

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
ANTROPOLOJİ (PALEOANTROPOLOJİ)
ANABİLİM DALI**

**BAZI ANADOLU ANTİK KENTLERİNDEKİ KAZILARDAN
ÇIKARILAN KEMİKLERİN DNA ANALİZİ**

Doktora Tezi

Evrin TEKELİ

Ankara-2017

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
ANTROPOLOJİ (PALEOANTROPOLOJİ)
ANABİLİM DALI**

**BAZI ANADOLU ANTİK KENTLERİNDEKİ KAZILARDAN
ÇIKARILAN KEMİKLERİN DNA ANALİZİ**

Doktora Tezi

Evrin TEKELİ

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Timur GÜLTEKİN**

Ankara-2017

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
ANTROPOLOJİ (PALEOANTROPOLOJİ)
ANABİLİM DALI**

**BAZI ANADOLU ANTİK KENTLERİNDEKİ KAZILARDAN
ÇIKARILAN KEMİKLERİN DNA ANALİZİ**

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Timur GÜLTEKİN

Tez Jürisi Üyeleri

Adı ve Soyadı

İmzası

1-Prof.Dr. Timur GÜLTEKİN

2-Prof.Dr. Ayla Sevim EROL

3-Prof.Dr. Yaşar BİLGE

4-Doç.Dr. Yener BEKTAŞ

5-Yrd. Doç.Dr. Can ALKAN

Tez Sınavı Tarihi: 27.04.2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜMÜDÜRLÜĞÜNE

Bu belge ile, bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik davranış ilkelerine uygun olarak toplanıp sunulduğunu beyan ederim. Bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçları andığımı ve kaynağını gösterdiğimi ayrıca beyan ederim.(18/05/2017)

Evrin TEKELİ

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri
tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: 15L0649002)

İÇİNDEKLİLER

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER.....	i
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM:1 KAVRAMSAL VE KURAMSAL ÇERÇEVE.....	3
1.1. Moleküler Antropoloji.....	8
1.2. Antik DNA Çalışmaları.....	5
1.2.1. Antik DNA Çalışmalarının Kullanım Alanları.....	8
1.2.1.1. Birey Düzeyinde Yapılan Çalışmalar.....	8
1.2.1.2. Cinsiyetin Belirlenmesi.....	11
1.2.1.3. Popülasyon Düzeyinde Yapılan Çalışmalar.....	16
1.2.1.4. Beslenme Şeklinin Belirlenmesi.....	19
1.2.1.5. Yerel Düzeyde Yapılan Çalışmalar.....	20
1.2.1.6. Hastalıkların Belirlenmesi.....	21
1.2.1.7. Bitki ve Hayvanlara Yönelik Çalışmalar.....	24
1.2.2. Antik DNA Çalışmalarında Kullanılan Biyoarkeolojik Örnekler.....	25
1.2.2.1. Kemikler.....	26
1.2.2.2. Dişler.....	31
1.2.2.2.1. Dişin Yapısı ve DNA'nın Diş İçerisindeki Dağılımı.....	32
1.2.2.2.1.1. Mine.....	32
1.2.2.2.1.2. Dentin ve Pulpa.....	33
1.2.2.2.1.3. Sement.....	33
1.2.2.2.2. Diş Çalışmalarında DNA'yı Etkileyen Faktörler.....	34
1.2.2.2.2.1. Diş Tipi.....	34
1.2.2.2.2.2. Yaş.....	35
1.2.2.2.2.3. Dental Hastalıklar.....	35
1.2.2.2.2.4. Ölüm Sonrası Bozunma.....	36
1.2.3. Antik DNA Çalışmalarında Kullanılan Biyolojik Moleküller.....	37
1.2.3.1. Nükleer DNA.....	37

1.2.3.2.Mitokondriyal DNA.....	39
1.2.3.3.STR (Short Tandem Repeat) Kısa Ardışık Tekrar Dizileri.....	40
1.2.4.Antik DNA Çalışmalarında Karşılaşılan Sorunlar.....	42
1.2.4.1.Kontaminasyon.....	42
1.2.4.1.1.Kontaminasyon Kaynakları.....	43
1.2.4.1.2.Ekzojen DNA ile Kontaminasyon	44
1.2.4.1.3.Kazı Öncesi Kontaminasyon Kontrolleri.....	45
1.2.4.2.Antik DNA Degradasyonu.....	48
1.2.4.2..Amino Asit Rasemizasyonu	50
1.2.4.3.Çevresel Faktörlerin DNA'nın Korunmasına Olan Etkisi	51
1.2.4.3.1.DNA Taponomisi.....	51
1.2.4.3.2.Humik asit, fulvik asit ve nem.....	52
1.2.4.3.3.Mikroorganizmaların Varlığı	52
1.2.4.3.4.Örneklerin Muhafaza Edilmesi.....	53
1.2.4.3.5.Sıcaklık.....	53
1.2.5.Antik DNA Çalışmalarında Özgünlük Kriterleri.....	55
1.2.6.Antik DNA Analizlerinde Uygulanan Yöntemler	57
1.2.6.1.Dekontaminasyon Yöntemleri.....	58
1.2.6.1.1.Fiziksel Temizlik ile Dekontaminasyon	59
1.2.6.1.2.Kimyasal Temizlik ile Dekontaminasyon.....	60
1.2.6.1.3.Ultroviyole Işını ile Dekontaminasyon.....	61
1.2.6.2.Dekalsifikasyon	62
1.2.6.3.DNA İzolasyon Yöntemleri	63
1.2.6.3.1.Fenol Kloroform ile DNA İzolasyon Yöntemi.....	66
1.2.6.3.2.Silika Yöntemi ile DNA İzolasyon Yöntemi	67
1.2.6.3.3.Ticari Kitler ile DNA İzolasyon Yöntemi.....	70
1.2.6.4.PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	70
BÖLÜM: 2 KONU-AMAÇ, MATERYAL VE METOT.....	75
2.1.Konu-Amaç.....	75
2.2.Materyal.....	76
2.2.1. Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü.	78
2.2.2. Van Kalecik Köyü Kalecik Nekropolü.....	80

2.2.3. Van Kalecik Köyü Ablagens Nekropolü	81
2.2.4. Van Kalecik Köyü Çatak Nekropolü	82
2.2.5. Giresun Adası	82
2.2.6. Teos Antik Kenti	84
2.2.7. Nysa Antik Kenti	86
2.2.8. Beybağ Mevkii Kazısı	88
2.3. Metot	89
2.3.1. Dekontaminasyon İşlemleri	89
2.3.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Dekontaminasyon İşlemi	90
2.3.2. Pulverizasyon (Toz Haline Getirme)	93
2.3.3. Dekalsifikasyon	96
2.3.4. DNA İzolasyonu	98
2.3.4.1. Fenol Kloroform DNA İzolasyon Yöntemi	98
2.3.4.2. QIAGEN Kemik ve Diş Protokolüne Göre DNA İzolasyon Yöntemi	99
2.3.4.3. Dişlerden DNA İzolasyonu	100
2.3.5. DNA'nın Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi	102
2.3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	103
2.3.7. Kapiller Elektforez	104
2.3.8. Kontaminasyonu Engellemek İçin Yapılan Çalışmalar	104
BÖLÜM:3 BULGULAR	107
3.1. Dekontaminasyon İşlemleri Sırasında Gözlemlenen Bulgular	107
3.2. Pulverizasyon (Toz Haline Getirme) Aşamasında Gözlemlenen Bulgular ...	112
3.3. DNA İzolasyonları Sonucunda Elde Edilen DNA'ların Miktar Tayini	113
3.4. Dekalsifikasyon İşlemleri, DNA Miktar Tayini ve PZR Değerlendirilmesi ..	116
3.5. DNA İzolasyon Yöntemlerinin ve PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	119
BÖLÜM:4 TARTIŞMA	124
SONUÇ ve ÖNERİLER	146
ÖZET	149
SUMMARY	151
KAYNAKÇA	153

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1 Dişin yapısı	32
Şekil-2 İnsanlarda bulunan 22 çift otozomal ve 1 çift cinsiyet kromozomu	38
Şekil-3 Çoğu antik buluntulara ait DNA örneklerinde sadece kısa gen bölgeleri çoğalabilir. 1-7 arasındaki bantlar, Geç Pleistosen dönemindeki mağara ayılarına ait mtDNA amplifikasyonlarının elektroforez görüntüleri. PZR aşamasında iki tane kontrol (K1, K2) kullanılmıştır. 6 örnek 105 bç. uzunlukta, 2 örnek 127 bç. uzunlukta amplifiye olmuş ve 175 bç'de ise hiçbir örnek amplifiye olmamıştır.....	57
Şekil-4 Çalışmada kullanılan kemik ve diş örneklerine ait kazı bölgeleri	76
Şekil-5 Eski Van Şehri Kalesi.....	79
Şekil-6 Eski Van Şehri hava fotoğrafı	80
Şekil-7 Van Kalecik Köyü Kalecik Nekropolü dikilitaşlar ve taş halkaların genel görünüşü	81
Şekil-8 Kalecik Nekropolü'nün genel görünüşü	81
Şekil-9 Giresun Adası.....	83
Şekil-10 Giresun Adası kazı alanından çıkartılan iskeletler	83
Şekil-11 Teos Antik Kent Haritası	85
Şekil-12 Teos Antik Kenti Genel Görünüşü	85
Şekil-13 Teos Güney Liman Klisesi.....	86
Şekil-14 Nysa Antik Kenti'nin hava fotoğrafı	87
Şekil-15 Nysa Antik Kenti Kütüphanesi	88
Şekil-16 Nysa Antik Kenti'nin ana caddesi.....	88
Şekil-17a Femur kemiğinin dış kısmında bulunan kaba topraklar fırça ile uzaklaştırılmıştır.....	91
Şekil-17b Femur kemiğinin dış yüzeyi zımpara ile temizlenmiştir	91
Şekil-18 Zımparalama işleminin yetersiz görüldüğü durumda femur kemiğinin dış kısmı el frezesi ile temizlenmiştir	91

Şekil-19a Femur kemiğinin distal kısmı SDS çözeltisi kullanılarak kimyasal temizliği yapılmıştır	92
Şekil-19b Dekontaminasyon işlemlerinde herbir örnek için ayrı diş fırçası kullanılmıştır	92
Şekil-20 Fiziksel ve kimyasal dekontaminasyon işlemlerinden sonra örnekler UV ışını altında bekletilmiştir	92
Şekil-21 Femur kemiğinden kesit alınması.....	93
Şekil-22 Demir testeresi ile kesilen femur kemiğinin dış yüzeyindeki kaba partiküller el frezesi ile uzaklaştırılmıştır	94
Şekil-23 Kesilmiş olan femur kemiği Mikrohid AF kullanılarak dezenfekte edilmiştir	94
Şekil-24 Femur kemiklerinden bazıları sıvı azot kullanılarak toz haline getirilmiştir	94
Şekil-25 Timpanik ve femur kemiklerinin bazıları sıvı azot kullanılmadan toz haline getirilmiştir	95
Şekil-26 Toz halindeki kemiğin terazide tartılması.....	96
Şekil-27 Toz haline getirilmiş olan kemik örneklerine EDTA solüsyonu eklenmiştir	97
Şekil-28 Dekalsifikasyon aşaması.....	97
Şekil-29 Dekalsifikasyon işlemi tamamlanmış örnekler	98
Şekil-30 Dişlerden pulpa çıkartılma işlemi.....	102
Şekil-31a Fiziksel ve kimyasal dekontaminasyon işlemleri sırasında Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü Kazısından çıkartılmış olan 1 numaralı femur kemiğinde çatlak gözlemlenmiştir	110
Şekil-31b Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü Kazısından çıkartılan 2 numaralı femur kemiğinde çatlak olduğu gözlemlenmiştir.....	110
Şekil-31c Eski Van Kalesi ve Höyüğü Kazısından çıkartılan 2 numaralı femur kemiğinin fiziksel ve kimyasal dekontaminasyon işlemleri sonrasında belirgin halde çatlak olduğu gözlemlenmiştir.....	110

Şekil-32 Giresun Adası Kazısından çıkartılan 19 numaralı femur kemiğinde kırık olduğu gözlemlenmiştir	110
Şekil-33a Teos Antik Kenti Kazısından çıkartılan 6 numaralı mandibula parçalanmıştır ve mandibula üzerinde bulunan dişlerde aşırı derecede aşınma olduğu için pulpa çıkartılamayacağından dolayı çalışmaya dâhil edilmemiştir	111
Şekil-33b Teos Antik Kenti Kazısından 5 numaralı mandibula örneği kırılmış ve bazı dişler çene içerisinde gömülü kalmıştır. Diş köklerinde parçalanma ve aşınmalar olduğu için çalışmaya dahil edilememiştir	111
Şekil-34a Nysa Antik Kenti Kazısından çıkartılan timpanik kemikler	112
Şekil-34b Giresun Adası Kazısından çıkartılan 40 numaralı femur kemiğinin dış yüzeyi çok pürüzlü olduğu için zımparalama işlemi yapılamamıştır	112
Şekil-35 Van Kalecik Köyü Kalecik Kazısından çıkartılan dişler	113
Şekil-36 X-STR sonucunda amplifikasyon oluşmayan örneklerden 26 numaralı timpanik kemiğinin elektroforez görüntüsü.....	122
Şekil-37 X-STR sonucunda 21 numaralı diş örneğinde sadece Y kromozomunda amplifikasyon olduğu için allel düşmesi gözlemlenmiştir.....	131
Şekil-38 X-STR sonucunda amelogenin gen bölgesinde amplifikasyon oluşmuştur ve 27 numaralı bireyin cinsiyeti dişi olarak belirlenmiştir.....	122
Şekil-39 X-STR sonucunda amelogenin gen bölgesinde amplifikasyon oluşmuştur ve 33 numaralı bireyin cinsiyeti erkek olarak belirlenmiştir.....	123

TABLolar DİZİNİ

Tablo-1 Antik DNA çalışmalarının Antropoloji’de kullanım alanları.....	7
Tablo-2 DNA’nın korunmasında etkili olan çevresel faktörler	55
Tablo-3 Antik DNA için özgünlük kriterleri	56
Tablo-4 Silika yöntemi ile yapılan DNA izolasyonunda karşılaşılan sorunlar ve önerilen çözümler	69
Tablo-5 Çalışmada kullanılan kemik ve diş örneklerinin çıkartılmış oldukları kazı alanı, kazı yılı ve tarihi dönemi gösterilmiştir	77
Tablo-6 Kazıdan çıkartılan örneklerde gözlenen morfolojik bulgular	108
Tablo-7 Diş, fibula, femur ve timpanik kemiklerinin toz halindeki miktarları ve fenol/kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu sonucundaki DNA miktar tayinleri.....	114
Tablo-8 QIAGEN Forensic Kit ile DNA İzolasyonu yapılan fibula, femur ve timpanik kemiklerinin DNA miktar tayini	115
Tablo-9 Sonuç alınamayan örneklerin farklı dekalsifikasyon aşamalarındaki DNA miktar tayini ve PZR sonuçları	117
Tablo-10 Fenol/Kloroform ve QIAGEN Forensic Kit yöntemi ile yapılan DNA izolasyonlarının PZR sonuçlarının karşılaştırılması	120
Tablo-11 Moleküler çalışmalar sonucunda belirlenen cinsiyetin morfolojik cinsiyet tespiti ile karşılaştırılması	121

KISALTMALAR

aDNA	Antik DNA
Bç	Baz çifti
BSA	Bovine Viral Serum (Sığır Serum Albumini)
Ca	Kalsiyum
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
GuSCN	Guanidinium thiocyanate
HVR	Hypervariable region (Çok değişken bölge)
Kb	Kilo baz
KCl	Potasyum Klorür
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
M.Ö.	Milattan Önce
mRNA	Messenger RNA
M.S.	Milattan Sonra
mtDNA	Mitokondrial DNA
NaCl	Sodyum Klorür
Nm	Nanometre
pH	Power of Hydrojen (Hidrojenin Gücü)
PTB	N-phenacylthiazolium bromid
PZR /PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikada dönüş sayısı
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sn	Saniye
STR	Short Tandem Repeat (Kısa Ardışık Tekrar Dizisi)
UV	Ultraviyole Işını
µl	Mikrolitre

ÖNSÖZ

Doktoraya başladığım ilk günden itibaren bana her konuda destek olan, ilgi alanım olan antik DNA çalışmalarını yapabilmem için beni her zaman destekleyen ve yanımda olan, çalışmalarım boyunca beni yönlendiren, yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, bana olan güven duygusu ile kendimi iyi hissettiren ve olumlu düşünceleri ile beni motive eden, tez danışmanım Prof.Dr. Timur GÜLTEKİN'e sonsuz teşekkürler ediyorum.

Çalışmalarımı yapabilmem için Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı DNA Laboratuvarını kullanmam için izin veren Prof. Dr. Lale SATIROĞLU TUFAN'a, proje kapsamında gerçekleşen tezimin başladığı günden itibaren hem deneyler aşamasında hem de proje ile ilgili işlerin yürütülmesinde benimle birlikte çalışan, tecrübelerini paylaşan, bana yol gösteren biyolog Cüneyt ELMA'ya, ihtiyaç duyduğum zaman yardımlarını benden esirgemeyen, laboratuvarında rahat bir şekilde çalışmamı sağlayan biyolog Handan SİNAN'a samimi ve sıcak arkadaşlığı için ayrıca teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam boyunca ilgi duyduğum antik DNA çalışmaları için beni hep destekleyen ve tezi bitirmem için motive eden Antropoloji Bölüm başkanı Prof.Dr. Ayla Sevim EROL'a,

Teos Kazısı'ndan çıkartılan örnekleri çalışmam için izin veren Ankara Üniversitesi Arkeoloji Bölümünden Prof.Dr. Musa KADIOĞLU'na,

Van Kalecik Köyü Urartu Nekropolü'nden çıkartılan dış örneklerini kullanmama izin veren Yüzüncü Yıl Üniversitesi Arkeoloji Bölümünden Araştırma Görevlisi Hakan YILMAZ'a,

Eski Van Şehri, Kalesi ve Höyüğü Kazısı'ndan çıkarılan örnekleri kullanmama izin veren İstanbul Üniversitesi Arkeoloji Bölümünden Doç.Dr. Erkan KONYAR'a ve örnekleri temin etmemde bana yardımcı olan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Antropoloji Bölümünden Yrd. Doç.Dr. Zehra SATAR'a,

Giresun Adası Kazısı'nın başkanlığını yapan ve tezimde materyal olarak iskelet örneklerini kullanmam için gerekli izini veren Selçuk Üniversitesi Arkeoloji Bölümünden Doç. Dr. Ertekin Mustafa DOKSANALTI'ya,

Muğla Beybağ Kazısından çıkarılan iskeletleri tezimde kullanmam için bana izin veren ve doktora süresi boyunca yanımda olduğunu her zaman hissettiren, ayrıca Giresun Adası Kazısı ile ilgili bilgilerini benimle paylaşan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Antropoloji Bölümünden Yrd. Doç. Dr. Seda Karaöz ARIHAN'a ve antropolog Emel ACAR'a,

NYSA Antik Kenti Kazısı'na katılmama vesile olan ve kazının bilimsel danışmanlığını yapan Ankara Üniversitesi Arkeoloji Bölümünden Doç. Dr. Hakan Serdar ÖZTANER'e ve iskeletleri temin etmemde yardımlarını esirgemeyen Aydın İli Müze Başkanı Yılmaz AKKAN'a ve Aynur AKKAN'a,

Dişlerden pulpa çıkarmamda yardımcı olan Tunca Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi ve diş hekimlerine,

Çok teşekkür ediyorum.....

Hayatımın her aşamasında özellikle eğitim dönemimde aldığım bütün kararlarda arkamda olan, maddi ve manevi her zaman benim yanımda olan, eğitimim için hiçbir fedakarlıktan kaçmayan, doktora süreci boyunca yoğun çalışmalarımın dolaylı zaman ayıramadığım aileme anlayışları ve sabırlarından dolayı minnettarım.

Evrin TEKELİ



GİRİŞ

Anadolu'nun, uzun tarihi boyunca coğrafi konumu kadar stratejik durumu da dünyanın değişik coğrafyaları ile etkileşim içinde olmuştur ve farklı kültürlerle sahip topluluklar tarafından yurt edinilmiştir. Anadolu, birçok prehistorik medineyete ev sahipliği yapmasından dolayı Türk bilim adamları kadar dünyanın birçok ülkesindeki araştırmacıların da ilgisini çekmiştir (Demirel, 2011).

Anadolu'nun farklı kültürel ve biyolojik çeşitliliği barındırmasından dolayı antropolojik açıdan oldukça zengin olan ülkemizde birçok arkeolojik ve antropolojik kazılar yapılmıştır ve halen devam eden kazılar vardır. Kazılarda birçok iskelet serisi elde edilmiş ve eski insanların morfolojik yapıları, demografisi, ortalama ömür uzunluğunun saptanması, boy uzunlukları, paleopatolojik bulgular, beslenme şekilleri gibi konularda paleoantropolojik açıdan araştırmalar yapılmıştır. Yapılan bu araştırmalar birçok yüksek lisans ve doktora tezinde yerini almıştır (Gözlük, 1998; Özdemir, 2008; Çırak, 2009; Özcan, 2010; Arıhan, 2013; Dağtaş, 2013; Acar, 2015; Yaka, 2015). Yapılan çalışmalarda, arkeologlar için kazılardan çıkarılan materyaller, geçmişin aydınlatılması için önemli olurken, antropologlar için de kazıdan çıkarılan iskelet örnekleri üzerinde yapılan morfolojik çalışmalar merak edilen birçok soruyu cevaplamaktadır. Tarihçiler, arkeologlar, paleontologlar, antropologlar, biyologlar, dil bilimciler insan kökenini merak etmiştir ve popülasyonlarının kökeni hakkında yapmış oldukları çalışmalar sonucunda çeşitli bilgilere ulaşmışlardır. Moleküler antropolojinin ortaya çıkması ve genetik teknolojinin antropoloji alanında kullanılması ile birlikte, kazıdan çıkartılan örnekler üzerinde yapılan moleküler analizler son yıllarda sosyal bilimler adına büyük bir

önem kazanmıştır. Özellikle de moleküler antropologlar bu alan ile daha çok ilgilenmeye başlamıştır. Bunun nedeni sahip olduğumuz DNA'ların bize atalarımızdan geçmiş olması, başlangıçtan bu yana mutasyonların birikmesi ve sonuçta günümüz insanların DNA'ları arasında farklılıklarının saptanmasıdır. Bu farklılıklar ile insanların genetik geçmişinin tarihi ve akrabalarına ışık tutacak kayıtlara ulaşılmaktadır.

Arkeolojik kazılardan elde edilen biyolojik dokular, tarihi iskelet örnekleri, dondurulmadan saklanan tıbbi örnekler gibi DNA analizleri için gereken özel koşullarda saklanmamış materyallerden DNA eldesini içeren çalışmaları antik DNA çalışmaları olarak tanımlamak mümkündür. Tarih öncesi topluluklara ait kazı bölgelerinden DNA elde edilmesi ile ilgili literatür taramaları DNA analizlerinin güçlüklerini anlatmakla başlar. Düşük DNA kalitesi, DNA'nın ileri derecede degrade olması, PZR inhibitörlerinin yoğunluğu ve yüksek kontaminasyon riski sebebiyle antik DNA analizlerinde DNA elde edilmesi için kullanılan yöntem büyük önem kazanmaktadır (Roux, 1995; Parr ve ark., 1996; Pääbo ve ark., 2004; Rohland ve Hofreiter, 2007). Bu sebeple DNA izolasyonu antik DNA analizlerinin en can alıcı aşamasıdır (Rohland and Hofreiter, 2007). DNA izolasyonu kadar önemli olan diğer faktörler ise; kalıntıların izolasyon öncesi ele alınış şekilleri ile birlikte kazının ne kadar eski olduğu, kazı bölgesinin iklimi, kazı alanındaki toprağın yapısı ve içeriği ile nemlilik durumudur. Bu gerçek, antik DNA çalışmalarında protokol oluşturmanın güç olduğunu ve her kazı bölgesinin farklı uygulamalar gerektirebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada, Türkiye'de farklı iklim özelliklerine sahip olan ve farklı tarihi dönemlere ait kazılardan çıkartılan degrade olmuş kemik ve diş örneklerinden DNA

elde edilerek cinsiyet tespitinin yapılması ve böylelikle antropolojik metotların cinsiyeti belirlemede yetersiz kaldığı durumlarda DNA analizlerinin önemli ve güvenilir olduğu anlatılmaktadır.

BÖLÜM:1 KAVRAMSAL ve KURAMSAL ÇERÇEVE

1.1.Moleküler Antropoloji

“Moleküler antropoloji” terimi ilk olarak 1962 yılında Wenner Gren Vakfı tarafından gerçekleştirilen “Sınıflandırma ve İnsan Evrimi” konulu bir antropoloji konferansında biyokimyager Emile Zuckerkandl tarafından öne sürülmüştür. Zuckerkandl, insan evrimi çalışmalarını biyomoleküllerin yapısındaki değişikliklerden yararlanarak incelenebileceğini belirtmiştir. Moleküler antropoloji terimi aslında bir çeşit antropolojinin alt dalı gibi gözükmese de, antropolojik sorulara yönelik uygulanan biyokimyasal teknolojiye dayanmaktadır. Zuckerkandl “biyokimyasal antropolojiyi” oluşturan unsurlara dikkat çekerek, insan ve goriller arasında sadece 287 amino asidin farklı olduğu üzerinde durmuştur. Bundan oldukça etkilenen Zuckerkandl, hemoglobinin yapısına dikkat çekerek gorilin sadece normal olmayan insan veya normal olmayan goril olduğunu belirterek, her iki türün de aslında bir popülasyonun devamıdır şeklinde düşünmüştür. Kongre katılımcılarında paleomemalog uzmanı George Gaylord Simpson farklı bir bakış açısıyla yaklaşarak bu düşünceye katılmadığını belirterek, hemoglobinin yanlış bir seçim olduğunu, insan ve gorilin aslında birbirinden biyolojik karşılaştırmalar ile ayrılabilceğini ancak, bunun sadece hemoglobine dayalı olmaması gerektiğini vurgulamıştır. Moleküler evrimin yeni gelişmesi ve bu alanla ilgilenenlerin

araştırmacılarından çok teknolojistlerin olması nedeniyle moleküler antropolojinin gelişim sürecinde çeşitli fikirler ileri sürülmüştür. İnsan ırkları arasındaki akrabalık ilişkilerini serolojik olarak belirlemek amacıyla William C.Boyd tarafından 1963 yılında insan popülasyonu ve genetik çalışmalar yapılmıştır. Cavalli-Sforza ve Edward tarafından insan popülasyonuna ait istatistiksel olarak morfometrik ve genetik bilgiler bulunmuştur. Buna göre, Avrupalılar, Asyalılar ve Afrikalılar birbirlerine yakın akrabadır. Ancak bu yöntemler ayrı olarak incelendiğinde yani morfolojik özellikler bakımından karşılaştırıldığında Asya ve Avrupalılar birbirlerine yakın iken, genetik çalışmalar sonucunda Avrupalı ve Afrikalıların birbirine yakın olduğu belirtilmiştir. Bu belirsizlik içinde olan tartışmalar 1980 yılında mitokondriyal Havva'nın gelişine kadar devam etmiştir. Antropolojik sorulara karşı moleküler, serolojik, hematolojik ve genetik yaklaşımlar uzun süre devam etmiştir. Moleküler veriler ile antropolojik yaklaşımlar arasında oluşan bağ, moleküler antropolojiyi ortaya çıkarmıştır (Marks, 2002). Mitokondriyal DNA'nın ve modern DNA'nın keşfi ve daha sonra 1984 yılında antik DNA çalışmalarının başlaması ile moleküler antropoloji alanında yapılan çalışmalar artmıştır. İnsan evrimi ve genetik çeşitlilik gibi antropologlar tarafından merak edilen konular, genetik teknolojinin antropolojide kullanılması ile moleküler antropoloji bilim dalı ortaya çıkmıştır. Böylelikle insan atalarının izlemiő olduğu göç yolları ve nüfus dağılımlarının belirlenmesine olanak sağlamış, insan evrimi ile genetik bilgiler elde edilmiştir. 1981 yılında Mitokondriyal DNA İnsan Genom Projesi tamamlanmıştır ve bu proje verileri moleküler antropoloji açısından önem arz etmektedir (Stoneking, 2016). 1985 yılında PZR'ın keşfi ile antik DNA alanında yapılan çalışmalar artmış ve moleküler antropoloji 2000 yılından sonra tüm

dünyada daha popüler hale gelmiştir (Akbaba, 2012). Moleküler antropoloji genel olarak,

1. İnsan olmayan primat toplumlarda moleküler genetik varyasyon modelleri
2. İnsan ve insan olmayan primat genlerinin karşılaştırılması
3. Çeşitli modern insan popülasyonlarının genetik varyasyon modelleri
4. Antik örneklerden genetik bilginin ortaya çıkartılması konularını kapsamaktadır.

1.2. Antik DNA Çalışmaları

İskelet üzerindeki bilgilerin elde edilmesinde antropologlar tarafından yapılan çalışmalarda yaş tayini, cinsiyet tayini, boy tahmini gibi biyolojik profili belirlemede kullanılan temel karakterler belirlenmiştir. Arkeologlarında bu alanda çalışmasıyla birlikte günümüz ve eski popülasyonlar arasındaki farklılıklar hakkında bilgi edinilmeye başlanmıştır (Altunçul, 2001). 1953 yılında James Watson ve Francis Crick tarafından DNA'nın keşfedilmesi ile iskeletlerden genetik bilgiler elde edilmeye başlamıştır. 1984 yılında California Üniversitesi'nden Higuchi ve arkadaşları, Güney Afrika'da yaşamış ve soyu tükenmiş olan bir zebraaya ait (*Equus quagga quagga*) deri kalıntılarında DNA elde ederek, dizileme yapmış ve modern zebra ile filogenetik yakınlığını belirlemişlerdir. Bu çalışma literatürde geçen ilk antik DNA çalışmasıdır (Higuchi ve ark., 1984). Bu çalışmanın hemen sonrasında Svante Pääbo ve ekibi tarafından 1985 yılında 23 farklı mumya üzerinde çalışılmış ve bunların birinden (2430 yıllık bir çocuk) DNA dizileri elde edilmiştir. Yapılan bu ilk çalışmalarda nükleer DNA'nın bir bölümünün yok olmasından dolayı mitokondriyal DNA çalışılmıştır. Ayrıca Pääbo bu çalışmada 23 farklı mumya örneğini

mikroskofta inceleyerek, dokulardaki hücresel değişimleri gözlemlemiş ve vücut yüzeyinden aldığı dokularda dehidratasyonun iç kısımlara göre daha çabuk geliştiğini, bundan dolayı da vücut yüzeyinin daha iyi korunduğu sonucuna varmıştır (Pääbo ve ark., 1985). 1985 yılında C. Mullis ve arkadaşları tarafından PZR'ın keşfedilmesiyle birlikte yapılan çalışmaların alanı genişlemiş, daha hızlı çalışılmaya başlanmıştır (Mullis ve ark, 1986). DNA zincirinin önceden belirlenen ve istenilen bir bölgesini çoğaltmak için kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu, antik DNA çalışmaları için de kullanılmaya başlanmıştır ve moleküler antropoloji çalışmalarında tablo-1'de gösterildiği gibi devrim niteliği taşıyan bir yöntem olarak, yapılacak olan DNA analizlerinde yerini almıştır (Rizzi ve ark., 2012).

Tablo-1 Antik DNA çalışmalarının Antropoloji’de kullanım alanları (Kaestle ve Horsburgh, 2002)

Uygulamalar	İçerdiği Konular	Moleküler Belirteç
Cinsiyet Belirleme	Evlilikleri ve gömü biçimlerini anlama, cinsiyetler arasındaki farklı ölüm oranları, cinsiyetlere bağlı görülen hastalıklar, beslenme şekillerini anlamaya yönelik yapılan çalışmalar	Cinsiyet Belirleyen Kromozomlar
İnsana ait olmayan aDNA	Beslenme şekilleri ve avlanmayı, bitkilerin ve hayvanların evcilleştirilmesini, insan popülasyonu ile aynı ortamda büyüyen hayvanların belirlenmesini, tarih öncesi ve günümüzde görülen hastalıkların belirlenmesi	Mitokondriyal DNA, Kloroplast ve Otozomal DNA
Akrabalık ilişkisi	Sosyal yapıyı, statüyü, evlik şekillerini, yapılan göçleri ve ölü gömme geleneklerini anlamaya yönelik yapılan çalışmalar	Mitokondriyal DNA, cinsiyet kromozomu ve otozomal mikrosatellitler
Popülasyon devamı ve nüfus hareketliliği	Tarih öncesi popülasyonun göç hareketini, gruplar arasındaki ata-torun ilişkisini, eski gruplar arasındaki morfolojik veya kültürel kalıntılar arasında benzerlik veya farklılığı anlamaya yönelik yapılan çalışmalar	Mitokondriyal DNA, cinsiyet kromozomu ve otozomal DNA
Filogenetik analizler	Türlerin evrimsel şekilleri ve modern insanın kökenini anlamaya yönelik çalışmalar	Mitokondriyal DNA, cinsiyet kromozomu ve otozomal DNA

1.2.1. Antik DNA Çalışmalarının Kullanım Alanları

Antik DNA çalışmaları; türlerin evrimi, insanlığın başlangıcı, tarımsal üretim veya medeniyetin başlangıcı, bitki ve hayvanların evrimi, geçmişte yaşamış insanların geçirmiş olduğu hastalıklar gibi geniş kapsamlı sorulara cevap vermeye çalışmak için bilim adamları için giderek önemli bir araç haline gelmiştir (Gusta, 1996; Hannison ve Foley, 2007; Llamas ve ark., 2016).

1.2.1.1. Birey Düzeyinde Yapılan Çalışmalar

Hem adli bilimlerde hem de antik DNA çalışmalarında birey düzeyinde kimliklendirme çalışmaları önemli bir yere sahiptir. Bazı durumlarda (aynı yaş ve cinsiyete sahip, kaçırılmış bir birey) kimliklendirmenin yapılması mümkündür, ancak kesin bir sonuç için DNA analizlerine ihtiyaç duyulur. İskelet kalıntılarından biyolojik profili belirleyebilmek için uygulanacak en iyi yöntem DNA analizidir. Adli bilimlerde elde edilen DNA ile, bireye ait genetik bir profil oluşturulur ve bireyin yakınlarından alınan DNA örneği ile karşılaştırma yapılarak genetik profilin belirlenmesi ile kimliklendirme yapılır. Kitlelölümlerde, toplu mezarlarda, cinayet kurbanlarında, kaçırılma durumlarında DNA analizleri kullanılır (Hagelberg ve ark., 1991). Ölmüş olan bir bireyin yaşayan torunları ya da bilinmeyen aileleri ile olan bağı, aDNA çalışmaları ile belirlenebilir ancak, yüzlerce ya da binlerce yıl öncesine ait bir bireyin torunlarını tanımlamak oldukça zordur. Eski çağda yaşamış bir birey ile benzer özelliklere sahip modern çağda yaşayan bireylerin bu özelliklerinin diğer modern çağ bireylerinde benzerlik göstermemesi açısından anne soyunun araştırılması gerekir. Ancak, bu araştırmayla ilgili birkaç zorlayıcı unsur

vardır. İlk olarak, binlerce yıl önce hayatta olan birçok insanın ya soyu tükenmiş ya da çok fazla soyu türemiştir (büyük olasılıkla, nüfus dağılımı olmuştur). Diğer zorlayıcı unsur ise, eğer annelerin dünyaya getirdiği kız çocuklarının sayısı her kadın başına hayatta olan bir kız çocuğu ortalamasını takip ederse, herhangi bir annenin mtDNA'sının 100 nesil (yaklaşık insan hayatının 2000 yılına eş) canlı kalma olasılığı %2'den daha az olmaktadır. Bu nedenle, 2000 yıl önce hayatta olan birçok kadının nesli artık devam etmiyor olacaktır. Diğer taraftan, bugün hayatta olan insanların büyük çoğunluğu 2000 yıl önce hayatta olan kadınların sayıca oldukça az olduğu bir mitokondriyal soy araştırmasında kendi soylarını izleyebileceklerdir. Ancak, bu “şanslı” kadınların bir kısmı soyları hayatta kalmayan bireylerle en azından anne tarafından akraba olursa, modern soylar ve binlerce yıl tarih öncesinden gelen bu soylar arasındaki eşleştirmelerin (veya yakın-eşleştirmeler) daha fazla meydana geleceği düşünülebilir. Hayatta olan insanları geçmişte yaşamış bir bireyle bağdaştırmanın diğer bir zor yanı da anne ve/veya baba soyunu kullanarak direk bir ilişkiyi saf dışı bırakmanın mümkün olmamasıdır. Çünkü mtDNA anneden gelir, fakat nükleer DNA ebeveynlerin her ikisinden de eşit şekilde gelmektedir, bunun yanında, bir bireyin % 100 mtDNA'sı yalnızca 1/16 oranında büyük-büyük dede ve ninesinden gelmektedir, şöyle ki; ataların, bir bireyin nükleer DNA'sına katkısı nükleer DNA'nın 1/16 ya da %6 oranındadır. Bu nedenle mitokondriyal DNA birçok soyun yalnızca bir dışından gelmektedir ve bu dışı birçok benzerlik içinde yalnızca bir benzerlikle uyumludur. Eğer, eskiden hayatta olan bir dışının ırksal bağlantısı yalnızca bir eril (örneğin; büyük-büyük-büyük dede) içeriyorsa, bu durumda bu bağlantının mitokondriyal sinyali kaybolur. Baba tarafından gelenlerin dışında Y- Kromozomu DNA için de aynı durum geçerlidir. Bu

nedenle modern çağda yaşayan bireyler aDNA bilgilerini kullanarak tarih öncesinde yaşayan atalarını muhtemelen bulabilmelerine rağmen, kesin olarak bir sonuca varamayacaklardır (Kaestle ve Horsburgh, 2002).

Birey düzeyinde yapılan antik DNA çalışmalarında X ve Y kromozomları kullanılarak cinsiyet belirlenebilmektedir. Kazıdan çok fazla tahrip olmuş şekilde çıkarılan ve karışık halde bulunan bireylerin minimum birey sayısını belirlemede X ve Y kromozomları belirlenerek cinsiyet tespiti yapılır. Ayrıca iskeletler üzerinde yapılan morfolojik özellikler, genetik veya bulaşıcı bir hastalığa dair bir işaret veriyorsa aDNA analizleri ile hastalığın neden olduğu mikroorganizma belirlenebilir (Kaestle ve Hoursburgh, 2004).

Cinsiyet belirlemenin dışında, bireylerin otozomal kromozomlarında oluşan varyasyonlardan yararlanılabilir. Örneğin, bölgenin tarihi yapısı da göz önünde bulundurularak, bireyin morfolojik olarak incelenmesi ile genetik bir hastalıktan şüphelenildiği durumda DNA analizi yapılarak, mutasyonlar tespit edilebilir. Örneğin Abraham Lincoln'ın Marfan Sendromu olduğunu öne süren araştırmacılar vardır (McKuisck, 1991; Reilly, 2000). 15.kromozom üzerinde yerleşmiş olan fibrillin geninde oluşan mutasyonlar sonucunda Marfan Sendromu oluşur (Ramirez ve ark., 1993). Marfan Sendromu belirtilerinden olan, aşırı uzun boy, uzun kol ve uzun eller Lincoln'da ve Lincoln'un atalarında görülmüştür. Lincoln'un ölümünden sonra, doku örneğinden aDNA çalışması yapılmak istenmiştir, fakat bu çalışmanın etik olmayacağı görüşünden dolayı çalışmaya izin verilmemiştir (Reilly, 2000).

Modern insanlar ve diğer hominidler arasındaki ilişki tanımı aDNA teknikleri kullanılarak incelenmiştir (Klings ve ark., 2000). Evrimsel tarihimizdeki

Neandertalların durumu, benzer olarak tanımlandıklarından beri tartışılmaktadır, fakat bir Neandertal tür örneğinden elde edilen mitokondriyal dizinin bir kısmını içerdiği belirtilen modern insanlarla benzer özelliklere sahip değildir. İki farklı Neandertal bireyin mitokondriyal dizini, Neandertal DNA dizisinin orijinal yayını basıldığı tarihten itibaren (Klings ve ark., 2000;Ovcinnikov ve ark., 2000) Neandertal mitokondriyal DNA dizileri modern bireylerden farklılık göstermektedir. Tür ya da alttür durumu ve genetik özellikler ile mitokondriyal dizi farklılığı arasındaki ilişki çok iyi anlaşılmamaktadır, fakat modern insanlar arasındaki farklılıklar karşılaştırıldığında bu bireyler arasındaki farklılık oldukça yüksek derecede gözlemlenmektedir (Kaestle ve Horsburgh, 2002; Caramelli ve ark., 2003).

1.2.1.2. Cinsiyetin Belirlenmesi

Paleoantropoloji alanında iskeletler üzerinde yapılan çalışmalarda bireyin cinsiyetinin belirlenmesi çok önemlidir (Gözlük, 1998; Çırak, 2009; Singh ve Garg, 2014; Mittnik ve ark., 2016). Cinsiyet belirlemede morfolojik ve metrik yöntemler kullanılmaktadır. Morfolojik yöntemde kafatası ve pelvis başta olmak üzere kadın ve erkekte cinsiyet farklılığı gösteren tüm kemikler morfolojik olarak incelenir (Krogman ve İşcan, 1986; Simon, 1998; Ubelaker, 2008). Özellikle yetişkinlerde cinsiyet belirlenirken, en çok pelvisten yararlanılır, çünkü cinsiyetler arasındaki fonksiyonel farklılıkların direkt ilişkili olduğu bölge pelvistir. Ancak bu yöntem çocuklarda kullanılmaz, çünkü iskeletteki cinsiyet farklılığı ergenlikten önce belirsizdir. İskelette tüm kemikler parçalanmamış ve tam olarak bulunuyorsa %100, sadece pelvis tam olarak bulunuyorsa %95, sadece kafatasından ise %92, pelvis ve kafatasının birlikte bulunduğu durumlarda %98 oranında cinsiyet belirlenebilmektedir (Buikstra ve Ubelaker, 1994). Hummel ve arkadaşlarına (2000)

göre ise, yetişkin bir bireyde kafatası ve kalça kemiği parçalanmamış halde olsa bile, morfolojik incelemelerde cinsiyet belirlerken yaklaşık %12 oranında hata olabilmektedir (Hummel ve ark., 2000). Kazılardan iskeletler tam halde çıkartılmış olsa bile, kafatası ve pelviste cinsiyet farklılığı olmaktadır.

Kafatasının ve pelvisin morfolojik olarak incelendiği durumlarda bazı kriterlerden yararlanılır. Kafatası inceleniyor ise; kafatasının hacmi, mastoit çıkıntı, oksipital bölgedeki kas yapışma izleri, frontal ve parietal çıkıntı, supraorbital kenarın büyüklüğü, alının şekli, elmacık kemiğinin şekli, altçene, temporal çizginin şekli, damağın şekli ve büyüklüğü, glabellanın çıkıntılı olması ve dişlere bakılmaktadır. Pelvisin incelendiği durumda ise; kas yapışma izlerine, pubis açısının şekline, pelvis boşluğunun şekline, sacrumun, iliumun ve symphysis pubisin yapısına bakılarak cinsiyet tayini yapılmaktadır (Gözlük, 1998; Çırak, 2009; Yaşar, 2012). Kafatası veya pelvisin bulunmadığı durumlarda uzun kemikler anatomi, adli antropoloji ve adli tıpta önemli bir rol oynamaktadır (Otağ ve Çimen, 2003). Black (1978), femur kemiğinin orta shaft çevresinin ölçümüne dayanarak ve uzun kemiklerin uzunluğuna göre cinsiyet tespitini geliştirmiştir (Black, 1978). Otağ ve Çimen (2003), kadın ve erkeklere ait toplamda 226 femur kemiğinden morfometrik yöntemlerle cinsiyet tespiti yapmıştır. Çalışmanın sonucunu beş popülasyonda femurdan yapılan cinsiyet tespiti çalışmaları ile karşılaştırmışlardır ve buldukları sonuçların doğruluk oranının düşük olduğunu belirtmişlerdir (Otağ ve Çimen, 2003). Toplu bir şekilde gömülen ve cinsiyeti bilinmeyen bireylerin calcaneus ve talus kemiği kullanılarak aritmetik ortalama hesabı ile cinsiyet belirlenebilmektedir (Acar, 2014). Bunun dışında cinsiyet belirleme ile ilgili çalışma yapan araştırmacıların bazıları ayak ölçüsünü temel alan çalışmalara dikkat çekmiştir. Bununla ilgili elde

edilen veriler, adli durumlara uygun olmaktadır, çünkü ayak kemikleri, ayakkabının içinde kendisini fosilleşmeye karşı koruyabilmektedir, diğer bir şekilde ayak kemikleri kendisini iskeletin geri kalanından ayırabilmektedir (Ubelaker, 2008).

Parçalanmış iskelet kalıntılarında veya seksüel farklılıkların tam olarak belirmediği yaşlardaki bireylere ait iskeletlerde morfolojik ve metrik yöntemler ile cinsiyetin belirlenmesi mümkün olmadığı için, cinsiyeti moleküler testlerle belirleme alternatif bir yöntem olmaktadır. Ancak, DNA analizinde yapılacak işlemler tam olarak yapılmaz ise veya kontaminasyon oluşursa, hatalı sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Faerman, 1995; O'Rourke ve ark., 2000a; Kaestle ve Horsburgh, 2002; Malaver ve Yunis, 2003; Pääbo ve ark., 2004; Skoglund ve ark., 2014).

DNA izolasyonu ve kimliklendirme ile ilgili teknolojinin ilerlemesiyle araştırmacılara yeni bir kapı açılmıştır. Bireylerde bulunan DNA'nın çoğu kuşaktan kuşağa aktarılır ve mayoz bölünme ile oluşan gamet, her bir bireyi kendi anne/babasından bireysel olarak eşsiz yapar. DNA'nın özel bir bölgesi ise hiç değişmez ve anne/babadan çocuğa değişmeden aktarılır. Bunlardan birisi Y kromozomudur ve babadan erkek çocuğa aktarılır, diğer bir gen bölgesi ise mtDNA'dır ve anneden çocuğa aktarılır. DNA'daki Y kromozomu genetik bir soyadı gibidir ve baba soyunun izini belirlemede kullanılır. Mitokondriyal DNA ise her iki soyun izini belirlemede kullanılır. Cinsiyet kromozomları üzerinde bulunan mitokondriyal DNA ve Y kromozomu ile cinsiyet belirlenir ve adli çalışmalarda kimliklendirme çalışmalarında çok önemlidir. Antik DNA çalışmalarında da morfolojik olarak inceleme yapılamayan durumlarda DNA analizleri önemli rol oynar. Antik DNA çalışmalarında da göç yollarının belirlenmesi başta olmak üzere

genetik hastalıklarda ve eski toplumların yaşamış olduğu coğrafik bölgede oluşan varyasyonların belirlenmesi için öncelikle iskeletlerin cinsiyetlerinin belirlenmesi gerekir (Singh ve Garg, 2014).

Çocukların ve parçalanmış iskelet buluntularının cinsiyetinin belirlenmesi morfolojik olarak zor olduğu için kesin bir sonuç vermeyebilir. Bu yüzden antropolojik araştırmalarda kullanılan moleküler yöntemler ile cinsiyet belirleme testleri, morfolojik incelemeler ile karşılaştırma yapılarak, sonuçların güvenilirliği sağlanır (Stone, 1996; Mitnik ve ark., 2016).

DYZ1 ve DYZ2, Y kromozomu üzerinde tekrar eden dizilimlerdir ve bunlar kromozomun sonunda yer alır. DXZ3, X kromozomu üzerinde tekrar eden dizilimdir. Bu tekrar eden dizilimler, kromozom için spesifiktir ve her birinin yüzlerce kopyası vardır. Çok fazla sayıda kopyalanmasından dolayı, tekrar eden dizilimler, tek kopya dizilimlerine göre daha kolay çoğalır (Ovchinnikov ve ark., 1998).

X ve Y kromozom dizilimlerinden oluşan ve %90 homolog olan, cinsiyetimizi belirleyen gen bölgesi ‘amelogenin’dir (Sullivan ve ark., 1993). Antik örneklerdeki DNA miktarı ve kalitesi daha düşük olmasına rağmen, çok az miktardaki DNA, PZR aşamasında çoğalabilir (Tekeli, 2010). Amelogenin, memelilerde bulunan diş gelişiminde rolü olan bir proteindir. Bu gen bölgesi hem X hem de Y kromozomunda bulunur. Faerman ve arkadaşları (1995) amelogenin gen bölgesini inceleyerek insan iskeletlerinin cinsiyetini belirlemişlerdir. Yapmış oldukları çalışmanın sonucunda X ve Y amelogenin primerlerinin oldukça duyarlı ve güvenilir olduğunu belirtmiş ve morfolojik incelemeler ile bu sonucu

desteklemişlerdir (Faerman ve ark., 1995). Amelogenin geninin X kromozomu 106 bç'lik, Y kromozomu da 112 bç'lik bir bölgede amplifikasyon oluşturur (Sullivan ve ark., 1993). Ancak bazen PZR aşamasında sadece X veya Y'nin amplifikasyonu oluşmaktadır. Bu durum PZR işlemlerinde allel kayması olarak bilinir. Bu problemin çözümü için PZR işlemi birkaç kez tekrarlanmalıdır (Handt ve ark., 1994). Amelogenin gen bölgesinin güvenilirliğini tespit etmek için yapılan bir çalışmada 18. ve 19.yüzyıla ait Londra'da bulunan bir manastır çevresinden cinsiyeti bilinen 13 adet insan iskeletine ait kalıntılar çalışılmıştır. Bunlardan sadece bir tanesinde DNA yetersiz gelmiş, diğer örneklerden başarılı bir şekilde DNA çoğaltılmış ve amelogenin gen bölgesinin doğruluğu, morfolojik incelemeler ile desteklenmiştir (Faerman ve ark., 1998).

Kanada'nın Egerton mezarlığında M.Ö. 12-19. yüzyıl olarak tarihlendirilen mezarlardan 263'ü açılmış ve bu mezarlardan ölü doğan veya yeni doğan 132 birey çıkartılmıştır. Bebeklerde morfolojik incelemeler yapılmış ve %60 oranında diş olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuç oranının, beklenen sonuçlardan daha fazla olması, araştırmacılar tarafından şaşkınlığa neden olmuştur, çünkü gömü ile elde edilen bilgilere göre, yeni doğan veya ölü doğan bu bebekler vaftiz edilmeden gömülmüştür. Bebek ölümlerinde morfolojik veya DNA analizleri ile cinsiyet belirlemede yapılan tahminler sonuçların yorumlanmasında önyargı oluşturmuştur. Genetik analizler ile yeni doğan/ölü doğan birey sayısı 121 olarak bulunmuştur. Bebek ve çocukların cinsiyetinin morfolojik olarak belirlenmesinin hatalı sonuçlara neden olduğu görülmüştür (Hummel ve ark., 2000; Lassen ve ark., 2000).

Çocukların cinsiyetinin belirlenmesi, arkeologlar açısından mezar tipinin öğrenilmesi ve sosyo-kültürel yaşamı bilmek adına önemlidir. Cinsiyet belirlemenin önemine dair farklı bir çalışma İsrail’de gerçekleştirilmiştir. İsrail’deki arkeologlar Ashkelon’da eski bir Roma Hamamının altında bulunan kanalizasyonu kazarken yeni doğan bebek iskeletleriyle karşılaşmışlardır. Arkeologlar bu iskeletlerin infantisit olduğunu düşünmüşlerdir. 43 iskelet üzerinde DNA analizi yapılmış, 43 örnekten 19’u sonuç vermiştir ve bunlardan 14’ünün erkek çocuğa, 5’inin de kız çocuğa ait olduğu belirlenmiştir. Yerleşim yeri incelendiğinde ise; bu hamamın bir genelev olduğu ve bulunan bu bebeklerin genelevde çalışan kadınlara ait olduğu ve onlar tarafından öldürüldüğü sonucuna varılmıştır. Ayrıca kız çocuklarının ileride genelevde çalıştırılmak üzere sağ tutulduğu da düşünülmektedir (Faerman ve ark., 1998).

1.2.1.3. Popülasyon Düzeyinde Yapılan Çalışmalar

Özellikle eski çağda yaşamış bireylerin tarih öncesi nüfus hareketi ve nüfus devamlılığı ya da nüfus değişimine dair soruların cevaplanabilmesi aDNA çalışmaları ile mümkün hale gelmiştir. Eski çağda yaşamış ve modern çağda yaşayan grupların, yakından ilişkisi olamayacağı düşünülürken, modern çağda yaşayan grupların atalarına yönelik genetik belirleyicilerin benzerliğe sahip oldukları düşünülmektedir (aşırı genetik sürüklenme veya seçici kuvvetler dışında). Ayrıca moleküler çalışmalarda kullanılan genetik belirleyiciler, sınırlı dağılımlara sahiptirler ve ilişkinin göstergesi olarak kullanılabilirler. Ata-torun ilişkilerinin belirlenmesinde antik DNA bilgisi, tek taraflı nüfus devamının test hipotezleri için kullanılabilir. Örneğin; Wang ve arkadaşları (2000), Linza - Çin arkeolojik sitesinden çıkarılan eski dönemde yaşamış bir bireyin mitokondriyal dizi verilerini,

yapmış oldukları çalışmada kullanmışlardır. Araştırmacılar, Linza ufkundaki kalıntılardan elde edilen bilgileri hem Linza hem de merkez ve Doğu Asya boyunca yaşayan, 6 büyük mitokondriyal haplogrubu tanımlayan modern çağ grupları içinde karşılaştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda günümüzdeki haplogrup frekansları ile çalışılan örneklerin frekanslarının birbirinden çok farklı olmadığı sonucuna varmışlardır (Wang ve ark., 2000). Biraz daha geniş açıdan bakıldığında nüfus dağılımlarının hareketli olduğu yerleşim yerlerinin incelenmesinde de aDNA bilgisinden yararlanır. Örneğin; aDNA kullanılarak keşfedilen dilsel ve arkeolojik kanıt, bugün Amerika'daki bazı tarih öncesi nüfus hareketlerini göstermektedir (Parr et al., 1996; Kaestle and Smith, 2001; Eshleman, 2002). O'Rourke ve arkadaşları (2000a) Kuzey Amerika'dan gelen aDNA sonuçlarının, coğrafi değişikliklerin yerel Kuzey Amerikalılar arasında tespit edilenler ile benzer olduklarını belirtmesine rağmen, bazı coğrafi seviyelerdeki analizler, bu benzerliklerin kullanıldığı analizler ve yeni aDNA çalışmalarının tümünün Kuzey Amerika'nın bazı bölgelerindeki genetik yok oluş ve tarih öncesi nüfus hareketinin kanıtı olabileceğini düşündürmektedir (O'Rourke ve ark., 2000a). Antik DNA verileri aynı zamanda tüm kıtaların nüfusça yoğunlaşması gibi büyük çapta nüfus hareketleri tartışmasını da içerir. Örneğin, Kızılderililerin (Amerika'nın ilk yerlileri) yaşayan yerli Amerikalılardan morfolojik olarak farklı olduğunun gösterilmesi, Amerika'nın ilk sömürgecilerinin yaşayan yerli Amerikalıların doğrudan ataları olmamasını gösterir. Buna rağmen, eski çağda yaşamış bu bireylerden elde edilen mitokondriyal DNA'nın ön analizleri, bugüne kadar üzerinde çalışılan Kızılderililerin büyük çoğunluğunu içeren ve yaşayan yerli Amerikalılar arasında bulunan mitokondriyal haplogrupların varlığını doğrulamaktadır. Bu bilgiler, buradaki ilk yerlilerin ve

modern yerli Amerikalılar arasındaki sürekliliğin en azından belli bir derece var olduğunu göstermektedir. Birçok coğrafi bölgeden elde edilen iskelet buluntuları üzerinde morfolojik teknikler geliştirilmiştir, ancak iskelet tam olmadığı için kullanılan tekniklerin doğruluğu sınırlı olmuştur. İskelet buluntuları ile yapılacak popülasyon çalışmalarında aDNA analizleri dışında arkeolojiye (popülasyonlar arasındaki akrabalık ilişkisinin belirlenmesi) ve adli antropolojiye (İskeletten biyolojik profili belirlemek için) ihtiyaç duyulur. Popülasyon çalışmalarında, DNA analizleri bireye ait en iyi bilgiyi verir (Kaestle ve Hoursburgh, 2002).

İnsan popülasyon tarihi ve evriminde, Avrupa'da Neolitikleşme sürecinde aDNA teknikleri kullanılarak araştırmalar yapılmıştır. İnsan evrimi çalışmalarında arkaik insanlar ve onların modern insanlar ile olan ilişkini araştırmak için yapılan çalışmalar vardır. Neanderthal ve Denisova insanları bu çalışmalar içinde en önemlisidir. Landmark, Neanderthal mtDNA'sı ile birçok çalışma yapmıştır ve bugünkü atalarımıza çok az bir gen akışı olsa bile Neanderthaller'in ayrı bir popülasyon olduğu sonucuna varmıştır (Noonan ve ark., 2006). Ancak son yapılan çalışmalarda bugün ki atalarımızın Afrika popülasyonundan yaklaşık yüz bin yıl önce Afrika'dan geldiğini gösterse bile, genlerimizin az bir oranda Denisova ve Neandertallerden geldiğini gösteren çalışmalar vardır (Krause ve ark., 2010; Reich ve ark., 2010; Lalueza-Fox ve Gilbert, 2011; Lowery ve ark., 2013).

1.2.1.4. Beslenme Şeklinin Belirlenmesi

Antik DNA çalışmaları ile buğday ve mısırın tarihçesi hakkında bilgi elde edilmiş, (Brown ve Brown, 1992), parşömenin ve boyanın kaynağı belirlenmiştir (Reese ve ark., 1996). İnsan mtDNA'sının 12S ve 16S RNA'sı çoğaltıldığı gibi, hayvanlarda da kimliklendirme çalışmalarında gen bölgeleri çoğaltılmış, bitki kloroplastında bulunan *rbcL* gen bölgesi çoğaltılarak, insanların beslenme şekilleri hakkında veriler elde edilmiştir (Hardy ve ark., 1995; Poinar ve ark., 2001; Kaestle ve Horsburg, 2002; Daskalaki, 2004). Türkiye'de başta Çatalhöyük olmak üzere Anadolu'nun diğer kazılarında çıkartılan kömürleşmiş buğday tohumlarından Bilgiç ve arkadaşları (2016) tarafından DNA dizisi çıkartılarak günümüz buğday türleri ile karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar, antik buğday tohumlarının altı kromozumlu (hekzaploid) olduğu ve günümüzdeki ekmek buğdayına (*Triticum aestivum*) veya kabuksuz buğdaya (*Triticum spelta*) benzediği sonucunu elde etmişlerdir. Yapılan bu çalışma, Orta Anadolu'nun buğdayın evcilleştirilmesinde önemli bir bölge olduğunu ortaya koymuştur (Bilgiç ve ark., 2016). Beslenme şekillerinin belirlenmesinde besin maddeleri materyal olarak kullanıldığı gibi taş aletler üzerinde de bir çalışma yapılmıştır. Kimura ve arkadaşları (2001) arkeolojik taş aletleri üzerindeki biyolojik artıkların, tarih öncesi insanların besin şekillerinin belirlenmesinde potansiyel DNA kaynağı olarak kullanıldığını belirtmektedir.

Etiyopya'da imal edilen taş aletlerin etno-deneysel arkeolojik bir çalışmasını ele alan araştırmacılar imalattan iskartaya kadar çeşitli aşamalarda taş aletler toplamışlar ve bunlardan elde edilen DNA'yı başarılı bir şekilde çoğaltmışlardır. Ancak daha sonra araştırmacılar çoğalttıkları bu DNA'da taşı kullanan kişiye ait DNA'nın da bulunduğunu ve bir kontaminasyon oluştuğunu bulmuşlardır (Kimura

ve ark., 2001). Bunun dışında yeni üretilen obsidiyen bıçaklarının yıkandıktan sonra üzerindeki hücrelerin korunup korunmadığına yönelik bir deney yapılmıştır. Taş aletleri yıkandıktan sonra mikroskopik olarak incelenmiştir. Yoğun yıkamanın yüzeydeki mikro çatlaklardaki hücreleri silmediği ve taş aletlerin aDNA kaynağı olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Shanks ve ark., 2001).

1.2.1.5.Yerel Düzeyde Yapılan Çalışmalar

Geniş popülasyonlar hakkındaki sorularımızın çoğu, bu grupların akrabalık, evlilik modeli ve bunun gibi aile konusunda sıkça sorulan soruları nasıl tanımladıklarıyla ilgilenirken, bazı popülasyonların yalnızca bir ya da birkaç aileden oluşmaları açısından aile ve yerel düzey arasındaki ayrım biraz çelişkilidir. Hem soy hem de genetik ilerlemenin büyük oranda önünü açan ve küçük nüfusa sahip olmaları açısından (Cavalli – Sforza ve Bodmer, 1999) özellikle avcı / toplayıcı grubundaki arkeolojik grupların daha az çeşitliliğe sahip oldukları düşünülmesine rağmen, kısmen daha büyük popülasyonlarda yapılan çalışmalar ile desteklenen, tarih öncesi popülasyonlarda mitokondriyal DNA'nın hiperdeğişken bölgesi, modern çağa göre daha az çeşitlilik göstermediğini teyit etmektedir. Soy örneğinin direk araştırılmasıyla ya da aDNA'dan elde edilen (Usher et al., 2002) genetik kodları tanımlayabilmemiz adına son zamanlarda geliştirilen, gruplar ya da sınıflar arasında ve içindeki anne tarafından, baba tarafından ve her iki taraftan gelen genetik işaretlerde değişim düzeyleri tahminlerinin karşılaştırılmasıyla ortak genetik kalıpları ayırt etmek mümkün olmaktadır (aile içi veya aile dışından evliliklerin genel kalıpları ya da baba veya anne soyunun özel kalıplarıyla). Yapılan genetik çalışmaların, morfolojik incelemeler ile benzerlik göstermesi bu tür çalışmalar için önemlidir. Soğuk algınlığı ve yüksek ateş gibi benzer çevresel etkenlere uyum

sağlayan Amerika'daki iki farklı yerel grup ile yapılan aDNA çalışmaları, iki grup için benzer kafatası morfolojilerinin olduğunu ortaya koymuştur (Herna'ndez, 1997).

1.2.1.6. Hastalıkların Belirlenmesi

Geçmiş toplumlarda görülen hastalıklar; bulaşıcı hastalıklar ve genetik hastalıklar olarak iki kategoride incelenebilir. Kanser (papilloma virusu ve rahim kanseri) gibi ‘genetik’ olan hastalıklar ayrıca çevresel faktörlerden de etkilenmektedir. Talasemi, cücelik, Gaucher sendromu gibi genetik hastalıklar, iskeletteki değişiklikler gözlemlenerek eski popülasyonlarda görülmüştür (Ortner ve Putschar, 1981). Geçmiş toplumlarda yaşayan insanlarda bu tür hastalıklar, genetik mutasyonlar sonucu ortaya çıkmıştır. Filon ve arkadaşlarının (1995) yılında yapmış olduğu çalışmada İsrail'de 3800 yıllık bir çocuğa ait iskelet ortaya çıkarılmıştır ve 8 yaşında ölen bu çocuğun iskelet patolojisi incelendiğinde anemi bulunmuştur. Anemi, genetik ve çevresel şartlar nedeniyle oluşmaktadır ve beslenme eksikliği, orak hücreli anemi ve talasemi de bu hastalığı etkilemektedir. Hemoglobinin bileşeni olan β -globin geni, ölen bu çocukta bulunmuştur. Bu hastalık, mutasyon sonucu ortaya çıkmış olup, %2-10 oranında Doğu Akdeniz bölgesinde görülmektedir (Filon ve ark., 1995). Tüberküloz ve grip gibi hastalıklara neden olan patojenler insan popülasyonunu etkiler ve aDNA analizleriyle insan popülasyonu için doğal seleksiyonun neden önemli olduğu belirlenebilmektedir (Stoneking, 2008).

Antik DNA analizleri ile geçmişte görülen hastalıklara neden olan patojen bulunmuştur. İlk patojen DNA, yaklaşık 40 yıllık parafinli dokuda bulunmuştur

(Shibata ve ark., 1988). 1918 yılında salgın sonucunda ölüme neden olan grip virüsü bulunmuştur (Taubenberger ve ark., 1997). DNA patojenini mumyalanmış dokulardan ve antik iskeletlerden elde etmek oldukça zordur, çünkü her ne kadar enfeksiyon tüm vücutta ağır olarak yayılmış olsa da, elde edilen DNA'da ki bakteri veya virüsün toplam miktarı çok azdır. Ancak, hastalıkların evrimi ve tarihsel gelişimi hakkında merak edilen sorulara aDNA çalışmaları ile cevap bulunabilir. Örneğin tüberküloz, tarih öncesi çağlarda insanlarda görülen bir hastalıktır. Fiziksel antropologların uzun süre tartışmasına neden olan bu hastalığın Amerika'da görüldüğü düşünülüyordu ancak, yirminci yüzyılda bazı araştırmacılar, tüberkülozun Yeni Dünya'da görülmediğini, Eski Dünya'dan köken alarak tüm dünyaya yayıldığını düşünmüşlerdir. Bu fikir, insanların yerleşik hayata geçmesi, hayvanları evcilleştirmesi ve tarımın gelişmesi ile yayıldığı düşüncesine dayanmaktadır (Buikstra, 1999).

Salo ve arkadaşlarının (1994), Peru'da 1000 yıllık mumyalanmış akciğer dokusundan tüberkülozun *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.canetti*, *M.africanum* ve *M.microti* türlerini bulmasıyla, bu hastalığın Avrupa'ya gelmeden önce Yeni Dünya'da görüldüğünü ortaya koymuştur (Salo ve ark., 1994)

Tüberküloz, akciğer gibi yumuşak doku dışında Rothschild ve arkadaşları (2001) metakarpalden DNA analizi yaparak tüberküloz hastalığını bulmuştur (Rothschild ve ark., 2001).

Raoult ve arkadaşları (2000) 14. yüzyılda, Ortaçağ Kara Ölüm salgınında 17-28 milyon kişinin (bu sayı popülasyonun %30-40'ını oluşturmaktadır) ölümüne sebep olan veba hastalığı üzerine bir çalışma yapmıştır. Vebanın fare ve pirelerden

bulaşarak ölüme neden olduğu düşünülmüştür. Veba hastalığının etken bakterisi olan *Yersinia pestis*'ten başka *Bacillus anthracis* ve *Ricetsia prowazekii* patojenlerinde olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle 23 iskelete (4'ü çocuktan, 9'u kadın bireyden ve 10'u erkek bireyden) ait diş örneğinin pulpasından DNA elde edilerek *Y.pestis* ve buna alternatif olarak *B.anthraxis* ile *Ricetsia prowazekii* amplifiye edilmiştir. İskeletlerden makroskobik ve morfolojik incelemeler yapılmış olup, vebaya ait herhangi bir belirti bulunmamıştır. Veba hastalığına neden olan *Yersinia pestis* bakterisi, diş örneklerinin pulpasından elde edilerek bulunmuştur (Raoult ve ark., 2000).

1960 yılında İspanya'da oluşan patlama sonucunda birçok insan Orkney'de bulunan Norse mezarlığına gömülmüştür. *Mycobacterium laprae'nin* kemiklerden elde edilip edilemeyeceğini belirlemek amacıyla bu mezardan iki farklı bireye ait iskelet alınmıştır. Öncelikle bu iskeletler üzerinde morfolojik incelemeler yapılmış ve bunlardan biri leproza uyumlu iskelet patolojisi göstermiş, diğerinde hiçbir patolojik durum görülmemiştir. Patolojik bulgu görülen bireyden elde edilen DNA ile iskelette leproza sebep olan bakteri *Mycobacterium laprae'nin* varlığını doğrulamıştır. Patolojik bulgu olmayan iskelette ise amplikasyon oluşmamıştır (Taylor ve ark., 2000).

Barnes ve Thomas'a (2006) göre, hastalıkların kökeni hakkında bazı sorunların tartışmaya neden olduğu düşünülse de antik DNA analizleri, insan hastalıklarının geçmişi ve tarihi hakkında daha fazla bilgi sağlamaktadır (Barnes ve Thomas, 2006).

1.2.1.7.Bitki ve Hayvanlara Yönelik Çalışmalar

Bitki ve hayvanların evcilleştirilmesine yönelik yapılan aDNA çalışmalarından, Thalmann ve arkadaşlarının (2013) yaptığı bir mitokodriyal DNA çalışmasında köpeklerin Avrupa'dan köken aldığı bulunmuştur ve böylece bu çalışma ile köpeklerin Orta Doğu veya Doğu Asya'dan gelerek evcilleştiği desteklenmektedir (Thalmann ve ark., 2013). Larson ve arkadaşları (2012) yapmış olduğu çalışmada köpeklerin 15,000 yıl önce evcilleştiğini, saf Amerikan köpeklerinin ise insanlarla birlikte Geç Pleistosen döneminde Bering boğazından geçerek Eski Dünya'dan köken aldığı sonucuna varmışlardır (Larson ve ark., 2012). Anderung ve arkadaşları (2005) Iber yarımadası ve Afrika sığırları arasındaki çiftleşmenin evcilleşmeye olan etkisini araştırmışlardır (Anderung ve ark., 2005). Svensson ve arkadaşları (2007) ile Telldahl ve arkadaşları (2011) bir seri sığır örneği kullanarak yaptıkları çalışmada, evcilleşme süresince farklı cinsler ile üreme sonucunda genetik izlerin zamanla değiştiğini belirtmişlerdir (Svensson ve ark., 2007; Telldahl ve ark., 2011). Larson ve arkadaşları (2005; 2007) evcil ve yaban domuzlarına ait eski ve modern DNA örneklerini çalışmışlardır ve Avrupa'daki evcilleştirilmiş domuzların Avrasya'ya geçtiği sonucuna varmışlardır (Larson ve ark., 2005; 2007). Akış ve arkadaşları (2014) Van-Yoncatepe Kalesi'nden çıkartılmış olan 2500 yıllık keçi kemikleri üzerinde bir çalışma yapmıştır. Çalışmada 17 kemik örneği kullanılmıştır ve bunlardan 9 tanesinden başarılı bir şekilde DNA elde edilmiştir. Araştırmacılar, örneklerin bu kadar eski olması ve DNA'nın günümüze kadar korunmuş olmasını, bölgenin coğrafik konumu ve iklim etkisinin başarıyı artırdığını düşündürmektedir (Akış, 2014). Arkeozooloji alanında Dağtaş (2013) tarafından antik DNA çalışması yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada Kilis

Oylum Höyüğünden ve Niğde Tepe Çiftliğinden çıkarılan koyunlara ait mandibula ve metapodya kemiklerinde mitokondriyal DNA çalışılmıştır. Elde edilen mitokondriyal DNA'lerden haplogrupları belirlenerek koyun evcilleştirme merkezinin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde özellikle Kilis'te baskın olduğu belirlenmiş ve bu çalışma ile koyunların evrimsel tarihinin aydınlatılması açısından katkıda bulunulmuştur (Dağtaş, 2013).

1.2.2. Antik DNA Çalışmalarında Kullanılan Biyoarkeolojik Örnekler

Antik DNA, günümüzde dünya çapında kemik, diş gibi organik kalıntılardan, mumyalanmış veya korunmuş yumuşak dokudan başarılı bir şekilde elde edilmektedir. Arkeolojik ve adli çalışmalar için yapılacak olan DNA çalışmalarında kemik ve diş gibi insan iskelet buluntuları genetik materyal olarak kullanılmaktadır ve eşsiz olmaları nedeniyle değerleri giderek artmaktadır (Adler ve ark., 2011). Yumuşak dokularda ki degradasyon hem daha hızlı olduğu için, hem de yumuşak doku kemik ve diş örnekleri kadar sağlam olmadığı için aDNA çalışmalarında çok tercih edilmemektedir (Hagelberg ve Cleg, 1991; Pääbo ve ark., 2004; Rizzi ve ark., 2012). Diş minesinin sert yüzeyi genellikle iyi korunmaktadır ve degradasyona karşı DNA'yı korumasından dolayı antik DNA çalışmaları için oldukça iyi bir kaynaktır (Pfeiffer ve ark., 1999). Kemikteki DNA'nın varlığı ve lokasyon olarak çeşitlilik göstermesine rağmen femur, humerus ve alt çene gibi sert kemikler de iyi korunmaktadır. Antik DNA çalışmaları için kullanılan diğer biyoarkeolojik örnekler ise; koproilit, yumurta kabuğu, boynuz, tüy, tırnak, polen, fildişidir (Pääbo ve ark., 2004; Rizzi ve ark., 2012; Singh ve Garg, 2014). Eğer saçlar iskelette mevcut ise, saç oldukça iyi bir DNA kaynağı olarak kullanılmaktadır (Rasmussen ve ark., 2014).

Bitkilerde bulunan kloroplast, DNA içerdiğinden dolayı kloroplast DNA'sı, bitki türlerinin belirlenmesinde ve bitkilerin soy hattının çıkarılmasında kullanılmaktadır (Kaestle ve Horsburgh, 2002). Antik örneklerdeki DNA'nın kalitesi, arkeolojik kazının yapıldığı bölge şartlarına bağlı olmakla birlikte, çalışılan örneğin yaşı da DNA kalitesini kısmen etkilemektedir (Singh ve Garg, 2014).

1.2.2.1. Kemikler

Kemik doku, organik (kollajen ve proteinler) ve inorganik maddelerden (çoğunlukla kalsiyum ve diğer mineraller) oluşmaktadır. Kuru kemiğin ağırlık olarak yaklaşık %22-23'ünü (Turner-Walker, 1993), hacim olarak da %40'ını organik madde oluşturur (Nielsen-Marsh ve Hedges, 2000a). Bu bileşimin %90'ını Tip 1 kollajenin uzun fibrilleri oluşturur ve bu da kemiğe gerilme direnci ve esneklik kazandırır. Tip 1 kollajen molekülleri oldukça organize olmuş durumdadır ve bu kollajen de üç sarmal amino asit zincirinden meydana gelir. Kollajen, yüksek glisin içeriği ile karakterize edilir ki her üç amino asitten (%33), yüksek oranda proline ve hidroksiprolinden oluşur. Tip 1 kollajen, normal fiziksel ve fizyolojik durumlarda çözünmez.

Taze ve kuru kemik yaklaşık olarak %8 oranında su içerir, ancak 105°C sıcaklıkta buharlaşabilir. Kemik gibi küçük gözenekli materyallerde toplam bağlı su oranı, hem sıcaklığa hem de bulunduğu bölgenin nemine bağlı olarak değişmektedir. Kemik fizyolojik olarak aktif olan bir dokudur ve hasar oluştuğunda kendini tamir edebilme özelliğine sahiptir (Turner-Walker, 2007).

Kemik bileşiminin özelliği, (spesifik eser elementler ve kararlı isotop oranları) tarih öncesi yaşamın sağlık durumu ve beslenmesi ile ilgili bilgiler verir, bu

bilgilerde insan evrim adaptasyon sürecinin anlaşılmasında önemlidir. Ancak kemik üzerinde analizler yapılmadan önce gömü işlemi veya kazı işlemlerinde biyolojik izlerin silinmediğinden emin olunması gerekir. Geçmişte yaşamış olan insanların beslenme şekli ve toplumun sağlık durumu ile edinilecek bilgiler için kemiklerin biyolojik ve kimyasal olarak bütünlüğünün sağlanması gerekir (Schoeninger ve ark., 1989).

Kemiklerdeki DNA'nın varlığı hidroksiapatit ve kollajen tespitiyle belirlenebilir (Özcan, 2010). Hidroksiapatit, kemik ve dişin en önemli birleşenlerinden biridir. Kemik dokusu, kollajen ve inorganik mineral olarak adlandırılan hidroksiapatitten oluşmuştur. DNA, hidroksiapatit için kuvvetli bir çekime sahiptir ve DNA degradasyonu, hem kollajen kaybı hem de hidroksiapatit içerisinde bulunan kristalin kaybı ile bağlantılıdır (Hasan ve ark., 2014). DNA'ya bağlanan hidroksiapatit DNA degradasyonunu yavaşlatır. Bu yüzden antik DNA çalışmalarında kemik doku kullanılmaktadır (Tuross, 1994;Parsons ve Weedn, 1996; Höss et al., 1996; O'Rourke ve ark., 1996; Tekeli, 2010). Ancak iskeletler organik ve inorganik materyal içerdiği için kemikten yapılacak olan DNA çalışmalarında hidroksiapatitin DNA'dan uzaklaştırılması gerekir. (Götherström ve Liden, 1996). Bunun için kemik örnekleri EDTA solüsyonu ile dekalsifiye edilir ve hidroksiapatitin DNA'dan uzaklaştırılması sağlanır (Hagelberg ve ark., 1991).

Kortikal ve trabeküler kemik (ayrıca süngerimsi kemik olarak bilinir) olmak üzere makroskobik olarak iki farklı kemik türü vardır. Kortikal kemik katıdır, yoğunluk kemiğin dış kısmındadır. Femur, tibia humerus, çene ve kafatası kortikal kemikler içinde yer alır. Trabeküler, kemik kortikal kemiğe göre daha az yoğundur

ve daha gözenekli bir yapıya sahiptir. Bunlar uzun kemiklerin ucunda ve düzenli kemiklerin içi ile düz kemiklerde bulunurlar (vertebra gibi) (Daskalaki, 2004).

Kortikal kemikler, gözenekli yapıya sahip kemiklere göre daha iyi korunmaktadır. Süngerimsi kemikler de kortikal kemiklere göre daha fazla DNA eldesi sağlar, ancak kontaminasyon riskinden dolayı antik DNA çalışmalarındaki kullanımı için güvenilirliği tartışılmaktadır ve kullanımı çok uygun görülmemektedir (Parsons ve Weedn, 1996; Parr et al, 1996; O'Rourke et al., 1996). Ayrıca süngerimsi kemikler gözenekli yapıya sahip oldukları için mikrobiyal degradasyon daha fazladır ve bu durum kontaminasyona neden olmaktadır (Daskalaki, 2004).

O'Rourke ve arkadaşları (2000b) aDNA çalışmaları için küçük kaburga kemiklerinin seçilmesini önermektedir, çünkü bunlar her bir birey için birden fazladır ve paleopatolojik ve morfolojik açıdan önemlidir ve arkeolojik koleksiyonlarda müzelerde kullanılmaz. Antik DNA çalışmalarında kullanılmak üzere iskeletlerden birçok yöntemle örnek alınabilir. Küçük parçalar kullanılabilir veya uzun kemiklerin orta kısmı kullanılabilir. Seçim lezyonu olmayan kemik örnekleri seçilmelidir. Çünkü kemikler üzerinde oluşan lezyonlar kontaminasyona neden olmaktadır (O'Rourke ve ark., 2000a).

Leney (2006), 2.Dünya Savaşı, Kore Savaşı ve Vietnam Savaşında kimliği belirlenemeyen yaklaşık 2000 insana ait kemik ve dişten mitokondriyal DNA çalışması yapmıştır. Örnekler arasındaki kütle farkının değişiklik göstermesinden dolayı elde edilen DNA'nın kalitesinin değiştiğini belirtmiştir. Tibia, femur mandibula ve birinci metatarsel ve dişin bu açıdan iyi bir DNA kaynağı olduğunu

vurgularken, kafatasından oldukça az miktarda DNA elde ettiğini belirtmiştir (Leney, 2006).

Edson ve arkadaşları (2009), 1992-2009 yılları arasından seçilen 558 kafatası kemiğinden mtDNA çalışması yapmıştır. Yaptıkları çalışmada kafatasının frontal kısmından %68 oranında, occipital kısmından %65 oranında, parietal kısmından %52 oranında ve temporal kısmından da %90 oranında başarı sağlamışlardır. Araştırmacılar, temporal kemikteki bu yüksek başarı oranını, temporal kemiğin memeli canlılardaki en sert ve en yoğun kemik olması (Frisch ve ark., 1998) ve diğer kemiklere göre çevresel şartlara karşı daha iyi korunmasına bağlamaktadır (Edson ve ark., 2009).

Prinz ve arkadaşları (2007) antik DNA çalışmalarında ve adli genetik çalışmalarında, kemik yoğunluğunun DNA'nın korunması ile doğrudan bağlantılı olduğu ve vücudun ağırlığını taşıyan femur ve tibia gibi kemiklerin seçilmesinin daha uygun olduğu görüşündedir (Prinz ve ark., 2007). Antik DNA çalışmalarında kullanılan kemik örneklerinin çoğu, çok düşük miktarda (%1 veya daha az) endojen DNA içermektedir. Ancak yapılan son çalışmalarda temporal kemiğin petrous çıkıntısının iyi bir endojen DNA kaynağı olduğu vurgulanmıştır (Gamba ve ark., 2014; Pinhasi ve ark., 2015; Rasmussen ve ark., 2014; Hansen ve ark., 2017).

Pinhasi ve arkadaşlarının (2015) yapmış olduğu bir çalışmada insana ait temporal kemiğin petrous çıkıntısı kullanılmıştır ve petrous çıkıntısının, diğer kemiklere göre daha çok endojen DNA içerdiği belirtilmiştir (Pinhasi ve ark., 2015). Gamba ve arkadaşları (2014), Doğu Maceristan'daki arkeolojik bir siteden Erken Neolitik Dönem olarak tarihlendirilen 13 bireyin petrus kemiğinden, dişin dentin

tabakasından, metatarsal ve metakarpal kemiği ile kaburga kemiklerinden DNA elde etmişlerdir. Bu kemikler içinde petrus kemiğinden elde edilen DNA miktarı, diğten 4-16 kat daha fazla, diğter kemiklerden ise 183 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar, petrus çıkıntısının en yoğun kemik olduğunu ve ölüm sonrasında çevresel şartlara karşı daha dayanıklı olmasını elde edilen DNA miktarı ile göstermişlerdir (Gamba ve ark., 2014).

İklim şartları ve kazıdan çıkarılma zamanının etkisini araştırmaya yönelik yapılan bir çalışmada ‘‘fosil kemik’’ve‘‘taze kemik’’olarak adlandırılan iki ayrı grup oluşturulmuştur.‘‘Fosil kemikler’’grubu, arkeologlar tarafından kazıdan çıkarılmış, çıkarılma aşamasında eldiven kullanılmamış ve kazıdan sonra paleontolojik çalışmaları yapılmıştır. Bu kemikler, kazıdan çıkarıldıktan sonra aseptik bir şekilde muhafaza edilmiştir ve böylece çevreden, insandan, yiyeceklerden ve evcil hayvanlardan kaynaklanan kontaminasyon riski azaltılmıştır. Bu örnekler, kazıdan sonra yıkanmış, müze koleksiyonu için uzun yıllar oda sıcaklığında (0 °C-40 °C) ve %20-%40 arasında değişen nem ortamında bekletilmiştir. Bir diğter grup ise 5 kaburga kemiğinden oluşmaktadır ve ‘‘taze kemik’’olarak adlandırılmıştır. Bu kemikler kazıdan çıkarılırken eldiven kullanılmıştır ve kemiklerde yıkama işlemi yapılmamıştır. Bunlardan 3’ü 2004 yılında, diğter ikisi 1947 yılında kazıdan çıkarılmıştır. 1947 yılında kazıdan çıkarılan örnek 1955 yılına kadar nemlilik oranı %40-60 arasında değişen bir ortamda muhafaza edilmiştir. 2004 yılında çıkarılan kemik örneği -20°C derecede bekletilmiştir. Çalışmanın sonucunda fosil kemikler, taze kemikler ile karşılaştırılmıştır ve fosil kemiklerde hiçbir amplifikasyon olmaz iken, taze kemiklerde %100 oranında amplifikasyon olmuştur. (Pruvost ve ark., 2007).

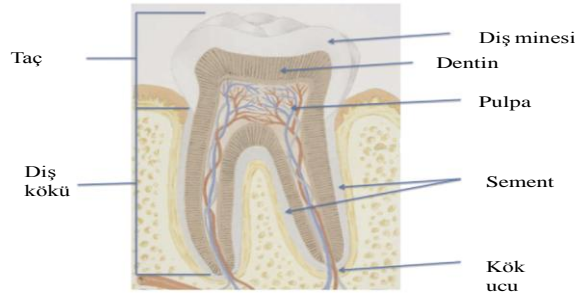
1.2.2.2. Dişler

Dişler, insan vücudunun en sert yapısıdır ve nem, yüksek ısı ve mikrobiyal olaylar gibi çevre koşullarına dayanıklı olmasından dolayı DNA analizlerinde kullanılmaktadır. DNA analizlerinde kemik yerine dişin daha çok tercih edilmesinin sebebi ise; dişleri saran, koruyan kuvvetli bir mine tabakası sayesinde kontaminasyon riskinin az olmasıdır (Daskalaki, 2004; Alakoç, 2007; İmamaoğlu ve ark., 2011; Higgins ve Austin, 2013).

Yapılacak olan aDNA çalışmalarında dişlerin seçimi ve DNA izolasyon yöntemleri DNA tiplendirme çalışmalarında önemlidir. Dişlerden pulpa çıkarılma aşamasında, daha sonradan yapılacak olan antropolojik çalışmalar düşünüldüğünde morfolojik olarak dişe zarar verilmemesi gereklidir. Bunun için DNA izolasyonu öncesinde örnek hazırlama yöntemleri kemik ve dişte farklıdır. Diş tüm halde toz haline getirilebilir, ancak tüm dişi kullanmak çok fazla mineral içereceği için bu durum, izolasyon işlemlerinde daha fazla reaktif kullanımını gerektirecektir. Diş dokuları fazlaca kalsiyum ve kollajen içerir (özellikle mine). Bunların varlığı DNA elde edilmesi ve DNA çoğaltılmasında sorun çıkartabilir. DNA bakımından zengin olan diş dokularında mineralin fazlaca bulunması düşük DNA miktarına neden olur. Dişlerde yapılan genetik analizlerin sonuçları; DNA'nın kalitesine, DNA'nın degradasyon derecesine, DNA'nın yeterli miktarda olmasına ve kullanılan izolasyon metotlarına bağlı olarak değişmektedir (Higgins ve Austin, 2013).

1.2.2.2.1. Dişin Yapısı ve DNA'nın Diş İçerisindeki Dağılımı

Anatomik olarak insan dişi iki kısma ayrılabilir; dişin taç kısmı ki bu kısım ağız içerisinde kalan kanallardır ve çenedeki kemiğin alveollerini örter. Diş kanalları olan mine, dentin, sement dişin sert tabakalarını oluştururken, pulpa yani diş özü dişin tek yumuşak tabakasıdır ve dişin taç kısmına göre daha fazla DNA içerir (Tilotta, 2010; Higgins ve Austin, 2013). (Şekil-1)



Şekil-1 Dişin yapısı (Higgins ve Austin, 2013)

1.2.2.2.1.1. Mine

Dişin mine tabakası insan vücudundaki en sert dokudur ve %96'sı (ağırlık olarak) minerallerden oluşur ve DNA içermez (Hasan ve ark., 2014). Bu doku; sıcaklık, UV, ışık, nem ve mikrop gibi çevresel şartlara karşı fiziksel bariyer oluşturarak diş hücrelerini korur. Ayrıca dişin mine yapısı kontaminatların içeri girmesine engel olduğu için, kemiklere göre dişin kontaminasyon riski daha azdır (Daskalaki, 2004). Diş minesi canlı olmasına (in vivo) rağmen geçirgenliği sınırlıdır, mineral kristaller arasındaki gözenekler son derecede küçüktür ve sudan daha geniş

moleküllerin nüfuzunu engeller. Ölüm sonrasında ve yaşam boyunca çevresel kontaminasyonların ve mikropların diş içine girmesine engel olacağı için dişin mine tabakası oldukça önemlidir (Higgins ve Austin, 2013).

1.2.2.2.1.2. Dentin ve Pulpa

Dentin ve pulpa, mine tabakası ile kaplanmış olduğu için diş sıcaklık, güneş ışığı, nem ve mikrobiyal etkenler gibi dış etkenlerden korur (Hasan ve ark., 2014). Dişteki dentin/pulpa, mine dokusunun aksine oldukça hücreli yapıdadır. Özellikle pulpa birçok hücre tipini içeren doku ile sıkıca bağlıdır. Dişteki en zengin DNA pulpada bulunmaktadır, ancak yaşa bağlı olarak veya dişlerde bulunan hastalığa göre pulpa kalitesi farklı olabilir (Pfeiffer, 1999; Higgins ve Austin, 2013; Pinhasi ve ark., 2015). Antik DNA çalışmalarında dişin kan damarları ile sinirlerinden oluşan yumuşak doku olan pulpa, genetik materyal olarak kullanılmaktadır (Alakoç, 2007; Tilotta, 2010; İmamoğlu ve ark., 2011). Dentinin %65'i hidroksiapatit organik makromoleküller (çoğunlukla kollajen) ve sudan oluşur ve dentin tabakası, genellikle herhangi bir vücut hücresi içermez ancak, mtDNA'lar odontoblastik işlem sonucunda birikir. Dentin, odontoblast (dentinin hücreli formu), fibroblast, savunma hücreleri (makrofaj ve histosit), plazma hücreleri, sinir hücreleri ve farklılaşmamış mezenşim hücrelerini içerir. (Higgins ve Austin, 2013).

1.2.2.2.1.3. Sement

Sement, diş köklerini örter ve %45-50 oranında inorganik minerallerden (hidroksiapatit), kollajen ve kollajen olmayan matriks proteinlerinden oluşur. Sement, hücreli ve hücreli olmayan sement şeklinde sınıflandırılabilir. Hücreli sement, cementoblast içerir ve DNA kaynağıdır. Hücreli sementin, fiziksel ve

kimyasal birleşimi kemik ile aynıdır, fakat yapı ve fonksiyonel olarak farklılık gösterir. Kemiğin aksine sement sürekli değişikliğe uğramaz, fakat yaşam boyunca sürekli yoğunluğunu artırır.

Sonuç olarak pulpa ve sement dişte bulunan en değerli nükleer DNA kaynağıdır. Ayrıca dentin ve pulpa mtDNA bakımından da değerlidir. Dişin mine tabakası DNA'dan yoksundur, ancak dentin ve pulpayı koruması açısından değerlidir. Bu yüzden diş örneği çalışılacağı zaman mine dokusu ile diğer diş dokuları karıştırılırsa minenin içerdiği kalsiyum ve fazla miktarda minerallerden dolayı izolasyon işlemleri sürecini ve PZR amplifikasyonunu engelleyebilir (Higgins ve Austin, 2013). Dişler morfolojik ve osteolojik araştırmalar için oldukça değerli kaynaklar olduğundan dolayı aDNA çalışmalarında dişler kullanılırken morfolojik olarak bozulmamasına dikkat edilmesi gerekir (Daskalaki, 2004).

1.2.2.2.2. Diş Çalışmalarında DNA'yı etkileyen faktörler

1.2.2.2.2.1. Diş Tipi

İnsan dişinin dört tipi vardır. Molar, premolar kaninler ve kesici dişler. Bunlar farklı formda ve büyüklüktedir, fakat histolojik yapı olarak benzerlik gösterirler. Farklı diş tipleri ile yapılan DNA çalışmaları karşılaştırıldığında en geniş pulpa hacmine sahip olan dişin en iyi DNA kaynağı olduğu görülmüştür (Leo ve ark., 2000; Rubio ve ark., 2009). Ayrıca çoklu diş kanallarında, tek diş kanalına göre daha fazla DNA ortaya çıkmaktadır ve çoklu diş kanallarındaki pulpa hacmi daha fazla olduğundan dolayı kökün yüzeysel alanı daha fazla sement sağlar. Yapılacak olan çalışmalarda dişler seçilirken en geniş pulpa hacmi ve kök yüzey alanı dikkate alınarak seçim yapılmalıdır. Bu açıdan bakıldığında en iyi aday molar dişlerdir. Molar

dişlerin olmadığı durumlarda, premolar dişler anterior dişlere göre daha fazla hücresel sement içerdiğinden dolayı tercih edilebilir (Higgins ve Austin, 2013).

1.2.2.2.2. Yaş

Yaş ilerlemesine bağlı olarak dişteki DNA'yı etkileyecek birçok değişim vardır. En belirgin negatif değişim pulpa hacminin azalmasıdır. Pulpa hacmi sadece azalmaz, ayrıca hücresel aktivitesi de azalır. Yaşlanma sürecinde dentin hacmi fazlalaşır ve devamlı olarak sertleşme oluşur. Pozitif değişim de yaşa bağlı olarak sementte fazlalaşan hücresel aktivitedir. Yaşın ilerlemesi ile oluşan bu değişim DNA'yı etkilemez, fakat ölüm sonrası DNA korunmasını etkiler. Örneğin zamanla diş minesindeki mineraller fazlalaşır, diş aşınması meydana gelir ve dentinin gözenekli yapısı tübüllerin tıkanması ile azalır. Yaşın ilerlemesi DNA'nın azalmasına neden olur. Yetişkin bir bireydeki molar dişler tercih edilirken, diş aşınması ve sement fazlalığı gibi nedenler diş seçimi yapılırken göz önünde bulundurulmalıdır. Diş hastalıkları ve diş tedavileri ve diş kaybının artmasından dolayı erişkin bireylerde diş seçimi sınırlı olabilir (Higgins ve Austin, 2013).

1.2.2.2.3. Dental Hastalıklar

Diş çürümeleri, mikrobiyal hastalıklar, diş dokusundaki kireçlenmelerin yıkımı gibi dental hastalıklar, DNA varlığını olumsuz yönde etkiler. Bunun gibi nedenler pulpanın içerisine bakterinin direk olarak girmesini kolaylaştırır ve dental tübüllerin boşalmasıyla birlikte hücre ölümü ile sonuçlanır. Dental hastalıklar sadece DNA miktarını artırmaz ayrıca kontaminasyon riskini de artırır. Bundan dolayı DNA analizleri için dişler seçilirken hastalığı olmayan ve bozulmamış dişler tercih

edilmelidir. Dişten çekilen röntgen analizleri diş seçiminde, diş kökü ve pulpa boyutunu belirlemede yardımcı olabilir (Higgins ve Austin, 2013).

1.2.2.2.4.Ölüm Sonrası Bozunma

Zamana bağlı olarak dişte DNA degradasyonu olur ve degradasyon, zaman ve çevresel faktörlerden etkilenir. Rubio ve arkadaşlarının (2013) yapmış olduğu bir çalışmada dişler, oda ısısında 1-18 ay arasında değişen periyotlarda muhafaza edilmiştir. Birinci ayda nükleer DNA kalitesinde %50 oranında bir azalma, ilerleyen periyotlarda 18 aya kadar azalmanın stabil kaldığı gözlemlenmiştir. Pulpanın çevresel şartlara karşı oldukça iyi korunmasından dolayı ölüm sonrası yapılan çalışmalarda pulpadaki çürümenin diğer yumuşak dokulara göre daha yavaş olduğu görülmüştür (Higgins ve Austin, 2013).

Caviedes-Bucheli ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmaya göre; ölümden 12 saat sonrasında pulpa hücrelerinin %50'sinin canlı hücreler olduğu belirlenmiştir. Çevresel şartlara bağlı olarak çevrenin kuru bir ortam olması, pulpanın kurumasına neden olur ve DNA'yı hidrolitik zarardan korur. Nemli bir ortam ise pulpanın tamamen yok olmasına ve çürümesine neden olur. Çürüme esnasında pulpa hücreleri hemoglobin ve serum proteinlerini yıkan sıvı üretir. Bu sıvı diş tübüllerini yıkarak pembe veya kırmızı görünümlü olarak diş renklerinin bozulmasına neden olur. (Higgins ve Austin, 2013).

Burger ve arkadaşları (1999), Tunç Çağı'na ait (M.Ö.1.yy ve M.Ö. 2.yy) 38 diş üzerinde çalışma yaparak, sıcaklığın etkisini belirlemiş ve DNA kalitesinde sıcaklığın en önemli faktör olduğunu bulmuşlardır. Sıcaklığın düşük olması ve

mikroorganizmaların ortamda bulunmaması, DNA'nın korumasını desteklemektedir. (Higgins ve Austin, 2013).

1.2.3. Antik DNA Çalışmalarında Kullanılan Biyolojik Moleküller

Antik DNA çalışmalarında nükleer DNA ve organeller kullanılır. Nükleer DNA büyük çoğunlukla her hücrenin çekirdeğinde bulunmasına rağmen, her hücre anne ve babadan gelen iki nükleer DNA'yı içerir. Mitokondri ve kloroplast organellerinde hücre başına çok az nükleer DNA bulunmasına rağmen, hücre başına binlerce mitokondriyal ve kloroplast DNA'sı bulunur. Nükleer DNA ile karşılaştırıldığında bu kadar çok sayıda kopyanın olması, DNA'nın bozulmamış bölgelerinin çoğaltılması için bir avantaj sağlar ve yapılan çoğu antik DNA çalışmalarında mitokondriyal DNA kullanılır (O'Rourke ve ark., 2000b; Eshleman, 2002; Kaestle ve Horsburgh, 2002; Krause ve ark., 2010).

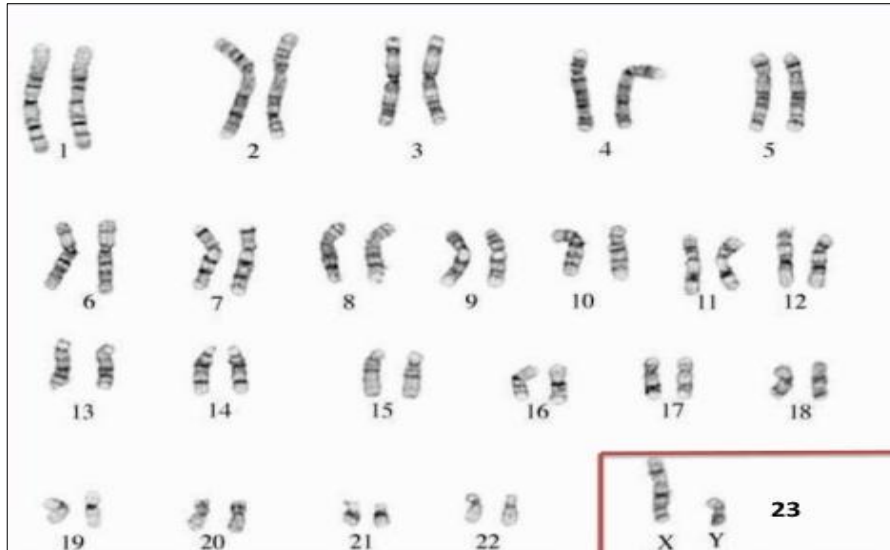
1.2.3.1. Nükleer DNA

Nükleer DNA, (Deoksiribo Nükleik Asit) bütün organizmaların genetik materyalini taşıyan ve hücre çekirdeğinde bulunan, çift sarmallı bir moleküldür. DNA, tek yumurta ikizleri haricinde her bireyde eşsiz olarak bulunur. DNA; adenin, guanin, timin ve sitozin olmak üzere dört farklı bazdan oluşur ve bu bazlar, şeker-fosfata bağlanarak bir nükleotit oluşturur. DNA molekülünde adenin her zaman timine, guanin ise sitozine bağlanır (Lindahl, 1993; Parsons ve Weedn, 1996). İnsanlarda, 22 çift otozomal kromozom ve 1 çift cinsiyet kromozomu bulunur (X ve Y kromozomu) (Şekil-2). Y kromozomu ile, popülasyon tarihimizin erkek soyu belirlenebilir. Y kromozomunda bulunan DNA, mtDNA gibi hızlı bir şekilde mutasyona uğramadığı halde, birçok polimorfizm tespit edilir. Y kromozom

dizilimi, bireylerin cinsiyetin belirlenmesinde, mtDNA gibi filogenetik çalışmalar için kullanılır ve Y kromozom haplotipleri, erkek soyundan gelen gen akışını belirlemede önemlidir (Stone, 1996).

Adli antropoloji çalışmalarında yapılan DNA analizleri, kimliklendirme çalışmalarının temelini oluşturan cinsiyet belirleme çalışmaları ve toplu mezarlardan aynı cinsiyette ve aynı yaşlarda çıkarılan bireylerin kimliklendirilmesinde nükleer DNA oldukça önemlidir (Crainic ve ark., 2002).

Kromozomlar üzerinde belirli bir genin bulunduğu konuma lokus denir, yani lokus, istenilen gen bölgesinin yerini ifade etmektedir (Fischer, 2005). Yapılacak olan çalışmanın amacına göre istenilen lokus belirlenir. İskelet kalıntılarında nükleer DNA çok zor elde edilmesine rağmen, birçok farklı lokusun incelenmesi, popülasyonlar arasındaki akrabalık ilişkisinin belirlenmesi, bireylerin cinsiyetlerinin tespit edilmesi için bir olanak sağlar.



Şekil-2 İnsanlarda bulunan 22 çift otozomal ve 1 çift cinsiyet kromozomu

(Fischer, 2005)

1.2.3.2. Mitokondriyal DNA

Memeli mitokondriyal DNA'sı, sitoplazma içine yerleşmiş, dairesel çift zincirli bir moleküle sahip olup, yaklaşık olarak 16,6 kb. uzunluktadır ve hücrenin enerji ihtiyacını sağlar. Mitokondriyal DNA, 13'ü solunumdan sorumlu proteinleri kodlayan mRNA, iki ribozomal RNAs (rRNAs) ve 22 tane transfer RNAs (tRNAs) içermektedir. MtDNA'nın 1,2 kb uzunlukta kodlanmayan ve D-loop olarak adlandırılan kontrol bölgesi vardır. Bu kontrol bölge, oldukça değişkenlik gösteren bölgeler (HVRs I,II ve III) içerir. Mitokondriyal DNA'yı diğer kromozomlardan ayıran bazı karakteristik özellikleri vardır. Her insan hücresinde nükleer genomun iki kopyası varken, mitokondriyal genomun çok fazla sayıda kopyası vardır. Her mitokondri, 10 mtDNA kadar molekül içerir ve her hücre birkaç yüz mitokondri içerir. Mitokondriyal DNA rekombinasyon olmadan, anne tarafından kalıtsal olarak çocuklara geçer (Daskalaki, 2014). Mitokondriyal DNA, hem erkekte hem de dişide bulunur, ancak gen aktarımında dişilerden bir alt soya geçer. Bunun içinde anneden gelen soy araştırmalarında önemlidir. Mitokondriyal DNA'nın mutasyon hızı nükleer DNA'ya göre daha fazladır. Hücre başına kopyalama sayısı fazla olduğu için, zamanla mitokondriyal DNA, nükleer DNA'ya göre daha fazla hayatta kalabilir. Bundan dolayı da çoğu antik DNA çalışmalarında mitokondriyal DNA kullanılmaktadır. Mitokondriyal DNA'nın bu tür özelliklerinden dolayı popülasyon genetiği analizleri için bir fırsat sağlar (Brown ve ark., 1979; Harrison, 1989; Stone, 2008; Thalmann ve ark., 2013; Shinoda ve Adachi, 2017). Mitokondriyal DNA çalışmalarıyla modern insanın Afrika'dan çıkışı, fosil kanıtları ile desteklenmiştir (Cann ve ark., 1987). Dünya çapında mtDNA varyasyonlarına yönelik son çalışmalar, insan atasının Afrika'ya 100,000-200,00 yıl önce yerleştiği görüşünü

desteklemektedir. Mitokondriyal DNA çalışmaları ayrıca, insan popülasyonundaki göç yollarının belirlenmesine katkı sağlar (Daskalaki, 2014). Bir popülasyona ait birden çok örneğin analiz edilmesinde, filogenetik ağaçlar kullanılarak yapılan analizler ile genetik çeşitlilik, popülasyonlar arasındaki farklılık ve popülasyonlar arasındaki gen akışı belirlenebilir. İnsana ait olmayan (hayvan/bitki) antik DNA çalışmaları, çoğunlukla morfolojik olarak cins veya türü belirlenemeyen örnekler ile bunların arasındaki filogenetik analizlerin yapılmasında kullanılır (Kaestle ve Horsburgh, 2002)

1.2.3.3 .STR (Short Tandem Repeat) Kısa Ardışık Tekrar Dizileri

STR, (Kısa Tekrar Dizileri) Mikrosatelit olarak da adlandırılır. DNA'da bulunan bu diziler 1-6 baz çifti uzunluğunda tekrar eden dizilerdir. Bu dizilerin amplifikasyon ürünleri 100-400 baz çifti arasında değişmektedir (Budowle ve ark., 1996). Genomlarda hem kodlanan hem de kodlanmayan gen bölgeleri vardır ve bu bölgeler kısa ardışık tekrar dizilerinden oluşur. STR'ların kullanım alanı oldukça geniş olup, bireyden bireye farklılık göstermektedir ve düşük mutasyona sahip olmasından dolayı adli bilimlerde kimlik tespitinde, babalık testlerinde, mutasyonların saptanmasında, popülasyon genetiğinde, herhangi bir hastalığa neden olan genlerin belirlenmesinde, genom haritalarının çıkarılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Bodowle ve ark., 1996; Parsons, 2007). Antik DNA çalışmalarında kullanılan kemik ve diş örnekleri yüksek sıcaklığa maruz kalır ve iyi korunamayan bu örneklerde de STR çalışmaları yapılır (Hasan ve ark., 2014). Antik örneklerden çok az miktarda DNA elde edilmektedir ve STR çalışmalarında heterozigot bir bireyde allel düşmesi çok nadir olarak görüldüğü için aDNA çalışmaları için oldukça avantajlı bir tekniktir (Prado ve ark., 1997). STR

çalışmaları, X –STR ve Y-STR olmak üzere iki kısımda incelenebilir. Y kromozomu sadece erkeklerde bulunduğu için, bu kromozomda bulunan kısa tekrar dizileri ile baba tarafından gelen erkek akrabaların Y-STR'ları aynı olur. Y-STR ile baba soyundan gelen akrabalık ilişkileri belirlenir, filogenetik ağaçlar çıkarılır ve özellikle adli bilimlerde babalık testinden yararlanır. Ayrıca baba soyundan gelen genlerde mutasyon olup olmadığı, var olan mutasyonun kaç nesilde olduğu belirlenebilir. X kromozomu anneden erkek/kız çocuğa geçtiği için X-STR çalışmaları ile büyük anne torun arasındaki akrabalık ilişkisi belirlenebilir (Ambers ve ark., 2016). Antik DNA çalışmalarında, örneklerden düşük miktarda DNA elde edildiği için amplifikasyon sırasında oluşabilecek varyasyon allel düşmesine neden olabilir. Allel düşmesi, heterozigot örneklerde hemozigot genotiplendirmesi olarak yanlış sonuç verir (Kimpton, 1994). DNA'nın kalitesi ve miktarının, allel düşmesi ile bağlantılı olduğu düşünülürse, STR tekniği ile başarılı bir şekilde genotiplendirme yapılabilmesi için en iyi kalitede DNA elde etmek aDNA çalışmaları için oldukça önemlidir (Kimptonve ark., 1994; Ivano ve ark., 1999; Ambers ve ark., 2016).

Japonya'nın güneyindeki iki farklı bölgeden (Hirohata ve Hanaura) çıkartılan iskelet kalıntıları arasındaki akrabalık bağımlı tespit etmek için STR çalışması yapılmıştır. Hirohata yaklaşık 1500 yıllık bir yerleşim yeridir ve yapılan arkeolojik kazılardan 16 oda mezarından 26 birey çıkarılmıştır. Hanaura ise yaklaşık olarak 2000 yıllık bir yerleşim yeridir ve 16 defin çıkartılmıştır. Çıkarılan bu bireyler küpler içinde bulunmuş ve aDNA analizlerinin arkeolojik verilere ışık tutacağı düşünülerek çalışılacak olan bireyler seçilmiştir. Hirohata'dan iki erkek, bir çocuk ve iki yetişkin birey aynı mezardan çıkartılmıştır. Hanaura'dan da iki birey aDNA

analizi için seçilmiştir. Bu bireylerden birinin yetişkin, diğerinin çocuk olduğu ve cinsiyetlerinin de dışı olduğu düşünülmüştür. DNA izolasyonları her birey için diş ve kemikten yapılmıştır. Yapılan STR çalışması sonucunda elde edilen alleller karşılaştırılmış ve Hanaura'daki iki bireyin anne/kız olduğu bulunmuştur. Hirohata'daki bireylerden yapılan STR çalışması ile arkeolojik veriler birlikte incelenmiş, ancak bireyler arasında akrabalık derecesi bulunamamıştır (Kurosaki ve ark., 1993).

1.2.4. Antik DNA Çalışmalarında Karşılaşılan Sorunlar

Antik DNA çalışmalarında karşılaşılan en önemli iki sorun vardır. Bunlardan birisi kontaminasyon, bir diğeri ise DNA degradasyonudur (Yang ve Watt, 2005; Akbaba, 2010; Kirsanow ve Burger, 2012; İyras ve Doğan, 2015; Shinado ve Adachi, 2017).

1.2.4.1. Kontaminasyon

Antik DNA çalışmalarında en önemli ve dikkat edilmesi gereken konu kontaminasyondur. Bütün antik DNA çalışmalarında moleküler hasar ve ekzojen kaynaklı kontaminasyondan dolayı sorun yaşanmaktadır. Arkeolojik insan kemikleri, DNA analizleri için büyük ölçüde kontaminasyon kaynağıdır. Kazı sırasında kazı ekibinden, arkeologlardan ve müze çalışanları tarafından el ile temas olması durumunda kontaminasyon riski yükselir. Çevresel şartlardan dolayı kemiklerde gözenekler ve delikler oluştuğu zaman kontaminasyon riski artar. Bundan dolayı kötü olarak korunmuş kemiklerde biyomoleküler korunma azalır ve kontaminasyon riski çoğalarak kalitesi bozulur (Kirsanow ve Burger, 2012).

Kazıyı yapan arkeologlar tarafından iskeletlerde aDNA çalışılacağı bilinmiyor olması aDNA çalışmaları için bir avantaj sağlayacaktır. Çünkü kontaminasyon riski laboratuvar aşamasında olabileceği gibi kazı alanında da oluşabilmektedir. Kontaminasyon, antik DNA çalışmalarında yanlış pozitiflik verebileceğinden dolayı oldukça endişe verici bir sorundur. Kontaminasyonu engellemenin veya azaltmanın en iyi yöntemi ise, önlemlere mümkün olduğunca erken başlamaktır. Antik DNA çalışmalarında kontaminasyon riskinin yüksek olmasından dolayı, kontaminasyon ihtimali olan kaynaklarda incelenmelidir. Örnekleri kazı alanında toplarken önlem almaya başlamak en ideal olanıdır. Bazı eski örneklerde (özellikle birkaç bin yıllık örneklerde) DNA çok az miktarda bulunduğu için örneklerin kendi içinde kontamine olma olasılığı yüksek değildir (Yang ve Watt, 2005).

1.2.4.1.1. Kontaminasyon Kaynakları

Kontaminasyon kaynağı, antik örneklerin tipine ve çalışmanın amacına göre değişmektedir. Buna göre;

1. Antik DNA çalışmalarını insan oluşturuyor ise, antropolojik incelemeler sırasında araştırmacı ve iskeletler arasında yoğun bir şekilde temas vardır. DNA'nın kontamine olması kazı çalışmalarında örnekler çıkarılırken, el ile temas sonucunda insandan geçebilir veya örnekler laboratuvara getirildikten sonra laboratuvar çalışmaları sırasında olabilir.
2. Antik DNA çalışmalarında materyal olarak hayvan veya bitki kullanılacak ise, kalıntının morfolojik olarak belirlenme aşamasında güncel türleri ile karşılaştırma yapılırken kontaminasyon olabilir.

3. Bakteri türlerinin antik DNA patojenleri için; kontaminasyon, topraktan veya çevrede bulunan yakın türlerden geçebilir (Bunun için toprak örneklerinde kontaminasyona neden olacak yakın türlerin olup olmadığını tespit etmek için toprak örnekleri toplanmalıdır) .
4. Laboratuvardaki ekipmanlar ve kimyasallar ile PZR aşamasında DNA'nın tüplerden transferi aşamasında kontaminasyon oluşabilir. Bu aşama çok tehlikeli kontaminasyon kaynağıdır, çünkü bunlar tüm örnek ile temas edebilir ve elde edilen DNA solüsyonlara bulaşabilir. Antik DNA çalışmalarındaki en büyük kontaminasyon riski PZR aşamasında amplifikasyon sırasında olmaktadır.
5. Laboratuvarda kullanılan çözeltiler, laboratuvar gözlüğü ve paketlenme, dağıtma gibi işlemlerde kullanılan tek kullanımlık gereçlerden kaynaklı kontaminasyon olabilir.
6. Dişi veya kemiği toz haline getirme aşamasına kadar kapalı ve kontamine olmayan örneklerin yüzeyi, gömü çevresindeki kontaminasyondan korunmuş olsa bile çevresel kontaminasyona maruz kalmış olabilir.
7. Bütün kontaminasyon kaynaklarına karşı kontrol mümkün olsa bile, toprakta bulunan mikroorganizmalar, kazı alanı çevresinde bulunan hayvan atıkları gibi çevreden gelebilecek çok fazla kontaminasyon kaynağı vardır (Kemp ve Smith, 2005; Yang ve Watt, 2005).

1.2.4.1.2. Ekzojen DNA ile Kontaminasyon

Moleküler hasar ve kontaminasyon, yapılacak olan birçok moleküler biyolojik tekniklere engel olarak, hatalı sonuçları ortaya çıkarır. Adli çalışmalarda, kemik ve diş örnekleri öncelikli olarak DNA çalışmaları için tercih edilir, fakat

özellikle kemiğin gözenekli yapısı ekzojen DNA'nın (ter, deri parçacıkları, solunan hücre) içeriye girmesine neden olur. Ayrıca toprakta bulunan ve kemiklerde gelişmiş olan mikroorganizmalar ile kazıyı yapan ekibin DNA'sı çalışılacak olan örneği kontamine edebilir. Ekzojen DNA tarafından oluşan kontaminasyon aDNA çalışmalarını oldukça sınırlamaktadır. İnsan DNA'sı, ekzojen DNA'dan çok az da olsa kontamine olmuş ise, oluşan bu kontaminasyon laboratuvarında kullanılacak olan çözeltilere de geçebilir. Oluşan bu kontaminasyon, DNA izolasyonu ve PZR aşamalarında yanlış çoğalmalar sonucunda yanlış pozitifliğe neden olacaktır. Bu gibi problemler için çalışma sırasında dikkatli olmak gerekir. Kazıdan çıkarılan birçok antik örneğin DNA'sında birden fazla bireye ait DNA bulunabilir ve bu sorun antik DNA'nın doğruluğunu şüpheye düşürür. Ayrıca Antik DNA türleri, birçok PZR inhibitörü içerir ki bu da DNA analizlerinde amplifikasyon ve purifikasyonda sorun oluşturur (Singh ve Garg, 2014).

1.2.4.1.3. Kazı Öncesi Kontaminasyon Kontrolleri

Kazılardan çıkarılan arkeolojik kalıntılar antik DNA çalışmalarına önemli bir hazine sunar. Bunlardan bazıları antik DNA analizleri yapılmadan önce arkeolojik ve antropolojik olarak yoğun bir şekilde çalışılmış olabilir. Çalışılmış olan bu örneklerin antik DNA'yı kontamine etme olasılığı yüksektir. Kazının yapıldığı zaman sürecinden örneklerin laboratuvara getirilmesine kadar ki aşamada birçok kişinin el temasından dolayı kontaminasyon olasılığı oldukça yüksektir ve bunun kimden geçtiğini belirlemek çok zordur. Laboratuvardaki personel tarafından gerekli önlemler alınacaktır, ancak antik DNA çalışılmasının yapılacağını arkeolog ve antropologların da bilmesi, olası kontaminasyon riskini azaltmaya yardımcı olacaktır (Yang ve Watt, 2005; Bollongino, 2008). Antik DNA çalışmalarında en çok

kullanılan doku, kemik ve diş örnekleridir. Bu örnekler de el ile tutulduğunda ve yıkama yapıldığında kontaminasyona çok açık olacağı için kazı alanında çalışan arkeologların yapılacak olan DNA analizleri için kazı esnası boyunca önlem almaları gerekir. Bunun için kazı alanında çalışan arkeologlar, örnekleri topraktan çıkarırken mutlaka eldiven ve maske kullanmalıdır (Daskalaki, 2004). Kazı sahasında çalışan arkeologların ve laboratuvarında çalışanların, laboratuvar çalışmaları öncesinde yapacakları kontaminasyon önlemleri çalışmanın genel kontaminasyon başarısında çok önemlidir. Antik kalıntıların toprak altından çıkartılması sırasında kontaminasyon önlemleri alınmalıdır. Kazı sırasında alınacak önlemler de laboratuvar sırasında uygulanacak önlemler kadar sıkı olmalıdır, ancak kazı alanının koşulları alınacak olan kontaminasyon önlemlerini engelleyebilir. Kontaminasyonu en aza indirmek için kazı sırası boyunca ve örneklerin muhafaza edilmesi süresince izlenmesi ve uygulanması gereken genel kurallar vardır. Bunlar:

1. Örneklerin alınması kazının yapıldığı alanda gerçekleşmelidir. Kazı alanından çıkarılan örneklerde DNA analizi yapılacak ise, toplama işlemi titiz bir şekilde yapılmalıdır. Bunun için tek kullanımlık eldivenler, temiz kâğıt poşetler, alimünyum folyo, maske, saç bonesi, yapışkanlı plastik poşetler ve dişçi aletleri ve mala temiz olmalıdır. Tek kullanımlık olmayan araçlar için %10'luk ticari çamaşır suyu kullanılmalıdır (Richards ve ark., 1995). Her bir örnek ayrı kilitli poşetlere konulmalıdır ve her örnek için ayrı eldiven kullanılmalıdır (Burger ve ark., 1999; Bollongino, 2008).
2. Kemik dokunun içine giren kontaminantların uzaklaştırılması zor olduğundan dolayı, antik DNA çalışmaları için kullanılacak örnekler kazı alanında temizlenmemelidir. (Yang ve Watt, 2005). Eğer ki DNA analizlerinden önce

osteometrik ölçümler yapılması gerekiyor ise sadece fırça ile temizleme yapılmalıdır (Bollongino, 2008).

3. Antik DNA çalışılacak olan örnekler, kazı sonrasında su altında yıkanmamalıdır, çünkü su, kemik dokusuna hidrolitik zarar verebileceği gibi DNA'nın bozunmasına da neden olacaktır (Daskalaki, 2004; Yang ve Watt, 2005; Bollongino, 2008). Özellikle sıcak iklimlerde birçok kemik diyagenz sırası boyunca yoğunluklarını ve sıkı yapısını kaybetmektedir. Yıkama işlemi de daha fazla degradasyonu artırmaktadır. Özellikle süngerimsi kemiklerde gözenekli yapı suyun tamamını içine nüfuz eder ve bu da kontaminasyona neden olur.
4. Eğer mümkün ise bir örnek için kullanılan eldiven ve araç gereçler diğer örneğe geçildiğinde değiştirilmelidir. Çalışılacak her bir örnek tamamen kuru olduğunda ayrı plastik kutulara koyulmalıdır (Yang ve Watt, 2005).
5. Özellikle antik DNA çalışmalarının materyalini insan iskeletleri oluşturuyor ise bu durumda insanlardan kaynaklı kontaminasyonların ayırt edilemesi zor olmaktadır. Bundan dolayı kontaminasyon riskini önlemek için kazıyı yapanların mutlaka eldiven ve maske takması gereklidir. Ayrıca önlük veya saç bonesi kullanılması daha idealdir (Bollongino, 2008).
6. Genetik analizler için her bir örnek için iki ayrı örnek çalışılmalıdır. Örneğin bir iskelete ait diş ve uzun kemikler çalışılmalıdır ve bunun için aDNA çalışması yapılacak örneklerden diş ve kemik ayrı ayrı alınarak paketlenmelidir (Bollongino, 2008).
7. Kazı alanından çıkarılan örneklerin laboratuvara taşınma sırasında kuru ve serin yerde muhafaza edilmesi gerekir. Antik DNA çalışmaları insandan

yapılacak ise, kazıyı yapanların ve araştırmacıların sa telinin ve yanak içinden bir srntnn alınarak laboratuvara getirilmesi gerekir (Yang ve Watt, 2005).

Bollongino ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan bir çalışmada tarih öncesi döneme ait sığır kemiklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır ve yapılan çalışmada kontaminasyon oluşmuştur. Keçi ile koyun kazı alanında gözlendiğinden dolayı, hayvan dışkısı veya hayvan kılı yüksek kontaminasyon kaynağı olarak düşünülmüştür. Bundan dolayı kazı alanından çıkarılan kemikler evcil hayvanlardan uzak tutulmalıdır.

1.2.4.2. Antik DNA Degrasyonu

Antik DNA çalışmalarını kontaminasyondan sonra sınırlandıran bir diğer faktör, DNA'nın degrade olmasıdır. Degrasyon, eski örneklerde bulunan DNA moleküllerinin çoğunu yıkabilir (Yang ve Watt, 2005). Yaşayan organizmalarda DNA molekülünde görülen üç farklı değradasyon vardır. Bunlar; hidroliz, oksidatif hasar ve metilasyondur. Su, kemiğin içinde bulunan kalsiyum ve fosfat minerallerini yok ederek, mikroorganizmaların gelişmesine yol açar ve hidrolitik ve oksitadif DNA hasarına neden olur. Hidroliz olayında moleküllerin (adenin ve guanin) su ilavesi ile bir kimyasal bağ parçalanır. Hidroliz, pH ve sıcaklığa bağlı olarak değişir. DNA değradasyonu, ölümden sonra 3-56 saat arasında en yoğun şekilde gerçekleşir ve DNA tamir mekanizması durur. Canlı hücrelerde DNA tamir mekanizması ve enzimatik onarım sayesinde DNA molekülünün bütünlüğü stabil kalır, fakat kemik ve diş gibi arkeolojik örneklerde, fosil kalıntılarında, dokular canlı olmadığı için tamir mekanizması yoktur. Organizmanın ölümünden sonra onarım

mekanizmaları yavaşlamaya başlar. Ölüm sonrası doku içerisindeki DNA, nükleazlar tarafından parçalanmaya başlar, hücre içerisinde bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalar tarafından bozunmaya başlar. Bunun gibi birçok faktör DNA'nın hızlı bir şekilde parçalanmasına neden olmaktadır (Singh ve Garg, 2014). Isının yükselmesi, mikroorganizmaların çoğalmasını ve kimyasal ayrışmayı artırır. Oksidasyon boyunca DNA'da oluşan hasar, oksijene maruz kalan bakteriler tarafından üretilen enzimler ile tamir edebilir (Lindahl, 1993). DNA'nın hidrolitik ve oksidatif hasar gibi kimyasal reaksiyonlara uzun süre maruz kalması, DNA'nın daha hızlı parçalara ayrılmasına neden olur ve DNA'nın çoğalmasına da engel olarak antik örneklerden DNA elde etmeyi zorlaştırır. Oluşan bu hasar, ayrıca yanlış amplifikasyona neden olacağı için elde edilen sonuçların doğruluğunu da etkilemektedir (Daskalaki, 2014). Kimyasal hasarlardan sonra insan iskeletlerinde kalan DNA, türlerin kronolojik yaşına bağlı değildir, fakat bulunduğu coğrafik bölgedeki ısı, sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Özellikle sıcak iklim bölgelerinde materyallerin korunması daha zor olduğu için sıcaklık önemli bir faktördür (Parsons ve Weeden, 1996; Chilvers ve ark., 2008).

Ölüm sonrasındaki süreçte antropologlar ayrışma aşamalarını gözlemler, entomologlar çalışmaları için böcek toplar ve botanikçiler, olay yerindeki bitkilerin yaşamını inceler (Parsons ve Weeden, 1996). Ölüm sonrası süreç, detaylı bir şekilde laboratuvar ortamında incelenecek ise, çürümüş dokular, kemik ve vücuttaki diğer organik materyaller için özel metotlar geliştirmek gerekir. Burada önemli olan ölüm sonrası degradasyonun derecesini belirlemektir. Eğer degradasyon belirli bir derecede olmuş ise bu aşamada laboratuvarında belirli metotlar kullanılarak tespit edilebilir. Bunun sonucunda elde edilen bilgi, kimin kaç gün veya kaç ay içinde

öldüğü sorusuna cevap verebilir (Anderson, 2005). Ölümden sonra DNA stabilitesi vücuttaki organlarda farklılık gösterir. Bär ve arkadaşlarına göre (1988) üç haftadan sonra en iyi stabilite beyin korteksinde, lenf nodüllerinde ve psoas kasında oluşur. Mikrosatellitler kullanılarak, (DNA içinde 10-60 baz çiftlik tekrar eden bir dizi) kötü DNA'nın degrade olmadan önce dalakta ve böbrekte beş gün muhafaza edildiği bulunmuştur (Bär ve ark., 1988).

Perry ve arkadaşları (1988), ölüm sonrası süreçte meydana gelen degradasyonu belirlemek için insan kaburga kemikleri ile çalışmışlardır. Kaburga kemikleri laboratuvarında oda ısısında düşük ve yüksek nemli bir ortam ayarlanarak birkaç hafta muhafaza edilmiştir ve sonrasında bu kemiklerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Southern Blot ve elektroforez işlemlerinden sonra otoradyogram kullanılarak DNA kantitasyonu belirlenmiştir. Araştırmacılar farklı bireyler arasındaki varyasyonun, nem gibi doğal faktör sonucu oluşan varyasyondan daha az olduğunu belirtmişlerdir (Perry ve ark., 1988).

1.2.4.2.1.Amino Asit Rasemizasyonu

Amino asitler, yaşayan bütün organizmalarda proteinlerin kimyasal bağlanmasını bloke eder. Her tür amino asit D ve L formu olmak üzere iki formdan oluşur. Bütün amino asitler L formu içerir, fakat zamanla kademeli olarak D formuna dönüşür, bu işlem rasemizasyon olarak adlandırılır. L formundan D formuna D/L=1 oluncaya kadar devam eder ve bu süreç önemli bir şekilde diyajenizeden etkilenir. Amino asit rasemizasyonunun iki ayrı kullanım amacı vardır.

Birincisi, dişin aspartik asit D/L oranı, ölüm yaşını gösterir. Ancak yaklaşık 15 yaşında bu tahmin hatalı bir şekilde yapılabilir ve D/L formunun oranı diyajenizden etkilendiği için kullanılan metotlar sadece modern kaynaklar için uygulanır. Bu sınırlamalardan dolayı ölüm yaşının tahmini için amino asit rasemizasyonunun kullanımı çok az olmaktadır (Tuross, 1994).

İkincisi, Poinar ve arkadaşları (1996) tarafından, iskeletlerdeki aspartik asit rasemizasyonunun derecesinin, DNA'nın korunması ile paralellik gösterdiği ileri sürölmüştür. Rasemizasyon derecesinin belirli bir oranda olması, DNA'nın çoğalmasına engel olmaktadır (Poinar ve ark., 1996). Rasemizasyonun çevresel faktörlere karşı hassasiyet göstermesi, DNA'nın bozunmasını hızlandırır. Antik DNA çalışmalarında amino asit rasemizasyonunun asıl kullanım amacı, DNA'nın elde edinebilirliğini değerlendirmek ve elde edilen DNA'yı doğrulamaktır (Green ve ark., 2010).

1.2.4.3. Çevresel faktörlerin DNA'nın Korunmasına Olan Etkisi

1.2.4.3.1. DNA Taponomisi

İskelet buluntularında yaklaşık 100,000 yıldan daha fazla zaman sürecinde DNA bulunmaz (Adler ve ark., 2011). Bu zaman diliminde çevresel faktörlerin DNA'nın korunmasını nasıl etkilediği tam olarak anlaşılmamıştır. Örneğin bazı iskelet örneklerinden DNA elde edilebilirken, diğer örneklerin yaşı ve toprak altında kalma süresi aynı olmasına rağmen DNA elde edilememektedir. Ölme nedeni, gömölme tipi ve diyajenize, bazı durumlarda DNA'nın korunmasını etkilemektedir. DNA'nın korunmasında zaman sürecinden çok, çevresel faktörler etkili olmaktadır. (Parsons ve Weedn, 1997; Caviedes-Bucheli, 2006). Ilık iklim şartlarına kıyasla,

soğuk ve serin iklim şartlarında DNA'nın daha iyi korunduğuna dair yapılan çalışmalar vardır (Poinar ve ark., 1996). Gilbert ve arkadaşları (2003) yapmış oldukları çalışmada kemiklerin mikroskop incelemesi ile DNA'nın korunup korunmadığının anlaşılmasının çok zor olduğunu belirtirken, Collins ve arkadaşları (2002), kemiklerin makroskopik incelemeleri ile moleküler korunması arasındaki bağlantının tartışılır olduğunu belirtmiştir (Gilbert ve ark., 2003; Collins ve ark., 2002).

1.2.4.3.2. Humik asit, Fulvik asit ve Nem

Humik ve fulvik asit PZR'ı inhibe ettiği için DNA amplifikasyonunun başarı oranını düşmektedir. Humik asidin olması nemliliğe neden olduğu için örneklerde çok yoğun miktarda humik asidin bulunması amplifikasyonun başarısını etkilemektedir. Nemin olması ayrıca dişlerin içine organik madde girmesine neden olmaktadır (Burger ve ark., 1999; Akış, 2014). Hidrolitik zarar total DNA'nın kaybına yol açmaz ancak, DNA yapısındaki modifikasyonları indükler ve bu durumda sonuçlarda tutarsızlık gösterir.

1.2.4.3.3. Mikroorganizmaların Varlığı

Mikroorganizmaların varlığı fosilleşme sürecini etkiler. Kuşların pisliği yüksek konsantrasyonda üre içermektedir ve üre de DNA'ya zarar verir. Kuşların dışkısından geçen kontaminasyon yüksek mikrobiyal istilaya neden olur (Burger ve ark., 1999).

1.2.4.3.4. Örneklerin Muhafaza Edilmesi

Antik DNA çalışmalarında kullanılacak örneklerin toplanması ve laboratuvar ortamına getirilinceye kadar muhafaza edilmesi önemlidir. Kazı işlemleri hızlı bir şekilde yapılmalıdır, kemikler güneş ışığına maruz kalmamalıdır. Kazı sonrasında degradasyon riskini azaltmak için örneklerin serin, kuru ve karanlık ortamda saklanması gerekir (Burger ve ark., 1999; Bollongino, 2008). Kazıdan çıkarılan kemikler kuru ise, oda ısısında saklanabilir ancak, uzun süreli çalışmalar için dondurucuda saklamak ideal olanıdır (Daskalaki, 2004). Ancak dondurucuda saklanmasını daha az tercih eden araştırmacılar da vardır, çünkü buzlanmanın olması DNA'nın zarar görmesine neden olmaktadır (Pruvost ve ark., 2007). Örneklerin oda ısısında muhafaza edilmesi, çoğalabilen DNA'nın miktarını etkilemez fakat hedeflenen DNA kalitesini etkiler. Örneklerin dondurucu dışında uzun süre depolanması DNA'nın kalitesini ve miktarını azaltmaktadır (Burger ve ark., 1999; Daskalaki, 2004). Nötral ve hafif alkalik ortamlar dokuyu ve DNA'yı korumaktadır. Dişlerin mine ve dentin tabakasında ve kemiklerde bulunan hidroksiapatit, asidik çözücülerde çözüldüğü için kemik apatitine zarar verir. Nötral ve hafif alkalik ortamlar dokuyu ve DNA'yı korumaktadır (Burger, 1999). Kemik yapısında bulunan hidroksiapatitin korunması açısından da en uygun toprak pH değeri 7,8'dir (Akış, 2014).

1.2.4.3.5. Sıcaklık

DNA'nın korunmasındaki en önemli faktörlerden birisi sıcaklıktır (Daskalaki, 2004). Burger ve arkadaşlarının (1999) yapmış olduğu araştırmada üç ülkeden farklı iklim koşullarında muhafaza edilmiş 38 örnek üzerinde aDNA

çalışması yapılmıştır ve çevresel faktörlerin etkisi tablo-2’de belirtilmiştir. Örneklerin bir kısmı Almanya Lichtenstein’de bir mağaradan (8°C), bir kısmı Birleşik Arap Emirlikleri Shimal şehrinde bulunan bir mezardan (27°C), diğer kısmı da Nepal’de bulunan bir mezardan (12°C) alınarak çalışılmıştır. Buna göre, 8°C sıcaklık DNA’nın korunması için oldukça iyi bir koşul olup, bu örnekler % 61-90 başarılı PZR amplifikasyonu göstermiştir. Sıcaklığın yüksek olmasının DNA kaybına neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca mağaraların sıcaklığının daha düşük olması ve yıl boyunca sabit sıcaklıkta olmasından dolayı, DNA’nın iyi korunduğu gözlemlenmiştir (Burger ve ark., 1999). Bollongino ve arkadaşlarının (2008) Afrika, Yakın Doğu ve Kuzey Afrika’dan elde ettikleri 291 kemikten aDNA karşılaştırılması yapılmış ve sıcaklığın fazla olduğu güney bölgelerde DNA’nın daha az korunduğu, kuzey bölgelerde ise sıcaklık daha düşük olduğundan dolayı daha başarılı DNA elde edildiği belirtilmiştir (Bollongino ve ark., 2008). Sıcaklığın düşük olması birçok kimyasal reaksiyonu yavaşlatarak, mikroorganizmaların çoğalmasını azaltır. Bundan dolayı DNA’nın korunması ve başarılı bir PZR amplifikasyonu için DNA çalışılacak örneklerin kazı alanından çıkarıldıktan sonra serin, kuru ve asidik olmayan bir ortamda muhafaza edilmesi gerekir (Tuross, 1994; Hedges, 1995; Nielsen-Marsch ve Hedges, 2000; Daskalaki, 2004; Bollongino ve ark., 2008). Mağara sıcaklıklarının düşük olması ve mağaraların kalkerli bir yapıya sahip olması, aDNA çalışmalarında önemli bir faktördür (Bollongino ve ark., 2008). İklim şartlarının ve örneklerin muhafaza edilme sıcaklıklarının aDNA çalışmalarına çok az bir etkisi olduğunu belirten Leney (2006), tropikal ve ılıman iklim özelliklerine sahip bölgelere ait kemik örneklerinden aDNA çalışması yapmıştır. Tropikal bölgedeki örneklerden %66,9 ılıman bölgedeki örneklerden ise %75,9 oranında

başarılı bir sonuç elde etmiştir ve sıcaklığın aDNA çalışmalarında önemli bir faktör olduğunu ancak, DNA'nın korunmasında tek önemli faktör olarak düşünülmemesini belirtmiştir (Leney, 2006).

Tablo-2 DNA'nın korunmasında etkili olan çevresel faktörler (Burger ve ark., 1999)

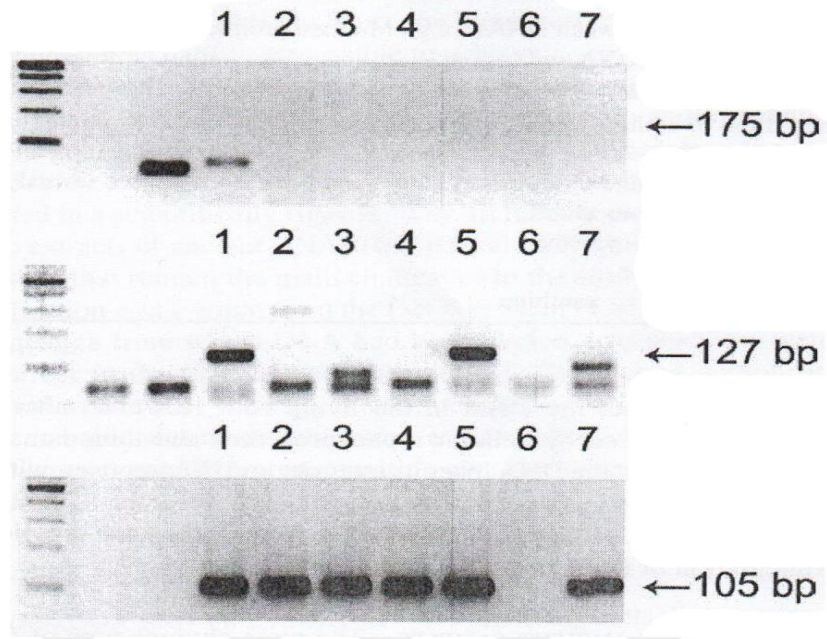
Mikroorganizmaların Varlığı	Mikroorganizmalar ve onların metabolitleri DNA'yı tamamen yıkabilir.
UV 'nin olmaması	Ultraviyole, dokunun sadece dış yüzeyine etki eder. Sert dokular ile çalışma yapılırken çoğunlukla örneklerin dış yüzeyi uzaklaştırıldıktan sonra UV de bekletilmesi gerekir.
Kuruluk ve nem	Kuru bir ortam, hidrolitik ve oksidatif hasara neden olur.
Ölümden sonra hızlı defin	Gaz oluşumu ve yumuşak dokunun yapısının bozulması mikroorganizmaların çoğalmasını hızlandırır.
Sert ve Kuru dokular	Sert ve kuru dokular fiziksel ve kimyasal reaksiyonu engeller. Kemikler ve dişler organik kalıntıları kimyasal reaksiyonlara ve mikroorganizmalara karşı korur.
Düşük Sıcaklık	Düşük sıcaklık birçok kimyasal reaksiyonu yavaşlatır ve mikroorganizmaların çoğalmasını azaltır.
Nötr veya hafif alkali pH değeri	Azalan çevresel pH ile sadece DNA'nın kendisi değil, ayrıca diş ve kemikte yok edilir. Nötral ve hafif alkalın ortamlar dokuyu ve DNA 'yı korur.
Düşük Sıcaklıkta Muhafaza Etme	Kazıdan çıkarılan kemiklerin DNA kalitesinin sağlanabilmesi için düşük sıcaklıkta saklanması gerekir.

1.2.5 Antik DNA Çalışmalarında Özgünlük Kriterleri

Antik DNA çalışmalarında karşılaşılan sorunlardan dolayı yanlış sonuçlar elde edilebilir. Bunun için aDNA çalışmalarında bazı önlemlerin alınması ve çalışma sırasında uygulanması gereken kriterler vardır. Pääbo ve arkadaşlarının (1989) yayınlamış olduğu çalışma tablo-3'te verilmiştir.

Tablo-3 Antik DNA için özgünlük kriterleri (Pääbo ve ark., 1989)

1	Amplifikasyon ürünlerinin klonlanması ve birden fazla klonun sekanslanması	Bu işlem, kontaminasyon ve DNA hasarı nedeniyle oluşan amplifikasyon ürünlerinin heterojenliğini kontrol eder.
2	Ekstraksiyon kontrolleri ve PZR kontrolleri	Yapılan her bir izolasyon işleminde en az bir tane negatif izolasyon kontrolü bulunmalıdır. Aynı şekilde PZR işlemleri için de birden fazla negatif kontrol bulunmalıdır (Şekil-3). Kullanılacak olan bu negatif kontrollerin birisi DNA ekstraksiyonu aşamasında yapılan negatif kontrol, diğeri de PZR aşamasında hazırlanan kontrol olmalıdır.
3	Aynı veya farklı DNA izolasyonlarından amplifikasyonların tekrar edilmesi	Amplifikasyonların tekrar edilmesinin iki amacı vardır. Bunlardan birincisi çok az görülebilecek kontaminantları tespit etmek için, bir diğeri de DNA bölgelerinin yanlış kodlanmasını denetlemektir. DNA'nın yanlış kodlanmasından dolayı asıl istenen gen bölgesine ait moleküllerin sayısı oldukça düşük olmaktadır. Bundan dolayı da amplifikasyon sonucunda istenilen başarıya ulaşılması zor olmaktadır.
5	Korunan makromoleküllerin biyokimyasal analizleri	Örnekler biyokimyasal olarak zayıf korunmuş ise, bu örneklerin DNA içerme olasılığı çok düşüktür. Örneklerin biyokimyasal olarak iyi korunması, antik DNA dizilimlerinin doğru olduğunu destekleyebilir.
6	Nükleer DNA haricinde mtDNA'nın varlığı	Nükleer DNA'nın farklı bölgelerini çoğaltmak için tercihen kullanılacak farklı primerler mevcuttur. Bundan dolayı bu aşamada dikkat edilmelidir, çünkü farklı amplifikasyon ürünlerinde mtDNA ile örtüşebilen nükleer eklemeler olabilir. Özellikle popülasyon çeşitliliği amacıyla yapılan çalışmalarda dikkat edilmesi gerekir.
7	İkinci bir laboratuvarın olması	Laboratuvar ortamındaki kimyasallardan veya el ile temas sonucu oluşabilecek kontaminasyonu denetlemek için ikinci bir laboratuvarın olması fayda sağlayacaktır. Ancak bu yapılan her çalışma için garanti vermemektedir, fakat bu önlem yeni veya umulmadık sonuçları elde etmeyi önleyebilir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, örnekler laboratuvara gelmeden önce yüzeydeki kontaminantlardan uzaklaştırılma işlemleri kesinlikle ikinci bir laboratuvarında yapılmalıdır.
8	Amplifikasyon verimi ve amplifikasyon sonucu oluşan ürünün uzunluğu arasında ters bir korelasyon olmalıdır.	Antik DNA parçalanmış olduğu için, amplifikasyon verimliliği, ürünün uzunluğu ile doğru orantılı olmayacaktır.



Şekil-3 Çoğu antik buluntulara ait DNA örneklerinde sadece kısa gen bölgeleri çoğalabilir. 1-7 arasındaki bantlar, Geç Pleistosen dönemindeki mağara ayılarına ait mtDNA amplifikasyonlarının elektroforez görüntüleri. PZR aşamasında iki tane kontrol (K1,K2) kullanılmıştır.6 örnek 105 bç. uzunluğunda, 2 örnek 127 bç. uzunlukta amplifiye olmuş ve 175 bç. de ise hiçbir örnek amplifiye olmamıştır (Pääbo ve ark., 2004).

1.2.6. Antik DNA Analizlerinde Uygulanan Yöntemler

Tarihteki ilk antik DNA çalışması, Higuchi ve arkadaşları (1984) tarafından quagga'nın (soyu tükenmiş olan zebra) DNA'sı başarılı bir şekilde çoğaltılarak DNA dizini elde edilmiştir (Higuchi ve ark., 1984). Bu tarihten sonra moleküler biyolojide kullanılan tekniklerinde gelişmesi, aDNA çalışmalarına büyük avantaj sağlamıştır.

Literatürdeki çoğu DNA izolasyon yöntemi, aktif hücreleri içeren taze dokular kullanılarak yapılmıştır. Ancak antik örneklerden DNA izolasyon çalışmalarında karşılaşılan bazı zorluklar vardır. Bunlardan birincisi antik DNA çalışmalarının başladığı tarihten itibaren, hemen hemen çoğu antik örnekte DNA'nın çok az korunmuş olması ve DNA'nın degradasyona uğramasıdır. Ancak, aDNA

çalışmalarında genellikle hücreler iyi korunamadığı için DNA'ya ulaşmak ve DNA elde etmek zordur. İkincisi ise, aDNA, oksidatif ve hidrolitik hasara uğradığı için, izolasyon aşamasında yüksek sıcaklık kadar, hücre zarını parçalamak için kullanılan güçlü deterjanlarda zarar vermektedir. Bir diğer sorun ise antik kemik ve diş örneklerinin çok fazla miktarda PZR inhibitörü içermesidir (Höss ve Pääbo, 1993; Hänni ve ark., 1995; Kalmar ve ark., 2000). Bu durumda DNA izolasyonuna engel olup, saf DNA elde etmeyi güçleştirir.

Arkeolojik veya adli iskelet kalıntılarında DNA izolasyonu, yapılacak analizler için oldukça güçlü veri sağlar, fakat birçok metodolojik problemi de ortaya çıkarır. Bu problemlerden biri şüphesiz ki diş ve kemik yüzeylerinde bulunan modern kontaminasyonun varlığıdır ki bu da yanlış pozitifliğe yol açar bu yüzden DNA izolasyon aşamasına geçilmeden önce kontaminantlar uzaklaştırılmaz ise hatalı sonuçlar elde edilir (Kemp ve Smith, 2005).

1.2.6.1. Dekontaminasyon Yöntemleri

Antik örneklerden DNA izolasyonu yapılırken uygulanan hiçbir yöntemde sadece endojen DNA elde edilmemektedir, çalışılacak örneğin üzerinde veya çevresinde bulunan bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaların üremesi sonucunda oluşan ekzojen DNA da elde edilmektedir. Ekzojen DNA miktarının, endojen DNA miktarından daha çok olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Höss ve ark., 1996; Noonan ve ark., 2005; Poinar ve ark., 2006). Bu yüzden DNA izolasyon yöntemleri öncesinde yapılacak olan dekontaminasyon çalışması önemlidir (Rohland ve Hofreiter, 2007). DNA izolasyonuna başlamadan önce örneklerin yüzeyinde bulunan ekzojen DNA'nın uzaklaştırılması için uygulanan dekontaminasyon işlemi fiziksel

(çalışılacak örneğin yüzeyinde bulunan partiküllerin uzaklaştırılması), kimyasal olarak (kimyasal maddeler ile silerek veya ıslatarak) veya örnek yüzeyini UV ışını altında bir süre bekleterek yapılabilir (Kemp ve Smith, 2005). Araştırmacıların kemik ve diş örneklerine uyguladıkları bu yöntemler şu şekildedir: (Kaestle ve Horsburgh, 2002; Kemp ve Smith, 2005; Watt, 2005; Kirsanow, Burger, 2012).

1. Kemiğin veya dişin yüzeyini yıkama
2. Kemiğin veya dişin yüzeyini fiziksel olarak uzaklaştırma
3. Kemik veya dişin sadece ön kısmını materyalden uzaklaştırma
4. Kemiğin veya dişin yüzeyini asit ile yıkama
5. Kemik veya dişi ultraviyole ışığında bırakma
6. Kemik veya dişi oldukça yüksek yoğunlaştırılmış etanole maruz bırakma
7. Kemik veya dişi çamaşır suyuna (sodyum hipoklorit-NaCl) maruz bırakma
8. Kemik veya dişe bu metotların kombinasyonu şeklinde bir yöntem uygulanabilir.

1.2.6.1.1. Fiziksel Temizlik ile Dekontaminasyon

Watt, (2005) yapmış olduğu tez çalışmasında antik DNA çalışan 106 kişiden 79'u, örneklerin yüzeyini fiziksel olarak uzaklaştırma tekniğini uyguladığını belirtmiştir. Özellikle de el frezesi veya matkap kullanımını fiziksel temizlemede en çok kullanılan tekniktir. El frezesi ve matkaptan sonra ise zımpara kâğıdı, fırça ve neşter bıçağı kullanılmaktadır (Watt, 2005). Yüzeyi fiziksel olarak temizlemek için zımpara kâğıdı veya el frezesi kullanmak yeterlidir ve bu aşamada örneğin tüm yüzeyinin uzaklaştığından emin olmak gerekir. Ancak bu yöntemde, yüzey temizlenirken ortamda ekzojen DNA'yı içeren çok fazla toz oluşur ki bu durum, da kontaminasyona neden olur (Watt, 2005; Rohland ve Hofreiter, 2007). Ayrıca kemik

yüzeyi pürüzlü ise veya kemiğin şekli düzgün değilse, yapılan yüzeysel temizliğin yeterli olup olmadığının anlaşılması zor olmaktadır (Watt, 2005). Diş fırçası ve bistüri yüzeyde bulunan kaba toprakların, bitki kalıntılarının temizlenmesinde kullanılabilir. Uzun kemikler, kafatası ve kaburga gibi boyut olarak büyük olan kemiklerin temizliğinde zımpara veya dönerli tel fırça etkili bir teknik olarak düşünülürken, el veya parmak kemiği gibi küçük ve hassas olan kemiklerde bu teknik uygun görülmemektedir. Bu kemikler yapısından dolayı zımparalama işlemi sırasında daha kolay parçalanacağı için fırçalama veya zımparalama tekniği önerilmemektedir. Bu gibi durumlarda Cemper-Kiesslich ve arkadaşları (2014) etanol ile yıkama tekniğini önermektedir (Cemper-Kiesslich ve ark., 2014).

1.2.6.1.2. Kimyasal Temizlik ile Dekontaminasyon

Örneklerin yüzeyinde bulunan kontaminantları uzaklaştırmak için Triton-X 100, N-lauryl-sarcosine, SDS, CTAB, Tween 20 ve çamaşır suyu gibi kimyasallar kullanılır. Kemiklerin yüzeyini sünger ile silmek, kemiklerdeki gözenekli yapıdan ekzojen DNA'nın içeri girmesine izin vermeyebilir, ancak özellikle gözenekli yapıya sahip kemiklerin çamaşır suyu ile yıkanması, çamaşır suyunun gözeneklerden içeri girmesine neden olur ve bu durum kontaminasyona neden olacağı gibi antik örneklerde çok az miktarda bulunan endojen DNA'yı da yıkabilir (Rohland ve Hofreiter, 2007). Kimyasal dekontaminasyon metotları içerisinde en çok çamaşır suyu kullanılmaktadır. Çamaşır suyu ekzojen DNA'yı yıkarken, endojen DNA'yı etkilemez. Antik DNA çalışmalarında endojen DNA, kemik mineraline bağlanır ve böylece çamaşır suyunun etkilerinden korunmuş olur (Higgins ve Austin, 2013).

1.2.6.1.3. Ultraviyole Işını ile Dekontaminasyon

Ultraviyole dalga boyu aralıklarına göre üç kısma ayrılır; UVA (320-400nm), UVB (280-320nm) ve UVC (200-280 nm) (Ke ve ark., 2005). UV ışını, görünürde olan yörünge elektronlarının uyarılmasına neden olur ve yüksek enerji seviyelerine getirmesini sağlar. Yapılan çalışmalar hücre içi biyomoleküller, DNA hasarını ve mutasyonu indükleyen UVC'yi güçlü bir şekilde çektiğini göstermiştir (Sakar ve Sommer, 1990; Ke ve ark., 2005). Ultraviyole ışını, örneklerin yüzeyini temizlemede etkili olabilir, fakat kemik yüzeyi pürüzlü ise uygulanan bu yöntem dekontaminasyonu sağlayamayabilir. UV ayrıca kemiğin sadece yüzeyine etki eder, bu yüzden kemiğin içine nüfuz eden endojen DNA'ya etki etmez. Sakar ve Sommer (1990) farklı miktardaki DNA örneklerini farklı dalga boyunda ve farklı zaman aralıklarında UV ışınına maruz bırakmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda UV ışınının örneklere olan mesafesinin önemli olduğunu, aradaki mesafe azaldıkça amplifikasyon ürünlerinde büyük bir azalma olduğu ve UV'nin en etkili olduğu dalga boyunun 254 nm. olduğu sonucuna varmışlardır (Sakar ve Sommer, 1990). UV'nin Taq polimeraz enzimi veya primerleri üzerine etkisi konusunda araştırmacıların farklı sonuçları vardır. Sakar ve Sommer (1990) ile Dwyer ve Saksena (1992) UV'nin Taq polimeraz enzimini ve primerleri etkilemediğini, Belak ve Ballagipordany (1993), Fox ve arkadaşları (1991) ise etkilediği görüşündedir.

UV'nin DNA üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalar sonucunda Watt (2005), UV'nin dekontaminasyon çalışmaları için kemik ve dişler için uygulanabileceği gibi laboratuvarında çalışma alanları içinde kullanılabileceğini, ancak UV kullanılacak örnek yüzeyinin kuru olması gerektiği belirtmiştir (Watt, 2005). Budowle (2014) ise UV ışınının sadece laboratuvar ortamı ve malzemeler

için kullanılmasını uygun görürken kemik ve diş örneklerinin yüzeysel temizliği için UV kullanımı yeterli olmadığını, Cemper-Kiesslich ve arkadaşları (2014) hücrelerin UV ışınından direkt olarak etkilenmediği için, kontaminasyonu önlemek için UV'yi tek başına kullanmanın yeterli olmadığı görüşündedir (Budowle, 2014; Cemper-Kiesslich ve ark., 2014).

Fiziksel yüzey temizleme, dekontaminasyon işlemleri içinde en çok kullanılan tekniktir ve kemik yüzeyindeki kontaminantları etkili bir şekilde uzaklaştırır. Ancak bu teknik, kemik dokunun içine nüfus etmez. Kimyasal temizlik, kemiğin içine nüfuz ederek etkili bir şekilde kontaminantları uzaklaştırır, ancak bu teknikte kullanılan kimyasal malzemeler de DNA'ya zarar verebilir. UV'nin laboratuvarlarda daha çok mikrobiyal dekontaminasyon için kullanımı uygun görülüp, aDNA çalışmalarında tek başına etkili olmamaktadır (Watt, 2005).

1.2.6.2. Dekalsifikasyon

Kemik dokusunun %70'ini inorganik kısımdan oluşur. Özellikle antik kemik örneklerinin inorganik kısmında bulunan kalsiyum hidroksiapatit kristalleri DNA'ya ulaşmayı zorlaştırır. DNA'ya ulaşmak için öncelikle Ca² iyonlarının uzaklaştırılması gerekir (Hochmeister ve ark., 1991; Loreille ve ark., 2007). Toz haline getirilmiş kemik ve diş örnekleri için pH değeri 7-8,5 olan EDTA tamponunda inkübasyonu esasına dayanan dekalsifikasyon işlemi örneklerin durumuna bağlı olarak değişmekle birlikte, inkübasyon süresi 72 saat sürer ve her 24 saatte bir EDTA tamponu değiştirilir (O'Rourke, 2000a; Cemper-Kiesslich, 2014). EDTA özellikle kemikte fazla bulunan kalsiyum ve magnezyuma bağlanarak, DNA'nın açığa çıkmasını sağlar (Cemper-Kiesslich, 2014). Dekalsifikasyon

aşamasında sadece EDTA kullanan araştırmacılar da vardır, ancak EDTA'nın varlığında Proteinaz K, daha çok aktivite gösterdiği için ikisinin birlikte kullanımı daha yaygındır. Proteinaz K'nın optimum reaksiyon sıcaklığı 56°C olarak belirtilmiştir, ancak oda ısısında (22°C) ve 30°C de inkübasyona bırakılan örneklerin sonuçları karşılaştırıldığında çok önemli bir fark gözlenmemiştir (Cemper-Kiesslich, 2014). Altunçul (2001), kemik örneklerinde dekalsifikasyon yapılmadan da başarılı DNA izolasyonunun yapılabileceğini belirtmiştir (Altunçul, 2001).

1.2.6.3. DNA İzolasyon Yöntemleri

DNA analizleri; moleküler genetik araştırmalarında, adli bilimlerde anne/babalık testlerinde, DNA parmak izi belirlemede, hastalık teşhisinde, filogenetik araştırmalarda, gen ekspresyonunda, genom yapısının belirlenmesinde, genomik kütüphane oluşturulmasında, gen klonlama alanlarında rutin olarak kullanılmaktadır. Moleküler genetik alanında yapılan çalışmalarda ilk işlem çalışılan materyalden DNA'yı saf bir şekilde elde etmektir. DNA izolasyonunda temel olarak öncelikle hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşmak için, hücre duvarı parçalanır. Parçalama fiziksel ve kimyasal yollar ile yapılabilir. Fiziksel parçalamada dondurup çözme şeklinde hücre duvarı yıkılır. Kimyasal parçalamada ise çeşitli kimyasal maddeler kullanılır. Daha sonra DNA-protein kompleksinin çözünmesi sağlanarak, proteinlerin ortamdaki uzaklaşması sağlanır. Bu aşamada denatürasyon gerçekleştirilir. Yani çift zincirden oluşan DNA molekülünün yüksek sıcaklıkta bırakıldığında tek zincirli hale gelmesi sağlanır. Bu aşamada yaygın olarak fenol/kloroform kullanılır, çünkü fenol-kloroform gibi organik çözücüler proteinleri DNA'dan uzaklaştırır. Fenol-kloroform dışında DNA'yı tutma özelliğinden dolayı spin klonlar da son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Spin klonlarda DNA

haricindeki diğer moleküller tamamen uzaklaşır. Son aşamada ise DNA'nın fiziksel veya kimyasal yöntemler ile diğer moleküllerden uzaklaştırılması sağlanır (Cattaneo ve ark., 2000). Antik DNA analizlerinde kullanılan yöntemler, adli bilimlerde kullanılan yöntemlerle aslında aynıdır, ancak aDNA çalışmalarında örneklerin üzerinden uzun bir süre geçtiği için normal prosedürde bazı değişiklikler yapılarak kullanılmaktadır. Organik faz oluşturan (fenol/kloroform) veya DNA'nın katı bir yüzeye (silika) bağlanmasını sağlayan yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır (O'Rourke ve ark., 2000a).

Antik veya taze kemik ve diş örnekleri ile çalışma yapılacak ise, izolasyon solüsyonuna Triton X-100 eklenebilir. Triton X-100, bozulmamış hücre zarını ve proteinlerini yıkar, N-phenacylthiazolium bromid (PTB) veya dithiothreitol (DTT) PZR inhibitörlerinin etkisini azaltmak için kullanılabilir. Genellikle chaotropic ajanlar, hidrojen bağlarını yıkan bir moleküldür ve genellikle DNA'yı silikaya bağlama amacıyla kullanılır, ancak bu süreç tam anlaşılacakla birlikte, çoğunlukla DNA'nın dehidrasyonu ile sonuçlanır. Guanidium izotiyosiyanat (GuSCN) veya NaI, chaotropic ajan olarak aDNA çalışmaları için kullanılabilir (Boom ve ark., 1990). Ayrıca GuSCN, PZR inhibitörü içermediği için hücre duvarını parçalamak için kullanılabilir (Höss ve Pääbo, 1993; Krings ve ark., 1997; Poinar ve ark., 1998; Hofreiter ve ark., 2004). Silika yöntemi, kemik ve diş örneklerinden kısa zamanda DNA elde edilmesi açısından bir avantaj sağlarken, izolasyon solüsyonu içinde fazla miktarda EDTA bulunmasından dolayı da dezavantaj olmaktadır (Rohland ve Hofreiter, 2007).

Kotan (2010) oda ısında 6 ay bekletilen 15 adet costa kemiğinden silika yöntemi ile DNA elde etmiştir. Çalışılan bu kemiklerden 3 tanesi eski kemik olup,

bu kemiklerden DNA elde edememiştir (Kotan, 2010). Rohland ve Hofreiter (2007b) DNA izolasyon tekniklerini karşılaştırmak için kapsamlı bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmanın ilk aşamasında DNA ekstraksiyon solüsyonu içine Triton X-100, %1 Tween 20, SDS, CTAB ve N-lauryl sarcosin ekleyerek ayrı solüsyonlar hazırlamışlar ve aynı örneklerden DNA elde etmişlerdir. Triton X-100 eklenerek hazırlanan DNA solüsyonu, en iyi sonucu vermiştir. Burada şaşırtıcı sonucu veren kimyasal ise N-lauryl sarcosin olmuştur, çünkü DNA izolasyonunda çok yaygın olarak kullanılmasına rağmen, elde edilen DNA'nın kalitesinde çok etkili olmamıştır. Deneyin ikinci aşamasında, kemikleri eritmek için gerekli olan sıcaklık ve inkübasyon süresi test edilmiştir ve kısa süreli inkübasyon sonucunda kemik tozunun erimesinde bir değişim görülmez iken, uzun süreli ve yüksek sıcaklıktaki inkübasyonda kemiklerin tamamen eridiği gözlemlenmiştir. Özellikle 56°C'de iki ay bekletilen örnekler, oda ısısında 4 gün inkübasyona bırakıldığında elde edilen DNA miktarında artış gözlenmiştir. Proteinase K ve EDTA'nın DNA izolasyonunda pozitif etkisi görülürken, Tris'in bir etkisi görülmemiştir (Rohland ve Hofreiter, 2007b). Dişlerde kullanılan izolasyon metotlarında proteinase K ve EDTA'nın birlikte kullanılması ile iyi sonuçlar alınmıştır. M.Ö. 300-600 yılları arasında tarihlendirilen dişlerde mtDNA ve nükleer DNA çalışılmıştır ve %90 oranında başarılı sonuç alınmıştır (Shiroma ve ark., 2004). DNA ve diğer biyomoleküller arasındaki çapraz bağları azaltmaya yardımcı olan ve ayrıca proteinlerin erimesini kolaylaştıran DTT, DNA izolasyonlarında kullanılmaktadır ancak, Proteinase K kemikteki kolejeni ve çapraz bağları eritmede tek başına yeterli olduğu için DTT'ye göre daha çok tercih edilmektedir. Birçok kimyasal aDNA

çalışmaları için izolasyon solüsyonuna eklenmektedir, ancak çoğunun DNA elde etmede bir etkisi yoktur (Rohland ve Hofreiter, 2007a).

1.2.6.3.1. Fenol Kloroform ile DNA İzolasyon Yöntemi

Organik izolasyon yöntemi olan fenol-kloroform yönteminde en önemli amaç proteinleri ortamdaki uzaklaştırmaktır. Ortamda bulunan proteinler uzaklaştırıldıktan sonra, fenol/kloroform ile nükleik asitler saflaştırılır (Altunçul, 2001). Proteinler ortamdaki uzaklaştırılmadan önce bir deterjan ile hücre zarı parçalanır, proteinaz K enzimi ile peptid bağları yıkılır. Eşit hacimde fenol/kloroform ilave edildikten sonra santrifuj edilerek fenol uzaklaştırılır. Bu aşamada fenol/kloroform/izoamil alkol karışımını kullanan ve öneren araştırmacılar vardır (Sambrook ve ark., 1989; Cattaneo ve ark., 2000). Kloroform izoamil alkol (24:1) eklendikten sonra tekrar santrifuj edilerek, DNA içeren sıvı faz yeni bir tüpe alınır ve soğuk %100 etanol ile çöktürülür (Kaestle ve Horsburgh, 2002). Çöktürme aşamasında etanol yerine izopropanol kullanımı ile PZR inhibitörlerinin uzaklaştırılması da sağlandığı için bu aşamada izopropanol kullanımını öneren araştırmacılar vardır (Sambrook ve ark., 1989; Hanni ve ark., 1995). Ayrıca alkole sodyum klorit, lityum klorit, sodyum asetat, amonyum asetat veya potasyum asetat ilave edilip, 24 saat -20°C’de bekletilmesi ile DNA miktarını artırabilir (Miller ve ark., 1988; Sambrook ve ark., 1989). Altunçul (2001) yapmış olduğu çalışmada kemik örneklerinde chelex ve sodyum asetat yönteminin başarılı olmadığını, fenol-kloroform/izoamilalkol yönteminin oldukça başarılı olduğunu belirtmiştir (Altunçul, 2001). Fenolün toksik olması, çevreye olan zararından dolayı ve fenol kalıntılarını ortamdaki uzaklaştırmak için Bozkaya (2012) yapmış olduğu çalışmada fenol yerine potasyum asetat kullanmıştır. Çalışmada fenol-kloroform yöntemine göre daha az

miktarda DNA elde edilmiş ancak, istenilen miktarda ve kalitede DNA elde edildiği için fenol yerine potasyum asetat kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır (Bozkaya, 2012).

1.2.6.3.2. Silika Yöntemi ile DNA İzolasyon Yöntemi

İnorganik izolasyon yöntemlerinde ortamda bulunan tuzlar uzaklaştırılarak, proteinlerin parçalanır. "Silika yöntemi ile DNA izolasyonu, guanidium izotiyosiyanatın pozitif yüklü amin grupları içeren ucuna DNA, diğer ucuna da silika parçacığının bağlanması esasına dayanan bir yöntemdir" (Kotan, 2010; 9). Silika temelli DNA izolasyon yöntemi iki kısımda incelenebilir. Yang (1998) silika klonlarını geliştirerek bir protokol oluşturmuştur (Yang, 1998). Rohland ve Hofreiter (2007a) Pleistosen dönemine ait mağara ayılarının kemik ve diş örneklerinden DNA elde etmek için silikayı süspansiyon halinde kullanarak optimize etmiş, karşılaşılan sorunlar için çeşitli çözümler üretmişlerdir (tablo-4) ve araştırmacılar bu yöntemin diğer izolasyon yöntemlerine göre avantajlarının olduğu görüşündedir (Rohland ve Hofreiter, 2007b). Bunlar;

1. Antik örneklerde DNA izolasyonunda yapılan işlemler çok olmamakla birlikte iki gün süren bir sürede DNA izolasyonu hızlı ve kolay bir şekilde tamamlanmaktadır.
2. Silika yöntemi ile farklı miktardaki kemik tozlarına ve DNA izolasyonu sırasında kullanılan ekstraksiyon hacmine kolaylıkla uyarlanabilir. Örneğin 50 mg kemik tozu için 1ml ekstraksiyon solüsyonu, 2 gram kemik tozu içinde 10 ml ekstraksiyon solüsyonu kolaylıkla hazırlanabilmektedir.

3. Bu yöntem sadece standart olarak kullanılan laboratuvar malzemelerini ve çok az miktarda kimyasal malzemeye ihtiyaç duymaktadır. İşlem sürecinde gerekli olan sıcaklık aralığı 20-23 °C olduğu için kolay bir şekilde uygulanabilmektedir (Rohland ve Hofreiter, 2007b).
4. DNA izolasyonunda kullanılan organik metotlar iyi sonuçlar vermesine rağmen, tehlikeli kimyasallar içerdiğinden dolayı PZR inhibitörlerini uzaklaştırılmada başarısız olmaktadır. Silika yönteminde PZR inhibitörleri daha az problem oluşturmaktadır ve kolay bir şekilde uzaklaştırılabilir (Hasan ve ark., 2014; Kalmar ve ark., 2000; Hänni ve ark., 1995; Höss ve Pääbo, 1993).

Tablo-4 Silika yöntemi ile yapılan DNA izolasyonunda karşılaşılan sorunlar ve önerilen çözümler (Rohland ve Hofreiter, 2007a)

Sorun	Sorun Kaynağı	Çözüm
Uygulamanın başarısız olması	İnhibitör maddeler	Çalışılan örnekte inhibitör olup olmadığını belirlemek için, uygulanan prosedür basamaklarında pozitif kontrol kullanılmalıdır. Ayrıca DNA izolasyonu yapılacak örneklerin tekrar çalışılma durumu olduğu için küçük hacimlerde ayrılıp saklanması gereklidir.
	Örneğin az veya hiç DNA içermemesi	Uygulanan aşamanın doğruluğunu doğrulamak için pozitif kontrol kullanılmalıdır. DNA izolasyonu aşamasında birden fazla örnek ile çalışılmalı, örneklerde DNA elde edilemediği durumda en az iki kere işlem tekrar edilmeli, örnek miktarı en az iki katına çıkarılarak tekrardan DNA izolasyonu yapılmalıdır.
	Silikaya bağlanmanın yetersiz olması	Bağlanma aşaması, orjinal bağlama solüsyonu kullanılarak tekrar edilmelidir. Yeni bir silika eklenerek, pH çok düşük ise tekrar ayarlanmalıdır. Antik örneklerde degradasyon sorunu olduğu için, bu basamağın en başından tekrar edilmesi daha uygundur.
	Kullanılan solüsyon veya tamponların çok eski olması	Kullanılan tüm solüsyon ve tamponların tekrardan hazırlanması gereklidir.
DNA izolasyonunda kontaminasyon oluşması	Kullanılan solüsyonlar kontamine olmuş olabilir	Endojen DNA ile kontamine olan DNA arasında farklılık var ise (bu durum sadece her bir ürünün ayrı klonlanması ile ayırt edilebilir) işleme devam edilebilir veya tüm izolasyon aşaması yeni solüsyonlar hazırlanarak tekrar edilmelidir (tekrar edilmesi daha uygundur).
	Çapraz kontaminasyon olmuş olabilir	Yeni solüsyonlar hazırlanarak, DNA izolasyonu tekrar edilmelidir.

1.2.6.3.3. Ticari Kitler ile DNA İzolasyon Yöntemi

Ticari kitlerde çok az miktarda materyale ihtiyaç duyulması, fenol-kloroform ve silika yöntemine göre daha hızlı sonuç vermesi ve işlem basamaklarında kontaminasyon riskinin daha az olması nedeniyle günümüzde kullanımı giderek artmaktadır. Hızlı ve güvenilir sonuç vermesinden dolayı ticari kitler özellikle adli bilimlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Farklı markaları olan ticari kitlerde de DNA izolasyonu için uygulanacak prosedürler her kitin içinde bulunmaktadır (Cattaneo ve ark., 2000). Cattaneo ve arkadaşları (1997) kemik ve kan örneklerine üç farklı DNA izolasyon yöntemi uygulamıştır ve ticari kit ile olan izolasyon sonucunda en iyi DNA'yı elde etmişlerdir (Cattaneo ve ark., 1997). Rohland ve Hofreiter, 40 mg kemik tozu kullanarak, antik kemik örneklerine farklı DNA izolasyon yöntemlerini uygulamıştır. Çalışmanın sonucunda fenol-kloroform yöntemi ile elde edilen DNA kalitesinin, ticari kit ile elde edilen DNA kalitesine yakınlık gösterdiği belirtilmiştir (Rohland ve Hofreiter, 2007b).

1.2.6.4. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PZR, in vitro koşullarda bir DNA dizisinin istenilen ve çoğaltılmak istenen iki parçası arasındaki bölümün enzimatik olarak çoğaltılmasına dayanan bir tekniktir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile az miktarda ekstrate edilmiş materyallerdeki örneklerin çoğaltılması mümkündür (Balogh ve ark., 2003). PZR ile birlikte sadece tek bir gen kopyasından hızlı bir şekilde milyonlarca kopya elde edilebilir (Saiki ve ark., 1988; Belak ve Ballagipordany, 1993). PZR işlemi üç aşamada gerçekleşir;

- Denatürasyon: Çift zincirli DNA'nın yüksek sıcaklıkta çözünerek tek zincirli DNA haline gelmesine denatürasyon (bozulma) denir. Denatürasyonun gerçekleşmesi için etkili olan sıcaklık 93-96°C arasında değişmektedir. Bu sıcaklıkta hidrojen bağları kopar ve DNA tek zincirli hale geldiği zaman denatürasyon tamamlanır.
- Primer eşleşmesi: İstenilen gen bölgesine ait dizayn edilen primerdeki iki oligonükleotidin istenilen gen bölgesine bağlanması için gerekli olan sıcaklık 55-56°C arasında değişmektedir. Bu basamakta hedef DNA ile primer eşleşir.
- Primer uzaması: DNA polimeraz ile primerlere DNA polimeraz ile nükleotid eklenerek hedef zincir uzatılır. Yapılacak çalışma ve kullanılacak olan primerlere göre 30-40- döngü arasında değişmektedir ve gerekli olan sıcaklık 72°C 'dir. DNA'ya bağlanacak olan bazlar primere 3' kısmında bağlanır. Bu aşamada hedef DNA örneği iki katına çıkar. Denatürasyon, primerlerin eşleşmesi ve primer uzamasından oluşan bu şamalar bir döngü olarak kabul edilir ve yapılan çalışmalara göre döngü sayısı 30-40 arasında değişmektedir. (Sommel ve Querci, 2000 ; Crainic ve ark., 2002).

DNA polimeraz, *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen Taq DNA polimeraz PZR' da en yaygın kullanılan enzimdir. Bu enzimin optimum çalışma sıcaklığı 70-80°C arasında değişmektedir. Bu enzim 5'ucundan 3'ucuna ekzonükleaz aktivitesine sahiptir (Saiki ve ark., 1988). Taq DNA polimeraz dışında kullanılan başka enzimlerde vardır. Bunlardan birisi olan Vent, Deep Vent, Pfu ve UITma DNA Polimerazlar 3'ucundan 5'ucuna ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. Bu özellik, primerlerin parçalanmasına neden olabileceği için, bu enzimin kullanılması yaygın değildir. Ampli Taq Gold DNA polimeraz enzimi sadece 94°C'de aktif olan

bir enzimdir. PZR reaksiyonunda kullanılan enzimler kadar reaksiyon için gerekli olan tamponlarda önemlidir. PZR’ da kullanılan tampon, enzime bağlı olarak değişmektedir. Taq DNA polimeraz için genellikle Tris, KCl ve MgCl₂ kullanılmaktadır. Burada MgCl₂, kullanılan polimerazın aktivitesini artırır, primerin hedef DNA’ya bağlanması için gerekli olan sıcaklığı artırır (Roux, 1995).

Hem antik DNA çalışmalarında hem de modern DNA çalışmalarında PZR yaygın olarak kullanılır. PZR aşamasında çok az miktarda bile DNA kontamine olursa, yanlış nükleik asidin amplifikasyonu gerçekleşir ve yanlış sonuç ortaya çıkar. PZR aşamasında oluşacak kontaminasyon riskini önlemek için oldukça dikkatli olmak gerekir. PZR aşamasında kontaminasyon olmaması için bazı önlemler alınmalıdır. Bunlar;

- ✓ Laboratuvar ortamında örneklerin hazırlandığı alan, DNA izolasyon alanı, PZR odası ve PZR sonrası alan ayrı olmalıdır.
- ✓ PZR odalarında kullanılan malzemeler başka bir alanda kullanılmamalıdır.
- ✓ PZR yapılan odaya hiçbir zaman kullanılacak olan DNA örneği getirilmemelidir.
- ✓ Kullanılacak olan PZR tüpleri, pipet uçları steril olmalıdır. Pipet uçları çapraz kontaminasyona neden olacağı için eğer mümkünse PZR kabini içinde filtreli pipet uçları kullanılmalıdır.
- ✓ PZR kabini içinde UV lambası ve işlem sırasında kullanılacak eldiven bulunmalıdır. Çalışma yapılmadan önce ve PZR sonrası UV çalıştırılmalıdır.
- ✓ PZR’da mutlaka negatif kontrol kullanılmalı ve PZR reaksiyonu negatif kontrole en son koyulmalıdır.

- ✓ Kullanılacak olan stok çözeltiler otoklav edilmelidir ve tek bir şişeden kullanmamak için kullanılacak en az miktarda farklı tüplere bölünmelidir.
- ✓ Laboratuvar ortamında bunlar dışında da oluşabilecek birçok kontaminasyon kaynağı olabilir. Bunun için öncelikle laboratuvar personelinin çok dikkatli olması gerekir (Parsons ve Weedn, 1996; Somma ve Querci, 2004; Cattaneo ve ark., 2000).

Yapılan çalışmalarda kontaminasyon olduğu tespit edilirse, daha sonraki yapılacak olan çalışmalar için kontaminasyon kaynağının mutlaka bulunması gerekir. DNA, daha önceki çalışmalardan kontamine olmuş ise, örnekler arasında çapraz kontaminasyon oluşmuş ise veya daha önceki DNA'nın amplifikasyonu sırasında kontaminasyon oluşmuş ise bu durum yanlış pozitifliğe neden olur. PZR aşamasından önce örneklerin dekontaminasyon işlemi sırasında kullanılan kimyasallardan dolayı parçalanmış ürünler oluşabilir, bu durum da yanlış negatifliğe neden olur (Neiderhauser ve ark., 1994). İnsan kaynaklı kontaminasyon olduğu gibi, bakterilerden kaynaklı kontaminasyonda oluşabilir. Ancak, Yoshii ve arkadaşlarının (1999) yapmış olduğu bir çalışmada kontamine olan gen bölgesi incelenmiş ve bu bölgenin insana ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca amplifikasyon aşamasında çok az miktarda DNA'nın çoğalabilme özelliğinden dolayı insan kaynaklı kontamine DNA da bu aşamada çoğalmaktadır, ancak bakteri veya mayaya ait DNA'lar çoğalmamaktadır (Yoshii ve ark., 1994; Skoglund, 2014).

Antik DNA çalışmalarında DNA degradasyonundan dolayı az miktarda DNA elde edilmektedir ve PZR ile çok az miktarda DNA çoğaltılabildiği için, PZR aDNA çalışmalarında oldukça önemlidir (Allen ve ark., 1993; Renaud ve ark., 2015). PZR

tekniki aDNA çalışmaları için oldukça fayda sağlarken, beraberinde birtakım sorunlarda getirmektedir. PZR inhibitörleri, amplifikasyonu engellediği için DNA'nın çoğalmasına engel olur. Toprakta gelen demir, humik ve fulvik asit, mikroorganizma DNA'sı, PZR inhibitörleri içerisinde yer alır. Genelde PZR inhibitörlerinin çevreden gelen etkenlerden kaynaklı olduğu düşünülmüştür, ancak iki farklı araştırma ekibi tarafından yapılan çalışmada insanlarda bulunan kollajenin potansiyel PZR inhibitörü olduğu bulunmuştur (Rogan ve Salvo, 1990; Cattaneo ve ark., 2000). DNA amplifikasyonuna neden olan bu PZR inhibitörlerinin uzaklaştırılması gerekir. Bunun için DNA saflaştırma teknikleri kullanılabilir veya inhibitör aktivitesini yüksek sıcaklık ile denatüre edilebilir (Bourke ve ark., 1999; Goodyear ve ark., 1994; Kolmar, 2000; Renaud ve ark., 2015). PZR inhibitörlerini ortadan kaldırmak için bazı araştırmacılar Bovine Serum Albumin (BSA) kullanımını önermektedir (Rohland ve Hofreiter, 2007a).

BÖLÜM:2 KONU-AMAÇ, MATERYAL ve METOT

2.1. Konu-Amaç

Çalışma konumuz, Türkiye’de farklı iklim özelliklerine sahip olan ve farklı tarihi dönemlere ait kazılardan çıkartılmış olan kemik ve diş örneklerinden DNA elde edilmesi ve cinsiyetlerinin belirlenmesini sağlamaktır. Bu çalışma kapsamında Orta Bizans Dönemi’nde yaşamış Giresun Adası’ndan çıkartılan kemik ve diş örnekleri, Orta Çağ Dönemi’nde yaşamış Van Kalesi ve Höyüğü kazısından çıkartılan kemik örnekleri, Erken Demir Çağ Dönemi’nde yaşamış Van Kalecik Köyü Urartu Nekropolü Kazılarından (Çatak/Ablagens/Kalecik Nekropolü) çıkartılmış olan diş örnekleri, Helenistik Roma Dönemi’nde yaşamış olan İzmir/Teos Kazısı’ndan çıkartılmış olan kemik ve diş örnekleri, Geç Bizans Dönemi’nde yaşamış Muğla/Beybağ Mevkii Kazısından çıkartılmış olan kemik ve diş örnekleri ile Bizans Dönemi’nde yaşamış Aydın/Nysa Antik Kenti Kazısından çıkartılmış kemik ve diş örnekleri kullanılmıştır.

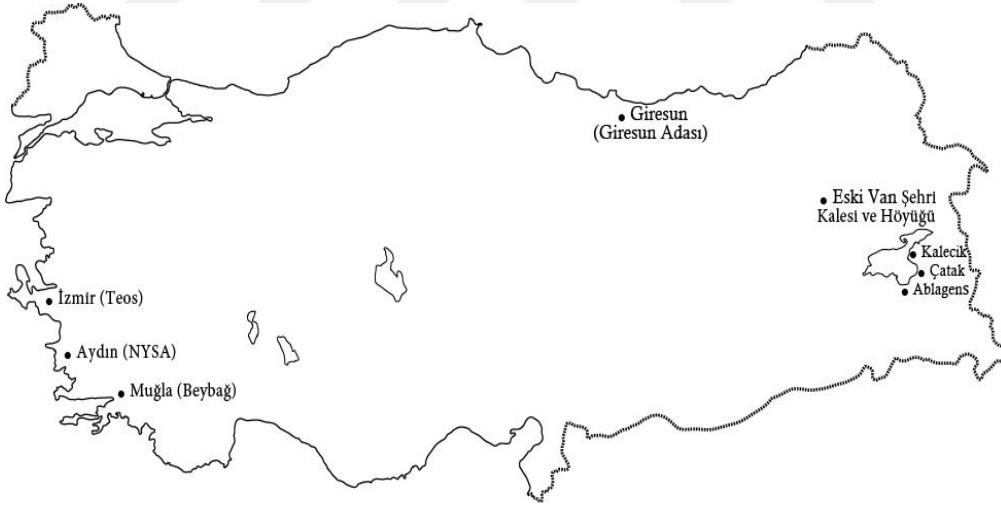
Bu çalışmada antik DNA çalışmalarına uygun ekipmanın sağlanması, farklı derecelerde degrade olmuş, farklı tarihlere ait, farklı fiziki şartlara maruz kalmış diş ve kemik örneklerinden DNA elde edilebilmesi ve cinsiyeti belirleyen amelogenin gen bölgesinde amplifikasyonun sağlanması ve bu yöntemlerin bundan sonraki çalışmalar için kullanılabilmesi hedeflenmiştir.

Tarih öncesi toplumların ekonomik, sosyal ve genetik özellikleri; arkeolojik kazılardan elde edilen iskelet kalıntıları incelenerek belirlenebilmektedir. Antropoloji alanında kullanılan yöntemlerle kemiklerin ait olduğu bireylerin yaşı, cinsiyeti ve boyları tespit edilebilmektedir. Ancak morfolojik yöntemlerle cinsiyetin

belirlenemediği bebek ve çocuklarda, ergin olmayan bireylerde ve parçalanmış iskelet buluntularında DNA analizleri oldukça önemli ve gereklidir. İskeletler üzerinde yapılan morfolojik incelemeler sonucunda elde edilen bilgiler ve moleküler analizler sonucunda ulaşılan bilgiler bir araya getirilerek elde edilen sonuçlar yorumlanarak, antik DNA çalışmalarının antropoloji alanındaki önemi ortaya koyulmaya çalışılmıştır.

2.2. Materyal

Çalışmada materyal olarak farklı tarihi dönemde yaşamış ve Türkiye coğrafyasında 3 farklı iklimsel özelliğe sahip 6 farklı kazı bölgesinden (Şekil-4) çıkartılmış olan kemik ve diş örnekleri kullanılmıştır ve tablo-5'te örnekler ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.



Şekil-4 Çalışmada kullanılan kemik ve diş örneklerine ait kazı bölgeleri

Tablo-5 Çalışmada kullanılan kemik ve diş örneklerinin çıkartılmış oldukları kazı alanı, kazı yılı ve tarihi dönemi gösterilmiştir.

Örneklerin Dönemi	Kazı Alanı	Kazı Yılı	Buluntu Türü	Sıra Numarası
Orta Çağ (erken dönem)	Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü	2014	Femur	1
Orta Çağ (erken dönem)	Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü	2014	Femur	2
Helenistik Roma	Teos/İzmir	2014	Femur	3
Helenistik Roma	Teos/İzmir	2014	Femur	4
Helenistik Roma	Teos/İzmir	2014	Mandibula üzerindeki dişler	5
Helenistik Roma	Teos/İzmir	2014	Mandibula üzerindeki dişler	6
Erken Demir Çağ	Van Kalecik Köyü/Ablagens	2014	Diş	7
Erken Demir Çağ	Van Kalecik Köyü/Ablagens	2014	Diş	8
Erken Demir Çağ	Van Kalecik Köyü/Ablagens	2014	Diş	9
Erken Demir Çağ	Van Kalecik Köyü/ Çatak	2007	Diş	10
Erken Demir Çağ	Van Kalecik Köyü/ Çatak	2007	Diş	11
Erken Demir Çağ	Van Kalecik Köyü/ Çatak	2007	Diş	12
Erken Demir Çağ	Van Kalecik Köyü/Kalecik	2007	Diş	13
Erken Demir Çağ	Van Kalecik Köyü/Kalecik	2007	Diş	14
Erken Demir Çağ	Van Kalecik Köyü/Kalecik	2007	Diş	15
Erken Demir Çağ	Van Kalecik Köyü/Kalecik	2007	Diş	16
Orta Bizans	Giresun Adası	2011	Femur	17*
Orta Bizans	Giresun Adası	2011	Mandibula üzerindeki dişler	18*
Orta Bizans	Giresun Adası	2011	Femur	19**
Orta Bizans	Giresun Adası	2011	Maxilla ve Mandibula üzerindeki dişler	20**
Orta Bizans	Giresun Adası	2011	Maxilla ve Mandibula üzerindeki dişler	21
Orta Bizans	Giresun Adası	2011	Mandibula üzerindeki dişler	22
Orta Bizans	Giresun Adası	2011	Maxilla ve Mandibula üzerindeki dişler	23
Bizans	Nysa /Aydın	2015	Timpanik Kemik	24
Bizans	Nysa/ Aydın	2015	Timpanik Kemik	25

Örneklerin Dönemi	Kazı Alanı	Kazı Yılı	Buluntu Türü	Sıra Numarası
Bizans	Nysa/Aydın	2015	Timpanik Kemik	26
Bizans	Nysa/ Aydın	2015	Mandibula üzerindeki dişler	27
Bizans	Nysa /Aydın	2015	Mandibula üzerindeki dişler	28
Bizans	Nysa /Aydın	2015	Timpanik Kemik	29
Bizans	Nysa/ Aydın	2015	Fibula	30
Bizans	Nysa/ Aydın	2015	Femur	31
Bizans	Nysa /Aydın	2015	Mandibula üzerindeki dişler	32
Orta Bizans	Giresun Adası	2012	Diş	33
Geç Bizans	Muğla/Beybağ	2008	Diş	34
Orta Bizans	Giresun Adası	2012	Diş	35
Orta Bizans	Giresun Adası	2012	Diş	36
Geç Bizans	Beybağ/Muğla	2008	Femur Diş Timpanik Kemik	37
Orta Bizans	Giresun Adası	2012	Femur	38****
Orta Bizans	Giresun Adası	2012	Diş	39****
Orta Bizans	Giresun Adası	2012	Femur	40

17 ve 18 numara, aynı bireye ait femur ve mandibula örneğidir. 19** ve 20** aynı bireye ait femur ve maxilla-mandibula örneğidir. 38**** ve 39**** aynı bireye ait femur ve diş örneğidir.

2.2.1. Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü

Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi'nin önemli yerleşim yeri olan Van ili, kesintisiz yerleşim yeri olması ile tarihte önemli bir yere sahiptir. M.Ö. 9. yüzyıl ve 6.yüzyıl arasında bir krallık sürmüş olan Urartu Devleti'nin başkenti, Van Kalesi (Tuşpa) olarak bilinmektedir (Konyar ve ark., 2013). Van Gölü kıyısında bulunan ve Tuşpa Sitedali olarak da bilinen "Van Kalesi"(Şekil-5) yerleşim yeri tamamen Urartu mimari izlerini taşımaktadır. Van Kalesi ve Höyüğü, İlk Tunç Çağı ve Urartu Dönemi yerleşim yeri olarak bilinmektedir.

Eski Van Şehri "Van Sitedali" olarak bilinir. Eski Van Şehri yerleşim yeri M.S.12. yüzyıldan M.S.20. yüzyıla kadar iskân görmüş olup, 800 yıllık geçmişinde

Selçuklu-Osmanlı izlerini taşımaktadır. Bu yerleşim yerinde Türk-İslam Dönemi'ne ait eserler bulunmuştur (Konyar ve ark., 2015).

Van Sitadeli'nin kuzeyinde yer alan "Van Kalesi Höyüğü'nde"(Şekil-6) M.Ö.3. yüzyıldan 20.yüzyılın başlarına kadar yerleşim sürülmüştür. Bu yerleşim yerinde yapılan arkeolojik kazılarda daha önce ortaya çıkarılan Urartu Dönemi'nin mimari izlerine rastlanılmıştır. "Van Kalesi Höyüğü Kazısı" 2010 yılında İstanbul Üniversitesi Arkeoloji Bölümü Öğretim üyesi Erkan Konyar tarafından başlatılmıştır. 2012 yılında Kültür Varlıkları ve Müzeler Genel Müdürlüğü'nün izni ile Türkiye'nin 12 farklı üniversitesinin de katılımıyla Van ilinin 5 bin yıllık geçmişi araştırılmaktadır. (Konyar ve ark., 2013).



Şekil-5 Eski Van Şehri Kalesi (*edebiyat.istanbul.edu.tr*)



Şekil-6 Eski Van Şehri hava fotoğrafı (*edebiyat.istanbul.edu.tr*)

2.2.2. Van Kalecik Köyü Kalecik Nekropolü

Kalecik, Van-Ağrı karayolu üzerinde yolun kuzeyinde bulunan bir ilçedir. Van Kalecik Nekropolü, Urartu Devletine başkentlik yapmış olan Van Kalesi'nin kuzeyinde, Kalecik Köyü'nün 1,5 km. kuzeydoğusunda Şahbağı Tepesi ile Sığır Tepesi arasında bulunan dikilitaşlardan oluşan bir alan içerisinde (Şekil-7) (Çavuşoğlu ve ark., 2008; Yılmaz ve ark., 2008). Bulduğu coğrafik konumu ile karasal iklim tipi görüldüğü için kış aylarında kar yağışı, yaz aylarında yağışlı ve sıcak olup, Van Gölü'nün bulunduğu kesimlerde kış ayları daha az sert geçer. Van Kalecik, ilk olarak 2003-2004 yıllarında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Arkeoloji bölümü tarafından araştırılmaya başlanmıştır. Kalecik'in güneybatısında bir nekropol alanın (Şekil-8) bulunması ile birlikte 2004-2007 yılları arasında Kültür ve Turizm Bakanlığı izini ile kazılar yapılmaya başlamıştır. Arkeolojik kazılardan önce bölgede defineciler tarafından kaçak kazılar yapıldığı ve yağmalandığı anlaşılmıştır. Arkeolojik kazılar sonucunda 25 adet mezar ortaya çıkarılmış ve sadece 12'sinde insan iskeletine rastlanılmıştır. Ortaya çıkarılan bu mezarlarda bulunan iskeletlerin yanlarında metal eser bulunmuştur. Bu eserlerin içinde Urartu örneklerine ait olan

gümüş yüzük ve küpe, altından kaplama iğne, kemer parçaları, saç tokları bulunmuştur. Kalecik yerleşim merkezinin dışında herhangi bir merkez olmadığı için mezarların kime ait olduğu belirlenememiştir ancak mezarlardan çıkan eserler doğrultusunda Urartu dönemi olarak tarihlendirilmiştir (Çavuşoğlu ve ark., 2008).



Şekil-7 Van Kalecik Köyü Kalecik Nekropolü dikili taşlar ve taş halkaların genel görünüşü
(Fotoğraf Atlas Dergisi)



Şekil-8 Kalecik Nekropolü'nün genel görünüşü (Fotoğraf Gökhan Tan)

2.2.3. Van Kalecik Köyü Ablangens Nekropolü

Ablangens nekropolü, Van'ın kuzeyinde F Tipi Cezaevi sahasında yer almaktadır. Van'a bağlı Yumrutepe (Derleşin) köyü Nekropole en yakın yerleşim alanıdır. 2014 yılında yapılan inşaat çalışmaları sırasında mezarlara rastlanılmıştır. Kültür ve Turizm Bakanlığı'na bağlı Van Müze Müdürlüğü tarafından yapılan kazı

çalışmalarında insan kemiği, seramik kaplar, bronz iğne ve bilezik bulunmuştur. Kazıdan çıkarılan buluntular, Erken Demir Çağı (M.Ö. 1250–850) dönemine işaret etmektedir (Yılmaz, 2016).

2.2.4. Van Kalecik Köyü Çatak Nekropolü

Çatak, Van ili'ne bağlı bir ilçedir. Çatak (Van) karayolu çalışmaları sırasında Erken Demirçağ olarak tarihlendirilmiş bir oda mezarına rastlanılmıştır. Bu oda mezarı Erken Demirçağı'ndan Urartu dönemine kadar yaygın olarak görülmüştür. Yapılan kazılarda insan iskeletlerinin yanı sıra bronz bilezik, bronz sikke ve çanak çömlek ele geçirilmiştir (Yılmaz ve ark., 2014).

2.2.5. Giresun Adası

Giresun ili, Karadeniz Bölgesi'nin Doğu Karadeniz bölümünde yer almakta olup, doğuda Trabzon ve Gümüşhane, güneyde Erzincan ve Sivas, batıda ise Ordu ile çevrili olan Karadeniz kıyısında bulan bir şehirdir. Bulunduğu coğrafik konumu ile iki ayrı iklim görülür. Kıyı kesimler ılık ve yağışlı olup, Rize'den sonra Türkiye'de en çok yağışın görüldüğü bölgedir.

Giresun ili sınırları içinde yer alan ve Giresun'un 1,7 km açığında yer alan Giresun Adası, (Şekil-9) antik dönem yerleşim merkezlerinden, Doğu Pontus Bölgesi'nin Grek koloni yerleşim alanlarından birisidir. Giresun Adası'nın antik ismi Roma İmparatorluk döneminde Aretias-Khalkeritis olarak adlandırılmıştır (Doksanaltı ve ark., 2011). 2011 yılında Giresun/Aretias-Khalkeritis Adası'nda, Giresun Müze Başkanlığı ile Selçuk Üniversitesi Arkeoloji bölümü ile birlikte arkeolojik kazılar başlatılmıştır. Arkeolojik kazıların başlaması ile birlikte ortaya divit takımı, seramik parçaları, iki adet bronz sikke çıkarılmıştır. Kazılarda Bizans dönemine ait bir kiliseye ait kalıntılar ortaya çıkmış olup, bu kilise zemininin altında

M.Ö. 4. yüzyılın ilk çeyreği olarak tarihlendirilen seramik parçaları bulunmuştur. Kilise temelinin altında bulunan bu seramikler bulunan en erken buluntular olup, bu antik kentin en azından klasik dönemden bu yana iskân edildiği belirlenmiştir. 2011 yılından itibaren yapılan yüzey araştırmalarında, ada üzerinde M.S. 5-6.yüzyıllara ait bir yapı ile ilgili bazı bulgulara ulaşılmıştır. Orta Bizans Dönemine ait bir kilise kalıntısı bulunmuş ve M.S.5-6.yüzyıl olarak tarihlendirilmiştir. Günümüze ulaşan kalıntıların çoğu Orta Bizans dönemine aittir (Doksanaltı ve Aslan, 2012). 2011 yılında 83 adet mezar açılmış ve 72 adet iskelet, 2012 kazılarında 52 adet iskelet çıkarılmıştır (Şekil-10). Çıkarılan bu bireylerin kilisede yaşayan insanlara ait olduğu düşünülmektedir (Acar, 2015)



Şekil-9 Giresun Adası (Fotoğraf, Emel Acar)



Şekil- 10 Giresun Adası kazı alanından çıkartılan iskeletler (Fotoğraf, Emel Acar)

2.2.6. Teos Antik Kenti

Teos Antik Kenti, İzmir ili Seferihisar ilçesi, Sığacık Mahallesi'nde yer alır (Şekil-11). Bu antik şehir ilk olarak 1962 yılında Dilettanti Cemiyeti tarafından 1924-1926 yıllarında ise Fransız araştırmacılar tarafından ilgi görmüştür. 1962-1966 yılları arasında ise Ankara Üniversitesi öğretim üyeleri tarafından araştırılmıştır. 2010 yılından itibaren bakanlar kurulu kararı ile kazı ve restorasyon çalışmaları Ankara Üniversitesi, Dil ve Tarih Coğrafya Fakültesi, Arkeoloji Bölümü öğretim üyesi Musa Kadioğlu başkanlığı tarafından yürütülmektedir.

Teos Antik Kenti İona Bölgesi'nin 12 antik kentinden birisidir. Teos Antik Kenti, küçük bir yarımada üzerinde kurulmuştur. Bu antik kentin kuzey ve güneyinde birer liman vardır. Bu antik kentin batısı Arkaik dönem, güneyi ise Hellenistik ve Roma dönemi nekropol alan olarak kullanılmıştır (Şekil-12). Buradaki kazılar bakanlar kurulu kararı ile 2010 yılında başlamıştır. Antik dönemde Teos, bir liman kenti olarak kullanılmış olup, kuzey ve güney limanı (Şekil-13) olmak üzere iki tane liman bulunur. Kuzey limanından günümüze ait pek bir kalıntı

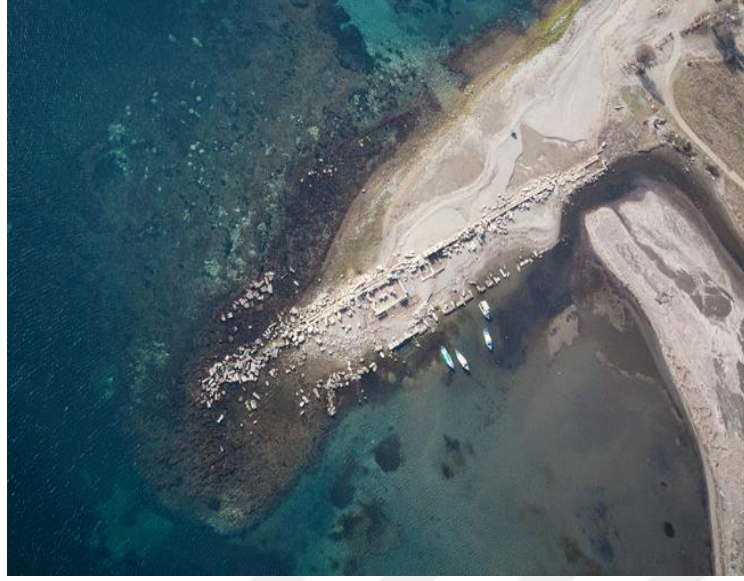
kalmamıştır. Güney limanı ise iyi bir şekilde korunmuştur ve günümüze kalan kalıntı eserler Roma dönemi olarak tarihlendirilmiştir (Kadıoğlu, 2012).



Şekil-11 Teos Antik Kenti haritası (*Atlas Dergisi*)



Şekil-12 Teos Antik Kenti görünüşü (www.izmirmuzesi.gov.tr)



Şekil-13 Teos Güney Liman Klisesi (www.teosarkeoloji.com)

2.2.7.Nysa Antik Kenti

Aydın ili, Sultanhisar ilçesinin 3 km kuzeyinde, Menderes Nehrinin kuzeyinde nehrin oluşturduğu bereketli havzada, Aydın dağlarının güney eteğinde yer alan Nysa Antik Kenti, (Şekil-14) Tekkecik deresinin oluşturduğu vadi üzerine kuruludur. Karia ve İona Bölgeleri'nin içinden geçerek önemli ulaşım ve ticaret yolları üzerinde yer alan ana yol, antik dönemde yoğun olarak kullanılmıştır. Hellenistik, Roma ve Bizans dönemi yerleşimleri görülen, gymnasium ve kütüphanesiyle (Şekil-15) önemli bir eğitim ve kültür kenti olmuştur. Nysa, XX. yüzyılın başlarından itibaren birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Alman Walther von Diest 1907 ve 1909 yılları arasında, 1921 yılında Yunan arkeolog Konstantin Kourouniötēs, 1960'lı ve 1980'li yıllarda İzmir ve Aydın Arkeoloji Müzeleri Nysa'da kazı ve araştırma çalışmalarını yürütmüştür. 1990 yılından itibaren Ankara Üniversitesi öğretim üyeleri ve yardımcılarınca yürütülen bilimsel çalışmalar, 1990-2010 yılları arasında Prof. Dr. Vedat İDİL başkanlığında, 2012 -2015 yılları arasında

Aydın Arkeoloji Müzesi başkanlığında, Ankara Üniversitesi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Serdar Hakan Öztaner'in bilimsel danışmanlığında gerçekleştirilmiştir (Öztaner ve ark., 2014).

Aydın ili, Sultanhisar ilçesi Nysa Antik Kentinde Kültür ve Turizm Bakanlığı'nın izin ve destekleriyle 2012 yılından bu yana Aydın Arkeoloji Müzesi başkanlığında Doç. Dr. S.Hakan Öztaner'in bilimsel danışmanlığında yürütülen kazı ve restorasyon çalışmalarının 2015 yılı kazı sezonunda kentin merkezi (Şekil-16) bir noktasında 1 çocuk, 1 genç ve 2 yetişkin, minimum dört bireye ait iskelet kalıntıları ele geçmiştir. Kentin ana caddesi olan Cadde 1-*Plateia* ile ona dik olarak bağlanan 4B caddesinin köşesinde açığa çıkarılan bu gömülerin, arkeolojik buluntulara göre kentin Bizans dönemi yaşantısına ait olduğu saptanmıştır.



Şekil-14 Nysa Antik Kenti'nin hava fotoğrafı (www.dtcf.ankara.edu.tr)



Şekil-15 Nysa Antik Kent Kütüphanesi



Şekil-16 Nysa Antik Kenti'nin ana caddesi

2.2.8. Beybağ Mevkii Kazısı

Beybağ, Muğla İli, Yatağan İlçesi Yeşilbağcılar Kasabası sınırları içinde Lagina ve Stratonikeia arasında yer alır. Beybağ Mevkii Kazıları, Konya Selçuk Üniversitesi Arkeoloji Bölümü'nden Prof Dr. Ahmet Tırpan başkanlığında 2007 yılında Börükçü merkezli olarak başlatılmıştır (Tırpan ve Söğüt, 2009). Kazılara 2008 yılında da devam edilmiş olup, nekropol alanda yapılan kazılardan Bizans dönemine ait mezarlar bulunmuştur. Yapılan arkeolojik kazılara göre Beybağ Mevkii'nin, M.S. 10. yüzyılın ortalarından 13. yüzyılın başına kadar yerleşim yeri olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (Arıhan, 2013).

2.3. Metot

Çalışmada farklı kazı alanından çıkartılan insana ait kemik ve diş örneklerinden moleküler çalışmalar ile cinsiyet tespit edilmiştir. Giresun Adası Bizans Dönemi iskeletlerinin paleodemografik yapısı Doç. Dr. Ertekin Doksanaltı ve Yrd. Doç. Dr. Seda Karaöz Arıhan tarafından çalışılmıştır. Bireylerin cinsiyetleri belirlenirken pelvis kemiği ve kafatası kemiklerindeki cinsiyet karakterlerinden yararlanılmıştır ve Emel Acar'ın 2015 yılında sunduğu yüksek lisans tezinde bilgiler verilmiştir (Acar, 2015). Eski Van Şehri ve Höyüğü Kazısından çıkartılan bireylerin cinsiyeti Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi bölümündeki öğretim üyeleri tarafından pelvis ve kafatasının osteolojik ve morfolojik özellikleri ile uzun kemiklerin uzunlukları hesaplanarak yapılmıştır. Van Kalecik Köyü (Kalecik/Çatak/Ablagens) kazısından çıkartılmış olan bireylerin mesial-distal ve bukkolingual diş boyutları analiz edilerek Araştırma Görevlisi Hakan Yılmaz tarafından cinsiyetleri belirlenmiştir. Beybağ Mevkii (Muğla) Kazısından çıkartılmış olan iskeletler, Yrd. Doç. Dr. Seda Karaöz Arıhan'ın 2013 yılında sunmuş olduğu doktora tezinde çalışılmıştır. Bu bireylerin cinsiyeti, pelvis ve kafatası morfolojileri kullanılarak tespit edilmiştir (Arıhan, 2013).

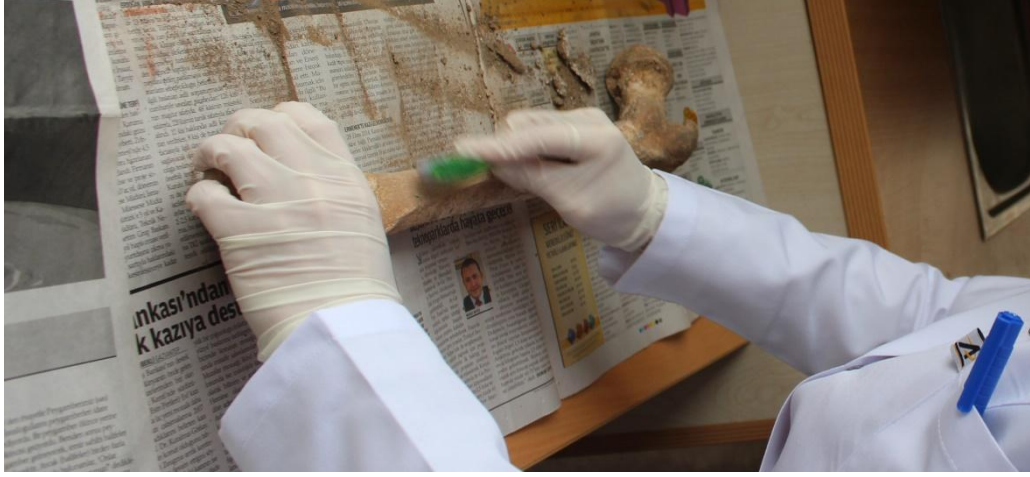
2.3.1. Dekontaminasyon İşlemleri

Moleküler çalışmalar, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı, DNA Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Kontaminasyon olmaması için örneklerin temizleneceği alan çamaşır suyu ile temizlenmiştir. Çalışılacak örneklerden bir kısmı, DNA çalışılacağı bilindiği için antropolojik incelemeler yapılmadan laboratuvara getirilmiştir. Diğer örneklerin antropolojik incelemeleri

laboratuvara gelmeden önce yapıldığı için kontaminasyon olasılığının yüksek olması göz önünde bulundurularak temizleme işlemleri çok daha dikkatli bir şekilde yapılmıştır.

2.3.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Dekontaminasyon İşlemi

Dekontaminasyon işlemleri Watt (2005) tarafından önerilen yöntemlerin kombinasyonu şeklinde yapılmıştır. Çalışılacak olan örneklerden femurun baş kısımları kullanılmayacağı için temizlenmeye alınmamıştır. Femur kemiğinin distal kısmı öncelikle kaba topraklardan fırça ile uzaklaştırılmıştır ve daha sonra zımpara ile dış yüzeyi temizlenmiştir (Şekil-17a,b). Dış yüzeyi pürüzlü olduğu için zımparalanamayan timpanik kemikler ile zımparalama işleminin yeterli görülmediği femur kemiklerinin dış yüzeyi el frezesi ile temizlenmiştir (Şekil-18). Femur ve timpanik kemikler, Mikrocid AF ile dezenfekte edilip kuruduktan sonra her iki tarafı 5 dk. olacak şekilde UV'de (245 nm) bekletilmiştir. Fiziksel temizlik işlemleri tamamlandıktan sonra kimyasal temizlik işlemine geçilmiştir. Bu aşamada Rohland ve Hofreiter'in (2007) çalışmalarından yararlanılmıştır. Distile su ile SDS çözeltisi hazırlanmıştır ve her örnek için ayrı kullanılan temiz diş fırçası ile timpanik kemikler ve femur kemiğinin distal kısmı temizlenmiştir (Şekil-19a,b). Kemiklerin her iki tarafı 5 dakika olacak şekilde UV'de bekletilmiştir (Şekil-20). Diş örneklerinde fiziksel temizlik yapılmamıştır. Diş örneklerinin dış yüzeyi femur ve timpanik kemiklerde olduğu gibi diş fırçası ile SDS çözeltisi hazırlanarak temizlenmiştir ve UV ışınının altında 5 dakika bekletilmiştir.



Şekil-17a Femur kemiğinin dış kısmında bulunan kaba topraklar fırça ile uzaklaştırılmıştır



Şekil- 17b Femur kemiğinin dış yüzeyi zımpara ile temizlenmiştir



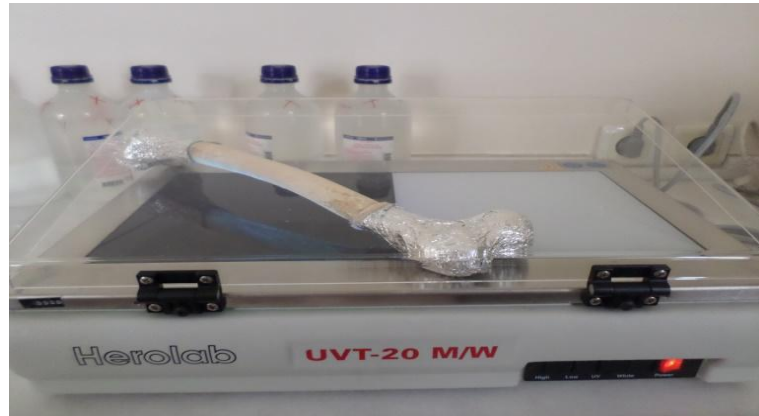
Şekil-18 Zımparalama işleminin yetersiz görüldüğü durumda femur kemiğinin dış kısmı el frezesi ile temizlenmiştir



Şekil-19a Femur kemiğinin distal kısmını SDS çözeltisi kullanılarak kimyasal temizliği yapılmıştır



Şekil-19b Dekontaminasyon işlemlerinde her örnek için ayrı diş fırçası kullanılmıştır



Şekil-20 Fiziksel ve kimyasal dekontaminasyon işlemlerinden sonra örnekler UV ışını altında bekletilmiştir

2.3.2. Pulverizasyon (Toz haline getirme)

Pulverizasyon aşamasına geçmeden önce femur örneklerinden demir testere ile küçük parçalar halinde kesit alınmıştır (Şekil-21). Her bir örnek için ayrı testere ucu kullanılmıştır ve kesimden önce demir testesinin uçları UV’de 10 dk. bekletilmiştir. Kesit alma sadece femur kemikleri için yapılmıştır, timpanik kemiklerde kesit alma işlemi yapılmamıştır. Kesit alma işlemi, kemik üzerinde kırık ve çatlak gözlenmeyen kısımdan yapılmıştır. Kesit alınan kemik örneklerinden bazılarının dış kısımlarında kalan kaba partiküller el frezesi ile uzaklaştırılmıştır. (Şekil-22). Kesit alınan parçaların hassas terazide tartımı yapıldıktan sonra Mikroizid AF ile dezenfekte edilmiştir (Şekil-23) ve kuruduktan sonra UV’de 10 dakika bekletilmiştir. Porselen havan ve kesilmiş olan kemik parçaları buzdolabında -85 °C de 3 saat bekletilmiştir. Örnekler sıvı nitrojen ile porselen havan içinde toz haline getirilerek, (Şekil-24) 1,5 ml epondorf tüplere alınmıştır. Çalışılan femur ve timpanik kemiklerinden bazıları ise sıvı nitrojene gerek kalmadan porselen havan içerisinde toz haline getirilmiştir (Şekil-25).



Şekil-21 Femur kemiğinden kesit alınması



Şekil- 22 Demir testere ile kesit alınan femur kemiğinin dış yüzeyindeki kaba partiküller el frezesi ile uzaklaştırılmıştır



Şekil- 23 Kesilmiş olan femur kemiği Mikrozyd AF kullanılarak dezenfekte edilmiştir



Şekil-24 Femur kemiklerinden bazıları sıvı azot kullanılarak toz haline getirilmiştir



Şekil-25 Timpanik ve femur kemiklerinin bazıları sıvı azot kullanılmadan toz haline getirilmiştir

2.3.3. Dekalsifikasyon

Toz haline gelmiş olan femur ve timpanik kemikler, 50 ml falkon tüplere aktarılarak, hassas terazide tartımı yapıldıktan sonra (Şekil-26) üzerine yaklaşık 30 ml kadar hazırlanmış olan 0,5 M (pH 7,5) EDTA eklenerek Cemper-Kiesslich'in (2014) önerdiği şekilde dekalsifikasyon işlemleri yapılmıştır (Şekil-27). Falkon tüpün kapağı parafilm ile sarılarak, 4°C' de buzdolabında çalkalayıcının içine konulmuş (Şekil 28) ve inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün 3000 rpm de 15 dk. santrifuj edilmiştir. Üst faz pipet ile çekilerek atılmıştır ve 0,5 M (pH 7,5) EDTA eklenerek tekrardan inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem 2 gün yapılmıştır. 3. gün sonunda distile su ile yıkama yapılarak dekalsifikasyon işlemi tamamlanmıştır (Şekil-29).



Şekil- 26 Toz halindeki kemiğin terazide tartılması



Şekil-27 Toz hale getirilmiş olan kemik örneklerine EDTA solüsyonu eklenmiştir.



Şekil-28 Dekalsifikasyon aşaması



Şekil-29 Dekalsifikasyon işlemi tamamlanmış örnekler

2.3.4.DNA İzolasyonu

Dekalsifikasyonu tamamlanan örneklere iki farklı DNA izolasyon yöntemi uygulanmıştır. Diş örneklerinden elde edilen pulpadan DNA izolasyonu yapılacağı için ve pulpa miktarı çok az olduğu için sadece tek bir yöntem ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Dişlerden fenol/kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Femur, fibula ve timpanik kemiklerden fenol/kloroform ve QIAGEN forensic kit ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Fenol/ kloroform yöntemi Barnett ve Larson'ın (2012) uyguladığı yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır.

2.3.4.1. Fenol Kloroform DNA İzolasyon Yöntemi

1. Dekalsifikasyonu tamamlanan örnekler 2 ml.'lik ependorfa aktarılarak üzerine TE Buffer, NaCl, Triton X 100, Proteinase K ve Solüsyon D (Denatürasyon Solüsyonu: GuSCN, N-Lauryoylsarcosine, Na-Sitrat karışımı) eklendi.
2. Örnekler 1 gece 56°C'de bekletildi.

3. Ertesi gün çalışılacak örneklere Proteinase K ve Solüsyon D eklendi.
4. Örnekler 1 gece 56°C'de bekletildi.
5. Ertesi gün örnekler üzerine eşit hacimde fenol kloroform eklenerek karıştırıldı.
6. 12500 rpm'de santrifüj edildi.
7. Üst kısım temiz bir ependorfa alınarak eşit hacimde soğuk isopropil alkol ve 1/10 oranında Na-Acetate eklendi.
8. -20 °C'de 5 saat bekletildi.
9. 14000 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi ve üst kısım pipet ile atıldı.
10. Örnekler üzerine %70'lik soğuk etanol eklendi ve 14000 rpm'de santrifüj edildi.
11. Etanol pipet ile dikkatli bir şekilde atıldı.
12. 37 °C'de kurumaya bırakıldı. Kuruyan pellet 20 µl su ile çözdürüldü ve -20°C'de muhafaza edildi.

2.3.4.2. QIAGEN Kemik ve Diş Protokolüne Göre DNA İzolasyon Yöntemi

1. Fiziksel ve kimyasal temizliği yapılmış olan kemik örneklerinden elde edilen kemik tozu 100 mg dan fazla olmayacak şekilde mikrosantrifüj tüpüne alındı.
2. Üzerine 360 µl Buffer ATL ve 20 µl Proteinase K eklenerek, 56°C'de inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon süresi sona erdikten sonra 300 µl Buffer AL eklenerek 10 saniye karıştırıldı.
4. 70 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve her 3 dakikada örnekler karıştırıldı.

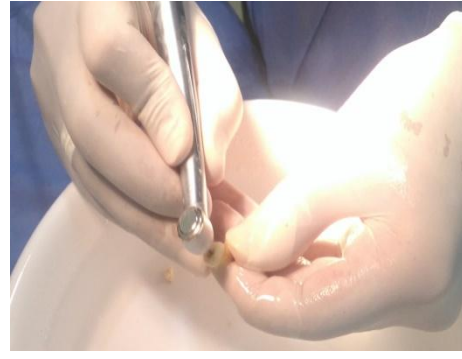
5. 14000 rpm 'de 1 dakika santrifuj edildi ve süpernatant 1,5 ml lik mikrosantrifuj tüpüne alındı.
6. 150 µl etanol (%96-100) eklendi ve 15 saniye karıştırıldı.
7. Santrifuj edilen örnekler, kit içerisinde bulunan tüplere aktarıldı.
8. 8000 rpm 'de 1 dakika santrifuj edildikten sonra alt kısımdaki sıvı atılarak tüpe yeniden filtre yerleştirildi.
9. 700 µl Buffer AW2 eklenerek 8000 rpm' de 1 dakika santrifuj edildi. Alt kısmı atıldı ve filtre tüpe yerleştirildi.
10. 700 µl etanol (%96-100) eklenerek 8000 rpm' de 1 dakika santrifuj edildi. Alt kısımdaki sıvı döküldü ve filtre tüpe yerleştirildi.
11. 14000 rpm' de 3 dakika santrifuj edildi.
12. Filtre 1,5 ml lik santrifuj tüpüne yerleştirildi ve 56°C'de 3 dakika santrifuj edildi.
13. 20 µl distile su ile sulandırıldı.
14. Oda ısısında (5-25°C) 1 dakika bekletildikten sonra 14000 rpm' de 1 dakika santrifuj edildi.
15. Elde edilen DNA -20°C 'de muhafaza edildi.

2.3.4.3. Dişlerden DNA İzolasyonu

Dişlerden elde edilen pulpa miktarları az olduğu için tek bir DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır ve fenol/kloroform izolasyon yöntemi tercih edilmiştir. Dişlerde kimyasal temizlik işlemi yapılmıştır ve daha sonrasında Özel Tunca Diş Kliniği'nde dişlerden pulpa çıkarılma işlemi yapılmıştır. Dişler üzerinde yuvarlak elmas frez (W&H aeratör) kullanılarak giriş boşluğu hazırlanmıştır. Boşluk açıldıktan sonra uzun silindirik elmas frez (W&H aeratör) kullanılarak pulpa öz

odası açılmıştır. Antik diş örneklerinde dekalsifikasyonun çok olmasından dolayı öz odasından pulpa çıkartılırken tirnef ile birlikte kanal eğeleri de (h-tipi) kullanılmıştır. Dişlerden pulpa elde edildikten sonra (Şekil-30) 1,5 ml'lik steril tüplere alınarak hassas terazide tartımları yapılmıştır. Pulpa örneklerine izolasyon aşamasından önce dekalsifikasyon işlemi yapılmıştır. Pulpa örnekleri üzerine 0,5 M 500 µl EDTA (pH 7,5) eklenerek 4°C'de çalkalayıcıda 20 dk. inkübasyona bırakılmıştır. 3000 rpm' de 15 dakika santrifuj edildikten sonra üst kısımdaki sıvı pipet ile çekilerek atılmıştır ve EDTA'nın uzaklaştırılması için distile su ile yıkama yapılmıştır.

Dekalsifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra pulpaların üzerine; TE Buffer, Solüsyon D, Proteinase K, NaCl, Triton X 100 eklenerek 56°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün pulpa örneklerinin üzerine Solüsyon D ve Proteinase K eklenerek 5 saat 56°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürecinden sonra örneklerin üzerine eşit hacimde fenol kloroform izoamil alkol eklenmiştir ve karıştırıldıktan sonra 12500 rpm de 10 dk. santrifuj edilmiştir. Üst kısım steril 1,5 ml'lik yeni bir tüpe alınarak üzerine eşit hacimde isopropil alkol ve 1/10 oranında NaAsetat eklenmiştir ve -20 °C'de 5 saat bekletilmiştir. Daha sonra 14000 rpm de 20 dk. santrifuj edildikten sonra sıvı kısım dökülerek, %96'lık etanol ile yıkama yapılmıştır ve örnekler kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan pellet 20 µl distile su ile çözdürüldükten sonra ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil-30 Dişlerden pulpa çıkartılma işlemi

2.3.5. DNA'nın Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi

DNA'nın temizliği ve miktarı spektrofotometre kullanılarak değerlendirilir. Bu amaçla 260/280 nm'lerdeki absorbans değerlerinin ölçülebildiği bir UV spektrofotometreye ihtiyaç duyulmaktadır. DNA'nın temizliği için $A(260/280)$ ve $A(260/230)$ değerlerine bakılır. Çünkü DNA 260 nm.'de, protein 280 nm.'de ve fenol 230 nm.'de dalga boylarında pik (en yüksek değer) yapmaktadır. $A(260/280)$ değeri DNA örnekleri için 1,8, RNA örnekleri için ise 2,0 değerinde olmalıdır. $A(260/230)$ değeri 1,8-2,2 arasında olmalıdır. DNA izolasyonundan sonra örneklerimizin miktar ve kalite tayinini belirlemek için Nanodrop ND-1000 spektrofotometre cihazı kullanılarak DNA miktarı ve saflığı belirlenmiştir.

2.3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

DNA elde edilen kemik ve diş örneklerinin amplifikasyonu GeneAmp PZR Sistemi 9700 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR aşamasında negatif ve pozitif kontroller kullanılmıştır. QIAGEN Investigator Argus X-12, X-STR (Amelogenin ve DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10079, DXS10101, DXS10103, DXS10134, DXS10135, DXS10146, DXS10148, HPRTB) kiti kullanılarak PZR mixi hazırlanmıştır.

PZR Mixi

Reaksiyon Mixi	5 μ l
Primer Mixi	2,5 μ l
Multi Taq2 DNA Polymerase	0,6 μ l
Su	12,9 μ l
DNA	4 μ l
Toplam Hacim	25 μ l

Hazırlana PZR karışımı aşağıdaki PZR şartlarındaki gibi çalıştırılmıştır.

PZR şartları

94 °C'de 4dk. (Denatürasyon)

96 °C'de 30 sn.	} 5 dōngü
63 °C'de 120 sn.	
72 °C'de 75 sn.	

94 °C'de	30 sn.	}	27 döngü
60 °C'de	120 sn.		
72 °C'de	75 sn.		
68 °C'de	65 sn.		(Son uzama)
10 °C'de	∞		

2.3.7.Kapiller Elektroforez

Amplifiye olan DNA örnekleri X-STR sistemini belirlemek için kapiller elektroforez cihazında (ABI Prism 310 Genetik Analiz Cihazı) analiz edilerek sonuçlar yorumlanmıştır. Kapiller elektroforez cihazında yürütme yapılmadan önce,

14 µl Formamid

0,5 µl DNA Size Standart 550 (BTO) QIAGEN

1 µl DNA örneği her bir örnek için hazırlanmıştır. Örnekler 95°C'de denatüre edildikten sonra cihaza yerleştirilmiştir. Elektroforez bittikten sonra Gene-Scan programı kullanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

2.3.8.Kontaminasyonu Engellemek İçin Yapılan Çalışmalar

Moleküler çalışmalarda kontaminasyon riski her zaman vardır. Dikkatli çalışılmadığı ve önlemler alınmadığı zaman bu durum, hem zaman kaybına hem de yanlış sonuçlar almamıza neden olur. Modern DNA örneklerinde bu risk her zaman var olduğu gibi antik DNA çalışmalarında kontaminasyon sorunu daha fazladır. Kontaminasyon riski laboratuvar ortamında olabileceği gibi laboratuvara gelmeden

önce de olabileceği için çalışmanın en başında bütün önlemler alınmalıdır. Bizim çalışmamızda kontaminasyonu engellemek için çeşitli önlemler alınmıştır.

- Çalışmamızda yer alan farklı kazı alanlarından gelen örnekler içinde Nysa kazısı ve Eski Van Şehri ve Höyüğü kazılarından çıkartılan örneklerden DNA analizinin yapılacağı bilindiği için, kazı sırasında eldivensiz hiçbir örnek toprak altından çıkarılmamıştır. Kazıdan iskelet çıkartılması sırasında eldiven ve maske kullanılmıştır. Her bir bireyin çıkartılması sırasında eldivenler değiştirilmiştir. Çapraz kontaminasyonu engellemek için kazıdan çıkartılan farklı bireyler ayrı ayrı kilitli poşetlere koyulmuştur. Antik DNA çalışmalarında en çok femur ve diş kullanıldığı için kazılardan çıkartılan femur ve dişler özellikle daha dikkatli bir şekilde çıkartılarak kilitli poşetlere koyulmuştur.
- Yapılan her aşamada eldiven, bone, gözlük ve maske kullanılmıştır. Femur örneklerinden kesit alma işleminde her bir örnek için ayrı testere ucu kullanılmıştır ve bu uçlar kullanılmadan önce UV’de 10 dakika bekletilmiştir.
- Pulverizasyon aşamasında kullanılacak olan porselen havan ve tokmaklar kullanılmadan önce otoklavlanmıştır.
- Kemik tozları için kullanılacak olan 50 ml’lik falcon tüpler ve ependorflar kullanılmadan önce otoklavlanmıştır.
- Çalışmada kullanılacak olan çözeltiler modern DNA çalışmalarında kullanılan çözeltilerle aynı olmasına rağmen aynı çözeltiler kullanılmamıştır ve antik DNA çalışması için ayrı olarak hazırlanıp, muhafaza edilmiştir.

- DNA ekstraksiyonu ve PZR ayrı odalarda yapılmıştır. DNA ekstraksiyonu öncesi kullanılacak olan odanın ve güvenlik kabininin UV'si çalıştırılarak ortam steril edilmiştir.
- DNA izolasyonu ve PZR işlemlerinde kullanılacak olan pipet uçları, ependorf tüpler ve PZR tüpleri otoklavlanmıştır.



BÖLÜM:3 BULGULAR

3.1. Dekontaminasyon İşlemleri Sırasında Gözlemlenen Bulgular

Farklı kazı bölgelerinden çıkartılan toplamda 10 femur, 1 fibula, 5 timpanik ve 25 diş örneğinin DNA izolasyonlarının yapılabilmesi için öncelikle dekontaminasyon işlemleri yapılmıştır. Çalışma materyallerimizi oluşturan kemik ve diş örneklerinden bir kısmı aDNA çalışması yapılacağı bilindiği için hiçbir şekilde temizlenme yapılmadan laboratuvara gönderilmiştir. Bir kısmı ise laboratuvara gelmeden önce antropolojik çalışmaların yapılabilmesi için temizlenmiştir (Tablo-7). Fiziksel ve kimyasal dekontaminasyon işlemleri sırasında 1 ve 2 numaralı femur örneklerinin distal kısmında çatlak olduğu gözlemlenmiştir (Şekil-31a,b,c). 19 numaralı femur örneğinde antropolojik incelemeler sırasında kırık olduğu tespit edilmiştir (Şekil-32). 5 ve 6 numaralı mandibula parçalanmış ve üzerinde bulunan diş örneklerinde dekontaminasyon işlemleri sırasında diş köklerinin bir kısmında parçalanmalar ve aşınmalar olduğu için bu örnekler çalışmaya dâhil edilmemiştir (Şekil-33a, b). Timpanik kemiklerin ve 40 numaralı femur kemiğinin dış kısmı çok pürüzlü olduğu için (Şekil-34a, b) zımparalama işlemi yapılamamıştır. Bu örneklerin dış yüzeyi el frezesi ile temizlenmiştir.

Tablo-6 Kazıdan çıkartılan örneklerde gözlenen morfolojik bulgular

Örnek Numarası	Buluntu Türü	Kazı Bölgesi	Durum
1	Femur	Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü	Çatlak var Antropolojik çalışma yapılmamış
2	Femur	Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü	Çatlak var Antropolojik çalışma yapılmamış
3	Femur	Teos/İzmir	Antropolojik çalışma yapılmamış Sağlam
4	Femur	Teos/İzmir	Sağlam Antropolojik çalışma yapılmamış
5	Mandibula	Teos/İzmir	Antropolojik çalışma yapılmamış
6	Mandibula	Teos/İzmir	Antropolojik çalışma yapılmamış
7	Diş	Van Kalecik Köyü/ Ablagens	Antropolojik çalışma yapılmış
8	Diş	Van Kalecik Köyü/ Ablagens	Antropolojik çalışma yapılmış
9	Diş	Van Kalecik Köyü/ Ablagens	Antropolojik çalışma yapılmış
10	Diş	Van Kalecik Köyü/ Çatak	Antropolojik çalışma yapılmış
11	Diş	Van Kalecik Köyü/ Çatak	Antropolojik çalışma yapılmış
12	Diş	Van Kalecik Köyü/ Çatak	Antropolojik çalışma yapılmış
13	Diş	Van Kalecik Köyü/Kalecik	Antropolojik çalışma yapılmış
14	Diş	Van Kalecik Köyü/Kalecik	Antropolojik çalışma yapılmış
15	Diş	Van Kalecik Köyü/Kalecik	Antropolojik çalışma yapılmış
16	Diş	Van Kalecik Köyü/Kalecik	Antropolojik çalışma yapılmış
17	Femur	Giresun Adası	Sağlam Antropolojik çalışma yapılmamış
18	Mandibula	Giresun Adası	Antropolojik çalışma yapılmamış

Örnek Numarası	Buluntu Türü	Kazı Bölgesi	Durum
19	Femur	Giresun Adası	Ortadan ikiye kırılmış. Antropolojik çalışma yapılmış
20	Maxilla Mandibula	Giresun Adası	Antropolojik çalışma yapılmış
21	Maxilla Mandibula	Giresun Adası	Antropolojik çalışma yapılmış
22	Mandibula	Giresun Adası	Antropolojik çalışma yapılmış
23	Maxilla Mandibula	Giresun Adası	Antropolojik çalışma yapılmış
24	Timpanik Kemik	Nysa/Aydın	Antropolojik çalışma yapılmamış
25	Timpanik Kemik	Nysa/Aydın	Antropolojik çalışma yapılmamış
26	Timpanik Kemik	Nysa/Aydın	Antropolojik çalışma yapılmamış
27	Mandibula	Nysa/Aydın	Antropolojik çalışma yapılmamış
28	Mandibula	Nysa/Aydın	Antropolojik çalışma yapılmamış
29	Timpanik Kemik	Nysa/Aydın	Antropolojik çalışma yapılmamış
30	Fibula	Nysa/Aydın	Antropolojik çalışma yapılmamış
31	Femur	Nysa/Aydın	Antropolojik çalışma yapılmamış
32	Mandibula	Nysa/Aydın	Antropolojik çalışma yapılmamış
33	Diş	Giresun Adası	Antropolojik çalışma yapılmamış
34	Diş	Muğla /Beybağ	Antropolojik çalışma yapılmamış
35	Diş	Giresun Adası	Antropolojik çalışma yapılmamış
36	Diş	Giresun Adası	Antropolojik çalışma yapılmamış
37	Femur Diş Kafatası	Muğla/Beybağ	Antropolojik çalışma yapılmamış Yarım, parçalanmış
38	Femur	Giresun Adası	Antropolojik çalışma yapılmış. Çok sağlam
39	Diş	Giresun Adası	Antropolojik çalışma yapılmamış
40	Femur	Giresun Adası	Antropolojik çalışma yapılmış. Çok sağlam



Şekil-31a Fiziksel ve kimyasal dekontaminasyon işlemleri sırasında Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü Kazısından çıkartılmış olan 1 numaralı femur kemiğinde çatlak gözlemlenmiştir.



Şekil-31b Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü Kazısından çıkartılan 2 numaralı femur kemiğinde çatlak olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil-31c Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü Kazısından çıkartılan 2 numaralı femur kemiğinin fiziksel ve kimyasal dekontaminasyon işlemleri sonrasında belirgin halde çatlak olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil-32 Giresun Adası Kazısından çıkartılan 19 numaralı femur kemiğinde kırık olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil-33a Teos Antik Kenti Kazısından çıkartılan 6 numaralı mandibula parçalanmıştır ve üzerinde bulunan dişlerde aşırı derecede aşınma olduğu için pulpa çıkartılamayacağı için çalışmaya dâhil edilmemiştir



Şekil-33b Teos Antik Kenti Kazısından çıkartılan 5 numaralı mandibula örneği kırılmış ve bazı dişler çene içerisinde gömülü kalmıştır. Diş köklerinde parçalanma ve aşınmalar olduğu için çalışmaya dahil edilmemiştir



Şekil-34a Nysa Antik Kenti Kazısından çıkartılan timpanik kemikler



Şekil-34b Giresun Adası Kazısından çıkartılan 40 numaralı femur kemiği

3.2. Pulverizasyon (Toz Hale Getirme) Aşamasında Gözlemlenen Bulgular

Timpanik ve femur kemikleri porselen havanda toz haline getirilmiştir. 2 numaralı femur kemiğinde çatlak olduğu gözlemlenmiştir. Toz haline getirilme sırasında oldukça sert ve sağlam olduğu görülmüş ve sıvı nitrojen kullanılarak toz hale getirilmiştir. 4 numaralı femur kemiği, çok sağlam olduğu için sıvı nitrojen kullanılarak toz haline getirilmiştir. Diğer femur ve timpanik kemikler ise sıvı azot kullanılmadan porselen havan içerisinde kolay bir şekilde toz haline getirilmiştir. Dişlerden DNA izolasyonu yapabilmek için pulpa çıkarılmıştır. Teos Kazısından çıkartılan mandibula üzerinde bulunan diş örnekleri çalışmaya alınmamıştır.

Van Kalecik Köy /Kalecik Kazısından çıkartılan 14 ve 16 numaralı dişlerin kökünde parçalanma olduğu için pulpa elde edilememiştir (Şekil-35). 15 numaralı diştten ise pulpa elde edilememiştir. Tablo 8’de diğer diş örneklerinden elde edilen pulpa miktarları verilmiştir.



Şekil-35 Van Kalecik Köyü/Kalecik Kazısından çıkartılan dişler

3.3. DNA İzolasyonları Sonucunda Elde Edilen DNA’ların Miktar Tayini

Fenol/koroform ve QIAGEN Forensic Kit kullanılarak femur ve timpanik kemiklerinin DNA izolasyonu yapılmıştır. Dişlerden elde edilen pulpa örneklerine fenol/kloroform yöntemi uygulanmıştır. QIAGEN Forensic Kit yönteminin prosedürü gereğince kemik örneklerine dekalsifikasyon işlemi uygulanmamıştır. DNA izolasyonu yapılan örneklerin DNA miktar tayini ve DNA saflık derecesi Nanodrop N-100 spektrofotometre cihazında ng/μl olarak ölçülmüştür. Fenol/kloroform yöntemine göre elde edilen DNA’ların miktar tayini ve saflık dereceleri tablo-8’de, QIAGEN Forensic Kit kullanılarak elde edilen DNA ‘ların miktar tayini ve saflık dereceleri de tablo’9 da gösterilmiştir.

Tablo-7 Diş, fibula, femur ve timpanik kemiklerinin toz halindeki miktarları ve fenol/kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu sonucundaki DNA miktar tayinleri

Örnek Numarası	Miktar ng/ µl	260/280 nm	260/230 nm	DNA İzolasyonu için Kullanılan Kemik Tozu ve Pulpa Miktarı (gr)	DNA İzolasyon Yöntemi
1	19.7	1.60	0.78	0.55	Fenol/Kloroform
2	20.1	1.70	0.89	0.33	Fenol/Kloroform
3	20.9	1.77	0.23	0.42	Fenol/Kloroform
4	29.4	1.56	0.06	0.35	Fenol/Kloroform
5	Çalışmaya Dâhil Edilmedi				
6					
7	12.7	1.72	0.09	0.05	Fenol/Kloroform
8	12.5	1.34	0.10	0.08	Fenol/Kloroform
9	3.6	1.72	0.05	0.09	Fenol/Kloroform
10	2.2	1.78	0.03	0.04	Fenol/Kloroform
11	5.6	1.18	0.09	0.05	Fenol/Kloroform
12	16.8	1.64	0.04	0.08	Fenol/Kloroform
13	29.7	1.44	0.10	0.05	Fenol/Kloroform
14					
15	Pulpa Elde Edilemedi				
16					
17	5.4	1.22	0.45	0.24	Fenol/Kloroform
18	17.4	1.56	0.06	0.07	Fenol/Kloroform
19	56.7	1.42	0.12	0.30	Fenol/Kloroform
20	37.9	1.45	0.52	0.17	Fenol/Kloroform
21	44.9	1.56	0.09	0.08	Fenol/Kloroform
22	17.6	1.45	0.08	0.13	Fenol/Kloroform
23	77.7	1.34	0.27	0.14	Fenol/Kloroform
24	9.6	1.60	0.02	0.28	Fenol/Kloroform
25	37.9	1.41	0.07	0.20	Fenol/Kloroform
26	62.3	1.50	0.20	0.38	Fenol/Kloroform
27	45.2	1.37	0.63	0.07	Fenol/Kloroform
28	3.4	1.22	0.04	0.05	Fenol/Kloroform
29	12.4	1.41	0.04	0.34	Fenol/Kloroform
30	143.2	1.32	0.21	0.41	Fenol/Kloroform
31	77.7	1.29	0.19	0.33	Fenol/Kloroform
32	26.3	1.13	0.032	0.06	Fenol/Kloroform
33	66.0	1.39	0.45	0.08	Fenol/Kloroform
34	15.2	1.76	0.07	0.04	Fenol/Kloroform
35	5.3	1.42	0.03	0.13	Fenol/Kloroform
36	18.5	1.33	0.10	0.15	Fenol/Kloroform
37 timpanik	142.2	1.38	0.22	0.38	Fenol/Kloroform
37 femur	2.9	2.11	0.23	0.33	Fenol/Kloroform
37 diş	19.5	1.49	0.09	0.06	Fenol/Kloroform
38	46.1	1.29	0.33	0.42	Fenol/Kloroform
39	5.09	2.09	0.10	0.04	Fenol/Kloroform
40	8.5	1.41	0.05	0.42	Fenol/Kloroform

Tablo-8 QIAGEN Forensic Kit ile DNA izolasyonu yapılan fibula, femur ve timpanik kemiklerinin DNA miktar tayini

Örnek Numarası	Kullanılan örnek miktarı	Miktar ng/ µl	260/280 Nm	260/230 nm	DNA İzolasyon Yöntemi
1	45mg	2.9	1.22	0.3	QIAGEN Forensic Kit
2	30mg	2.6	1.21	0.36	QIAGEN Forensic Kit
3	30mg	3.6	1.87	0.31	QIAGEN Forensic Kit
4	42mg	4.4	1.80	0.34	QIAGEN Forensic Kit
17	12mg	10.3	1.45	0.07	QIAGEN Forensic Kit
19	60mg	4.0	1.86	0.27	QIAGEN Forensic Kit
24	60mg	5.9	1.95	0.5	QIAGEN Forensic Kit
25	90mg	11.3	1.27	0.36	QIAGEN Forensic Kit
26	35mg	6.3	1.74	0.5	QIAGEN Forensic Kit
29	53mg	4.3	1.73	0.39	QIAGEN Forensic Kit
30	40mg	6.1	1.30	0.48	QIAGEN Forensic Kit
31	38mg	4.3	1.37	0.49	QIAGEN Forensic Kit
37(timpanik)	20mg	4.1	1.21	0.28	QIAGEN Forensic Kit
37 (femur)	70mg	2.1	1.75	0.23	QIAGEN Forensic Kit
38	40mg	6.5	2.14	0.32	QIAGEN Forensic Kit
40	60mg	7.0	1.90	0.24	QIAGEN Forensic Kit

3.4. Dekalsifikasyon İşlemleri, DNA Miktar Tayini ve PZR Değerlendirilmesi

Timpanik ve femur kemiklerinin hepsi dekalsifiye edildikten sonra fenol/kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Dekalsifikasyon, 3 gün sonunda tamamlanmıştır. Ancak PZR sonrasında bazı örneklerden (37 numaralı femur ve timpanik kemik, 40 numaralı femur kemiği ile 24, 25, 26, 29 numaralı timpanik kemiği) sonuç alınmadığı için örneklerden dekalsifiye edilmeden DNA izolasyonunun yapılmasına karar verilmiştir. Ayrıca 2, 4 ve 17 numaralı femur kemikleri dekalsifiye edilmeden DNA izolasyonu yapılmıştır. Tablo-9'da dekalsifikasyon aşamalarına göre DNA miktar ve saflığı ile PZR sonuçları birlikte verilmiştir.

Tablo-9 Sonuç alınamayan örneklerin farklı dekalsifikasyon aşamalarındaki DNA miktar tayini ve PZR sonuçları

40 Numaralı Femur Kemigi	Dekalsifikasyonu Tamamlanan	Dekalsifikasyonun 2.Günü	Dekalsifikasyonu Yapılmayan
260/280nm	1.41	1.56	1.09
260/230nm	0.05	0.13	0.05
Miktar ng/ µl	8.5	65.0	72.1
PZR Sonucu	-	+	+

37 Numaralı Femur Kemigi	Dekalsifikasyonu Tamamlanan	Dekalsifikasyonun 2.Günü	Dekalsifikasyonu Yapılmayan
260/280nm	2.11	1.47	1.45
260/230nm	0.23	0.04	0.05
Miktar ng/ µl	2.9	6.6	18.1
PZR Sonucu	-	-	-

29 Numaralı Timpanik Kemigi	Dekalsifikasyonu Tamamlanan	Dekalsifikasyonun 2.Günü	Dekalsifikasyonu Yapılmayan
260/280nm	1.41	1.63	1.36
260/230nm	0.04	0.84	0.12
Miktar ng/ µl	12.4	65.4	48.5
PZR Sonucu	-	+	+

24 Numaralı Timpanik Kemigi	Dekalsifikasyonu Tamamlanan	Dekalsifikasyonu Yapılmayan
260/280nm	1.60	1.54
260/230nm	0.02	0.14
Miktar ng/ µl	9.6	94.3
PZR Sonucu	-	+

25 Numaralı Timpanik Kemigi	Dekalsifikasyonu Tamamlanan	Dekalsifikasyonu Yapılmayan
260/280nm	1.41	1.59
260/230nm	0.07	0.17
Miktar ng/ µl	37.9	84.7
PZR Sonucu	-	+

26 Numaralı Timpanik Kemigi	Dekalsifikasyonu Tamamlanan	Dekalsifikasyonu Yapılmayan
260/280nm	1.5	1.55
260/230nm	0.2	0.35
Miktar ng/ µl	62.3	67.1
PZR Sonucu	-	-

37 Numaralı Timpanik Kemiği	Dekalsifikasyonu Tamamlanan	Dekalsifikasyonu Yapılmayan
260/280nm	1.38	1.85
260/230nm	0.22	0.04
Miktar ng/ µl	142.2	21.0
PZR Sonucu	-	+

2 Numaralı Femur Kemiği	Dekalsifikasyonu Tamamlanan	Dekalsifikasyonu Yapılmayan
260/280nm	1.70	1.63
260/230nm	0.89	0.34
Miktar ng/ µl	20.1	29.4
PZR Sonucu	+	+

4 Numaralı Femur Kemiği	Dekalsifikasyonu Tamamlanan	Dekalsifikasyonu Yapılmayan
260/280nm	1.56	1.61
260/230nm	0.34	0.27
Miktar ng/ µl	29.4	125.4
PZR Sonucu	+	+
17 Numaralı Femur Kemiği	Dekalsifikasyon Tamamlanan	Dekalsifikasyon Yapılmayan
260/280nm	1.22	1.43
260/230nm	0.45	0.47
Miktar ng/ µl	5.4	28.3
PZR Sonucu	+	+

PZR'da amplifiye olan örnekler (+) olarak, PZR'da amplifiye olmayan örnekler (-) olarak gösterilmiştir.

3.5. DNA İzolasyon Yöntemlerinin ve PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Femur, fibula ve timpanik kemiklerinde farklı DNA izolasyon yöntemleri uygulanarak PZR yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Toplamda 16 örnekten iki yöntem ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Fenol/kloroform yöntemi ile elde edilen PZR sonucunda 14 örnekte amplifikasyon olduğu gözlemlenmiştir. QIAGEN Forensic Kit kullanılarak yapılan DNA izolasyonu sonucunda yapılan PZR'da ise 6 örnekte amplifikasyon olduğu belirlenmiştir (Tablo-10). PZR ve elektroforez işlemleri sonucunda 26 numaralı timpanik kemiğinde, 37 numaralı femur kemiğinde ve 9, 12, 13, 22, 34, 35, 36, 37 ve 39 numaralı diş örneklerinde amplifikasyon oluşmamıştır (Şekil-36). 21 numaralı diş örneğinde ise X allel düşmesi gözlemlenmiştir (Şekil-37). Çalışılan örnekler içinde dişi olan bireyler, X kromozomunda pik vermiştir (Şekil-38). Erkek olduğu tespit edilen bireyler X ve Y kromozomunda pik vermiştir (Şekil-39). Antropolojik incelemeler sonucunda cinsiyeti belirlenebilen örnekler ile moleküler çalışmalar sonucunda cinsiyeti tespit edilen örnekler karşılaştırılmıştır (Tablo-11).

Tablo-10 Fenol/Kloroform ve QIAGEN Forensic Kit yöntemi ile yapılan DNA izolasyonlarının PZR sonuçlarının karşılaştırılması

Örnek Numarası	Fenol/Kloroform Yöntemi PZR Sonucu	Qiagen Forensic Ki Yöntemi PZR Sonucu
1 (Femur)	+	+
2 (Femur)	+	+
3 (Femur)	+	-
4 (Femur)	+	-
17 (Femur)	+	-
19 (Femur)	+	+
24 (Timpanik)	+	-
25 (Timpanik)	+	+
26 (Timpanik)	-	-
29 (Timpanik)	+	+
30(Fibula)	+	+
31(Femur)	+	+
37(Timpanik)	+	-
37 (Femur)	-	-
38 (Femur)	+	-
40 (Femur)	+	-

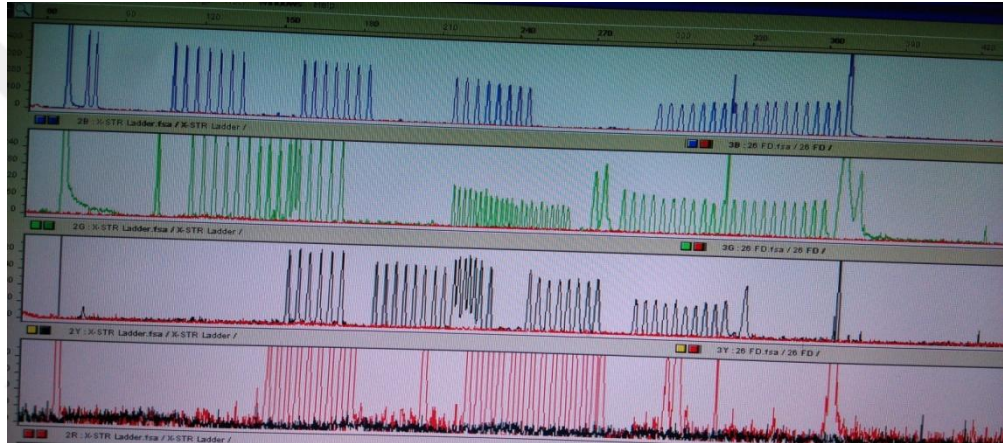
PZR’da amplifiye olan örnekler (+) olarak, PZR’da amplifiye olmayan örnekler (-) olarak gösterilmiştir.

Tablo-11 Moleküler çalışmalar sonucunda belirlenen cinsiyetin morfolojik cinsiyet tespiti ile karşılaştırılması

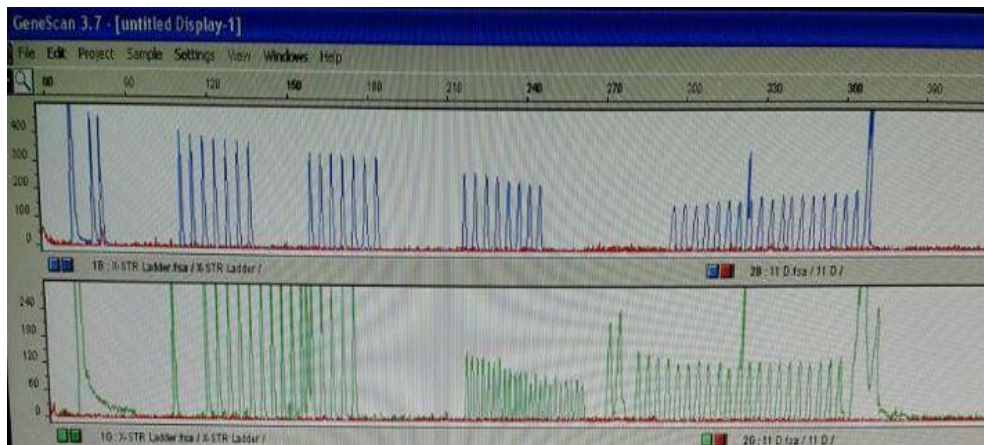
Örnek Numarası	Moleküler Bulgu	Morfolojik Cinsiyet Tayini	Örnek Türü	Kazı Alanı
1	DİŞİ	DİŞİ	Femur	Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü
2	ERKEK	ERKEK	Femur	Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü
3	ERKEK	Belirlenemedi	Femur	Teos/İzmir
4	ERKEK	Belirlenemedi	Femur	Teos/İzmir
5	--	Belirlenemedi	Mandibula	Teos/İzmir
6	--	Belirlenemedi	Mandibula	Teos/İzmir
7	ERKEK	ERKEK	Diş	Van Kalecik Köyü/ Ablagens
8	ERKEK	ERKEK	Diş	Van Kalecik Köyü/ Ablagens
9	Belirlenemedi	ERKEK	Diş	Van Kalecik Köyü/ Ablagens
10	DİŞİ	ERKEK	Diş	Van Kalecik Köyü/ Çatak
11	ERKEK	ERKEK	Diş	Van Kalecik Köyü/ Çatak
12	Belirlenemedi	ERKEK	Diş	Van Kalecik Köyü/ Çatak
13	Belirlenemedi	ERKEK	Diş	Van Kalecik Köyü/ Kalecik
14	--	ERKEK	Diş	Van Kalecik Köyü/ Kalecik
15	--	ERKEK	Diş	Van Kalecik Köyü/ Kalecik
16	--	ERKEK	Diş	Van Kalecik Köyü/ Kalecik
17*	DİŞİ	ERKEK	Femur	Giresun Adası
18*	DİŞİ	ERKEK	Mandibula üzerindeki diş	Giresun Adası
19**	DİŞİ	ERKEK	Femur	Giresun Adası
20**	DİŞİ	ERKEK	Mandibula üzerindeki diş	Giresun Adası
21	ERKEK	ERKEK	Mandibula üzerindeki diş	Giresun Adası
22	Belirlenemedi	DİŞİ	Mandibula üzerindeki diş	Giresun Adası
23	DİŞİ	DİŞİ	Mandibula üzerindeki diş	Giresun Adası
24	ERKEK	Belirlenemedi	Timpanik	Nysa/Aydın
25	DİŞİ	Belirlenemedi	Timpanik	Nysa/Aydın
26	Belirlenemedi	Belirlenemedi	Timpanik	Nysa/Aydın
27	DİŞİ	Belirlenemedi	Mandibula üzerindeki diş	Nysa/Aydın
28	ERKEK	Belirlenemedi	Mandibula üzerindeki diş	Nysa/Aydın
29	ERKEK	Belirlenemedi	Timpanik	Nysa/Aydın
30	ERKEK	Belirlenemedi	Fibula	Nysa/Aydın
31	ERKEK	Belirlenemedi	Femur	Nysa/Aydın
32	DİŞİ	Belirlenemedi	Mandibula üzerindeki Diş	Nysa/Aydın

Örnek Numarası	Moleküler Bulgu	Morfolojik Cinsiyet Tayini	Örnek Türü	Kazı Alanı
33	ERKEK	ERKEK	Diş	Giresun Adası
34	Belirlenemedi	DİŞİ	Diş	Beybağ/Muğla
35	Belirlenemedi	DİŞİ	Diş	Giresun Adası
36	Belirlenemedi	DİŞİ	Diş	Giresun Adası
37	DİŞİ Belirlenemedi Belirlenemedi	DİŞİ	Timpanik Diş Femur	Beybağ/Muğla
38***	DİŞİ	ERKEK	Femur	Giresun Adası
39***	Belirlenemedi	ERKEK	Diş	Giresun Adası
40	DİŞİ	DİŞİ	Femur	Giresun Adası

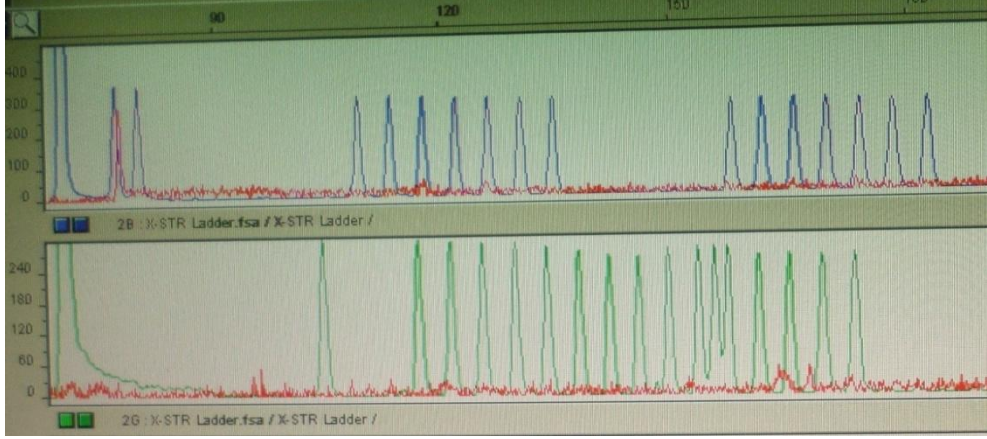
Pulpa elde edilemeyen diş örnekleri (--) şeklinde belirtilmiştir. 17 ve 18* numara aynı bireye ait femur ve mandibula örneğidir. 19** ve 20** aynı bireye ait femur ve maxilla-mandibula örneğidir. 38*** ve 39*** aynı bireye ait femur ve diş örneğidir.



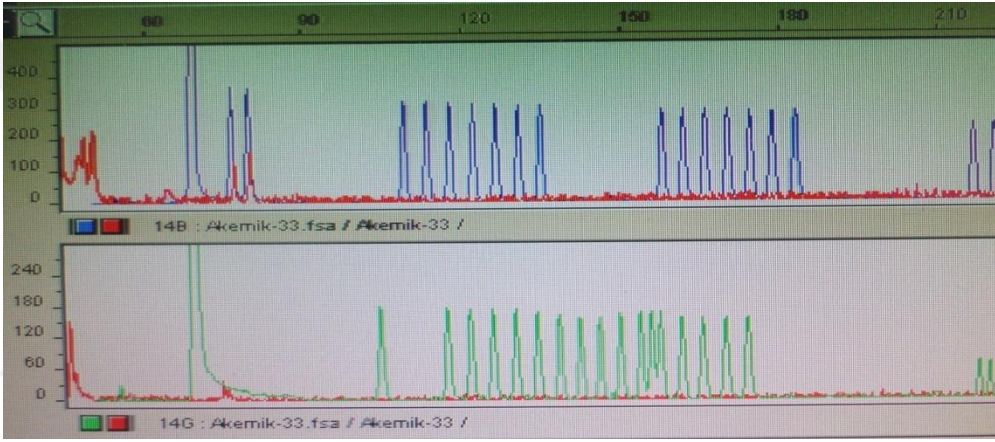
Şekil-36 X-STR sonucunda amplifikasyon oluşmayan örneklerden 26 numaralı timpanik kemiğinin elektroferez görüntüsü



Şekil-37 X-STR sonucunda 21 numaralı diş örneğinde sadece Y kromozomunda amplifikasyon oluştuğu için allel düşmesi gözlemlenmiştir.



Şekil- 38 X-STR sonucunda amelogenin gen bölgesinde amplifikasyon oluşmuştur ve 27 numaralı bireyin cinsiyeti dişi olarak belirlenmiştir.



Şekil-39 X-STR sonucunda amelogenin gen bölgesinde amplifikasyon oluşmuştur ve 33 numaralı bireyin cinsiyeti erkek olarak belirlenmiştir.

BÖLÜM:4 TARTIŞMA

Çalışmada materyal olarak 6 farklı kazı alanından çıkartılan fibula, timpanik ve femur kemikleri ile diş örnekleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan örneklerin bazılarının moleküler çalışmalardan önce antropolojik incelemeleri yapılmıştır. 2014 yılında Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü kazısından çıkartılan iki farklı bireye ait femur kemikleri Erken Dönem Orta Çağ olarak tarihlendirilmiştir. Bu örnekler laboratuvara getirilmeden önce moleküler çalışmalar yapılacağı bilindiği için kazıdan dikkatli bir şekilde çıkartılmış ve kazı alanında bekletilmeden laboratuvar ortamına ulaştırılmıştır. Teos Antik Kenti kazısına ait iki adet femur ve mandibula üzerindeki diş örnekleri, Teos Limanı Kurtarma kazısından 2014 yılında çıkartılmıştır. Femur ve mandibula örneklerinde antropolojik çalışmalar yapılmamıştır. Van Kalecik Köyü'nün 3 farklı lokasyonu olan Ablagens kazısından 2014 yılında çıkartılmış olan 3 farklı bireye ait diş örnekleri, Çatak kazısından 2007 yılında çıkartılmış olan 4 farklı bireye ait diş örnekleri ve Kalecik kazısından 2007 yılında çıkartılmış olan 3 farklı bireye ait diş örnekleri Erken Dönem Demir Çağ olarak tarihlendirilmiştir. Bu diş örnekleri, antropolojik incelemeleri yapıldıktan sonra laboratuvarımıza getirilmiştir. Muğla ili Beybağ Mevkii kazısından 2008 yılında çıkartılan bir bireye ait diş, timpanik ve yarım femur kemiği ile farklı bir bireye ait diş örneği Geç Bizans Dönemi olarak tarihlendirilmiştir. 2011-2012 yılları arasında Giresun Adası kazısından çıkartılan iki farklı bireye ait femur ve mandibula üzerindeki dişler ve 7 farklı bireye ait diş, 1 bireye ait femur örneği Orta Bizans Dönemi olarak tarihlendirilmiştir. 2015 yılında Nysa Antik Kenti'nde yapılan kazı ve restorasyon çalışmalarında kentin merkezi bir noktasında 1 çocuk, 1 genç ve 2

yetişkin minimum dört bireye ait iskelet kalıntıları Bizans Dönemi olarak tarihlendirilmiştir.

Farklı kazı alanlarından çıkartılan kemik ve diş örneklerinin DNA analizi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı DNA Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışmada farklı tarihi dönemlerden ve farklı iklimlerden ele geçirilen örneklerden DNA elde edilerek cinsiyetin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada toplu gömülerden çıkartılan ve cinsiyeti tam olarak belirlenemeyen örnekler ile bütün bir halde ele geçirilemeyen iskeletlerde olduğu için antik örneklerden başarılı bir şekilde DNA elde edilmesi ve devamında cinsiyet belirlenmesi adli bilimlerde önemli olduğu kadar antropoloji alanında da oldukça önemli olmaktadır.

Antik DNA çalışmaları modern DNA çalışmaları ile aynı prosedürlere sahip olmasına rağmen, aDNA çalışmalarında uygulanması ve dikkat edilmesi gereken bazı kriterler vardır. Ayrıca modern DNA çalışmalarına göre eski kemik örneklerinden DNA elde etmek daha zordur ve bunun için disiplinli ve sabırlı bir çalışma gereklidir. Arkeolojik kazılardan çıkartılan iskeletlerin, yapılabilecek moleküler çalışmaları da göz önünde bulundurularak toprak altından dikkatli bir şekilde çıkartılması ve çıkarıldıktan sonra muhafaza edilmesi önemlidir. Bu noktada kazıda görev yapan arkeologların moleküler çalışmalar hakkında bilgi sahibi olması önemlidir. Güral (2007), katılmış olduğu 8. Uluslararası Kazı, Araştırma ve Arkeometri Sempozyumu'nda bir anket yapmıştır ve bu ankete kazı başkanlığı veya başkan yardımcılığı görevinde bulunan 29 kişi katılmıştır. Anket sonuçlarına göre 25 katılımcı kazılarında DNA analizi yapılmadığını, 4 katılımcı ise DNA analizlerinin yapıldığını belirtmiştir. DNA analizi yapılmayan kazılardan 4 tanesinde insan iskeletine rastlanılmadığı için DNA analizi yapılmadığı belirtilmiştir. DNA

analizi yapılmadığını belirten 25 katılımcıdan 1 tanesi DNA analizlerinin yasak olduğu için yapılmadığını belirtirken, 1 tanesi bilgisi olmadığını, 23 kişide kazılarında çıkartılan iskeletler üzerinde DNA analizlerinin yapılmasını istediklerini belirtmiştir (Güral, 2007).

Antik örneklerde bulunan DNA, modern örneklerle göre daha az miktarda bulunmaktadır. Parsons ve Weeden (1996), bu az miktardaki DNA'nın korunmasında çevresel faktörlerin etkisinin bulunduğu ancak, toprak altında kalma süresi ve yaşları aynı olan iskeletlerden bazılarında DNA elde edilirken bazılarında DNA elde edilemediğini belirtmiştir. İskeletlerin toprak altında bulunma süresi ve buna bağlı olarak toprakta bulunan humik ve fulvik asit nemliliğe neden olur ve bu durum da PZR'ı inhibe ederek amplifikasyonu engeller (Burger ve ark., 1999). Toprağın nemli olması ve iskeletlerin toprak altında kalmasının DNA'ya etkisi düşünüldüğünde deniz kenarına yakın olarak bulunan kazı bölgelerinden çıkartılan örneklerden başarılı bir amplifikasyon gerçekleşmesi zordur. Çalışma materyalini oluşturan Nysa Antik Kenti, Beybağ Mevkii, Teos Antik Kenti ve Giresun Adası deniz kenarına yakın yerleşim yerleridir. Denize yakın olmaları ve elde edilen DNA başarıları değerlendirildiğinde Nysa Antik Kentinden çıkartılan 9 örnekten 8'inden sonuç alınmıştır. Giresun Adası Kazısından çıkartılan 13 örnekten 9'undan, Beybağ Mevkii kazısından çıkartılan 4 örnekten 1'inden ve Teos Antik Kenti kazısından çıkartılan 4 örnekten 2'si (mandibuladaki dişler) çalışmaya dâhil edilmemiştir, çalışılan 2 femuru kemiğinin 2'sinden de sonuç alınarak toplamda %69,2 oranında bir başarı elde edilmiştir. Ancak Teos Antik Kenti'nden çıkartılan 2 femur kemiğinden DNA elde edilebilmesi, çevresel faktörler içerisinde toprak yapısında bulunan humik ve fulvik asidin tek başına önemli bir etkisi olmadığını

düşündürmektedir. Ancak, toprakta bulunan humik ve fulvik asidin miktarını belirlemek için herhangi bir test yapılmadığı için kesin bir sonuca varılamamıştır. Kazıdan çıkartılan mandibula üzerinde bulunan dişlerin aşırı derecede parçalanmış olması ve mandibulanın sertliğini kaybetmiş olması örneklerin çıkarıldığı ortam olan liman kentinin bataklık olması ve toprağın oldukça nemli olması iskeletlerin fiziksel olarak korunmasını etkilediğini göstermiştir.

Kazılardan çıkartılan iskelet buluntularının toplanması ve laboratuvar ortamına getirilmesine kadar geçen sürede muhafaza edilmesi aDNA çalışmalarının ilk aşmasını oluşturur. Kazıdan çıkartılan kemiklerin muhafaza edilmesi konusunda farklı görüşler vardır. Daskalaki (2004), aDNA çalışılacak kemiklerin kazıdan çıkarıldıktan sonra derin dondurucuda muhafaza edilmesi gerektiğini belirtirken, Pruvost ve arkadaşları (2007) derin dondurucuda saklanan örneklerde buzlanmanın olacağı ve DNA'nın bundan zarar görmesinden dolayı örneklerin derin dondurucuda muhafaza edilmemesi gerektiğini belirtmiştir. Kazıdan çıkartılan örneklerin muhafaza edilmesi sıcaklık faktörü ile birlikte ele alındığında aDNA çalışmalarını yapan araştırmacılardan bazısı serin ve kuru ortamda muhafaza edilen örneklerden DNA elde etme başarısının daha yüksek olduğunu, sıcaklığın DNA'nın korunmasında çok önemli bir faktör olduğunu belirtmiştir (Burger ve ark., 1999; Nielsen-Marsch ve Hedges, 2000; Bollongino ve ark., 2008).

Kazıdan çıkartılan örneklerin muhafaza edilmesi kadar önemli olan bir diğer faktör de kazı alanının coğrafi iklim özelliğidir. Leney, (2006) sıcaklığın DNA'nın korunmasında çok az bir etkisi olduğunu, tropikal ve ılıman iklim bölgelerindeki kazılardan çıkartılan kemikler ile yapmış olduğu aDNA çalışması sonucunda göstermiştir. Tropikal iklim bölgesinden çıkartılan örneklerden DNA elde etme

başarısını %66,9, ılıman iklim bölgesinden çıkartılan örneklerden DNA elde etme başarısını ise %75,9 olarak bulmuştur. Çalışmada Türkiye'nin batısında bulunan İzmir, Aydın ve Muğla ile Türkiye'nin doğusunda bulunan Van ilinden çıkartılan kemik ve diş örneklerinden DNA elde etme başarısı düşünüldüğünde sıcaklık ile birlikte kazıdan çıkartılma tarihleri ve buluntu türlerinin birlikte değerlendirilmesi gerektiği görülmektedir. Pruvost ve arkadaşları (2007) müze koleksiyonu olan ve 40°C'de bekletilen kemik örnekleri ile sıcaklığı 4-19°C olan kazı alanından çıkartıldıktan hemen sonra çalışmaya başlanan kemiklerden elde edilen DNA'yı karşılaştırmışlardır ve kazıdan yeni çıkartılan kemiklerde %100 amplifikasyon oluşurken, müze koleksiyonundaki kemiklerde hiçbir amplifikasyon oluşmamıştır. Bizim çalışmamızda Nysa Antik Kenti kazısından 2015 Ağustos ayında kemik ve diş örnekleri çıkartılmış, laboratuvar çalışmalarına 6 ay sonra başlanmıştır. Çalışma materyallerini oluşturan antik kemik ve diş örnekleri içerisinde kazıdan çıkarıldıktan sonra analize başlama süresi en kısa olan bu örneklerden DNA elde etme başarısının yüksek olması Pruvost ve arkadaşlarının (2007) görüşünü desteklemektedir.

Eski örneklerde oluşan degradasyondan dolayı DNA elde etmek zordur. Kemik dokusunda bulunan hidroksiapatit DNA'ya bağlanarak degradasyonu yavaşlattığı için antik DNA çalışmaları ile ilgili literatür taramasına bakıldığında kemik ve dişlerin en çok kullanılan örnekler olduğu görülmektedir (Tuross, 1994; Parsons ve Weedn, 1996; Höss ve ark., 1996; O'Rourke ve ark., 1996; Alakoç, 2007; Özcan, 2010; Tekeli, 2010; Hansen ve ark., 2017). Özellikle materyal olarak kemik çalışılacak ise femur, humerus ve tibia gibi uzun kemiklerin daha çok tercih edildiği görülmektedir (Jeffres ve ark., 1992; Tuross, 1994; Gilbert ve ark., 2005; Prinz ve ark., 2007; Özcan, 2010; Hasan ve ark., 2014; Yaka, 2015).Yapılan

antik DNA çalışmalarında uzun kemiklerin dışında son zamanlarda kafatası kemiklerinden özelliklede temporal kısımdan başarılı sonuçlar alan araştırmacılar vardır (Edson ve ark., 2009; Gamba ve ark., 2014; Rasmussen ve ark., 2014; Pinhasi ve ark., 2015). Bu çalışmada da toplamda 5 adet timpanik kemik çalışılmıştır ve 4 tanesinden başarılı bir şekilde amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

Özcan (2010) yapmış olduğu çalışmada kemiklerden kesit alınması ve pulverizasyon sırasında kemiklerin farklı sertlikte olduğunu gözlemlemiş ve daha sert kemiklerden başarılı bir şekilde DNA elde etmiştir. Bu çalışmada kullanılan 10 adet femur ve 1 adet fibula kemiğinden başarılı bir şekilde DNA elde edilip amplifikasyon sağlanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar uzun kemikler ve özelliklede femur kemiğinin aDNA çalışmalarında sıklıkla kullanılmasını desteklemektedir. Bu çalışmada 4, 17 ve 40 numaralı femur kemiklerinin diğer kemiklere göre daha sağlam olduğu gözlemlenmiştir. 4 numaralı femur kemiğini toz haline getirmesi zor olmuştur ve bu aşamada sıvı nitrojen kullanılmıştır. Diğer sağlam olan 17 ve 40 numaralı kemikleri toz haline getirmek oldukça kolay olmuştur ve sıvı nitrojen kullanılmamıştır. Bu 3 kemikten de DNA elde edilmiş ve amplifikasyon sağlanmıştır. 2 numaralı femur kemiğinde çatlak olduğu gözlemlenmiştir ve bu çatlaktan dolayı kemikten kesit alınması ve pulverizasyon işlemlerinin çok kolay olacağı düşünülmüştür. Ancak pulverizasyon işleminde femur kemiğinin çok sağlam olduğu ve poröz yapının bulunmadığı görülmüştür ve sıvı nitrojen ile toz hale getirilmiştir. 1 numaralı femur kemiğinde de çatlak gözlemlenmiştir ancak sıvı nitrojen olmadan çok kolay bir şekilde toz haline getirilmiştir. Bu örnekler dışında çalışmada kullanılan diğer 5 adet femur kemiği sıvı azot kullanımına gerek duyulmadan kolay şekilde toz haline getirilip, başarılı bir şekilde DNA elde edilmiş

ve PZR'da amelogenin gen bölgesinde amplifikasyon oluşmuştur. Kemiklerin sertliği ve DNA elde edilmesi arasındaki bağ düşünüldüğünde bu çalışmada kolay bir şekilde toz haline getirilen femur ve timpanik kemiklerden de başarılı bir şekilde DNA elde edilmiştir. Bu durumda kemik dokunun %70'ini oluşturan inorganik yapı, kemiğin sert olmasını sağlar ve fizyolojik olarak kemiği korur, ancak DNA elde edilmesi açısından düşünüldüğünde kemiğin sert ve sağlam olması oluşabilecek çatlak ve kırıkları önleyerek kontaminasyon riskini azaltır. Kontaminasyonun aDNA çalışmalarında büyük bir sorun olduğu düşünüldüğünde sağlam bir kemik ile çalışma yapılması bir avantaj olarak görülebilir, ancak inorganik kısımda bulunan kalsiyum iyonlarının DNA'yı ulaşmayı engellediği düşünüldüğünde uygulanan dekalsifikasyon işlemi ve DNA izolasyon yöntemi daha önemli bir faktör olmaktadır.

Bozulmuş veya parçalanmış insan kalıntılarının kimliklendirilmesinde dişler ve kemikler tek DNA kaynağı olarak kullanılmaktadır. Dişlerin çene içerisindeki yerleşimleri DNA'nın korunması açısından kemikler ile karşılaştırıldığında dişlerin DNA kaynağı olarak kullanılmasını tercih eden araştırmacılar vardır (Higgins ve Austin, 2013; İmamoğlu ve ark., 2011; Alakoç, 2007; Gilbert ve ark., 2005). Hasan ve arkadaşları (2014) diş, femur, metakarpal, humerus, tibia ve vertebra kemiklerinden DNA izolasyonu yapmıştır ve dişlerden daha başarılı bir sonuç elde etmiştir. Pinhasi ve arkadaşları (2015) ise, diş ve diğer kemik örneklerine kıyasla timpanik kemikten daha fazla miktarda DNA elde etmiştir ve timpanik kemiğin memeli canlılarda vücudun en sert ve en yoğun kemik olduğu görüşündedir (Pinhasi ve ark., 2015). Çalıştığımız örnekler içerisinde sadece 37 numaraya ait diş, femur ve timpanik kemik olduğu için tek bir örnek üzerinde değerlendirme yapmak mümkün

olmuştur. DNA miktarını ve saflığını ölçmemizi sağlayan nanadrop cihazında timpanik kemikten elde edilen DNA miktarı daha fazladır. Ancak bu ölçümde insan DNA'sı dışında, ortamda bulunan mikroorganizmaların DNA'sı da bulunduğu için, insana ait DNA miktarının değerlendirilmesi yapılamaz. Ancak PZR sonuçlarına bakıldığında aynı bireye ait olan diş, femur ve timpanik kemik içerisinden sadece timpanik kemikte amplifikasyon oluşması, timpanik kemikte DNA'nın daha iyi korunduğunu göstermektedir.

Antik DNA çalışması için laboratuvara getirilen 26 bireye ait diş örneklerinden 5'i çalışmaya dâhil edilmemiştir. Bunlardan 5 ve 6 numaralı mandibula üzerinde bulunan diş örnekleri Teos Antik Kenti kazısından çıkartılmıştır. Dekontaminasyon işlemleri sırasında dişlerde aşırı derecede parçalanma olduğu görüldüğü için çalışmaya alınmamıştır. 14 ve 16 numaralı dişlerin kökünde parçalanma olduğu için, 15 numaralı diş örneğinden de pulpa çıkarılamadığı için bu örnekler çalışmaya dâhil edilmemiştir. Farklı kazılardan çıkarılmış olan toplamda 21 diş örneğinden pulpa çıkarılarak fenol/kloroform izoamil alkol ile DNA izolasyonu yapılmıştır ve 12 tanesinde amplifikasyon oluşmuştur. Antik DNA çalışmalarında materyal olarak diş kullanan araştırmacılar içerisinde başarılı sonuçlar elde edenler olmuştur. Krüttli ve ark., (2014), dişin dentin kısmından, Adler ve arkadaşları (2011) ile Damgaard ve arkadaşları (2015), dişin sement kısmından başarılı bir şekilde yüksek miktarda endojen DNA elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise femur ve timpanik kemiklerden dişe göre daha iyi sonuç alınmıştır. Dişlerdeki pulpanın iyi bir DNA kaynağı olduğu bazı araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur (Pfeiffer, 1999; Alakoç, 2007; Tilotta, 2010; İmamoğlu ve ark., 2011; Higgins ve Austin, 2013).

Çalışmamızda toplamda 16 adet kortikal kemik (femur, fibula, timpanik) ve 21 adet diş örneğinden DNA izolasyonu yapılmıştır. 16 adet kortikal kemikten 14'ünden sonuç alınmıştır ve %87,5 oranında bir başarı sağlanmıştır. 21 adet diş örneğinin 12'sinden sonuç alınmıştır ve %57,1 oranında bir başarı sağlanmıştır. Çalışılan diş örneklerinin yarısına yakınında amplifikasyon oluşmamıştır. Dişten elde edilen pulpa miktarının yeterli olmaması ve dişlere uygulanan dekalsifikasyon işlemi sırasında DNA kaybı olduğu düşünülmektedir. DNA izolasyonu için kullanılan örnek miktarının çok az olması yeterli miktarda kaliteli DNA'ya ulaşmayı kısıtlamıştır. Ayrıca kemik örneklerinde DNA izolasyonu için kullanılan miktar fazla olduğu için DNA izolasyon tekrarları yapılmıştır ve yeterli miktarda kemik tozu olduğu için iki yöntem ile DNA izolasyonunun yapılmasına olanak sağlamıştır. Ancak dişlerden elde edilen pulpa miktarı az olduğu için DNA izolasyon yöntemlerinden sadece bir tanesi uygulanmıştır. Ayrıca dişlerden elde edilen pulpa miktarının az olması, amplifikasyon oluşmayan diş örneklerinden DNA izolasyonunun tekrar edilmesini kısıtlamıştır. Bu durumlar değerlendirildiğinde aDNA çalışmaları için kortikal kemikler ile çalışmanın daha uygun olduğu düşünülmektedir.

Antik DNA çalışmalarında dikkat edilmesi gereken unsurlardan birisi kontaminasyonu engellemektir. Kontaminasyon, laboratuvar ortamında oluşabileceği gibi, kazı alanında kazı ekibinden kaynaklı da oluşabilir. Antik DNA çalışmalarında kontaminasyon riskini işaret eden çalışmalar arttığı gibi, sonuçların güvenilirliği daha ciddi kontrollerden geçirilmek zorunda kalmıştır. Bu gelişmeler antik örneklerden elde edilen az miktardaki degrade DNA ile gerçekleştirilen analizlerin kontaminasyona çok fazla açık olduğunu ve bu örnekler ile yapılan

çalışmalarda özel önlemler alınması gerektiğini ortaya koyan çok sayıda çalışma mevcuttur (Handt ve ark., 1994; Handt ve ark., 1996; Gilbert ve ark., 2005; Yang ve Watt, 2005; Bouwman ve Chilvers, 2006; Rubio ve ark., 2013). Kontaminasyonu engellemek için antik DNA çalışmalarının ilk basamağını oluşturan örneklerin toplanması sırasında kazıyı yapan arkeologların bu konuda bilinçli olması yapılacak çalışmaları kolaylaştırmaktadır (Watt, 2005). Özellikle antik örneklerde çok az miktarda endojen DNA bulunduğu için yapılacak olan dekontaminasyon işlemleri aDNA çalışmalarında önemli olmaktadır. Fiziksel dekontaminasyon, kimyasal dekontaminasyon ve UV ışınına maruz bırakılarak uygulanan dekontaminasyon işlemleri tek tek uygulanabileceği gibi bu üç yöntemi kombinasyon şeklinde uygulayan araştırmacılar vardır (Burger ve ark., 1999; Watt, 2005; Gefrides ve ark., 2010; Cemper-Kiesslich ve ark., 2014). Bu çalışmada kullanılan örneklerin bir kısmında DNA çalışması yapılmadan önce antropolojik incelemeler yapıldığı için kemiklerin yüzeyi temizlenmiş bir şekilde laboratuvara getirilmiştir. Bu örneklerde kimyasal dekontaminasyon işlemi yapılmış ve sonrasında UV ışınına maruz bırakılmıştır. Diğer örneklerde ise dekontaminasyon yöntemleri kombinasyon şeklinde uygulanmıştır. Kazı yerinden ıkartılan örneklerde mikroorganizmaların gelişimi engellenirse, biyomoleküllerin, oksidasyon ve hidrolitik işlemler sırasında kimyasal bozunmaya engel olmak mümkündür. Endojen DNA'nın bozunmasını engellemek ve ekzojen DNA'dan oluşacak kontaminasyonun önüne geçmek için, kazı alanından ıkartılan örneklerin yıkanmaması gerektiğini belirten Yang ve Watt'ın (2005) bilgileri dikkate alınarak, aDNA çalışmasının yapılacağı bilinen örnekler kazıdan ıkartıldıktan sonra su altında yıkanmamıştır.

Watt (2005), örneklerin dış yüzeyinin uzaklaştırılmasında el frezesi ve matkaptan sonra en çok zımpara kâğıdı ve diş fırçasının kullanıldığını belirtirken, Cemper, Kiesslich ve arkadaşları (2014) fiziksel dekontaminasyon işleminde kullanılacak olan malzemeyi çalışılacak kemiğe göre seçmenin daha uygun olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada femur ve timpanik kemiklerin dış yüzeyi her bir örnek için ayrı kullanılan zımpara ile uzaklaştırılmıştır. Ancak bazı örneklerin dış yüzeyi pürüzlü olduğu için ve timpanik kemiklerin şekli düzgün olmadığı için zımparalama işlemi yetersiz olmuştur ve el frezesi kullanılmıştır. El frezesi, en düşük seviyede çalıştırılarak yüksek ısının oluşması engellenmiştir.

Literatürde geçen çalışmalar içerisinde kimyasal dekontaminasyon işlemi için kullanılan çeşitli kimyasal malzemeler içerisinde en çok sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) kullanılmıştır ve çamaşır suyu kullanımının örneklere olan etkisi bazı araştırmacıların çalışma konusu olmuştur. Richard ve Sykes (1995) yapmış oldukları çalışmada %0,5'lik sodyum hipokloritin (ticari olarak satılan çamaşır suyu %10) kemik örneklerinde daha etkili olduğu sonucuna varmıştır (Richard ve Sykes, 1995).

Kemp ve Smith, (2005) kemik ve diş örneklerinde bulunan kontaminantları uzaklaştırmak için sodyum hipokloriti çeşitli kombinasyonlar şeklinde uygulamıştır. Araştırmacılar, 500 ve 10,000 yıllık kemik ve diş örneklerine %6'lık sodyum hipokloriti 15 dakika bekleterek örneklerdeki kontaminantları uzaklaştırmada en etkili yöntemin olduğunu belirtmiştir (Kemp ve Smith, 2005). Price ve Andrus (1992) yapmış oldukları çalışmada, Kemp ve Smith'in (2005) bulduğu sonuçtan daha farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Price ve Andrus'un yapmış olduğu çalışmada %10'luk sodyum hipokloridin DNA'yı yıkmada yeterli olduğunu, %2,5'lik sodyum hipokloridin ise DNA'ya zarar verdiğini, %5,25'lik sodyum hipokloridin de yüzeyde

bulunan bitkisel atıkları uzaklaştırdığını belirtmiştir. Bunun yanı sıra, DNA'nın sodyum hipoklorite maruz kalması PZR'ın 76 baz çiftinde amplifiye olmasını engellemiştir. DNA, çok daha küçük parçalara kırıldığı için çamaşır suyunun kullanılacağı zaman sadece yüzeye uygulanması tavsiye edilmiştir (Price ve Andrus, 2005).

Yapılan bu çalışmalar dikkate alınmıştır ve kimyasal dekontaminasyon işleminde sodyum hipoklorit kullanılmamıştır, bunun yerine Rohland ve Hofreiter'in (2007b) çalışmaları dikkate alınarak %5'lik SDS kullanılmıştır. Kimyasal dekontaminasyon işlemi sonrasında kemik ve diş örneklerinin hepsi 245 nm. de UV ışığında 5'er dakika bekletilmiştir. Antik DNA çalışmalarında kontaminasyon riski için alınan önlemler ve örneklerin fiziksel durumları ile yapılan dekontaminasyon işlemleri değerlendirildiğinde uygulanan dekontaminasyon yöntemlerinin ekzojen DNA'yı uzaklaştırmada başarılı olduğu görülmektedir. Ayrıca antik DNA çalışmalarında suyun olumsuz etkisi göz önünde bulundurulmalıdır ve kimyasal temizlik mümkün olduğunca yüzeysel yapılmalıdır.

DNA izolasyonu öncesinde kemik ve dişlerde yoğun olarak bulunan Ca ve Mg iyonlarını uzaklaştırmak için dekalsifikasyon işlemi uygulanmıştır. Antik DNA çalışmalarında uygulanan dekalsifikasyon işlemleri araştırmacılar tarafından tartışılmaktadır. Fischer (1993) ve Altunçul'a (20001) göre dekalsifikasyon yapılmadan da DNA izolasyonunun yapılabileceği belirtilirken, bazı araştırmacılar ise (Hochmeister ve ark., 1991; O'Rourke, 2000b; Loreille ve ark., 2007; Cemper-Kiesslich, 2014) dekalsifikasyon işleminin yapılmasının gerekli olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada kemik ve diş örneklerinin hepsine dekalsifikasyon işlemi uygulanmıştır. Dekalsifiye edilmiş örneklerden DNA izolasyonu yapılmıştır ve PZR

sonucunda amplifikasyon oluşmayan örneklerde DNA kaybı olduğu düşünüldüğü için örneklere dekalsifikasyon işlemi uygulanmadan DNA izolasyonu yapılmıştır. Dekalsifikasyonu tamamlanmış ve dekalsifiye edilmemiş örneklerin DNA miktarları PZR sonuçları ile birlikte karşılaştırıldığında özellikle timpanik kemiklerde DNA kaybı olduğu görülmüştür. Cemper-Kiesslich (2014) ve O'Rourke'a (2000b) göre dekalsifikasyon işlemi 72 saat devam etmektedir, ancak bu çalışmada 48 saatte tamamlanan dekalsifikasyon sonucunda amplifikasyon oluşmuştur. Ayrıca dekalsifiye edilmeyen örneklerde de amplifikasyon oluşmuştur. Dekalsifikasyon işlemi sırasında az miktarda da olsa DNA kaybı olduğu düşünülmektedir. DNA hasarının çok olduğu antik örneklerde dekalsifikasyon süresinin uzatılmaması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Antik DNA çalışmalarında deri gibi yumuşak doku veya kemik ve diş gibi sert dokular materyal olarak kullanılmaktadır. Mulligan (2005), Proteinase K'yı sadece yumuşak dokunun DNA izolasyonu sırasında, EDTA'yı da sert dokuların DNA izolasyonunda kullanmayı tercih ederken, bazı araştırmacılar kemik ve diş örneklerinde EDTA ile birlikte Proteinase K'nın kullanılmasını önermektedir (Shiroma ve ark., 2004; Rohland ve Hofreiter, 2007; Cemper-Kiesslich, 2014). Antik DNA çalışmalarında örneğin durumu, saklanma koşulları, hangi tarihi döneme ait olduğu gibi veriler DNA elde edilmesinde kullanılan protokolleri değiştirmektedir. Son yıllarda neredeyse antik DNA çalışmalarına ait literatürdeki makale sayısına yakın sayıda farklı DNA izolasyon yöntemi bulunmaktadır ve bunlardan başarılı sonuçları bilinen birkaç yöntem ön plana çıkmaktadır. Bunlardan birisi 1996 yılında Baron ve arkadaşlarının yaptığı DNA izolasyonunda fenol kloroform yöntemini kullandıkları çalışmadır (Baron ve ark., 1996). Başarılı

sonuçları onaylanmış olan bir diğer protokol ise 1993 yılında Höss ve Pääbo tarafından gerçekleştirilen ve silika yöntemi ile yapılan DNA izolasyonudur (Höss, Pääbo, 1993). Günümüzde önerilen ve başarılı oldukları kanıtlanmış bu protokollerin uygulamalarındaki küçük farklılıkların kazı örneklerinin durumuna, yaşına ve içinde bekledikleri çevresel koşullara göre büyük önem kazandığı bilinmektedir (Hummel, 2003). Bu çalışmada fenol/kloroform izoamil yöntemi ve QIAGEN Forensic Kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. EDTA, dekalsifikasyon sırasında kullanılmış, Proteinase K ise fenol/kloroform izoamil yöntemi ile DNA izolasyonu sırasında proteinleri uzaklaştırmak amacıyla kimyasal maddeler ile birlikte kullanılmıştır. Guanidium izotiyosiyonatu (GuSCN), DNA'yı silikaya bağlamak amacıyla DNA izolasyonu yapan araştırmacılar (Boom ve ark., 1999; Kolman ve Tuross, 2000; Rohland ve Hofreiter, 2007; Hasan ve ark., 2014 ;Kotan, 2010) olduğu gibi hücre duvarını parçalamak amacı ile kullanan araştırmacılar da vardır (Höss ve Pääbo, 1993; Krings ve ark., 1997 ;Poinar ve ark., 1998; Hofreiter ve ark., 2004). GuSCN, PZR inhibitörü içermez ve hücre duvarını parçalamada kuvvetli bir kimyasaldır. Bu nedenle GuSCN, sodyum sitrat ve N-lauryl sarcosin ile hazırlanan denatürasyon solüsyonu şeklinde DNA izolasyonunun ilk aşamasında kullanılmıştır. Fenol/ kloroform izoamil yöntemi ile elde edilen DNA izolatlarının PZR sonuçlarına bakıldığında 9 adet femur kemiğinin 8'inde başarılı bir amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. 37 numaralı femur kemiğinde fenol/kloroform izoamil yöntemi ve QIAGEN Forensic Kit ile yapılan DNA izolasyon yönteminde hiçbir amplifikasyon oluşmamıştır. Bu bireye ait femur kemiği kırık ve yarım bir şekilde laboratuvara geldiği için distal kısımdan kesit alınamamıştır. Antik DNA çalışmalarında kullanılacak örneklerin seçimi burada önemli olmaktadır. Mikroskop

ile inceleme yaparak DNA'nın korunmuş olup olmadığını tahmin etmek oldukça zordur. İyi bir örnek seçiminde bazı karakteristik özellikler vardır. Kortikal kemikler, süngerimsi kemiklere göre daha katıdır ve yoğunluk kemiğin dış yüzeyindedir (Daskalaki, 2004). Uzun kemiklerin diyafiz kısmı aDNA çalışmaları için daha uygundur, ancak kemiğin üzerinde gözle görülür bir çatlak veya mikrobiyal bir aşındırma olmamalıdır (Bollongino, 2008). Antik DNA çalışmasında diş çalışılacak ise ileri derecede aşınma olan, fizyolojik olarak bütünlüğünü kaybetmiş ve patolojik bulguları olan dişler seçilmemelidir. Çalışılacak örnekler morfolojik olarak iyi durumda değilse ve patolojik bulgular var ise DNA analizi için seçilmemelidir. Gusta ve White (1996)'a göre yapılacak çalışmada testin tutarlılığını sağlamak için bir bireyden iki ayrı örnek (kemik ve diş) alınarak çalışılmalıdır. Örneklerin toplanmasında DNA analizi için bütün iskelet kalıntılarının alınmasına gerek yoktur. Femur, humerus, tibia ve kafatası gibi kortikal kemiklerin alınması yeterli olmaktadır.

Bizim çalışmamızda Giresun Adası kazısından çıkartılan iskeletlerden üç bireye ait femur ve diş örnekleri ile Baybağ kazısından çıkartılmış olan bir bireye ait femur, diş ve timpanik kemikler çalışılmıştır. Bunun dışında Nysa Antik Kenti kazısından çıkartılmış olan bireylere ait diş, femur ve timpanik kemikler ile de çalışılmıştır, ancak toplu gömü olduğu için ve iskelet kalıntıları parçalanmış bir şekilde ele geçirildiği için morfolojik olarak kesin bir şekilde cinsiyet tespiti yapılamamıştır. Nysa Antik Kenti bireylerinde diş, femur ve timpanik kemiklerinden DNA elde edilmiş ve amelogenin gen bölgesinde amplifikasyon olmuştur. Giresun Adası kazısından çıkartılan 3 farklı bireyin diş ve femur kemiği kullanılmıştır. 17 numaralı femur ve 18 numaralı diş örneği aynı bireye ait olup, moleküler sonuçları

birbiri ile uyumludur. Aynı şekilde 19 numaralı femur kemiği ile 20 numaralı diş örneği aynı bireye aittir ve moleküler sonuçları birbiri ile uyumludur. 38 numaralı femur kemiği ile 39 numaralı diş örneği de aynı bireye aittir, ancak femurdan elde edilen DNA'dan amplifikasyon sağlanmışken, dişte herhangi bir amplifikasyon oluşmamıştır. Beybağ kazısından çıkartılan 37 numaralı bireye ait diş, femur ve timpanik kemikten DNA elde edilmiştir ve sadece timpanik kemikte amplifikasyon oluşmuştur.

İki farklı DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA miktarları ve yapılmış olan PZR sonuçları karşılaştırıldığında fenol/kloroform izoamil yöntemi ile yapılan izolasyonun daha başarılı olduğu görülmüştür. Hem adli bilimlerde hem de antik DNA çalışmalarında kullanılan DNA izolasyonu için kullanılan ticari kitler, araştırmacılar için zaman açısından bir avantaj sağlarken, kit içinde yer alan prosedürler aynen uygulanmak zorunda olduğu için bir değişiklik yapılamamaktadır. Ama fenol/kloroform izoamil yönteminde kullanılan malzemeler, inkübasyon süresi ve ayarlanabilen sıcaklık gibi faktörler de değişiklikler yapmak mümkündür. Ticari kitlerin daha hızlı sonuç vermesi ve kontaminasyon riskinin daha az olmasından dolayı bu yöntemi tercih eden ve iyi sonuç alan araştırmacılar da vardır (Cattaneo ver ark., 2000). Bu çalışmada kullanılan DNA izolasyon yöntemi kadar yapılan PZR'da önemli olmaktadır. Bu çalışmada hassasiyeti yüksek, ticari PZR kiti kullanılmasından dolayı 0,5 ng DNA yeterli olmaktadır. DNA izolasyonundan sonra nanadrop cihazında DNA'nın saflığı ve miktarı ölçülmüştür. Ancak PZR sonucunda oluşan amplifikasyonlar ve DNA miktarları karşılaştırıldığında, amplifikasyonun DNA miktarından çok, DNA kalitesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

DNA izolasyonu yapıldıktan sonra DNA'nın miktar ve saflığı spektrofotometrik yöntem ile jel elektroforezinde veya Real Time PZR kullanılarak ölçülebilmektedir. DNA izolasyonu sonrasında agaroz jel elektroforezin kullanılması antik DNA çalışmalarında çok doğru sonuç vermeyebilir. Elektroforezde yürütme işlemi sonrasında belirli uzunluklarda bant oluşur, ancak eski örneklerdeki DNA miktarı çok az olduğu için jelde DNA görülmeyebilir. Bu durum DNA'nın olmadığı anlamına gelmediği gibi, bant görülmesi saf DNA'nın elde edilmiş olmasını veya görülen bandın kontaminasyon sonucu oluştuğu anlamına da gelmemektedir. Bu çalışmada DNA izolasyonu sonunda nanodrop N-100 spektrofotometre cihazı kullanılarak DNA'nın miktar ve saflığı belirlenmiştir. Agaroz jel elektroforezine göre daha avantajlı olan bu yöntem, çok az miktarda olan ve jelde görüntülenemeyen DNA'yı görebilecek hassasiyete sahiptir. Çalışmamızda 37 örnekte DNA izolasyonu yapılmıştır ve örneklerin nanodrop N-100 spektrofotometre cihazında DNA miktar ve saflığına bakılmıştır. Fenol/kloroform izoamil yönteminden elde edilen DNA miktarı 2,2 ng ile 142,2 ng arasında değişmektedir. QIAGEN Forensic Kit yöntemi ile femur, fibula ve timpanik kemiklerden yapılan DNA izolasyonunda DNA miktarı 2,1 ng/µl ile 11,3 ng/µl arasında değişmektedir. Amplifikasyon oluşmayan örneklerin DNA miktarları içerisinde 46,1 ng/µl konsantrasyonuna sahip örnekte amplifikasyon oluşmaz iken, 3,4 ng/µl konsantrasyona sahip örnekte amplifikasyon oluşmuştur. Çok az miktarda elde edilen DNA'da amplifikasyonun oluşmasında kullanılan X-STR kiti çok önemli olmuştur. QIAGEN Investigator Argus X-STR kiti 0,5 ng DNA'da bile başarılı bir sonuç verme özelliğine sahiptir. Çalışma bu yönden değerlendirildiğinde özellikle de antik DNA çalışmalarında, elde edilen DNA kalitesinin DNA miktarından daha

önemli olduğu görülmektedir. Nanodrop ölçümünde insan DNA'sı dışında ortamdaki mikroorganizmaların da DNA'sı ölçüme dâhil olduğu için çalışılan bireyin saf DNA miktarı belirlenememektedir. Örneklerimizden aldığımız sonuçlar doğrultusunda DNA miktarının çok önemli bir kriter olarak değerlendirilmemesi gerektiği görülmüştür. Spektrofotometre ile DNA saflığını belirlemek de mümkün olmaktadır. İdeal şartlarda DNA örnekleri için bu absorbans değerinin 1,8 olması beklenmektedir. Bizim örneklerimizde, QIAGEN Forensic Kit ile yapılan DNA izolasyonu sonucunda 260/280 nm dalga boyundaki absorbans değeri 1,21 ile 2,14 arasında değişmektedir. Fenol/kloroform izoamil yönteminde ise 260/280 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri 1,22 ile 2,11 arasında değişmektedir. 230/260 nm dalga boyundaki absorbans değeri fenol/kloroform izoamil yönteminde 0,04 ile 0,089 arasında değerler değişmektedir. QIAGEN Forensic Kit ile yapılan DNA izolasyonunda ise 230/260 nm dalga boyundaki absorbans değeri 0,23 ile 0,49 arasında değişmektedir. İdeal bir DNA'da ise 260/230 nm'deki absorbans değerinin 1,8-2,2 arasında olması beklenmektedir. Bizim örneklerimizin absorbans değeri bu değerden oldukça uzakta çıkmıştır ve PZR sonuçlarına bakıldığında absorbans değeri ile amplifikasyon sonucu arasında önemli bir bağlantı görülmemiştir.

STR, (kısa ardışık tekrar dizileri) adli bilimlerde kimlik tespitinin yapılmasında yaygın olarak kullanılmakla birlikte degrade olmuş ve çok az miktarda DNA elde edilen örneklerin kullanımında önemli bir yere sahiptir (Budowle ve ark., 1996). Bu çalışmada da X-STR kullanılmış olması, kontaminasyonun olup olmadığını belirleme konusunda bir avantaj sağlamıştır. Antik DNA çalışmalarında amelogenin gen bölgesi dışında herhangi bir bölgede amplifikasyonun oluşması durumunda, çalışılan örnek ile personelin gen bölgesi karşılaştırılarak

kontaminasyon olup olmadığı anlaşılmaktadır. Ayrıca STR'in oldukça hassas çalışması ve güvenilir olması aDNA çalışmaları için büyük bir avantaj sağlamaktadır. Adli çalışmalarda olduğu gibi arkeolojik insan kalıntılarında kullanılan STR tekniği ile elde edilen sonuçlar, popülasyon genetiği ve akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi gibi antropoloji alanına önemli bilgiler sunar (Hummel ve ark., 1995; Hermann ve Hummel, 1997; Ivanov, 1999; Parsons, 2007). Schmerer (2001), aşırı derecede bozunmuş insan kemiklerinden elde ettiği çok düşük miktarda DNA örneğini PZR 'da çoğaltarak STR tekniği ile başarılı bir sonuç elde etmiştir (Schmerer, 2011). STR çalışmalarının avantajları yanında dezavantaj olarak sayılabilecek ancak çok nadir olarak görülen allel düşmesi görülebilir. Allel düşmesinde, heterozigot lokustaki allellerden biri düşer (Prado ve ark., 1997; Schultes ve ark., 1999). Antik DNA çalışmalarında çok az miktarda DNA elde edildiği için allel düşmesinin DNA miktarından kaynaklı olduğunu düşünen araştırmacılar vardır. (Kimpton, 1994; Handt ve ark., 1994; Prado ve ark., 1997). Bizim çalışmamızda da 21 numaralı diş örneğinde X allel düşmesi görülmüştür. Bu örnekte X alleli düşmüş, sadece Y alleli görülmüştür. Y bandının düşmesi durumunda sonuçların yorumlanmasında zorluk yaşanırken, X allelinin düşmesi yanlış sonuca sebep olmamıştır.

PZR aşamasında negatif ve pozitif kontroller kullanılmıştır. Yaptığımız PZR uygulamasında 1µl DNA yerine 4 µl DNA kullanılmış ve PZR 'ın 2. aşamasındaki döngü sayısı artırılarak amplifikasyon şansı artırılmıştır. PZR sonrasında elde edilen moleküler sonuçlar ile antropolojik sonuçlar karşılaştırılmıştır. Toplamda 37 örnekten DNA elde edilmiştir ve bu örneklerin 27'sinde amelogenin gen bölgesinde amplifikasyon olmuştur ve genel olarak %72,9 oranında bir başarı sağlanmıştır.

Amelogenin gen bölgesi dışında diğer gen bölgelerinde herhangi bir amplifikasyon oluşmamıştır.

Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü kazısından çıkartılmış olan iki femur kemiğinde yapılan morfolojik ve moleküler cinsiyet tespitlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Teos Antik Kenti kazısından çıkartılan iki femur kemiğinden moleküler çalışmalar sonucunda erkek bireye ait olduğu bulunmuştur, ancak elimizde sadece femur kemiği olduğu için antropolojik olarak cinsiyet belirlenememiştir. Van Kalecik Köyü, Ablagens kazısından çıkartılmış olan 3 diş örneğinin 2'sinde amplifikasyon oluşmuş ve cinsiyeti erkek olarak belirlenmiştir ve her iki veri birbiri ile uyumlu olmuştur. Van Kalecik Köyü, Çatak kazısından çıkartılan 3 diş örneğinin 1'inde amplifikasyon oluşmamış, 1'inde antropolojik ve moleküler veriler ile erkek birey olduğu belirlenirken, diğer 1 örnekte sonuçlar birbiri ile aynı olmamıştır. Van Kalecik Köyü kazısından çıkartılan bireylerin morfolojik cinsiyet tayinin de dişlerden yararlanılmıştır. Dişlerden alınan mesial-distal ve buccal lingual diş ölçüleri ile çene kemiklerden alınan metrik değerler cinsiyet ayırımında kullanılmaktadır. Ancak izole dişlerin veya ele geçen yarım çenelerin cinsiyet ayırımında zorluklar yaşanmaktadır. Alakoç, (2007) Adrasan ve Yoncatepe Kazılarında çıkartılan diş örnekleri üzerinde odontometrik yöntemler ve DNA analizleri ile cinsiyet tespiti yapmıştır ve odontometrik yöntemlerin tek başına cinsiyet belirlemede yeterli olmadığı sonucuna varmıştır (Alakoç, 2007). Van Kalecik Köyü, Kalecik kazısından çıkartılmış olan 4 diş örneğinin 3'ünde pulpa elde edilemediği için DNA izolasyonu yapılamamıştır, diğer 1 örnekte ise amplifikasyon oluşmamıştır. Beybağ kazısından çıkartılmış olan 2 bireyin 1'inde amplifikasyon oluşmamıştır, diğer bireyin ise morfolojik ve moleküler cinsiyet bulguları birbiri ile

aynıdır. Nysa Antik Kenti kazısından çıkartılmış olan 9 örnekten sadece 1'inde herhangi bir amplifikasyon gerçekleşmemiştir. Bu kazı bölgesinden çıkartılmış olan bireyler toplu bir şekilde gömülmüştür ve bireylere ait tüm kemikler bulunamamıştır. Bulunan kemikler de parçalanmış durumda olduğu için morfolojik cinsiyet tespiti yapılamamıştır. Giresun Adası kazısından çıkartılmış olan 13 örneğin 4'ünde herhangi bir amplifikasyon oluşmamıştır. Amelogenin gen bölgesinde amplifikasyon oluşan 8 bireyden 5'inin moleküler ve morfolojik cinsiyet bulguları birbiri ile uyumlu olmamıştır. Giresun Adası kazısından çıkartılan ve moleküler analizler için laboratuvara getirilen kemikler genel olarak iyi korunmuştur. Ancak, iskeletlerin yan yana gömülü olması ve kemiklerin karışık durumda olması birey tayininin yapılmasını zorlaştırmıştır. İskelet materyallerinin kazıdan parçanmış şekilde çıkması veya bireylere ait kemiklerin eksik olması cinsiyet tespitini zorlaştırmaktadır. Bu gibi durumlarda kimliklendirmenin temelini oluşturan cinsiyet tespitinde DNA analizlerinin antropoloji alanında önemli olduğu bu çalışma ile ortaya koyulmuştur.

Antik DNA analizlerinde DNA'nın farklı derecelerde degrade olması, çok az miktarda endojen DNA'nın bulunması ve özellikle de kontaminasyon riskinin yüksek olması, yapılan çalışmaların güvenilirliğini sorgulamaktadır. Amelogenin gen bölgesinin bir alleli 106 bç., diğer alleli de 112 bç. uzunluğundadır (Sullivan ve ark., 1993; Faerman ve ark., 1997). Antik örneklerde 200 bç.'den daha uzun bir gen bölgesinde amplifikasyonun olması antik DNA'nın modern DNA ile kontamine olduğunun göstergesi olarak görülmektedir (Hernandez ve ark., 2003). Çalışmada sonuç aldığımız örneklerde bu bölgeler dışında herhangi bir gen bölgesinde

amplifikasyonun olmaması, modern DNA ile kontaminasyon olmadığını ve moleküler sonuçların doğruluğunu göstermektedir.



SONUÇ ve ÖNERİLER

İnsanı biyolojik ve kültürel yönü ile inceleyen antropoloji, moleküler biyolojideki teknolojinin gelişmesi ve moleküler antropolojinin ortaya çıkması ile tarih öncesi döneme dair soruları cevaplamaktadır. Kazılardan çıkartılan iskelet kalıntıları, antropologlar, arkeologlar ve paleontologlar için önemli olmakla birlikte farklı bilim dallarının koordineli bir şekilde çalışmasıyla aDNA alanında yapılan çalışmalarda başarı ölçütü yükselmektedir. Antik DNA çalışmaları, modern DNA çalışmaları ile aynı prosedüre sahiptir ancak, aDNA çalışmalarında eski kemik ve diş örneklerinden DNA elde etmek çok daha zor olduğu için çok dikkatli ve sabırlı bir şekilde çalışma yapılmalıdır. Çalışmada kullanılacak olan örneklerin kazı alanından çıkarılması, aDNA çalışmalarının ilk basamağını oluşturur. Kazı başkanlarının ve arkeologların yapılabilecek moleküler analizleri göz önünde bulundurarak iskeletlerin kazıdan çıkarılması ve çıkarıldıktan sonra muhafaza edilmesi konusunda bilgi sahibi olmaları önemlidir. DNA analizi yapılacak iskelet kalıntılarının en kısa sürede laboratuvara getirilmesi ve laboratuvarında çalışmalara mümkün olduğunca erken başlanması DNA elde etme başarısını artırmaktadır. Antik DNA çalışmalarında sıklıkla rastlanılan ve literatürde sürekli bahsedilen kontaminasyon probleminin önüne geçmek için gerekli önlemlerin dikkatli bir şekilde alınması durumunda saf DNA elde etmek kolaylaşacağı gibi sonuçların güvenilirliği sağlanmış olacaktır. Arkeoloji, antropoloji gibi bilim dallarının moleküler biyoloji/adli bilimler gibi deneysel bilimler ile birleşerek, kazıdan çıkarılan kemik ve diş gibi biyolojik materyallerin incelenmesi, eski bir kültürün anlaşılması açısından önemlidir. Bizim için bir başarı ölçütü olan tarih öncesi dönemde yaşamış ve Türkiye'nin iklimsel olarak farklı coğrafi bölgelerindeki kazı

alanlarından çıkartılmış olan fibula, timpanik ve femur kemikleri ile diş örneklerinden DNA elde edilmiştir. 5 adet timpanik kemik ile çalışılmıştır ve bunların 4'ünden başarılı bir şekilde sonuç alınmıştır, %80 oranında bir başarı sağlanmıştır. Uzun kemiklerden 11 adet femur kemiği ve 1 adet fibula kemiği ile çalışılmıştır ve bunlardan sadece 1 femur kemiğinden sonuç alınamamıştır ve %91 oranında bir başarı sağlanmıştır. 21 diş örneğinden elde edilen pulpalardan 12'sinden sonuç alınmıştır ve %57,1 oranında bir başarı sağlanmıştır. Degrade olmuş bu örneklerden X-STR ile PZR yapılarak amelogenin gen bölgesinde amplifikasyonun oluşması ile cinsiyet tespiti yapılmıştır. Moleküler analizler ile elde edilen sonuçlar, iskeletler üzerinde morfolojik incelemeler ile yapılan cinsiyet sonuçları ile karşılaştırılmıştır ve % 56 oranında bir uyum olduğu görülmüştür. Kimliklendirilmenin yapılabilmesi için cinsiyet tespitinde DNA analizlerinin güvenilirliği ve önemi bu çalışma ile ortaya konulmuş olup, insan tarihinin biyokültürel geçmişi antropolojinin içinde yerini almış olan aDNA çalışmaları ile belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile;

- 1) Kazı alanından örneklerin dikkatli bir şekilde çıkartılması ve minimum birey sayısı belirlendikten sonra patketleme yapılmasının,
- 2) Kazıdan çıkartılan kemik ve dişlerde DNA analizi yapılacak ise örneklerin laboratuvara getirilme süresinin uzun olmamasının,
- 3) Moleküler çalışmalar için mümkün olduğunca kortikal kemiklerin tercih edilmesinin ve bir bireyden iki farklı kemik alınmasının,
- 4) Parçalanmış veya yarım kemik örnekleri ile aşırı derecede aşınma olan diş örneklerinin kullanılmamasının,

- 5) DNA izolasyon yönteminin belirlenmesinin, antik örnekler için kullanılacak olan PZR kitinin hassasiyeti ve elektroforez işlemlerinin güvenilirliğinin,
- 6) Kontaminasyon riski için uygulanacak yöntemlerin iyi belirlenmesi ve bunların dikkatli bir şekilde çalışmanın her aşamasında uygulanmasının gerekli olduğu görülmüştür.



ÖZET

Binlerce yıldır birçok uygarlığı içinde barındıran Anadolu'da birçok arkeolojik ve antropolojik kazılar yapılmıştır ve yapılmaya devam etmektedir. Kazılardan çıkartılan iskeletlerde yapılan incelemeler sonucunda bireylerin boy uzunluğu, cinsiyeti, geçirmiş olduğu hastalıklar, beslenme şekilleri belirlenmektedir. İskelet buluntularından DNA elde edilmesi ve moleküler antropolojinin ortaya çıkması ile birlikte antropoloji alanında yapılan çalışmaların alanı genişlemiş ve tarih öncesi dönemlerde yaşayan insanlar hakkında akla gelen sorular cevaplanmaya başlamıştır. Antropoloji alanında biyolojik profilin belirlenmesi, adli bilimlerde de iskelet üzerinde yapılan kimliklendirme önemlidir ve iskelet üzerinde cinsiyet tespiti yapılamadığı durumda DNA analizi oldukça önemli olmaktadır.

Bu çalışmada İzmir Teos Antik Kenti Kazısından (Helenistik-Roma), Aydın Nysa Kazısından (Bizans), Muğla Beybağ Kazısından (Geç Bizans), Giresun Adası Kazısından (Orta Bizans) ve Van Kalecik Köyü Urartu Nekropolü (Erken Demir Çağ) ile Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü (Orta Çağ) Kazılarından çıkartılmış olan diş, femur ve timpanik kemiklerinden DNA elde edilerek cinsiyetin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan örnekler Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih Coğrafya Fakültesi Anatropoloji Bölümü'ne getirilmiştir ve moleküler çalışmalar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı DNA Laboratuvarında yapılmıştır. Antik DNA çalışmalarında kontaminasyonun oluşması sonuçları etkilediği için, bu problemin oluşmaması için dekontaminasyon işlemleri örneklerin durumu göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Farklı iklimsel özelliklere ve farklı çevresel şartlara maruz kalmış olan 16 adet kemik (femur, fibula, timpanik) ve 21

adet diş örneğine iki farklı DNA izolasyon yöntemi (fenol kloroform/ticari kit) uygulanmıştır. DNA elde edildikten sonra cinsiyetinin belirlenmesi amacıyla X-STR kiti kullanılarak PZR yapılmıştır. Çalışılan 10 adet femur kemiğinin 9'unda, 5 adet timpanik kemiğinin 4'ünde, 1 adet fibula kemiğinde ve 21 diş örneğinin 12'sinde amelogenin bölgesinde amplifikasyon oluşmuştur. Toplamda 37 örnekten DNA izolasyonu yapılmıştır ve bunlardan 27'sinden sonuç alınarak % 72,9 oranında bir başarı sağlanmıştır. İskeletler üzerinde yapılan morfolojik cinsiyet sonuçları ile moleküler sonuçlar karşılaştırılmıştır ve %56 oranında bir uyum olduğu görölmüştür. Bu alışma ile morfolojik yöntemlerle cinsiyetin belirlenemediği durumlarda DNA analizlerinin oldukça önemli ve gerekli olduğu ortaya koyulmuştur.

SUMMARY

Many archeological and anthropological excavations have been done in Anatolia which has included many civilisations for thousand of years and it has been gone on. As a result of examinations which are done on skeletons which are taken out of the excavations, the individuals' tall stature, gender, disease that they had, their nutrition ways are determined. The field of studies which are done in the field of anthropology expanded as DNA was obtained from the findings of skeleton and the molecular anthropology occurred, and the questions which came into the mind on people who lived in the prehistory periods started to be answered. The identification which was done on the skeleton in the field of anthropology and in the legal sciences are important and the analysis of DNA is very important in the case that the gender determination on skeleton couldn't be done.

It was aimed in this study that DNA was obtained from the femur and tympanic bones with the teeth which were taken from the excavations on Izmir Teos Ancient City (Hellenistic-Roma), Aydin Nysa (Byzantine), Mugla Beybag (The Late Byzantine), Giresun Island (Middle Byzantine), and Van Kalecik Town Urartu Necropolis, Old Van City Towel and Mound (Middle Age). The samples which were used in the study were brought to The Department of Anthropology, The Faculty of Language and History, Ankara University and the molecular studies were done in the DNA laboratory, in The Department of Legal Medicine, Medical Faculty, Ankara University. As the occurrence of contaminations in ancient DNA studies affected the results, the works on decontamination were done in consideration with the samples' status as the problem wasn't seen. DNA was obtained from the use of two different DNA isolation methods (phenol chloroform /

commercial kit) from 16 cortical bones (femur, fibula and tympanic) and 21 the sample of tooth which were exposed to the different climatic properties and different environmental conditions. After DNA was obtained, PCR was done with the use of X-STR kit to determine the sex. The amplification occurred in the area of amelogenesis in 9 of 10 femur bones, 4 of 5 tympanic bones, 1 fibula bone and 11 of 21 tooth samples which were worked. A total of 37 samples were isolated from DNA and taking the results of 27 of these samples and 72.9% success rate was achieved. The morphological gender results on skeletons were compared with the molecular results and it was found that there was conformity at % 56 The results which were obtained as a result of molecular works with the data which were obtained as a result of the morphological examinations which were done on the skeleton were compared and interpreted. It provides a great contribution to the legal sciences and anthropology that DNA would be obtained from the skeleton findings which are in the group embedding and in a case that the gender determination will not be done with the working in different disciplines' together with the ancient DNA studies. . In this study, DNA analysis is very important and necessary in cases where sex can not be determined by morphological methods.

KAYNAKÇA

1. Acar, A., (2014), “Yoncatepe Toplumunda Calcaneus ve Talus Kemiklerinden Cinsiyet ve Boy Tahmini”, *Ankara Üniversitesi, Dil Tarih Coğrafya Fakültesi Antropoloji Dergisi*, 28. Sayı, Ankara.
2. Acar,E., (2015), “Giresun/Khalkeritis (Aretias) Adası Nekropolü ve İskeletlerin Paleoantropolojik Analizi, *Yüksek Lisans Tezi*”, *Selçuk Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü*, Konya.
3. Adler, CJ., Et al, (2011), “Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones”, *Journal and Archeological Science*, 38;956-964.
4. Akbaba, A., (2012), “Moleküler Antropolojide Antik DNA (aDNA) Çalışmaları ve Kontaminasyon Problemleri”, *Yüksek Lisans Tezi*, *Ahi Evran Üniversitesi*, Kırşehir.
5. Akış, I., (2014), “Antik DNA Çalışmaları ve Türkiye”, *Journal of Cell and Molecular Biology* 12(1&2):1-9, Haliç University, Printed in Turkey.
6. Alakoç, YD., (2007), “Diş dokularından DNA analizi ile cinsiyet tayini ve sonuçların odontometrik veriler ile karşılaştırılması”, *Doktora Tezi*, *Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
7. Allen, M., Et al., (1993), “Genetic typing of HLA class II genes in Swedish populations application to forensic analysis”, *Journal Forensic Sciences*, 38 (3):554-70.
8. Altunçul, H., (2001), “Kemik Dokudan DNA Çekitleme ve Tipleme Yöntemleri”, *Doktora Tezi*, *İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı*, İstanbul.
9. Ambers, A., Et al., (2016), “Modified DOP-PCR for improved STR typing of degraded DNA from human skeletal remains and bloodstains”, *Legal Medicine* 18 ,7–12, Published by Elsevier Ireland Ltd.
10. Anderson, RR., (2005), “DNA Degradation and Postmortem Interval:Preliminary Observations and Methods”, *Master Theses*, *University of Tennessee*, Knoxville, USA.
11. Anderung, C., Et al., (2005), “Prehistoric contacts over the Straits of Gibraltar indicated y genetic analysis of Iberian Bronze Age cattle”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102,8431-8435.
12. Arıhan, SK., (2013), “Beybağ Mevkii (Muğla) Bizans Dönemi Toplumunda Beslenmeye Bağlı Gelişen Paleopatolojik Rahatsızlıklar”, *Doktora Tezi*, *Ankara Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Antropoloji Anabilim Dalı*, Ankara.
13. Balogh, MK., Et al., (2003), “STR genotyping and mtDNA sequencing of latent fingerprint on paper”, *Forensic Science International*, 137 188–195.

14. Barners, I., Thomas, MG., (2006), ‘Evaluating bacterial pathogen DNA preservation in museum osteological collection’, *Proceeding of the Biological Sciences*, 273:645-653.
15. Barnett, R., Larson, G., (2012), ‘A phenol-chloroform protocol for extracting DNA from ancient samples’, *Methods Mol Biol.* 2012;840:13-9. doi: 10.1007/978-1-61779-516-9_2.
16. Baron, H., Hummel, S., Herrmann, B., (1996), ‘Mycobacterium tuberculosis complex DNA in ancient human bones’, *Journal of Archaeological Science*, 23: 667-671
17. Bayraktar, E., (2014), ‘Adli Antropoloji,’*Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı, İzmir.*
18. Belak, S., Ballagipordany, A., (1993), ‘Experiences on the Application of the Polymerase Chain-Reaction in a Diagnostic Laboratory’, *Molecular and Cellular Probes* 7(3):241-248.
19. Bilgiç, H., Et al., (2016), ‘Ancient DNA from 8400 Year-Old Çatalhöyük Wheat:Implications for the Origin of Neolithic Agriculture’, *PLoS one*, 11, E0151974.
20. Black, TK., (1978), ‘A New Method for Assessing the Sex of Fragmentary Skeletal Remains: Femoral Shaft Circumferenc’, *American Journal Physical Anthropology*; 48: 227-232.
21. Bollongino, R.,Vigne, JD., (2008), ‘Temperature monitoring in archaeological animal bone samples in the Near East arid area, before, during and after excavation’, *Journal Archaeological Sciences*, 34 (4), 873–881.
22. Boom, R., Et al., (1990), ‘Rapid and simple method for purification of nucleic acids’, *Journal Clinical Microbiology*, 28:495-503.
23. Bourke, M.,Et al., (1999), ‘NaOH treatment to neutralize inhibitors of Taq polymerase’, *Journal Forensic Sciences*, 44(5):1046-50.
24. Bouwman, AS., Chilver, ER., (2006), ‘Brief communication:Identification of the authentic ancient DNA sequence in a human bone contaminated with modern DNA’, *American Journal of Physical Anthropology*, Volume 131, Issue 3, p: 428–431.
25. Bozkaya, F., (2012), ‘DNA İzolasyonunda Fenol-Kloroform Yerine Potasyum Asetat Kullanımının DNA Miktarı ve Kalitesi Üzerine Etkisi’,*Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakülte Dergisi*,1(2):92-96.
26. Brown,WM., George, M.,Wilson, AC., (1979), ‘Rapid evolution of animal mitochondrial DNA’, *Proc Natl Acad Sci, USA* 76, 1967–197.
27. Brown,TA., Brown, KA, (1992), Ancient DNA and the archaeologist, *Antiquity*, 66:10-23.

28. Budowle, B., (1996), "Methods for typing the STR typing laboratories, In:Carracedo", A., Brinkmann, B., Bar, W., editors. *Advances in Forensic Haemogenetics*, 6.Berlin: Springer-Verlag,p:107-14.
29. Budowle, B., (2014), "DNA Typing of Bone Samples" Personel communication, October 03-06, Prague;Conference .
30. Buikstra, JE., Ubelaker, DH., (1994), *Standards: For Data Collection From Human Skeletal Remains*, Arkansas Archeological Survey Research Series No: 44.
31. Buikstra, JE., (1999), *Paleoepidemiology of tuberculosis in the Americas*, In:Palfi G, Dutour, O., Deak, J., Hutás, I., editors. *Tuberculosis: Past and Present*. Budapest-Szeged:Golden Book-TB Foundation.
32. Burger, J., Et al., (1999), "DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains," *Electrophoresis*, 20, 1722–1728.
33. Bär,W., Et al., (1988), "Postmortem Stability of DNA",*Forensic Science International*, 39(1):59-70.
34. Cann, RL., Stoneking, M., Wilson, AC., (1987), Mitochondrial DNA and human evolution, *Nature*, 325, 31-36.
35. Caramelli, D., Et al., (2003), "Evidence for a genetic discontinuity between Neandertals and 24,000-year-old anatomically modern Europeans", *PNAS*, Vol 100, no:11 6593–6597.
36. Cattaneo, C., Et al., (1997)," Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplication of three different gene sequences", *Journal Forensic Sciences*, 42(6):1126-35.
37. Cavalli-Sforza, LL., Bodmer, WF., (1999), "The genetics of human populations", New York: *Dover Publications*, Inc.
38. Caviedes-Bucheli, JJ., Et al.,(2006), "Quantification of lactate-dehydrogenase and cell viability in postmortem human dental pulp", *Journal of Endodontia*, 32, 183–185.
39. Cemper-Kiesslich, J., Coy, MR., Kanz,F., (2014), "Ancient DNA and Forensic Mutual Benefits:A Practical Sampling and Laboratory Guide Through a Virtual Ancient DNA Study", *Adli Tıp Bülteni*, 19(1)-14.
40. Collins, MJ., Et al., (2002), The survival of organic matter in bone:a revie, *Archaeometry*, 44:383-394.
41. Crainic, K., Et al., (2002), "Skeletal Remains Presumed Submerged in Water for Three Years Identified Using PCR-STR Analysis", *Journal of Forensic Sciences*, 47(5):1-3.
42. Çavuşoğlu, R., Biber, H., Başar, F., (2008), 2004-2007Yılları Van-Kalecik Kalecik Kazıları, *30.Kazı Sonuçları Toplantısı*, 1.Cilt 26-30 Mayıs, Ankara s: 269-289.

43. Çeker, D., (2014), ‘‘Adli Antropolojide Perimortem ve Postmortem Kırıkların Ayrımı ve Travma Analizlerindeki Önemi’’, *Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih Coğrafya Fakültesi Antropoloji Dergisi*, 27 s:047-064.
44. Çırak, A., (2009), ‘‘Kelenderis İskeletlerinin Paleoantropolojik Analizi ve Anadolu Toplumları Arasındaki Yeri’’, *Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Antropoloji Anabilim Dalı*, Ankara.
45. Chilvers, ER., Et al., (2008), ‘‘Ancient DNA in human bones from Neolithic and Bronze Age sites in Greece and Crete’’, *Journal Archaeological Sciences*, 35:2707-2714.
46. Dağtaş Diltaş, N., (2013), ‘‘Kısa bir antik DNA bölgesi ve bu bölgenin Güneydoğu Anadolu’daki koyunların mitokondriyal DNA haplogrupların belirlenmesinde kullanımı’’, *Yüksek Lisans Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü*, Ankara.
47. Damgaard, PdB., Et al., (2015), ‘‘Improving Access to endogenous DNA from human teeth and the impact of common decontamination measures’’, *Ivestig Genetics*, 4:18-18.
48. Daskalaki, E., (2004), ‘‘Archaeological Genetic-Approaching Human History through DNA Analysis’’, *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 1101, Uppsala University, Swedish*.
49. Doksanaltı, EM., Mimiroğlu, ĞM., Güleç, H., (2011), Giresun (Aretias-Khalkeritis) Adası Kazısı Ön Rapor: Anadolu ve Çevresinde Ortaçağ, *AKVAD*, Ankara, s: 163- 184.
50. Doksanaltı, EM, Aslan, E., (2012), Karadeniz’de Antik Bir Ada Yerleşimi: Aretias-Khalkeritis Adası, Stratonikeia’dan Laginaya - Ahmet Adil Tırpan Armağanı / From Stratonikeia to Lagina – qa.
51. Dwyer, DN., Saksena, N., (1992), Failure of ultra-violet irradiation and autoclaving to eliminate PCR contamination, *Molecular and Cellular Probes* 6(1):87-88.
52. Edson, SM., Et al., (2009), ‘‘Sampling of the cranium for mitochondrial DNA analysis of human skeletal remains’’, *Forensic Sciences Int-Gen*, 2:269-270.
53. Eshleman, J., (2002a), ‘‘MtDNA and population movements in prehistoric western North America’’, *American Journal Physical Anthropology*, [Suppl]34:68.
54. Faerman, M., Et al., (1995), ‘‘Sex identification of archaeological human remains basen on amplification of the X and Y amelogenin alleles’’, *Genetics*, 29;167(1-2):327-32.
55. Faerman, M., Et al., (1998), ‘‘Determining the Sex of Infanticide Victims from the Late Roman Era through Ancient DNA Analysis’’, *Journal of Archaeological Science*, 25:861-865.

56. Filon, D., Et.al., (1995), Sequence analysis reveals a β -thalassaemia mutation in the DNA of skeletal remains from the archaeological site of Akhziv, Israe, *Nature Genetics* 9:365-368.
57. Fischer, EP., (2005), *Genler ve Genom, İnkilap Kitabevi*, I SBN 975-10-2415-3.
58. Fischer, DL., (1993), ‘Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone’, *Journal of Forensic Sciences*, 38, pp: 60–68.
59. Fox, JC., Et al., (1991), Eliminating PCR Contamination- is UV Irradiation the Answer, *Journal of Virological Methods*, 33(3):375-382.
60. Frisch,T., Et al., (1998), Volume-Referent Bone Turnover Estimated From the Interlabel Area Fraction After Sequential Labelling, *Bone* 22:667-682.
61. Gamba, C., Et al., (2014), ‘Genome flux and stasis ina five millennium trnasect of European prehistory’, *Nat Comm*, 5:1-9.
62. Gefrides, LA., Et al., (2010), ‘UV irradiation and autoclave treatment for elimination of contaminating DNA from laboratory consumables’, *Forensic Sci Int Genet*, 4:89-94.
63. Gilbert, MTP., Et al., (2003), ‘Long-term survival of ancient DNA in Egypt:Response to Zink and Nerlich’, *J. Phys Anthropol*, 128:110-114. PMID:15714514.
64. Gilbert, MTP, Et al., (2005), ‘Assessing ancient DNA studies’, *Trends Ecol Evol* 20.541–4.
65. Goodyear, P., Et al., (1994), ‘A reliable method for the removal of co-purifying PCR inhibitors from ancient DNA’, *Biotechniques*;16 (2):232-5
66. Götherström, A., Liden, K., (1996), ‘A modified DNA extraction method for bone and teeth’, *Laborativ Arkeolog*, 9, pp: 53-56
67. Gözlük, P., (1998), ‘Klazomenia İskeletlerinin Paleoantropolojik Açidan Değerlendirilmesi’, *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Antropoloji Anabilim Dalı*, Ankara
68. Green, RE., Et al., (2010), ‘A draft sequence of the Neanderthal genome’, *Science* 328:710-722
69. Gusta,D., White,TD., (1996), ‘On the use of skeletal collections for DNA analysis’, *Ancient Biomolecules*, 1 89–92.
70. Gural,D., (2007), ‘Arkeolojide Biyolojik Yöntemler: aDNA’, *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İstanbul*.

71. Hagelberg, E., Clegg, J., (1991), ‘Isolation and characterisation of DNA from archaeological bone’, *Proceeding of the Royal Society of London Series B244*, s: 45-50.
72. Handt, O., Et.al., (1994), Ancient DNA: methodological challenges, *Experientia* 50:524-529, DOI: 10.1007/BF01921720.
73. Handt, O., Et al., (1996), ‘The retrieval of ancient human DNA sequences’, *American Journal Human Genetics*, 59, 368–376.
74. Hanni, C., Et al., (1995), ‘Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts’, *Nucleic Acids Res*, 23:881–882.
75. Hannison, CM.,Foley, BP., (2007), ‘Ancient DNA fragments inside Classical Greek amphoras reveal cargo of 2400-year-old shipwreck’, *Journal of Archaeological Science*, 35, 1169–1176.
76. Hardy, C., Et al.,(1995), ‘Rabbit Mitochondrial DNA Diversity from Prehistoric to Modern Times’, *Journal Molecular Evolution*, 40:227-237.
77. Harrison, RF., (1989), ‘Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology’, *Trends Ecol Evol*, 4:6–11.
78. Hasan, MM., Et al, (2014), ‘An Efficient DNA Extraction Method From Bone And Tooth SamplesY Complete Demineralization Followed By The Use Of Silica-Based Columns’, *Dhaka Univ. Journal Biological Sciences*, 23(2): 101-107.
79. Hedges, REM., Millard, A.R., (1995), ‘Bones and Groundwater: Towards the Modelling of Diagenetic Process’, *Journal of Archaeological Science*, 22, 155–164.
80. Herrmann, B., Hummel, S., (1997), ‘Genetic analysis of past populations y aDNA studies’, In *Advances in Research on DNA Polymorphisms (IFFH Harkone Symposium Committee, eds)*, 33-47.
81. Herná ndez, M., Fox.CL., Garcí ‘a-Moro, C., (1997), ‘Fuegian cranial morphology: the adaptation to a cold, harsh environment’, *American Journal Physical Anthropology* ,103:103–117.
82. Higgins, D., Austin, JJ., (2013), ‘Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review’, *Science&Justice*, Volume 53, Issue 4, December Pages 433–44.
83. Higuchi, R., Et al., (1984), ‘DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family’, *Nature*, 312: 282–284.
84. Hochmeister, MN., Et al., (1991), ‘Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone human remains’, *Journal of Fronsic Sciences*, 36,1649-1661.
85. Hofreiter, M., Et al., (2004), ‘Evidence for reproductive isolation between cave bear populations’, *Curr. Bio*, 14:40-43.

86. Higuchi, R., Et al., (1984), ‘‘DNA sequences from quagga, an extinct member of the horse family’’, *Nature*, 312:282-284.
87. Höss, M., Pääbo, S., (1993), ‘‘DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method’’, *Nucleic Acids Res*, 21, 3913–3914.
88. Höss, M., Et al., (1996), DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues, *Nucleic Acids Res*, 24(7): 1304-1307.
89. Hummel, S., Et al., (1995), ‘‘aDNA: a new approach to old questions’’, *Z. Morphol. Anthropol.*, 81,41-65.
90. Hummel, S., Et al., (2000), ‘‘Evaluation of morphological sex determination by molecular analyses’’. *Anthropol Anz*, 58.9–13.
91. Hummel, S., (2003), ‘‘Ancient DNA typing: methods, strategies and applications’’, Berlin, Germany: Springer.
92. Hänni, C., Et al., (1995), ‘‘Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts’’, *Nucleic Acids Research*, 23, 881–882.
93. Höss, M., Et al., (1996), ‘‘Molecular phylogeny of the extinct ground sloth *Myiodon darwini*’’, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 181–185.
94. Ivanov, PL., Isaenko, MV., (1999), ‘‘Identification of human decomposed remains using the STR systems: effect on typing results’’, In *Proceeding of the Second European Symposium on Human Identification*, Promega Corporation, Innsbruck, Austria.
95. İmamoğlu, Ö., Karapirli, M., Akboyun, N., (2011), ‘‘Diş Örneklerinden DNA Elde Edilme Metodlarının Karşılaştırılması ve Adli Bilimler Açısından Değerlendirilmesi’’ *Adli Tıp Dergisi*, Cilt / Vol.:26, Sayı / No:1
96. İyras, HM., Doğan, YD., (2015), ‘‘Antik DNA çalışmaları ve karşılaşılan sorunlar’’, *Ankara Üniversitesi, Antropoloji Dergisi*, Sayı:30, s:53-60.
97. Jeffreys, AJ., (1992), ‘‘Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis’’, *Forensic Science International*, Volume 56, Issue 1, p:65-76.
98. Kadioğlu, M., (2012), Teos, *Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih Coğrafya Fakültesi, Arkeoloji Bölümü Dergisi*, Ek III.2.
99. Kaestle, FA., Smith, DG., (2001), ‘‘Ancient Native American DNA from western Nevada: implications for the Numic expansion hypothesis’’, *Am J Phys Anthropol* 115:1–12.
100. Kaestle, FA., Horsburgh, KA., (2002), Ancient DNA in anthropology: Methods, applications, and ethics, *American Journal Physical Anthropology*. 2002; Suppl 35:92-130.

101. Kalmar,T., Et al., (2000), ‘‘A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones’’,*Nucleic Acids Res.*, 28, E67.
102. Kanz, F., Kiesslich, C., (2015), ‘‘Forensic Archeology and Anthropology in Austria, Forensic Archaeology: A Global Perspective’’, First Edition. Edited by WJ. Mike Groen, Nicholas Márquez-Grant and Robert C. Janaway.
103. Ke,WZ., (2005), ‘‘Effects of UV irradiation on calf thymus DNA in aqueous solution. A Raman spectroscopic study’’, *Journal of Raman Spectroscopy*, 36 (1):39-44.
104. Kemp, BM., Smith, DG., (2005), ‘‘Use of eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth’’,*Forensic Science International*, 154 s: 53-61.
105. Kiesslich, C., Coy, MJ., Kanz, F., (2014), Ancient DNA and Forensics Mutual Benefits: A Practical Sampling and Laboratory Guide Through a Virtual Ancient DNA Study, *Adli Tıp Bülteni* , 19(1):1-14.
106. Kimura, B., Et al., (2001), ‘‘Analysis of DNA from ethnoarchaeological stone scrapers’’, *Journal Archaeological Sciences*, 28:45–53.
107. Kirsanow, K., Burger, J., (2012), ‘‘Ancient human DNA’’, *Annals of Anatomy*, 194: 121-132.
108. Kolman, CJ., Tuross, N., (2000), ‘‘Ancient DNA analysis of human population’’, *American Journal Physical Anthropology*.111(1):5-23.
109. Konyar, E., Et al., (2013), Eski Van Şehri Kalesi ve Höyüğü Kazıları 2012 Çalışmaları, 35. Kazı Sonuçları Toplantısı, 2. Cilt, 27-31 Mayıs Muğla, s: 358-370.
110. Konyar, E., Et al., (2015), Eski Van Şehri,Kalesi ve Höyüğü 2014 Yılı Kazı Çalışmaları, 37. Kazı Sonuçları Toplantısı, 2. Cilt, 11-15 Mayıs Erzurum, s: 573-590.
111. Kotan, D., (2010), ‘‘Silika Metodu ile Kemikten DNA Ekstraksiyonu, Yüksek Lisans Tezi’’,Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adli Tıp Anabilim Dalı, Adana.
112. Krause, J., Et al., (2010), ‘‘A Complete mtDNA Genome of an Early Modern Human from Kostenki, Russia’’, *Current Biology*, 20, 231-236, Elsevier Ltd All rights reserved DOI 10.1016/j.cub.2009.11.068.
113. Krings, MA.,Et al., (1997), ‘‘Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans’’, *Cell Published by Elsevier, Inc.* 90:19-30.
114. Krings, M., Et al., (2000), ‘‘A view of Neandertal genetic diversity’’,*Natura Genetics*, 26.144-146.
115. Krogman, WM., İşcan, MY., (1986), ‘‘The Human Skeleton in Forensic Medicine, Second Edition, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, İllionis.

116. Krüttli, A., Et al., (2014), ‘Ancient DNA analysis reveals high Frequency of European Lactase Persistence Allele (T-13910) in Medieval Central Europe’, *Plos one*, 9:e86251.doi:10.1371.
117. Kolmar, T.,(2000), ‘A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones’, *Nucleic Acids Res*, 28: E67.
118. Kuhn, S.L., (2002), ‘Paleolithic Archeology in Turkey’, *Evolutionary Anthropology* 11: 198-210.
119. Kurosaki, K., Et.al., (1993), ‘Individual identification from ancient human remains’, *Am J Hum Genet*, 53:638-64.
120. Lalueza-Fox, C., Gilbert, MT., (2011), ‘Paleogenomics of archaic hominins’, *Curr Biol*, 21, R1002-1009.
121. Larson, G., Et al., (2005), ‘Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication’, *Science*, 307,1618-1621.
122. Larson, G., Et al., (2007), ‘Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe’, *Proc Natl Acad Sci, USA*, 104,15276-15281.
123. Larson, G., Et al., (2012), ‘Rethinking dog domestication by integrating genetics’, archeology, and biogeography, *Proc Natl Acad Sci, USA*; 109, 8878-8883.
124. Lassen, C., Hummel, S., Herrmann, B., (2000), ‘Molecular sex identification of stillborn and neonate individuals (“Traufkinder”) from the burial site Aegerten’, *Anthropol Anz*, 58:1–8.
125. Leney, MD., (2006), ‘Sampling Skeletal Remains for Ancient DNA (aDNA):A Measure of Success Historical Archaeology’, *Remains of the Day: Forensic Applications in Archaeology*, pp. 31-49.
126. Leo, DD., Turrina, S., Marigo, M., (2000), ‘Effects of individual dental factors on genomic DNA analysis’, *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 21 411–415.
127. Lindahl, T., (1993), ‘Instability and Decay of the Primary Structure of DNA’, *Nature*, 362:709-715; doi:10. 1038/362709a0.
128. Llamas, B., Et al., (2016), ‘Human Evolution: a tale from ancient genomes’, *The Royal Society*, DOI: 10.1098/rstb.2015.0484.
129. Loreille, OM., Et al., (2007), ‘High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization’, *Forensic Science International, Genetics* 1, pp: 191–195.

130. Lowery, RK., Et al., (2013), ‘‘Neanderthal and Denisova genetic affinities with contemporary humans:introgression versus common ancestral polymorphisms’’,*Gene* Volume 530, Issue 1, 530,83-94.
131. Malaver, PC., Yunis, JJ., (2003), ‘‘Different dental tissues as a source of DNA for human identification in forensic cases’’, *Croatian medical Journal*, 44:306-309.
132. Marks, J., (2002), ‘‘What is molecular anthropology?’’What can it be?, *Evolutionary Anthropology:Issues, News, and Rewievs*;
133. McKusick,VA., (1991), ‘‘Lincoln, Abraham and Marfan-syndrome’’,*Nature* 352:280.
134. Miller, SA., Dykes, DD., Polesky, HF., (1988), ‘‘A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells’’,*Nucleic Asids Res.*, 16:1215.
135. Mittnik, A., Et al., (2016), ‘‘A Molecular approach to the Sexing of the Triple Burial at the Upper Paleolithics Site of Dalni Vestonice’’, *PLOS One*, v:11 (10) e0163019.
136. Mulligan, CJ., (2005), ‘‘Isolation and Analysis Of DNA from Archaeological, Clinical, and Natural History Specimens, Methods In Enzymology’’ ,Vol 395, *Elseiver*.
137. Mullis, K., Et al., (1986), ‘‘Spesific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction’’,*Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 51:263-271.
138. Neiderhauser, C., Et al., (1994), ‘‘Reliability PCR Decontamination Systems’’, PubMed, *PCR Methods and Applications*, 4, 117-123.
139. Nielsen-Marsh, C., Hedges, REM., (2000), ‘‘Patterns of Diagenesis in Bone I: The Effects of Site Environments’’, *Journal of Archaeological Science*, 27, 1139–1150.
140. Nielsen-Marsh, CM., Hedges, REM., (2000a), ‘‘Pattern of diagenesis in bone I:the effects of site environments’’, *Journal Archaeology Sci*, 27: 1139-1150.
141. Nielsen, K., Et al., (2008), ‘‘Comparision of five DNA quantification methods’’, *Forensic Science International Genetics*, 2:226-230.
142. Noonan, J., Et al., (2006), ‘‘Sequencing and analysis of Neanderthal genomics DNA’’, *Science* ,DOI: 10.1126/1131412.
143. Ortner, DJ., Putschar, WGJ., (1981), ‘‘Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains’’,Washington. DC., Smithsonian Institution Press.
144. Otağ, İ., Çimen, M., (2003), ‘‘Femurdan Morfometrik Yöntemlerle Cinsiyet Tayini’’, *Cumhuriyet Üniversitesi,Tıp Fakültesi Dergisi*, 25(4):165-170.
145. Ovchinnikov, IV., Et al., (1998), ‘‘Molecular analysis of Neanderthal DNA from the norhern Causacus’’,*Nature*, 404:490-493; DOI:10.1038/3500662.

146. Özcan, ŞŞ., (2010), ‘‘Arkeolojik Toplumlarda Akrabalık İlişkileri: Bir Moleküler Antropolojik Yaklaşım’’, *Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Ana Bilim Dalı, İstanbul.*
147. Özdemir, S., (2008), ‘‘Minnetpınarı İskeletlerinin Paleopatolojik Açından Analizi’’, *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Paleoantropoloji Anabilim Dalı, Ankara.*
148. Öztaner, SH., Et al., (2014), Nysa Ad Maeandrum’daki Yeni Bulgular Üzerine Bir Değerlendirme, içinde_ In Memoriam Filiz Öktem, *Ankara Üniversitesi Yayınları No:415, Dil ve Tarih Coğrafya Fakültesi, Eskiçağ Dilleri ve Kültürleri Bölümü Latin Dili ve Edebiyatı Anabilim Dalı Yayınları, No:440,s: 225-245.*
149. Poinar, HN., Et al., (1998), ‘‘Molecular coproscopy:dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*’’,*Science*, 281:402-406.
150. Poinar, HN., Et al., (2006), ‘‘Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA’’,*Science*, 311, 392–394.
151. Polat, MA., (2013), ‘‘Türkiye’de Antropolojinin Başlaması ve Gelişimi’’, e-toraks dergisi.
152. Parr, RL, Carlyle, SW, Q’Rourke DH, (1996), ‘‘Ancient DNA analysis of Fremont Amerindians of the Great Salt Lake Wetlands’’, *American Journal of Physical Anthropology*, 99:507-518.
153. Parsons, TJ., Weedn, VW., (1996), Preservation and recovery of DNA in postmortem specimens and trace samples, In :Haglund WD, Sorgy MH, editors. *Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remains*. Boca Raton, FL: CRC Press.
154. Parsons, TJ., (2007), Application of novel ‘‘mini-amplicon’’ STR multiplexes to high volume casework on degraded skeletal remains, *Forensic Science International, Genetics* 1 pp: 175–179.
155. Pääbo, S., (1985), ‘‘Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA’’, *Nature*, 314, 644 – 645,10,1038/314644a.
156. Pääbo, S., Et al., (2004), ‘‘Genetic analyses from ancient DNA’’, *Annual Review Genetics*, 38: 645-679.
157. Perry,WL., Et al., (1988), ‘‘The Autodegradation of Deoxyribonucleic Acid (DNA) in Human Rib Bone and Its Relationship to the Time Interval Since Death’’, *Journal of Forensic Sciences*, 33(1):144-153.
158. Pfeiffer, H., Et al., (1999), ‘‘Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth’’, *International Journal of Legal Medicine*, 112, pp: 142–144.
159. Pinhasi, R., Et al., (2015), ‘‘Optimal Ancient DNA Yields from the Inner Ear Part of the Human Petrous Bone’’, *PLOS one*.

160. Poinar, HN. Et al., (1996), ‘‘Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA’’, *Science*, 10;272(5263):864-6.
161. Poinar, HN., Et.al., (2001), ‘‘A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans’’, *Proc Nat Acad Sci, USA* 98:4317-4322.
162. Prado, V., Et al., (1997), ‘‘Extraction of DNA from human skeletal remains: practical applications in forensic sciences’’, *Genetic Anal-NCBI*, 14(2):41-4.
163. Prince, AM., Andrus, L., (1992), ‘‘PCR how to kill unwanted DNA’’, *Biotechniques-NCBI*, s: 358-360.
164. Prinz, M., Et al., (2007), ‘‘DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI)’’, *Forensic Science Int-Genetics*, 1:3-12.8.
165. Pruvost., Et al., (2007), ‘‘Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA’’, *PNAS published online*, DOI:10.1073/pnas.0610257104.
166. Q’Rourke, DH, Carlyle, SW, Parr RL, (1996), Ancient DNA: methods, progress, and perspectives, *American Journal Hum an Biological*, 8.557-571.
167. O’Rourke, DH., Hayes, MG., Carlyle, SW., (2000a), Ancient DNA studies in physical anthropology, *Annual Review Anthropolical*, 29.217–242.
168. O’Rourke, DH., Hayes, MG., Carlyle, SW., (2000b), ‘‘Spatial and tem-poral stability of mtDNA haplogroup frequencies in Native North America’’ *Human Biological*, 72.15–34
169. Ramirez, F., Et al., (1993), ‘‘The Fibrillin-Marfan syndrome connection’’, *Bioessays-NCBI*, 15.589–594.
170. Rasmussen, M., Et al., (2014), ‘‘The genome of a Late Pleistocene human from a Clovis burial site in western Montana’’, *Nature*, 506:225-229.
171. Raoult, D., Et al., (2000), Molecular Identification ‘‘by suicide PCR’’ of *Yersinia pestis* as the agent of Medieval Black Death, *PNAS*, published online, DOI: 10.1073/pnas.220225197.
172. Reese, RL., Et.al., (1996), ‘‘Ancient DNA from Texas pictographs’’, *Journal Archaeological Science*, 23:269-277.
173. Reich, D., Et al., (2010), ‘‘Genetics history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia’’, *Nature*, 468, 1053-1060.
174. Reilly, PR., (2000), ‘‘Abraham Lincoln’s DNA and other adventures in genetics’’, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
175. Renaud, G., Et al., (2015), ‘‘Schmutzi: estimation of contamination and endogenous mitochondrial consensus calling for ancient DNA’’, *Genome Biology*, 16:224.

176. Richards, M.B., Sykes, B.C., Hedges, R.E.M., (1995), ‘‘Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains’’, *Journal Archaeological Science*, 22, s: 291-299.
177. Rizzi, E., Et al., (2012), ‘‘Ancient DNA Studies :new perspectives on old samples’’, *Genetics Selection Evolution*, 44: 21.
178. Rogan, P.K., Salvo, J.J., (1990), Study of nucleic acids isolated from ancient remains, *Yearbook of Physical Anthropology*; 33:195-214.
179. Rohland, N., Hofreiter, M., (2007a), ‘‘Ancient DNA extraction from bones and teeth’’, *Nature Publishing Group*, Vol.2 No.7
180. Rohland, N., Hofreiter, M., (2007b), ‘‘Comparison and optimization of ancient DNA extraction’’, *Biotechniques NCBI*, 42, 343–352.
181. Roux, K.H., (1995), ‘‘Optimization and troubleshooting in PCR’’, *PCR methods and Applications*, 4,185-194.
182. Rothschild, B.M., Et.al., (2001), ‘‘*Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present’’, *Clinical Infection Diseases* 33:305-311.
183. Rubio, L., Et al., (2009), ‘‘Study of short- and long-term storage of teeth and its influence on DNA’’, *Journal of Forensic Sciences*, 54 ,1411–1413.
184. Rubio, L., Et al., (2013), ‘‘Time-dependant changes in DNA stability in decomposing teeth over 18 months’’, *Journal Acta Odontologica Scandinavica*, Volume 71, Issue 3-4.
185. Saiki, R.K., Et al., (1988), ‘‘Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase’’, *Science*, 239 (4839):487-91.
186. Sakar, G., Sommer, S.S., (1990), ‘‘Shedding light on PCR Contamination’’, *Nature* 34:327; doi:10.1038/343027a0.
187. Salo, W.L., Et.al., (1994), ‘‘*Mycobacterium tuberculosis* DNA in apre-Columbian Peruvian mummy’’, *Proc Natl Acad Sci, USA* 91:2091-2094.
188. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989), *Molecular cloning: a laboratory guide*. 2nd ed. Salem, MA: Cold Spring Harbor Lab-oratory Press.
189. Schmerer, W.M., (2011), ‘‘Optimized DNA extraction from ancient human bones improves the reproducibility of STR genotyping of highly degraded ancient DNA’’, *Technical Tips Online*, Vol.6, *Elsevier*, Science Ltd.
190. Schoeninger, M., Moore, K., Kingston, M.M., (1989), ‘‘Detection of bone preservation in archaeological and fossil samples’’, *Applied Geochemistry*, Vol 4 pp: 281-289.

191. Schultes, T., Hummel, S., Herrmann, B., (1999), Amplification of Y-Chromosomal STRs From Ancient Skeletal Material, *Human Genetics*, 104:164-166.
192. Shanks, OC., Et al., (2001), ‘‘Recovery of protein and DNA trapped in stone tool microcracks’’, *Journal Archaeological Science*, 28:956–972.
193. Svensson, EM., Et al., (2007), ‘‘Tracing genetic change over time using nuclear SNPs in ancient and modern cattle’’, *Anim Genet*, 38,378-383.
194. Shibata,D., Et.al., (1988), Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin-tissue sections: a bridge between molecular biology and classical histology, *Cancer Research*, 48:4564-4566.
195. Shinoda, K., Adachi, N., (2017), ‘‘Ancient DNA Analysis of Palaeolithic Ryukyu Islanders’’, *New Perspectives in Southeast Asian and Pasific Prehistory* Edt.by Piper,P., Matsumura, H., published y Anu Press.
196. Shiroma, CY., Et al., (2004), A minimally destructive technique for sampling dentine powder for mitochondrial DNA testing, *Journal of Forensic Sciences*, 49, 1–5.
197. Simon, M., (1998), *Archeology of Human Bones*, RoutledgeUK, London. s:42-206.
198. Singh, J., Garg, A., (2014), ‘‘Ancient DNA Analysis And Its Probable Applications In Forensic Anthropology’’, *Journal Punjab Acad Forensic Medicine Toxicology*, 14.
199. Skoglund, P., Et al., (2014), ‘‘Separating endogenous ancient DNA from modern day contamination in a Siberian Neandertal’’, *Proc Natl Acad Sci*, 111(6): 2229–2234.
200. Somma, M., Querci,M., (2004), *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*,The Polymerase Chain Reaction (PCR), Session 6,JRC.
201. Stone, A., Et al, (1996), ‘‘Sex Determination of Ancient Human Skeletons Using DNA’’, *American Journal of Physical Anthropology*, 99:231-238.
202. Stoneking, M., (2008), *Human origins. The molecular perspective*, *Science&Society*, Vol:9, Issue S1.
203. Stoneking, M., (2016), *The Human Genome Project and Genetic Anthropology*, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
204. Sullivan, K., Et al.,(1993), ‘‘Fluorescence-basen DNA segment analysis in forensic science’’, *Biochem Soc Trans*, 21(1):116-20.
205. Taylor, GM., Et al., (2000), A medieval case of lepromatous leprosy from 13-14th century Orkney, *Scotland, Journal of Archaeological Science*, 27: 1133–1138.
206. Taubenberger, JK., Et.al., (1997), ‘‘Initial genetic characterization of the 1918 ‘‘Spanish’’ influenza virus’’, *Science*, 275:1793-1796.

207. Tekeli, E., (2010), ‘‘Arkeolojik Kazılardan Elde Edilen Organik Kalıntıların Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması’’, *Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi*, Konya.
208. Telldahl, Y., Et al., (2011), ‘‘Typing late prehistoric cows and bulls-osteology and genetics of cattle the Eketorp ringfort on the Oland island in Sweeden’’, *PLos One* 6,e20748.
209. Thalmann, O., Et al., (2013), ‘‘Complete Mitochondrial Genomes of Ancient Canids Suggest a European Origin of Domestic Dogs’’, *Science*, Vol. 342, Issue 6160, pp. 871-874.
210. Tırpan, AA., Söğüt, B., (2009), Lagina Börükçü, Belentepe ve Mengefe 2008 Yılı Çalışmaları, *31.Kazı Sonuçları Toplantısı*, 3.cilt, Denizli
211. Tilotta, F., Et al., (2010), ‘‘A comparative study of two methods of dental pulp extraction for genetic fingerprinting’’, *Forensic Science International*, 202, e39–e43
212. Turner-Walker, G., (1993), ‘‘The characterisation of fossil bone’’, *Unpublished PhD thesis, Department of Archeology, University of Durham*.
213. Turner-Walker, G., (2007), ‘‘The Chemical and Microbial Degradation of Bones and Teeth’’, *Advances in Human Paleopathology*, DOI: 10.1002/9780470724187.ch1, pp: 4-29.
214. Tuross, N., (1994), The biochemistry of ancient DNA in bone, *Experientia*, 50: 530-535.
215. Ubelaker, DH., (2008), Biological Anthropology of the Human Skeleton, Second Edition. Edited by M.Anne Katzenberg and Shelley R.Saunders, s: 41-61.
216. Usher, B., Weets, J., Wanglund, C., (2002), ‘‘Can we determine kinship systems Testing models of genetic patterns for cemetery analysis’’, *American Journal Physical Anthropology*, [Suppl] 34.159.
217. Yaka, R., (2015), ‘‘Ancient DNA Isolation And Mitochondrial DNA Analysis Of Human Samples From Çemialo Sırtı, Batman In Southeast Anatolia’’, *Master Thesis, Middle East Technical University, Biology Department*, Ankara.
218. Yang ,DY., Et al., (1998), ‘‘Improved DNA extraction from ancient bones using silica-basen spin columns’’, *American Journal of Physical Anthropology*, Volume 105, Issue 4 Pages 539–543.
219. Yang, DY.,Watt, K., (2005), ‘‘Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis’’, *Journal of Archaeological Science* 32, 331–336.
220. Yaşar, ZF., (2012), ‘‘Burdur/Kızılın Mağarası İskeletlerinin Antropolojik Açından Değerlendirilmesi’’, *Ç.Ü. Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, Cilt 21, Sayı 2, Sayfa 129-142.

221. Yılmaz, H., Et al., (2008), Van Kalecik (Urartu) Toplumunun Paleoantropolojik Analizi, 24. Arkeometri Sonuçları Toplantısı, 26-30 Mayıs, Ankara s: 29-40.
222. Yılmaz, H., Pehlevan, C., Göksal, N., (2014),“Çatak(Van)İskeletlerinin Paleopatolojik Analizi”, *International Journal of Human Sciences*, 11(2),1327-1350.
223. Yılmaz, H., (2016), ‘‘Ablanganis Erken Demir Çağ iskeletlerinde antemortem diş kaybı, Van –Türkiye’’, *International Journal of Human Sciences*, 13(1), 1731-1744.
224. Yoshii,T., Et.al., (1994), PCR inhibitor:water soluble melanin,which inhibits DNA polymerases and Dnases, In Bar W, Fiori A ,Rossi U., editors. *Advances in Forensic Haemogenetics 5*. Berlin: Springer-Verlag, p 393-4.
225. Wang, L., (2000), ‘‘Genetic structure of a 2,500-year-old human population in China and its spatiotemporal changes’’, *Molecular Biology Evolution* ,17.1396–1400.
226. Watt, K., (2005), ‘‘Decontamination Techniques In Ancient DNA Analysis’’, *Master Thesis, Simon Fraser University*.