasına rağmen, analizler çok miktarda ve yüksek kalitede genomik DNA gerektirmektedir (Kurdyukov ve Bullock, 2016).

Memeli genomundaki metillenmiş CpG'ler, %70-80 oranında tekrar bölgelerinde bulunmaktadır. Böylelikle, metillenmiş CpG yoğunluğu ölçülmesinde tekrar bölgelerinin analiz edilmesi global yoğunluk hakkında doğru bilgi vermektedir. Bu yöntemlerde DNA'ya bisulfit modifikasyonu uygulanır ve daha sonra PCR ile amplifiye edilmektedir. Elde edilen tüm genoma ait PCR ürünleri, yeni nesil sekanslama gibi yüksek-ölçekli yöntemlerle analiz edilerek genomdaki 5-mC yoğunluğu belirlenmektedir (Mahapatra ve ark., 2012).

1.1.3.2. Gen-Spesifik Metilasyon Analizi

Gen-spesifik metilasyon analizlerinde kullanılan yöntemler arasında bisülfıt modifikasyon, restriksiyon enzimi ve immünopresipitasyon, sekanslama, pyrosekanslama, mikroçip, RT-PCR ve mikrodizin analiz yer almaktadır (Güler ve Balcı, 2016). Gen-spesifik metilasyon ölçümü için bisülfıt modifikasyonu yöntemi gold standart olarak kabul edilmiştir. Bu yöntemde, DNA baz diziliminde metillenmemiş olan tüm sitozin bazları kimyasal reaksiyonla urasil'e dönüştürülmektedir. Metillenmiş olan sitozinler etkilenmezler ve sitozin olarak kalırlar. Modifikasyon işleminden sonra PCR ile amplifiye edilir ve daha sonra sekanslama ile DNA'daki metillenmiş ve metillenmemiş bölgeler ayırt edilebilmektedir (Castellanos-Rizaldos ve ark., 2014). Gen-spesifik DNA metilasyon analiz kitleri ile herhangi bir gen bölgesinde bisülfıt modifikasyonu yapmadan RT-PCR ile metilasyon yüzdesi kantitatif olarak elde edilmektedir (Kurdyukov ve Bullock, 2016). Restriksiyon enzimleri ile kesim yönteminde, enzimler metillenmiş ya da metillenmemiş DNA'yı tanıyıp kesim yapacak şekilde adapte edilebilmektedir. Enzim kesiminden sonra oluşan fragmentlere adaptör ligasyonu yapılmaktadır. Fragmentler PCR ile amplifiye edilmektedir. Restriksiyon enzim yöntemlerin dezavantajı, metilasyon analizinin sadece enzimin tanıdığı bölgelerle kısıtlı olmasıdır. Metillenmiş bölgeleri analiz etmek için 5m-C'lere bağlanan metil-spesifik proteinlere özgü antikorlar üretilmiştir. Bu antikorların kullanımıyla immünopresipitasyona dayalı metotlar geliştirilmiştir. DNA önce sonikasyona uğratarak denatüre edilmektedir. Metillenmiş bölgelere bağlanan proteinlere özgü antikorlar kullanılarak immünopresipitasyon işlemi yapılmaktadır. Bu bölgeler PCR ile amplifiye edilmektedir. Daha sonra oluşan fragmentler mikroarray ya da yeni nesil sekanslama yöntemleri ile analiz edilmektedir (Güler ve Balcı, 2016). Pyrosekanslama, aynı reaksiyonda birden çok CpG bölgesinin metilasyon miktarının kesin olarak belirlenebilmesi yönünden avantajlıdır. Tek dezavantajı, her bir reaksiyonda sadece 25-30 bazlık bölgelerin sekanslanabilmesi ve bunun da analiz edilecek CpG bölgelerini sınırlandırıyor olmasıdır (Kurdyukov ve Bullock, 2016).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu bölümde, örneklerin toplanması, laboratuvar analizi ve istatistik analizi ile verilerin değerlendirilmesi üç ana aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sırasında literatürde belirtilen genel kurallar göz önünde tutularak çalışılmıştır.

2.1. Örnek Toplanması

Bu tez çalışması, Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında saklanan psoas kas dokularında; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi 11 Nisan 2016 tarihli Klinik araştırmalar etik kurulu toplantısında 07-308-16 sayılı etik kurulu kararı ve Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu (ATK) Ankara Grup Başkanlığının 07/06/2016 tarihli Eğitim ve Bilimsel Araştırma Komisyonu toplantısında 21589509/246 sayılı bilimsel çalışma onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. İnsan psoas kas doku örnekleri.

Cesedin nereden geldiği, ölüm nedeni, ölüm saati, ne kadar süre ile hastanede kaldığı ve ne zaman morga geldiği belirlenmiştir. Bu kişiler farklı sebeplerden dolayı hayatını kaybetmiştir. Bunlar; ateşli silah, yüksekten düşmeye bağlı travma, trafik kazası, iş kazası, uçucu madde intoksikasyonu, yüksek akım ve intihar örnekleridir. Ayrıca, grup içerisinde kalp-damar hastalığı ve şizofreni tanısı alan vakalar bulunmuştur (Çizelge 4.). PMA arasındaki farkı en erken 2 saat ve en geç 26 saat 40 dakika olmuştur. Çalışma yer alan vakalar 15-71 yaş arasında değişen 4 kadın ve 17 erkek bireyden oluşmaktadır (Çizelge 4.).

Çizelge 4. İncelenen İnsan Biyometrik Verileri

Vaka No.	Cinsiyet	Öleninin Klinik Özellikleri ve Ölümünün nedeni	PMA
1.	E	Gastrointestinal sistem hastası (18 gün hastanede)	10 saat 05dk
2.	E	Yüksek düşme (2 gün hastanede)	12 saat 55 dk
3.	E	İş kazası (Aynı gün)	17,5 saat
4.	K	Evde öldü (Aynı gün)	14,5 saat
5.	E	Ateşli silah (Aynı gün)	15 saat
6.	E	Kalp damar hastası (Aynı gün)	15 saat
7.	E	Yüksek düşme (Aynı gün)	18 saat
8.	E	Bilinmiyor (Aynı gün)	14 saat 30 dk
9.	K	Kalp damar hastası (Aynı gün)	11 saat 20 dk
10.	E	Bilinmiyor (12 gün hastanede)	18 saat
11.	E	Yüksekten düşme (10 gün hastanede)	20 saat 30 dk
12.	E	Şizofreni (Aynı gün)	22 saat 30 dk
13.	E	İş kazası (Yüksekten akım) (Aynı gün)	16 saat 30 dk
14.	E	Kalp damar hastası (Aynı gün)	14 saat
15.	E	Uçucu madde (2 gün hastanede)	13 saat 15 dk
16.	E	Ateşli silah (Aynı gün)	2 saat
17.	K	Trafik kazası (50 gün hastanede)	25 saat 30 dk
18.	E	Şizofreni (Aynı gün)	26 saat 40 dk
19.	E	Ateşli silah (Aynı gün)	18 saat 50 dk
20.	E	Ateşli silah (Aynı gün)	18 saat 50 dk
21.	K	Trafik kazası (67 gün hastanede)	20 saat
No.: Numara, PMI: Postmortem aralığı, E: Erkek, K: Kadın			

2.2. Gerekli Materyaller

2.2.1. Alet ve Gereçler

- a. Laboratuvar önlüğü
- b. Eldiven
- c. Su banyosu
- d. Mikrosantrifüj (12000x g, 16000x g)
- e. 10, 100, 1000'lik pipetler
- f. 10, 100, 1000'lik pipet ucu
- g. Volteks
- h. Mikrodalga fırın
- i. Hassas terazi
- j. Elektroforez Cihaz
- k. Elektrofotometre Cihaz ((Epoch Microplate Spectrophotometer-BioTek)
- l. -85°C Dondurucu (Scancool, SCL50P)
- m. -20°C Dondurucu
- n. Rack
- o. Steril gazlı bez
- p. Mezür (10ml, 25ml, 100ml, 1000ml)
- q. Aluminium foil
- r. Bistrü

2.2.2. Kimyasallar

- a. %70, %90, %100 EtOH
- b. Çamaşır su
- c. dH₂O
- d. TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, Ph 7.5)
- e. Agaroz
- f. Etidium Bromür (EtBr)
- g. BromoFenol blue
- h. Quick-DNA TM Miniprep Plus Kit, Katalog No. D4068 & D4069
- i. 5-mC DNA ELISA Kit, Katalog Numarası D5325 & D5326

Çizelge 5. Quick-DNA TM Miniprep Plus Kit içeriği.

Ürünleri	D4068 (50 Preps.)	D4069 (200 Preps.)	Saklama Sıcaklığı
Proteinase K & Storage Buffer	20 mg	4 x 20 mg	-20 °C (karıştırıldıktan sonra)
BioFluid & Cell Buffer (Red)	12 ml	45 ml	Oda sıcaklığı
Solid Tissue Buffer (Blue)*	6 ml	22 ml	Oda sıcaklığı
Genomic Binding Buffer	25 ml	85 ml	Oda sıcaklığı
DNA Pre-Wash Buffer *	30 ml	2 x 50 mg	Oda sıcaklığı
g-DNA Wash Buffer	50 ml	200ml	Oda sıcaklığı
DNA Elution Buffer	10 ml	50 ml	Oda sıcaklığı
Zymo-Spin TM IIC-XL Columns	50 Columnns	200 Columnns	Oda sıcaklığı
Collection Tubes	100 tubes	400 tubes	Oda sıcaklığı

Çizelge 6. 5-mC DNA ELISA Kit içeriği

Ürünleri	D5325 (1 x 96 wells)	D5326 (2 x 96 wells)	Saklama Sıcaklığı
5-mC Coating Buffer	15 mg	30 mg	4°C
5-mC ELISA Buffer	250 ml	250 ml x 2	4°C
Anti-5-Methylcytosine (1 µg/µl)	15 ml	30 ml	-20°C
Secondary Antibody (1 µg/µl)	15 ml	30 ml	4°C
HRP Developer	15 ml	30 mg	4°C
Negative Control (100 ng/µl)	50 ml	50ml	-20°C
Positive Control (100 ng/µl)	50 ml	50 ml	-20°C
96-well plate (12 x 8-well Strips)	1 Columnns	2 Columnns	Oda sıcaklığı

Çizelge 7. Negatif Kontrol ve Pozitif Kontrol hazırlaması. Bu tablo standart bir eğri oluşturmak için kullanılması gereken yedi karışımın hazırlanışını gösterir.

% 5-Mc	Negatif Kontrol (100ng/μl)	Negatif Kontrol (100ng/μl)
%0	10.0 μl	0 μl
%5	9.5 μl	0.5 μl
%10	9.0 μl	1.0 μl
%25	7.5 μl	2.5 μl
%50	5.0 μl	5.0 μl
%75	2.5 μl	7.5 μl
%100	0 μl	10.0 μl

Çizelge 8. Antikor hazırlaması

	Dilüsyonu	Hacmi (μl)	Örnek (18 kuyu)
5-mC ELISA Tampon	N/A	(# wells + 2) 100	2,000 μl
Anti-5-Metilsitozin	1:2,000	Buffer Vol. / 2,000	1 μl
İkincil Antikor	1:1,000	Buffer Vol. / 1,000	2 μl

2.3. DENEY PROSEDÜRÜ

2.3.1. DNA İzolasyonu

Çalışmanın yapıldığı Ankara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarında saklanan 21 psoas kas dokularından DNA izolasyonu Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit, Katalog No. D4068 & D4069 ile gerçekleştirildi. 21 psoas kas doku örnekleri -85°C dondurucudan çıkartılıp bistüri yardımı ile 25 mg'lik dokulara parçalandı. Kalan dokular ihtiyaç halinde tekrar kullanılmak üzere -85°C dondurucuda saklandı.

Parçalanmış doku 25 mg'lik mikrosantrifüj tüplere alındı ve üzerine 95µl su, 95µl Solid Tissue Buffer (mavi) ve 10 µl Proteinaz K eklendi. Ondan sonra karışım 15 saniye vorteks edildi. Sonraki aşamaya devam etmeden önce su banyosunda 55°C'de bir gece boyunca örnekler inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra örnekler su banyosundan çıkartılıp 15 saniye vorteks edildi. Çözünmeyen parçayı ortamdan uzaklaştırmak için 12,000 x g 1 dakikada santrifüj edildi. Santrifüjden alınan tüplerin içindeki 200µl süpernatant dikkatlice çekilip yeni mikrosantrifüj tüplere alındı. Ondan sonra üstüne 400µl Genomic Binding Buffer eklendi ve 1 dakikada 12,000x g santrifüj edildi. Daha sonra kit ambalajı içerisindeki bir koleksiyon tüpüne yerleştirilmiş Zymo-Spin™ IIC-XL Column çıkarıldı daha sonra 600µl karışım mikrosantrifüj tüpünden alınarak Zymo-Spin™ IIC-XL Column tüpü içerisine aktarıldı ve 1 dakikada 12,000x g santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında içerisinde atık solüsyon bulunan koleksiyon tüpü atıldı (Zymo-Spin™ IIC-XL Column tüplerin içinde DNA yapıştı). Yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirilmiş Zymo-Spin™ IIC-XL Column içerisine 400µl DNA Pre-Wash Buffer eklendi ve 1 dakika 12,000 x g santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında içerisinde solüsyon biriken koleksiyon tüpü atılarak Zymo-Spin™ IIC-XL Column yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi. Ondan sonra Zymo-Spin™ IIC-XL Column içerisine 700µl g-DNA Wash Buffer eklendi ve 1 dakika 12,000 x g santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında içerisinde solüsyon biriken koleksiyon tüpü atıldı.

Daha sonra Zymo-Spin™ IIC-XL Column yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirildi. Zymo-Spin™ IIC-XL Column içerisine 200µl g-DNA Wash Buffer eklendi ve 1 dakika 12,000 x g’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında içerisinde solüsyon biriken koleksiyon tüpü atıldı.

Yeni ve steril mikrosantrifüj tüpü alınıp içerisine Zymo-Spin™ IIC-XL Column yerleştirildi. Daha sonra Zymo-Spin™ IIC-XL Column içerisine 40µl DNA Elution Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 1 dakika 16,000 x g santrifüj edildi ve 20µl DNA Elution Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. İnkübasyonundan sonra 1 dakika 16,000 x g’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, Zymo-Spin™ IIC-XL Column altında bulunan mikrosantrifüj tüpünün içerisinde yaklaşık olarak 60µl saflaştırılmış genomik DNA bulundu. Zymo-Spin™ IIC-XL Column tüpler atıldı ve DNA örnekleri mikrosantrifüj tüpünde kaldı (Şekil 2.2). DNA saflığı, DNA miktarı ve DNA metilasyon analiz zamanına kadar -20’de saklandı.



Şekil 10. 21 insan dokulardan elde edilen, DNA izolasyon işleminden sonraki DNA örnekleri.

2.3.2. DNA'nın Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

2.3.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi, DNA, RNA ve proteinlerin moleköl saflığı ve ağırlığı ve miktarının saptanmasında yaygın olarak kullanılan moleküler bir inceleme yöntemidir. Alınan DNA örneklerin saflığı ve degradasyonu görüntülenmek için %2'lik agorose jel hazırlandı. 2gr Agaroz, 90ml dH₂O ve 10ml TBE içerisinde karıştırıldıktan sonra Mikrodalga fırında homojenize edildi. Biraz soğutulduktan sonra 3.5µl Etidyum Bromür eklendi ve jel tepsisine hava kabarcığı oluşmayacak şekilde döküldü ve polimerleşmesi beklenildi. Agaroz jel elektroforezi için DNA örnekleri yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra jele yüklendi ve 120V'da 25 dakika bekletildi. Görüntüler Image Analyze programı ile elde edildi (Şekil 2.3).

2.3.2.2. DNA Miktar Tayini

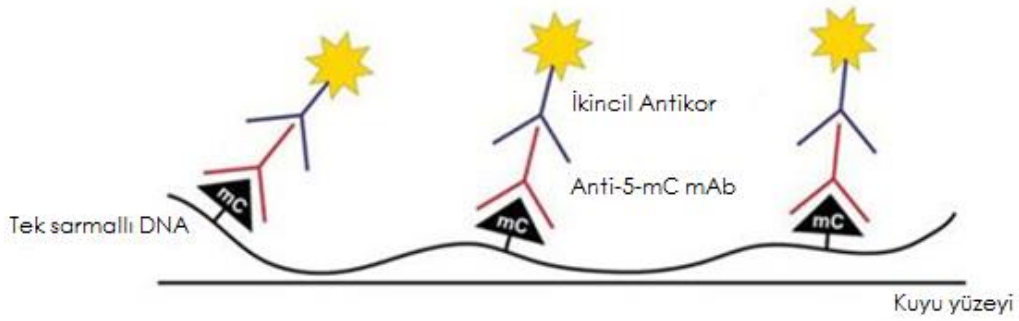
Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit ile elde edilen DNA örneklerin miktarını tayinini belirlemek için spektrofotometrik (Epoch Microplate Spectrophotometer-BioTek) ölçüm yapıldı. Epoch Microplate Spectrophotometer-BioTek ile 280 ve 280nm dalga boylarında ölçtüğü absorbans değerlerinin oranının (A₂₆₀/A₂₈₀) saf DNA'de yaklaşık 1,8 saf RNA ise yaklaşık 2.0 olması şartı aranmaktadır. Eğer proteinden kaynaklanan bir kontaminasyon varsa A₂₆₀/A₂₈₀ yukarıda verilen değerlerden daha az olacaktır ve nükleik asit ölçümü mümkün olmayacaktır.

Deneyimizde spektrofotometrik ölçüm yapmak üzere bilgisayar yazılımında bulunan Gen5 programı başlatıldı. Başlatma işlemi tamamlandıktan sonra her iki optik yüzey (alt ve üst) dH₂O ile iyice teması silinerek temizlendi. Daha sonra 2µl dH₂O yüklenerek ve bilgisayarda kör (read blank) seçilerek kör ölçümü tamamlandı. Kuyularda yeşil rengi göstererek kontrol testi tamamlandı. Daha sonra iki optik yüzey tekrar temizlendi. DNA ölçüm işlemi için 2µl DNA örnek yüklenerek ve bilgisayarda

ölçüm (Read sample) seçilerek DNA ölçümü yapıldı. Tüm DNA örneklerin optik dansiteleri elde edildi (Çizelge 2.2.). Ölçüm yapıldıktan sonra her iki optik yüzey tekrar silenerek temizlendi.

2.3.3. DNA Modifikasyonu

DNA metilasyonun miktarı tayininde öncelikle elde edilen DNA örneklerin 5-mC DNA ELISA Kit ile modifiye edilmiştir. 5-mC DNA ELISA Kit, en az 3 saat içinde herhangi bir DNA örneğinde 5-mC ölçmek için araştırmacıya sağlayan uygun ve güçlü bir araçtır. Bu kit, 5-mC için hem duyarlı hem de spesifik olan benzersiz bir Anti-5-Metiltiyosin monoklonal antikora sahiptir. Test, omurgalı, bitki ve mikrobiyal kaynaklardan gelen geniş bir girdi DNA, yanı sıra PCR amplikonları ve parçalanmış DNA ile uyumludur. DNA örneğindeki 5-mC'lik yüzdelik, kit ile birlikte verilen özel olarak tasarlanmış kontrollerle oluşturulan standart bir eğriye göre doğru bir şekilde ölçülebilmektedir. Ayrıca, hızlı, akıcı iş akışı, yüksek verimli analiz için idealdir.



Şekil 11. 5mC DNA ELISA Kiti ile DNA modifikasyonunun prensibi. 5-mC DNA ELISA Kiti, iş akışında dolaylı ELISA tekniğini kullanır. Denature edilmiş, tek sarmallı DNA örnekleri, 5-mC Coating Buffer içerisinde kuyu yüzeyleri kaplandı. Anti-5-Metiltiyosin monoklonal antikor (Anti-5-mC mAb) ve HRP ile konjüge edilmiş Sekonder Antikor 5-mC ELISA Tamponu Kuyulara eklendi. 5-mC'nin saptanması, HRP Developer eklenmesinden sonra gerçekleşmektedir (zymo research ürünleri: 5-mC DNA ELISA Kiti, Katalog No. D5325 & D5326).

2.3.3.1. DNA Modifikasyonu Yöntemi

Global DNA metilasyon analizi, üretici tarafından sağlanan talimatlara uygun olarak 5-mC DNA ELISA Kiti (Katalog No. D5325 & D5326) kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca, 21 DNA örnekleri içerisinde 100 ng DNA, her bir PCR tüpüne eklendi ve 5-mC Coating Buffer ile son hacmi 100µl'ye getirildi. DNA, bir termal döngü cihazı içinde 5 dakikada 98°C dereceye ulaştırılıp denatüre edildi. Denatürasyonundan sonra, DNA'lar 10 dakika boyunca buz içerisinde bırakıldı. Daha sonra gerekli olan kuyu şeritleri sayısında alındı.

Denatüre edilmiş DNA'lar 100 µl plate kuyularına yüklendi ve alüminyum folyo ile kapatıldı, sonra 1 saat süreyle 37°C derecede inkübasyon edildi. Daha sonra her bir kuyucuk, 200 µl 5-mC ELISA buffer ile 3 kez yıkandı (her yıkamadan sonra 5-cm ELISA buffer kuyularından atıldı). Daha sonra her bir kuyucuğa 200 µl 5-mC ELISA buffer eklendi. Plate alüminyum folyo ile kapatıldı ve 30 dakika süre ile 37 °C derecede inkübasyona bırakıldı. 100 µl Antikor (5-mC ELISA buffer, Anti-5-metilsitozin ve ikinci antikor karışımı) her bir kuyucuğa yüklendi. Ondan sonra plate alüminyum folyo ile kapatıldı ve 1 saat süre ile 37°C derecede inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra Antikor karışımı kuyulardan atıldı. Ondan sonra her bir kuyucuk, 200µl 5-mC ELISA buffer ile 3 kez yıkandı. Yıkama aşamalarından sonra her bir kuyucuğa 100µl HRP developer eklendi ve oda sıcaklığında 50 dakika içinde renk gelişmeye bırakıldı. Ondan sonra 405-450nm'de bir ELISA plaka okuyucusu (Epoch Microplate Spectrophotometer-BioTek) ile absorbansı ölçüldü.

2.4. İSTATİSTİK ANALİZLER

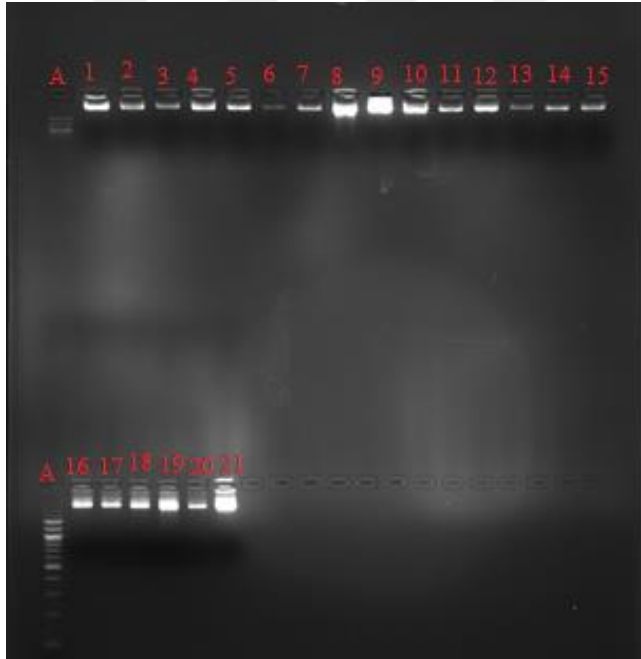
Örneklere ait analiz sonuçlarının ortalama, standart sapma ve korelasyon katsayısı gibi hesaplanan değerleri IBM SPSS istatistik paket programından yararlanarak yapılmıştır. Negatif Kontrol ve Pozitif Kontrol ile yapılandırılan standart eğrinin ikinci dereceden regresyon denklemi kullanılarak 5-mC'lik yüzdesi hesaplandı. İstatistiksel analiz yapmak üzere postmortem doku örnekleri 3 grup zaman aralığında sınıflandırdı (Tablo 10). Normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık seviyesi olarak $p<0.05$ alındı.

3. BULGULAR

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, istatistiksel anlamlılıkları belirleyerek tablo ve şekil olarak bu bölümde sunulmuştur. Çalışmaya alınan toplam 21 vakanın biyometrik verileri Çizelge 4’te ve Şekil 9’da gösterilmiştir. Tüm örneklerden DNA izole edilmiş (Çizelge 9 ve Şekil 10) ve elde edilen DNA’ların saflığı incelenmiştir (Şekil 12).

Çizelge 9. Vakalara ait cinsiyet ve istatistik olarak değerlendirilmesi.

Cinsiyet	Frekans	Yüzde	Geçerli yüzde	Kümülatif yüzde
Erkek	17	81	81	81
Kadın	4	19	19	100
Total	21	100	100	



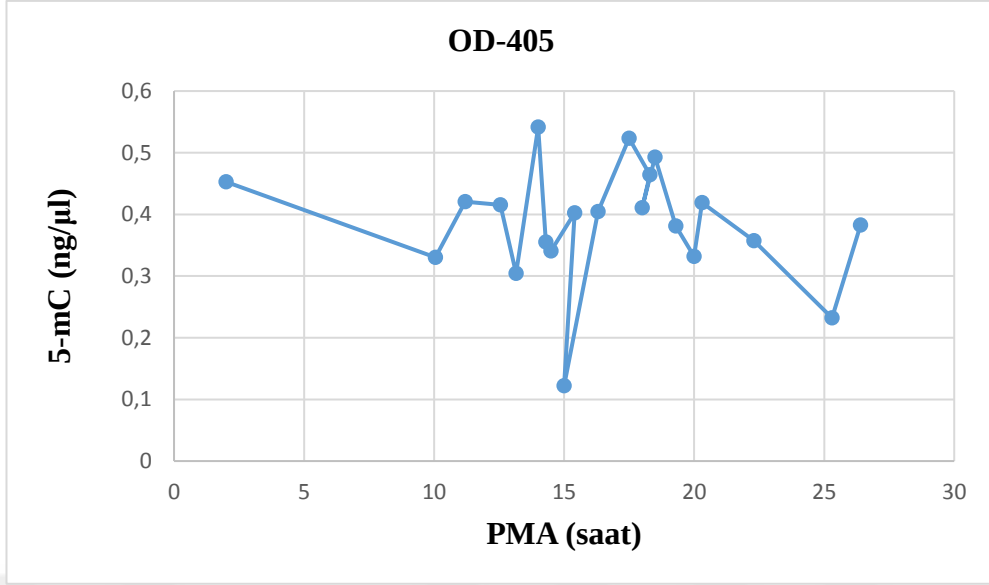
Şekil 12. 21 vakadan izole edilen DNA’ya ait jel elektroforez görüntüsü.

Çizelge 10. Vakalara ait optik dansite ve DNA (ng/µl) sonuçları.

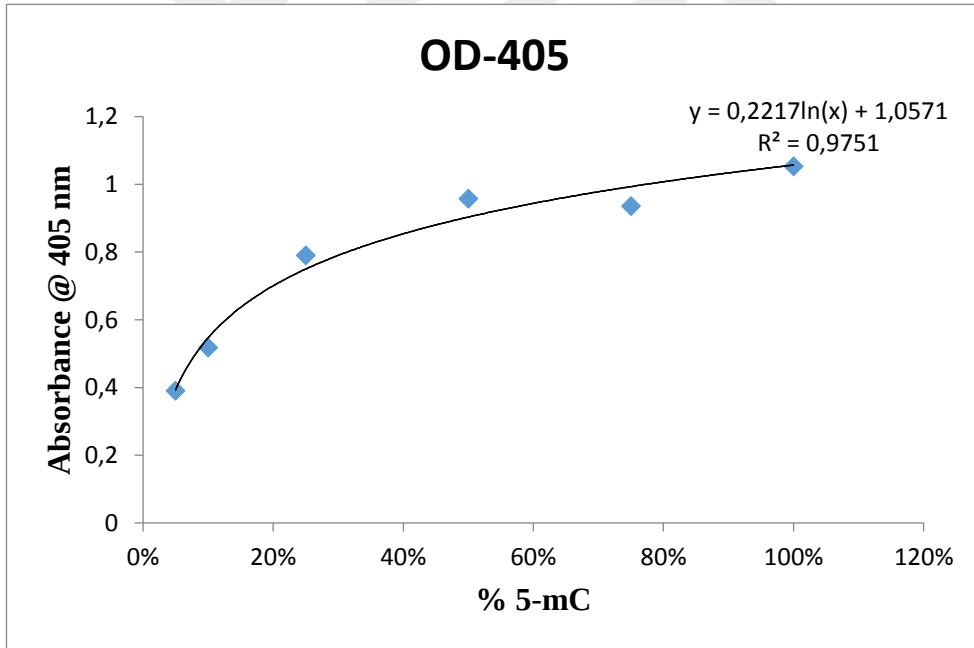
Vaka No.	Optik Dansite (260/230)	ng/µL
1	1,021	47,472
2	1,8165	15,1145
3	0,6335	12,589
4	1,491	14,4285
5	1,4805	19,248
6	0,081	6,267
7	0,349	4,684
8	0,3685	42,832
9	0,73	107,961
10	1,613	130,4915
11	0,2645	23,7605
12	0,6545	42,508
13	1,854	11,3405
14	1,625	14,1005
15	1,838	14,681
16	1,726	36,78
17	0,02	25,95
18	0,0995	28,586
19	1,4075	92,0895
20	0,882	24,3665
21	1,2325	148,622

Çizelge 11. Vakalara ait global DNA metilasyon (ng/µl) ve standart sonuçları

Hasta no	Cinsiyet	Global DNA Metilasyonu (ng/µl)	PMA
1	E	0,3305	10 saat 5dk
2	E	0,4155	12 saat 55 dk
3	E	0,5235	17,5 saat
4	K	0,3405	14,5 saat
5	E	0,4025	15 saat
6	E	0,122	15 saat
7	E	0,464	18 saat
8	E	0,355	14 saat 30 dk
9	K	0,4205	11 saat 20 dk
10	E	0,4105	18 saat
11	E	0,419	20 saat 30 dk
12	E	0,3575	22 saat 30 dk
13	E	0,4045	16 saat 30 dk
14	E	0,5415	14 saat
15	E	0,3045	13 saat 15 dk
16	E	0,453	2 saat
17	K	0,232	25 saat 30 dk
18	E	0,3825	26 saat 40 dk
19	0,493	0,493	18 saat 50 dk
20	0,381	0,381	18 saat 50 dk
21	0,332	0,332	20 saat
Standartlar (ng/µl)			
0%			0,075
5%			0,39
10%			0,5175
25%			0,79
50%			0,9575
75%			0,9355
100%			1,053



Şekil 13. Değişen saatlerde zamana bağlı olarak vakalara ait global DNA metilasyon (ng/μl) oranları. Şekil postmortem dönemde insan kas psoas dokusu örnekleri üzerinde ölüm zamanı tayininde DNA metilasyonu etkinliğinin göstermi.



Şekil 14. DNA karışımları ile üretilen standart eğri.

Çizelge 12. Vakalara ait Global DNA metilasyon miktarı (ng/μl) ve global DNA metilasyon yüzdesi. Aşağıdaki tablo, logaritmik ikinci dereceden regresyon türetilen Şekil 8'deki denklem kullanılarak, kendi absorbansına dayalı DNA örneklerinden 5-mC yüzdesini göstermektedir.

Vaka no	Global 5-mC (ng/μl)	Global % 5-mC (Formül sonucu)
1	0,3305	0,0377
2	0,4155	0,0554
3	0,5235	0,0901
4	0,3405	0,0395
5	0,4025	0,0522
6	0,122	0,0147
7	0,464	0,0689
8	0,355	0,0421
9	0,4205	0,0566
10	0,4105	0,0541
11	0,419	0,0563
12	0,3575	0,0426
13	0,4045	0,0527
14	0,5415	0,0977
15	0,3045	0,0336
16	0,453	0,0656
17	0,232	0,0242
18	0,3825	0,0477
19	0,493	0,0785
20	0,381	0,0474
21	0,332	0,0380

Çizelge 13. Vakalara ait grupları ve istatistik olarak değerlendirilmesi

Vaka Grubu	Frekans	Yüzde	Geçerli yüzde	Kümülatif yüzde
0-12 saat	3	14,3	14,3	14,3
12-18 saat	9	42,9	42,9	57,1
18-27 saat	9	42,9	42,9	100
Total	21	100	100	

Çizelge 14. Vakalara ait global DNA metilasyon yüzdesi sonuçları ve istatistik olarak değerlendirilmesi.

Grup	N	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum
0-12 saat	3	0,0533	0,0142397	0,0566	0,0377	0,0656
12-18 saat	9	0,053111	0,0262802	0,0522	0,0147	0,0977
18-27 saat	9	0,050856	0,0161857	0,0477	0,0242	0,0785
Total	21	0,052171	0,0200673	0,0522	0,0147	0,0977

NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

Çizelge 15. Vakalara ait bildirilen 3 grup için ortalama rank.

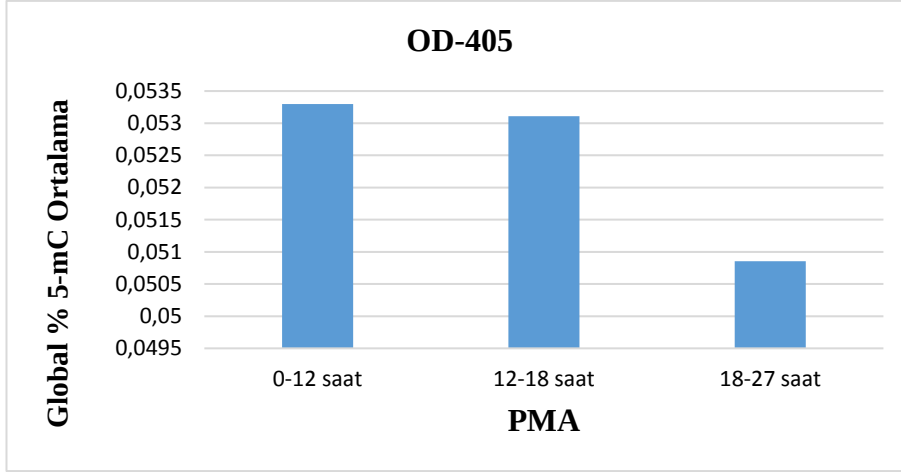
Grup	N	Ortalama Rank
0-12 saat	3	12,33
12-18 saat	9	10,56
18-27 saat	9	11
Total	21	

Çizelge 16. Vakalara ait bildirilen 3 grup için istatistik Testi.

	logx	
Chi-Square	0,185	P>0,05
df	2	
Asym. Sig.	0,912	

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: grup



Şekil 15. Vakalara ait grupları, global DNA metilasyon ortalamaları ve PMA ilişkisi.

Çizelge 17. Vakalara ait Cinsiyetler arasındaki global DNA metilasyon düzeyinin istatistik olarak değerlendirilmesi.

Cinsiyet		Logx	Ort-miktar
Erkek	N	17	17
	Ortalama	0,055135	0,397647
	St. Sapma	0,0205261	0,0959184
	Medyan	0,527	0,4045
	Minimum	0,0147	0,122
	Maksimum	0,0977	0,5415
Kadın	N	4	4
	Ortalama	0,039575	0,33125
	St. Sapma	0,0132756	0,0772491
	Medyan	0,03875	0,33625
	Minimum	0,0242	0,232
	Maksimum	0,0566	0,4205
Total	N	21	21
	Ortalama	0,052171	0,385
	St. Sapma	0,0200673	0,0947056
	Medyan	0,0522	0,4025
	Minimum	0,0147	0,122
	Maksimum	0,0977	0,5415

Npar Tests

Mann-Whitney Test

Çizelge 18. Vakalara ait bildirilen cinsiyet için ortalama rank.

Cinsiyet		N	Mean	Sum of Ranks
Logx	Erkek	17	11,88	202
	Kadın	4	7,25	29
	Total	21		

Çizelge 19. Vakalara ait bildirilen cinsiyet için istatistiksel Testi.

Test Statistics a	Logx	
Mann-Whitney U	19	P> 0,05
Wilcoxon W	29	
Z	-1,343	
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,179	
Exact Sig. 2*(1-tailed Sig.)	0,203^b	

a. Grouping variable: cinsiyet

b. Not corrected for ties

Çizelge 20. Hastanede yatanların ve aynı gün vefat edenlerin global DNA metilasyon değerleri üzerine etkisi istatistik olarak değerlendirilmesi.

		Logx	Ort-miktar
Aynı gün	N	14	14
	Ortalama	0,056879	0,402929
	St. Sapma	0,0217944	0,1024612
	Medyan	0,05245	0,4035
	Minimum	0,0147	0,122
	Maksimum	0,977	
			0,5415
Yatışlı	N	7	7
	Ortalama	0,042757	0,349143
	St. Sapma	0,012572	0,0700058
	Medyan	0,038	0,332
	Minimum	0,0242	0,232
	Maksimum	0,0563	
			0,419
Total	N	21	21
	Ortalama	0,052171	0,385
	St. Sapma	0,0200673	0,0947056
	Medyan	0,0522	0,4025
	Minimum	0,0147	0,122
	Maksimum	0,0977	
			0,5415

Npar Testa

Mann-Whitney Test

Çizelge 21. Vakalara ait bildirilen hastanede yatanları ve aynı gün vefat edenleri için ortalama rank.

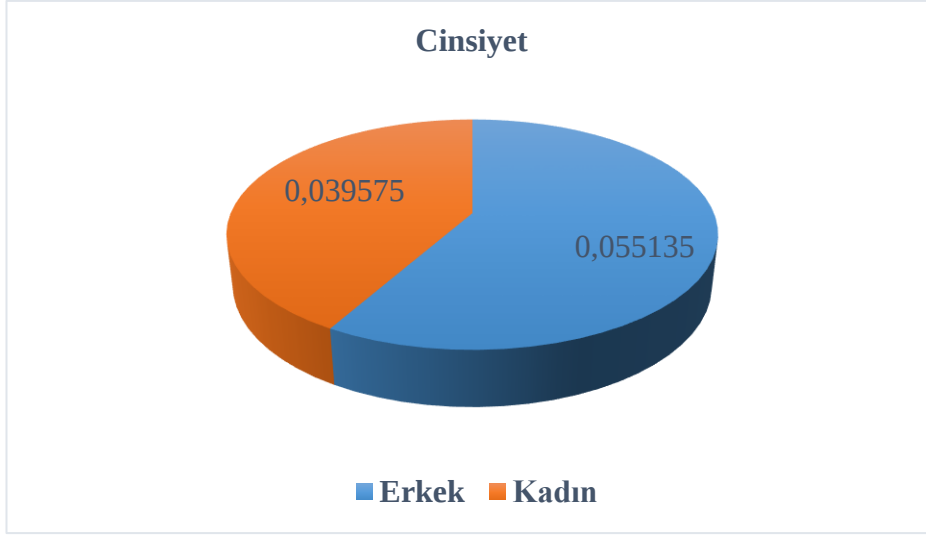
		N	Ortalama	Sum of Ranks
Logx	Aynı gün	14	12,5	175
	Yatışlı	7	8	56
	Total	21		

Çizelge 22. Vakalara ait bildirilen hastanede yatanları ve aynı gün vefat edenleri için istatistiksel Testi.

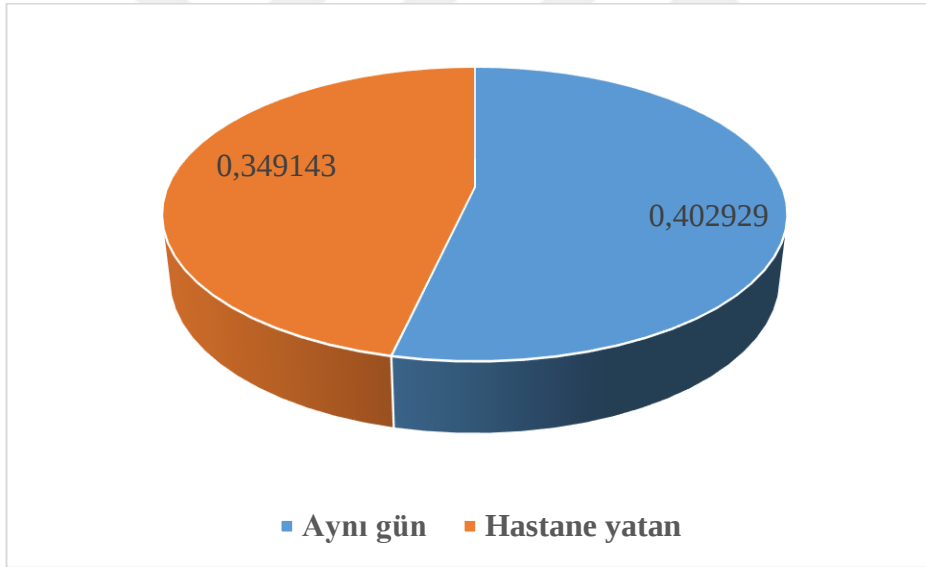
Test Statistics a	logx	
Mann-Whitney U		P>0,05
Wilcoxon W	28	
Z	56	
Asymp. Sig. (2-tailed)	-1,156	
Exact Sig. 2*(1-tailed Sig.)	0,117	
	0,128^b	

a. Grouping variable: Hastane-kalıs

b. Not corrected for ties.



Şekil 16. Cinsiyet ve global DNA metilasyon ortalamalarının karşılaştırılması.



Şekil 17. Hastanede yatan ve aynı gün vefat eden gruplar arasındaki global DNA metilasyon ortalamalarının karşılaştırılması.

4. TARTIŞMA

Toplumsal yaşamın temel taşlarından biri, adaletin doğru biçimde gerçekleşmesidir. Yargının doğru biçimde karar verebilmesi, doğru toplanmış ve doğru değerlendirilmiş çok sayıda delilin bulunmasına bağlıdır. Günümüzde, adli bilimler bilirkişilik görevini yerine getirerek yargıya önemli hizmet vermektedir. Ayrıca, adli bilimler uzmanlarının verdiği raporlar kuşkusuz çoğu ülkelerin adalet ve yargı sistemlerini önemli ölçüde etkilemektedir.

Adli vakalarda, cesedin bulunduğu yerin incelenmesinde güvenilir sonuçlar vermesi gerekmektedir. Ancak, PMA için güven aralıklarıyla tahminde bulunulmasını sağlayan geleneksel yöntemler yerine daha kesin sonuçlar verebilecek yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Postmortem dönemde DNA'nın uzun bir süre stabil olduğu bilindiğinden DNA degradasyon düzeyinin tayin edilmesine yönelik çeşitli metotlar kanıtlanmıştır. Ayrıca, DNA'ların zamana bağlı degradasyonları da PMA belirlenmesinde kullanılmıştır. Günümüzde ise, postmortem RNA fragmentasyon düzeyinin zamana göre kantitatif belirlenmesinin PMA tayininde kullanılabileceği düşünülmüştür. Ancak, bu konuda yapılan çalışmalar sürmekle birlikte sağlanan gelişmeler yeterli değildir. Biz bu sebeple postmortem sürenin belirlenmesinde global DNA metilasyonunun kullanılabilirliğinin araştırılmasını amaçladık. Bu amaçla çalışmamızda, postmortem bilinen 21 vakadan aldığımız insan psoas kas doku örnekleri üzerinde; değişen saatlerde zamana bağlı olarak DNA metilasyonu düzeylerindeki değişimleri inceledik.

Çalışmamızda, postmortem vakalardan aldığımız örneklerin %81'ini erkekler, %19'unu ise kadınlar oluşturmuştur (Çizelge 9). Ayrıca, çalışmadaki vakaların yaşları 15-71 arasında yer almaktadır. Vakalarla ilgili verilerin PMA ve ölüm nedeni Çizelge 4'teki bilgiler özetlenmiştir.

Bu çalışmada, alınan tüm postmortem insan psoas kas doku örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak örneklere ait DNA değerleri saptanmıştır (Çizelge 10). Elde edilen DNA'ların miktarı, spektrofometrik ölçüm sonucu 4,684 ng/μl ile 148,622 ng/μl arasında hesaplanmıştır.

Tüm örneklerden izole edilen DNA'lar %2'lik agarose jelde kontrol edilmiştir. Tablo 3'teki numara sıralarına göre jele yüklenmiş ve jel görüntülerine göre elde edilen DNA'lar 5-mC DNA ELISA Kit ile kullanılması için yeterli bulunmuştur (Şekil 12).

Rhein ve ark. (2015) tarafından domuz beyni ve kanı üzerinde yapılan bir çalışmada PMA arttığında DNA metilasyonunda anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Ayrıca, DNA metilasyon sonuçlarının post mortem aralıkta DNA bütünlüğüne önemli derecede bağlı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile uyumlu olarak çalışmamızda alınan DNA'ların saflığı değerlendirdikten sonra DNA'lardan global DNA metilasyon analizi yapılarak global DNA metilasyon ait değerler saptanmıştır (Çizelge 11). Elde edilen global DNA metilasyonların miktarı, spektrofotometrik ölçüm sonucu 0,122 ng/μl ile 0,5415 ng/μl arasında hesaplanmıştır.

Kruskal-Wallis testi, normal dağılım göstermeyen gruplarda üç veya daha fazla sayıda grubun ortalamaları arasındaki farklılığın anlamlılığını göstermek için test amacıyla kullanılan bir tekniktir (McKight ve Najab, 2010). Bu çalışmada, global DNA metilasyonunun ortalamasını yüzdelik olarak incelediğimiz vakaları 3 gruba bölerek Kruskal-Wallis testi uygulandı (Çizelge 13).

Global DNA metilasyonu düzeylerinde belirtilen gruplar arasında 0.185'lik bir skor ile istatistiksel bir fark olmadığı göstermiştir (Çizelge 16; P = 0,912). Bildirilen 3 grup için ortalama rank sırasıyla 2-12 saat için 12.33, 12-18 saat için 10,56 ve 18-27 saat için 11'dir (Çizelge 15). Böylece, çalışmamızda poas kas dokularında global DNA metilasyon düzeyi ve PMA arasındaki korelasyon incelendiğinde global DNA metilasyon düzeyinin PMA'da kullanabilecek uygun bir belirteç olmadığı sonucuna varılmıştır.

Gross ve ark. (2016) tarafından yetişkin Sprague Dawley farelerinin beyinleri üzerinde yapılan bir çalışmada 0 ila 96 saatler arasında değişen sürelerde DNA metilasyon düzeyleri incelenmiştir. Söz konusu çalışmada 5-metilsitozin ve 5-hidroksimetilsitozin stabilitesi incelenmiştir. Onların çalışmaları sonucunda 5-metilsitozin ve 5-hidroksimetil-sitozin'in ne global ne de bölge-spesifik düzeylerinin PMA'dan etkilenmediği bildirilmiştir. Benzer şekilde, Ernst ve ark. (2008) tarafından yapılan bir diğer çalışmada, yapay metillenmiş plazmid kullanarak in vitro olarak DNA metilasyon durumunun aşırı pH koşullarında bile sabit kaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmaya uyumlu olarak çalışmamızda insan psoas kas dokusunda 2 ila 27 saatler arasında değişen PMA zamana arasında global DNA metilasyonunda herhangi bir değişiklik olmadığı ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.

Boks ve ark. (2009) tarafından ikizlerde yaş, cinsiyet ve genotip ile DNA metilasyon ilişkisi araştırılmıştır. Onların çalışmalarda tam kan genomik DNA'yı ikiz (23 monozigot ikiz çift ve 23 dizigot ikiz çift, N = 92) ve sağlıklı kontrollerde (N = 96) kullanmıştır. Onların çalışmaları sonucunda olguların yaşları ile cinsiyetlerinin DNA metilasyon değerleri arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Çalışmamızda ise, postmortem insan psoas kas dokularında hem erkeklerde hem de kadınlarda global DNA metilasyon düzeyleri araştırıldı. Ancak, postmortem 2 ila 27 saatlerde tespit edilen global % 5-mC ortalamalar vakaların cinsiyetine göre farklılık gösterip göstermediğine Mann-Whitney testi ile baktığımızda erkekler ve kadınlar arasında global DNA metilasyonun düzeylerinde 0.179'lık bir skor ile istatistiksel bir fark olmasada belirlendi (Çizelge 19; p=0,203). Çalışmamızda yer alan vakaların az sayıda kullanılması bu sonuca neden olabileceği şeklinde yorumlandı. Ayrıca, çalışmamızda vakaların yaşları hakkında veri elde edilmediğinden postmortem DNA metilasyon değerleri arasında korelasyon incelenememiştir. Bildirilen cinsiyet için ortalama rank sırasıyla erkek için 11,88; kadın için 7,25'dir (Çizelge 18).

Nohara ve ark. (2011) tarafından bir metil-yeterli diyet (MSD), bir metil eksik diyet (MDD) ve bir MDD + arsenik besili erkek ve dişi C57BL/6 farelerinin karaciğeri üzerinde bir çalışma yapmıştır. Söz konusu çalışmada DNA metilasyon seviyesini, evrensel metil verici S-adenosilmetionin (SAM) içeriğini ve DNA metil transferazların (DNMT) ekspresyonu araştırılmıştır. Onların çalışma sonucunda farelerde hepatik global DNA metilasyonunda cinsiyete-spesifik değişiklikler olduğunu bildirmiştir. Çünkü MDD ve arsenik, erkek farelerin karaciğerlerinde genomik 5meC içeriğini azaltma eğilimindeyken, MDD + arsenik, dişi farelerde bulunan karaciğerlerde 5meC içeriğini önemli ölçüde artırdığını gözlenmiştir. MDD ve MDD + arsenik, sadece erkek farelerin karaciğerlerinde DNMT1 ekspresyonunu bastırmıştır. SAM içeriği MDD ve MDD + arsenik ile yalnızca dişi farelerin karaciğerlerinde azalması gözlenmiştir. Bir diğer beklenmedik bulgu, gruplar arasında 5meC içerisindeki küçük farklılık gözlenmiştir. Fragou ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada ise, kokain ve eroin ile dozlanan farelerin karaciğer ve beyindeki global DNA metilasyon seviyelerini araştırmıştır. Bu çalışmada beyin ve karaciğer arasındaki küresel metilasyon durumundaki doku spesifik farklılıklarını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, dozlanmış ve kontrol edilen hayvanlar arasında toplam içeriğinde %5-metil-2'-deoksisitidin'in hiçbir farkı gözlenmemiştir. Kokain veya eroin ile tedavi edilen farelerin beyindeki ve karaciğerindeki global DNA metilasyon durumu etkilenmeden kalmıştır.

Çalışmamızda ise, alınan vakaların ölüm nedenlerine ek olarak, bazı ölmeden önce hastanede yatan, diğerleri aynı gün vefat eden kişiler de bulunmaktaydı. Böylece, ilaç kullanmanın global DNA metilasyon düzeyleri üzerine etkiler olabileceği düşünüldüğünden bu iki grup ile postmortem global DNA metilasyon değerleri arasındaki ilişki analiz edildi. Alınan vakalara ait aynı gün vefat edenleri ve ölmeden önce hastanede bir süreye yatanların genel bilgileri Çizelge 4'te verilmiştir. Böylelikle, ölmeden önce hastanede yatan ve aynı gün vefat eden grupları arasındaki postmortem global DNA metilasyon değeri ortalamaları üzerine etkisi analiz Mann-Whitney U testi ile analiz edildi (Çizelge 20). Ancak, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı (Çizelge 22; $p=0,128$). Bildirilen 2 grup için ortalama rank sırasıyla hastanede yatan için 8, aynı gün vefat eden için 12,5'dir (Çizelge 21).

Adli araştırmalarda olay yeri incelemelerinden elde edilen biyolojik kaynaklı materyallerin analizi son derece önemlidir. Ayrıca, biyolojik kaynaklı materyallerin türünün ve kökeninin belirlenmesi, bağışçılarla fiili suç eylemlerini birbirine bağlayarak olay yeri yeniden inşası için önemli ipuçları sağlayabilir. Bununla birlikte Adli biyolojik kaynaklı materyallerin incelenmesinde katalitik, enzimatik ve immünolojik testler kullanarak çeşitli sınır vardır. Ancak, günümüzdeki çalışmalarda dokuya spesifik DNA metilasyonu, bu sınırlamaların üstesinden gelmek için umut verici yeni bir araç olarak önerilmiştir. Ayrıca, Adli tıpta metilasyon çalışmaları son yıllarda ilgi artmaya başlamıştır. Bu tez çalışmasında, postmortem dönemde değişen saatlerde zamana bağlı olarak insan kas dokusu örnekleri üzerinde global DNA metilasyon düzeyi araştırılmış ve ölüm zamanı tayininde DNA metilasyonu Adli bilimlerde kullanabilirliği test edilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tüm şiddetli ve şüpheli ölümlerde, ölüm zaman ve nedenini belirlemek önemlidir. Ayrıca, ölüm belgeleri aynı zamanda sağlık istatistiklerinin de önemli bir kaynağı olup, Dünya Sağlık Örgütü de konuyu tüm dünyada bilimsel, ortak temellere dayandırmak için çaba göstermektedir. Ancak, bugüne kadar tıbbi ve tıbbi olmayan bulguların birlikte değerlendirilmesi ölüm zamanının tayini için % 100 kesin sonuçlar vermemiştir.

Adli tıpta metilasyon çalışmaları son yıllarda ilgi sürmeye başlamıştır. 2016 yılında Gross ve arkadaşlar yaptığı sadece bir çalışmada otopsi materyallerinde beyin dokusunda global DNA metilasyon düzeyi analiz edilmiş ve analiz bir korelasyon bulunmuştur.

PMA ve metilasyon ilişkisi konusunda otopsi kas dokularında hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında postmortem dönemde değişen saatlerde zamana bağlı olarak insan kas dokusu örnekleri üzerinde global DNA metilasyonu düzeyi analiz edilerek ölüm zamanı tayininde genom ebadında DNA metilasyonunun etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmada insan psoas kas dokusunda 2 ila 27 saatler arasında değişen PMA arasında global DNA metilasyonunda herhangi bir değişiklik olmadığı ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir. Bu sonuca vaka sayısı, yaş, cinsiyet, hayat tarzı, çevresel faktörler, hasta popülasyonu veya hastalık alt tiplerindeki farklılıkların neden olabileceği düşünülmektedir. Böylelikle, çalışmanın hem ölüm zamanı hem de vaka sayısı bakımından daha geniş çalışılması ve farklı dokularda da araştırma yapılmasını öneriyoruz.

Postmortem dönemde global DNA metilasyonu üzerinde çalışmalar yaş ve kişinin antemortem durumları da dikkate alınmalı ve bu faktörleri üzerinde ek çalışmalar yapılması gereği sunulmaktadır. Çalışmamızın sonuçları, preliminar sonuçlardır. Ayrıntılı araştırmalara ışık tutması açısından son derece önemlidir.

ÖZET

POSTMORTEM ÖLÜM ZAMAN TAYİNİNDE DNA METİLASYONUNUN ETKİNLİĞİ

Tüm şiddetli ve şüpheli ölümlerde, ölüm zaman ve nedenini belirlemek için bir otopsiye ihtiyaç duyulmaktadır. Önceki araştırmacılar, postmortem biyokimya ve moleküler biyoloji, ölüm prosedüründe yer alan hücrelerin ve organların morfolojik ve fonksiyonel değişiklikleriyle kurulamayan genel patofizyolojik değişiklikleri incelemek için kullanmıştır. Bu çalışmada, ölüm zamanının tayininde global DNA metilasyonunun etkinliğini değerlendirmek amacıyla 2 ila 27 saat arasında değişen postmortem aralıklarla ATK'dan aldığımız 21 insan kas doku örneğinden Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Katalog No. D4068 & D4069) ile izole edilen DNA kullanılmıştır. DNA metilasyonun miktarı tayininde öncelikle elde edilen DNA örneklerin 5-mC DNA ELISA Kiti (Katalog No. D5325 & D5326) ile modifiye edilmiştir. Sonuçlarımız, postmortem insan kas doku örneklerinde zamana bağlı olarak postmortem ilk 27 saatte global DNA metilasyonunun stabil olduğunu göstermektedir. Sonuçlara göre ölüm zaman tayininde ilk 27 saatte global DNA metilasyonu etkinliği ve PMA arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır. Bu nedenle, postmortem insan kas dokularındaki araştırmasında global DNA metilasyonun incelemek konusunda daha fazla çalışma ile desteklemesine ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Epigenetik, DNA metilasyonu, ölüm zamanı, postmortem aralığı

SUMMARY

THE EFFECTS OF DNA METHYLATION IN DETERMINING TIME OF DEATH DURING POSTMORTEM

All violent and suspicious deaths require an autopsy to determine the time and possible cause of death. Previous researchers use postmortem biochemistry and molecular biology to examine the general pathophysiological changes involved in the death procedure that cannot be established by morphological and functional changes of cells and organs. In this study however, we used DNA isolated from 21 human psoas muscle tissue samples obtained from ATK subjected to postmortem intervals ranging from 2 to 27 hours by using Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Catalog No. D4068 & D4069). In determining the amount of global DNA methylation, the DNA samples obtained were first modified with 5-mC DNA ELISA Kit (Katalog No. D5325 & D5326) according to the manufacturer's recommendations. Our results indicated that global DNA methylation are stable in the first 27 hours in postmortem human psoas muscle tissue samples. According to the results, there was no significant correlation between global DNA methylation effect and PMI in the first 27 hours time-dependent postmortem. For this reason therefore, there is need for further comprehensive research on global DNA methylation in post mortem human muscle tissues in determining time of death.

Keywords: Epigenetics, DNA methylation, time of death, postmortem interval

KAYNAKLAR

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., & PILLAI, S. (2012). Basic immunology: functions and disorders of the immune system. *Elsevier Health Sciences*.
- AÇIKGÖZ, A. (2008). İnsan cesetleri üzerinden toplanan ento-molojik delillerle ölüm zamanı tayini. Doktora Tezi. AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Disiplinlerarası Adli Tıp AD, Adli Biyo-loji Programı. Ankara.
- AL-HERZ, W., BOUSFIHA, A., CASANOVA, J. L., CHATILA, T., CONLEY, M. E., CUNNINGHAM-RUNDLES, C., & KLEIN, C. (2014). Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Proceedings of ICI Milan 2013*, 164.
- AN, J. H., SHIN, K. J., YANG, W. I., & LEE, H. Y. (2012). Body fluid identification in forensics. *BMB reports*, 45(10), 545-553.
- ASANTE, S. (2013). Application Of Newton's Law Of Cooling Case Study: Estimation Of Time Of Death In Murder. Kwame Nkrumah University of Science and Technology.
- ATA, Ö. Y. (2009). Histon Deasetilaz İnhibitörleri ve Demetilize Edici Ajanlar. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Oncology Special Topics*, 2(1), 44-47.
- AYDOĞAN, F., & UYGUN, K. (2011). Kanser hastalarında palyatif tedaviler. *Klinik Gelişim*, 24(3), 4-9.
- BABU, S., BIRADAR, G., BAKKANNAVAR, S., KUMAR, P. G., & SHAILA, B. (2015). Estimation of time since death from nuclei changes of bone marrow cells. *Indian Journal of Forensic and Community Medicine*, 2(4), 198-202.
- BAUER, M., GRAMLICH, I., POLZIN, S., & PATZELT, D. (2003). Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study. *Legal medicine*, 5(4), 220-227.
- BENDER, O., ÇELEBİ, E., & ATALAY, A. (2016). RNA İnterferans ve Güncel Klinik Uygulamaları. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 36(1), 53-60.
- BIRD, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*, 16(1), 6-21.

- BISHOP, C. P. (2014). Document Title: Estimating Postmortem Interval: A Molecular Approach.
- BOCK, C., BEERMAN, I., LIEN, W. H., SMITH, Z. D., GU, H., BOYLE, P., ... & MEISSNER, A. (2012). DNA methylation dynamics during in vivo differentiation of blood and skin stem cells. *Molecular cell*, 47(4), 633-647.
- BOCKLANDT, S., LIN, W., SEHL, M. E., SÁNCHEZ, F. J., SINSHEIMER, J. S., HORVATH, S., & VILAIN, E. (2011). Epigenetic predictor of age. *PloS one*, 6(6), e14821.
- BODUR, E., & DEMIRPENÇE, E. (2010). Kodlamayan RNA'lar ve gen susturumu. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 41(8).
- BOKS, M. P., DERKS, E. M., WEISENBERGER, D. J., STRENGMAN, E., JANSON, E., SOMMER, I. E., & OPHOFF, R. A. (2009). The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PloS one*, 4(8), e6767.
- BRUNDAGE, A., & BYRD, J. H. (2016). Forensic Entomology in Animal Cruelty Cases. *Veterinary pathology*, 53(5), 898.
- CAN, M. I., & ASLAN, A. (2016). Epigenetic Mechanisms and Some Recent Studies. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 6(2), 445-452.
- CASTELLANOS-RIZALDOS, E., MILBURY, C. A., KARATZA, E., CHEN, C. C., MAKRIGIORGOS, G. M., & MEREWOOD, A. (2014). COLD-PCR amplification of bisulfite-converted DNA allows the enrichment and sequencing of rare un-methylated genomic regions. *PloS one*, 9(4), e94103.
- Cİ, W., & LIU, J. (2015). Programming and inheritance of parental DNA methylomes in vertebrates. *Physiology*, 30(1), 63-68.
- COLLINS, F. S., MORGAN, M., & PATRINOS, A. (2003). The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science*, 300 (5617), 286-290.
- Çağlayan, E., & Turan, K. (2014). Klotho geni, yaşlanma ve DNA metilasyonu.
- ÇEPPIOĞLU, S. K., & YURDUN, T. (2015). Adli Bilimlerde Epigenetik: Yeri ve Geleceği. *Türkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine-Special Topics*, 1(3), 38-47.
- DOKMANOVIC, M., CLARKE, C., & MARKS, P. A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Molecular cancer research*, 5(10), 981-989.

- ERDAL, M. E., & YILMAZ, Ş. G. (2016). mikroRNA Çalışmaları ve Psikiyatriye Yansıması. *Türkiye Klinikleri Journal of Psychiatry Special Topics*, 9(1), 16-24.
- ERNST, C., MCGOWAN, P. O., DELEVA, V., MEANEY, M. J., SZYF, M., & TURECKİ, G. (2008). The effects of pH on DNA methylation state: In vitro and post-mortem brain studies. *Journal of neuroscience methods*, 174(1), 123-125.
- FEINBERG AP, CUI H, OHLSSON R. DNA Methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Sem Canc Biol* 2002; 12: 389-98.
- FEINBERG AP, TYCKO B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 1-11.
- FISH, J. T., MILLER, L. S., BRASWELL, M. C., & WALLACE, E. W. (2013). Crime scene investigation. Routledge.
- FRAGA MF, BALLESTAR E, PAZ MF et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102(30), 10604–10609 (2005).
- FRAGOU, D., ZANOS, P., KOUIDOU, S., NJAU, S., KITCHEN, I., BAILEY, A., & KOVATSI, L. (2013). Effect of chronic heroin and cocaine administration on global DNA methylation in brain and liver. *Toxicology letters*, 218(3), 260-265.
- FRANKLIN, D. (2010). Forensic age estimation in human skeletal remains: current concepts and future directions. *Legal Medicine*, 12(1), 1-7.
- FRUMKIN, D., WASSERSTROM, A., BUDOWLE, B., & DAVIDSON, A. (2011). DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Science International: Genetics*, 5(5), 517-524.
- FRUMKIN, D., WASSERSTROM, A., DAVIDSON, A., AND GRAFIT, A. (2010). Authentication of forensic DNA samples. *Forensic science international Genetics* 4, 95-103.
- GOODALL, E. F., HEATH, P. R., BANDMANN, O., KIRBY, J., & SHAW, P. J. (2013). Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration.

- GORDON, L., JOO, J. E., POWELL, J. E., OLLIKAINEN, M., NOVAKOVIC, B., LI, X., ANDRONIKOS, R., CRUICKSHANK, M. N., CONNEELY, K. N., SMITH, A. K., et al. (2012). Neonatal DNA methylation profile in human twins is specified by a complex interplay between intrauterine environmental and genetic factors, subject to tissue-specific influence. *Genome research*, 22, 1395-1406.
- GREER, E. L., & SHI, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 343-357.
- GREGG, C., ZHANG, J., BUTLER, J. E., HAIG, D., & DULAC, C. (2010). Sex-specific parent-of-origin allelic expression in the mouse brain. *Science*, 329(5992), 682-685.
- GROSS, J. A., NAGY, C., LIN, L., BONNEIL, É., MAHEU, M., THIBAUT, P., ... & TURECKI, G. (2016). Global and Site-Specific Changes in 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine after Extended Post-mortem Interval. *Frontiers in genetics*, 7.
- GÜLER, C., & BALCI PEYNIRCIOĞLU, B. (2016). DNA metilasyonu ve hastalıklarla ilişkisi.
- GÜZELGÜL, F., & AKSOY, K. (2009). Kodlanmayan RNA'ların İşlevi ve Tıpta Kullanım Alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 18(3).
- HANCI, I., TÜZÜN, A., AÇIKGÖZ, N., BALSEVEN, A., & CANDAR, S. (2002). Adli Entomoloji. *Ankara: Emniyet Genel Müdürlüğü Asayiş Daire Başkanlığı Yayın No: 9*, 65.
- HIRSCHI, T., & GOTTFREDSON, M. (1983). Age and the explanation of crime. *American journal of sociology*, 89(3), 552-584.
- İZMİRLİ, M., TUFAN, T., & ALPTEKİN, D. (2012). DNA metilasyonu. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 21(4).
- KADER, F., & GHAİ, M. (2015). DNA methylation and application in forensic sciences. *Forensic science international*, 249, 255-265.
- KANHERKAR, R. R., BHATIA-DEY, N., & CSOKA, A. B. (2014). Epigenetics across the human lifespan. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2, 49.
- KANZLEITER, T., JÄHNERT, M., SCHULZE, G., SELBIG, J., HALLAHAN, N., SCHWENK, R. W., & SCHÜRMANN, A. (2015). Exercise training alters DNA methylation patterns in genes related to muscle growth and differentiation in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 308(10), E912-E920.

- KARAN, M. A., & TUFAN, F. (2010). Yaşlanma mekanizmaları. *Ege Tıp Dergisi*, 49(10).
- KINDE, B., WU, D. Y., GREENBERG, M. E., & GABEL, H. W. (2016). DNA methylation in the gene body influences MeCP2-mediated gene repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201618737.
- KUO, M. H., & ALLIS, C. D. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays*, 20(8), 615-626.
- KURDYUKOV, S., & BULLOCK, M. (2016). DNA methylation analysis: choosing the right method. *Biology*, 5(1), 3.
- KUSHWAHA, V., YADAV, M., SRIVASTAVA, A. K., & AGARWAL, A. (2010). Time since death from degenerative changes in the Kidney.
- KÜÇÜKOĞLU, K. (2013). Histonların Asetilasyonu ve Histon Deasetilaz İnhibitörleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Pharmacy Sciences*, 2(2), 55-73
- LADD-ACOSTA, C., HANSEN, K. D., BRIEM, E., FALLIN, M. D., KAUFMANN, W. E., & FEINBERG, A. P. (2014). Common DNA methylation alterations in multiple brain regions in autism. *Molecular psychiatry*, 19(8), 862-871.
- LAZARUS, J., MATHER, K. A., THALAMUTHU, A., & KWOK, J. B. (2015). Genetic factors and epigenetic mechanisms of longevity: current perspectives.
- LEE, H. Y., AN, J. H., JUNG, S. E., OH, Y. N., LEE, E. Y., CHOI, A., ... & SHIN, K. J. (2015). Genome-wide methylation profiling and a multiplex construction for the identification of body fluids using epigenetic markers. *Forensic Science International: Genetics*, 17, 17-24.
- LEE, H. Y., JUNG, S. E., LEE, E. H., YANG, W. I., & SHIN, K. J. (2016). DNA methylation profiling for a confirmatory test for blood, saliva, semen, vaginal fluid and menstrual blood. *Forensic Science International: Genetics*, 24, 75-82.
- LEVESQUE, M. L., CASEY, K. F., SZYF, M., ISMAYLOVA, E., LY, V., VERNER, M. P., SUDERMAN, M., BRENDGEN, M., VITARÓ, F., D'IONNE, G., et al. (2014). Genome-wide DNA methylation variability in adolescent monozygotic twins followed since birth. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 9, 1410-1421.

- LISANTI, S., OMAR, W. A., TOMASZEWSKI, B., DE PRINS, S., JACOBS, G., KOPPEN, G., ... & LANGÏE, S. A. (2013). Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. *PLoS One*, 8(11), e79044.
- LÖVKVIST, C., DODD, I. B., SNEPPEN, K., & HAERTER, J. O. (2016). DNA methylation in human epigenomes depends on local topology of CpG sites. *Nucleic acids research*, gkw124.
- MADRIGANO, J., BACCARELLI, A. A., MITTLEMAN, M. A., SPARROW, D., VOKONAS, P. S., TARANTINI, L., & SCHWARTZ, J. (2012). Aging and epigenetics: longitudinal changes in gene-specific DNA methylation. *Epigenetics*, 7(1), 63-70.
- MAHALAKSHMI, V., GURURAJ, N., SATHYA, R., SABARINATH, T. R., SIVAPATHASUNDHARAM, B., & KALAISELVAN, S. (2016). Assessment of histological changes in antemortem gingival tissues fixed at various time intervals: A method of estimation of postmortem interval. *Journal of forensic dental sciences*, 8(2), 114.
- MAHAPATRA, S., KLEE, E. W., YOUNG, C. Y., SUN, Z., JIMENEZ, R. E., KLEE, G. G., ... & DONKENA, K. V. (2012). Global methylation profiling for risk prediction of prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(10), 2882-2895.
- MCKIGHT, P. E., & NAJAB, J. (2010). Kruskal-Wallis Test. Corsini Encyclopedia of Psychology.
- MOISON, C., GUIEYSSE-PEUGEOT, A. L., & ARIMONDO, P. B. (2014). Deep Insight Section. <http://AtlasGeneticsOncology.org>, 285.
- NOHARA, K., BABA, T., MURAI, H., KOBAYASHI, Y., SUZUKI, T., TATEISHI, Y., & SANO, T. (2011). Global DNA methylation in the mouse liver is affected by methyl deficiency and arsenic in a sex-dependent manner. *Archives of toxicology*, 85(6), 653-661.
- OAKS, Z., & PERL, A. (2014). Metabolic control of the epigenome in systemic Lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 47(4), 256-264.
- PARHAM, P. (2014). The immune system. Garland Science.
- RHEIN, M., HAGEMEIERS, L., KLINTSCHAR, M., MUSCHLER, M., BLEICH, S., & FRIELING, H. (2015). DNA methylation results depend on DNA integrity—role of post mortem interval. *Frontiers in genetics*, 6, 182.
- RODRÍGUEZ-RODERO, S., FERNÁNDEZ-MORERA, J. L., MENÉNDEZ-TORRE, E., CALVANESE, V., FERNÁNDEZ, A. F., & FRAGA, M. F. (2014). Aging genetics and aging. *Aging and disease*, 2(3), 186-195.

- ROTILI, D., & MAI, A. (2011). Targeting histone demethylases: a new avenue for the fight against cancer. *Genes & cancer*, 2(6), 663-679.
- SALLY ROBERTSON (2015). What is DNA Methylation? Erişim Adresi: <http://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-DNA-Methylation.aspx>. 10.07.2016
- SAMPAIO-SILVA, F., MAGALHÃES, T., CARVALHO, F., DINIS-OLIVEIRA, R. J., & SILVESTRE, R. (2013). Profiling of RNA degradation for estimation of post mortem interval. *PLoS One*, 8(2), e56507.
- SAWAN, C., VAISSIÈRE, T., MURR, R., & HERCEG, Z. (2008). Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 642(1), 1-13.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D., & JEMAL, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(1), 7-30.
- SINGAL, R., GINDER, G.D. (1999). DNA methylation. *Blood*, 15;93(12), 4059-70.
- STEWART, B., & WILD, C. P. (2016). World cancer report 2014. World.
- SWIFT, BENJAMIN. "The timing of death." *Essentials of autopsy practice*. Springer London, 2006. 189-214.
- TAN, Q., CHRISTIANSEN, L., THOMASSEN, M., KRUSE, T. A., & CHRISTENSEN, K. (2013). Twins for epigenetic studies of human aging and development. *Ageing research reviews*, 12(1), 182-187.
- TOLOU-GHAMARI, Z. (2016). Investigation of final causes of death in 5360 deceased patients within a teaching hospital in Isfahan, Iran. *American Journal of Experimental and Clinical Research*, 3(2), 161-164.
- TÜRKİYE İSTATİSTİK KURUMU (2016). Ölüm nedeni istatistikleri. Erişim Adresi: [http://www.tuik.gov.tr/basinOdasi/haberler/2016_41_20160331.pdf] Erişim Tarihi: 23.01.2017.
- TÜRKİYE İSTATİSTİK KURUMU (2015). Ölüm istatistikleri. Erişim Adresi: [<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=21522>] Erişim Tarihi: 15.11.2016.
- VASS, A., FLEMING, R., HARBISON, S., CURRAN, J., & WILLIAMS, E. (2013). Evaluating the Use of DNA and RNA Degradation for Estimating the Post-Mortem Interval.

- VENTER, J. C., ADAMS, M. D., MYERS, E. W., LI, P. W., MURAL, R. J., SUTTON, G. G., & GOCCAYNE, J. D. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), 1304-1351.
- VIDAKI, A., DANIEL, B., & COURT, D. S. (2013). Forensic DNA methylation profiling—Potential opportunities and challenges. *Forensic Science International: Genetics*, 7(5), 499-507.
- VIRKLER, K., & LEDNEV, I. K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*, 188(1), 1-17.
- WANG, L., ZHANG, J., DUAN, J., GAO, X., ZHU, W., LU, X., ... & LI, W. (2014). Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell*, 157(4), 979-991.
- WANG, L., ZHANG, J., DUAN, J., GAO, X., ZHU, W., LU, X., ... & LI, W. (2014). Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell*, 157(4), 979-991.
- WEIDNER, C. I., LIN, Q., KOCH, C. M., EISELE, L., BEIER, F., ZIEGLER, P., BAUERSCHLAG, D. O., JOCKEL, K. H., ERBEL, R., MUHLEISEN, T. W., et al. (2014). Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome biology* 15, R24.
- WOOD, A., & SHILATIFARD, A. (2004). Posttranslational modifications of histones by methylation. *Advances in protein chemistry*, 67, 201-222.
- XU, C., QU, H., WANG, G., XIE, B., SHI, Y., YANG, Y., ... & FENG, L. (2015). A novel strategy for forensic age prediction by DNA methylation and support vector regression model. *Scientific reports*, 5, 17788.
- YOUNG, S. T., WELLS, J. D., HOBBS, G. R., & BISHOP, C. P. (2013). Estimating postmortem interval using RNA degradation and morphological changes in tooth pulp. *Forensic science international*, 229(1), 163-e1.
- ZAKHARI, S. (2013). Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res*, 35(1), 6-16.
- ZHAO, G., YANG, Q., HUANG, D., YU, C., YANG, R., CHEN, H., & MEI, K. (2005). Study on the application of parent-of-origin specific DNA methylation markers to forensic genetics. *Forensic science international*, 154(2), 122-127.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Post-mortem Ölüm Zamanı Tayininde DNA Metilasyonunun Etkinliği ve Hücre Dışı Matriks Elemanlarının Rolü
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	28.04.2016 M. Melli

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Aslıhan AVCI			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Metodolojik Araştırma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

M. Melli

A.U.T.F.
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
ASLI BOZER

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Post-mortem Ölüm Zamanı Tayininde DNA Metilasyonunun Etkinliği ve Hücre Dışı Matriks Elemanlarının Rolü
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	28.04.2016 M. Melli

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BİYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 07-308-16	Tarih: 11 Nisan 2016		
Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M. Melli
Prof.Dr.İrfan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M. Melli
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M. Melli
Prof.Dr.Seher DEMİRER	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☒	Derste
Prof.Dr.Şule ŞENGÜL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M. Melli
Prof.Dr.İnci İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M. Melli
Prof.Dr.Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M. Melli
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☒	12 Nisan
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	12 Nisan
Doç.Dr.Süha YAĞCIOĞLU	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	12 Nisan
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☒	12 Nisan
Doç.Dr.Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☒	Derste
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M. Melli
Uz.Dr.Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M. Melli
Mühübe SUTAY	İşletme	-	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M. Melli

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

T. C.
ADALET BAKANLIğI
Adli Tıp Kurumu Başkanlığı

Sayı : 21589509/ **246**
Konu: Bilimsel Çalışma

07/06/2016

Sayın, Prof. Dr. Aslıhan AVCI

“Post-mortem Ölüm Zamanı Tayininde DNA Metilasyonunun Etkinliği ve Hücre Dışı Matriks elemanlarının Rolü” isimli çalışma öneriniz, 07/06/2016 tarihli Eğitim ve Bilimsel Araştırma Komisyonu toplantısında görüşölmüş ve kabul edilmiştir.

Bilginize rica ederim.


Doç. Dr. Yalçın BÜYÜK
Başkan

ÖZGEÇMİŞ

1. BİREYSEL BİLGİLER

Adı : Abdoulskarim
Soyadı : UZABAKIRIHO
Cinsiyet : Erkek
Uyruğu : RUANDA
Doğum Tarihi : 20.07. 1987
Pasaport No : PC180603
T.C No : 99904439344
Telefon : +905535419480
E-mail : abuzabak@yahoo.com
Medeni Hali : Bekar

2. EĞİTİM BİLGİLER

Derece	BÖLÜM/PROGRAM	OKUL/ÜNİVERSİTESİ	YIL
İlkokul	-	Juru Primary School	1994 – 2000
Lise	- Biyokimya	- Kayonza Modern Secondary School - Groupe Scolaire Gahini	2000 – 2003 2004-2006
Lisans	Uygulamalı Biyoloji (Biyoteknoloji Opsiyon)	Kigali Institute of Science and Technology (KIST)	2009-2012
-	Türk dili (Türkçe)	Ankara University TÖMER	2013-2014
Yüksek Lisans	Disiplinlerarası Adli Bilimler (Adli Biyoloji)	Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Adli Bilimler Enstitüsü/ Ankara University	2014-2017
	Yüksek Lisans Tezi Başlığı ve Danışman		
Postmortem Ölüm zaman Tayininde DNA metilasyonunun etkinliği (Danışman: Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU)			
	Lisans Tezi Başlığı ve Danışman		
Antibacterial activity of <i>Tagetes mimuta</i> plant leaves extracts (Danışman: Ass. Prof. Antoine NSABIMANA)			

3. EK EĞİTİM

EĞİTİM	Olduğu yeri	Yıl
Yasama Bilgilendirme Eğitimi	Türkiye Büyük Millet Meclisi (TBMM)/ Ankara	07-09/10/ 2015
Laboratuvar güvenliği, DNA izolation ve Agaroz elektroforez	Biyoteknoloji Laboratuvar/Ankara Universitesi-Tandoğan Kampus	2013 (1 Week)
Laboratuvar güvenliği, Örnek toplama, Laboratuvar Teknikler ve yöntemler (Mikrobiyoloji, Parazitoloji, Biyokimya, Seroloji ve Hematoloji)	C.H.U.B (Butare University Teaching Hospital) Laboratory/RWANDA	2011 (10 Weeks)
Liderlik eğitimi	Masaka, Kigali city/ RWANDA	2009 (3 Days)
Computer eğitimi	Centre Informatique Hello World (C.I.H), Kigali-RWANDA	2008 (5 Weeks)
Liderlik ve Askerlik eğitimi	Nkumba, Northern Province/ RWANDA	2008

4. DİL BECERİLER

Dil	Kinyarwanda	İngilizce	Fransızca	Swahili	Türkçe
Yazma	Mükemmel	Mükemmel	Mükemmel	Orta Düzey	İleri Düzey
Konuşma	Mükemmel	Çok iyi	Çok iyi	İyi	iyi

5. BİLGİSAYAR BECERİLERİ

Program	Düzey
Ms Word	İleri Düzey
Ms Excel	İleri Düzey
Ms PowerPoint	İleri Düzey
Ms Publisher	İleri Düzey

6. İŞ DENEYİMLERİ

Görevleri	İş Yeri	Yıl
Öğretmen	Nyamiyaga Primary School	2007- 2008
Treasurer (Saymanı)	CEM/ KIST-KHI (Muslim Students Communalities of Kigali Institute of Science and Technology - Kigali Health Institute)	2010 - 2011
Treasurer (Saymanı)	FCEMR (Forum of Muslim Students Communalities in Rwanda)	2011- 2012
TF (Task-Force) KIST- Öğrenciler Disiplin Kurulu Başkanı	KIST(Kigali Institute of Science and Technology)	2011 - 2012
Safety Officer [Health, Safety and Environment (HSE)]	VEKSONS RWANDA Ltd	2012- 2013

7. ULUSLARARASI DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

ABDULKARIM UZABAKIRIHO (2015). The role of Forensic science in Criminal investigation in Rwanda” *Research Journal of Forensic Sciences*. Vol. 3(5), 1-4.

ABDOULKARIM UZABAKIRIHO (2015). The Investigation of the Causes and Manner of Infant Mortality in Forensic Casework. *International Journal of Novel Research in Life Sciences*. Vol. 2, Issue 3, pp: (10-15).

ABDOULKARIM UZABAKIRIHO, ANTOINE NSABIMANA, OMAR SINAYOBYE & SYLVESTRE HABIMANA (2015). “Antibacterial Effects of *Tagetes Minuta* Plant Extracts Against *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus* in Rwanda. *International Journal of Novel Research in Life Sciences* Vol. 2, Issue 2, pp: (44-48).

8. ULUSLARARASI KONGRELER

29-30/ 05/ 2016: 2nd International Congress and Workshop of Forensic Toxicology, Ankara-TURKEY. Sunulan konu başlığı: “Effects of Drug Abuse and Drug Trafficking among the Youth in East African Community (EAC)”

27-28/ 11/ 2014: 1st International Forensic Biology & Genetics Congress, Ankara-Turkey. Sunulan konu başlığı: “Forensic Science in Rwanda”

29– 30/ 11/ 2014: 1st International Congress and Workshop of Forensic Toxicology, Ankara TURKEY. Poster konusu:“Traditional medicine: Antibacterial Activity of *Tagetes minuta* Plant Extracts”

20-21/09/ 2014: Ulusal Felaket Kurbanlarının Kimliklendirilmesi Kongresi, Ankara–TURKEY.

17-19/10/ 2014: Ulusal Tıp Günleri, Kastamonu-Turkey