

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ  
FEN BİLİMLER ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı: Y. Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU**

**BİYOLOJİK ÖRNEKLERİN TELOMER  
KISALMASINA BAĞLI YAŞ TAYİNİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Neşe GÜLÜM  
Moleküler Biyolog**

**İstanbul-2013**

## **TEŞEKKÜR**

*Yüksek lisans tezimin gerçekleşmesinde katkıda bulunan İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. İmdat ELMAS ve Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı değerli hocamız Prof. Dr. Salih CENGİZ' e, çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleriyle benimle paylaşan ve karşılaştığım tüm sorunların çözümünde deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU'na, bilgi ve deneyimleriyle tezime katkıda bulunan Mesut YEŞİL ve Hüseyin Avni TAÇ'a, ekipman kullanımı yardımlarından dolayı MEMORİAL SAĞLIK HİZMETLERİ A.Ş.'ye, çalışmam boyunca bana verdiği moral ve destek için sevgili eşim Süleyman GÜLÜM'e ve sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili aileme,*

*Teşekkür ederim...*

*Neşe GÜLÜM*

Bu tez çalışması 10265 proje numarasıyla İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

**Kısaltmalar:**

A	Adenin
ALFIE	Etnik köken alel frekansı (Allele Frequency For the Inference of Ethnicity)
AMPFLP	Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
Ark	Arkadaşları
ATP	Adenozin trifosfat
bç	Baz çifti
C	Sitozin
Ct	Eşik-değer döngü sayısı (Cycle threshold)
CDK	Sikline bağlı kinaz (Cyclin Dependent Kinase)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonukleotit tri fosfat
dsDNA	Çift sarmallı Deoksiribonükleik asit (Double Strand DNA)
EDTA	Etilenediaminotetra asetik asid
G	Guanin
HPV	Human Papilloma Virüs
İns	İnsersiyon
kb	Kilo baz
M	Molarite

$\mu$ l	Mikrolitre
mini-STR	Mini -kısa ardışık tekrar (Short Tandem Repeat)
mRNA	Messenger RNA
mtDNA	Mitokondriyal DNA
ng	Nanogram
nucDNA	Çekirdek DNA'sı
OD	Optik dansite
Ort	Ortalama
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
p53	Protein 53 veya tümör protein 53
pRb	Protein retinoblastinoma
R <sup>2</sup>	Belirtme katsayısı (korelasyon katsayısının karesi)
Real-Time PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time Polymerase chain reaction)
RNA	Ribonükleik Asit
ROX	Carboxy-X-rhodamine
Rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
rRNA	Ribozomal RNA
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
ssDNA	Tek zincirli DNA (Single-Stranded DNA)

STR	Mikrosatelit (Short tandem repeat)
T	Timin
TRF	Sonlandırıcı restriksiyon parçası (Terminal Restriksiyon Fragman)
TRF1	Telomerik tekrar bağlayıcı faktör 1 (Telomeric Repeat Binding Factor 1)
TRF2	Telomerik tekrar bağlayıcı faktör 2 (Telomeric Repeat Binding Factor 2)
UV	Ultraviyole
V	Volt
VNTR	Minisatelit-değişken sayıda ardışık tekrar dizini (Variable Number Tandem of Repeat)

## İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR: .....	II
ŞEKİL LİSTESİ .....	IX
TABLO LİSTESİ .....	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Adli genetik çalışmaların tarihçesi .....	3
2.2 Biyolojik kanıtlardan kişilerin fiziksel özelliklerinin tahmini .....	4
2.2.1 Fiziksel karakter tahmini ve biyolojik soy testleri .....	4
2.2.2 Yaş tahmini .....	5
2.2.3 Moleküler düzeyde yaşlanma .....	6
2.3 Telomer hipotezi .....	7
2.3.1 Kromozomların temel yapısı .....	7
2.3.2 Kromozomların yapısı ve sınıflandırılması.....	8
2.3.3 Kromozom morfolojisi .....	8
2.4 Telomerin yapısal ve fonksiyonel önemi .....	10
2.4.1 Telomerlerin yapısı .....	10
2.4.2 Telomerlerin fonksiyonu .....	12
2.4.3 Telomerler ve kromozom uzunluğu .....	13
2.4.4 Telomer uzunluğu ve telomerazın kontrolü .....	13

2.4.5	Telomer kısalmasının hücre yaşlanmasındaki önemi.....	15
2.4.6	Replikatif yaşlanma ve telomer kısalması.....	16
2.4.7	Telomer uzunluklarını etkileyen faktörler.....	18
2.5	PCR ( Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	18
2.5.1	Eşzamanlı 'Real Time' PCR .....	19
2.5.2	Real Time PCR'ın genel kullanım alanları .....	19
2.5.3	Real Time PCR avantajları.....	20
2.5.4	Real-Time PCR'da kullanılan prob sistemleri ve boyaları .....	20
2.5.5	SYBR Green I boyasına dayalı Real-Time PCR sistemleri .....	21
2.5.6	Real-time PCR'da ürün miktarını saptanması.....	22
2.5.7	Göreceli kantitasyon hesaplamaları ve karşılaştırmalı Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) metodu.....	22
2.6	Telomer uzunluğunun ölçülmesi .....	24
2.6.1	Telomer uzunluğunun ölçülmesinde Sonlandırıcı Enzim Kesim (Terminal Restriksiyon fragman, TRF) analizinin kullanılması .....	24
2.6.2	Telomer uzunluğunun ölçülmesinde Real-Time PCR'ın kullanılması .....	24
2.7	İstatistiksel analiz .....	27
2.7.1	Ki-Kare dağılımı .....	27
2.7.2	Ki-Kare uygunluk testi .....	28
2.7.3	Kolmogorov-Simironov testi.....	28
2.7.4	Belirtme katsayısı $R^2$ .....	28
2.7.5	Basit doğrusal regresyon analizi .....	29

3.	GEREÇ VE YÖNTEM .....	30
3.1	Çalışmada kullanılan kimyasallar ve cihazlar .....	30
3.1.1	Çalışma planı.....	31
3.2	DNA örneklerinin toplanması .....	32
3.3	Örneklerden DNA izolasyonu .....	32
3.4	DNA miktarının ve saflığının ölçülmesi .....	32
3.5	Primerlerin hazırlanması .....	33
3.6	PCR optimizasyonu.....	33
3.7	Standart eğrinin oluşturulması .....	35
3.8	Tüm örneklerin Real-Time PCR çalışması .....	36
3.9	Real-Time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi.....	37
3.10	Sonuçların karşılaştırmalı Ct değerlendirmesi .....	37
3.11	İstatistiksel değerlendirme.....	38
4.	BULGULAR .....	39
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	56
6.	ÖZET.....	62
7.	SUMMARY .....	63
	EKLER .....	69
	Ek 1. DNA izolasyon Prosedürleri .....	69
	QIAamp® DNA Mini Kit ile Kandan DNA İzolasyonu.....	69



BuccalAmp™ Epicentre DNA Kit ile Ağız İçi Sürüntü (buccal swab) Örneklerinden DNA İzolasyonu .....	70
Ek 2. Dikey PAGE elektroforez prosedürü .....	71
Ek 3. Bilgilendirilmiş olur formu .....	72
ÖZGEÇMİŞ .....	73

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: a. Sağlıklı bir bireyin XY karyotipi	b. kromozom bölgeleri.....	9
Şekil 2: Telomer saç tokası yapısı.....		11
Şekil 3: Memeli hücresindeki telomer yapısı, telomer tekrarları, subtelomerler ve G iplikçığının yapısı.....		12
Şekil 4: Embriyonik kök hücre ile erişkin kök hücre arasındaki telomer ve telomeraz farkı...		14
Şekil 5: a) TRF1 ve TRF2 proteinlerin telomer saç tokasına bağlanma şekli.....		15
Şekil 6: Telomer kısalması ve hücrenin yaşlanma evreleri.....		17
Şekil 7: Floresan işaretli problemlerin bağlanma şekilleri.....		21
Şekil 8: a) tel 1 ve tel 2 primerlerinin genomik DNA'daki bağlanma (annealing) şekli.....		25
Şekil 9: Corbett Rotor Gene 6000 cihazında iki adımlı PCR programının ayarlanması.....		36
Şekil 10: Kandan izole edilen DNA'ların %8'lik PAGE görüntüsü.....		39
Şekil 11: Ağız içi sürüntü örneklerinden izole edilen DNA'ların %8'lik PAGE görüntüsü...		40
Şekil 12: PCR optimizasyonu sonucu elde edilen ürünlerinin %8'lik PAGE görüntüsü.....		41
Şekil 13: Telomer bölgesine ait standart eğri.....		42
Şekil 14: 36B4 bölgesine ait standart eğri.....		42
Şekil 15: Bir set çalışma sonucu telomer bölgesi için elde edilen Real-Time PCR ham veri grafiği.....		43
Şekil 16: Bir set çalışma sonucu telomer bölgesi için elde edilen kantifikasyon sonuçları....		43
Şekil 17: Bir set çalışma sonucu 36B4 bölgesi için elde edilen Real-Time PCR ham veri grafiği.....		43

Şekil 18: Bir set çalışma sonucu 36B4 bölgesi için elde edilen kantifikasyon sonuçları.....	44
Şekil 19: Katılımcıların yaş ve cinsiyet dağılımı.....	45
Şekil 20: Cawthon'un denklemine göre elde edilen bağlı $\Delta\Delta Ct$ dağılımı.....	54
Şekil 21: Hewakapuge'nin bağlı telomer uzunluğunun gerçek yaşlara karşı grafik dağılımı..	55

**TABLO LİSTESİ**

Tablo 1. PCR’da kullanılan Primer dizileri ve 100 $\mu$ M’lik stok çözeltinin hazırlanması.....	33
Tablo 2. Rotor-Gene® SYBR Green ® PCR bileşenleri .....	34
Tablo 3. PCR döngü programı .....	34
Tablo 4. K562 Yüksek Moleküler Ağırlıklı DNA ‘nın seyreltme faktörü tablosu .....	35
Tablo 5. Kan ve ağız içi sürüntü örneklerinden elde edilen en düşük ve en yüksek DNA miktarları .....	39
Tablo 6. Tüm örneklerden elde edilen veri tablosu.....	46

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

DNA analizi ile kimlik tespiti tüm dünyada yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Suç failini tespit etmek için ister olay yerinden ister mağdur üzerinde bulunan ve kime ait olduğu bilinmeyen biyolojik örneklerden mümkün olduğunca çok bilgiye ulaşılmaya çalışılır. Olay ile ilgili şüpheli bulunduğu zaman kıyaslama yapılabilmektedir. Fakat şüpheli bulunmadığında olay çözümsüz kalmaktadır. Bunun için biyolojik delillerden ne kadar çok bilgi edinilebilirse faile ulaşmak da o derece kolay olur. Moleküler biyoloji alanında sağlanan gelişmelerin adli bilimlerde uygulanmasıyla, biyolojik örneklerin tanımlanması maksimum düzeye ulaşmaktadır. Adli bilimciler delilden suçluya ulaşmada her geçen gün yeni bilgiler edinme çabasındadırlar(1,2).

Kimliklendirmede son 20 yıldır kısa ardışık tekrar dizisi içeren bölgeler (STR- Short Tandem Repeat) kullanılmaktadır. Bu sistemlerle kişinin DNA profili ve cinsiyeti tayin edilebilmektedir. Biyolojik örnekten kişinin fiziksel görüntüsü ile ilgili fikir edinilebilirse faile ulaşmak çok daha kolay olacaktır. Son dönemlerde SNP belirteçleri (markırları) ile kişinin saç, göz ve ten rengi belirlenebilmektedir (1). Bu bilgilere ek olarak biyolojik örnekten kişinin yaşının belirlenebilmesi kimlik tespitinde ve failin bulunmasında büyük katkı sağlayacaktır.

Geçmişten günümüze kadar yapılan araştırmalar sonucunda, hücre yaşlanmasında telomerlerin etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Yaşlanma multifaktöryel ve çok değişken olmasına rağmen biyolojik yaşlanmada telomer uzunluğu belirteç (marker) olarak kullanılabilir (2). Telomerler, protein ve DNA dan yapılmış olup kromozom bütünlüğünün kontrolünde etkilidirler. Bu yapılar DNA'yı kırılmalardan, parçalanmalardan ve istenmeyen kromozom uçlarının birleşmesinden korur. Ayrıca kromatin organizasyonunda replikasyon ve hücre bölünmesinde çok önemli görevleri bulunmaktadır (1, 2).

Telomerler insan kromozomlarının uçlarında bulunan TTAGGG tekrarlarından oluşan yapılar olup, her hücre bölünmesinde bu tekrarların sayıları azalmaktadır. Telomerlerin bu özelliğinden yararlanarak kişilerin biyolojik ve kronolojik yaşın belirlenmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir (1,3).

Telomerlere bağlı yaş tahmini yapabilmek için toplumlara özgü standart sapma ve indeks bilgileri gereklidir. Bugüne kadar Amerika, Japonya ve İsveç'te telomerlere bağlı yaş

tahmini çalışmaları yapılmış ve toplumlarına zu standart sapma ve indeks bilgileri saptanmıştır (1). Ancak lkemizde bu konuyla ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu tez çalışmasında DNA'nın telomer bölgelerinin analizi yapılarak biyolojik örneklerden (kan ve ağız içi sürüntüsü) kişilerin yaşlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Adli genetik çalışmaların tarihçesi

Olay yerinde çok farklı biyolojik örnek bulunabilmektedir. DNA, her çekirdekli hücrede bulunmaktadır ve olay yerine bırakılan herhangi bir biyolojik (sigara izmariti, kepek, parmak izi, sakız, tıraş bıçağı gibi) delilden elde edilebilmektedir. Moleküler genetik alanda gerçekleştirilen ilerlemeler, polimorfik özelliklerin direkt olarak DNA düzeyinde incelenmesine olanak tanımıştır (1,2). İnsan genomunda bulunan yaklaşık 3 milyar baz çifti (bç), her biri farklı lokuslarda yer alan 50 000-100 000 geni kodlamaktadır. Genlerin çoğu “alel” olarak adlandırılan birkaç farklı formda bulunabilmektedir. Bu şekilde polimorfizm gösteren bir gen için her birey biri anneden diğeri babadan aktarılan iki farklı alel taşıyabilirken bir popülasyonda aynı gen için çok sayıda alel bulunabilmektedir. Bu polimorfizm adli amaçlı DNA analizlerinin temelini oluşturur ( 3, 4, 5).

DNA'nın adli kullanımı ilk defa 1985 yılında Alec Jeffrey tarafından keşfedilmiştir (1, 6, 7). Jeffrey farklı sayıda ardışık tekrar eden dizileri (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) DNA'da kodlanmayan bölgelerde bulunduğunu ve bireyler arasında yüksek ayırım gücüne sahip olduğunu göstermiştir. Bu özelliklere dayanarak Jeffrey çoklu lokus (multi-locus) problemlerinin kullanıldığı DNA parmak izi yöntemini (DNA fingerprinting) keşfetmiş ve geliştirmiştir. Bu yöntem ile bireye özgü DNA profili elde edilmektedir. Popülasyondan rastgele seçilen iki kişinin (tek yumurta ikizleri hariç) aynı DNA profiline sahip olma olasılığının teorik olarak 1/30 milyar olduğunu bildirilmiştir (5). Ancak yöntemin çok zahmetli ve uzun sürmesi ayrıca 30'dan fazla DNA bantının değerlendirilmesindeki güçlükler nedeniyle bu teknik çok kısa bir süre için kullanılmış ve yerini tekli lokus problemlerinin kullanıldığı DNA profilleme yöntemi almıştır (5, 6, 7).

Kary Mullis ve ark. tarafından 1986 yılında tanımlanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR-Polimerase Chain Reaction) ile çok küçük miktarlardaki biyolojik materyallerden DNA analizi yapma imkanı sağlanmıştır. PCR tekniği, adli bilimler alanında bir çığır açmıştır. Adli serolojide ilk PCR'ye dayalı yöntem, çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizminde (Amplified Fragment Length Polymorphism- AMPFLP) uygulanmıştır. Daha önce olay yerinde bulunan ve kullanılmayan biyolojik deliller (kıl, sperm, sigara izmariti vb.) bu yöntemle analiz edilebilmiştir ( 7, 8, 9). Yöntemin dezavantajı iyi kalitede (parçalanmamış) ve

fazla miktarda (300-500 ng) DNA'ya gereksinim duymasdır. Ancak adli örnekler her zaman analiz için yeterli miktarda ve kalitede DNA içermeyebilirler ( 5, 6, 7).

Devam eden çalışmalarla, STR lokuslarının PCR ile çoğaltılarak incelenebileceğinin gösterilmesi adli amaçlı DNA analizinde yeni bir dönemin açılmasına neden olmuştur. Genomda sayılarının fazla olması, yüksek oranda polimorfizm göstermeleri ve inceleme kolaylığı STR'lerin adli çalışmalarda ideal genetik işaretler olmasını sağlamıştır. Günümüzde adli DNA analizlerinde hazır ticari kitleri kullanılmaktadırlar. Bu kitler ile otozomal STR multipleks (tek tüp içerisinde çoklu lokus çoğaltma) amplifikasyonu yapılmaktadır. Bu yöntemle göre iki kişinin aynı profile sahip olma olasılığı  $3 \times 10^{-11}$  ile  $5 \times 10^{-19}$  arasında değişmektedir (9).

## **2.2 Biyolojik kanıtlardan kişilerin fiziksel özelliklerinin tahmini**

Adli vakalarda olay yerinde bulunan biyolojik örneklerden genetik kimliklendirme yapılarak suçluya ulaşılabilmektedir. Olay ile ilgili şüpheli bulunduğu zaman kıyaslama yapılabilirken, şüpheli bulunmadığı vakalarda şahitlerin ifadeleri alınarak şüphelinin fiziksel özellikleri hakkında bilgi edinilmektedir. Bu özellikler örneğin, cinsiyet, boy, kilo, saç rengi vb. özelliklere dayanarak şüpheliye ulaşılmaya çalışılmaktadır. Ancak bu fiziksel özellikler, uzun süren araştırmalarda anlamını yitirir. Çünkü zamanla şüphelinin saç rengi, şekli ve kilosu gibi özellikleri değişebilmektedir. Delilden DNA profili ile birlikte yeni geliştirilen DNA analizleri ile kişinin deri ve göz renginin de belirlenebilmesi, kişiyi tahmin etmede çok büyük avantaj sağlamaktadır (6, 10).

### **2.2.1 Fiziksel karakter tahmini ve biyolojik soy testleri**

Cinsiyet, temel fiziksel özelliklerden biridir ve DNA tipleme yöntemleri ile belirlenebilmektedir. Eşey kromozomlarının üzerinde bulunan amelogenin lokusu analizi ile yapılmaktadır. Son dönemlerde soy tahmini ve diğer fiziksel karakterlerin belirlenebilmesi için birçok araştırma yapılmaktadır. Bunlardan bazıları etnik köken tahmini, göz, saç ve deri renginin tahminine dayanmaktadır. Etnik köken analizleri, 6 farklı lokusun analizi ile yapılmaktadır. Analizde elde edilen STR lokuslarının sonuçları daha sonra etnik köken alel frekansını belirleyen (Allele Frequency For the Inference of Ethnicity, ALFIE) bir yazılım ile belirlenmektedir (1, 6, 10).



Günümüzde göz rengi ve biyolojik kökenini tahmin edebilmek için geliştirilmiş hazır ticari kitler bulunmaktadır. Bu kitlerden biri DNAWitness™ 2.5 'tir. Bu kit ile DNA üzerinde bulunan ve etnik köken ile ilgili bilgi veren belirteçler (informative marker) analiz edilerek kişinin Afrika, Kızılderili, Doğu Asya veya Avrupa'dan geldiği tahmin edilebilmektedir. Son zamanlarda aynı şirketin geliştirdiği Avrupa DNA 2.0 denilen yeni kiti ise bir bireyin Avrupa alt soyunu (Güney Doğu Avrupa, İber, Bask, Avrupa ve Kuzey Doğu Avrupa) tahmin etmenin mümkün olduğunu belirtmektedir. Bu kit, 1349 bilgilendirici belirteç kullanılarak geliştirilmiştir. Ayrıca aynı şirketin çıkardığı RETINOME™ adında diğer bir kit ise iris rengini belirlemek üzere geliştirilmiştir (1, 6, 10, 11).

İnsanlardaki birçok fiziksel özellik bir gen veya birkaç genin kombine ifadesi (ekspresyonu) sonucunu oluşturmaktadır. Yukarıda bahsedilen etnik köken, göz rengi ve benzeri özelliklerin aksine, bir bireyin yaşı bir gen ya da birkaç genin kombine ekspresyonu ile tahmin edilemez. Kişilerin yaş tahminlerinin yapılmasında hem çekirdek DNA'sı (nucDNA) hem de mitokondrial DNA (mtDNA) düzeyinde araştırılması faydalı olacağı düşünülmektedir.

### **2.2.2 Yaş tahmini**

Kimliği belirsiz cesetlerden ve iskeletlerden fiziksel ve biyokimyasal analizlere dayanarak yaş tahmini çalışmaları uzun zamandır uygulanmaktadır. Adli araştırmalarda bazı fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde kişinin yaşı önem taşımaktadır. Örneğin, kıvılcık saç genine sahip 60 yaşındaki bir bireyde kıvılcık saçın görülmemesi veya kellik genine sahip bir kişinin 18 yaşında kel olmaması gibi.

Tsuji ve ark. (12) telomer kısalmasına bağlı olarak yaşı tahmin etmeye çalışmış ve ortalama telomer uzunluğu için bir formül geliştirmiştir (1, 12, 13). Alvaraz ve ark. Gama hemoglobin izoformlarının gen ekspresyonunu analiz ederek bireylerin yaşları ile ilişkilendirmeye çalışmışlardır. Gama hemoglobinin iki izoformunu yeni doğanlara özgü gen ekspresyonunun olduğunu ve daha ileriki yaşlarda yeni doğanlara göre ayırt edilebilme özelliği taşıdığını göstermişlerdir (14). Meissner ve ark. yaş tahmininde mitokondriyal DNA'nın 5 kb'lık delesyon analizi ile kabaca yaşın tahmin edilebildiği ve sadece genç ya da yaşlı tahminine yönelik formüller geliştirmişlerdir (1, 14, 15).

Yaş tahmini aynı zamanda zooloji alanında da çok büyük ilgi görmüştür. Popülasyonların doğal hareket şekilleri ve göç gibi parametreler araştırıldığında hayvanların

yaş faktörü çok büyük önem taşımaktadır. Ancak geleneksel ekolojik yöntemler ile yabani ortamlardaki hayvan popülasyonlarında yaş belirlenmesi neredeyse imkansızdır. Bu yöntemler ile hayvanların yaşını belirleyebilmek için onları öldürmek gerekir. Çünkü mevcut yöntemler sadece ölüm anındaki yaş tahminini belirlemeye yöneliktir. Ancak soyları tükenmek üzere olan hayvanlarda etik olarak bu yöntem sakıncalı görülmüştür.

DNA üzerinde bulunan telomerlerin uzunluklarına bağlı yaş belirlenmesi ilk defa Southern Cross Üniversitesine bağlı Balina Araştırma Merkezi'ndeki araştırmacılar tarafından uygulanmıştır. Bu araştırmada kambur balinaların derilerinden elde edilen DNA'dan telomer uzunluklarını analiz etmişlerdir. Yabani hayvan nüfusunun yaşını belirlemek üzere geliştirilen bu yeni yöntem özellikle soyları tükenmek üzere olan hayvanları korumak adına çok büyük önem taşımaktadır (1,16).

### 2.2.3 Moleküler düzeyde yaşlanma

Bir bireyin yaşını DNA analiziyle belirleyebilmek için yaşlanma mekanizmasını moleküler düzeyde bilmek gerekir. Yaşlanma; genel olarak canlıların fizyolojik fonksiyonlarında bozulma, çevre şartlarına uyum sağlayamama, hastalanma, doğurganlığın azalması ve ölüm ile gerçekleşen bir süreç olarak tanımlanmaktadır (1,13). Bazı genlerin yaşlanmaya sebep olduğu bilinmektedir. Yaşlanma genelde organizmanın bakım ve onarım mekanizmalarının verimsiz çalışması ve büyük ölçüde bedensel hasar birikimi nedeniyle oluşur.

Bugüne kadar moleküler düzeyde yaşlanma mekanizmasını açıklamak üzere sayısız modeller öne sürülmüştür. Başlıca öngörülen modeller şunlardır:

- I. Kromozom uçlarında bulunan telomer tekrarları her hücre bölünmesinde azalmaktadır. Bunların azalması yaşlanmaya sebep olduğu düşünülmektedir (1).
- II. Yaş ilerlemesiyle mitokondriyal genomda mutasyonların meydana gelmesi ve bu mutasyonların mitokondriyal aktiviteyi durduması sonucu yaşlılığın geliştiği varsayılmaktadır (1,18).
- III. Yaşa bağlı somatik mutasyonların artışı, diğer DNA hasarları ve bunlara bağlı olarak DNA onarım kapasitesinin azalması yaşlanmaya sebep olabileceği düşünülmektedir (1,19). Örneğin, PARP1 genin kodladığı PARP-1 (Poli ADP-Riboz Polimeraz-1) enzimi sadece

DNA hasara uğradığı zaman sentezlenmektedir. Ancak, uzun yaşam süresi olan organizmalarda yüksek düzeyde PARP-1 tespit edilmiştir (18, 19).

IV. Hücrelerde protein metabolizmasının yavaşlaması farklı metabolik atıkların birikmesine sebep olur. Bu durum mitokondriyal aktiviteyi etkileyip hücrenel yaşlanmaya neden olabilmektedir. En sık rastlanan metabolik atıklar ise lipofuscin (yaş pigmenti) ve parçalanamayan proteinlerdir (1,20).

V. Heterokromatin, ökromatin ve nükleer matriks çekirdeğin yapıtaşı olup burada olabilecek değişiklikler veya dengesizlikler yaşlanmaya neden olabileceği düşünülmektedir (1, 21).

Bu beş teori yaşlanma ile ilgili "ağ" teorisini oluşturmaktadır. Dolayısıyla yaşa bağlı kemik kırıkları, sakatlık ve hastalıkların oluşması gibi mekanizmalar "ağ" teorisini desteklemektedir (1,22).

## **2.3 Telomer hipotezi**

Leonard Hayflick 40 yıl önce normal hayvan hücrelerinin proliferasyon yeteneğinin kaybını gözlemiş ve buna bağlı yaşlanma-telomer hipotezini geliştirmiştir. Hipoteze göre; Telomerler kromozomların uçlarında bulunan özel yapılar olup hücre bölünmesine bağlı olarak boyları kısalır bu da yaşlanmanın biyolojik saat mekanizmasını oluşturur (23).

### **2.3.1 Kromozomların temel yapısı**

Yunanca chroma= renk maddesi ve soma= vücut kelimelerinden oluşan kromozom kelimesi, ökaryot organizmalarda üzerinde genlerin sıralandığı DNA-protein kompleksi olup, hücre çekirdeğinin bölünmesi sırasında kalın, yoğun ve kendine özgü boyanma potansiyeline sahip kromatin materyalidir.

İnsan kromozomları ilk defa 1874 de Arnold ve 1881 de Fleming tarafından gözlenmiştir. 1956 da Tjio ve Levan insanda 46 kromozom olduğunu göstermiştir. Üç yıl sonra Lejeune, Down sendromunda trizomi 21'i bildirmiştir. Bunu diğer sayısal anomaliler izlemiş ve 1970 de kromozom bantlama yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte birçok yapısal anomaliler de keşfedilmiştir (5, 24, 25).

### 2.3.2 Kromozomların yapısı ve sınıflandırılması

Her kromozomda özgül ve işlevsel bölgeler bulunmaktadır.

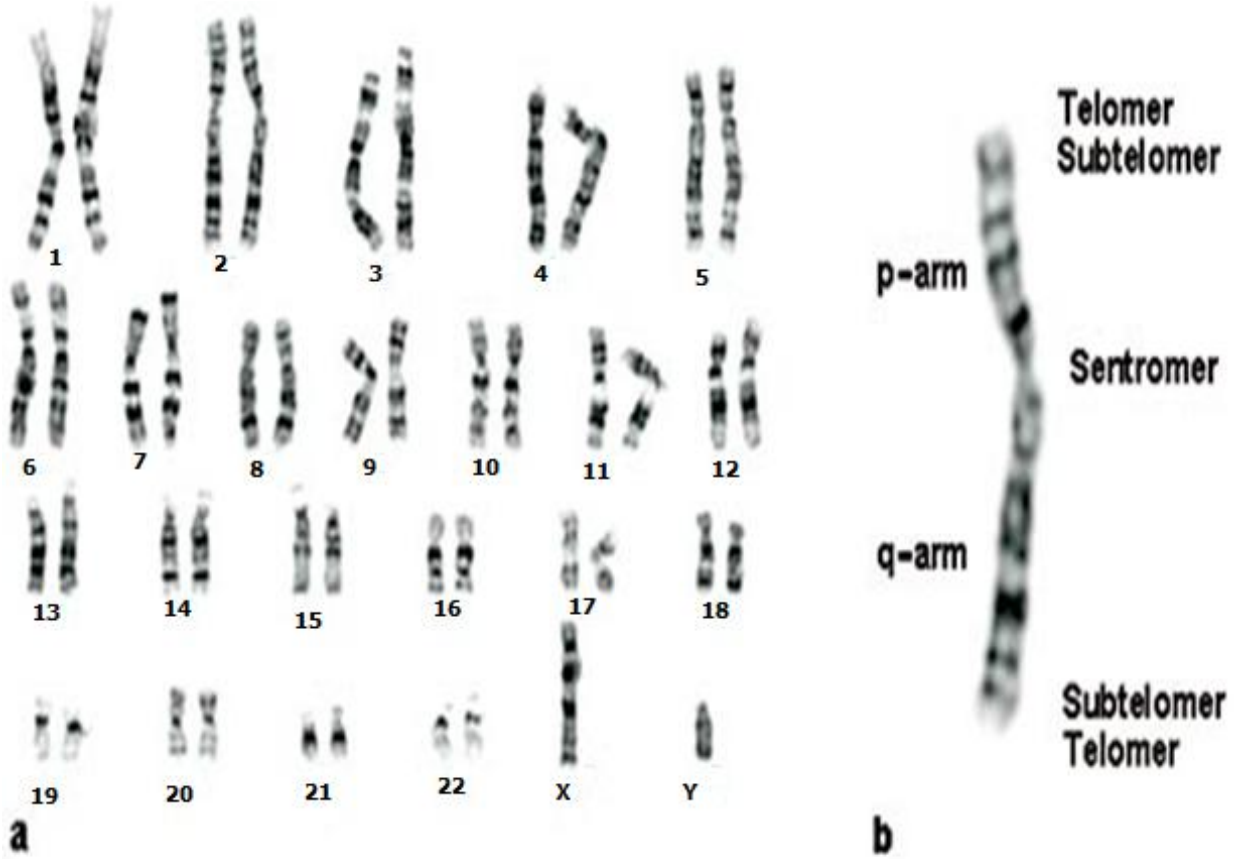
- **Heterokromatin ve Ökromatin:** İşlevsel olarak heterokromatin alanlar inaktif genlerin ve tekrarlayan DNA dizilerinin yer aldığı bölgeler olarak tanımlanmaktadır. Ökromatin bölgeler ise kromozomun ana yapısını oluşturan ve yoğun olarak aktif genleri içeren bölgelerdir.
- **Kromozomun Özgül Bölgeleri:** Bu bölgeler sentromer ve telomerlerden oluşmuş olup, tekrarlayan DNA dizilerini içeren heterokromatin alanlardır. Bu iki yapı kromozomların doğru bölünmesi ve devamlılığın korunmasında son derece önemlidirler.
- **Sentromerler:** Antijenik özellikleri ile tanımlanan ve proteinleri bağlayan spesifik DNA dizileri içerirler. Bu proteinler mitoz ve mayoz sırasında anafazda kromozomların veya kromatidlerin ayrılmasını kolaylaştıran iğ iplikçiğinin yapısına katılmaktadır. Bu nedenle, hücre bölünmesi sırasında genetik materyalin yavru hücrelere eşit dağılımında rol oynarlar (3, 25, 26).
- **Telomerler:** ökaryotlarda kromozom uçlarında yer alan özelleşmiş heterokromatik koruyucu yapılardır (13,14).

### 2.3.3 Kromozom morfolojisi

İnsanların normal hücre çekirdeklerinde bulunan 46 kromozomun (23 çift) yarısı baba diğer yarısı da anne kaynaklıdır. Bunların 22 çifti otozomal bir çifti de gonozomal kromozomlardır. Normal insan karyotipinde sentromer bölgelerine göre üç genel kromozom şekli bulunur:

- **Metasentrik Kromozomlar:** Sentromerleri ortada olan ve iki kolu birbirine eşit olan kromozomlardır.
- **Submetasentrik Kromozomlar:** Sentromerleri merkezden uzak ve iki kolu eşit olmayan kromozomlardır.
- **Akrosentrik Kromozomlar:** Sentromerleri bir uca çok yakın olan kromozomlardır.

Kromozomlar, 1985'ten beri sitogenetik adlandırmadaki uluslararası sisteme (ISCN= International System for Human Cytogenetic Nomenclature) göre sınıflandırılır. Şekil 1'de gösterildiği gibi bu sistemde kromozom çiftlerinin büyüklüğüne ve sentromer bölgelerine göre A (1.-3.), B (4.-5.), C (6.-12. ve X), D (13.-15.), E (16.-18), F (19.-20.) ve G (21.-22. ve Y) 7 grupta sınıflandırılırlar (14, 15, 26).



Şekil 1: a. Sağlıklı bir bireyin XY karyotipi

b. kromozom bölgeleri

Memorial Hastanesi Genetik Tanı Merkezi Sitogenetik bölümü, 2012

## 2.4 Telomerin yapısal ve fonksiyonel önemi

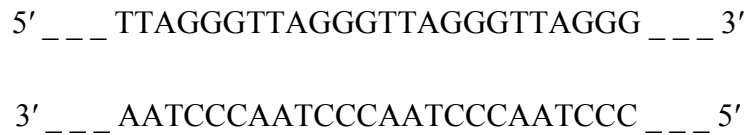
Ökaryotik hücrelerdeki kromozomların esas yapılarını oluşturan telomerler, kromozomların özel yapıdaki koruyucu uçlarıdır. Telomerler, basit ardışık tekrarlar içeren DNA dizileri ve özel proteinlerden oluşan nükleoprotein yapılarıdır (29).

### 2.4.1 Telomerlerin yapısı

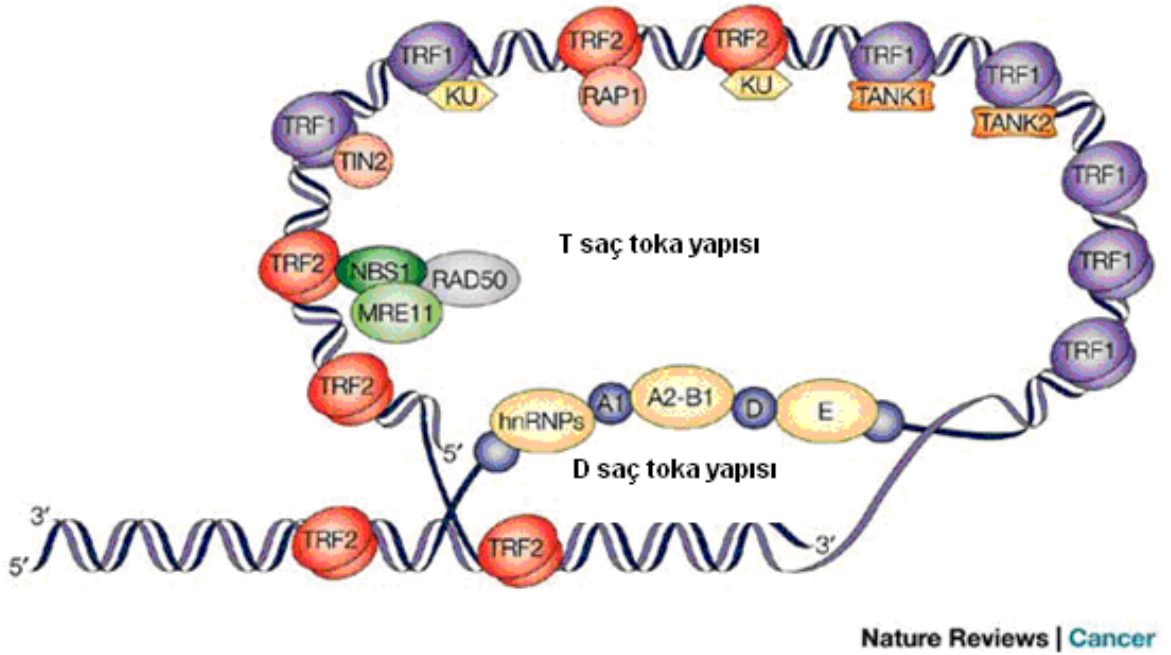
Telomerler, ökaryotlarda kromozomların uçlarında yer alan özelleşmiş heterokromatik yapılarıdır. Birçok canlı türünde evrim boyunca korunmuş olan telomer dizileri 5' → 3' yönünde guanin-timin (GT) ve 3' → 5' yönünde sitozi-adenin (CA)'ce zengin tekrarlardan oluşur.

Telomerlerin yapısı ilk olarak, tek hücreli bir ökaryot olan Tetrahymena termophyla'nın kromozom uçlarında ardışık tekrar eden kısa zincirlerin oluşturduğu uzun seriler olarak tanımlanmıştır. Aynı tip yapının bitki ve insanlarda da bulunması telomer dizisinin evrensel bir yapı olduğunu göstermektedir. Telomerler, protein ve DNA'dan yapılmış olup kromozom bütünlüğünün kontrolünde etkili temel yapılarıdır (13).

İnsanda telomerik DNA; 10-20 kb uzunluğunda olup, kısa bir zincir olan 5'-TTAGGG-3' nin çok sayıda kopyasından oluşur.



Yukarıda gösterildiği gibi, bütün ökaryotların telomer yapısında dizinin biri G nükleotidi diğeri C nükleotidi bakımından zengindir. Genellikle G-T'ce zengin dizi diğeri diziden daha uzun olup 14-16 bazlık tek dizi halinde çıkıntı yapar. Uçların yapısı için iki model öne sürülmektedir. İlk model, Şekil 2'de gösterildiği gibi, uzamış olan G-T dizisinin normalin dışında baz çiftlerinin etkileşimleri ile kendi üzerine katlanarak bir çift saç tokası yapısını oluşturmasıdır.



**Şekil 2:** Telomer saç tokası yapısı (32).

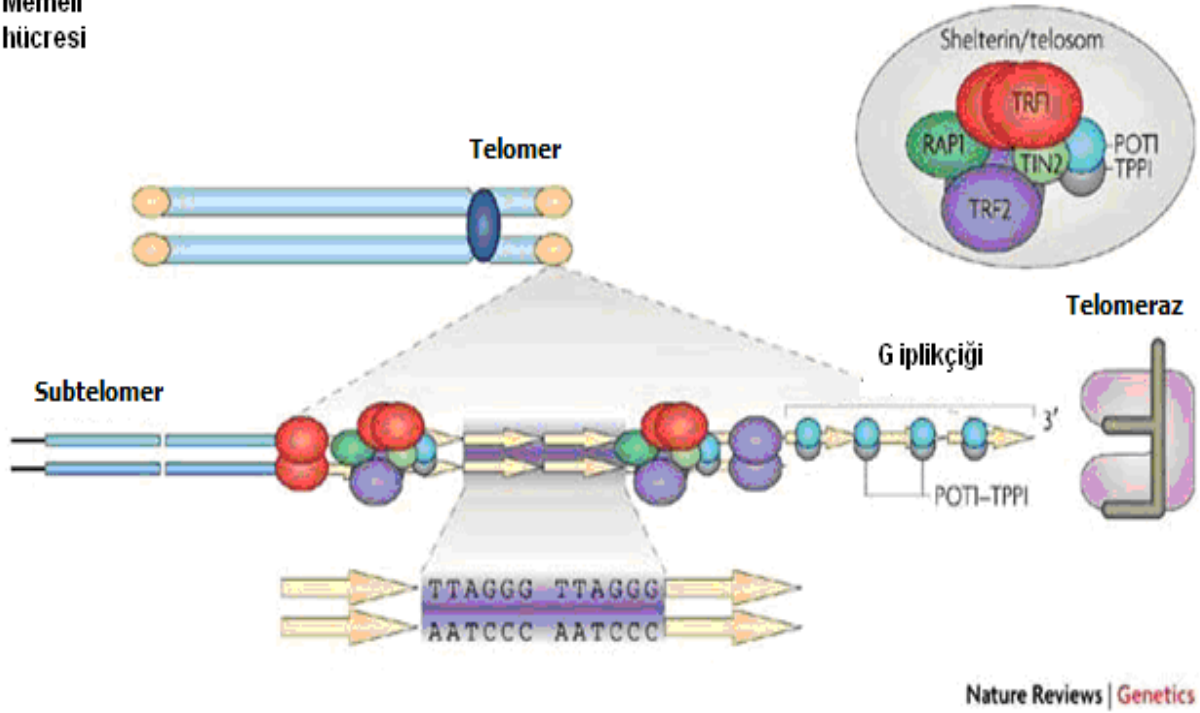
Diğer model ise her bir tekrar ünitesinden bir G nin birleşmesi sonucunda ‘quartet’ ya da dörtlü G bölgelerinin meydana gelmesidir. Alternatif model olarak da telomerler çekirdek zarının iç yüzeyine tutunarak kromozom uçlarını korudukları düşünülmektedir (Şekil 3) (1, 13, 30).

Telomerlerin yapısı değişik organizmalarda temelde aynı olmakla birlikte, sahip oldukları tekrar dizileri ve uzunlukları yönünden farklılık gösterirler. Yapısal olarak telomer, kromozomun ucunda bulunan subtelomerik ve esas telomerik bölgelerden oluşur. Subtelomerik bölge, değişik organizmalarda farklı uzunlukta olup türlere özgü heterojen dizi tekrarları içerir.

İnsan telomerlerinde 40-60 kb uzunluğunda subtelomerik bölge, 30-45 kb uzunluğunda TTGGGG ve TGAGGG tekrarlarından oluşan uzun blok, bunu takiben TTAGGG tekrarları olan arablok ve 10-15 kb uzunluğunda TTGGGG ve TGAGGG tekrarlarını içeren kısa bloktan oluşur.

Subtelomerik bölgenin ucunda yer alan esas telomerik bölge, çift ve tek dal halinde uzanır. İnsan telomerlerinde TTAGGG tekrarlarından oluşan esas telomerik bölge 5-15 kb uzunlukta olup bunun 50-100 bazlık kısmı tek dal ile sonlanır (1, 29, 31).

Memeli  
hücresi



**Şekil 3:** Memeli hücresindeki telomer yapısı, telomer tekrarları, subtelomerler ve G iplikçığının yapısı (33).

#### 2.4.2 Telomerlerin fonksiyonu

Telomer fonksiyonları ile ilgili bilgiler çoğunlukla mayalarda yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Telomerler; canlılığın devamında önemli olan birçok fonksiyonu üstlendikleri bilinmektedir. Bunları üç önemli rol içinde toplayabiliriz:

- Kromozomların stabilitesini koruyan ve kromozom uçları arasında füzyon oluşmasını engelleyen yapılardır.
- Telomerik diziler nükleaz saldırılarına karşı kromozomların uç bölgelerini korurlar.
- Kromozom uçlarının tam replikasyonu için gereklidirler.

Son yıllarda telomerlere ait dördüncü bir görev daha belirlenmiştir. Kromozom ucundaki telomer varlığı kromozomun normal olduğuna ( kırık ya da parça kaybı olmadığına)



dair bir sinyal olarak değerlendirilmektedir. Çünkü telomerik bölgenin kaybı programlı hücre ölümüne neden olmaktadır. Normal somatik hücreler her replikasyonda kendi telomerik dizilerinden 35-100 baz çiftini kaybederler. Telomerlerin yaşla birlikte somatik hücrelerde kısaldığını, spermelerde ise daha uzun olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda telomer uzunluğu sperm hücresinde yaklaşık olarak 15 kb ve somatik hücrelerde ise 10 kb kadardır (29, 34, 35).

### **2.4.3 Telomerler ve kromozom uzunluğu**

1985'de E. Blackburn ve C. Greider, Tetrahymena'da telomer sentezini sağlayan yeni bir enzim keşfettiler (15). Telomeraz olarak bilinen bu enzim ribonükleoprotein yapısındaki bir DNA polimeraz enzimidir. Bu enzim, bir protein alt ünitesi ile kısa bir RNA molekülü içerir. RNA molekülü telomeraz enziminin çalışma mekanizmasının nasıl olduğunu açıklayan esas yapıdır. Telomeraz, ökaryotik kromozomların replikasyonunun tamamlanmasında önemli rol oynamaktadır (24, 27).

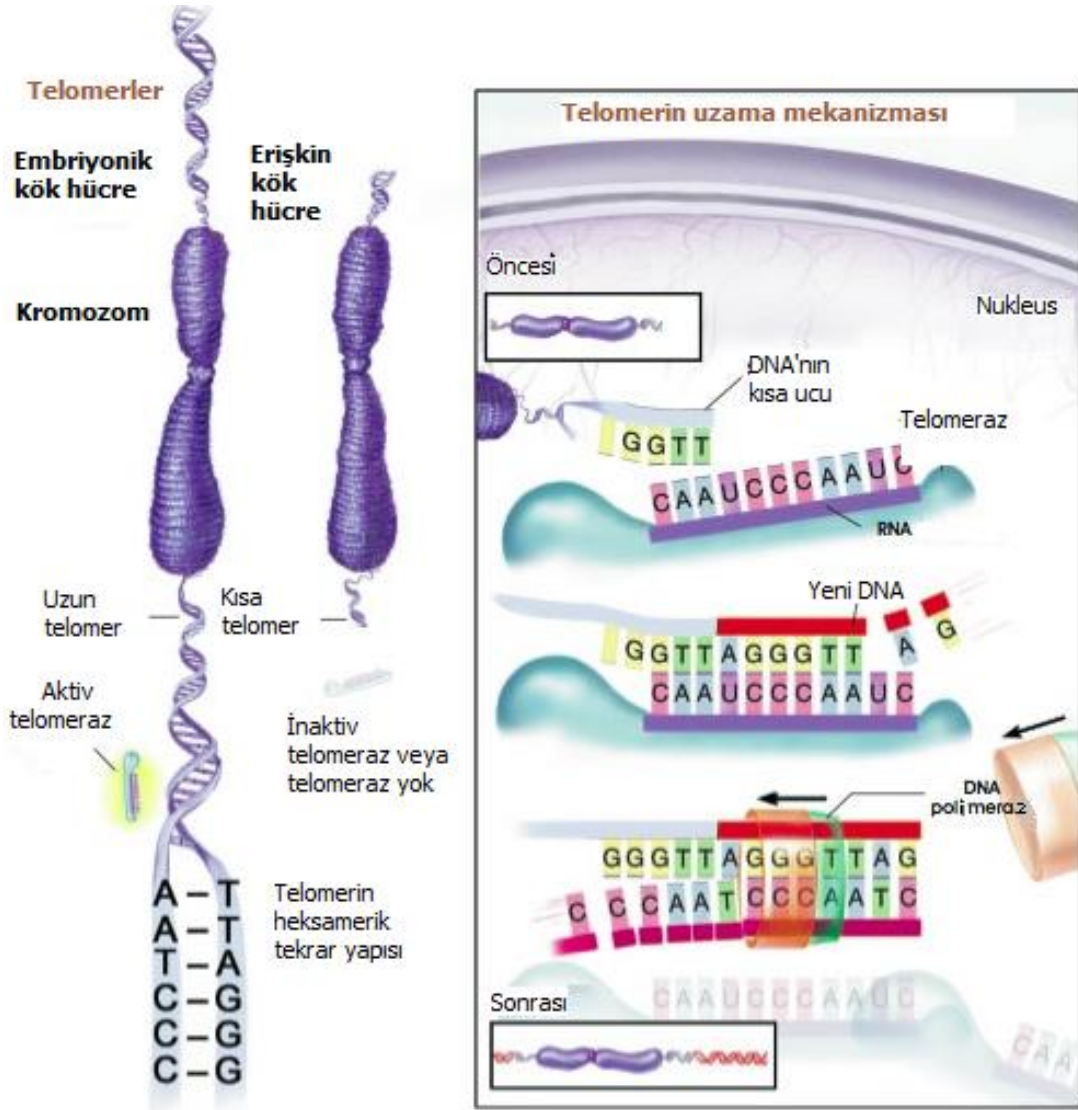
Tetrahymena telomeraz RNA'sının bir bölgesinde 3'-AACCCCAAC-5' zinciri yer alır. Bu zincir aynı organizmanın telomerik tekrarları olan 5'-GGGGTT-3' zincirlerine komplementerdir. Telomeraz kendi RNA'sının telomer tekrarına komplement olan diziyi kalıp kullanarak telomerin tek dalını uzatmaktadır. Aktivitesi için yalnızca dGTP ve dTTP gereklidir (3, 4).

İnsan vücudunda fetal ve ergin testislerin, fetal ovaryumun, hematopoietik kök hücrelerin, lenfositlerin, tamir gören dokuların çoğalan hücrelerin, saç foliküllerin ve barsak kripta hücrelerinin dışındaki normal somatik hücrelerde telomeraz enzim aktivitesinin tayin edilemediği ileri sürülmektedir. Somatik hücrelerde her hücre bölünmesinde telomer, telomerik tekrarlarını kaybeder. Bu nedenle burada telomeraz aktivitesi çok düşüktür. Ancak ölümsüzleşmiş olan kanser hücreleri, fetal, ergin testisler ve fetal ovaryum gibi telomeraz aktivitesine sahip olan hücreler telomerik kayıplarını telomeraz aktivitesi sayesinde telafi ederler (27, 36).

### **2.4.4 Telomer uzunluğu ve telomerazın kontrolü**

Genel olarak hücreler, bir kez daha güvenli bir şekilde hücre bölünmesi geçiremeyecek kadar kısa telomerlere sahip olduklarında bölünmeyi durdururlar ve telomeraz aktivitesi göstermezler. Sabit telomer uzunluğuna ve orta seviyede çoğalma kapasitesine sahip olan hücreler ise aktif telomeraz enzimi bulundururlar. İnsan eşey hücrelerinde bulunan

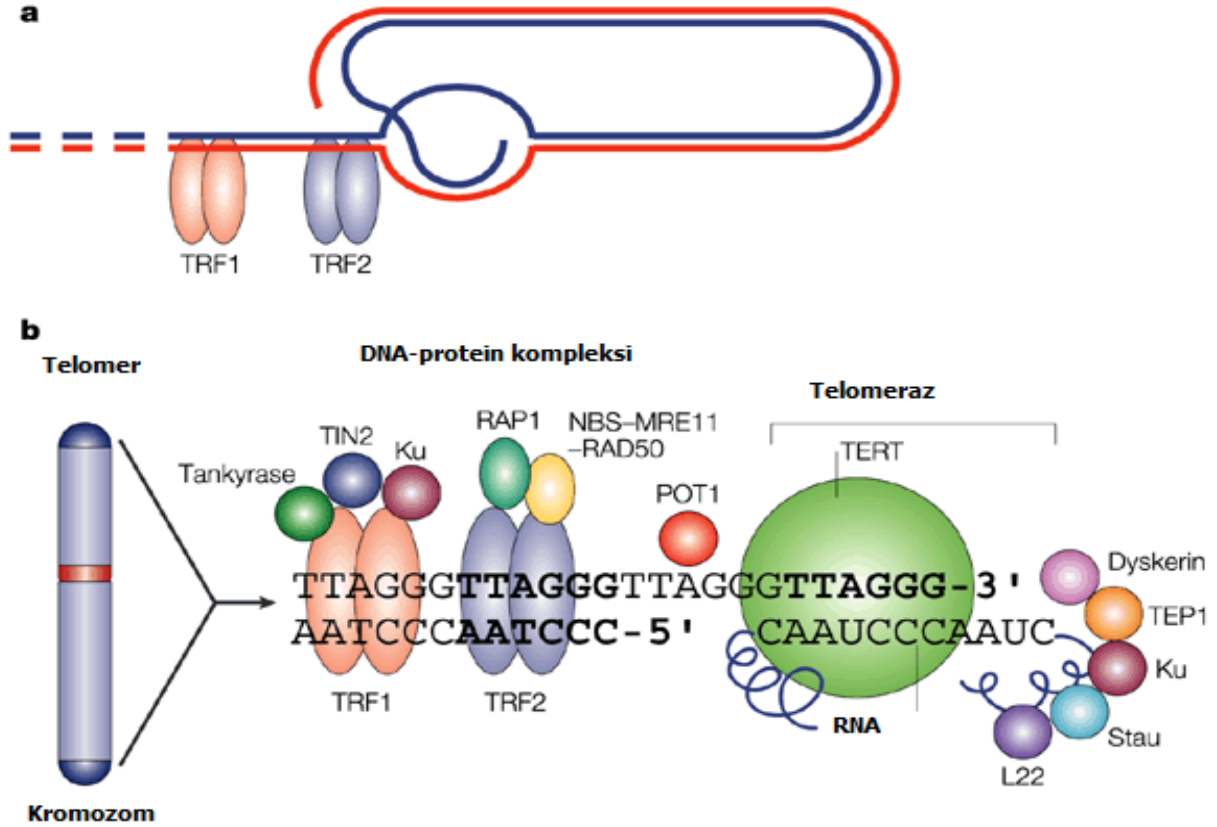
telomerlerin somatik hücelere göre daha uzun olmasının nedeni; somatik hücelerde telomeraz aktivitesinin azaldığını ve kromatinin zamanla kaybolduğunu bu da programlanmış hücre yaşlılığın bir mekanizması olduğunu düşündürmektedir. Embriyonik kök hücre ile erişkin kök hücre arasındaki telomer ve telomeraz farkı Şekil 4'te gösterilmektedir.



**Şekil 4:** Embriyonik kök hücre ile erişkin kök hücre arasındaki telomer ve telomeraz farkı (37)

Telomer kararlılığı telomer bağlayan proteinlerle sağlanır. Bunlar, telomerik tekrar bağlayıcı faktör 1 (Telomeric Repeat Binding Factor 1, TRF1) ve telomerik tekrar bağlayıcı faktör 2 (Telomeric Repeat Binding Factor 2, TRF2) dizine özgü bağlayıcı proteinler olup, telomerik DNA tekrarlarına bağlanırlar. Bu proteinler, telomerik tekrar dizilerinde oluşacak

bir mutasyona karşı telomer uzunluğunu korumada etkindirler. Ancak TRF1’de oluşabilecek mutasyon, telomer bağlanma bölgesinin bozulmasına ve dolayısıyla telomer uzunluğunun değişmesine neden olmaktadır (24, 35). TRF1 ve TRF2 proteinlerin telomer saç tokasına bağlanması ve telomerlerle ilgili proteinlerin şematik gösterimi Şekli 5’te verilmiştir.



Nature Reviews | Immunology

Şekil 5: a) TRF1 ve TRF2 proteinlerin telomer saç tokasına bağlanma şekli

b) Telomerler ile bağlantılı proteinlerin şematik gösterimi (38).

#### 2.4.5 Telomer kısalmasının hücre yaşlanmasındaki önemi

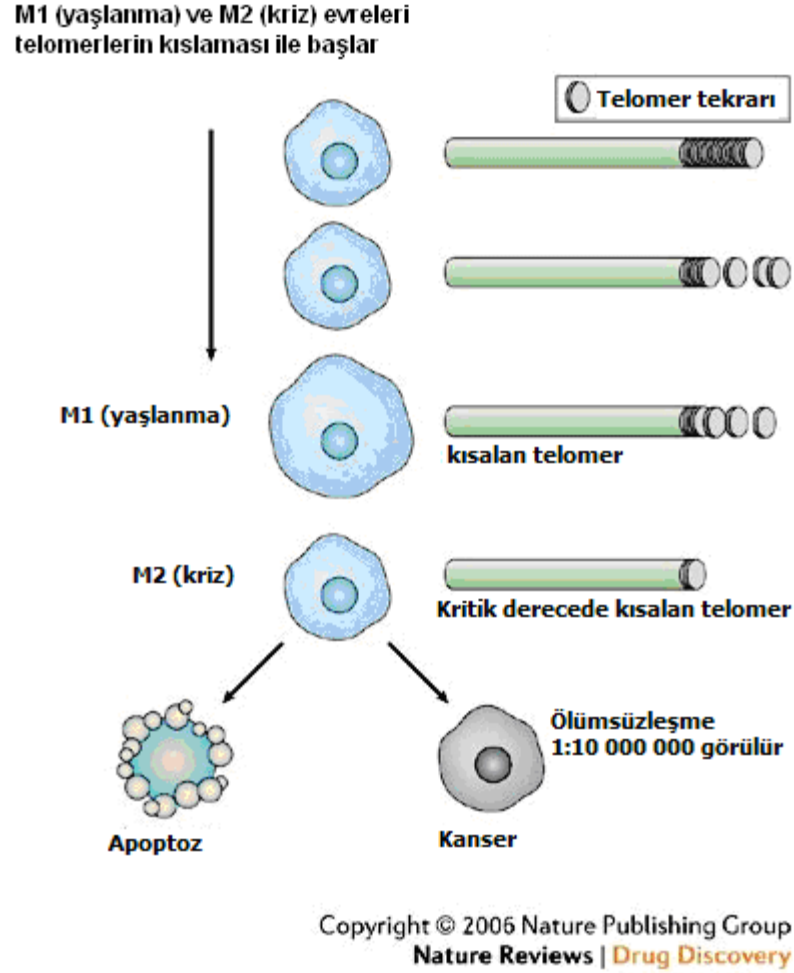
Hücre yaşlanması, insan hücrelerinde iki evreye ayrılabilir. Bunlar: **Mortalite evresi 1 (M1= yaşlanma)** ve **Mortalite evresi 2 (M2= kriz)**'dir. M1; önemli miktarda telomer kısalmasından sonra ortaya çıkar ve tümör baskılayıcı proteinleri olan p53 ve retinoblastinomanın (pRb) normal fonksiyonları tarafından kontrol edilir. Bu proteinler, hücrelerin G<sub>0</sub> ve G<sub>1</sub> evresinde durmalarını sağlayan **büyüme kontrol noktası (M1)** için bir

sinyal görevi yaparlar. Eğer hücreler SV40 (Simian Virüs) Tag veya HPV (Human Papilloma Virüs) E6/E7 gibi viral onkogenlerin her hangi birisi ile değişime uğrarlarsa M1 evresini geçerler. M2, kromozom ucunda çok az ya da birkaç tane telomerik tekrar kaldığında ortaya çıkar. Sadece nadir bir olayda hücreler M2 evresini geçebilir. Bunun sonucunda da telomerler kararlı hale gelir ve hücreler ölümsüzleşir ( 27, 28, 36).

#### **2.4.6 Replikatif yaşlanma ve telomer kısalması**

Leonard Hayflick 1961 yılında replikatif yaşlanmayı incelemiş ve normal insan fibroblastlarının 50 hücre bölünmesi sonunda gelişme ve bölünme yeteneklerini yitirdiğini tespit etmiştir.. Yaşlanmış hücreler metabolik olarak aktif kalırken, yeni hücreler meydana getirememekte ve en sonunda da ölmektedirler. Normal memeli somatik hücreler in vitro koşullarda belli sayıda bölünebilmektedirler. Bu maksimum bölünme sayısına "Hayflick Limiti" denir. Genç insanlardan alınan hücreler, yaşlılardan alınan hücrelere göre kültür ortamında daha fazla bölünürler. İnsan embriyo hücreleri yaklaşık 60 - 80 defa bölündükten sonra yaşlanmaya başlamaktadırlar. Orta yaşlı insanlardan alınan hücreler sadece 10-20 defa bölünebilmektedir. Uzun ömürlü canlılardaki bölünme sayısı kısa ömürlü canlılara göre çok daha fazladır. Örneğin, fareden alınan hücreler 10- 15 defa bölünebilirken, kaplumbağadan alınan hücreler 100'den fazla bölünebilmektedir. Bunun dışında erken yaşlanma sendromu (Werner Sendromu) gösteren hastalardaki hücre bölünmesi sayısının, normal insanlarınkinden daha az olduğu da gösterilmiştir. Geçmişten bugüne kadar yapılan araştırmalar sonucunda hücre yaşlanmasında telomerlerin etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Yaşlanma multifaktöryel ve çok değişken olmasına rağmen biyolojik yaşlanmada telomer uzunluğu bir belirteç olarak kullanılabilir (1, 24, 29).

Genel olarak, insan hücrelerinde yaşlanma ve ölüm M1 ve M2 evresinde gerçekleşir. Telomerin önemli miktarda kısalması sonucu ortaya çıkan evre M1'dir. Şekil 6'da gösterildiği gibi bu kısalık kritik bir noktaya ulaştığında hücre bölünmesi durur ve yaşlanma başlar. Bu noktadaki telomer boyu korunursa hücre yaşlı olarak hayatını sürdürür. Yaşlanma programını uyaran farklı etmenler vardır. Telomer kısalması, yaşlanma programı için en iyi tanımlanmış fizyolojik uyarandır.



**Şekil 6:** Telomer kısalması ve hücrenin yaşlanma evreleri (39).

Değişmiş DNA metabolizması, erken yaşlanma gibi birçok hastalığı tetikler. Bu hastalıklar tarafından etkilenen enzimler, DNA metabolizmasını ya da tamirinin çeşitli aşamalarında olumsuz şekilde etkilenirler. Bu durum gelecekte erken yaşlanmayı beraberinde getirir. Yaşlanma, bir tür tümör baskılayıcı sistem olarak çalışır. Ancak aktive edilmiş onkogenlerin ekspresyonu da yaşlanmayı başlatır. Ataxia telangiectasia, Werner sendromu, Hutchinson - Gilford progeria, Down sendromu ve Nijmegen - Breakage sendromu DNA metabolizmasının değişmesiyle meydana gelen hastalıklardır. DNA hasarlarının, yaşlanmaya ait moleküler mekanizmayı nasıl uyardığı tam olarak bilinmemekle birlikte bu hastalıkların telomer uzunluğunu ve fonksiyonunu etkilediği söylenebilir (24, 30, 40).

Telomer kısalması insan hücrelerinde yaşlanmaya öncülük eder. Kontrol noktaları p53, Rb benzeri proteinlere ve viral onkogenlere bağlıdır. Bu protein ve onkogenlerin işlevini kaybetmesi sonucu hücreler M1 evresini atlayarak M2 evresine geçerler. p53 kaybı nedeniyle

hücre bölünmesi kontrol edilemez. Bu durumda telomer fonksiyonu aksar ve hücre mikro düzeyde bir kaosa sürüklenir. P53/Rb inhibisyonu, hücre bölünmesine izin verir fakat daha sonra hücre "telomer krizine" girer. Bu periyotta kromozomların yapısı bozulur ve hücre ölümü gerçekleşir (4, 24, 27).

p53, Rb benzeri proteinler ve viral onkogenler, G1 evresinde görev yapamayacağından hücre döngüsü G2'den S fazına atlar ve hücre bölünmesi devam eder. Fakat böyle bir durumda somatik hücrelerde telomeraz enzim aktivitesi çok azaldığından telomer boyu giderek kısalır ve M2 noktasında ölür. Bu aşamada hücrede meydana gelebilecek ikinci bir genetik değişiklik hücreyi ya ölüme götürür ya da değişime neden olur. Eğer M2 noktasında hücrenin telomer boyu sabit kalırsa, hücre M2 noktasını aşarak ölümsüzleşir ve bölünmeye devam eder. Bu olay telomeraz enziminin kontrolü ya da yeniden aktifleşmesi sonucu ortaya çıkar. Kanser hücreleri M2 evresini aşabilen hücrelerdir (4, 24, 26).

#### **2.4.7 Telomer uzunluklarını etkileyen faktörler**

Çeşitli çevresel faktörler; yaşam tarzı (düzenli olarak tüketilen alkol ve sigara miktarı, beslenme şekli, egzersiz), vücutta mevcut serbest radikaller ve bazı antioksidanların telomerlerin uzunluklarını etkilediği bilinmektedir (24, 30). Şekil 6'da gösterildiği gibi çeşitli kanser hastalarında telomer uzunluklarının etkilendiği ve aktif durumda oldukları (49), ayrıca çeşitli araştırmalarda kromozomların özgün yapılarının ve bunlara bağlı olarak telomer uzunluklarının kalıtsal olduğu da bildirilmiştir. Kalıtsallık faktörü, incelenen gruplara bağlı olarak değişik sonuçlar vermektedir. Alman bilim adamlarının yaptıkları bir araştırmada tek ve çift yumurta ikizlerinde telomerler uzunluklarının %78 kalıtsal olduğunu (27), ancak diğer bir araştırmada, telomerler uzunluklarının sadece %44 'ünün kalıtsal olduğu tespit edilmiştir (12).

#### **2.5 PCR ( Polimeraz Zincir Reaksiyonu)**

İlk otomatize termal döngü cihazları 1988 yılında "thermus aquaticus" bakterisinden saflaştırılan ve ısıya dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) geliştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); dizisi bilinen bir DNA bölgesinin in vitro koşullarda DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan bir tekniktir.

İlk olarak Kary Mullis bu tekniğe bugünkü ismini vermiş ve uygulamaya koymuştur. Bu buluşu ile 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmıştır (4).

### 2.5.1 Eşzamanlı 'Real Time' PCR

Eşzamanlı PCR (Real-Time PCR, RT-PCR) yöntemi daha önceden geliştirilmiş olan standart PCR yönteminden iki özelliği ile farklıdır. Birincisi; Real-Time PCR yönteminde termal döngü cihazıyla birleştirilmiş bir optik okuma sisteminin kullanılmasıdır. İkincisi ise PCR işlemi sırasında amplifikasyonu bilgisayar ekranına yansıtacak bir probun veya problemin bulunmasıdır. Primerlerin bağlanması takiben gerçekleştirilen polimerizasyon aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan boya miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenir. Bu teknik, floresan okuma yapması nedeniyle flüoresan kantitatif Real-Time PCR, kantitatif-kinetik PCR gibi çeşitli şekillerde adlandırılmaktadır. Bu tekniklerinin kullanılmasıyla birlikte moleküler biyoloji alanında bir devrim yaşanmıştır.

Real-time PCR tekniği sayesinde; DNA'nın dizi analizi, DNA haritalaması, insan genom projesindeki araştırmalar, genetik hastalıkların teşhisi ve tümör hücrelerinin ilaçlara karşı dirençlerinin saptanması, adli örneklerin genetik tiplendirilmesi, kemoterapi taramaları, tümör evrelerinin moleküler tespiti ve evrim çalışmalarına (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesi) kadar uzanan çok farklı alanda kullanılmaktadır (26, 41). Bugün piyasada en yaygın kullanılan Real-Time sistemleri; ABI Prism 7700 (Applied Biosystems, USA), Light Cycler (Roche), Icycler (BioRad) ve Rotor-Gene Q (QIAGEN) cihazlardır.

### 2.5.2 Real Time PCR'in genel kullanım alanları

- Gen ifadesi (ekspresyonu) miktarının belirlenmesi
- Viral miktarın belirlenmesi
- Patojenlerin tespiti
- DNA hasarı (mikrosatellit kararsızlığı) tespiti
- Metilasyon tespiti
- Kemik iliği transfer (KİT) sonrası kimerizmin izlenmesi

- Kemik iliği transfer (KİT) sonrası minimal rezidüel hastalık (MRD) izlenmesi
- Genotipleme –erime eğrisi (melting-curve) analizi
- Anne kanından tek hücreden doğum öncesi (prenatal) tanı
- Hemoglobinopatilerin prenatal tanısı

### 2.5.3 Real Time PCR avantajları

- Klasik PCR’da plato fazı yani son nokta değerlendirebilirken, Real-Time PCR’da ekponansiyel (büyüme) fazında veri gözlemlenebilir.
- Floresan sinyalinin gücü doğrudan çoğaltılan ürün miktarı ile orantılıdır.
- Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işlemi, hem de çoğaltılan ürünlerin tesbiti yapılabilir.
- Standart klasik PCR yöntemlerinden 1000 kat daha az DNA/ RNA ile çalışılabilir.
- PCR sonrası elektroforez gerektirmez.
- Nitel ve nicel değişimi belirleyebilme hassasiyeti vardır.
- Çalışma ve değerlendirme aynı tüpte ve tüp açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski azdır.
- PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek reaksiyona müdahale edilebilir.
- Gen kopya ürünleri sayısal değerlere dönüştürülerek ölçülebilir.

### 2.5.4 Real-Time PCR’da kullanılan prob sistemleri ve boyaları

- Özgün Floresan İşaretli Problar
  - FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
  - TaqMan
  - Molecular Beacons
  - Scorpion Primerleri
  - Hibridizasyon Probları



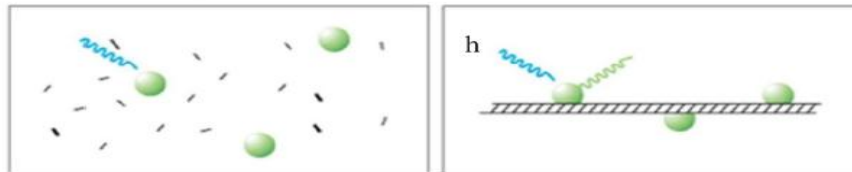
- Özgün Olmayan Floresan İşaretli Problar
  - Syber Green I
  - Etidyum Bromür

### 2.5.5 SYBR Green I boyasına dayalı Real-Time PCR sistemleri

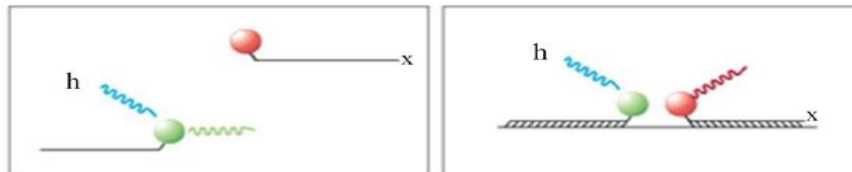
Higuchi ve ark. 1992 yılında ilk defa SYBR Green I boyasını kullanarak Real-Time PCR amplifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Özgün olmayan floresanla işaretli etidyum bromür problemlarına kıyasla SYBR Green I boyası daha az toksik, daha spesifik ve en az 10 kat daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (43).

SYBR Green I boyası çift sarmallı DNA (dsDNA)'ya bağlanırken, tek sarmal DNA (ssDNA)'ya bağlanmamaktadır. Bu özelliğinden dolayı boyanın ışınımı (eksitasyon 254 ve 488 nm, emisyonu 560nm) ortalama 800 ile 100 kat artar. PCR başladığında yeni sentezlenen DNA miktarının artması floresan sinyalinin de artmasına sebep olur (Şekil 6). SYBR Green I tabanlı PCR sistemlerin en büyük dezavantajı boyanın spesifik olmayan DNA'ya da bağlanmasıdır. Bu nedenle bir PCR reaksiyonunda bulunan bütün dsDNA moleküllerinin yanında spesifik olmayan PCR ürünleri ve primer-dimer gibi yapıların miktarı da ölçülmektedir. Bu sorunu gidermek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılır..

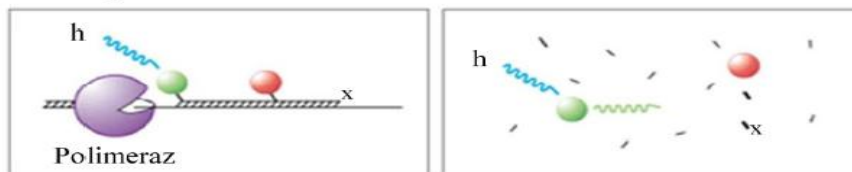
#### I. SYBR Green



#### II. Hibridizasyon Problemleri



#### III. TaqMan Problemleri



Şekil 7: Floresan işaretli problemlerin bağlanma şekilleri (43).

### 2.5.6 Real-time PCR'da ürün miktarını saptanması

Real-time PCR'da amplifikasyon sonucunda elde edilen ürün miktarının saptanması mutlak (absolüt) ve göreceli (rölatif) yöntemle yapılabilir. Mutlak kantitasyonda ilgili ürünün PCR sinyali bir standart eğri ile kıyaslanarak hesaplanır. Göreceli kantitasyonda ise ilgili ürünün PCR sinyali bir referans (kalibratör) ya da tek gen kopya denilen sabit bir ürünün sinyali ile kıyaslanarak hesaplanır. Dolayısıyla göreceli kantitasyon analizi kısaltılmış mutlak kantitasyon yöntemi olup, sonuçların değerlendirilmesi karşılaştırmalı Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) metoduna göre hesaplanır. Bu metot aynı zamanda  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metot olarak da adlandırılır.

### 2.5.7 Göreceli kantitasyon hesaplamaları ve karşılaştırmalı Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) metodu

Real-Time PCR amplifikasyonu sırasında üç ayrı faz görülmektedir. Birinci faz birkaç döngü süren ve saptanabilir oranda ürünün oluşmadığı arka plan fazıdır. İkinci faz üslü çoğalma (logaritmik) fazıdır ve ürün miktarının saptanabilir en alt düzeye gelmesiyle başlar. Bu fazda ürünler logaritmik şekilde çoğalır. Üçüncü faz ise plato fazıdır. Plato fazda ürün miktarının saptanabildiği en yüksek seviyedir. Bu aşamadan sonra ürün çoğalması artık logaritmik çoğalmadan lineer çoğalmaya geçer. Çoğalmanın lineer hale geçmesinin nedeni; reaksiyon ortamında enzim, primer ve nükleotitlerin tükenmiş olması, ürünlerin birbiriyle eşleşmesi, yüksek sıcaklık nedeniyle hidroliz ve ekzonükleaz aktivitesinin kaybedilmesinden kaynaklanmaktadır.

Real-Time PCR amplifikasyon kinetiğinde ürünün logaritmik çoğalma aşağıdaki denkleme göre hesaplanır

$$T_n = T_0(E)^n$$

$T_n$  n döngüsünde hedef dizinin ulaştığı miktarı,  $T_0$  hedefin ilk baştaki miktarını ve E amplifikasyon etkinliğini göstermektedir.

PCR etkinliği en az 1, en fazla 2 olabilir. Etkinlik 2 olduğunda her döngüde ürünlerin iki katına çıktığı anlaşılır. Kısa ürün veren reaksiyonlarda etkinlik 2'ye yaklaşır. Etkinlik 1'e yaklaştıkça döngülerde hiç ürün artışı olmadığı dolayısıyla amplifikasyon olmadığı anlaşılır. Ayrıca uzun ürünlerde etkinlik düşer.

$$E = (10^{-1/\text{eğim}} - 1) \times 100$$

Real-time PCR’da her döngü sonunda floresan ölçüm yapıldığından PCR döngüleri tamamladığında amplifikasyonun log fazının da belirlenmesi kolay olur. Log fazı sırasında reaksiyonun başındaki kalıp DNA sayısının log10 değeri ile ürünlerin belli bir eşik değerini aştığı döngü sayısı arasında doğrusal bir ilişki vardır. Hedef DNA miktarını bilinen standartlar çalışılarak bu doğrusal ilişki yardımıyla “standart eğri” çizilir.

Eşik değer, başlangıçta farklı sayıda hedef dizi içeren amplifikasyonların hepsinin aynı sayıda ürün içerdiği noktadır. Buna bağlı olarak başlangıçta az sayıda hedef DNA içerenler daha çok döngü ile eşik değere ulaşırken, daha çok sayıda hedef içerenler ise daha az döngüyle eşik değere ulaşırlar.

$$K = T_0(E)^{Ct}$$

Eğer eşik değerdeki PCR ürün sayısına K ve ulaşmak için gereken döngü sayısı Ct olarak gösterilirse yukarıdaki denklem uygulanır. Bunun doğrusal denklemi ise aşağıdaki gibidir.

$$\log K = \log T_0 + Ct * \log E$$

Başlangıçtaki hedef DNA miktarı ( $T_0$ ) bilindiğinden ve eşik değere ulaşmak için geçen döngü sayısı (Ct) ölçüldüğünden denklem aşağıda gösterildiği şekilde yazabilir.

$$Ct = - (1/\log E) * \log T_0 + (\log K / \log E)$$

Bu denklem standart eğri denklemidir. Yatay eksen; başlangıçtaki hedef DNA miktarının logaritması, dikey eksen ise; eşik değerini aştığı döngü sayısıdır. Eğrinin eğimi PCR etkinliğini göstermektedir. Standartlarla çizilen bu eğri üzerindeki pozisyonuna göre bilinmeyen bir örnekte başlangıçtaki hedef DNA miktarı saptanabilir (42).

## **2.6 Telomer uzunluğunun ölçülmesi**

Bu güne kadar insanlarda telomer uzunluklarını ölçmek için birçok farklı yöntem kullanılmıştır. Bütün yöntemlerin temeli insanların gerçek yaşı ile telomer uzunlukları arasındaki bağlantıya dayanmaktadır. Telomer uzunluklarını ölçmek için en sık kullanılan iki yöntem aşağıda ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

### **2.6.1 Telomer uzunluğunun ölçülmesinde Sonlandırıcı Enzim Kesim (Terminal Restriksiyon fragman, TRF) analizinin kullanılması**

İnsan telomer uzunluğunu ölçmek için kullanılan en eski yöntem Sonlandırıcı Enzim Kesimi (Terminal Restriksiyon Fragman, TRF) analizidir. Bu yöntemde DNA'yı kesen ve telomer segmentlerinin (fragmanlarını) kesilmesini engelleyen özel seçilmiş enzimler kullanılmaktadır. Enzim kesimi sonucu elde edilen DNA fragmanlarının ayrımı ise jel elektroforezi ile yapılır. Jel elektroforezi ile ayrılan DNA parçacıkları özel membrana aktarılır (blotting). Membrandaki ürünler hibridizasyon yöntemi ile bir proba işaretlenerek görüntülenir (2, 31, 34).

Bu yöntemde kullanılan enziminin kesim bölgesine bağlı olarak TRF uzunlukları değişebilir ve tahmini telomer uzunlukları % 5 kadar gerçek uzunluğundan sapma gösterebilir (34). Ayrıca kullanılan enzime bağlı olarak kesilen bölgeler subtelomerik bölgeleri de içerebilir. Bundan dolayı elde edilen sonuçların gerçek telomer uzunluklarını temsil edip etmediği sorgulanabilir. Buna ek olarak, TRF yönteminde hatalı (artefakt) oto-radyolojik lekeler oluşabilir, bu da değerlendirmede hatalara neden olur (13, 34). Ayrıca elde edilen uzunluk farklılıkları enzim kesimi ile elde edilen kromozomların telomerik ve subtelomerik bölgelerdeki polimorfizmlerinin varlığına bağlı olabilir. TRF yönteminin en büyük dezavantajlardan biri de yüksek miktarda DNA gerektirmesi ve çalışmanın çok uzun sürmesidir. Üstelik olay yerinde bulunan örneklerin DNA miktarları çoğunlukla azdır. Bundan dolayı adli örneklerin TRF yöntemi ile analiz edilmesi uygun değildir (13, 31, 34).

### **2.6.2 Telomer uzunluğunun ölçülmesinde Real-Time PCR'in kullanılması**

Telomerlerin ölçümünü sağlayan Real Time PCR yöntemi ilk olarak Cawthon tarafından 2002 yılında geliştirilmiştir. Bu yöntemle çok daha kısa sürede ve 35 nano gram (ng) gibi düşük miktardaki DNA örneklerinin analizi yapılabilmektedir (34). İlk kez Cawthon tarafından sentezlenen primerler, insan telomer bölgesine özgün olup primer-dimer



Her Real Time PCR çalışmasında olduğu gibi bu çalışmada da DNA miktarının ölçülmesi ancak bir referans ile kıyaslanarak yapılmaktadır. Seçilecek referans her zaman sabit miktarda ve tek gen kopyası (single gene copy) olması gerekir (1). Cawthon çalışmasında tek gen kopyası olarak 12. kromozomda yer alan ve asidik ribozomal fosfoproteini PO kodlayan 36B4 geni kullanmıştır. Ayrıca bu bölgenin amplifikasyonunu kontrol etmek için pozitif kontrol olarak 11. kromozomun kısa kolunda bulunan hemoglobin beta zincirini kodlayan beta-globin ( $\beta$ -globin) geni kullanılmıştır.

Cawthon, ölçüm yapmadan önce standart eğrileri belirlemiştir. Standart DNA eğrisini, referans DNA içeriği 1/3 oranında ardışık seyrelterek elde etmiştir. Bu standart eğriler hem heksamerik telomer tekrarı hem de 36B4 geni için yapmış ve çalışmalarını bu standart eğrilere göre değerlendirmiştir.  $\beta$ -globin primerlerini ise hem optimizasyon için hem de tüm primerlerin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için kullanmıştır. Cawthon, elde ettiği sonuçların önce eşik-değer döngü (cycle threshold, Ct) noktasını belirlemiştir. Ct değeri log fazına geçen ve amplifikasyonda ölçülebilen en düşük floresan değeri olarak tanımlanmıştır (34). Ct değerlerini real time PCR sonucunda her bir örnekte hem heksamerik telomer tekrarı hem de 36B4 geni için belirlemiştir.

PCR döngüsünde ürün ortalama iki kat artmaktadır. Bu oran aşağıdaki denklem ile hesaplanır.

$$\left( \frac{2^{Ct(\text{telomer})}}{2^{Ct(36B4)}} \right)^{-1} = 2^{-\Delta Ct}$$

Cawthon her örnek için  $\Delta Ct$  değeri hesaplamış ve daha sonra elde ettiği tüm değerleri karşılaştırmalı Ct ( $\Delta \Delta Ct$ ) yöntemine göre kıyaslamıştır. Bu yöntemde kullanılan denklem aşağıda gösterilmiştir.

$$2^{-(\Delta Ct1 - \Delta Ct2)} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

Yukarıdaki denkleme göre kalibratörden (K562 Yüksek Moleküler Ağırlıklı DNA, Promega) ve örneklerden elde ettiği sonuçları değerlendirmiştir. Ayrıca, katılımcıların farklı örnekleriyle de kıyaslamıştır. Bu hesaplamalarla elde ettiği değerleri telomerin heksamerik tekrar miktarını belirlemiş ve  $\Delta\Delta Ct$  rölafif (göreceli) telomer uzunluğunu tanımlamıştır. (34).

## 2.7 İstatistiksel analiz

### 2.7.1 Ki-Kare dağılımı

Ki-Kare dağılımı ilk olarak 1900'lü yıllarda Pearson tarafından ortaya atılmıştır (32). Bu yöntemde gözlenen değerler ile beklenen değerler kıyaslanır. Farklı kategori, nesne, denek veya sayısal değerler ile ilgilenir (33). Ki-Kare dağılımı; uygunluk, bağımsızlık, çeşitlilik ve homojen grupların testinde oldukça sık kullanılır (32). Ki-Kare; aritmetik ortalaması sıfır ve varyansı bir olan normal bölünmeli bir ana kütlede her biri diğerinden bağımsız olarak seçilen  $n$  birimli bir örnekleme ait değerlerin karelerinin toplamıdır (32). Yani,  $Z_i$ ,  $i = 1, \dots, n$  tane bağımsız standart normal dağılım için  $Z_1^2, Z_2^2, Z_3^2, \dots, Z_n^2$  toplamı ile,  $n$  serbestlik derecesi Ki-Kare dağılımıdır (44, 45, 46).

$$\chi_n^2 \approx \sum_{i=1}^n Z_i^2$$

Ki-Kare; iki veya daha fazla veri seti arasında önemli bir farkın olup olmadığını belirlemek için araştırmacının kullanabileceği bir istatistiksel analiz yöntemidir (46).

### 2.7.2 Ki-Kare uygunluk testi

Uygunluk testi belli bir hipoteze uygunluk ve ihtimal dağılımlarına uygunluk testi olarak iki kısımda incelenmektedir. Belirli bir hipoteze uygunluk testinde; gözlenen frekansların ( $o_i$ ) i, belli bir hipoteze göre beklenen frekanslara ( $e_i$ ) i uygun olup olmadığı araştırılır. Ki-kare aşağıdaki denkleme göre hesaplanır (46).

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

### 2.7.3 Kolmogorov-Smirnov testi

Bu test, Kolmogorov tarafından 1933 yılında  $\chi^2$  uygunluk testlerine alternatif olarak önerilmiştir. 1939 yılında ise bir Rus matematikçisi olan Smirnov tarafından iki bağımsız örnek için uyum testi geliştirilmiştir. Kolmogorov ve Smirnov testi benzerlik nedeniyle uygulamada, Kolmogorov– Smirnov uygunluk testleri olarak da bilinirler.

$\chi^2$  testinin uygulanabilmesi için beklenen frekansların 5'den büyük olması istenir. Oysa Kolmogorov-Smirnov testinde beklenen frekanslar için bir alt limit söz konusu değildir. Kolmogorov-Smirnov testi böyle bir koşula dayanmadığı için kolayca uygulanabilmektedir (44, 45, 46).

### 2.7.4 Belirtme katsayısı $R^2$

Tahmin edilen doğrusal regresyon denkleminin örnekleme uygun olup olmadığını belirlemek için uygulanan istatistiksel yöntemdir. Bu test ya belirtme katsayısı  $R^2$  (R-kare) ya da F-sınama şeklinde uygulanır.

Belirtme katsayısı  $R^2$  (R-kare) aşağıdaki formül ile hesaplanır ve 1-toplam hatalar karesi ile tüm toplam kareler oranı olarak tanımlanır.

$$R^2 = 1 - \frac{SS_{err}}{SS_{tot}}$$



$SS_{err}$  toplam hatalar karesini,  $SS_{tot}$  tüm toplam kareleri ifade etmektedir. İstatistiksel analizde R-kare değeri bulunur. Bu değer 0 ile 1 arasında olmalıdır.  $R^2$  değeri sıfırdan uzaklaştıkça modelin iyi uyum sağladığı kanaatine varılır (44, 45).

### 2.7.5 Basit doğrusal regresyon analizi

Basit Doğrusal regresyon analizinde, Y bağımlı (cevap, sonuç) ve X bağımsız (belirleyici) olmak üzere iki değişken arasındaki sebep-sonuç ilişkisini doğrusal bir model olarak ortaya koyan bir yöntemdir. Basit Doğrusal regresyon analizinde iki değişken arasındaki neden sonuç ilişkisi;

$$Y_i = \alpha + \beta x_i + \varepsilon$$

şeklinde bir denklem ile ifade edilir. Bu model Y'nin değişiminin X tarafından ne kadar belirlendiğini ve Y'nin tahmin edilmesini sağlar.

Basit Doğrusal regresyon modelinde kesişme noktası (crossing point), bağımlı değişken ve konsantrasyon değerleri log10 tabanına dönüştürülerek ve bağımsız değişken olarak belirtilmiştir (46). Hedef gen için kesişme noktası değeri ile logaritmik dönüştürülmüş konsantrasyon değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren basit doğrusal regresyon modeli aşağıdaki denklem ile ifade edilir.

$$Y = a + bX$$

Burada; Y: Bağımlı değişken, kesişme nokta (crossing point) değerlerini; X: Bağımsız değişken, logaritmik dönüştürülmüş konsantrasyon değerlerini; a: X=0 olduğunda bağımlı değişkenin alacağı değeri (kesim noktası) ve b: Regresyon katsayısını göstermektedir (45, 56).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tezde çalışmaya onay veren, sağlıklı ve yaşları 19 ile 46 arasında değişen 50 kişinin periferik kan ve ağız içi sürüntü örnekleri kullanılmıştır. Aynı bireyin dokularındaki telomer uzunluklarının farklılık göstermesinden ötürü iki farklı dokuda analiz yapılarak sonuçlar kıyaslanmıştır. Örnekler Ocak ayı 2012 yılında sağlık personelinen toplandı ve ilk aşamada DNA izolasyonu, ikinci aşamada Real Time PCR ile analizi, üçüncü aşamada elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı. Son aşamada ise kişilerin gerçek yaşları ile bulunan değerler kıyaslanarak değerlendirildi.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda ve Memorial Hastanesine bağlı genetik bölümünde yapıldı. Örnekler söz konusu hastanede bulunan Real Time PCR cihazında yürütülerek analiz edildi.

#### 3.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve cihazlar

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda ve Memorial Hastanesine bağlı genetik bölümünde bulunan ve kullanılan cihaz, malzeme ve kitlerin listesi aşağıda ayrıntılı şekilde verilmiştir.

- Real Time PCR cihazı (Corbett Rotor Gene 6000)
- PCR cihazı (GeneAmp PCR System 9700)
- Otoklav (Nüve OT 4060)
- Vorteks (Nejat Çoşkuner)
- Etüv (Nüve EN 500) -
- Mikrosantrifüj (Heraus Biofuge 15)
- Su Isıtıcısı
- Termomikser (Eppendorf)
- Derin Dondurucu
- Buzdolabı
- Spektrofotometre (Epoch Biotek)
- PAGE elektroforez düzeneği (Mini-Protean® tetra cell, Bio-Rad)
- Otomatik Pipet Seti (Eppendorf) (0,1µl-2,5 µl, 2 µl-20 µl, 10 µl-100µl, 100 µl-1000µl)

- Pudrasız eldiven
- 2 ml'lik EDTA'lı tüp (kan alınımı için)
- Fırçalı svap
- BuccalAmp<sup>tm</sup> DNA izolasyon kiti (Epicentre)
- Mini QIAamp® DNA izolasyon kiti (Qiagen)
- GelRed nukleik asid boyama çözeltisi (Biotium)
- Akrlamid/Bis<sup>TM</sup> 19:1 (Amresco)
- Tetramethylethylenediamine (TEMED, Amresco)
- Amonium Persulfate (APS, Amresco)
- 1,5 ml'lik Ependorf tüp
- 0.1-10 µl'lik filtreli pipet ucu
- 1-20 µl'lik filtreli pipet ucu
- 200 µl'lik filtreli pipet ucu
- 1000 µl'lik filtreli pipet ucu
- 0.2 ml'lik optik PCR tüpü (Bio-Rad)
- 0,2 ml Strip tüpü (Bio-Rad)
- K562 Yüksek Moleküler Ağırlıklı DNA (Promega)
- Rotor-Gene® SYBR Green ® PCR kit (Qiagen)
- 150 Mer 6 adet Primer ( HPLC Grade)

### 3.1.1 Çalışma planı

Deneyler aşağıda belirtilen sıraya göre yapıldı;

- DNA örneklerinin toplanması
- Örneklerin DNA izolasyonu
- DNA örneklerinin kalitesi ve miktarının belirlenmesi
- Primerlerin hazırlanması
- PCR optimizasyonu
- Standart eğrinin oluşturulması
- Tüm örneklerin Real Time PCR çalışması
- Real Time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi
- Sonuçların karşılaştırmalı Ct değerlendirmesi

- İstatistiksel değerlendirme

Çalışma sırasında kontaminasyon riskini önlemek için tek kullanımlık eldiven, bone ve maske kullanıldı.

### **3.2 DNA örneklerinin toplanması**

Bu çalışmaya gönüllü katılmayı kabul eden her iki cinsiyetten yaşları 19 ile 46 arasında, 29 kadın ve 21 erkekten oluşan toplam 50 kişinin örnekleri kullanıldı. Bilgilendirilmiş olur formunu (Ek 3.) imzalayan katılımcılardan hem kan hem de ağız içi sürüntü (buccal swab) örnekleri alındı. Örnekleri alınan kişilerin listesi oluşturularak kod ve sıra numarası verildi.

### **3.3 Örneklerden DNA izolasyonu**

Kan örneklerinin DNA izolasyonu Mini QIAamp® DNA izolasyon kiti (Qiagen) ile, ağız içi sürüntü örneklerinin DNA izolasyonu ise BuccalAmp™ (Epicentre) kit kullanılarak yapıldı. Kitlere ait prosedürler Ek 1’de verilmiştir.

### **3.4 DNA miktarının ve saflığının ölçülmesi**

Örneklerden DNA izole edildikten sonra optimizasyon için DNA örneklerinin saflığının ve miktarının bilinmesi gerekir. DNA miktarı ve saflığı için izolatlar hem PAGE elektroforezinde yürütüldü hem de spektrofotometrede ölçümü yapıldı. PAGE elektroforez protokolü Ek 2’de verilmiştir. DNA izolatları PAGE jel elektroforezinde %8’lik jelde 250 V ve 40 dakika yürütüldü. Elektroforezden sonra jel GelRed nükleik asid boyama çözeltisiyle 10 dk. boyandı ve MiniBIS DNR Bio-İmaging Systems GelCapture programı kullanılarak DNA bantları görüntülendi.

DNA örnekler UV spektrofotometre Epoch Biotek cihazında 260 nm (DNA için) ve 280 nm (protein için) dalga boylarında absorbans değerleri ölçüldü. Analiz ise Gene5 version 1.10.8 programında yapıldı.

### 3.5 Primerlerin hazırlanması

Bu çalışma için toplam 6 adet primer sentezletti. Liyofilize halde sentezlenmiş primerlerden 100 µM stok çözelti hazırlamak için kullanılan primer dizileri, primer miktarları ve eklenen Tris-EDTA (TE) miktarları Tablo 1’te gösterilmiştir.

PCR aşamasında kullanılmak üzere hazırlanan primer ana stoklardan 20 µM’lık primer çözeltileri hazırlandı ve -20 °C’de saklandı.

**Tablo 1.** PCR’da kullanılan Primer dizileri ve 100 µM’lık stok çözeltinin hazırlanması

	Primerin adı	Primer Dizisi	Baz sayısı	Miktarı (nmol)	Eklenen TE (µl)
<b>Telomer bölgesi primerleri</b>	Tel-F (İleri)	5’-CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT- 3’	39	13.8	138
	Tel-R (Geri)	5’-CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT- 3’	39	10.2	102
<b>36B4 bölgesi primerleri</b>	36B4-F (İleri)	5’- CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC - 3’	23	44.0	440
	36B4-R (Geri)	5’- CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A- 3’	25	33.3	333
<b>β-globin bölgesi primerleri</b>	β-globin-F (İleri)	5’- GCT TCT GAC CAC ACT TGT TTC ACT AGC- 3’	27	21.9	219
	β-globin-F (Geri)	5’- CAC CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC- 3’	23	45.8	458

### 3.6 PCR optimizasyonu

Bu çalışma için özel olarak sentezlettilen primerlerin etkin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için toplam 25 µl hacimli PCR reaksiyonu Tablo2’de gösterildiği gibi hazırlandı. Telomer için Tel-F ve Tel-R, 36B4 için 36B4-F ve 36B4-R ve β-globin bölgesi

için  $\beta$ -globin-F ve  $\beta$ -globin-R primerleri kullanılarak , her bölge için 4'er adet olmak üzere toplamda 12 adet PCR yapıldı.

**Tablo 2.** Rotor-Gene® SYBR Green ® PCR bileşenleri

PCR bileşenleri	Eklenen hacimler ( $\mu$ l ) /reaksiyon
<b>2 x Rotor-Gene ®SYBR Green ® PCR Master Mıx</b>	12.50 $\mu$ l
<b>F primeri (20 <math>\mu</math>M)</b>	2.50 $\mu$ l
<b>R primeri (20 <math>\mu</math>M)</b>	2.50 $\mu$ l
<b>DNA</b>	2. - 5. $\mu$ l
<b>Distile su</b>	25 $\mu$ l'ye tamamlandı

PCR karışımları hazırlandıktan sonra kısa süre santrifüj yapılarak GeneAmp 9700 PCR cihazına yerleştirildi ve Tablo 3' de verilen döngü programa uygun şekilde PCR yapıldı.

**Tablo 3.** PCR döngü programı

Aşama	Sıcaklık	Zaman (saniye)	Döngü sayısı
<b>İlk denatürasyon</b>	95 °C	300	1
<b>Denatürasyon</b>	95 °C	5	50
<b>Bağlanma ve Uzama</b>	60 °C	10	
<b>Bekletme</b>	4 °C	$\infty$	

PCR ürünleri 200 V'de %8'lik PAGE elektroforezinde yürütülerek PCR'da çoğalma olup olmadığı (amplifikasyon) kontrol edildi.

### 3.7 Standart eğrinin oluşturulması

Standart eğrisini oluşturmak için K562 Yüksek Moleküler Ağırlıklı DNA ‘nın Tablo 4’te gösterildiği gibi, distile su ile 1/3 seri sulandırmalar yapıldı. Farklı konsantrasyonlarda toplam 8 adet standart DNA elde edildi.

Seyreltilen 8 adet K562 DNA örneği, hem telomer hem de 36B4 gen bölgelerini çoğaltan primerler ile Corbett Rotor Gene 6000 Real Time cihazında PCR yapıldı. Kullanılan K562 DNA örneklerinin konsantrasyonları Tablo 4’ te gösterilmektedir. PCR reaksiyon bileşenleri ve döngü programı Tablo 2 ve Tablo 3’e uygun şekilde yapıldı. Rotor-Gene ScreenClust HRM Software® analiz programında telomer ve 36B4 için standart eğrisi oluşturuldu.

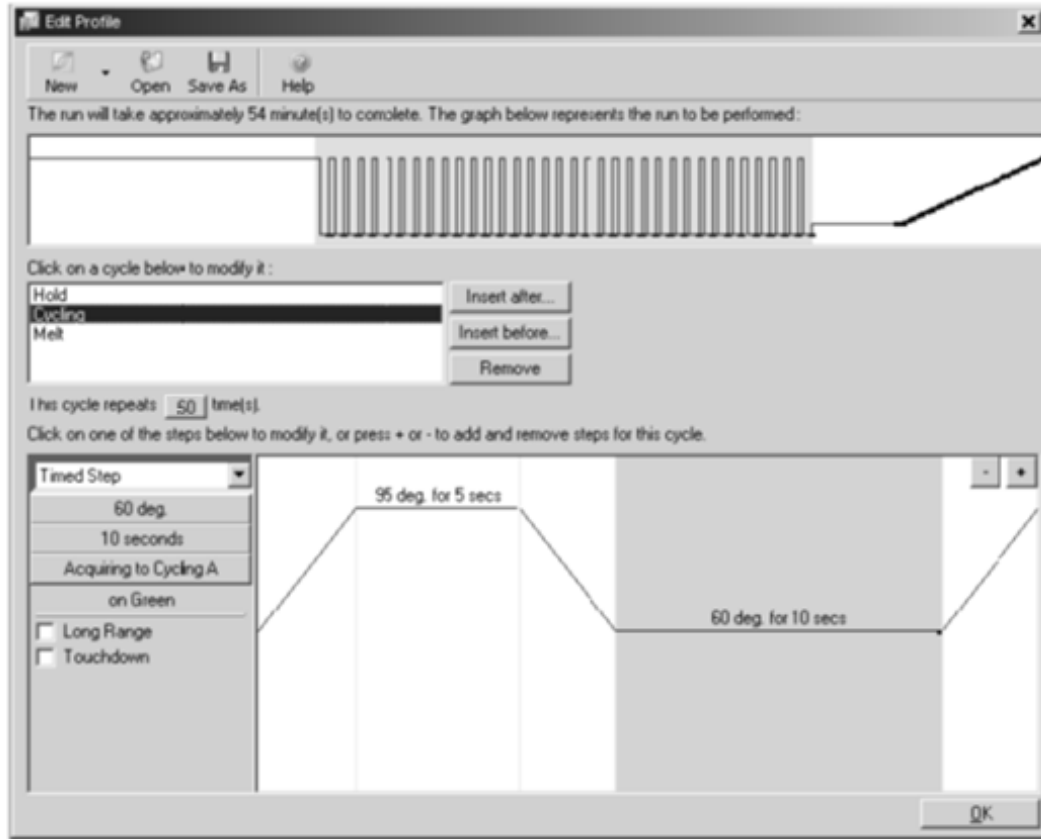
**Tablo 4.** K562 Yüksek Moleküler Ağırlıklı DNA ‘nın seyreltme faktörü tablosu

Seyreltme Faktörü	K562 DNA standart konsantrasyonu ng/μl
3X	50.0
3X	16.7
3X	5.56
3X	1.85
3X	0.62
3X	0.21
3X	0.068
3X	0.023

### 3.8 Tüm örneklerin Real-Time PCR çalışması

İzole edilen tüm DNA örneklerinin hem telomer hem de referans 36B4 gen bölgesini çoğaltan primerler kullanılarak Tablo 2 ve Tablo 3'te belirtilen koşullara uygun şekilde Corbett Rotor Gene 6000 cihazında PCR yapıldı. Cihazın döngü parametreleri Şekil 8'de gösterilmektedir. Çalışmada sağlıklı ve gerçekçi değerler elde etmek için her örnek için üçer adet (triplet) PCR yapıldı. Ayrıca her bir çalışma setinde negatif kontrol (distile su) kullanıldı.

Corbett Rotor Gene 6000 PCR cihazında 72'lik rotor kullanıldığından her bir sette 72 PCR reaksiyonu çalışıldı. Dolayısıyla her PCR çalışmasında 23 DNA örneği (her bir örnek için üçer adet PCR) ve 1 negatif kontrol kullanıldı. Tüm örnekler Rotor-Gene ScreenClust HRM Software ® ile analiz edildi.



Şekil 9: Corbett Rotor Gene 6000 cihazında iki adımlı PCR programının ayarlanması



### 3.9 Real-Time PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Real-Time PCR'dan elde edilen sonuçlar Rotor-Gene ScreenClust HRM® programında Ct metodu ile değerlendirildi. Program aracılığı ile yürütmelerin başarılı olup olmadığını anlamak için her örneğin Ct değeri saptandı. Sonuç alınamayan örneklerde çalışmalar tekrar edildi. Verileri farklı parametrelere göre değerlendirebilmek için bir veri tabanı oluşturuldu.

### 3.10 Sonuçların karşılaştırmalı Ct değerlendirmesi

Çalışılan tüm örneklerden ve kalibratörden (K562) elde edilen Ct değerlerinden bir veri tablosu oluşturuldu. Veri tablosunda her örneğin, kodu, telomer ve 36B4 bölgesine ait üçer adet sonucu ve aynı bölgeler için kalibratörden elde edilen değerler yazıldı. Daha sonra triplet (üçlü) örneklerin standart sapmaları belirlendi ve bu değerler üzerinde Cawthon ve Hewakapuge'in metodlarında kullandıkları denklemlere göre hesaplamalar yapıldı (1,34).

Cawthon'nun metodunda  $\Delta Ct$  değerleri ve bu değerlere bağlı  $\Delta\Delta Ct$  değerleri aşağıda verilen denklemlere göre hesaplandı. Aynı bireye ait tükürük ve kan örneklerine ait telomer uzunluk farkları belirlendi.

$$\left( \frac{2^{Ct(\text{telomer})}}{2^{Ct(36B4)}} \right)^{-1} = 2^{-\Delta Ct}$$

$$2^{-(\Delta Ct1 - \Delta Ct2)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Ayrıca, tüm örneklerin Ct değerleri Hewakapuge'nin aşağıda verilen denklemine göre de analiz edildi.

$$\frac{\frac{Ct(\text{telomer})}{Ct(36B4)} \text{Örnek}}{\frac{Ct(\text{telomer})}{Ct(36B4)} \text{Kalibratör}} = \text{Rölatif Telomer Uzunluğu}$$

Elde edilen  $\Delta\Delta Ct$  ve rölatif telomer uzunluk değerleri örneklerin gerçek yaşları ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucu elde edilen verilerden grafikler oluşturuldu.

### 3.11 İstatistiksel değerlendirme

Karşılaştırmadan elde edilen sonuçların istatistikî değerlendirmeleri yapılarak kan ve ağız içi svap örneklerine ait yaş tahmini ile ilgili regresyon analizi yapıldı. Her örnekte yapılan üçlü tekrar sonuçları birbirleri ile kıyaslandı. Aynı kişiye ait kan ve ağız içi svap örneklerinden elde edilen sonuçlar, kişilerin gerçek yaşlarıyla karşılaştırıldı. Microsoft Excel programı kullanılarak istatistiksel uygunluk testleri yapıldı ve  $R^2$  değerleri belirlendi.

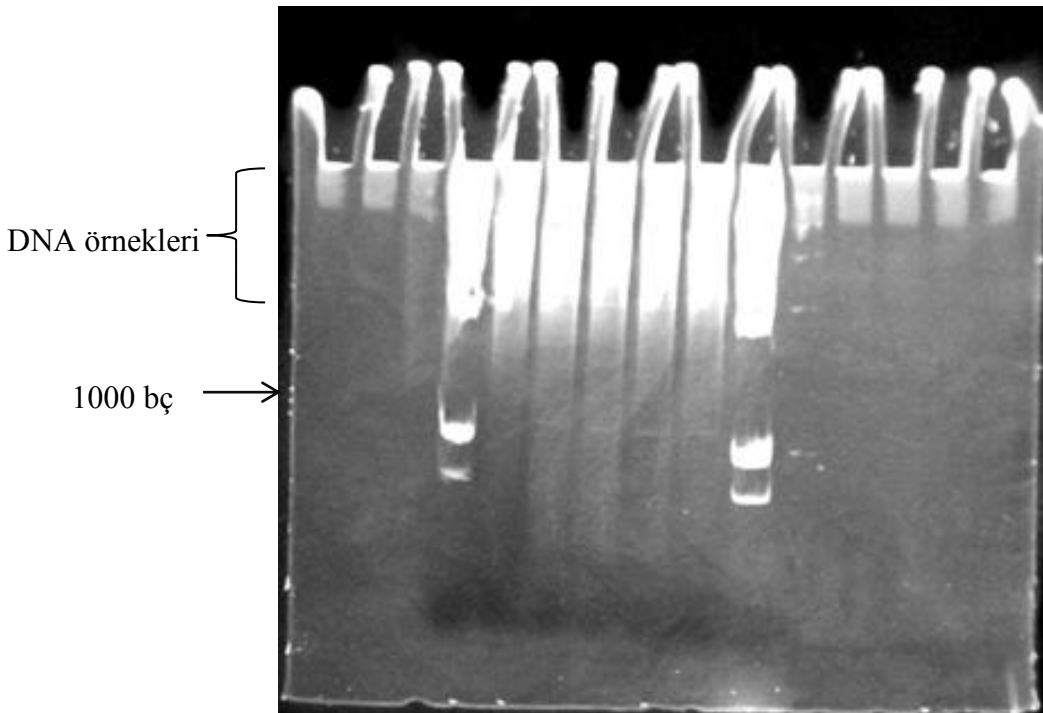
#### 4. BULGULAR

Bu çalışmada 50 gönüllüden alınan kan ve ağız içi sürüntü (tükürük) örneklerinden elde edilen DNA örneklere özgün primerleri kullanarak Real-Time PCR yapıldı. Telomerlerden elde edilen bağlantı değerleri ile kişilerin gerçek yaşları kıyaslandı

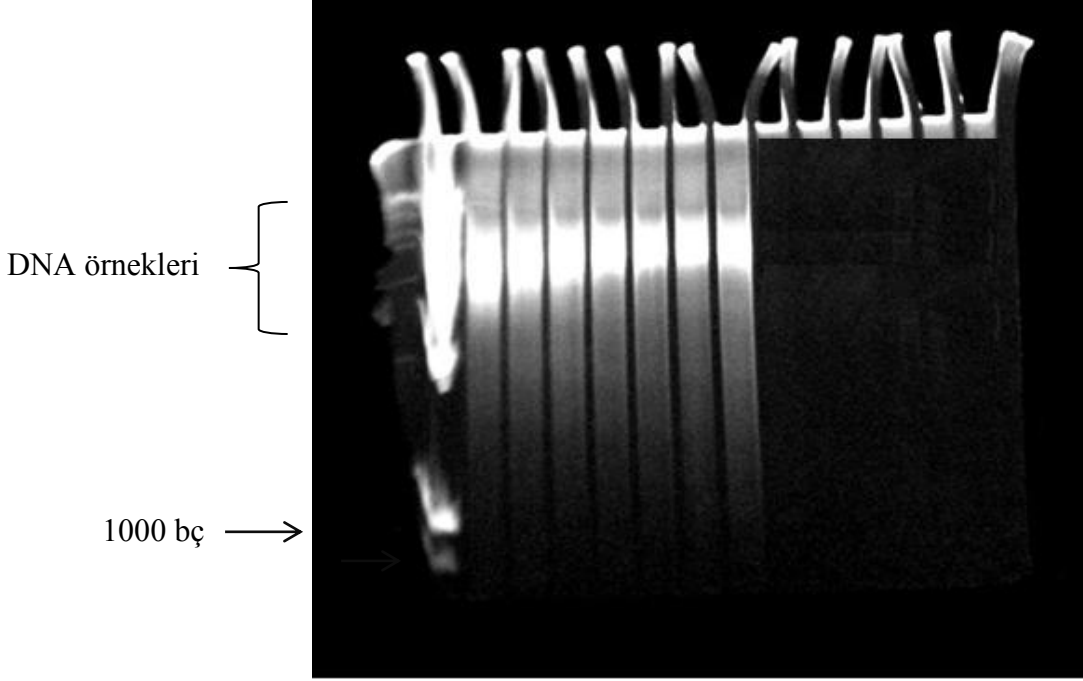
Kan ve ağız içi sürüntü örneklerinin DNA izolatları %8'lik Poliakrilamid jel elektroforezinde (PAGE) yürütüldü. Elde edilen sonuçlar Şekil 10 ve 11'de gösterilmektedir. Ayrıca ortalama DNA konsantrasyonları da Tablo 5'te verilmiştir.

**Tablo 5.** Kan ve ağız içi sürüntü örneklerinden elde edilen en düşük ve en yüksek DNA miktarları

Örnek tipi	DNA Konsantrasyonları (ng/μl)
Kan	40-85
Ağız içi sürüntü	15-30

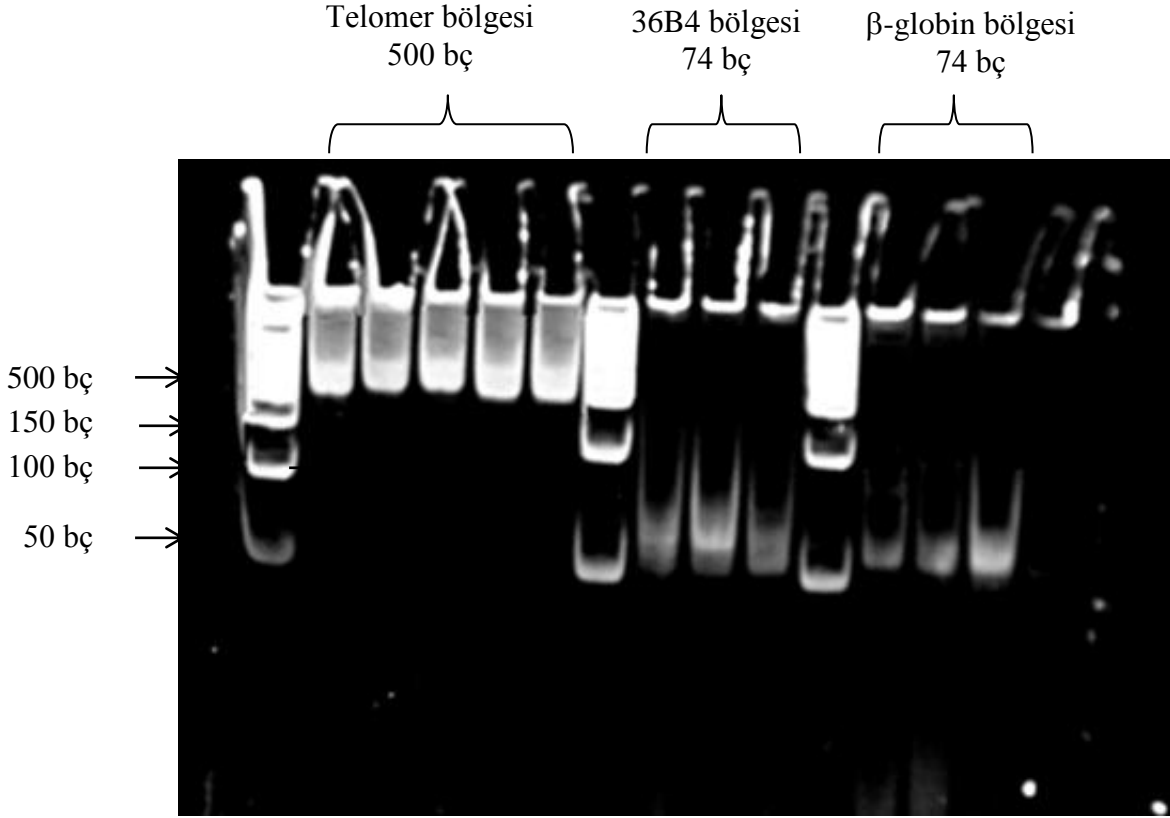


**Şekil 10:** Kandan izole edilen DNA'ların %8'lik PAGE görüntüsü



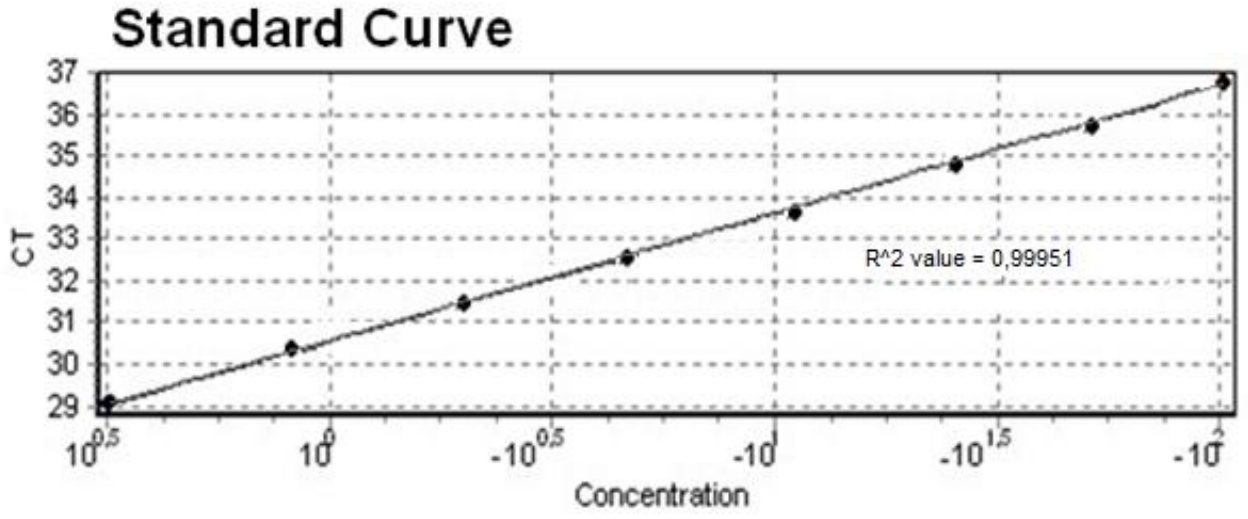
**Şekil 11:** Ağız içi sürüntü örneklerinden izole edilen DNA'ların %8'lik PAGE görüntüsü

Bölüm 3.6'da anlatıldığı şekilde yapılan PCR sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin telomer bölgesi için 500 bç, 36B4 ve  $\beta$ -globin bölgesi için 74 bç olarak belirlendi. PCR ürünlerine ait PAGE elektroforez sonuçları Şekil 12'de gösterilmiştir.

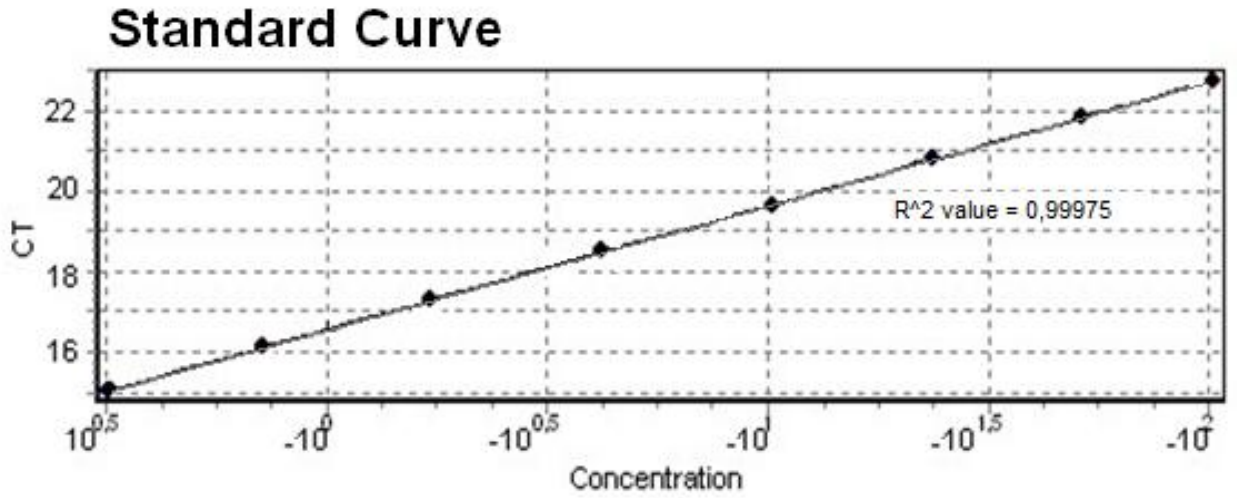


**Şekil 12:** PCR optimizasyonu sonucu elde edilen ürünlerinin %8'lik PAGE görüntüsü

Tablo 4'te gösterildiği şekilde farklı konsantrasyonlarda (50ng/μl - 0.023 ng/μl) hazırlanan K562 Yüksek Moleküler Ağırlıklı DNA'nın Rotor-Gene ScreenClust HRM Software ® programında analizi sonucunda telomer ve 36B4 bölgesi için elde edilen standart eğri sırasıyla Şekil 13'te ve Şekil 14'te gösterilmiştir.

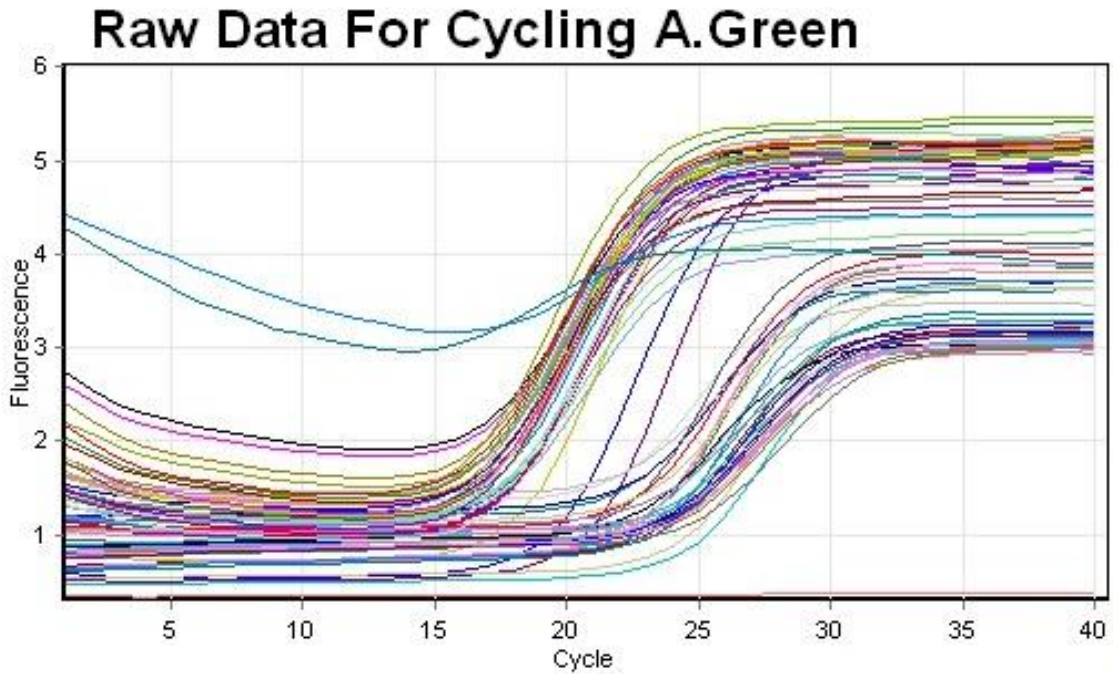


Şekil 13: Telomer bölgesine ait standart eğri

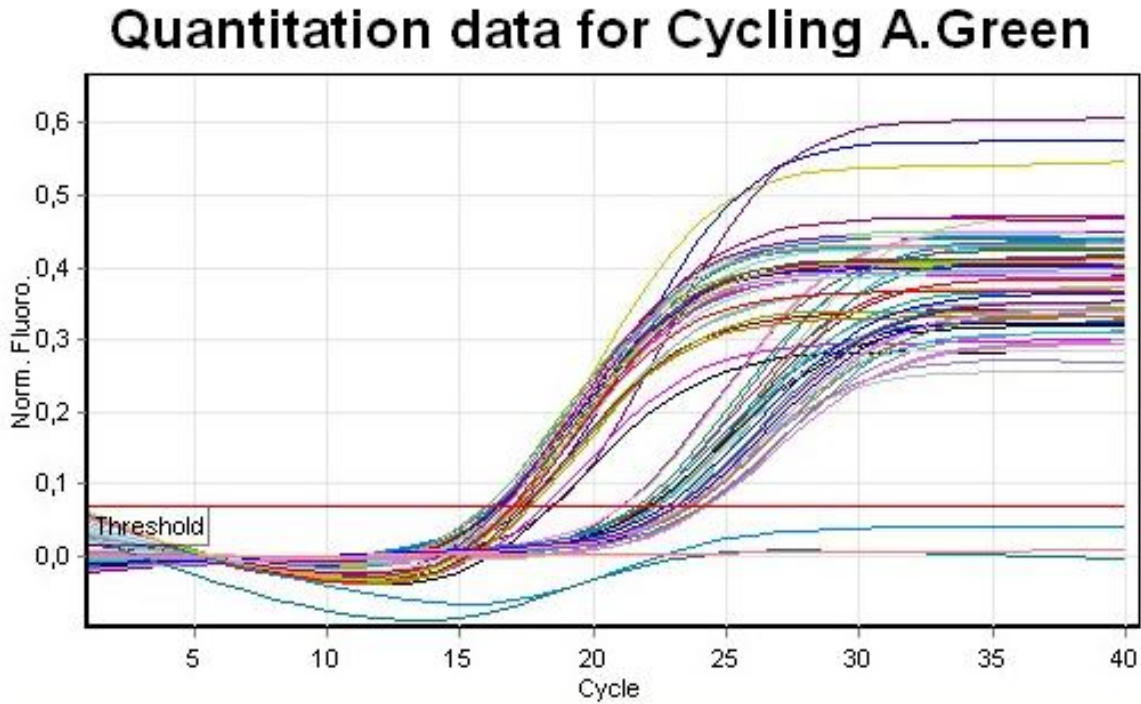


Şekil 14: 36B4 bölgesine ait standart eğri

Rotor-Gene ScreenClust HRM Software ® analiz programında telomer bölgesi için bir set (23 örnek ve bir adet negatif kontrol) çalışmasından elde edilen ham veri grafiği Şekil 15'te ve kantifikasyon (miktar) sonuçları Şekil 16'da gösterilmiştir.



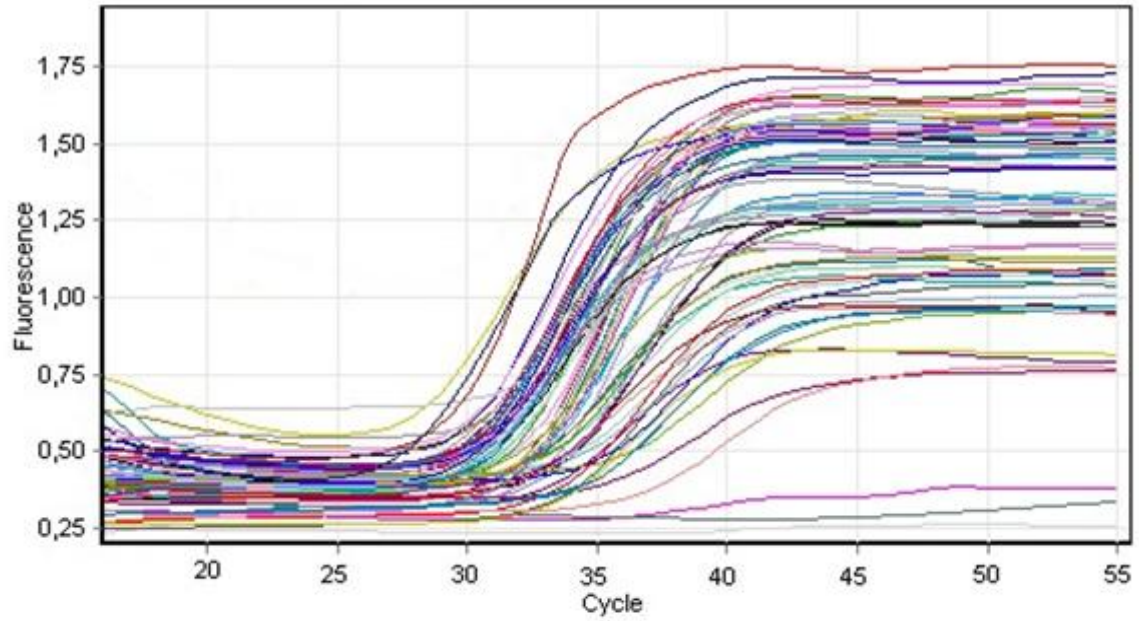
**Şekil 15:** Bir set çalışma sonucu telomer bölgesi için elde edilen Real-Time PCR ham veri grafiği



**Şekil 16:** Bir set çalışma sonucu telomer bölgesi için elde edilen kantifikasyon sonuçları

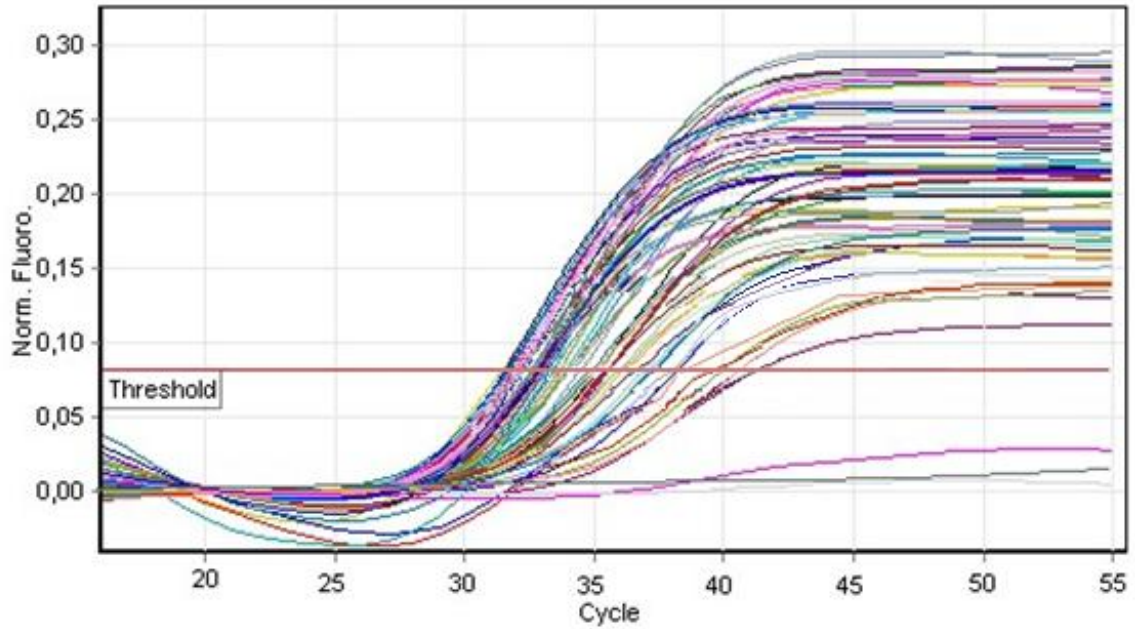
Aynı sette kullanılan DNA örneklerinin 36B4 bölgesini çoğaltan primerler kullanarak elde edilen ham veri grafiği Şekil 17'de ve kantifikasyon (miktar) sonuçları Şekil 18'de gösterilmiştir.

## Raw Data For Cycling A.Green



Şekil 17: Bir set çalışma sonucu 36B4 bölgesi için elde edilen Real-Time PCR ham veri grafiği

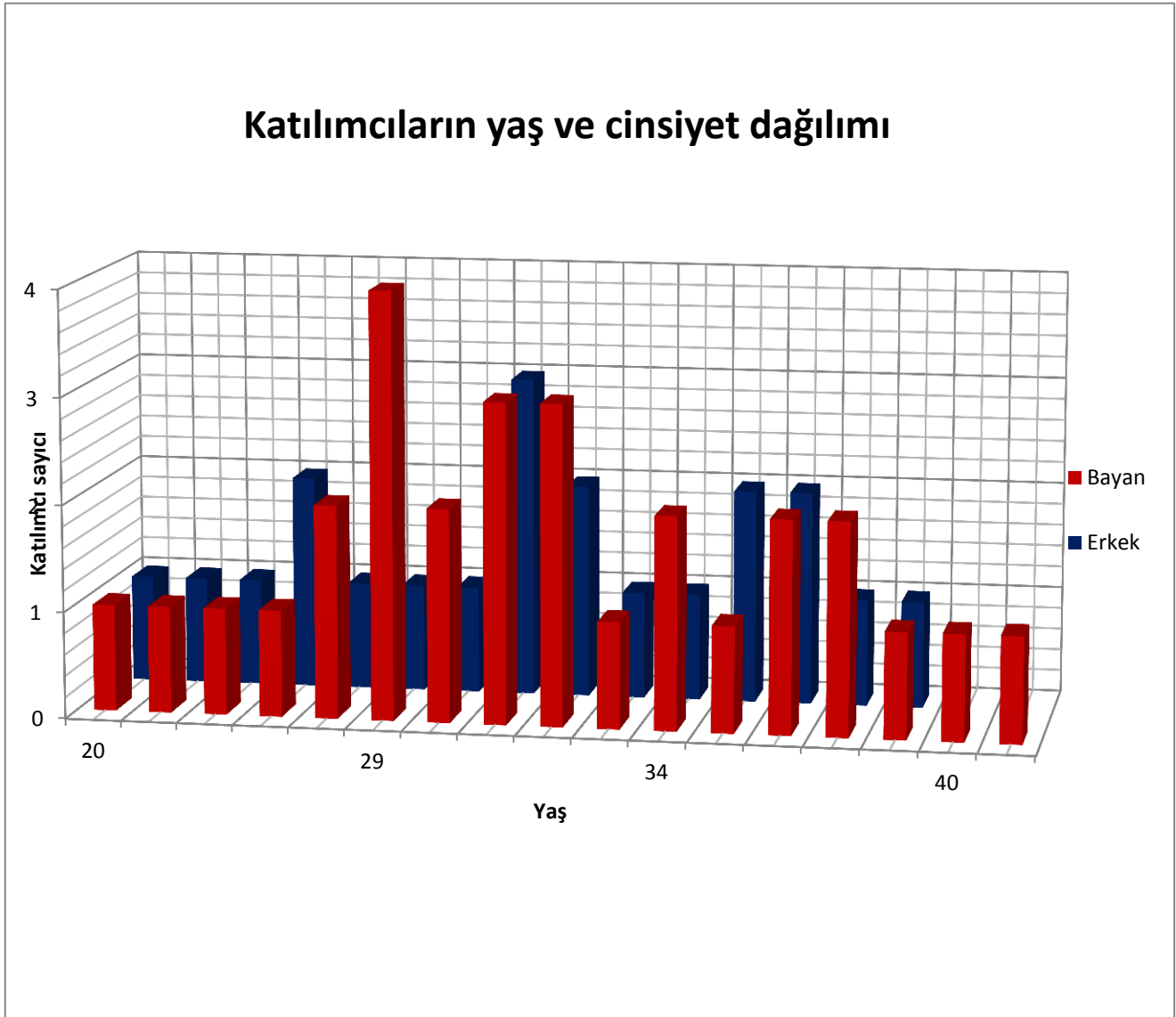
## Quantitation data for Cycling



Şekil 18: Bir set çalışma sonucu 36B4 bölgesi için elde edilen kantifikasyon sonuçları



Bu çalışmaya gönüllü katılan 29 kadın ve 21 erkekten oluşan toplam 50 kişinin, gerçek yaş dağılımı ve cinsiyet dağılımı Şekil 19'da gösterilmiştir.



**Şekil 19:** Katılımcıların yaş ve cinsiyet dağılımı

**Tablo 6.** Tüm örneklerden elde edilen veri tablosu

Katılımcı	Cinsiyet	Örnek tipii	Yaş	Ct (tel)			Ct (tel) standart sapma	Ct (ortalama)	Ct (36B4)			Ct (36B4)			Ct (36B4) standart sapma	Ct (36B4) (ortalama)	kalibratör Ct-tel (ortalama)	kalibratör Ct (36B4) (ortalama)	$\Delta$ Ct örnek = $2^{\Delta}$ - $\Delta$ Ct	$\Delta$ Ct kalibratör	Cawthon metdodu $\Delta\Delta$ Ct değeri	Hewakapuge denklemleri Rölatif Telomer Uzunluğu
1	K	KAN	29	17,33	17,34	17,42	0,05	<b>17,36</b>	43,6	43,66	43,65	43,6	43,66	43,65	0,02	<b>43,64</b>	19,7	36,2	-26,28	-16,52	<b>9,76</b>	<b>0,73</b>
		AGİZ İÇİ SVAP		21,26	21,41	21,41	0,09	<b>21,36</b>	48,55	48,58	48,53	48,55	48,58	48,53	0,03	<b>48,55</b>	19,7	36,2	-27,19	-16,52	<b>10,67</b>	<b>0,81</b>
2	K	KAN	33	18,35	18,37	18,32	0,03	<b>18,35</b>	41,7	41,67	41,69	41,7	41,67	41,69	0,03	<b>41,71</b>	19,7	36,2	-23,36	-16,52	<b>6,84</b>	<b>0,81</b>
		AGİZ İÇİ SVAP		23,06	23,06	22,96	0,06	<b>23,03</b>	49,75	49,66	49,69	49,75	49,66	49,69	0,05	<b>49,70</b>	19,7	36,2	-26,67	-16,52	<b>10,15</b>	<b>0,85</b>
3	E	KAN	33	16,77	16,84	16,84	0,04	<b>16,82</b>	44,11	44,13	44,00	44,11	44,13	44,00	0,07	<b>44,08</b>	19,7	36,2	-27,26	-16,52	<b>10,74</b>	<b>0,70</b>
		AGİZ İÇİ SVAP		22,26	22,41	22,26	0,09	<b>22,31</b>	49,05	49,00	48,95	49,05	49,00	48,95	0,05	<b>49,00</b>	19,7	36,2	-26,69	-16,52	<b>10,17</b>	<b>0,84</b>
4	E	KAN	43	16,41	16,84	17,06	0,33	<b>16,77</b>	39,75	39,85	39,78	39,75	39,85	39,78	0,05	<b>39,79</b>	19,7	36,2	-23,02	-16,52	<b>6,50</b>	<b>0,78</b>
		AGİZ İÇİ SVAP		22,30	22,70	22,33	0,22	<b>22,44</b>	49,88	49,75	49,80	49,88	49,75	49,80	0,07	<b>49,81</b>	19,7	36,2	-27,37	-16,52	<b>10,85</b>	<b>0,83</b>
5	K	KAN	37	16,03	16,17	16,17	0,08	<b>16,12</b>	42,55	42,63	42,53	42,55	42,63	42,53	0,05	<b>42,57</b>	19,7	36,2	-26,45	-16,52	<b>9,93</b>	<b>0,70</b>
		AGİZ İÇİ SVAP		21,94	22,04	22,04	0,06	<b>22,01</b>	47,82	47,78	47,75	47,82	47,78	47,75	0,04	<b>47,78</b>	19,7	36,2	-25,78	-16,52	<b>9,26</b>	<b>8,85</b>
6	K	KAN	31	16,55	16,54	16,62	0,04	<b>16,57</b>	42,55	42,53	42,47	42,55	42,53	42,47	0,04	<b>42,52</b>	19,7	36,2	-25,95	-16,52	<b>9,43</b>	<b>0,72</b>
		AGİZ İÇİ SVAP		22,97	22,84	22,97	0,08	<b>22,93</b>	48,53	48,61	48,47	48,53	48,61	48,47	0,07	<b>48,54</b>	19,7	36,2	-25,61	-16,52	<b>9,09</b>	<b>0,87</b>
7	E	KAN	31	15,96	16,10	16,04	0,07	<b>16,03</b>	43,71	43,60	43,67	43,71	43,60	43,67	0,06	<b>43,66</b>	19,7	36,2	-27,63	-16,52	<b>11,11</b>	<b>0,68</b>

Katılımcı	Cinsiyet	Örnek tipil	Yaş	Ct (tel)			Ct (tel) standart sapma	Ct (ortalama)	Ct (36B4)			Ct (36B4)			Ct (36B4) standart sapma	Ct (36B4) (ortalama)	kalibratör Ct-tel (ortalama)	kalibratör Ct (36B4) (ortalama)	$\Delta Ct$ örnek = $2^{\Delta Ct}$	$\Delta Ct$ kalibratör	Cawthon metoddu $\Delta \Delta Ct$ değeri	Hewakapuge denklemleri Rölatif Telomer Uzunluğu
7	E	AGIZ İÇİ SVAP	31	20,96	21,12	21,00	0,08	<b>21,03</b>	47,72	47,83	47,78	47,72	47,83	47,78	0,04	<b>47,81</b>	19,7	36,2	-26,78	-16,52	<b>10,26</b>	<b>0,81</b>
8	K	KAN	29	19,81	20,13	19,81	0,18	<b>19,92</b>	45,81	45,76	45,74	45,81	45,76	45,74	0,04	<b>45,77</b>	19,7	36,2	-25,85	-16,52	<b>9,33</b>	<b>0,80</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		20,59	20,61	20,57	0,02	<b>20,59</b>	48,65	48,70	48,59	48,65	48,70	48,59	0,06	<b>48,65</b>	19,7	36,2	-28,06	-16,52	<b>11,54</b>	<b>0,78</b>
9	K	KAN	29	20,17	20,17	20,03	0,08	<b>20,12</b>	42,30	42,88	42,97	42,30	42,88	42,97	0,06	<b>42,93</b>	19,7	36,2	-22,80	-16,52	<b>6,28</b>	<b>0,86</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		20,01	19,89	19,97	0,06	<b>19,96</b>	43,68	43,72	43,62	43,68	43,72	43,62	0,05	<b>43,67</b>	19,7	36,2	-23,72	-16,52	<b>7,20</b>	<b>0,84</b>
10	K	KAN	34	19,88	19,92	19,88	0,02	<b>19,89</b>	44,48	44,30	44,36	44,48	44,30	44,36	0,09	<b>44,38</b>	19,7	36,2	-24,49	-16,52	<b>7,97</b>	<b>0,82</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		23,00	22,94	23,08	0,07	<b>23,01</b>	47,42	47,36	47,38	47,42	47,36	47,38	0,03	<b>47,39</b>	19,7	36,2	-24,38	-16,52	<b>7,86</b>	<b>0,89</b>
11	K	KAN	29	18,65	18,53	18,53	0,07	<b>18,57</b>	40,12	40,20	40,22	40,12	40,20	40,22	0,05	<b>40,18</b>	19,7	36,2	-21,61	-16,52	<b>5,09</b>	<b>0,85</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		23,47	23,63	23,47	0,09	<b>23,52</b>	48,70	48,82	48,86	48,70	48,82	48,86	0,08	<b>48,79</b>	19,7	36,2	-25,27	-16,52	<b>8,75</b>	<b>0,89</b>
12	K	KAN	46	19,69	19,69	19,69	0,00	<b>19,69</b>	42,39	42,31	42,39	42,39	42,31	42,39	0,05	<b>42,36</b>	19,7	36,2	-22,67	-16,52	<b>6,15</b>	<b>0,86</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		21,34	21,24	21,34	0,06	<b>21,31</b>	48,40	48,52	48,49	48,40	48,52	48,49	0,06	<b>48,47</b>	19,7	36,2	-27,16	-16,52	<b>10,64</b>	<b>0,81</b>
13	E	KAN	19	18,80	18,77	18,88	0,06	<b>18,82</b>	41,52	41,52	41,49	41,52	41,52	41,49	0,02	<b>41,51</b>	19,7	36,2	-22,69	-16,52	<b>6,17</b>	<b>0,83</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		23,31	23,26	23,31	0,03	<b>23,29</b>	47,42	47,50	47,49	47,42	47,50	47,49	0,04	<b>47,47</b>	19,7	36,2	-24,18	-16,52	<b>7,66</b>	<b>0,90</b>
14	E	KAN	27	20,11	20,12	20,01	0,06	<b>20,08</b>	39,72	39,78	39,77	39,72	39,78	39,77	0,03	<b>39,76</b>	19,7	36,2	-19,68	-16,52	<b>3,16</b>	<b>0,93</b>

Katılımcı	Cinsiyet	Örnek tipil	Yaş	Ct (tel)			Ct (tel) standart sapma	Ct (ortalama)	Ct (36B4)			Ct (36B4)			Ct (36B4) standart sapma	Ct (36B4) (ortalama)	kalibratör Ct-tel (ortalama)	kalibratör Ct (36B4) (ortalama)	$\Delta Ct$ örnek = $2^{\Delta Ct}$	$\Delta Ct$ kalibratör	Cawthon metoddu $\Delta \Delta Ct$ değeri	Hewakapuge denklemleri Rölatif Telomer Uzunluğu
14	E	AGIZ İÇİ SVAP	27	25,87	25,75	25,87	0,07	<b>25,83</b>	48,42	48,43	48,45	48,42	48,43	48,45	0,02	<b>48,43</b>	19,7	36,2	-22,60	-16,52	<b>6,08</b>	<b>0,98</b>
15	K	KAN	28	20,93	20,89	21,04	0,08	<b>20,95</b>	40,45	40,39	40,41	40,45	40,39	40,41	0,03	<b>40,42</b>	19,7	36,2	-19,46	-16,52	<b>2,94</b>	<b>0,95</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		24,20	24,22	24,20	0,01	<b>24,21</b>	47,92	47,92	47,88	47,92	47,92	47,88	0,02	<b>47,91</b>	19,7	36,2	-23,70	-16,52	<b>7,18</b>	<b>0,93</b>
16	K	KAN	37	20,19	20,32	20,19	0,08	<b>20,23</b>	39,64	39,66	39,61	39,64	39,66	39,61	0,03	<b>39,64</b>	19,7	36,2	-19,40	-16,52	<b>2,88</b>	<b>0,94</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		23,03	23,03	22,99	0,02	<b>23,02</b>	48,31	48,29	48,30	48,31	48,29	48,30	0,01	<b>48,30</b>	19,7	36,2	-25,28	-16,52	<b>8,76</b>	<b>0,88</b>
17	K	KAN	25	19,29	19,22	19,31	0,05	<b>19,27</b>	37,85	37,83	37,85	37,85	37,83	37,85	0,01	<b>37,84</b>	19,7	36,2	-18,57	-16,52	<b>2,05</b>	<b>0,94</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		23,26	23,26	23,14	0,07	<b>23,22</b>	45,85	45,87	45,85	45,85	45,87	45,85	0,01	<b>45,86</b>	19,7	36,2	-22,64	-16,52	<b>6,12</b>	<b>0,93</b>
18	K	KAN	31	20,24	20,23	20,24	0,01	<b>20,24</b>	37,75	37,72	37,70	37,75	37,72	37,70	0,03	<b>37,72</b>	19,7	36,2	-17,49	-16,52	<b>0,97</b>	<b>0,99</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		25,80	25,83	25,80	0,02	<b>25,81</b>	48,15	48,12	48,13	48,15	48,12	48,13	0,02	<b>48,13</b>	19,7	36,2	-22,32	-16,52	<b>5,80</b>	<b>0,99</b>
19	E	KAN	22	16,59	16,47	16,46	0,07	<b>16,51</b>	42,15	42,17	42,15	42,15	42,17	42,15	0,01	<b>42,16</b>	19,7	36,2	-25,65	-16,52	<b>9,13</b>	<b>0,72</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		21,10	21,27	21,15	0,09	<b>21,17</b>	49,11	49,12	49,08	49,11	49,12	49,08	0,02	<b>49,10</b>	19,7	36,2	-27,93	-16,52	<b>11,41</b>	<b>0,79</b>
20	K	KAN	34	16,72	16,85	16,85	0,08	<b>16,81</b>	42,75	42,70	42,72	42,75	42,70	42,72	0,03	<b>42,72</b>	19,7	36,2	-25,92	-16,52	<b>9,40</b>	<b>0,72</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		22,37	22,32	22,34	0,03	<b>22,34</b>	48,75	48,77	48,77	48,75	48,77	48,77	0,01	<b>48,76</b>	19,7	36,2	-26,42	-16,52	<b>9,90</b>	<b>0,84</b>
21	K	KAN	31	17,23	17,20	17,27	0,04	<b>17,23</b>	38,41	38,40	38,44	38,41	38,40	38,44	0,02	<b>38,42</b>	19,7	36,2	-21,18	-16,52	<b>4,66</b>	<b>0,83</b>

Katılımcı	Cinsiyet	Örnek tipil	Yaş	Ct (tel)			Ct (tel) standart sapma	Ct (ortalama)	Ct (36B4)			Ct (36B4)			Ct (36B4) standart sapma	Ct (36B4) (ortalama)	kalibratör Ct-tel (ortalama)	kalibratör Ct (36B4) (ortalama)	$\Delta Ct$ örnek = $2^{\Delta Ct}$	$\Delta Ct$ kalibratör	Cawthon metoddu $\Delta \Delta Ct$ değeri	Hewakapuge denklemleri Rölatif Telomer Uzunluğu
21	K	AGIZ İÇİ SVAP	31	24,31	24,23	24,31	0,05	<b>24,28</b>	46,55	46,48	46,50	46,55	46,48	46,50	0,04	<b>46,51</b>	19,7	36,2	-22,23	-16,52	<b>5,71</b>	<b>0,96</b>
22	K	KAN	32	17,73	17,56	17,71	0,09	<b>17,67</b>	40,11	40,09	40,13	40,11	40,09	40,13	0,02	<b>40,11</b>	19,7	36,2	-22,44	-16,52	<b>5,92</b>	<b>0,81</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		23,07	23,11	23,11	0,02	<b>23,10</b>	47,67	47,68	47,65	47,67	47,68	47,65	0,02	<b>47,67</b>	19,7	36,2	-24,57	-16,52	<b>8,05</b>	<b>0,89</b>
23	E	KAN	32	17,06	17,03	17,13	0,05	<b>17,07</b>	43,58	43,60	43,59	43,58	43,60	43,59	0,01	<b>43,59</b>	19,7	36,2	-26,52	-16,52	<b>10,00</b>	<b>0,72</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		23,54	23,63	23,54	0,05	<b>23,57</b>	49,23	49,20	49,20	49,23	49,20	49,20	0,02	<b>49,21</b>	19,7	36,2	-25,64	-16,52	<b>9,12</b>	<b>0,88</b>
24	E	KAN	33	16,93	17,03	17,02	0,06	<b>16,99</b>	42,58	42,56	42,55	42,58	42,56	42,55	0,02	<b>42,56</b>	19,7	36,2	-25,57	-16,52	<b>9,05</b>	<b>0,73</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		22,99	23,11	23,06	0,06	<b>23,05</b>	49,78	49,77	49,77	49,78	49,77	49,77	0,01	<b>49,77</b>	19,7	36,2	-26,72	-16,52	<b>10,20</b>	<b>0,85</b>
25	K	KAN	38	19,07	19,02	19,13	0,06	<b>19,07</b>	39,55	39,51	39,56	39,55	39,51	39,56	0,03	<b>39,54</b>	19,7	36,2	-20,47	-16,52	<b>3,95</b>	<b>0,89</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		25,35	25,40	25,40	0,03	<b>25,38</b>	47,77	47,75	47,76	47,77	47,75	47,76	0,01	<b>47,76</b>	19,7	36,2	-22,38	-16,52	<b>5,86</b>	<b>0,98</b>
26	E	KAN	35	18,59	18,50	18,68	0,09	<b>18,59</b>	41,11	41,10	41,09	41,11	41,10	41,09	0,01	<b>41,10</b>	19,7	36,2	-22,51	-16,52	<b>5,99</b>	<b>0,83</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		24,93	25,01	24,98	0,04	<b>24,97</b>	47,75	47,77	47,70	47,75	47,77	47,70	0,04	<b>47,74</b>	19,7	36,2	-22,77	-16,52	<b>6,25</b>	<b>0,96</b>
27	E	KAN	39	18,89	18,93	19,07	0,09	<b>18,96</b>	43,31	43,33	43,32	43,31	43,33	43,32	0,01	<b>43,32</b>	19,7	36,2	-24,36	-16,52	<b>7,84</b>	<b>0,81</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		23,94	23,90	23,91	0,02	<b>23,92</b>	48,88	48,90	48,92	48,88	48,90	48,92	0,02	<b>48,90</b>	19,7	36,2	-24,98	-16,52	<b>8,46</b>	<b>0,90</b>
28	K	KAN	35	18,92	18,96	19,04	0,06	<b>18,97</b>	38,64	38,65	38,66	38,64	38,65	38,66	0,01	<b>38,65</b>	19,7	36,2	-19,68	-16,52	<b>3,16</b>	<b>0,90</b>

Katılımcı	Cinsiyet	Örnek tipil	Yaş	Ct (tel)			Ct (tel) standart sapma	Ct (ortalama)	Ct (36B4)			Ct (36B4)			Ct (36B4) standart sapma	Ct (36B4) (ortalama)	kalibratör Ct-tel (ortalama)	kalibratör Ct (36B4) (ortalama)	$\Delta Ct$ örnek = $2^{\Delta Ct}$	$\Delta Ct$ kalibratör	Cawthon metodu $\Delta \Delta Ct$ değeri	Hewakapuge denklemleri Rölatif Telomer Uzunluğu
28	K	AGIZ İÇİ SVAP	35	23,23	23,23	23,16	0,04	<b>23,21</b>	47,75	47,73	47,77	47,75	47,73	47,77	0,02	<b>47,75</b>	19,7	36,2	-24,54	-16,52	<b>8,02</b>	<b>0,89</b>
29	K	KAN	30	18,94	19,10	18,99	0,08	<b>19,01</b>	36,66	36,65	36,65	36,66	36,65	36,65	0,01	<b>36,65</b>	19,7	36,2	-17,64	-16,52	<b>1,12</b>	<b>0,95</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		26,51	26,34	26,37	0,09	<b>26,41</b>	45,75	45,78	45,80	45,75	45,78	45,80	0,03	<b>45,78</b>	19,7	36,2	-19,37	-16,52	<b>2,85</b>	<b>1,06</b>
30	K	KAN	20	18,51	18,54	18,47	0,04	<b>18,51</b>	41,11	41,13	41,14	41,11	41,13	41,14	0,02	<b>41,13</b>	19,7	36,2	-22,62	-16,52	<b>6,10</b>	<b>0,83</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		23,65	23,58	23,71	0,07	<b>23,65</b>	47,64	47,65	47,63	47,64	47,65	47,63	0,01	<b>47,64</b>	19,7	36,2	-23,99	-16,52	<b>7,47</b>	<b>0,91</b>
31	K	KAN	38	18,09	18,11	17,96	0,08	<b>18,05</b>	39,58	39,56	39,61	39,58	39,56	39,61	0,03	<b>39,58</b>	19,7	36,2	-21,53	-16,52	<b>5,01</b>	<b>0,84</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		23,97	23,89	24,02	0,07	<b>23,96</b>	49,31	49,33	49,35	49,31	49,33	49,35	0,02	<b>49,33</b>	19,7	36,2	-25,37	-16,52	<b>8,85</b>	<b>0,89</b>
32	K	KAN	28	18,09	18,02	18,04	0,04	<b>18,05</b>	42,22	42,20	42,20	42,22	42,20	42,20	0,01	<b>42,21</b>	19,7	36,2	-24,16	-16,52	<b>7,64</b>	<b>0,79</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		24,22	24,18	24,16	0,03	<b>24,19</b>	48,94	48,92	48,95	48,94	48,92	48,95	0,02	<b>48,94</b>	19,7	36,2	-24,75	-16,52	<b>8,23</b>	<b>0,91</b>
33	K	KAN	26	19,83	19,57	19,67	0,13	<b>19,69</b>	40,67	40,62	40,64	40,67	40,62	40,64	0,03	<b>40,64</b>	19,7	36,2	-20,95	-16,52	<b>4,43</b>	<b>0,89</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		24,83	24,94	24,73	0,11	<b>24,83</b>	47,81	47,85	47,82	47,81	47,85	47,82	0,02	<b>47,83</b>	19,7	36,2	-22,99	-16,52	<b>6,47</b>	<b>0,96</b>
34	E	KAN	38	18,93	19,04	18,94	0,06	<b>18,97</b>	37,74	37,70	37,70	37,74	37,70	37,70	0,02	<b>37,71</b>	19,7	36,2	-18,74	-16,52	<b>2,22</b>	<b>0,93</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		25,97	26,04	26,09	0,06	<b>26,03</b>	49,31	49,29	49,33	49,31	49,29	49,33	0,02	<b>49,31</b>	19,7	36,2	-23,28	-16,52	<b>6,76</b>	<b>0,97</b>
35	E	KAN	37	19,94	20,04	20,01	0,05	<b>20,00</b>	39,51	39,55	39,53	39,51	39,55	39,53	0,02	<b>39,53</b>	19,7	36,2	-19,53	-16,52	<b>3,01</b>	<b>0,93</b>

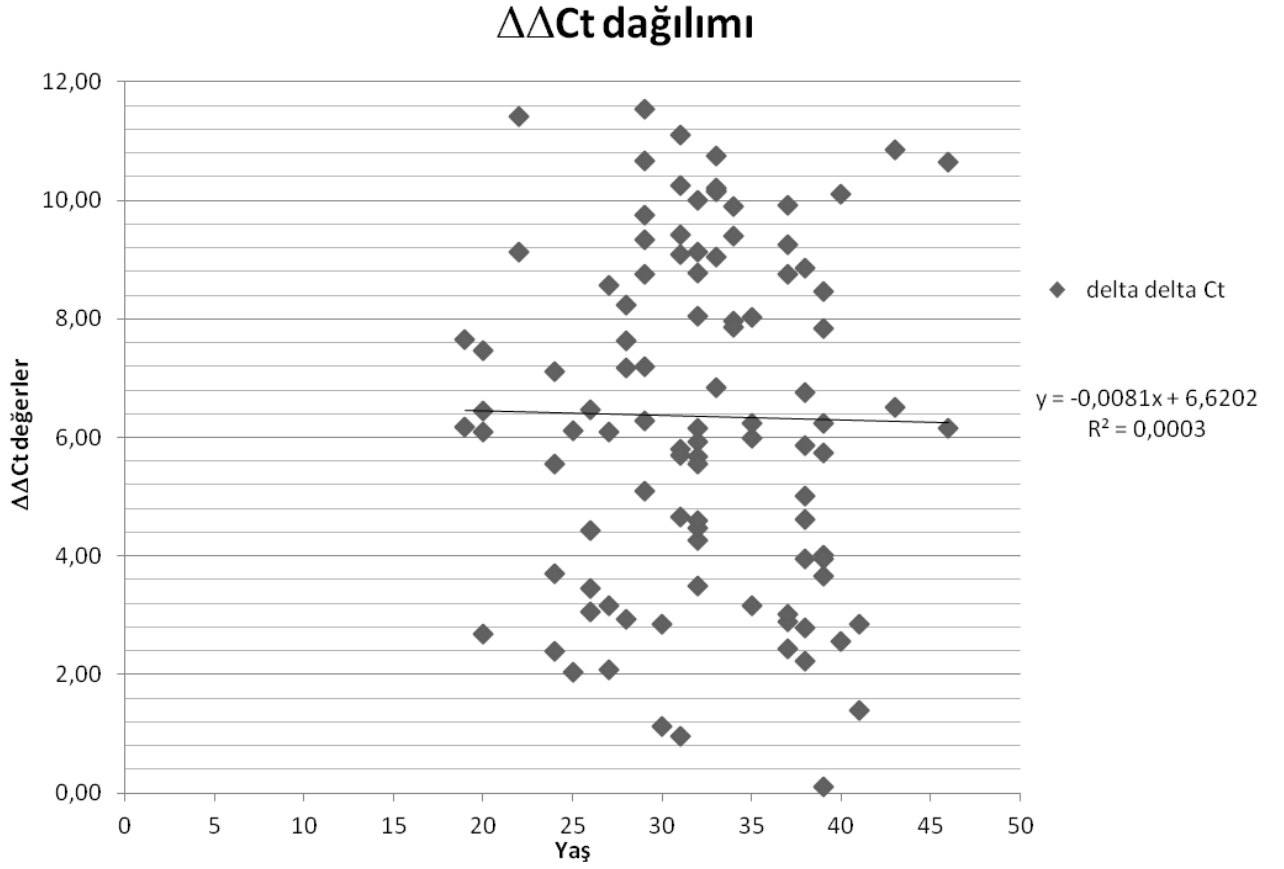
Katılımcı	Cinsiyet	Örnek tipil	Yaş	Ct (tel)			Ct (tel) standart sapma	Ct (ortalama)	Ct (36B4)			Ct (36B4)			Ct (36B4) standart sapma	Ct (36B4) (ortalama)	kalibratör Ct-tel (ortalama)	kalibratör Ct (36B4) (ortalama)	$\Delta Ct$ örnek = $2^{\Delta Ct}$	$\Delta Ct$ kalibratör	Cawthon metoddu $\Delta \Delta Ct$ değeri	Hewakapuge denklemleri Rölatif Telomer Uzunluğu
35	E	AGIZ İÇİ SVAP	37	27,51	27,56	27,49	0,04	<b>27,52</b>	46,47	46,48	46,48	46,47	46,48	46,48	0,01	<b>46,48</b>	19,7	36,2	-18,96	-16,52	<b>2,44</b>	<b>1,09</b>
36	E	KAN	38	19,53	19,46	19,54	0,04	<b>19,51</b>	40,64	40,66	40,62	40,64	40,66	40,62	0,02	<b>40,64</b>	19,7	36,2	-21,13	-16,52	<b>4,61</b>	<b>0,88</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		26,15	26,18	26,18	0,02	<b>26,17</b>	45,46	45,47	45,50	45,46	45,47	45,50	0,02	<b>45,48</b>	19,7	36,2	-19,31	-16,52	<b>2,79</b>	<b>1,06</b>
37	E	KAN	26	20,21	20,25	20,13	0,06	<b>20,20</b>	39,81	39,79	39,74	39,81	39,79	39,74	0,04	<b>39,78</b>	19,7	36,2	-19,58	-16,52	<b>3,06</b>	<b>0,93</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		26,01	25,95	25,91	0,05	<b>25,96</b>	45,91	45,96	45,95	45,91	45,96	45,95	0,03	<b>45,94</b>	19,7	36,2	-19,98	-16,52	<b>3,46</b>	<b>1,04</b>
38	E	KAN	24	19,00	19,02	18,96	0,03	<b>18,99</b>	37,91	37,92	37,88	37,91	37,92	37,88	0,02	<b>37,90</b>	19,7	36,2	-18,91	-16,52	<b>2,39</b>	<b>0,92</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		25,10	25,17	25,09	0,04	<b>25,12</b>	48,75	48,77	48,73	48,75	48,77	48,73	0,02	<b>48,75</b>	19,7	36,2	-23,63	-16,52	<b>7,11</b>	<b>0,95</b>
39	E	KAN	20	19,25	19,34	19,20	0,07	<b>19,26</b>	38,45	38,48	38,48	38,45	38,48	38,48	0,02	<b>38,47</b>	19,7	36,2	-19,21	-16,52	<b>2,69</b>	<b>0,92</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		25,34	25,38	25,44	0,05	<b>25,39</b>	48,37	48,33	48,36	48,37	48,33	48,36	0,02	<b>48,35</b>	19,7	36,2	-22,97	-16,52	<b>6,45</b>	<b>0,97</b>
40	E	KAN	32	19,87	19,87	19,75	0,07	<b>19,83</b>	40,61	40,60	40,65	40,61	40,60	40,65	0,03	<b>40,62</b>	19,7	36,2	-20,79	-16,52	<b>4,27</b>	<b>0,90</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		25,14	25,20	25,13	0,04	<b>25,16</b>	47,34	47,37	47,36	47,34	47,37	47,36	0,02	<b>47,36</b>	19,7	36,2	-22,20	-16,52	<b>5,68</b>	<b>0,98</b>
41	E	KAN	41	18,96	19,07	19,07	0,06	<b>19,03</b>	36,91	36,94	36,97	36,91	36,94	36,97	0,03	<b>36,94</b>	19,7	36,2	-17,91	-16,52	<b>1,39</b>	<b>0,95</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		26,32	26,38	26,40	0,04	<b>26,37</b>	45,73	45,77	45,72	45,73	45,77	45,72	0,03	<b>45,74</b>	19,7	36,2	-19,37	-16,52	<b>2,85</b>	<b>1,06</b>
42	E	KAN	32	19,26	19,26	19,25	0,01	<b>19,26</b>	39,24	39,28	39,28	39,24	39,28	39,28	0,02	<b>39,27</b>	19,7	36,2	-20,01	-16,52	<b>3,49</b>	<b>0,90</b>

Katılımcı	Cinsiyet	Örnek tipil	Yaş	Ct (tel)			Ct (tel) standart sapma	Ct (ortalama)	Ct (36B4)			Ct (36B4)			Ct (36B4) standart sapma	Ct (36B4) (ortalama)	kalibratör Ct-tel (ortalama)	kalibratör Ct (36B4) (ortalama)	$\Delta Ct$ örnek = $2^{\Delta Ct}$	$\Delta Ct$ kalibratör	Cawthon metoddu $\Delta \Delta Ct$ değeri	Hewakapuge denklemleri Rölatif Telomer Uzunluğu
42	E	AGIZ İÇİ SVAP	32	24,47	24,47	24,61	0,08	<b>24,52</b>	46,58	46,59	46,57	46,58	46,59	46,57	0,01	<b>46,58</b>	19,7	36,2	-22,06	-16,52	<b>5,54</b>	<b>0,97</b>
43	K	KAN	39	17,82	17,95	17,95	0,08	<b>17,91</b>	40,66	40,68	40,67	40,66	40,68	40,67	0,01	<b>40,67</b>	19,7	36,2	-22,76	-16,52	<b>6,24</b>	<b>0,81</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		24,08	24,11	23,96	0,08	<b>24,05</b>	44,58	44,61	44,59	44,58	44,61	44,59	0,02	<b>44,59</b>	19,7	36,2	-20,54	-16,52	<b>4,02</b>	<b>0,99</b>
44	K	KAN	32	20,32	20,24	20,24	0,05	<b>20,27</b>	41,27	41,24	41,26	41,27	41,24	41,26	0,02	<b>41,26</b>	19,7	36,2	-20,99	-16,52	<b>4,47</b>	<b>0,90</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		24,24	24,30	24,30	0,03	<b>24,28</b>	49,55	49,57	49,58	49,55	49,57	49,58	0,02	<b>49,57</b>	19,7	36,2	-25,29	-16,52	<b>8,77</b>	<b>0,90</b>
45	K	KAN	27	18,99	19,00	18,87	0,07	<b>18,95</b>	37,58	37,54	37,56	37,58	37,54	37,56	0,02	<b>37,56</b>	19,7	36,2	-18,61	-16,52	<b>2,09</b>	<b>0,93</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		24,23	24,23	24,39	0,09	<b>24,28</b>	49,37	49,35	49,36	49,37	49,35	49,36	0,01	<b>49,36</b>	19,7	36,2	-25,08	-16,52	<b>8,56</b>	<b>0,91</b>
46	E	KAN	24	19,32	19,23	19,23	0,05	<b>19,26</b>	39,48	39,47	39,53	39,48	39,47	39,53	0,03	<b>39,49</b>	19,7	36,2	-20,23	-16,52	<b>3,71</b>	<b>0,90</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		26,65	26,54	26,54	0,06	<b>26,58</b>	48,61	48,67	48,65	48,61	48,67	48,65	0,03	<b>48,64</b>	19,7	36,2	-22,07	-16,52	<b>5,55</b>	<b>1,01</b>
47	K	KAN	32	19,05	18,94	18,96	0,06	<b>18,98</b>	41,67	41,68	41,62	41,67	41,68	41,62	0,03	<b>41,66</b>	19,7	36,2	-22,67	-16,52	<b>6,15</b>	<b>0,84</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		24,44	24,44	24,53	0,05	<b>24,47</b>	45,58	45,60	45,57	45,58	45,60	45,57	0,02	<b>45,58</b>	19,7	36,2	-21,11	-16,52	<b>4,59</b>	<b>0,99</b>
48	K	KAN	39	19,03	19,07	19,05	0,02	<b>19,05</b>	39,51	39,52	39,54	39,51	39,52	39,54	0,02	<b>39,52</b>	19,7	36,2	-20,47	-16,52	<b>3,95</b>	<b>0,89</b>
		AGIZ İÇİ SVAP		25,34	25,41	25,41	0,04	<b>25,39</b>	47,64	47,68	47,62	47,64	47,68	47,62	0,03	<b>47,65</b>	19,7	36,2	-22,26	-16,52	<b>5,74</b>	<b>0,98</b>
49	E	KAN	39	19,09	19,07	19,07	0,01	<b>19,08</b>	35,72	35,69	35,70	35,72	35,69	35,70	0,02	<b>35,70</b>	19,7	36,2	-16,63	-16,52	<b>0,11</b>	<b>0,98</b>



Katılımcı	Cinsiyet	Örnek tipil	Yaş	Ct (tel)			Ct (tel) standart sapma	Ct (ortalama)	Ct (36B4)			Ct (36B4)			Ct (36B4) standart sapma	Ct (36B4) (ortalama)	kalibratör Ct-tel (ortalama)	kalibratör Ct (36B4) (ortalama)	$\Delta Ct$ örnek = $2^{\Delta Ct}$	$\Delta Ct$ kalibratör	Cawthon metodunu $\Delta \Delta Ct$ değeri	Hewakapuge denklemleri Rölatif Telomer Uzunluğu
49	E	AĞIZ İÇİ SVAP	39	25,20	25,20	25,18	0,01	<b>25,19</b>	45,38	45,36	45,37	45,38	45,36	45,37	0,01	<b>45,37</b>	19,7	36,2	-20,18	-16,52	<b>3,66</b>	<b>1,02</b>
50	K	KAN	40	19,66	19,55	19,57	0,06	<b>19,59</b>	38,67	38,64	38,69	38,67	38,64	38,69	0,03	<b>38,67</b>	19,7	36,2	-19,07	-16,52	<b>2,55</b>	<b>0,93</b>
		AĞIZ İÇİ SVAP		23,00	23,04	23,04	0,02	<b>23,03</b>	49,67	49,65	49,63	49,67	49,65	49,63	0,02	<b>49,65</b>	19,7	36,2	-26,62	-16,52	<b>10,10</b>	<b>0,85</b>

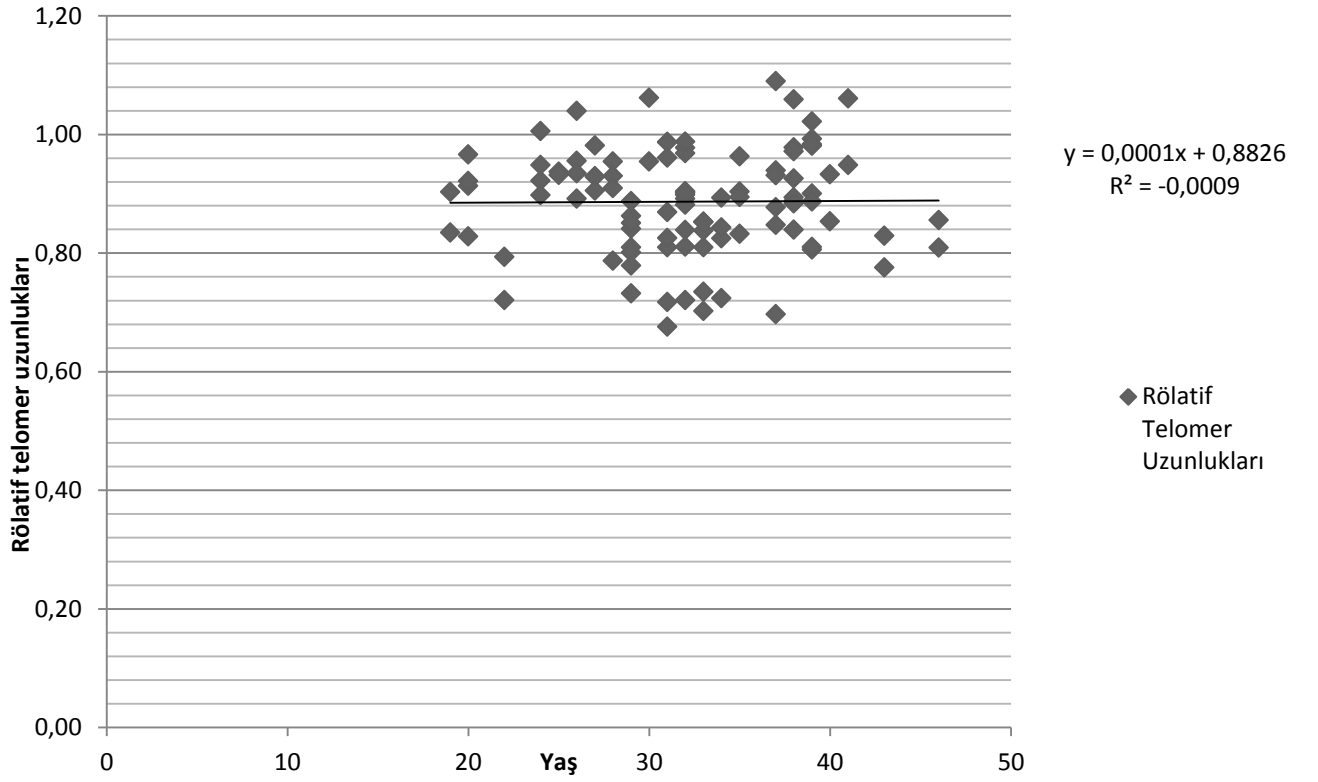
Cawthon'un denklemine göre elde edilen  $\Delta\Delta Ct$  sonuçları ile gerçek yaşlara karşı grafik dağılımı Şekil 20'de gösterilmiştir.



**Şekil 20:** Cawthon'un denklemine göre elde edilen bağlı  $\Delta\Delta Ct$  dağılımı

Hewakapuge'nin denklemine göre rölatif telomer uzunlukları ile katılımcıların gerçek yaşları kıyaslanarak elde edilen sonuçların grafik dağılımı Şekil 21'de gösterilmiştir.

## Rölatif telomer uzunlukları ile gerçek yaş dağılımı



**Şekil 21:** Hewakapuge'nin bağı telomer uzunluğunun gerçek yaşlara karşı grafik dağılımı

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında insan kromozomlarının uçlarında bulunan TTAGGG tekrarlarından oluşan ve her hücre bölünmesinde sayıları azalan telomerlerden yararlanarak, kan ve ağız içi epitel hücrelerden kişilerin yaş belirlenmesi amaçlanmıştır. Telomerlere bağlı yaş tahminin yapılabilmesi ve bunun rutin adli araştırmalarda kullanılması ile birçok adli olgunun aydınlatılması mümkün olacaktır. Bugün mevcut olan STR, mini-STR, mt-DNA sistemleri ile kişilerin DNA profilleri ve cinsiyeti belirlenebilmektedir. Olay yerinden ele geçen ve kime ait olduğu bilinmeyen biyolojik delillerden gün geçtikçe çok daha fazla bilgi edinme çabası ile kişilerin ırksal ve fiziksel özellikleri (ten, göz ve saç rengi) belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu fiziksel belirlemelerle birlikte biyolojik örnekten kişinin yaşı da tahmin edildiği takdirde faile ulaşmak çok daha hızlı ve kolay olacaktır. Dünyada bugüne kadar telomerlere bağlı yaş tahmini ile ilgili birkaç çalışma yapılmış ve toplumlara özgü standart sapma ve indeks bilgileri tespit edilmiştir.

Kromozom ucundaki telomerik bölgenin kaybı, hücrenin programlı bir şekilde hücre ölümüne neden olmaktadır. Somatik hücreler her replikasyonda kendi telomerik dizilerinden 35-100 baz çiftini kaybederler. Telomerlerin kısalma oranı her somatik hücrede aynı olmadığı gibi spermelere göre de daha fazla olduğu gösterilmiştir. Spermde telomer uzunluğu yaklaşık olarak 15 kb, somatik hücrelerde ise 10 kb kadar olduğu saptanmıştır (29, 34, 35). Telomer ve telomeraz etkisinin üzerine yapılan değişik çalışmalarda çeşitli çevresel faktörler, yaşam tarzı (düzenli olarak tüketilen alkol ve sigara miktarı, beslenme şekli, egzersiz v.b.), mevcut serbest radikaller ve bazı antioksidanlardan dolayı telomer uzunluklarının etkilendiği bildirilmiştir (24, 30). Kanser hastalarında yapılan araştırmalarda kanserli dokulardaki telomer uzunluklarının diğer dokulara göre daha aktif oldukları ve daha az kısaldığı tespit edilmiştir (32). Çeşitli araştırmalarda kromozomlara özgü yapıların ve telomer uzunluklarının kalıtsal olduğu ve toplumlara özgü farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (27).

Çalışmamıza gönüllü katılan kişilerin günlük yaşam alışkanlıkları ile ilgili bazı kişisel bilgileri (kökenleri, evli olup olmadıkları, sigara kullanıp kullanmadıkları v.b.) alınmış olmasına rağmen çevresel faktörlerin telomerler üzerindeki etkisini araştırmak için çok daha ayrıntılı anket çalışması yapılması gerekir. Örneğin; katılımcıların tükettikleri gıda türlerini ve miktarını, egzersiz alışkanlıklarını, tüketilen alkol sigara miktarı vb. bilgilerinin de alınması gerekir. Ayrıca böyle ayrıntılı bir çalışmada plaseboyu dışlayabilmek ve objektif sonuçlar

elde edebilmek için kontrol grubunun da oluşturulması gerekir. Bu çalışmada yaşam alışkanlıkları ve çevresel faktörlere bağlı araştırma ve kıyaslama yapılmamıştır.

Araştırmamızda Real Time PCR tekniği ile aynı kişinin kan ve ağız içi epitel hücreleri kullanılarak rölatif telomer uzunlukları belirlendi. Toplanan örneklerden ilk aşamada DNA izolasyonu yapıldı. Kan örnekleri için; Mini QIAamp® DNA izolasyon kit (Qiagen), ağız içi sürüntü örnekleri için; BuccalAmp™ (Epicentre) DNA izolasyon kiti kullanıldı. İzole edilen DNA örneklerinin saflığını ve miktarını kontrol etmek için PAGE elektroforezi ve spektrofotometre ile ölçüm yapıldı. DNA örneklerinin UV spektrofotometrik ölçümü için Epoch Biotek cihazı kullanıldı ve Gene 5 version 1.10.8 programında da analiz edilerek örneklere ait ortalama DNA konsantrasyonları belirlendi (Tablo 5). PAGE elektroforezi sonrasında DNA bantlarını görünürleştirmek için MiniBIS DNR Bio-İmaging Systems GelCapture programı kullanıldı (Şekil 10 ve Şekil 11).

Spektrofotometrik değerlendirmede, DNA örneklerinin 260 nm ve 280 nm’de OD’leri (optik densite) ölçülerek protein ya da RNA kontaminasyonun olup olmadığı kontrol edildi. İyi kalitedeki DNA örneği A260/A280 oranının 1,8 ile 2,0 arasında olması gerekmektedir. OD’nin 2’nin üzerinde olması protein kontaminasyonunu 1,8’in altında olması da RNA kontaminasyonunu işaret etmektedir. Kandan elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu 40-85 ng/ml ve A260/A280 oranları ise 1.8 ile 2.0 arasında elde edildi. Bu değerler sağlıklı PCR çalışması için gerekli koşulları sağlamıştır. Ancak, ağız içi sürüntü örneklerinden elde edilen DNA’ların konsantrasyonu 15-30 ng/ml ve A260/A280 oranları ise 1,8 ’in altında elde edildi. Bu da ağız içi sürüntü örneklerinde RNA kontaminasyonunun varlığını işaret etmektedir. Bunun sebebi ise, kullanılan kit prosedürüne göre; DNA izolasyon işleminin baştan sona kadar aynı tüpte yapılıyor olması ve ayrı bir saflaştırma aşaması olmamasından kaynaklanmaktadır. Bu da DNA saflığını negatif yönde etkilemektedir. Bu tez kapsamında yapılan PCR optimizasyonunda düşük kalitede DNA kullanılmasına rağmen başarılı PCR sonuçları elde edilmiştir. Olumlu sonuçlar alınmamış olsaydı, DNA örneklerinin protein veya RNA’dan temizlenmesi gerekecekti.

Araştırmamızda, telomer uzunluğunu ölçmek için Cawthon’un önerdiği şekilde; telomer 36B4 ve kontrol için  $\beta$ -globin bölgelerini çoğaltan primerler kullanıldı. Ayrıca pozitif (K562 DNA) ve negatif kontroller de çalışıldı. Kullanılan primerlerin PCR ürünleri telomer bölgesi için yaklaşık olarak 500 bp, 36B4 ve kontrol  $\beta$ -globin bölgeleri için 74 bp uzunluğunda olması

gerekir. Yapılan PCR optimizasyonunda istenilen boyutta PCR ürünleri elde edildi (Şekil 12).  $\beta$ -globin bölgesi çoğalıp, telomer ve 36B4 bölgesi çoğalmamış olsaydı bu primerlerin çalışmadığına karar verilecekti. Ancak telomer 36B4 ve  $\beta$ -globin primerleri ile yapılan PCR ile başarılı sonuçlar elde edildi.

PCR optimizasyonunda dikkat edilen önemli noktalardan biri ürünlerin primer-dimer oluşturmamasıdır. Cawthon'un önerdiği ve çalışmamızda kullandığımız primerler (Şekil 8) primer-dimer oluşturmayacak özelliktedir. Cawthon, Tel F primeri 31 bç ve Tel R primeri ise 33 bç uzunluğunda, komplementer bölgesi ile hibrit oluşturacak ve 5'-3'ne doğru uzayacak şekilde tasarladı. Ayrıca tel F ve tel R primerleri kendi aralarında hibride olsalar bile 3' yönündeki son baz komplementer olmadığından kararlı bir yapı (primer-dimer) oluşmamaktadır.

Real-Time PCR'da kullanılmak üzere telomer ve 36B4 primerleri kullanılarak standart eğriler oluşturuldu. Bunun için; standart kantitatif analizlerde kullanılan ve konsantrasyonu bilinen K562 Yüksek Moleküler Ağırlıklı DNA'nın (Promega) 3:1 oranında seri sulandırmaları (8 adet) kullanıldı (Tablo 4). Oluşturulan seri sulandırmalara Tablo 2 ve Tablo 3'te gösterildiği şekilde PCR yapıldı. PCR sonucu elde edilen değerlerden DNA konsantrasyonuna göre Ct (Cycle threshold) grafiği çizildi (Şekil 13 ve Şekil 14). Ct; floresan sinyalin gözlemlenebilmesi için gereken minimum değer (eşik değerini) geçtiği döngü sayısına (eşik döngüsü) denir ve kuantifikasyonda (miktar belirlenmesinde) kullanılacak önemli bir parametredir (42). Ct aynı zamanda, logaritmik faz gücünü göstermektedir ve % 90 - 100 arasında olması gerekir (1,34). Ct değeri, amplifikasyonun kayıp/kazanç analizinin yapılmasıyla elde edilir. Başlangıçtaki yüksek DNA miktarı, PCR sırasında ürün artışına neden olacak ve Ct değeri düşecektir. Rotor-Gene ScreenClust HRM Software® analiz programı Cycle threshold (Ct) değerini, büyüme eğrisinin (growth curve) matematiksel analiziyle hesaplar. Bir Ct değeri 50'den yüksek ise amplifikasyonun olmadığı ve bu değer hesaplanamayacağı anlamına gelir.

Yukarıda söz edilen ve standart eğrilerin güvenilirliğini kontrol etmek için grafik değerlerinden belirtme katsayısı ( $R^2$ ) hesaplanır. Bu katsayı Rotor-Gene ScreenClust HRM Software® programında otomatik olarak hesaplanır. Standart eğri (standard curve), değişik DNA konsantrasyonlarının (3: 1 oranında sulandırılan K562 DNA) Ct'ye karşı elde edilen değerlerinden (kesişme noktaları) bir doğru oluşturması gerekir (Şekil 13 - 14). Verimli bir amplifikasyon için  $R^2$  değerinin 1'e yakın olması gerekir. Telomer ve 36B4 bölgeleri için elde edilen standart eğrilerin  $R^2$  değerleri 0.999'dan büyük olduğu için PCR çalışmalarına uygun

olduğu tespit edildi.  $R^2$  değeri, standart eğrinin eğimi ile doğru orantılı olup Bölüm 2.5.2. deki etkinlik (E) için gösterilen denkleme göre hesaplanır. Buna göre -3.332'lik bir eğim %100'lük bir verime karşılık gelmektedir. Verimin mutlak değerinin 3.332'den büyük olması verimin %100'den düşük olduğunu, küçük olması ise %100'den büyük olduğunu gösterir ve her iki durumda da reaksiyon optimize edilir. %100'lük verimde hedef DNA'nın her döngü sonunda iki katına çıkmış olduğunu göstermektedir. Gerçekte hiçbir PCR reaksiyonu bu değere erişmediği de bilinmektedir.

Tüm örneklerin Real-Time PCR çalışmaları yapılarak pozitif ve negatif kontrol sonuçlarına dayanarak değerlendirme yapıldı. Kalibratör (pozitif kontrol) olarak K562 kullanıldı. K562 kullanmanın amacı hem miktarı (konsantrasyonu) bilinen bir DNA örneğinin olması hem de sonucu bilinen bir örnekle çalışmaktır. Ayrıca, PCR sırasında bileşenlerden kaynaklanan olası hataları ortaya çıkarmak için de kullanılır. Örneğin, kalibratörden geçerli sonuç alınmadığında diğer örneklerin sonuçlarına da güvenilmeyeceği için PCR tekrarlanır. Yüksek doğrulukta sonuç alabilmek tüm örneklerin PCR'ları üç kez tekrar edildi. Ayrıca, her Real-Time PCR çalışması sırasında üç adet negatif kontrol çalışılarak olası kontaminasyonun varlığı kontrol edildi.

Her çift sarmal DNA, kendine özgü erime eğrisi ( $T_m$ ) değerine sahiptir.  $T_m$ , çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal haline gelebilmesi için gerekli sıcaklık değeridir. Bu sıcaklık da yaklaşık olarak PCR ürünün  $T_m$ 'sine ya da birkaç derece altına eşittir. SYBR Green I tabanlı Real-Time PCR çalışmalarında primer dimerlerinin tek zincirli olduğu ve hedef PCR ürününün çift zincirli olduğu bir sıcaklıkta floresans ölçüm yapılmaktadır. Bundan dolayı primer dimer oluşumundan kaynaklanan floresans artışlarından etkilenmemiş ve PCR ürününe özgü artış izlenmiş olunur. (43). SYBR Green I dizi ayrımı yapmaksızın tüm çift zincirli DNA'lara bağlandığı için PCR ürünü spesifik olarak görüntülenemez. Kendi aralarında sekonder yapılar oluşturmeyen primerlerin seçilmesi ya da primer sekonder yapıların (dimer)  $T_m$ 'nin üzerindeki bir sıcaklıkta ölçüm alınması yoluyla yalnızca PCR ürününe bağlı artışın gözlenmesi mümkün olur. PCR ürününün kesin olarak saptanması ancak erime eğrisi analizi (melt curve analysis) yoluyla tespit edilebilir. Erime eğrisi analizi; SYBR-Green gibi floresan boyaların kullanıldığı analizlerde çoğalan DNA'nın hedef bölge olduğunu kesinleştirmek amacıyla kullanılır (34, 43). Erime eğrisi analizinde, çift sarmal DNA'nın sıcaklığı yavaş yavaş artırılarak floresan sinyalin sıcaklığa bağlı değişimini gösteren bir grafik oluşturulur. Floresan sinyalin ani düşüşünden kaynaklanan tepcikler aracılığıyla

DNA iplikçiklerinin birbirlerinden ayrılmaları gözlemlenir. Fakat bu çalışmada kullanılan primerler istenmeyen sonuçların (primer, dimer ve sekonder yapılar) oluşmasını engelleyecek özelliktedir. Dolayısıyla bu tür yanılığın üstesinden gelinerek, erime eğrisi analizinin yapılmasına da gerek kalmamıştır.

Bu çalışmaya katılan kişilerin (29 kadın ve 21 erkek) Şekil 19'da gösterildiği gibi yaşları 19 ile 46 arasında olup yaş ortalaması 32,1'dir. Tüm örneklerin Real-Time PCR çalışmaları yapıldı ve PCR verilerinden yararlanarak Rotor-Gene ScreenClust HRM Software® analiz programında otomatik olarak Ct değerleri hesaplandı. Ham veri ve kantifikasyon değerlendirme sonucu elde edilen Ct değerlerinden bir veri tablosu oluşturuldu (Tablo 6). Bu veri tablosundaki Ct değerleri, Cawthon'nun denklemine göre hesaplandığında belirtme katsayısı ( $R^2$ ) 0,0003 (Şekil 20) ve Hewakapuge'in denklemine göre hesaplandığında -0,0009 (Şekil 21) olarak bulundu.  $R^2$  değeri sıfırdan uzaklaştıkça elde edilen verilerin gerçeğe yakın olduğunu gösterir (44). Cawthon ve Hewakapuge denklemleri kullanılarak yapılan hesaplamalarda  $R^2$  değerinin sıfıra çok yakın olduğu saptanmıştır. Bu da, elde edilen değerlerin gerçek değerleri yansıtmadığını göstermektedir.

Aynı yaştaki katılımcılar arasında dahi çok farklı rölatif telomer uzunlukları elde edildi. Cawthon'nun denklemine göre (Şekil 20) 31 yaşındaki kişilerin  $\Delta\Delta Ct$  değerleri 0.97 ile 11.11 arasındayken Hewakapuge'nin denklemine göre aynı bireylerin rölatif telomer uzunlukları 0.68 ile 1.09 arasında tespit edildi. Hewakapuge'nin kendi çalışmasında da sonuçlarımıza benzer şekilde 31 yaşındaki katılımcıların rölatif telomer uzunlukları 0.72 ile 0.99 arasında bulmuştur. Hem kendi çalışmamızda hem de Hewakapuge'nin çalışmasında çok düşük korelasyon katsayıları tespit edilmiştir. Dolayısıyla, Cawthon'un yöntemi kullanılarak kişilerin gerçek biyolojik yaşları ile elde edilen rölatif telomer uzunlukları arasında bağlantı kurulamadı.

Telomer uzunluğunun yaşa bağlı olarak kısaldığı bilinmektedir (1). Daha önce Tsuji ve ark. ile Takasaki ve ark. tarafından Japon popülasyonunda TRF yöntemini kullanarak telomer uzunluğunu belirlemeye çalışmışlardır. TRF daha önce bölüm 2.6.1 anlatıldığı gibi, telomer bölgelerinin belirlenebilmesi için kullanılan ilk yöntemlerden biridir. TRF spesifik enzim kullanımı ile genomik DNA'nın enzim kesimi sonucu oluşan fragmanların jel elektroforezinde yürütülerek değerlendirilmesine dayanır. Ancak telomer bölgelerinin yanısıra subtelomerik bölgeleri de içermektedir. Takasaki ve ark. ise yaptıkları araştırmada TRF yönteminin adli kullanıma uygunluğunu tespit etmek için farklı yaş ve etnik toplumlardaki



dağılımının daha ayrıntılı araştırılması gerektiğini bildirmiştir. Cawthon tarafından geliştirilen yöntemde ise Real-Time PCR'ı kullanarak subtelomerik bölgeler haricindeki telomerik bölgeleri çoğaltan primerler kullanmıştır. Cawthon'un metodu subtelomerik bölgeleri içermemesi ve sadece telomere özgün olması, telomerlerin uzunluğu ile yaş arasında daha iyi bir korelasyon sağlanacağı beklenmekteydi (34). Hewakapuge Cawthon'un tasarladığı primerleri kullanarak, yaşları 1 ile 89 arasında değişen ve farklı etnik kökene sahip toplam 167 kişi çalışmış ve telomer uzunluğu ile yaş arasında negatif korelasyon olduğu sonucuna varmıştır (1). Takasaki ve ark. ve Tsuji ve ark.'nın yaptıkları çalışmada Hewakapuge'ye göre daha yüksek korelasyon katsayıları bulmuşlardır. Hewakapuge'ye göre Cawthon'un primerleri ile Real Time PCR yönteminin adli araştırmalarda kişinin yaşını tahmin etmede kullanıma uygun olmadığını bildirmiştir. Bu bulgulardan yola çıkarak subtelomerik bölgelerinin de analize dâhil edilmesi ile kişilerin gerçek biyolojik yaşları arasında daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir. Ancak araştırmamızda subtelomerik bölgeler çalışılmamıştır.

Bu çalışma sonucuna göre; kullanılan primerler ve Real Time PCR sonucu elde edilen rölatif telomer uzunlukları ile kişilerin gerçek yaşları arasında çok düşük bir bağlantı olduğu tespit edildi. Düşük  $R^2$  değerlerinden dolayı rölatif telomer uzunlukları ile kişilerin gerçek yaşları arasında bağlantı kurulamadı. Dolayısıyla, rölatif telomer uzunluklarının kişilerin gerçek yaşlarını yansıtmadığı ve söz konusu primerler kullanılarak telomerlerin adli olaylarda yaş tahmininde kullanıma uygun olmadıklarını saptadık. Araştırmalarda telomerik bölgeler dışında subtelomerik bölgeler analize dahil edilerek daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca şimdiye kadar henüz araştırılmamış ancak telomer uzunluklarını etkileyen başka gen bölgelerinden ve enzimlerden yararlanarak yeni yöntemler geliştirilmesi gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

## 6. ÖZET

Adli vakalarda olay yerinde birçok farklı biyolojik örnek bulunabilmektedir. Olay yerinde bulunan bu biyolojik örneklerden kimliklendirme yapılabilmektedir. Böylece elde edilen profile bağlı suç ya da suçluyla ilgili tespit yapılabilmektedir. Olay ile ilgili şüpheli bulunduğu zaman kıyaslama yapılabilir. Bunun için olay yerinde bulunan biyolojik delilden ne kadar çok bilgi edinilebilirse faile ulaşmak o oranda kolay olur. Adli biyolojik kalıntılardan bugünkü teknoloji ile kişinin DNA profili belirlenebilmektedir. Ancak adli bilimciler delilden suçluyla ulaşma konusunda günden güne yeni bilgiler edinme çabasındadırlar.

Telomerler insan kromozomlarının uçlarında bulunan TTAGGG tekrarlarından oluşan yapılardır ve her hücre bölünmesinde bu tekrarların sayıları azalmaktadır. Telomerin bu özelliğinden yararlanarak, biyolojik örneklerden kişilerin yaşı tahmin edilebilir.

Bu tezde çalışmaya onay veren, sağlıklı ve yaşları bilinen 50 kişinin periferik kan ve ağız içi sürüntü örnekleri kullanıldı. Toplanan örneklerden ilk aşamada DNA izolasyonu, ikinci aşamada Real Time PCR analizi, üçüncü aşamada elde edilen sonuçların Ct metoduna göre analiz edildi ve elde edilen sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı. Son aşamada ise kişilerin gerçek yaşları ile bulunan değerler kıyaslanarak değerlendirildi.

Bu çalışma sonucuna göre; kullanılan primerler ve Real Time PCR sonucu elde edilen rölatif telomer uzunlukları ile kişilerin gerçek yaşları arasında çok düşük bir bağlantı olduğu tespit edildi. Düşük  $R^2$  değerlerinden dolayı rölatif telomer uzunluklarının kişilerin gerçek yaşlarını yansıtmadığı ve söz konusu primerler kullanılarak telomerlerin adli olaylarında yaş tahmininde kullanıma uygun olmadıkları saptandı. Ayrıca şimdiye kadar henüz araştırılmamış ancak telomerlerin uzunluklarını etkileyen başka gen bölgeleri ve enzimler den yararlanarak yeni yöntemler geliştirilmesi gerekir.

## 7. SUMMARY

At the forensic crime scene, various biological samples can be found and from those samples DNA profiles can be determined. By the help of the current technology, it can be determined to whom the samples belong to. When there is any suspicious person, those profiles can be compared. The more data obtained from the biological samples, the more easily the identity of the guilty person can be found. Moreover, forensic scientists are searching for new technologies that will enable them to identify the suspects using the evidences.

Telomeres are terminal chromosomal structures that consist of TTAGG repeats which shorten in each cell division. In this study, a method based on the telomere shortening was proposed to determine the age of the people using their biological samples.

In this study, blood and buccal swaps were collected from 50 voluntarily agreed participants and their DNA was isolated. Real-time PCR was performed, results were analyzed using the Ct method and obtained data was statistical evaluated. Furthermore, by statistical analysis participant's real ages were compared with the obtained relative telomere length results.

According to the results from this study, it was found that there was a low correlation between the real ages of the participants and the relative telomere lengths. Since R<sup>2</sup> coefficients were very low, the results from this study does not represent the real ages. According to those findings, the primers used in this study as well as the methods used, were not appropriate for forensic determination of the age. We believe that more effort is required to explore novel factors or genes which can also can alter telomere lengths.

## 8. KAYNAKLAR

1. Hewakapuge S, et al. (2008) Investigation of telomere lengths measurement by quantitative real-time PCR to predict age. *Int J Legal Med* 10: 236-242.
2. Tsuji A, et al. (2002) Estimating age of humans based on telomere shortening. *Forensic Sci Int* 126:197-9.
3. Bozcuk A. N.(2000) *Genetik*, Palme Yayıncılık, İkinci Bölüm, 20-2
4. Karp C. (2002) *Cell and Molecular Biology*, 3rd Edition, 581-88.
5. Lee, H.C. et al. (1994) DNA typing in forensic science I. Theory and background. *Am J Forensic Med Pathol* 15: 269-82.
6. Gaensleen, R.E. (1984) *Sourcebook in Forensic Serology, Immunology and Biochemistry*, Washington: US Gov Print Office, 293-20
7. Robertson, J. et al. (1990) *DNA in Forensic Science: Theory, Techniques and Applications*, London: Ellis Howard Ltd.
8. Filoğlu, G. (2009) *Temel Adli Genetik Ders Notları* , İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü
9. Sensabaugh, G.F. (1991) Forensic application of the polymerase chain reaction. *J Forensic Sci Soc* 31: 201-4.
10. Butler, J. (2006) Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing, *J Forensic Sci*, 51: 253-65.
11. Greider CW, et al. (1989) A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337: 331-7.
12. Tsuji, A, et al. (2002) Estimating age of humans based on telomere shortening, *Forensic Sci Int* 126: 197-9.
13. Takasaki T, et al. (2003) Age estimation in dental pulp DNA based on human telomere shortening. *Int J Legal Med* 117:232-4.

14. Alvarez, M, et al. (2006) The identification of newborns using messenger RNA profiling analysis, *Analy Biochem*, 357: 21-4.
15. Meissner, C, et al. (2006) Tissue-specific deletion patterns of the mitochondrial genome with advancing age, *Exper Geront*, 41: 518-24.
16. Centre, SCUWR (2008) Humpback whale telomere ageing research project, 15/02/2012, <<http://www.scu.edu.au/research/whales/index.php>>.
17. Schmeling, A, et al. (2007) Age estimation, *For Sci Int*, 165:178-81.
18. Linnane, A. W. et al. (1989) Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases, *The Lancet*, 1: 642-5.
19. Promislow, D. E. L. (1994) DNA repair and the evolution of longevity: a critical analysis, *J Theor Bio* 170: 291-00
20. Terman, A, et al. (2004) Aging as a catabolic malfunction, *Int J Biochem Cell Bio*, 36: 2365-75.
21. Oberdoerffer, P, et al. (2007) The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing, *Nat Re. Mol Cell Bio*, 8: 692-02.
22. Kirkwood, T .B. (2005) Understanding the odd science of aging, *Cell*, 120: 437-47
23. Boukamap, P. (2001) Ageing mechanisms: the role of telomere loss, *Clin Expe Derm*, 26: 562-5.
24. Harley CB, et al. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458–60
25. Alberts, B. et al. (2002) *Molecular Biology of The Cell*. 4<sup>th</sup> edition Gar Sie, New York U.S.A.
26. Lodish, H, et al (2002) *Molecular Cell Biology*, 4<sup>th</sup> edition, W. H. Freeman & Company, New York U.S.A.
27. Henderson E, et al. (1988) Structure, Synthesis and Regulation of Telomeres, *Can Cell*, 6: 453-61.

28. Bekaert, S, et al. (2004) Telomere biology in mammalian germ cells and during development , *Developmental Biology*, 274: 15-30.
29. Chan, S R, et al. (2004) Telomeres and telomerase, *Philos Trans Royal Society Bio Sci* 29; 359: 109-22.
30. Gil ME, Coetzer TL. (2004) Real-time quantitative PR-PCR for human telomere elongation reverse transcriptase in chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research* 28; 8 : 969-72
31. Karlsson AO, Svensson A, Marklund A, Holmlund G. (2008) Estaimating human age in forensic samples by analysis of telomere repeats. *Forensic Sci Int Gen Supp Series I* 569-71.
32. Neumann, A A, et al. (2002) , Telomere maintenance and cancer -- look, no telomerase, *Nat Rev Can*, 2; 11: 879-84
33. Blasco, M A (2007) The epigenetic regulation of mammalian telomeres, *Nat Rev Gen*, 8: 299-09.
34. Cawthon RM. (2002) Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucl Acids Res* 30:e47.
35. Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S., Dani M., Deaven L.L., Jones M.D., Meyne J., Ratriff R.L., Wu J.R., (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:6622–26.
36. Greider CW, Blackburn EH. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43:405-13.
37. Department of Health and Human Services. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Appendix C, (2001) NIH stem cell illustrations ©Terese Winslow (assisted by Lydia Kibiuk and Caitlin Duckwall), 15/02/2012, <http://stemcells.nih.gov/info/2001report/chapter3.asp>
38. Hodes, R J, et al. (2002) 'Telomeres in T and B cells, *Nat Rev Imm* 2: 699-06

39. Jerry WS, et al. (2006) Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions, *Nat Rev Drug Dis* 5: 577-84
40. Wege H, Chui MS, Le HT, Tran JM, Zern MA. (2003) SYBR Green real-time telomeric repeat amplification for the rapid quantification of telomerase activity. *Nucl Acids Res* 31:e3.
41. Voet, D. and Voet, J. G. (1995) *Biochemistry*. 2nd Ed. John Wiley and Sons, Inc. USA.
42. Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification il real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* 29, e45.
43. Wilson, K. & Walker, J.(2000) *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*, 5<sup>th</sup> edition, Oxford University Press
44. Aytaç, M. (1998), *Matematiksel İstatistik*, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa.
45. Dagpunar, J. (1988), *Principles of Random Variate Generation*, Clarendon Press, Oxford.
46. Hasgür, İ. (2000), *Matematiksel İstatistik*, Seçkin Yayınları, Ankara.
47. Masutomi K, Hahn WC (2003) Telomerase and tumorigenesis. *Can Letters*, 194 (2): 163-72
48. Gil ME, Coetzer TL. (2004) Real time quantitative PCR of telomere length. *Mol Biotech* 2:169–72.
49. Ünlü M, Morgan M.E., Jonathan S. Minden J.S. (1997) Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts, *Electroph* 18;11: 2071–7
50. Dival, G.B., (1982) The application of electrophoretic techniques in the field of criminology. *Electroph* 6:249-58.
51. Szostak JW, Blackburn EH. (1982) Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29:245-55.
52. Lowe, A L, et al. (2001) Inferring ethnic origin by means of an STR profile, *For Sci I*, vol. 119;1:17-22.

53. Jobling, M A, et al. (2004) Encoded evidence: DNA in forensic analysis, *Nat Rev Gen*, 5;10:739-51.
54. Haugland, R.P. (2002) *The Handbook of Fluorecent Probes and Research Products* 9th Edition. Molecular Probes, Inc.



## **EKLER**

### **Ek 1. DNA izolasyon Prosedürleri**

#### **QIAamp® DNA Mini Kit ile Kandan DNA İzolasyonu**

1. 1,5 ml 'lik mikrosantrifüj tüpüne 300 µl periferik kan örneği konuldu.
2. 20 µl Proteinaz K ve 200 µl Buffer AL eklenerek 15 saniye vortekslendi
3. 56°C'de 10 dakika inkübe edildi.
4. Tüpün duvarındaki damlaların aşağı inmesi için 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. % 96- 100'lük etanolden 200 µl eklendi ve 15 saniye vortekslendi
6. Vorteksten sonra tekrar 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Bu karışım, içinde 2 ml'lik toplama tüpü bulunan QIAamp® mini kolona aktarıldı ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Alttaki 2 ml'lik toplama tüpü atılarak, QIAamp® mini kolon, 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
9. 500 µl AW1 tamponu eklenerek, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Alttaki 2 ml'lik toplama tüpü atılarak, QIAamp® mini kolon, 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
11. 500 µl AW2 tamponu eklenerek, 8000 rpm'de santrifüj edildi.
12. Membranın kurumasını sağlamak için, QIAamp® mini kolon 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
13. QIAamp® mini kolon, 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpüne yerleştirilerek, 200 µl AE tamponu eklendi.
14. oda ısısında 15 dakika inkübe edildikten sonra, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
15. QIAamp® mini kolonu atıldı ve 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpünün kapağı kapatıldı.
16. Elde edilen izolatlar uzun süreli saklama için -20°C'de muhafaza edildi.

## **BuccalAmp™ Epicentre DNA Kit ile Ağız İçi Sürüntü (buccal swab) Örneklerinden DNA İzolasyonu**

1. Her bir ağız içi sürüntü örneği için QuickEkstract™ tüpüne protokol kodları yazıldı.
2. Buccal swab QuickEkstract™ tüpüne konuldu ve swaptaki hücrelerin çözünmesi sağlandı.
3. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
4. QuickEkstract™ örnek tüpleri, 65°C'de su banyosunda 1 dakika bekletildi.
5. QuickEkstract™ örnek tüpleri vortekslendi ve 98°C'de su banyosunda 2 dakika bekletildi.
6. Tüpün duvarındaki damlaların aşağı inmesi için, 4000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.
7. Elde edilen izolatları uzun süre saklamak için -20°C'de muhafaza edildi.

## Ek 2. Dikey PAGE elektroforez prosedürü

1. 10 ml % 8'lik PAGE jel karışımı hazırlanmak için; 15 ml'lik tüpün içine 2,5 ml Akrilamid: bis-akrilamid çözeltisi, 1 ml 10X TBE, 6,5 ml distile su, 100 µl % 10 'luk APS ve 6 µl TEMED eklendi ve karıştırıldı.
2. Jel düzeneği oluşturuldu ve ilk adımda hazırlanan akrilamid karışımı, Jelde hava kabarcığı oluşmasını engelleyecek şekilde yavaş ve sabit hızla döküldü. Jelin üst tarafına örnek kuyucuklarını oluşturacak tarak yerleştirildi.
3. Hazırlanan jel, polimerizasyon için yarım saat süreyle oda sıcaklığında bekletildi ve 1X TBE yürütme tamponu ile doldurulmuş olan tanka yerleştirildi. Tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve oluşan kuyucukların içi mikropipet yardımıyla yıkandı.
4. 10 µl DNA örneği 1,5 yükleme boyası (Blue/Orange 6X Loading Dye, Promega) ile karıştırıldı.
5. İlk kuyucuğa 50 bç boyutundaki DNA markeri (50bp DNA Step Ladder, Promega) yüklendi. Diğer kuyucuklara da hazırlanan DNA örnekleri yüklendi.
6. Elektroforez 200 V'da 45 dakikada gerçekleştirildi.
7. Yürütme tamamlandıktan sonra, jelin GelRed boyama çözeltisinin içine konuldu ve 10 dakika orbital çeviricide çalkanarak boyanması sağlandı.
8. Jel transiluminatörde UV ışık altına yerleştirildi ve DNA bantları gözlendi.

### Ek 3. Bilgilendirilmiş olur formu

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü tarafından yürütülen ve aşağıda adı geçen araştırma projesinde kullanılmak üzere biyolojik örnek (tükürük veya kan) verme yoluyla katkıda bulunmanızı dileriz.

**Projenin adı :** Biyolojik Örneklerin Telomer Kısalmasına Bağlı Yaş Tayını

**Proje Yürütücüsü:** Neşe (Ajredin ) Gülüm

**Araştırmanın amacı:** Bu tez çalışmasında biyolojik örneklerden kişilerin yaşı tahmin edilecektir. Bunun için DNA'nın telomer bölgesinden yararlanılacaktır. Telomerler insan kromozomların uçlarında bulunan tekrarlardan oluşan yapılardır ve her hücre bölünmesinde bu tekrarlar kısalır. Telomerin bu özelliğinden yararlanarak, biyolojik ve kronolojik yaş belirleyici olarak kullanılabilir. Telomerlere bağlı yaş tahmini yapabilmek için toplumlara özgü standart sapma ve indeks bilgileri gereklidir. Bugüne kadar Amerika, Japonya ve İsveç'te telomerlere bağlı yaş tahmini çalışmaları yapılmış ve toplumlarına özgü standart sapma ve indeks bilgileri saptanmıştır. Ancak ülkemizde henüz bu konuyla ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Elde edilecek sonuçlardan, istatistikî değerlendirme ve kıyaslama yapılacaktır. Bu sonuçlara bağlı olarak adli vakalarda telomerlerin yaş tahmininde uygun bir indikatör olup olmadığı belirlenecektir. Ayrıca bu çalışma daha ileride yapılacak popülasyon çalışmalarına temel oluşturacaktır.

Araştırmanın katılımcıya herhangi bir etkisi yoktur. Gönüllü, istediği anda araştırmacıya haber vererek araştırmadan çekilmek isteyebilir. Bu durumda araştırmacı, katılımcının örneklerini derhal imha edecektir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcının araştırma dışı bırakılacağı bildirilebilir.

Gönüllü katılımcı, araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyecektir. Ayrıca kendisine bir ödeme yapılmayacaktır.

Gönüllü katılımcının kimlik bilgileri son derece gizli tutulacaktır ve hiçbir surette kimse ile paylaşılmayacaktır. Bilgilerin kullanımında şifre kullanılacaktır. Katılımcının çalışmadan herhangi bir neden ile ayrılması durumunda; tüm kayıtları silinecektir.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verilmektedir.

**Bilgilendirilmiş olur:** Bilgilendirilmiş olur formunu okudum ve anladım. Yukarıda adı geçen çalışma için biyolojik örnek vermeyi kabul ediyorum. İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsünün genetik inceleme sonuçlarımı anonim bir şekilde bilimsel yayınlarında kullanmalarını kabul ediyorum.

**Araştırmacının mobil telefon numarası:**

**Araştırmaya gönüllü katılan kişinin**

**Adı – Soyadı:**

**Doğum yeri:**

**Yaşı:**

**İmza**

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı-soyadı:** Neşe GÜLÜM

**Doğum Tarihi:** 25.11.1981

**İletişim Adresi:** Teşvikiye Mah. Nişantaşı Ihlamur Yolu Sok. Erdek Apt No:61-3 Şişli /  
İstanbul

**Telefon:** 0536 3969609

### Eğitim Durumu

D.S.U. Rade Jovcevski - Korcagin	(1996-2000)
İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	(2001-2006)
İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Yüksek Lisans Programı	(2009- Halen)