

**ANTİK İNSAN KEMİK VE DİŞ ÖRNEKLERİNDE DNA
İZOLASYON METOTLARININ VERİMLİLİK
AÇISINDAN KARŞILAŞTIRILMASI**

**COMPARISON OF DNA ISOLATION METHODS IN
TERMS OF EFFICIENCY IN ANCIENT HUMAN BONE
AND DENTAL SAMPLES**

HAZAL TAHRAVİ

PROF. DR. HATİCE MERGEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Validem'e

ÖZET

ANTİK İNSAN KEMİK VE DİŞ ÖRNEKLERİNDE DNA İZOLASYON METOTLARININ VERİMLİLİK AÇISINDAN KARŞILAŞTIRILMASI

Hazal TAHRAVİ

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice MERGEN

Eş Danışman: Prof. Dr. Yeşim DOĞAN

Ocak 2023, 60 sayfa

Antik DNA (aDNA); ileri derecede hasara uğramış, müze örneklerinden veya kazılardan elde edilen diş ve kemik gibi materyallerdeki DNA olarak tanımlanmaktadır. Antik DNA çalışmaları ile nesli tükenen canlıların genetik dizilerinin okunması, akrabalık ilişkilerinin aydınlatılması, insan popülasyonlarının evrimsel kökeninin ortaya konması ve eski zamana ait patojenlerin dizilerinin eldesi mümkün olmuştur. PZR teknolojisinin gelişmesiyle birlikte antik DNA çalışmaları ilerlemiş ancak bu teknolojinin hassaslığı ve kontaminasyona karşı açık olması alanda yaşanan sorunların da şekillenmesine yol açmıştır. Antik DNA'nın uğramış olduğu hasar, kemik ve diş gibi materyallerden DNA eldesini zorlaştırmakta ve elde edilebilir DNA'nın uzunluğunu büyük ölçüde kısıtlamaktadır. Antik DNA'ya dair yapılan çalışmalar çok çeşitli olmakla

birlikte ilk çıkışından bu yana DNA'nın izolasyonu ve PZR başarısının iyileştirilmesi alan içerisinde önemli bir konu olmuştur. Antik DNA örneklerinin dizilerinin okunması ve diğer moleküler tayinler için örnekten başarılı bir şekilde DNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bunun için antik DNA'da sıklıkla kullanılan iki yöntem fenol-kloroform ve silika membran izolasyon yöntemleridir.

Yapılan tez çalışmasıyla silika membran ve fenol-kloroform izolasyon metodlarının verimlilik ve amplifiye edilebilir DNA uzunlukları açısından karşılaştırılması hedeflenmiştir. Mitokondriyal DNA'nın amplifikasyonu için 162 bç, 177 bç ve 218 bç boyutlarında ürün veren 3 farklı primer çifti kullanılmıştır. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda 5 adet femur, 5 adet talus ve 5 adet diş örneği kullanılarak silika membran ve fenol-kloroform izolasyonları gerçekleştirilmiş olup bu metodların farklı örnek türlerindeki başarısı da karşılaştırılmıştır. Örnekler Karia Bölgesinde bulunan Stratonikeia Antik Kenti kazılarında elde edilmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda femur ve talus örneklerinin fenol-kloroform izolasyonlarında yalnızca en kısa amplikonda (162 bç) başarılı sonuç alınmıştır. Aynı örneklerin silika membran izolasyonları ise her üç amplikonda da başarılı sonuç vermiştir. Böylelikle femur ve talus örnekleri için silika membran izolasyon yönteminin hem verim hem de amplifiye edilebilir uzunluk açısından fenol-kloroform izolasyonundan daha başarılı olduğu gösterilmiştir. Diş örneklerinde ise fenol-kloroform yönteminde en kısa amplikon boyutunda yoğun bantlar elde edilmiş, silika membran yönteminde ise az yoğun ancak daha uzun amplikon (177bç) boyutlarında sonuç alınmıştır. Aynı zamanda silika membran izolasyonunda fenol-kloroform metodunun aksine dekalsifikasyona gerek olmadığı ve PZR'nin 2. kuşakta sonuç verdiği görülmüştür. Kullanılan yöntem örnek özelinde değişiklik gösterebilmekle birlikte silika membran izolasyonu fenol-kloroform izolasyonuna kıyasla daha başarılı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Antik DNA, DNA izolasyonu, mtDNA, Kontaminasyon, Polimeraz zincir reaksiyonu

ABSTRACT

COMPARISON OF DNA ISOLATION METHODS IN TERMS OF EFFICIENCY IN ANCIENT HUMAN BONE AND DENTAL SAMPLES

Hazal TAHRAVİ

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hatice MERGEN

Co- Supervisor: Prof. Dr. Yeşim DOĞAN

January 2023, 60 pages

Ancient DNA refers to DNA in severely damaged materials such as teeth and bones that come from museum specimens or excavations. The study of ancient DNA has made it possible to read the genetic sequences of extinct organisms, clarify kinship relationships, reveal the evolutionary origins of human populations, and preserve the sequences of ancient pathogens. With the development of PCR technology, the study of ancient DNA has evolved, but the sensitivity and susceptibility of this technology to contamination has also led to problems in this area. Damage to ancient DNA makes it difficult to extract DNA from materials such as bones and teeth and severely limits the length of DNA that can be recovered. Although studies of ancient DNA are diverse, isolation of DNA and improvement of PCR success have been important topics in the

field since their first appearance. Successful isolation of DNA from the sample is a prerequisite for reading the sequences of ancient samples and for other molecular determinations. For this purpose, two methods are usually used to isolate ancient DNA: phenol-chloroform and silica membrane isolation.

The aim of this work is to compare the silica membrane and phenol-chloroform isolation methods in terms of efficiency and amplifiable DNA lengths. For the amplification of mitochondrial DNA, 3 different primer pairs were used, yielding products in sizes of 162 bp, 177 bp and 218 bp. In this context, silica membrane and phenol-chloroform isolations were performed on 5 femur, 5 talus, and 5 tooth samples in the studies, and the success of these methods on different sample types was compared. The samples were obtained from the excavations of Stratonikeia Ancient City located in the Caria Region.

The experiments showed that only the shortest amplicon (162 bp) was successful in phenol-chloroform isolation of femur and talus specimens. Isolation of the same specimens with silica membranes yielded successful results for all three amplicons. Thus, the isolation method with silica membranes was shown to be more successful than the isolation method with phenol-chloroform samples for femur and talus samples, both in terms of efficiency and amplifiable length. For dental samples, the phenol-chloroform method yielded dense bands with the shortest amplicon length, whereas the silica membrane method yielded less dense but longer amplicon lengths. Although the method used may vary depending on the type of sample, silica membrane isolation was found to be more successful compared to phenol-chloroform isolation.

Keywords: Ancient DNA, DNA Isolation, mtDNA, Contamination, Polymerase chain reaction

TEŞEKKÜR

Uzun bir yolda attığım bu ilk adımda tez çalışmam boyunca ilgisi, tecrübesi ve en önemlisi gösterdiği sevgi sayesinde bu yolda neden devam etmek istediğimi bana varlığıyla hatırlatan, her fikrinde ve her sözünde bakış açımı değiştiren ve ufkumu açarak bana ilham olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hatice MERGEN'e,

Tüm bu süreç boyunca bana yol gösteren, yaşadığım her probleme bir çözüm bulan ve belki de farkında olmasa her konuştuğunda beni rahatlatan ve neşelendiren, kendisini tanıdığım için çok şanslı olduğumu düşündüğüm eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Yeşim DOĞAN'a,

Çalışmam boyunca bana gösterdiği ilgi ve destekleri için Sayın Doç. Dr. Emel SAĞLAR ÖZER'e,

Sadece akademik hayatta bana öğrettikleriyle değil, her konudaki gösterdikleri destek ile çalışma ortamımı güzelleştiren ve her gün bulunduğum yerde ne kadar şanslı olduğumu bana hatırlatan, tanıdığım günden itibaren bana sadece hoca değil yakın birer dostmuş gibi hissettiren değerli hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Beril ERDEM TUNÇDEMİR ve Doç. Dr. Sibel KÜÇÜKYILDIRIM ÇELİK'e,

Birlikte çalıştığımız tüm süre boyunca çalışma arkadaşından öte olan, her sıkıntımı ve sevincimi sanki kendilerininmiş gibi benimle birlikte yaşayan, her gün durmadan dillendirdiğim kahve isteklerimi çoğu zaman geri çevirmeyen ve hayatıma kattıkları değerler için Özgür Özdemirel ve Dilara Vaizoğlu'na,

Kısa bir süre çalışma fırsatı bulsak da bu süre boyunca bana gösterdikleri sevgi, destek ve yardımları için minnettar kalacağım Büşra Nur Şeker ve Büşra Karataş'a,

Uzakta olsa da en yakınımnda hissettiğim, her derdimi düşünmeden anlattığım ve her konuda bana desteğini bir an olsun esirgemeyen sevgili dostum Melike Keskin Fişne'ye,

Hayatımın her anında ve her alanında bana desteğini hep hissettiğim, iyi-kötü ne yaparsam yapayım en iyisini yaptığımı ve daha iyisini yapabileceğimi bana gösteren, en kötü günlerimi bile en güzel günüme çevirebilen ‘neşe kaynağım’ Mert Meriç Çelik'e ve tüm ailesine,

Son olarak hayatım boyunca bana olan sevgilerinden ve desteklerinden şüphe etmeme dahi fırsat vermeyen, tüm başarılarımın sebebi olan, her kararında arkamda duran ve isteklerime her daim saygı gösteren canım aileme ve Zoya'ya,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**BU TEZ ÇALIŞMASI HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA
PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ FYL-2021-19646 NUMARALI PROJE
TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR**

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	i
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Deoksiribonükleik Asidin (DNA) Yapısı.....	4
2.2. Antik DNA	5
2.2.1. Enzimatik Bozunma	12
2.2.2. Oksidasyon temelli bozunma	13
2.2.3. Hidrolitik bozunma	13
2.2.4. Radyasyon	15
2.2.5. DNA'nın bulunduğu ortamın diğer fiziksel ve kimyasal özellikleri	15
2.3. Antik DNA'da kontaminasyon	18
2.4. Antik DNA'da PZR inhibitörleri	20
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	22
3.1. Dekontaminasyon Uygulamaları.....	23
3.2. Örneklerin Tozlaştırılması (Pulverizasyon)	24
3.3. DNA İzolasyonu.....	25
3.3.1. Fenol-Kloroform İzolasyonu.....	25
3.3.2. Silika Membran İzolasyonu	27
3.4. Spektrofotometrik Ölçüm.....	28
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	28
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi.....	31

3.7. DNA Dizileme	31
4. SONUÇLAR.....	34
4.1. Spektrofotometre sonuçları.....	34
4.2. Agaroz jel elektroforezi sonuçları.....	35
4.2.1. Fenol-Kloroform izolasyonuna ait sonuçlar	35
4.2.2. Silika membran izolasyonuna ait sonuçlar	40
4.3. Seçili Örnekler ile Yapılan Sanger Dizileme Sonuçları	44
5. TARTIŞMA	46
6. KAYNAKLAR	55
EKLER.....	61
EK 1 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu	61
ÖZGEÇMİŞ	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bazlar arasında kurulan hidrojen bağları.	5
Şekil 2.2. DNA'nın muhtemel hasar noktaları	15
Şekil 2.3. Sitozin, Adenin, Guanin ve 5-Metilsitozin bazlarının deaminasyon reaksiyonu	15
Şekil 3.1. Şekil 3.1. Stratonikeia Antik Kenti'nin havadan fotoğrafı	22
Şekil 3.2. Dekontaminasyon öncesi kemik ve diş örnekleri	24
Şekil 3.3. Kullanılan primerlerin ve oluşan ampliconların mitokondri D-loop bölgesi üzerinde gösterimi	30
Şekil 4.1. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen femur örneklerinin A ampliconuna ait sonuçları.	36
Şekil 4.2 Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen talus örneklerinin A ampliconuna ait sonuçları.	36
Şekil 4.3 Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen diş örneklerinin A ampliconuna ait sonuçları.	37
Şekil 4.4 Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen femur örneklerinin B ampliconuna ait sonuçları.	37
Şekil 4.5. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen talus örneklerinin B ampliconuna ait sonuçları	38
Şekil 4.6. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen diş örneklerinin B ampliconuna ait sonuçları	38
Şekil 4.7. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen femur örneklerinin C ampliconuna ait sonuçları	39
Şekil 4.8. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen talus örneklerinin C ampliconuna ait sonuçları.	39
Şekil 4.9. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen diş örneklerinin C ampliconuna ait sonuçları.	40
Şekil 4.10. Silika membran yöntemi ile izole edilen femur örneklerinin A ampliconuna ait sonuçları.	40
Şekil 4.11. Silika membran yöntemi ile izole edilen talus örneklerinin A ampliconuna ait sonuçları.	41

Şekil 4.12. Silika membran yöntemi ile izole edilen diş örneklerinin A amplikonuna ait sonuçları.....	41
Şekil 4.13. Silika membran yöntemi ile izole edilen femur örneklerinin B amplikonuna ait sonuçları.....	42
Şekil 4.14. Silika membran yöntemi ile izole edilen talus örneklerinin B amplikonuna ait sonuçları.....	42
Şekil 4.15. Silika membran yöntemi ile izole edilen diş örneklerinin B amplikonuna ait sonuçları.....	43
Şekil 4.16. Silika membran yöntemi ile izole edilen femur örneklerinin C amplikonuna ait sonuçları.....	43
Şekil 4.17. Silika membran yöntemi ile izole edilen talus örneklerinin C amplikonuna ait sonuçları.....	44
Şekil 4.18. Silika membran yöntemi ile izole edilen diş örneklerinin C amplikonuna ait sonuçları.....	44
Şekil 4.19. 1014 numaralı femur örneğine ait kromatogram görüntüsü.....	45
Şekil 4.20. 1026 numaralı talus örneğine ait kromatogram görüntüsü.....	45
Şekil 4.21. 1059 numaralı talus örneğine ait kromatogram görüntüsü.....	45
Şekil 4.22. 1107 numaralı talus örneğine ait kromatogram görüntüsü.....	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. DNA üzerindeki farklı hasar tipleri	12
Çizelge 2.2. DNA'nın korunumunu sağlayan faktörler	17
Çizelge 3.5.1. Mitokondri D-loop bölgesini çoğaltmak için seçilen primerler.....	30
Çizelge 3.5.2. PZR reaksiyonu bileşenleri ve koşulu.....	31
Çizelge 3.7.1. PZR pürifikasyonu içeriği ve reaksiyon koşulları.....	32
Çizelge 3.7.2. Sekans reaksiyonu içeriği ve reaksiyon koşulları	32
Çizelge 4.1. Fenol-kloroform izolasyonunun spektrofotometre ölçüm sonuçları	34
Çizelge 4.2. Silika membran izolasyonunun spektrofotometre ölçüm sonuçları	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
μ	Mikro
°C	Santigrat derece
®	Tescilli
™	Ticari marka

Kısaltmalar

μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
A	Adenin
aDNA	Antik DNA
bç	Baz çifti
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Sitozin
Ca ⁺²	Kalsiyum
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
Exo	Ekzonükleaz
F	İleri primer
g	g-kuvveti

HCl	Hidroklorik Asit
M	Molar
mg	Miligram
Mg ⁺²	Magnezyum
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NaCl	Sodyum Klorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	Geri Primer
rCRS	Cambridge referans dizisi
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SAP	Shrimp Alkalen Fosfataz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
T	Timin
TBE	Tris-Borik asit EDTA
TE	Tris-EDTA Tamponu
U	Ünite
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Antik DNA eski diş, kemik gibi çeşitli biyolojik materyallerden elde edilen DNA olarak tanımlanmaktadır. Antik DNA alışmaları gmlerdeki örüntülerin anlaşılmasını ve cinsiyetler arası ölüm oranlarının tespitiyle farklı cinsiyetlerdeki hastalık şemasının çıkarılmasını mümkün kılmış, avlanma ve beslenme düzenlerinin, sosyal yapı, g ve evlilik kalıplarının anlaşılmasını sağlamıştır. Aynı zamanda çevresel krizlerin geçmiş zamandaki ekosistem üzerine etkilerinin görülmesi, nesli tükenen canlıların genetik dizilerinin okunması ve insan popülasyonlarının evrimsel kökeninin aydınlatılması mümkün olmuştur [1].

1984'te Higuchi ve meslektaşlarının nesli tükenmiş bir quaqqa'dan DNA izolasyonu gerçekleştirmesi ile antik DNA alanı doğmuştur [2]. Bu ilk adımın atılmasıyla birlikte müze örneklerinden ve mumyalaşmış dokulardan da çalışmalar gerçekleştirilmiş ve antik DNA alanı, yapılan çalışmalar ve sağladığı verilerle birlikte büyümeye başlamıştır. Yine de o dönemdeki moleküler tekniklerin ve teknolojinin yetersizliği çalışmaların ilerlemesini yavaşlatmıştır. Ancak polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) bulunmasıyla birlikte araştırmacılar hızlı ve etkili bir şekilde DNA üzerinde belirli bölgeleri oğaltabilmeye başlamışlardır. Yeni metotların gelişmesi ve antik DNA'da yapılan çalışmaların artmasıyla birlikte DNA eldesinin yalnızca müze örnekleri veya mumyalaşmış dokular gibi korunaklı örneklerden değil arkeolojik kazılardan elde edilen iskelet parçalarından da elde edilebildiği görülmüştür.

PZR; etkili, hızlı ancak kontaminasyona karşı hassas bir yöntemdir ve belirli bir gen bölgesinin üstel olarak çoğaltılması ilkesine dayanır. Bu uygulama her ne kadar antik DNA alanındaki çalışmaları hızlandırmış ve çeşitlendirmiş olsa da alana özgü problemleri de beraberinde getirmiştir. Antik DNA alanında karşılaşılan başlıca 3 problem vardır, bunlar; DNA degradasyonu, kontaminasyon ve PZR inhibitörleridir [3].

DNA'da gerçekleşen post mortem hasar DNA degradasyonunun en büyük sebebidir. Canlı bir organizmada DNA üzerinde farklı etkenlerden kaynaklanan çeşitli hasarlar meydana gelir ancak DNA tamir mekanizmaları tarafından bu hasarlar onarılır. Organizmanın ölümüyle birlikte tamir mekanizmaları artık çalışmaz ancak yıkıcı süreçler devam eder. Bağlardaki hidroliz, depürinasyon, deaminasyon gibi süreçler DNA'nın önemli ölçüde hasar almasını sağlar. Aynı zamanda ortamdaki nükleaz aktivitesi DNA'nın parçalanmasında önemli bir rol oynar. Nükleazların kaynağı canlının kendisi olabileceği gibi ortamdaki mikroorganizmalar da olabilir [4]. DNA'nın uğradığı bu degradasyon süreçleri örnekte az miktarda bulunan ve hasara uğramış DNA'nın eldesini ve verimli bir şekilde PZR ile amplifiye edilmesini zorlaştırır. PZR uygulamasının hassaslığı, antik DNA çalışmalarını kontaminasyona açık hale getirir. Antik DNA'nın herhangi bir sebeple modern DNA ile kontamine olması koşulunda, PZR'de modern DNA antik DNA'yı alt eder. Aynı zamanda antik DNA çalışmaları sıklıkla gömülerden alınan örneklerle yapıldığından PZR inhibitörleri araştırmacılar için önemli bir problem teşkil etmektedir. PZR inhibitörleri toprağın içerisinde veya kemiğin kendisinde bulunan maddelerden kaynaklanabilir. İnhibitörler *Taq* polimerazın aktivitesini doğrudan veya dolaylı yoldan inhibe ederek etki edebilirler. Tüm bu etkenlerin antik DNA üzerinde birlikte etki göstermesi, antik DNA çalışmalarını zor ve hassas kılmakla birlikte elde edilebilir DNA'nın kalitesini ve uzunluğunu büyük ölçüde kısıtlamaktadır [5].

Antik DNA'da yapılacak ileri analizlerden verimli sonuçlar alınabilmesi için DNA'nın örnekten başarılı bir şekilde elde edilmesi gerekmektedir. Antik DNA çalışmalarında sıklıkla karşımıza çıkan ve başarılı olduğu gösterilmiş fenol-kloroform ve silika membran izolasyon yöntemlerinin verimi ve PZR başarısı tez çalışması kapsamında karşılaştırılmıştır. Antik DNA'nın yaşı, saklanma koşulları ve diğer çevresel koşullardan kaynaklı olarak ileri derecede bozunmaya uğrayabileceği bilinmektedir. Bu durum DNA'nın çeşitli uzunluklarda parçalanması ve elde edilebilir DNA'nın kısalmasıyla sonuçlanır.

Tez kapsamında çalışılan örneklerin mitokondriyal DNA'sı farklı ampikon boyutlarına sahip 3 farklı primer çifti ile amplifiye edilmiş ve elde edilebilir DNA uzunlukları

karşılaştırılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda hem elde edilebilir DNA uzunlukları hem de izolasyon verimi kıyaslandığında silika membran izolasyon metodunun genel anlamda fenol-kloroform izolasyon metoduna göre daha verimli olduğu bulunmuştur.

“The double helix is indeed a remarkable molecule. Modern man is perhaps 50,000 years old, civilization has existed for scarcely 10,000 years and the United States for only just over 200 years; but DNA and RNA have been around for at least several billion years. All that time the double helix has been there, and active, and yet we are the first creatures on Earth to become aware of its existence.”

Francis Crick (1916–2004)

2. GENEL BİLGİLER

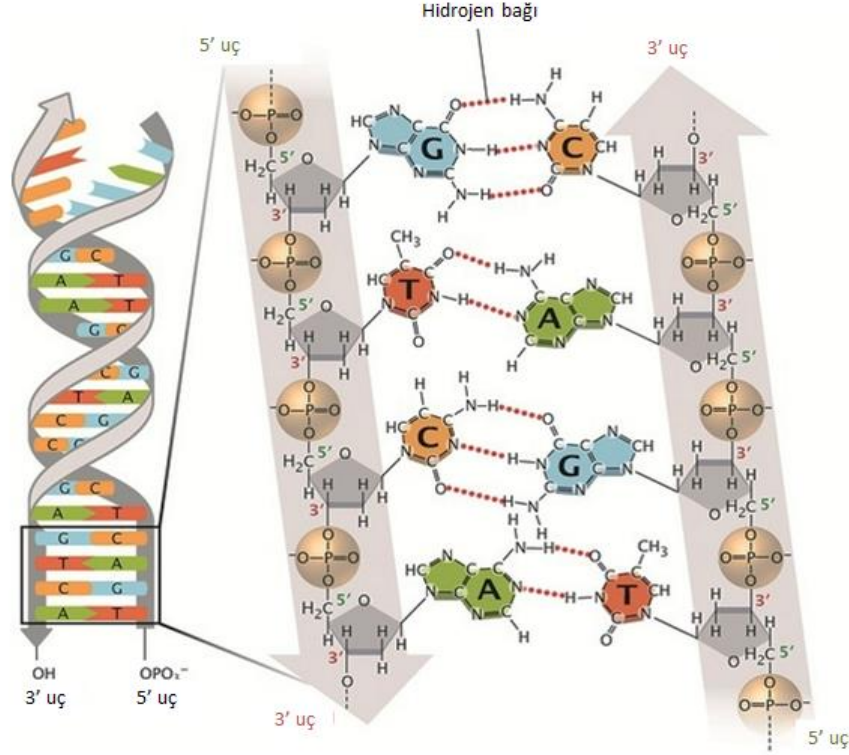
2.1. Deoksiribonükleik Asidin (DNA) Yapısı

DNA, negatif yüke sahip bir polinükleotittir ve genellikle çift sarmal yapıda bulunur. Hidrojen bağları ile birbirine bağlı ve zıt yönlerde uzanan iki iplikten oluşur ve her iplik fosfodiester bağlarıyla birbirine bağlanmış olan deoksiriboz şeker moleküllerinden oluşan bir omurga yapısına sahiptir. Doğal koşullarda DNA hidratlı bir makromoleküldür [6].

DNA molekülü; azotlu bir baz, bir pentoz şeker ve en az bir fosfat grubundan oluşan ve nükleotitler olarak isimlendirilen alt birimlerden oluşmaktadır. RNA'dakinden farklı olarak DNA'nın barındırdığı şeker 2'-deoksiribozdur ve 2' karbonuna bağlı herhangi bir hidroksil grubuna sahip değildir. DNA içerisindeki şeker ve fosfat grubu daimi olarak mevcut olduğundan, nükleotit ayrımı, içerdikleri farklı azotlu bazlar sayesinde yapılır. Bir nükleotit temelde 4 azotlu baz içerebilir, bunlardan ikisi pirimidin ve ikisi pürindir. DNA'da bulunan pürinler Adenin (A) ve Guanin (G), pirimidinler ise Timin (T) ve Sitozin (C)'dir. Pürin veya pirimidin ayırt edilmeksizin nükleotitlerin hepsi DNA'nın iki ayrı ipliğini birbirine bağlayan zayıf etkileşimli hidrojen bağının oluşması için gerekli olan nitrojen atomunu içerirler. Ökaryotik bir DNA molekülündeki her bir zincirin birbirinden ayrı uçlarında hidroksil grubuna bağlı olmayan serbest bir fosfat grubu vardır ve bu durum DNA'nın 5' ucundan 3' ucuna okunmasını sağlar [7].

Nükleotitler birbirleriyle hidrojen bağları aracılığıyla bağlanırlar. A ile T arasında 2, G ile C arasında ise 3 hidrojen bağı kurulur. DNA yapısı içerisindeki şeker molekülleri,

dışarıda kalacak şekilde bulunur ve bu durum bazların birbirleriyle hidrojen bağı kurmasını ve şeker-fosfat omurgasını oluşturmasını mümkün kılar [7] .



Şekil 2.1. Bazlar arasında kurulan hidrojen bağları ([8] numaralı kaynaktan değiştirilerek alınmıştır).

İki zincir arasında bu şekilde kurulan hidrojen bağları, kovalent bağlara kıyasla zayıf etkileşimler oldukları için DNA geri dönüştürülebilir bir şekilde ayrılabilir. Bu vesileyle DNA replikasyonu, RNA transkripsiyonu ya da DNA'nın moleküler metotlardaki kullanılabilirliği mümkün olur. Bazlar arasındaki bağlar tersinir olarak kırıldıktan sonra DNA'nın iki ipliği birbirinden ayrılır. Bu ayrılmayı gerektiren hücresel veya deneysel süreç tamamlandıktan sonra iplikler kolaylıkla yeniden bağlanabilirler. Deneysel süreçler içerisinde bu bağlar DNA'nın ısıtılması ve soğutulması ile indüklenir [7].

2.2. Antik DNA

Antik DNA (aDNA); eski diş, kemik, müze örnekleri, balık pulları ve doğal olarak mumyalanmış dokular gibi çeşitli biyolojik materyallerden elde edilen DNA olarak

tanımlanır [9]. Antik DNA bu şekilde tanımlanıyor olsa da örneklerin bulunduğu elverişsiz koşullar, elde edilecek DNA'nın yüksek oranda hasar görmüş olması ve deneysel zorluğu bakımından adli çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Bu nedenle antik DNA alanındaki çalışmalarda bozunmaya uğramış bu örneklerdeki DNA'nın eldesi için geliştirilen protokollerin adli çalışmalara da katkı sağladığı düşünülmektedir [10].

Antik DNA, ilk olarak Higuchi ve arkadaşlarının 1984 yılında yaptığı bir çalışma ile ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada soyu tükenmiş canlıların kalıntılarında DNA'nın elde edilebilirliği sorgulanmış ve 1880'lerde nesli tükenmiş bir zebra türü olduğu düşünülen quaqqa'nın müze örneklerinden DNA eldesi başarı ile gerçekleştirilmiş olup mitokondriyal genomunun bir bölümü dizilenmiştir [2, 11]. Bu çalışma bir müze örneğinden filogenetik açıdan bilgi edinilen ilk çalışma olmuştur ve quaqqa'nın filogenetik sınıflandırmasını mümkün kılmıştır [12].

Müze örneklerinden ve bir mumyadan DNA elde edilmesinin ardından antik DNA çalışmalarında yaşanan temel sorunlar ortaya çıkmaya başlamıştır [2, 13]. Bu çalışmalarla birlikte örneklerdeki elde edilebilir DNA'nın bir kısmının mikrobiyal veya fungal kökenli olduğu, endojen DNA'nın da çoğunlukla kısa, hasar görmüş fragmentler şeklinde ve mitokondriyal DNA (mtDNA) gibi çoklu kopyalar halinde bulunan DNA ile sınırlı olduğu görülmüştür. Bu çalışmalar aynı zamanda kullanılan yöntemlerin yetersizliğine de dikkat çekmiştir [14]. Böylelikle antik DNA'nın ileri boyutta hasar görmüş olduğu ve sadece korunaklı örneklerden sınırlı bir dizi bilgisinin elde edilebileceği kanısı yaygınlaşmıştır [15].

Kullanılan yöntemler ve DNA'nın bulunduğu elverişsiz koşullar, çalışmaların doğruluğunu kesin bir şekilde gösterilebilmesi için tekrarlanabilirliğini de sınırlamıştır [4]. Bu durum polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) teknolojisinin gelişmesiyle birlikte yön değiştirmiştir. PZR'nin bulunmasıyla birlikte araştırmacılar antik örneklerden izole edilen DNA'ları hızlı ve kolay bir şekilde amplifiye edip analiz etme fırsatı bulmuşlardır ve böylelikle antik DNA çalışmaları geçmişe birer pencere açmaya başlamıştır [16, 17].

PZR; DNA molekülü içerisindeki spesifik bir segmentin milyarlarca kopyasının oluşturulmasına olanak sağlayan bir tekniktir ve DNA'nın üstel olarak çoğaltılmasına (amplifikasyonu) dayanır. DNA'nın bu şekilde çoğaltılması fikri aslında ilk olarak 1974'te kimyasal gen sentezine alternatif bir fikir olarak yapılan bir çalışmada DNA'nın in vitro koşullarda çoğaltılmasıyla ortaya çıkmıştır [18, 19]. Ardından PZR olarak isimlendirilen bu teknik 1980'lerin ortasında Mullis ve arkadaşları tarafından orak hücre anemisinin teşhisi amacıyla geliştirilmiştir ve bundan yaklaşık on yıl sonra Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir [16]. PZR teknolojisi genlerin klonlanması, hastalıkların teşhisi, filogenetik çalışmalar, doğum öncesi anomalilerin tespiti gibi birçok alanda etkili olmuş ve insan genom projesi gibi önemli bir çalışmayı mümkün kılmıştır [18, 20].

Antik DNA alanında korunaklı bir biçimde saklanmış örneklerden çeşitli çalışmalar yürütülmeye devam edilmiştir. Bu çalışmalardan birinde 25-30 milyon yaşında olduğu düşünülen ve bir kehribar içine gömülü halde bulunan bir termitin mitokondriyal ve nükleer DNA dizisi okunmuştur [21]. Yeni metotların gelişmesi ve yapılan çalışmalarla birlikte antik örneklerden DNA eldesinin yalnızca korunaklı koşullarda saklanmış örneklerden değil farklı koşullarda bulunan kemik ve diş gibi nispeten korunaklı çeşitli doku tiplerinden de elde edilebileceği görülmüştür. DNA'nın elde edilebileceği örneklerin bu şekilde çeşitlenmesi, örneklerin arkeolojik ve paleontolojik yaygınlığından kaynaklanan önemli bir atılımdır [13, 15, 22-26]. Antik DNA'nın elde edilebildiği örnek grubu yalnızca bunlarla da sınırlı kalmamıştır. Paabo ve arkadaşları 7000 yıllık bir insan beyninden mitokondriyal DNA izole etmeyi başarmış ve dizilemişlerdir. Her ne kadar beyin dokusunda oluşabilecek lezyonlar ve parçalanmalar, DNA'yı yaklaşık 100 baz çifti (bç) gibi kısa segmentlere ayırabiliyor olsa da bu çalışmada özellikle PZR aşamasında yapılan optimizasyonlar ile bireye ait soyun kökenleri aydınlatılabildiği görülmüştür [27]. Yine de kazılardan elde edilen örnekler, müze örnekleri gibi uygun koşullarda saklanmış antik örneklerden DNA eldesi ve elde edilebilen DNA'nın uzunluk ve kalitesi daha başarılı olmuştur [28].

Yaklaşık son 200 yıldır, müzelerde saklanan bitki ve hayvan örneklerinden elde edilen DNA'lar ile yapılan çalışmalardaki teknikler neredeyse rutin hale gelmiştir. Ancak paleontolojik ve arkeolojik örnekler için aynısı söylenemez. Bu örnek grubunda

DNA'nın elde edilebilirliği büyük bir problem olmakla birlikte dokuda analiz edilebilir DNA'nın kalmamış olma ihtimalinin de göz önünde bulundurulması gerekir [28]. Örneğin, kazı alanlarından elde edilen ve çalışmalarda sıklıkla kullanılan kemik; içerisindeki moleküler hasarın yanı sıra mikroorganizmalar tarafından da yıkıma uğratılmaktadır ve bu durum elde edilen DNA'nın kalitesini ve uzunluğunu yüksek ölçüde etkilemektedir [29]. Her örneğin bulunduğu sıcaklık, iklim gibi ortam koşulları ve aldığı hasar değişkenlik gösterebileceğinden, uygulanan teknikler rutin olmaktan çok uzaktır. Bununla birlikte örnekte yeterli ya da uygun özellikte DNA bulunmaması ihtimali ve çağdaş DNA'nın çalışma ortamının içinde ve dışında bulunuyor olması kontaminasyona karşı ciddi önlemler alınmasını ve örneklere titizlikle yaklaşılmalarını gerektirir [28].

Antik DNA çalışmaları, PZR'nin keşfiyle birlikte hız kazandıkça, alanda yaşanacak temel problemlerin de şekillenmesine yol açmıştır [30]. Kontaminasyon, örneklerin alındıkları ortamdaki ya da izolasyon metotlarından kaynaklanan PZR inhibitörleri, DNA'nın degradasyonu gibi sorunlar antik DNA çalışması yürüten araştırmacıları zorlamaya başlamıştır [31].

Eski insan DNA'sı üzerine yapılan çalışmalar, kendi türümüzün evrimine dair merak edilen soruları cevaplama potansiyelinden ötürü ilgi gören bir alan olmuştur. Ancak bu çalışmalar yürütülürken modern DNA kontaminasyonu çalışmanın doğruluğuna yönelik bir risk oluşturmaktadır ve bu nedenle zaman zaman şüpheli yaklaşımlara maruz kalmıştır. Öte yandan PZR ve dizileme teknolojilerinin zamanla daha çok gelişmesi ve alana hâkimiyetin artmasıyla birlikte standartlar iyileştirilmiş ve eski insan kalıntılarından yapılan çalışmalara duyulan güven yeniden artarak çalışmaların ilerlemesine sebep olmuştur [14, 32].

Eski hayvan ve insan örneklerinde, DNA analizleri için genellikle mitokondriyal DNA tercih edilmektedir. Bunun başlıca sebebi hücrelerde çoklu kopya olarak bulunmaları nedeniyle DNA elde etme olasılığının daha yüksek olmasıdır. Aynı sebeplerden ötürü eski bitki örneklerinde yapılan çalışmalarda da çoğunlukla kloroplast tercih edilmektedir. Yine de yakın akraba türler üzerinden yürütülen çalışmalarda

mitokondriyal DNA'dan edinilen bilginin tüm genomun zaman içerisindeki değişimini yansıtamayabileceğinin göz önünde bulundurulması gerekir [28].

Antik DNA çalışmaları gömülerdeki örüntülerin anlaşılmasını ve cinsiyetler arası ölüm oranlarının tespitiyle farklı cinsiyetlerdeki hastalık şemasının çıkartılmasını mümkün kılmış, avlanma ve beslenme düzenlerinin, sosyal yapı, göç ve evlilik kalıplarının anlaşılmasını sağlamıştır. Aynı zamanda çevresel krizlerin geçmiş zamandaki ekosistem üzerine etkilerinin görülmesine, nesli tükenen canlıların genetik dizilerinin okunmasına ve insan popülasyonlarının evrimsel kökeninin aydınlatılmasına olanak sağlayabilir [33]. DNA dizileme teknolojisinin gelişmesiyle birlikte canlı organizmaların DNA dizilerinin karşılaştırılması yapılmış ve bu yönde ilerleyen evrimsel çalışmalar da yaygınlaşmıştır. Ancak modern DNA dizilerinin bize verdiği sonuçlar tarihsel süreçlerin DNA üzerindeki etkisinin yalnızca dolaylı kanıtlarını sunmaktadır. Michael Hofreiter moleküler evrimdeki bu durumdan zamanda kapana kısılmış (time-trapped) olarak bahsetmiştir. Antik DNA analizlerinden elde edilen bulgular, moleküler evrimi yalnızca dolaylı sonuçlar elde edilen bu kapandan çıkarmış ve geçmişe dair doğrudan sonuçlar elde edilmesine olanak sunmuştur [28].

Pääbo antik DNA alanında yaptığı çalışmalarla, Neanderthal'in (Homo neanderthalensis) genom dizisini okumayı başarmış ve daha önceleri bilinmeyen bir hominin olan Denisova'nın keşfini yapmıştır. Aynı zamanda eski insanlar arasındaki gen akışına ışık tutmuş ve bu gen akışının günümüz insanı üzerine olan etkisine dair fikirler sunmuştur [34-36]. Tüm bu başarılarından ötürü "soyu tükenmiş homininlerin genomları ve insan evrimi ile ilgili keşifleri nedeniyle" 2022 Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'ne layık görülmüştür. (The Nobel Prize, <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2022/press-release/>, Erişim Tarihi: 03.12.2022)

Antik kemik örnekleri aynı zamanda patojenlerin ve kronik hastalıkların geçmiş zamanda yaşayan halklar üzerindeki etkisinin de ortaya konulmasına yardımcı olabilmektedir. Çoğu patojen hızlı bir şekilde ölüme sebebiyet verebilir ve böylelikle kazılardan elde edilen sınırlı iskelet parçalarının aslında sağlıklı bir bireye aitmiş gibi görünmesine neden olabilir. Aynı zamanda birçok hastalık etkeni birlikte çalışabilir

veya birinin varlığı diğerini tetiklemiş olabilir. Bu gibi durumların doğru bir şekilde aydınlatılabilmesi için antik DNA analizleri kullanılabilir [37]. Antik DNA alanının ortaya çıkışından kısa bir süre sonra antik hastalıklar üzerine yapılan ilk çalışmalar özellikle *Mycobacterium tuberculosis* ve *Mycobacterium leprae* üzerine odaklanmıştır [38-40]. İlk çalışmalardan bu zamana kadar geçen sürede teknolojinin de etkisiyle yapılan çalışmalar detaylandırılmış ve daha kapsamlı hale getirilerek *M. leprae*'nin evriminin ve çevresel uyumunun verimli bir şekilde araştırılmasına olanak sunmuştur [41].

Hastalıkların geçmiş zamanda yaşayan halklar üzerine etkisinin incelendiği konulardan biri ise 6. yüzyılda başladığı düşünülen ve etkeni *Yersinia pestis* olan vebadır. Yıllar içerisinde çeşitli salgınlara sebep olan *Y. pestis*'in neden olduğu belgelenmiş ilk salgın Justinianus Vebası'dır. İlk olarak Roma imparatorluğunda görünmüş ve 541'den 750'ye kadar devam etmiştir. Yapılan paleogenomik çalışmalar hastalık etkeni olarak *Y.pestis*'i işaret etmiş ancak pandemi süresince bu salgının yayılması, bakterinin çeşitliliği ve genetik geçmişi hakkında yeterli bilgi bulunamamıştır [42, 43]. Bu durumun aydınlatılması antik DNA ile mümkün olmuştur. Vebadan öldüğü düşünülen kişilerin gömü örneklerinden yapılan analizlerde örneklerin bulunduğu bölgedeki veba salgınları doğrulanmış ve *Y. pestis*'in genomu geçmişe yönelik olarak aydınlatılmaya başlanmıştır [43, 44].

Antik DNA aracılığıyla hastalıkların incelenmesi, patojen ve konakçının evrimsel açıdan bilgisini gerektirir. Bu nedenle popülasyon genetiği, evrimsel biyoloji, hesaplamalı biyoloji, insan genetiği ve patojen genetiği alanlarında bilgi sahibi olmayı gerektirmektedir. Aynı zamanda bu örneklerin evrimsel olarak incelemeleri yapılırken, antik örneklerdeki dizilerin karşılaştırılması için modern verilere ihtiyaç duyulur ve böylece elde edilen veriler antropoloji ve evrimsel tıp alanına da katkı sağlayabilir [37]. Antik DNA çalışmaları bunlarla sınırlı kalmayıp epigenetik alanında da ilerleme kaydetmiştir.

Epigenetik, eski insanların bazı fenotipik özelliklerinin yeniden yapılandırılmasını ve bireyleri etkileyen çevresel koşulların aydınlatılmasını sağlayabilir [45]. Epigenetik değişikliklerin gen ifadesi üzerindeki etkisi DNA'daki biyokimyasal modifikasyonlar

ile sonuçlanabilmektedir. Doğal seleksiyon ile epigenetiğin potansiyel ilişkisinin test edilmesi, epigenetik mekanizmaların evrimsel zaman ölçekleri üzerinden izlenmesini gerektirebilir [46]. Yakın zamana kadar antik DNA'dan edinilen bilgiler ile genlerin transkripsiyonel aktivitesi hakkında bilgi edinmenin mümkün olmayacağı düşünülmekteydi. Ancak genom analizlerindeki metodolojik yaklaşımların geliştirilmesi, epigenetik mekanizmaların araştırılmasında farklı imkânlar sunmuştur. Yapılan çalışmalarla birlikte antik DNA'nın epigenetik mekanizmalar üzerine bilgi sağlayabileceği görülmüştür ve epigenetiğin evrimdeki rolünün aydınlatılmasında antik DNA güçlü bir araç olarak kullanılabilir [46, 47]. Günümüz insanı ve eski insanın nöral aktivitelerindeki asıl farklılıkların epigenetik düzeyde gerçekleştiği ve böylelikle bu duruma ilişkin evrimsel değişiklikleri tanımlamanın mümkün olacağı düşünülmektedir. Zhenilo, 2016 yılında yayınladığı makalesinde bu duruma ilişkin görüşlerini "İyi korunmuş bir insan beyni fosili bulacak kadar şanslıysak bu, antik DNA ve insan evrimi çalışmaları için bir atılım olacaktır" şeklinde dile getirmiştir [47]. Tüm bunlar göz önüne alındığında antik DNA'nın multidisipliner bir alan olduğunu söylemek mümkündür.

Antik DNA çalışması yapılacak örneklerin, kazı alanından çıkarılması ve analizlerinin yapılacağı laboratuvara nakli sırasında pek çok sorunla karşılaşmaktadır. Bu sorunlar genel başlıklar altında DNA hasarı, kontaminasyon, PZR inhibitörleri olarak sıralanabilir [3].

Çizelge 2.1. DNA üzerindeki farklı hasar tipleri ([4] numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

Hasar çeşidi	Süreç	DNA üzerindeki etkisi
Zincir kırılmaları	Mikroorganizma kaynaklı bozunma	DNA miktarında azalma
	Post mortem hücredeki nükleazlar	DNA uzunluğunda azalma
	Diğer kimyasal süreçler	
Oksidatif lezyonlar	Bazlarda hasar	Baz parçalanması
	Deoksiriboz kalıntılarında hasar	Şeker parçalanması Nükleotit modifikasyonları
DNA çapraz bağları	DNA'nın kendisiyle veya diğer moleküller ile reaksiyonu	Örneğin Maillard ürünlerinin oluşması
Hidrolik lezyonlar	Amino gruplarının kaybı	Dizinin değişmesi
	1. Adenin ⇒ Hipoksantin	
	2. Sitozin ⇒ Urasil	
	3. 5-metilsitozin ⇒ Timin	
	4. Guanin ⇒ Ksantin	

2.2.1. Enzimatik Bozunma

Bir hücrenin ölümü lipazlar, nükleazlar gibi farklı enzim sınıflarının aktive olması ile ilişkilendirilir. Özellikle endojen endonükleazlar ölüm sonrasında DNA'nın parçalanma sürecinin başlatılmasında kritik bir rol oynar [6, 28]. DNA, nükleozoma bağlı histon yapısının bozulmadan kalması koşuluyla ardı ardına parçalanma süreçlerine girer. Kromatin proteinleri, lizozomal proteazlar tarafından sindirilir ve bu durum DNA'nın rastgele bir şekilde endonükleazlar tarafından parçalanmasına sebep olur [6].

DNA, aynı zamanda mikroorganizmaların ve bulunduğu çevredeki hayvanların salgıladığı ekzojen nükleazlar tarafından da bir bozunmaya uğrar. Organizmanın ölümüyle birlikte normal koşullarda hücrenin katabolik enzimlerini tutan bölmeler parçalanır ve bu enzimler ortama salınarak çevredeki mikroorganizmaların beslenmesine yol açabilir. Çevredeki mikroorganizmaların büyümesiyle birlikte de

makromoleküllerin bozunma süreci hızlanır veya artar [4, 6]. Toprakta bulunan mikroorganizmaların %70'inden fazlası nükleaz enzimlerine sahiptir ve çevrelerinde bulunan DNA'nın degradasyonuna yol açar [48]. Ancak, enzimatik ve/veya mikroorganizma kaynaklı bozunmadan kaçınmanın yolları vardır. Nadiren olsa da eğer bir doku, ölümden sonra hızlı bir şekilde kurutulursa veya DNA bir mineral matrikse adsorbe edilirse bu tip bozunmalardan kaçılabilir [4]. Nükleazların yanı sıra DNA, oksidasyon ve hidroliz süreçlerinin etkisiyle yavaş ve kendiliğinden bir bozunmaya da uğrar. Enzimatik reaksiyonları, çok daha yavaş ancak kalıcı bir etki bırakan ve spontan bir şekilde gelişen enzimatik olmayan bu reaksiyonlar izler [6].

2.2.2. Oksidasyon temelli bozunma

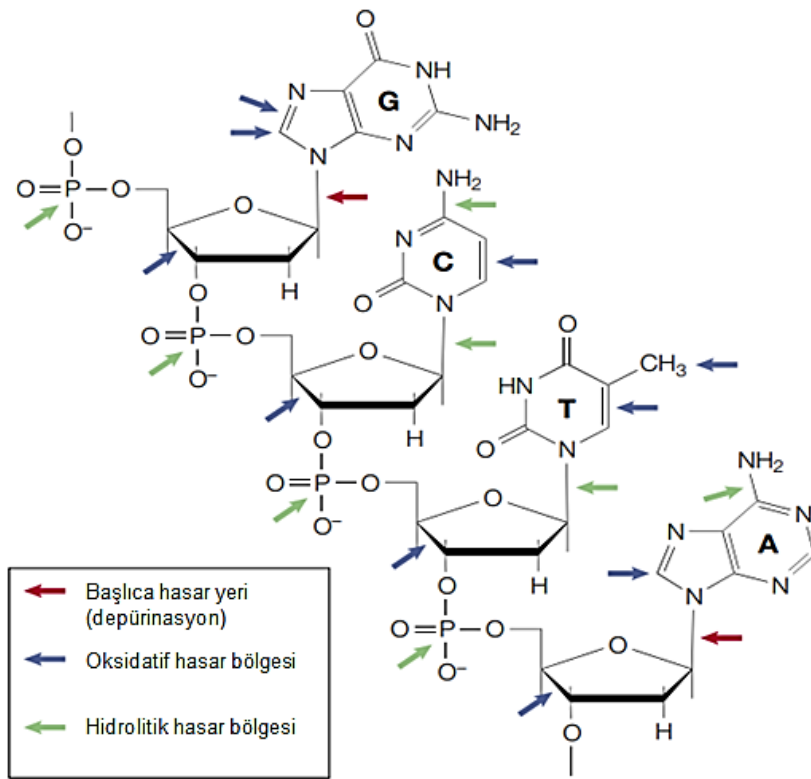
Aerobik metabolizmaya sahip hücrelerde meydana gelen katabolik reaksiyonlar sonucunda oksijen radikalleri oluşur. Bu radikaller DNA'da pürin ve/veya pirimidinlerin şeker kalıntılarının, çapraz bağların çeşitli modifikasyonlarına sebep olarak hasarlara yol açabilirler. DNA'nın parçalanmasına sebep olan bu oksidatif stresin kaynağı ölüm sırasında canlının kendisi olabileceği gibi ölüm sonrasında mikroorganizmalar tarafından ortama verilen radikaller de olabilir. DNA'nın oksidasyonuna en sık guanin kalıntılarında rastlanır. Guanin oksitlenerek 8-hidroksiguanine veya 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidine dönüşür [49]. Oksidasyon yolu ile oluşan benzer metabolitler, yapılan moleküler tayinlerde kullanılan enzimleri bloke edebilir ve amplifikasyonun durmasına yol açabilirler. Bu tip dönüşümler canlı organizmada tamir mekanizmaları ile onarılır ancak canlının ölümüyle birlikte böyle bir onarım mümkün olmaz [4, 30, 49].

2.2.3. Hidrolitik bozunma

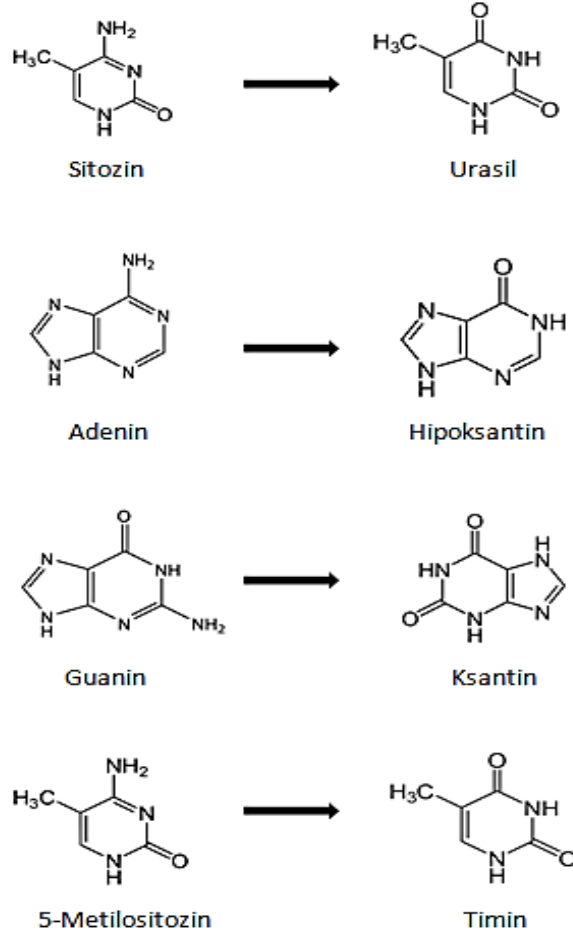
Deaminasyon ve depürinasyonun da içinde bulunduğu hidrolitik süreçler DNA'nın stabil yapısının bozulmasına ve molekül içerisinde kırılmalara neden olur [28]. DNA'nın fragmentlere ayrılmasına sebep olan bu bozunmalardan en yaygın ve araştırmacıları en çok zorlayan tiplerinden biri DNA'nın hidrolitik depürinasyonu ile başlayan ve DNA omurgasının β -eliminasyonu ile devam eden bir süreçtir. DNA molekülünde ortaya çıkan hidroliz reaksiyonu bazlar arasındaki bağın dengesizleşmesine neden olur ve böylece çeşitli bölgelerde tek zincir kırıkları meydana

gelir. Bu durum antik DNA örneklerinden yapılacak analizlerin verimini oldukça düşürmektedir [11, 30, 49].

Bir diğer yaygın hidrolitik bozunma ise sitozinlerin urasillere dönüştüğü sitozin deaminasyonudur. Bu işlemin sonunda DNA kısa ve küçük parçalara bölünmüş olur. Bu süreç, moleküler analizler esnasında yanlış baz eşleşmelerine sebep olur ve DNA dizisi okunurken C bazlarının T şeklinde ve G bazlarının A şeklinde okunmasına yol açarak dizisinin doğru okunmasını engeller [11, 49, 50].



Şekil 2.2. DNA'nın muhtemel hasar noktaları. Başlıca hasar bölgeleri (deaminasyon) kırmızı, hidrolitik hasara duyarlı bölgeler yeşil, oksidatif hasara duyarlı bölgeler ise mavi ok ile gösterilmiştir. G, guanin; C, sitozin; T, timin; A, adenin ([28] numaralı kaynaktan Türkçeleştirilerek alınmıştır).



Şekil 2.3. Sitozin, Adenin, Guanin ve 5-Metilsitozin bazlarının deaminasyon reaksiyonu

2.2.4. Radyasyon

DNA'nın bulunduğu ortamdaki arka plan radyasyonunun etkisi DNA üzerine doğrudan veya dolaylı olarak işleyebilir ve bu durum DNA'nın azot bazlarını ve şeker fosfat omurgasını değiştirerek DNA'ya zarar verir [28]. Gümü örneklerindeki radyasyonun sebebi toprakta bulunan potasyum (K) ve uranyum (U) iyonları olabilir. Aynı zamanda radyasyon, radikallerin oluşumuna sebep vererek DNA'da dolaylı yoldan bir hasara neden olabilmektedir [51].

2.2.5. DNA'nın Bulunduğu ortamın diğer fiziksel ve kimyasal özellikleri

DNA'nın aldığı hasar bulunduğu ortam ile doğrudan ilişkilidir. Yapılan çalışmalar DNA'nın bozunması üzerinde ortam koşullarının etkisinin zamana bağlı etkilerden daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ortamın nemi, tuz oranı, sıcaklığı ve pH değeri gibi

özellikleri DNA'nın ne kadar korunacağını veya ne kadar bozulacağını belirler. Nemin varlığı, organik maddelerin dokuya nüfuz etmesini sağlar ve PZR'nin çalışma verimini dolaylı yoldan etkileyebilir. Ortamın düşük ve sabit bir sıcaklıkta olması, nötr veya hafif alkali bir pH değerine sahip olması, aynı zamanda nemsiz olması DNA'nın izole edileceği dokuyu ve DNA molekülünün korunmasını destekler [9, 52, 53].

Sıcaklığın yüksek olduğu koşullarda DNA'nın daha çok zarar gördüğü, sıcaklığın düşük olduğu koşullarda daha korunaklı kaldığı görülmüştür. Yine de örneğin bulunduğu ortamdaki sıcaklık değişimleri DNA'daki kimyasal bağların kopmasına sebep olabilmektedir. Sıcaklığın düşük olduğu ortamlarda nem ve mikrobiyal etki yüksek olsa dahi, sıcaklığın yüksek olduğu ancak diğer zararlı etkenlerin düşük olduğu ortama göre DNA kaybı daha az olmaktadır [52, 53]. Ortamdaki düşük sıcaklık ölümden hemen sonra oluşan hasarı kısmi bir şekilde azaltarak nükleaz aktivitesini yavaşlatabilir veya engelleyebilir.

Sıcaklık kadar nem de DNA üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Ortamdaki yüksek nemin varlığı DNA molekülünde hidrolitik ve oksidatif hasarlara yol açabilir. Yapılan çalışmalar eski örneklerin barındırdığı DNA molekülünün karanlık, nemsiz ve soğuk ortamlarda daha iyi korunduğunu göstermiştir [49, 52].

Çizelge 2.2. DNA'nın korunumunu sağlayan faktörler ([53] numaralı kaynaktan uyarlanmıştır).

Etken	Sebebe
Mikroorganizmaların yokluğu	Mikroorganizmalar ve metabolitleri DNA'ya yüksek oranda hasar verir.
UV (ultraviyole) ışınları ve radyoizotopların yokluğu	UV ışınları dokunun yüzeyini etkiler.
Kuruluk	Kuru koşullar altında hidrolitik ve oksidatif hasar azalır.
Sert ve kuru dokular	Sert ve kuru dokular fiziksel ve kimyasal reaksiyonları önler. Kemik ve diş doku, organik kalıntıları kimyasal reaktanlara ve mikrobiyal istilaya karşı korur.
Düşük sıcaklık	Düşük sıcaklık birçok kimyasal reaksiyonu yavaşlatır ve mikroorganizma istilasını azaltır.
Nötr veya hafif alkali pH değeri	Azalan ortam pH'sı ile sadece DNA'nın kendisi değil bulunduğu doku (kemik, dişler) da hasar görür.
Şelatlayıcı hümit ve fulvik asitlerin varlığı	Fenolik jeopolimerler aerobik aktiviteyi önler.
Düşük sıcaklıkta depolama	Örnekler, düşük sıcaklıklarda muhafaza edilmelidir. Daha uzun süreler için dondurucuda saklanması önerilir.

Bir DNA'nın sağlam kalması ve belirli bir zaman içerisinde aldığı hasarla ilgili çeşitli fikirler ortaya atılmış olup DNA'ya dair çizilen bu zaman sınırlaması, yapılan çalışmalarla değişmiş ve genişletilmiştir [54, 55]. Dizilemesi yapılan en eski örneklerden biri yaklaşık bir milyon yıl öncesine ait bir mamuttan elde edilmiştir [56].

Yukarıda başlıklar halinde verilen sebeplerin antik DNA üzerinde birlikte veya ayrı ayrı etki etmesi, elde edilebilen DNA uzunluklarını büyük ölçüde kısıtlamaktadır [30]. Antik DNA'nın maruz kaldığı hasar modern DNA'ya göre elde edilmesini ve dolayısıyla analizini daha zor kılar. DNA'nın degradasyonu antik DNA'yı kontaminasyona karşı hassas kılarken, elde edilecek DNA'nın uzunluğunu da önemli ölçüde etkiler [9]. Bunun yanı sıra DNA'nın miktar, kalite ve elde edilebilir uzunluğu

çevresel koşullara da bağlı olduğundan bu konuda genel bir sonuca varmak mümkün değildir. Farklı koşullara maruz kalmış örnekler ile yapılan bir çalışmada, sadece en iyi gömü koşullarına sahip örneklerde 200 bç'nden daha uzun bölgelerin çoğaltılabildiği gösterilmiştir [53]. Tüm bu nedenlerden ötürü antik DNA çalışmalarında genel kabul gören bir rutin yoktur ve çalışmanın tüm basamakları DNA'nın elde edileceği örneğin durumuna göre düzenlenmelidir.

2.3. Antik DNA'da Kontaminasyon

PZR teknolojisi kontaminasyona karşı son derece hassastır ve bu nedenle örnek içerisindeki düşük miktarlardaki modern DNA kontaminasyonu bile yanlış sonuçlara sebebiyet verebilir [7]. Antik DNA çalışmalarında, "Kontaminasyon" terimi, çalışma sırasında eldesi istenmeyen DNA'ları tanımlamak için kullanılır. Antik DNA çalışmalarında kontaminasyonun en önemli sebeplerinden biri mikrobiyal DNA'dır. Örnek üzerinde çok miktarda bulunabilir ve böylelikle eldesi hedeflenen endojen DNA'nın yüzdesini azaltır. Ayrıca yeni dizileme teknolojilerinde sonuçların hızlı ve doğru tayini için büyük bir problem teşkil etmektedir [32]. Yapılan bir çalışmada 80 milyon yıllık kemik parçalarından mitokondriyal sitokrom b'yi kodlayan genin bir kısmının dizilendiği gösterilmiş ve DNA parçalarının milyonlarca yıl hayatta kaldığı söylenmiştir [57] ancak sonraki yıllarda bu çalışmanın bakteriyel bir kontaminasyon sebebiyle yanlış sonuç verdiği belirtilmiştir [58].

Bir diğer büyük kontaminasyon sebebi ise modern insan DNA'sıdır ve örneğin çıkarılmasından analizine kadar giden tüm süreçlerde örneğin yüksek oranlarda bu kontaminant DNA'ya maruz kalması muhtemeldir [32]. Kontaminant DNA molekülleri arkeologlar veya müze görevlileri tarafından yapılan işlemler sırasında dökülen deri hücreleri olabileceği gibi moleküler testler yapılırken, ortamdaki toz parçacıkları veya deneylerin gerçekleştirileceği laboratuvarında daha önceden yapılmış deneylerden elde edilen düşük miktardaki DNA'lar da olabilir. Bu ihtimallerin meydana gelmediği durumlarda, işlemler sırasında tüm önlemler alınsa bile kontaminasyon örneğin kendisinden kaynaklanabilmektedir [28, 59, 60]. Örneğin yapılan bir çalışmada bir dinazorun antik kalıntılarından DNA izolasyonunun başarıyla gerçekleştirildiği gösterilmiş [57], ancak bu çalışmayı takip eden yılda analiz edilen DNA'nın bir insan mitokondri DNA'sı olduğu ve çalışmada önemli bir kontaminasyon yaşandığı fark

edilmiştir [61]. Bunun gibi hatalı sonuçların saygın dergilerde yayınlanmış olması alandaki çalışmalara olan güveni sarsmıştır [30]. Literatürde kontaminasyon kaynaklı yanlış sonuçların çıktığı veya çıkan sonuçların sorgulandığı birçok çalışma bulmak mümkündür [57, 61-64]. Alec Jeffreys, Paabo'nun 1984 yılında yayınlanan quaqqa makalesinin hemen ardından yazdığı bir makalesinde korunmuş mamut dokusundan DNA elde etmeye çalıştığını ancak elde ettiği DNA'ların büyük oranda kazı sonrası gerçekleşen mikrobiyal kontaminasyondan kaynaklandığını belirtmiştir. DNA'ların çok küçük bir kısmında fil-benzeri dizilere rastlamış ancak bu dizilerin de post mortem DNA hasarından kaynaklı olarak bozunmaya uğradığını belirtmiştir [65].

Kontaminasyon riskinin önemi anlaşıldıkça laboratuvar ortamında bu riski en aza indirmek için çeşitli önlemler alınmaya başlanmıştır [32]. 1990'ların sonunda Pääbo ve meslektaşlarının Neanderthal DNA dizilemesi üzerine yaptıkları bir çalışmada modern DNA'dan kontaminasyonunun önüne geçmek için, yapılan çalışmalar kısım kısım bölünüp iki farklı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir [66]. Yine de asıl risk, örnekler laboratuvar ortamına gelmeden maruz kaldıkları kontaminasyondur [32]. Yapılan çalışmalar diş ve kemik örneklerinin, kontaminasyon etkeni DNA'nın derin penetrasyonunu destekleyen gözenekli yapılarından ötürü kontaminasyona daha açık olduğunu göstermiştir [67]. Örneklerin kontaminasyona açık doğaları göz önünde bulundurularak kazı çalışmalarında uygulanan teknikler ve alınan önlemlerin geliştirilmesi gerektiği düşünülmektedir [32].

Antik DNA çalışmalarında karşılaşılan problemler çoğu zaman birbirleriyle ilişkilidir. Örnekten veya ortamdan kaynaklanan kontaminasyon, PZR gibi deneysel süreçlerde tolere edilemez. Çünkü antik DNA uzun süreler boyunca farklı etmenlerden kaynaklanan degradasyona ve miktar kaybına uğramıştır böylece ortamdaki ekzojen modern DNA, endojen DNA'yı alt eder [68]. Bu nedenle modern DNA analizi yapan araştırmacılar için kontaminasyon, antik DNA araştırmacıları için olduğu kadar büyük bir problem teşkil etmez. Çünkü hedef DNA'ları kontaminasyon kaynaklı DNA'dan daha fazladır ve tolere edilebilir [69].

2.4. Antik DNA'da PZR inhibitörleri

PZR enzimatik ve hassas bir reaksiyondur ve bu nedenle de inhibitörlere oldukça duyarlıdır. Bu durum PZR uygulamasının en önemli dezavantajlarından biridir. PZR inhibitörlerinin sık rastlandığı örnekler kan, doku ve toprak olarak sıralanmıştır [70]. Antik DNA'da sıklıkla eski gömülerden elde edilen kemik örnekleri üzerinde çalışıldığından, PZR inhibitörleri araştırmacılar için önemli ve üstesinden gelinmesi gereken bir problem teşkil eder [33].

PZR inhibitörlerinin, sürecin farklı aşamalarında farklı etki mekanizmaları ile müdahale edebildiği üç potansiyel etki mekanizması şöyledir; (i) inhibitörün polimeraza bağlanması ile doğrudan inhibisyon, (ii) inhibitörün DNA ile etkileşime girmesi ve (iii) primer uzaması sırasında polimeraz ile etkileşimi [5, 71]. DNA polimerazın aktivitesini etkileyen birçok PZR inhibitörü vardır. Reaksiyon içeriğinde bulunabilecek proteazlar veya deterjanlar bu enzimi degrade edebilir. Üre ve fenol gibi kimyasallar DNA polimerazı degradasyona uğratarak kalsiyum (Ca^{+2}), kollajen, hematin gibi kimyasallar ise polimeraz aktivitesini inhibe etme kapasitesine sahiptir. İnhibitörler dolaylı yollardan da polimeraz aktivitesine etki edebilirler. Örneğin polimerazın kofaktörleri ile etkileşime giren inhibitör maddeler ortamdaki kofaktör derişimini azaltarak polimeraz aktivitesini sınırlar [5]. Mesela kalsiyumun, polimerazın kofaktörü olan magnezyum (Mg^{+2}) ile rekabete girerek etki ettiği bilinmektedir [71]. PZR inhibitörleri DNA'nın izole edildiği örnekten veya izolasyon sırasında uygulanan yöntemin içeriğindeki malzemelerden kaynaklanabilir [70]. PZR'nin kısmen veya tamamen inhibisyona uğraması, yapılan çalışmanın hassasiyetini etkiler ve yanlış sonuçlar elde edilmesine sebep olabilir [5].

PZR inhibitörleri organik, inorganik, katı veya sıvı formdaki maddeler olabilir. Bilinen inhibitörlerin birçoğu protein ve proteaz özellikteki organik bileşiklerdir. Yaygın olarak karşılaşılan inhibitör maddeler hümik asitler, tanenler ve fulvik asitler olabilir ve bu maddeler toprağın doğal kompozisyonu içerisinde bulunurlar. Bu bileşenler esasen ortamdaki bitkilerin bozunması ile meydana gelir ve PZR içerisinde *Taq* DNA polimerazın aktivitesini inhibe edebilir [69]. Özellikle hümik asidin örnekteki varlığı, ortamdaki nem ile pozitif korelasyon gösterir [53]. Bir diğer güçlü inhibitör ise bağ doku ve kemikte bulunan kollajendir ve antik DNA çalışmalarında sıklıkla kullanılan

örnek grubu olan kemik doku içerisinde bulunur [71, 72]. DNA izolasyon protokollerinde sıklıkla karşımıza çıkan fenol, kloroform, etanol, sodyum klorür (NaCl), sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi birçok kimyasal da ayrıca PZR inhibitörlerine örnektir. Fenol, kloroform ve SDS *Taq* DNA polimerazın degradasyonu ve denatürasyonuna sebep olarak reaksiyonu inhibe etme kapasitesine sahiptirler [5, 73, 74].

İnhibitörlerin tek iplikli ya da çift iplikli DNA'ya bağlanması izolasyon aşamasında DNA ile birlikte elde edilmesine sebep olabilir ve PZR uygulamasını etkiler [70]. Dolayısıyla hem örneğin alındığı ortamdan kaynaklanan hem de örneğin kendisinden kaynaklanan inhibitör maddeler deney tüpünün içerisine girmiş olur. İnhibitör bileşiğin ne olduğu kadar konsantrasyonu da PZR inhibisyonuna etkisinde önemlidir [5]. Tüm bu sebeplerden ötürü yapılacak antik DNA çalışmalarında DNA'nın yüksek miktarda elde edilmesinin yanı sıra inhibitörlerin ve olası kontaminantların temizliği de çok önemlidir ve inhibitörler özelinde optimizasyon uygulanırken, parametreler inhibitörün çeşidine ve etki mekanizmasına göre değişiklik gösterebilir [71].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez çalışması kapsamında kullanılan farklı antik DNA izolasyon yöntemlerinin DNA kazanım oranları ve PZR inhibitörlerini elimine etme başarılarının karşılaştırılması ve antik DNA çalışmaları için kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca incelenecek olan kemik ve diş örneklerinden elde edilecek olan antik DNA verimlerinin ve mitokondri D-loop bölgesinin farklı uzunluktaki primerlerle amplifiye edilerek izolasyon verimlerinin farklı amplifikasyon boyutları da göz önünde bulundurularak karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Çalışmada kullanılan örnekler Karia Bölgesi'nde yer alan Stratonikeia Antik Kenti'ne ait kazılardan elde edilmiştir. Karia Bölgesi günümüzde Aydın ve Muğla İlleri'nin büyük bir kısmını ve Denizli İli'nin batı uç kısmını kaplayan bir bölgedir. Stratonikeia kentinin kalıntıları Muğla'nın, Yatağan İlçesi'nin 7 km batısında bulunan Eskihisar Köyü'nde bulunmaktadır. Stratonikeia kent merkezinde bu zamana kadar yapılan kazılarda, Bronz Çağı'ndan itibaren buluntu ele geçmiştir (T.C. Muğla Valiliği, <http://www.mugla.gov.tr/stratonikeia-antik-kenti>, Erişim Tarihi: 13.01.2022).



Şekil 3.1. Stratonikeia Antik Kenti'nin havadan fotoğrafı, işaretli yer kazının yapıldığı alanı göstermektedir ([75] numaralı kaynaktan alınmıştır).

Çalışma kapsamında kullanılan örnekler 5 adet femur kemiği, 5 adet talus kemiği ve 5 adet diş olarak seçilmiştir. Kemik ve dişin sert ve dayanıklı yapıları nedeniyle DNA'yı dış etkenlerden zarar görmeden uzun yıllar boyu bozulmadan korunmasını sağladıkları bilindiği için bu örnek grubu tercih edilmiştir. İskeletin farklı bölümlerinden alınan örnekler arasındaki DNA korunumunun ve elde edilebilir DNA'nın veriminin de kıyaslanması amaçlanmıştır.

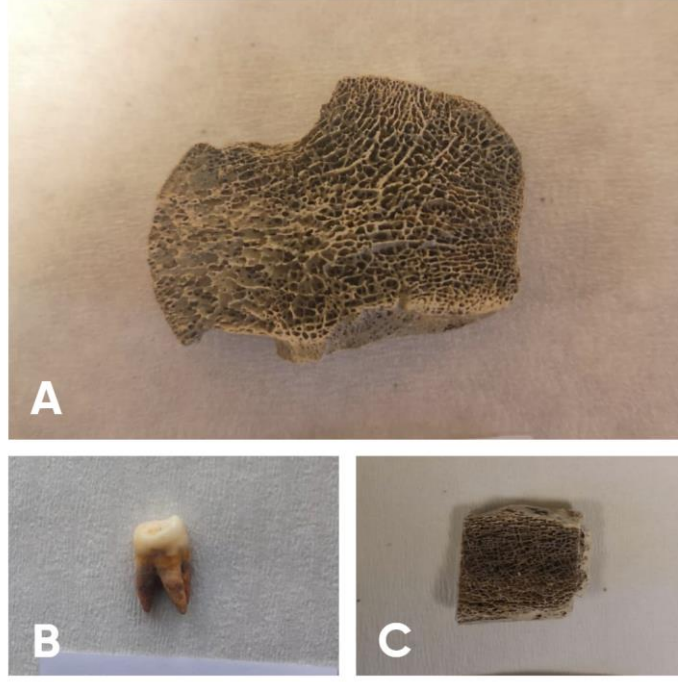
Bu doğrultuda yapılan deneysel çalışmaların her aşaması antik DNA çalışmalarına göre optimize edilmiş olup alana özgü problemler en aza indirgenmeye çalışılmıştır. Pulverizasyon, DNA izolasyonu ve PZR deneylerinin her biri farklı laboratuvarlarda gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında yürütülen deneysel çalışmalar için izlenen yol sırasıyla aşağıdaki gibidir;

- Kemik ve diş örneklerinin dekontaminasyonu
- Kemik ve diş örneklerinin gravür cihazı yardımıyla temizlenmesi, toz hale getirilmesi
- Örneklerden fenol kloroform ve silika membran izolasyon yöntemleri ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmesi
- DNA kantitasyonu
- Mitokondri D-loop bölgesinden seçilen 3 farklı primer ile PZR reaksiyonunun gerçekleştirilmesi
- Agaroz jel elektroforezi
- Seçilen örneklerin DNA dizileme yapılarak doğrulanması

3.1. Dekontaminasyon Uygulamaları

Bu çalışma kapsamında kullanılan femur ve talus kemik örnekleri, bütün haldeki iskelet kemiklerinden küçük parçalar halinde çıkartılmış şekilde bulunmaktadır, diş örnekleri ise çeneden ayrılmış haliyle bulunmaktadır.



Şekil 3.2. Dekontaminasyon öncesi kemik ve diş örnekleri (A: talus, B: diş, C: femur)

Femur, talus ve diş örnekleri öncelikle 10 dk UV'ye maruz bırakılmıştır. Bu aşamada UV kabin içerisinde her örneğin konulacağı yer önceden işaretlenmiş olup sonraki aşamalarda olası bir örnekler arası kontaminasyon riski azaltılmıştır. Bu aşamadan sonra diş örnekleri tozlaştırma aşamasına hazır hale gelmiş olup femur ve talus kemik örnekleri ile dekontaminasyon işlemlerine devam edilmiştir. Femur ve talus örneklerinin zımpara ile dış etkenlere maruz kalan yüzey kısmı temizlenmiş ve Dremel marka gravür cihazı (Dremel® 3000) yardımı ile süngerimsi tabakasından arındırılmıştır. Sonrasında örnekler yeniden 10 dk UV'ye maruz bırakılmıştır. Örneklerin temizlenme aşamasında her örnek sonrasında tek kullanımlık ekipmanlar atılmış ve yerine yenisi kullanılmış olup diğer ekipmanlar ise çamaşır suyu ile temizlenmiş ve ardından UV'ye maruz bırakılarak sterilize edilmiştir.

3.2. Örneklerin Tozlaştırılması (Pulverizasyon)

Femur ve talus örneklerinin tozlaştırılması için dekontaminasyonu tamamlanan örnekler önceden steril edilmiş bakır havan içerisinde alınarak dövülmüş ve toz haline getirilmiştir. Ardından steril tüplere yerleştirilerek -20°C 'de saklanmıştır. Bütün haldeki diş örneklerinde ise dentin ve pulpa kısımları Dremel marka gravür cihazı yardımı ile

delinmiş ve içerisinden çıkan toz steril ependorf tüplerde birleştirilerek -20°C'de saklanmıştır.

3.3. DNA İzolasyonu

3.3.1. Fenol-Kloroform İzolasyonu

Antik DNA çalışmalarında sıklıkla kullanılan ve organik yöntem olarak da isimlendirilen bu izolasyon yönteminde ilk aşama örnekteki proteinlerin ve kompleks lipidlerin parçalanmasını hedefleyen lizis aşamasıdır. Sonraki aşamalarda nükleik asitleri diğer moleküllerden ayırmak için fenol-kloroform karışımı eklenerek sulu (üst) ve organik (alt) fazlara ayırım yapılır. Faz ayırımının gerçekleşmesiyle birlikte nükleik asitler sulu fazdan izole edilebilir. Protokoller içerisindeki yıkama basamakları çalışmaya göre değişkenlik gösterebilir.

Fenol-kloroform izolasyonunda lizis aşamasına geçilmeden önce örnekler kalsiyum ve diğer minerallerden arındırılmak için demineralizasyon (dekalsifikasyon) aşamasına tabi tutulurlar. Femur ve talus örneklerinin demineralizasyonu için çok aşamalı EDTA inkübasyonu uygulanmıştır.

- 50 mg kemik tozu tartılır ve 1,5 ml'lik ependorf tüpe alınır.
- Örnek üzerine 500 µl 0,5 M EDTA (Sigma) (pH: 8,0) eklenir ve rotatorda gece boyu inkübasyona bırakılır.
- Sonraki gün rotatordan alınarak 3 dk 6000 rpm'de santrifüj edilir ve süpernatant yeni tüpe alınır. Kalan pelet üzerine 500 µl 0,5 M EDTA eklenir ve yeniden rotatorda gece boyu inkübasyona bırakılır.
- Inkübasyon sonrasında 3 dk 6000 rpm'de santrifüj edilir ve alınan süpernatant önceki günden elde edilen süpernatant ile birleştirilerek izolasyona hazır hale getirilir.

Diş örneklerinin demineralizasyonu için, içerdikleri az miktardaki DNA göz önünde bulundurularak diğer kemik örneklerinden farklı bir demineralizasyon süreci izlenmiştir. Femur ve talus örneklerinin aksine diş örneklerinde pelet kullanılmıştır çünkü EDTA inkübasyonu aşamasının süresi DNA'nın süpernatanta geçebileceği kadar uzun tutulmamıştır.

- Toz haldeki diş örnekleri steril 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınır ve çıkan tozun miktarına göre (~ 200 µl) 0,5 M EDTA çözeltisi eklenir.
- Soğuk oda içerisindeki rotatorda 10 dk inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrasında 3 dk 6000 rpm'de santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
- EDTA'dan temizlenmek için iki kez steril distile su ile yıkanır.
- Son aşamada örnek üzerine 15 µl steril distile su eklenerek izolasyona hazır hale getirilir.

İzolasyon için uygulanan protokol, laboratuvarımızda rutin olarak kullanılan Fenol-kloroform izolasyon yönteminin, antik DNA çalışması için modifiye edilmiş şeklidir. Fenol-kloroform izolasyonu için NaCl (Amresco), SDS (Sigma), Trizma Base (Sigma), Proteinaz K (Sigma), Fenol (Carlo Erba), Kloroform (Carlo Erba) ve Etanol (Emsure) kullanılmıştır. Uygulanan protokol sırasıyla aşağıdaki gibidir:

- Demineralizasyonu gerçekleştirilen örneklerden 250 µl alınarak 1,5 ml'lik ependorf tüp içerisine aktarılır.
- Her örnek üzerine üzerine 250 µl lizis tamponu eklenir.

Lizis Tamponunun İçeriği:

1M NaCl: 90 µl

%10 SDS: 80 µl

1X Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH: 7,6): 70 µl

Proteinaz K çözeltisi (20 mg/ml): 10 µl

- Alt üst edilerek lizis tamponunun örnek ile karışması sağlanır ve 37°C' de gece boyu lizise bırakılır.
- Lizat üzerine 500 µl fenol: kloroform (1:1) eklenir.
- 2500 rpm'de 4 dakika santrifüj edilerek faz ayrımı sağlanır.
- Süpernatant yeni bir tüpe alınarak üzerine 1,5 ml'ye kadar %100 etanol eklenir.
- Presipitasyonun fazlaşması için 20 dakika boyunca -20°C'de inkübe edilir.
- 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir ve üst faz uzaklaştırılır.

- Pelet üzerine, örneği 1,5 ml'ye tamamlayacak şekilde %70 etanol eklenir.
- 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılır.
- DNA'nın görülemeyecek kadar az olması nedeniyle etanol tüp içerisinden tamamen buharlaşana kadar beklenir.
- DNA, 50-100 µl steril distile su eklenerek çözdürülür.

3.3.2. Silika Membran İzolasyonu

Silika membran temelli izolasyon yöntemi Quick-gDNA™ Miniprep kit (Zymo Reserch) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kit katı dokudan DNA izolasyonuna izin verdiği için antik kemik ve diş örneklerine dekalsifikasyon işlemi uygulanmamış, direkt olarak pulverizasyonu yapılan örnekler ile izolasyon gerçekleştirilmiştir. Antik örneklerin bulundurduğu düşük miktardaki DNA göz önünde bulundurularak kit protokolünde önerilenden daha fazla miktarda kemik tozu kullanılmıştır.

Uygulanan kit protokolü aşağıdaki gibidir:

- 50 mg kemik tozu (diş örneklerinden ise az miktarda çıkan tozun tamamı) üzerine 500 µl genomik lizis solüsyonu (içerisine %0,5 (v/v) 2-merkaptöetanol (Bio-Rad) eklenmiş) eklenir.
- Örnekler yaklaşık 4-6 saniye vortekslenir ve 5-10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilir.
- 10000 g'de santrifüj işlemi gerçekleştirilir ve süpernatant, toplama tüpleri içerisindeki Zymo-Spin™ kolona transfer edilir.
- Örnekler 10000 g'de 1 dakika santrifüj edilir ve spin kolon yeni toplama tüpüne yerleştirilir.
- Spin kolonlar üzerine 200 µl DNA ön yıkama solüsyonu eklenerek 10000 g'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Spin kolon üzerine 500 µl g-DNA yıkama solüsyonu eklenir ve yeniden 10000 g'de 1 dakika santrifüj edilir.

- Spin kolon, mikrosantrifüj tüpüne alınarak kolonun tam üzerine gelecek şekilde 70 µl DNA elüsyon solüsyonu eklenir ve 2-5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir.
- İnkübasyonu tamamlanan örnekler en yüksek hızda 30 saniye boyunca santrifüj edilir ve mikrosantrifüj tüpü içerisindeki kolon atılarak örnekler -20°C' de saklanır

3.4. Spektrofotometrik Ölçüm

İzolasyonu gerçekleştirilen örneklerin Q5000 UV-Vis Spectrophotometer (Quawell) cihazı ile DNA konsantrasyonları ölçülmüştür. Örneklerin ölçüm sonuçları, sonuçlar bölümünde tablo şeklinde sunulmuştur (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Rutin olarak kullanılan PZR'yi başarılı kılan en önemli etmenlerden biri, doğal ortamı kaplıcalar olan *Thermus aquaticus* bakterisinden izole edilen bir termostabil DNA polimerazdır. Kısaca *Taq* DNA polimeraz olarak isimlendirilen bu polimeraz PZR uygulaması için gereken yüksek ısıtma ve soğutma döngülerine dayanıklıdır ve böylece DNA'nın bu teknik ile hasarsız bir şekilde çoğaltılabilmesini mümkün kılar.

PZR'nin gerçekleşebilmesi için 4 temel bileşen gereklidir; bir DNA kalıbı, DNA polimeraz, serbest nükleotitler ve primerler. Kullanılacak DNA polimeraz termostabil yapıda olmalı ve sıcaklık değişimlerinde bozunmadan kalabilmelidir. Serbest nükleotitler ise PZR içerisinde DNA'nın oluşturulabilmesi için yapı taşı olarak kullanılırlar. Seçilen primerler çoğaltılacak bölgenin uzunluğunu ve yerini tanımlar, bu sebeple çoğaltılması istenilen gen dizisine özgü olmalıdırlar.

PZR farklı sıcaklık ve sürelerde gerçekleşen 3 ardışık adımın tekrarlanmasından oluşur. Bu işlem bir termal döngü cihazı içerisinde gerçekleştirilir. Denatürasyon olarak isimlendirilen PZR'nin ilk adımında çift iplikli DNA 95°C'ye ısıtılarak iplikleri birbirine bağlayan hidrojen bağlarının ayrılması sağlanır. Primer yapışması olan ikinci adımda ise sıcaklık, primerlerin DNA'ya bağlanmasına olanak sağlayacak ve her primere özgü farklılık gösteren bir dereceye düşürülür. Zincir uzamasının gerçekleştiği

üçüncü adımda ise sıcaklık, *Taq* DNA polimerazın optimum aktivite gösterdiği derece olan 72°C'ye yükseltilir. Primerler diziye bağlandıktan sonra polimeraz bu primerleri bir başlangıç noktası olarak kabul eder ve ortamda bulunan serbest nükleotitleri bağlayarak yeni DNA ipliğini sentezler. Bahsedilen bu üç adım belirli bir sayıda tekrarlanır ve böylece kalıp DNA her döngü sonucunda üstel olarak çoğaltılmış olur. PZR reaktifleri belirli döngülerden sonra artık kullanılamayacağından işlem yaklaşık 30-40 döngüde sonlandırılır.

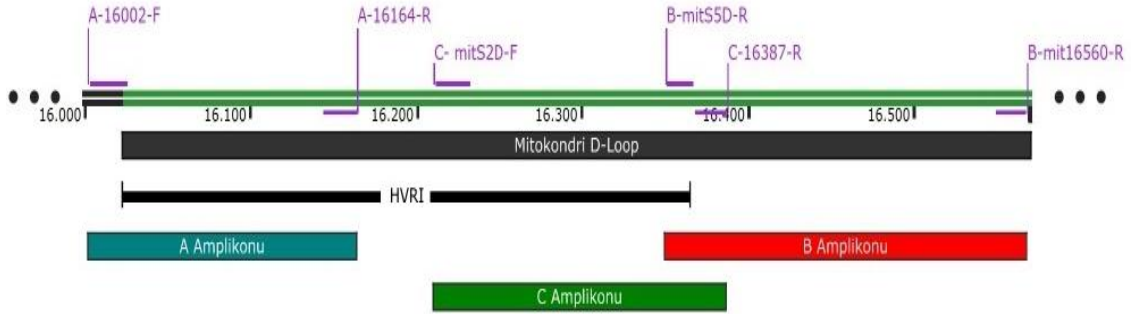
Tez çalışması kapsamında farklı amplikon uzunluğuna sahip primerlerin antik DNA üzerindeki amplifikasyon başarısını test etmek amacıyla 3 farklı primer çifti seçilmiştir. Primerler mitokondri üzerinde bulunan D-loop bölgesinin farklı kısımlarından seçilmiş olup Çizelge 3.5.1 ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir. PZR bileşenlerinden kaynaklanabilen veya işlem sırasında oluşabilecek kontaminasyonları görüntüleyebilmek amacıyla her reaksiyonda negatif kontrol kullanılmıştır. Aynı zamanda reaksiyonun doğru çalıştığını gözlemlemek için insan kanından izole edilen modern DNA, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

PZR bileşenleri ve koşulları, yapılan denemeler sonunda antik örnekler için optimize edilmiştir. Antik DNA çalışmalarında örnekten veya örneğin alındığı ortamdan kaynaklanan olası PZR inhibitörlerine karşı PZR reaksiyonunun daha verimli çalışması için reaksiyon içeriğine Bovine serum albumin (BSA) (GeNei™) eklenmiştir. Reaksiyon içeriği ve koşulu çizelge 3.5.2'de verilmiştir.

İlk PZR reaksiyonu sonrası görünür bir PZR ürünü elde edilemediğinden, 2. ve 3. kuşak PZR reaksiyonu uygulanmıştır. İlk reaksiyonun ürünü kalıp DNA olarak kullanılmış, aynı reaksiyon bileşenleri ve aynı reaksiyon koşulları uygulanarak 2. PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Silika membran izolasyon yöntemi ile izolasyonu gerçekleştirilen örneklerde 2. kuşak PZR yeterli olmuş ancak fenol-kloroform yöntemi ile izole edilen örneklerde 3. kuşak PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 3. kuşak PZR reaksiyonunda kullanılan kalıp DNA 2. PZR reaksiyonu ürünüdür.

Çizelge 3.5.1. Mitokondri D-loop bölgesini çoğaltmak için seçilen primerler (F: İleri primer, R: geri primer)

Amplikon Adı	Primer Adı	Pimer Dizisi	Fragman Uzunluğu
A Amplikonu	16002-F	5'-tctaatttaaactattctctgttc -3'	162 bç
	16164-R	5'-tttatgtactacaggtgggtcaa-3'	
B Amplikonu	mitS5D-F	5'-atcccttctcgtcccca-3'	218 bç
	mit16560-R	5'-atcgtgatgtcttatttaag-3'	
C Amplikonu	mitS2D-F	5'-cagcaatcaaccctcaactatc-3'	177 bç
	16387-R	5'-tatctgaggggggtcatcca-3'	



Şekil 3.3. Kullanılan primerlerin ve oluşan amplikonların mitokondri D-loop bölgesi üzerinde gösterimi

Çizelge 3.5.2. PZR reaksiyonu bileşenleri ve koşulu

Reaksiyon Bileşenleri		Reaksiyon Koşulu	
DNA	5 µl	94°C	1 dk
10X PCR Tamponu	5 µl	94°C	40 sn
25 mM MgCl ₂	5 µl	56°C	40 sn
2,5 mM dNTP karışımı	1 µl	72°C	30 sn
10 mM İleri Primer	0,5 µl	72°C	1 dk
10 mM Geri primer	0,5 µl	+4°C	∞
BSA	0,5 µl		
<i>Taq</i> DNA Polimeraz (5U/ µl)	0,5 µl		
dH ₂ O	32 µl		
Son Hacim	50 µl		

35 Döngü

3.6. Agaroz Jel Elektrofrez

10 µl PZR ürünü, 2 µl 6X Yükleme tamponu (%40 süzkroz, %0,25 bromfenol mavisi, %60 10X TBE tamponu) ile karıştırılmış ve %2'lik (w/v) agaroz (Roche) jele yüklenmiştir. Amplikon boyutlarının belirlenebilmesi için 50 bç marker (Bioron) kullanılmıştır. Agaroz jelin tablası tank içerisine yerleştirilerek üzerine 1X TBE eklenmiş ve Consort mini elektrofrez güç kaynağına bağlanarak markerın tüm bantları netleşene kadar (~1 saat) 80 voltta yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.7. DNA Dizileme

PZR ile çoğaltılan bölgelerin doğruluğunu kontrol etmek amacıyla seçili örneklerin 16002-F (A ampikonu) ileri primeri ile dizilemesi gerçekleştirilmiştir. Dizileme yöntemi olarak Sanger Dizileme tercih edilmiş ve yürütme işlemi Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) kapiller elektrofrez sisteminde gerçekleştirilmiştir.

Seçili PZR örnekleri öncelikle PZR ExoI/SAP pürifikasyonu işlemine tabi tutulmuş ve ardından sekans reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PZR pürifikasyonu ve sekans reaksiyon koşulları Çizelge 3.7.1 ve Çizelge 3.7.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7.1. PZR pürifikasyonu içeriği ve reaksiyon koşulları

PZR Pürifikasyonu bileşenleri		PZR Pürifikasyonu Reaksiyon Koşulu	
PZR Ürünü	4µl	37°C	20 dakika
Exonuclease I (10 U/µl)	0,4µl	80°C	20 dakika
Shrimp Alkalen Fosfataz (2 U/µl)	0,8µl	95°C	2 dakika

Çizelge 3.7.2. Sekans reaksiyonu içeriği ve reaksiyon koşulları

Sekans Reaksiyonu		Sekans Reaksiyon Koşulu	
Pürifiye PZR Ürünü	1,5µl	96°C	10 saniye
10µM Primer	0,5µl	50°C	5 saniye
Big Dye (Thermo Fisher Scientific)	0,6µl	60°C	4 dakika
10X Big Dye Tamponu	0,95µl		
dH ₂ O	6,45µl		
Son Hacim	10µl		

24 Döngü

Sekans reaksiyonu BigDye™ Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Sekans reaksiyonunun ardından reaksiyon ürünleri sekans pürifikasyon işlemine tabi tutulur. Sekans pürifikasyonu için kullanılan yöntem aşağıdaki gibidir:

- Sekans reaksiyonu sonucunda elde edilen ürüne, 2 µl 3 M sodyum asetat ve 50 µl %100’lük soğuk etanol eklenerek karıştırılır. Karışım 1,5 ml’lik tüpe alınır.

- 20 dakika -20°C 'de inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrasında 13000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir.
- Üst faz dikkatlice uzaklaştırılır.
- Pelet üzerine 250 μl %70'lik soğuk etanol eklenir ve 13000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilir.
- Üst faz dikkatlice uzaklaştırılır.
- Etanolün tamamen uçması beklenir.
- Ardından 20 μl formamid eklenir. Daha sonra vortekslenir ve spin edilir.
- Örnekler sekans tüplerine alınır ve 94°C 'de 4 dakika boyunca denatüre edilir.
- Denatürasyon sonrası -20°C 'de 3 dakika inkübe edilir.
- İnkübasyonu tamamlanan örnekler sekans cihazına yüklenir.

4. SONUÇLAR

4.1. Spektrofotometre sonuçları

Kazı sonucu elde edilen kemik örneklerinden 50 mg tartılarak, diş örneklerinden ise dentin/pulpadan çıkan tozun tamamı kullanılarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Fenol-kloroform yöntemi ile yapılan izolasyon örneklerinin spektrofotometre ölçümleri Çizelge 4.1’de, silika membran yöntemi ile yapılan izolasyon örneklerinin spektrofotometre ölçümleri ise Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Fenol-kloroform izolasyonunun spektrofotometre ölçüm sonuçları

Örnek tipi	Örnek	DNA miktarı (ng/µl)	260/280	260/230
Femur	1003	826,93	1,51	0,37
	1012	1213,90	1,51	0,50
	1014	797,17	1,45	0,48
	1040	571,33	1,52	0,36
	1068	468,02	1,52	0,27
Talus	1026	1020,37	1,58	0,35
	1030	1237,88	1,47	0,57
	1043	1018,29	1,56	0,36
	1059	716,40	1,79	0,23
	1107	994,58	1,60	0,35
Diş	1009	11,42	1,57	0,69
	1059	13,86	1,80	0,83
	1079	12,90	1,78	1,31
	1091	19,03	1,47	0,76
	1111	19,18	1,62	1,38

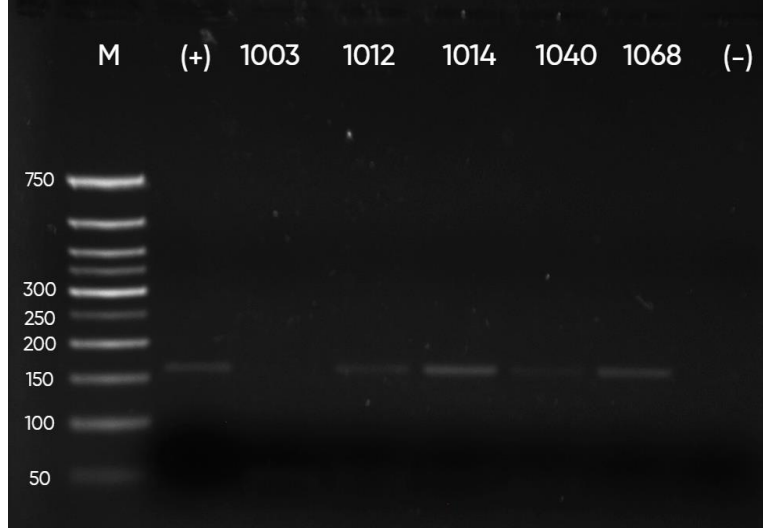
Çizelge 4.2. Silika membran izolasyonunun spektrofotometre ölçüm sonuçları

Örnek tipi	Örnek	DNA miktarı (ng/µl)	260/280	260/230
Femur	1003	9,86	1,49	0,11
	1012	4,35	1,48	0,21
	1014	68,21	1,31	1,00
	1040	5,34	0,47	0,54
	1068	9,42	1,13	0,38
Talus	1026	24,34	1,40	0,58
	1030	11,31	1,45	0,45
	1043	79,83	1,19	1,45
	1059	77,05	1,03	3,26
	1107	9,35	1,36	0,61
Diş	1009	13,74	1,09	0,86
	1059	2,48	1,74	0,41
	1079	8,45	1,39	0,71
	1091	11,55	1,28	0,69
	1111	3,24	1,76	0,19

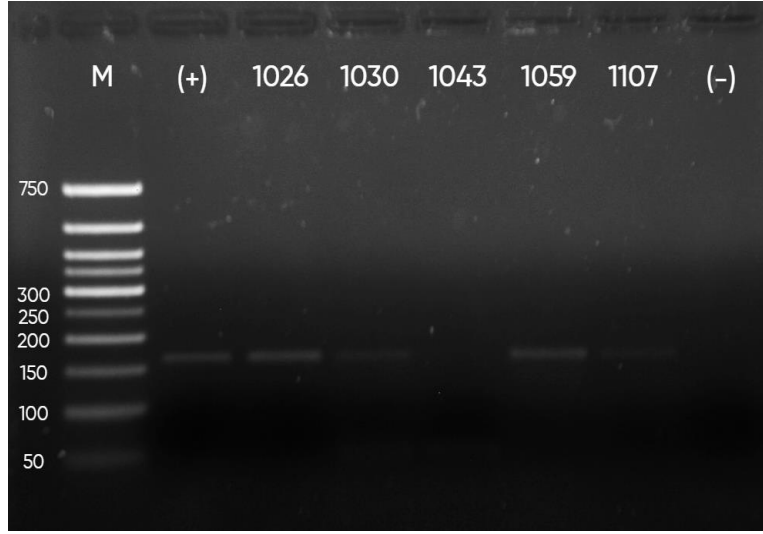
4.2 Agaroz jel elektroforezi sonuçları

4.2.1. Fenol-Kloroform izolasyonuna ait sonuçlar

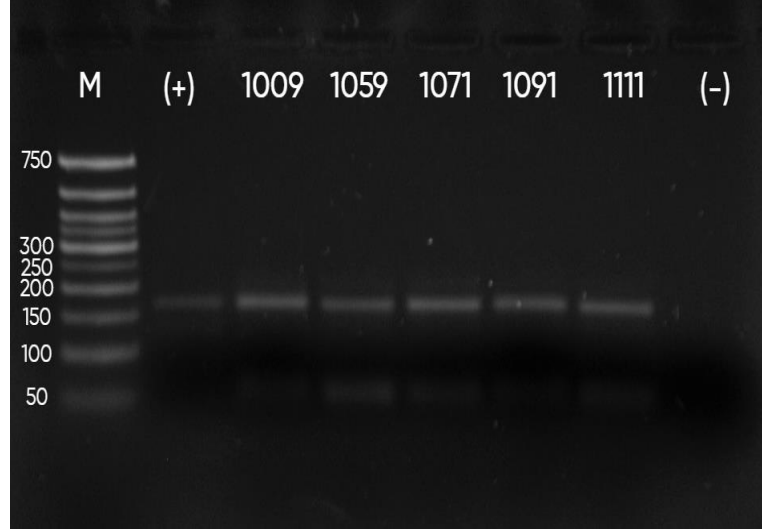
Fenol-Kloroform izolasyon yöntemi ile izolasyonu yapılarak 16002-F ve 16164-R primer çifti ile 3 kuşak amplifikasyonu gerçekleştirilen ve 162 bp uzunluğunda olan A amplikonunun %2'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. Femur örneklerinde yalnızca 1003 numaralı örnek, talus örneklerinde ise yalnızca 1043 numaralı örnek başarısız sonuç vermiştir. Diş örneklerinin tamamında A amplikonu başarılı şekilde çoğaltılmıştır.



Şekil 4.1. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen femur örneklerinin A amplikonuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).

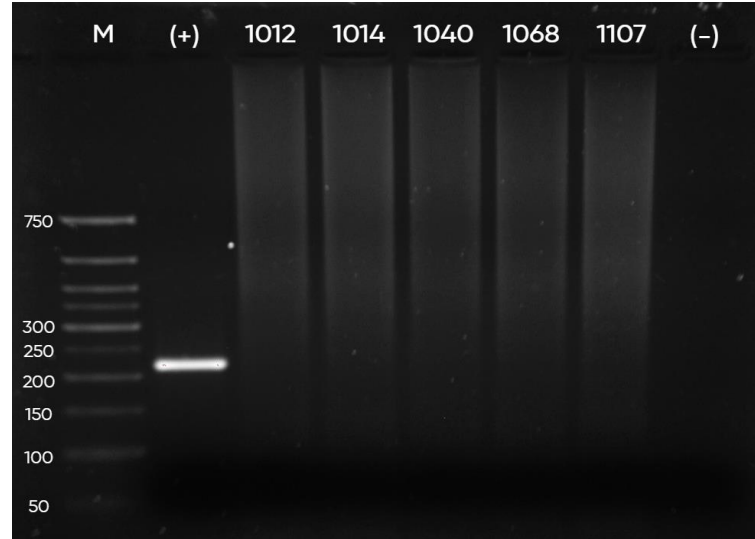


Şekil 4.2. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen talus örneklerinin A amplikonuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).

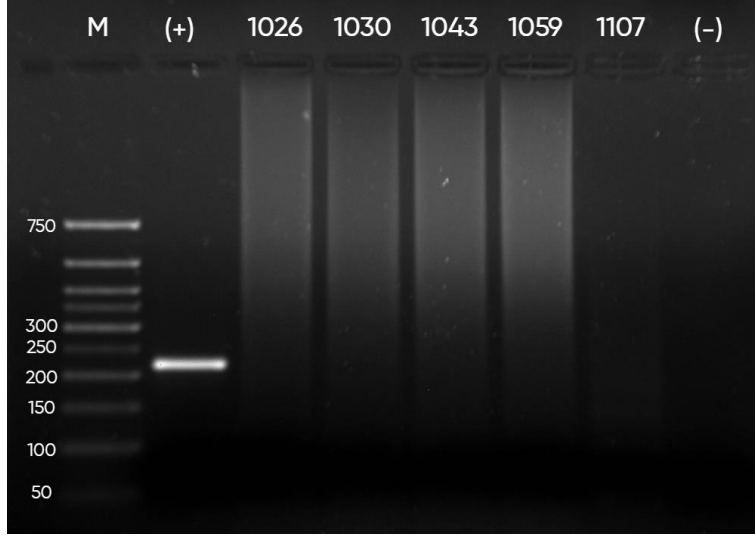


Şekil 4.3. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen diş örneklerinin A ampliconuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).

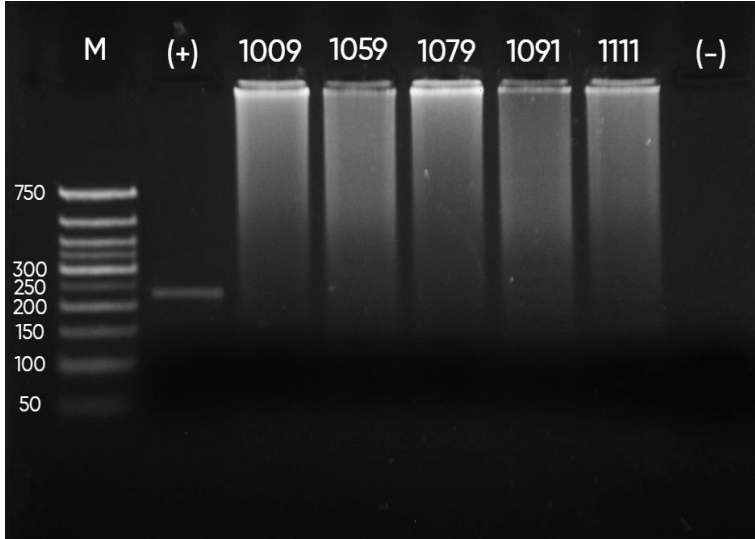
Fenol-kloroform izolasyon yöntemi ile izolasyonu yapılarak mitS5D-F ve mit16560-R primer çifti ile 3 kuşak amplifikasyonu gerçekleştirilen ve 218 bp uzunluğunda olan B ampliconunun %2'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. Femur, talus ve diş örneklerinin tamamında B ampliconu başarılı şekilde amplifiye edilememiştir.



Şekil 4.4. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen femur örneklerinin B ampliconuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).

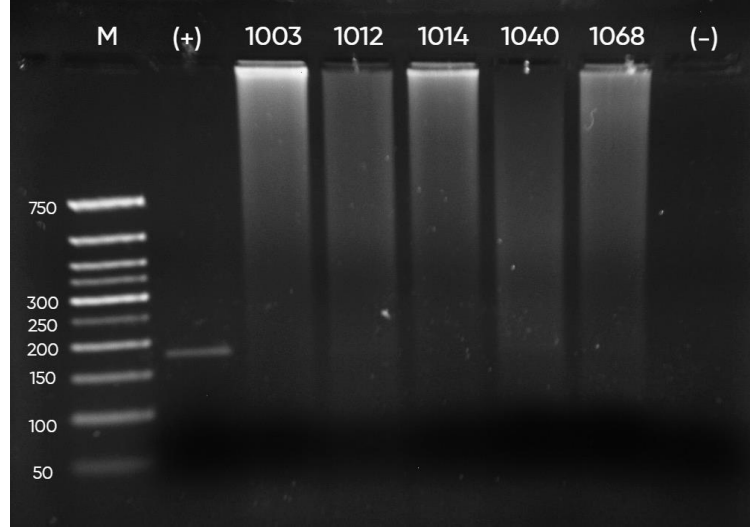


Şekil 4.5. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen talus örneklerinin B ampliconuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).

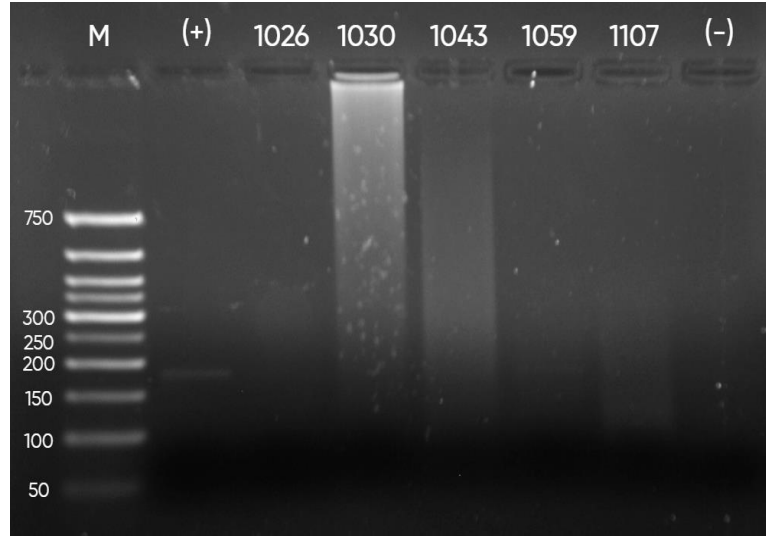


Şekil 4.6. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen diş örneklerinin B ampliconuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).

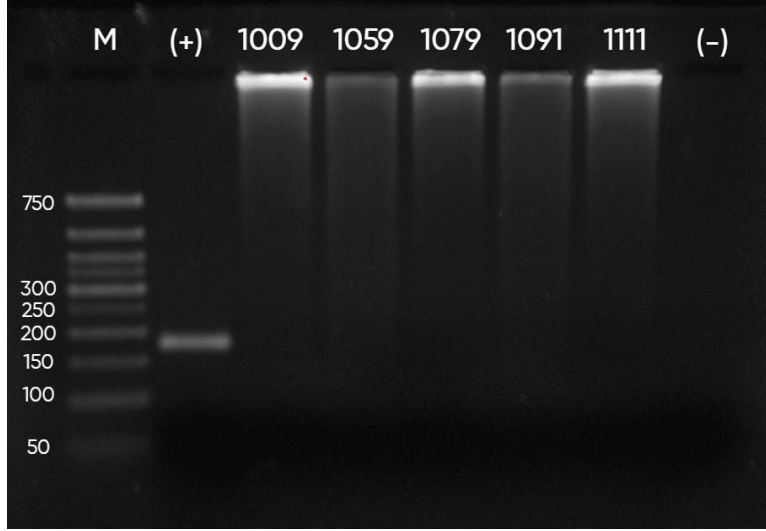
Fenol-kloroform izolasyon yöntemi ile izolasyonu yapılarak mitS2D-F ve 16387-R primer çifti ile 3 kuşak amplifikasyonu gerçekleştirilen ve 177 bp uzunluğunda olan C ampliconunun %2'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Talus örneklerinde yalnızca 1026 ve 1059 numaralı örneklerde çok az miktarda olsa da beklenen büyüklükte bant görülmüştür. Femur ve diş örneklerinde ise C ampliconu başarısız sonuç vermiştir.



Şekil 4.7. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen femur örneklerinin C amplikonuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).



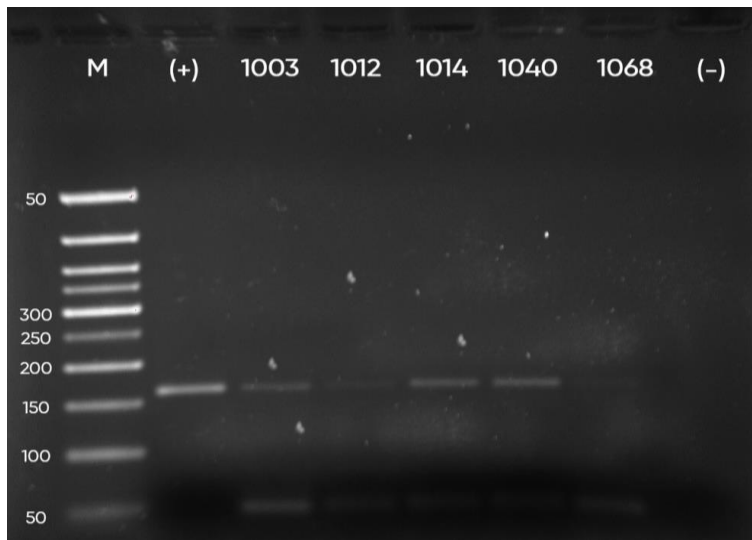
Şekil 4.8. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen talus örneklerinin C amplikonuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).



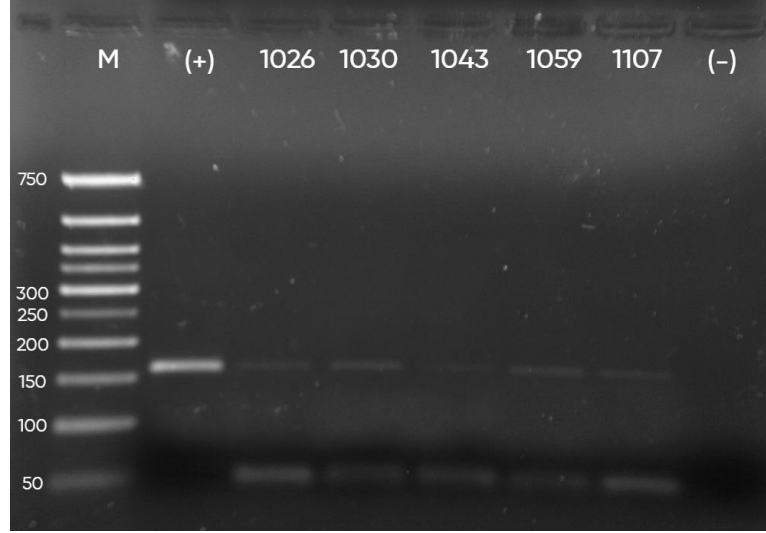
Şekil 4.9. Fenol- kloroform yöntemi ile izole edilen diş örneklerinin C ampliconuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).

4.2.2. Silika membran izolasyonuna ait sonuçlar

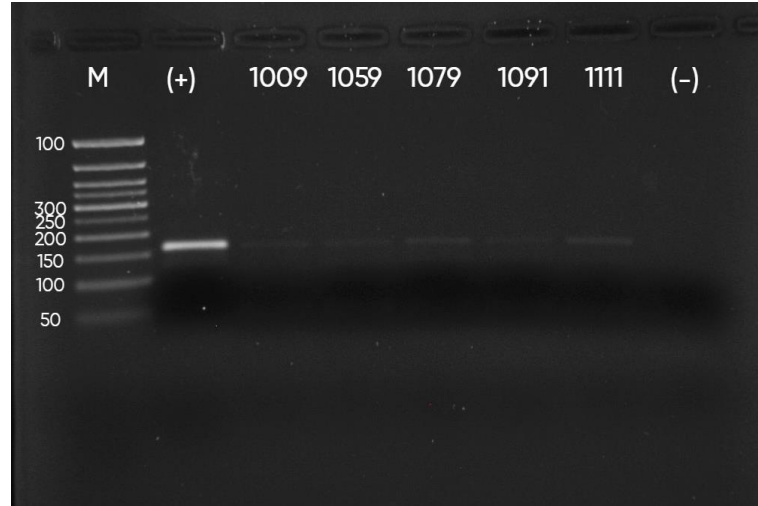
Silika membran izolasyon yöntemi ile izolasyonu yapılarak 16002-F ve 16164-R primer çifti ile 2 kuşak amplifikasyonu gerçekleştirilen ve 162 bp uzunluğunda olan A ampliconunun %2'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir. Femur, talus ve diş örneklerinin tamamında A ampliconu başarılı şekilde çoğaltılmıştır.



Şekil 4.10. Silika membran yöntemi ile izole edilen femur örneklerinin A ampliconuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).

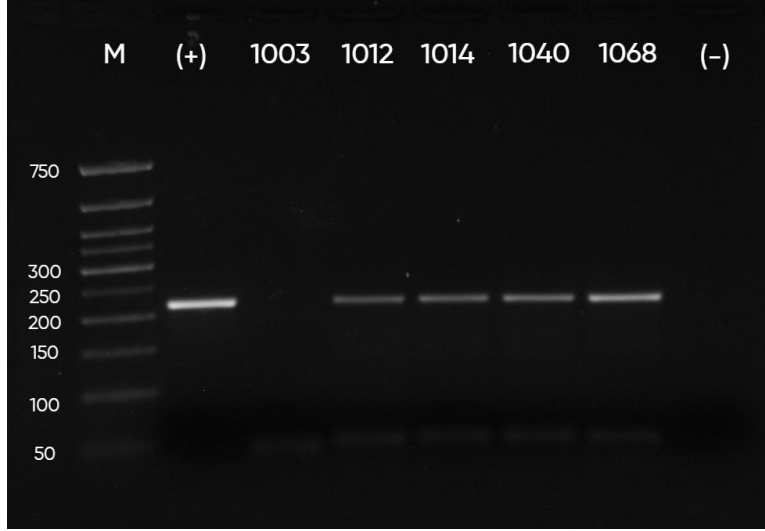


Şekil 4.11. Silika membran yöntemi ile izole edilen talus örneklerinin A amplikonuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).

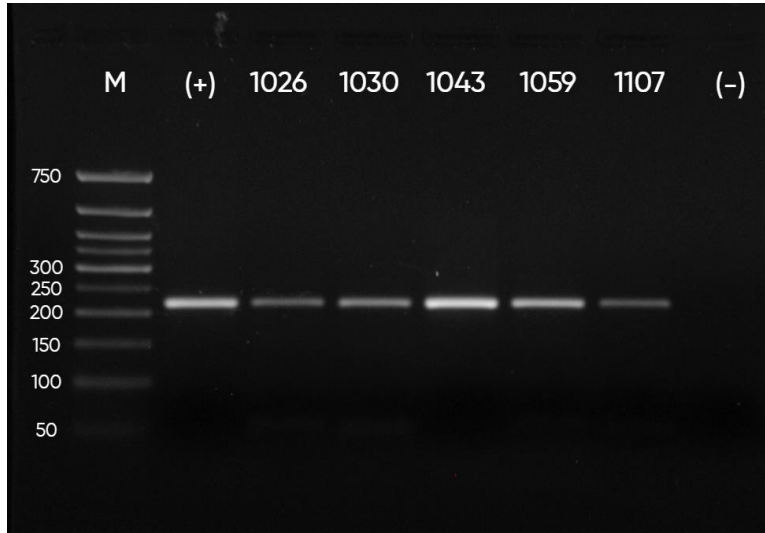


Şekil 4.12. Silika membran yöntemi ile izole edilen dış örneklerinin A amplikonuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).

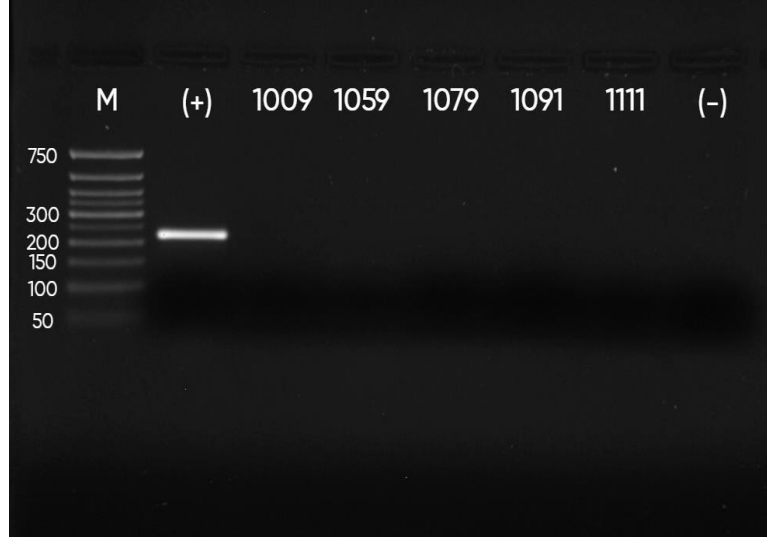
Silika membran izolasyon yöntemi ile izolasyonu yapılarak mitS5D-F ve mit16560-R primer çifti ile 2 kuşak amplifikasyonu gerçekleştirilen ve 218 bp uzunluğunda olan B amplikonunun %2'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verilmiştir. Femur örneklerinden yalnızca 1003 numaralı örnekte, dış örneklerinin ise tamamında amplifikasyon başarısız olmuştur. Talus örneklerinin tamamında ise bu bölgede başarılı amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.13. Silika membran yöntemi ile izole edilen femur örneklerinin B amplikonuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).

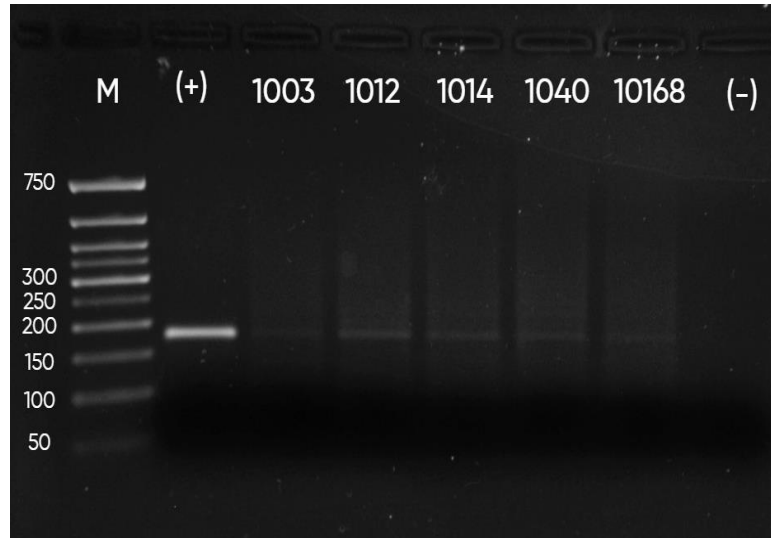


Şekil 4.14. Silika membran yöntemi ile izole edilen talus örneklerinin B amplikonuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).

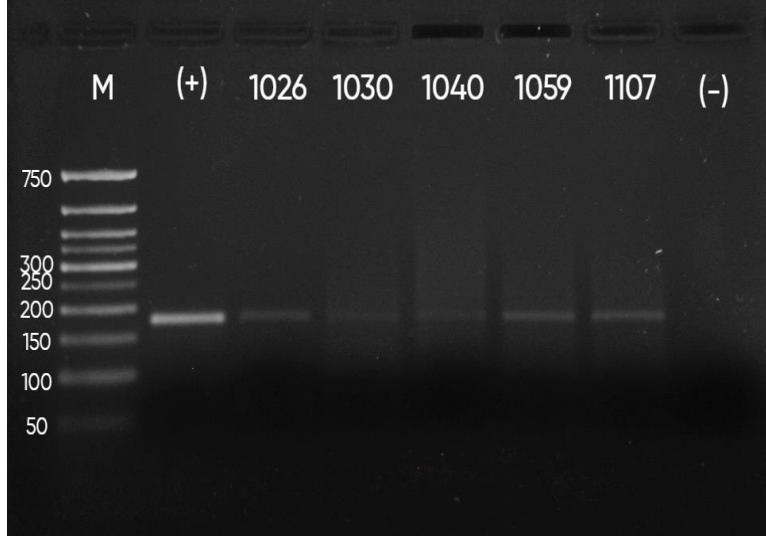


Şekil 4.15. Silika membran yöntemi ile izole edilen diş örneklerinin B ampliconuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).

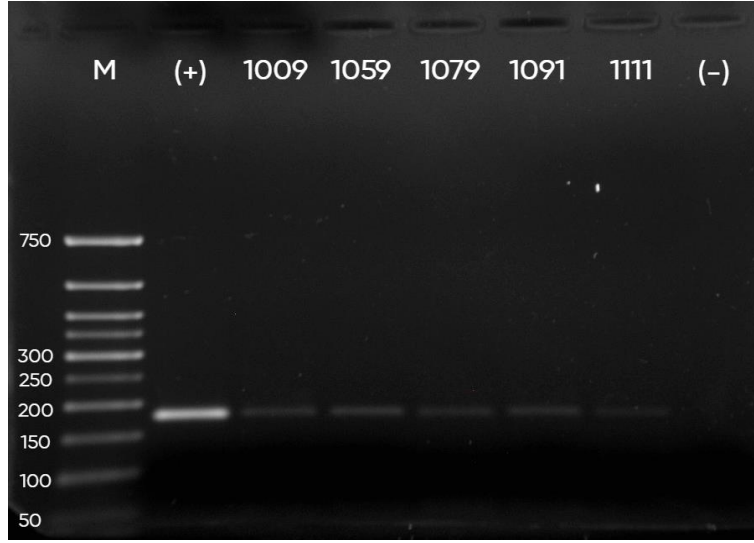
Silika membran izolasyon yöntemi ile izolasyonu yapılarak mitS2D-F ve 16387-R primer çifti ile 2 kuşak amplifikasyonu gerçekleştirilen ve 177 bp uzunluğunda olan C ampliconunun %2'lik agaroz jel görüntüleri Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de verilmiştir. Femur, talus ve diş örneklerinin tamamında C ampliconu başarılı şekilde çoğaltılmıştır.



Şekil 4.16. Silika membran yöntemi ile izole edilen femur örneklerinin C ampliconuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).



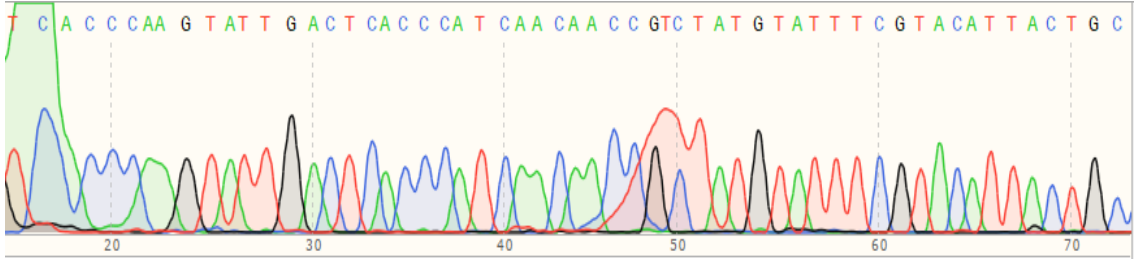
Şekil 4.17. Silika membran yöntemi ile izole edilen talus örneklerinin C ampliconuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).



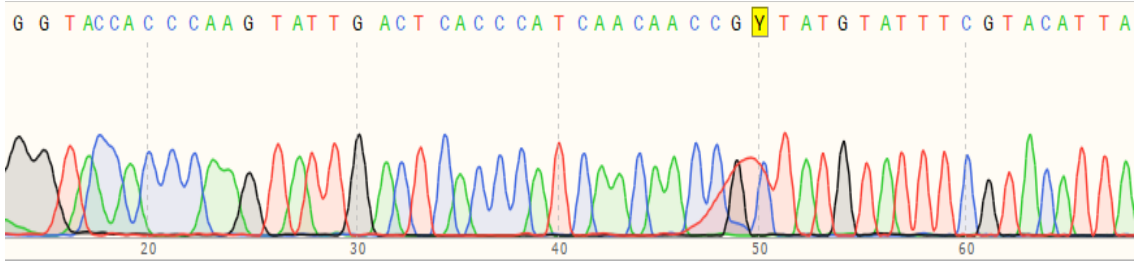
Şekil 4.18. Silika membran yöntemi ile izole edilen dış örneklerinin C ampliconuna ait sonuçları. M (marker), (+) (pozitif kontrol), (-) (negatif kontrol).

4.3. Seçili Örnekler ile Yapılan Sanger Dizileme Sonuçları

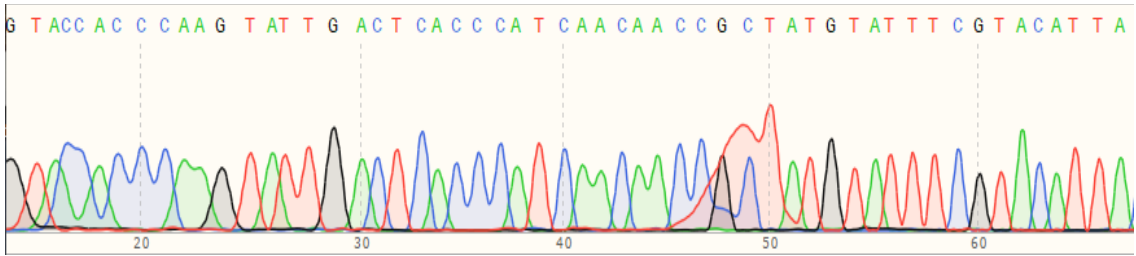
Fenol-kloroform yöntemi ile izolasyonu gerçekleştirilen ve başarılı şekilde çoğaltılabilen 1014, 1026, 1059, ve 1107 numaralı örneklerde 16002-F primeri (A ampliconu) ile okunan DNA dizilerinin kromatogram görüntüleri Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21 ve Şekil 4.22’de verilmiştir.



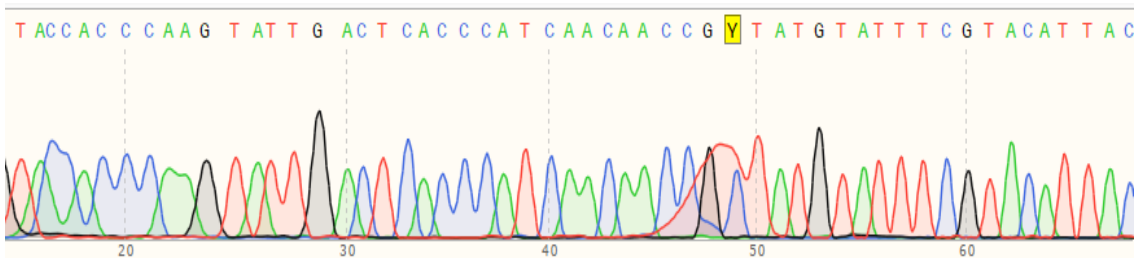
Şekil 4.19. 1014 numaralı femur örneğine ait kromatogram görüntüsü



Şekil 4.20. 1026 numaralı talus örneğine ait kromatogram görüntüsü



Şekil 4.21. 1059 numaralı talus örneğine ait kromatogram görüntüsü



Şekil 4.22. 1107 numaralı talus örneğine ait kromatogram görüntüsü

5. TARTIŞMA

Antik örneklerden elde edilen DNA dizilerinin okunması evrimsel ve antropolojik çalışmalar için önemli bir rol oynar [76]. İlk antik DNA çalışmaları mumya ve müze örneklerinin dış etkenlerden korunduğunu ve antik DNA'nın yalnızca bu örnek grubundan elde edilebildiği düşüncesine odaklanmış ve ilk çalışmalar bu örnek grubu üzerinden yürütülmüştür. Ancak ilerleyen zamanlarda kazılardan elde edilen mineralize dokuların da yüksek miktarda DNA içerdiği gözlenmiştir. Böylelikle antik DNA ile ilgili çalışmalar omurgalı kemiklerine ve dişlerine yönelmiştir [11]. Kemikler, mumya örnekleri, müze örnekleri, kehribarda bulunan böcekler ve bitki fosilleri gibi geçmişten günümüze kadar kısmen olsa da korunaklı kalmış birçok biyolojik materyaldeki antik DNA arkeoloji, biyoloji ve adli bilimler gibi çeşitli disiplinler için önemli bilgiler sunar. Antik DNA, popülasyonlarla ilgili hipotezlerin geliştirilmesine katkıda bulunurken, bireylerin cinsiyetlendirilmesi, akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi, popülasyon göçleri ve hatta tarımın gelişimine dair bilgiler sunma potansiyeline sahiptir [15]. Bu bağlamda yapılan çalışmaların çoğu örnekten elde edilen DNA'nın dizisinin okunmasını gerektirir. Antik DNA'nın örnekten başarılı bir şekilde izole edilmesi, DNA dizisinin başarılı bir şekilde okunabilmesi için kritik bir aşamadır. Ancak antik DNA izolasyonunda elde edilebilir DNA'nın düşük miktarı ve olası kontaminasyon riski büyük bir problem teşkil eder [77]. Hasar almış ve düşük miktarda bulunan DNA ile çalışırken doğru izolasyon metodunun seçimi ve metot sırasında yapılacak uygulamalar tüm deneyin gidişatını belirleyecektir [69, 78]. İzolasyon metotları örneğin çeşidine, hangi dokudan elde edildiğine ve hasarın derecesine göre değişebilir ve literatürde farklı izolasyon metotlarının denemelerine dair çeşitli çalışmalar bulmak mümkündür [78, 79].

Antik DNA çalışmalarında uygulanan izolasyon yöntemleri, örneğin elde edildiği doku ve korunma koşulları dolayısıyla standart izolasyon protokollerinden temelde 3 açıdan farklıdır. Bunlardan ilki çoğu DNA izolasyon yönteminin bozulmamış ve yüksek oranda DNA içeren taze dokular için tasarlanmış olmasıdır. Antik DNA'yı barındıran eski örneklerde ise hücre yapısı çoğunlukla bozunmaya uğramıştır ve izolasyon parametreleri bu durum göz önünde bulundurularak optimize edilmelidir. İkincisi,

izolasyon yapılırken çok agresif yöntemlerden kaçınılması gerektiğidir çünkü antik DNA bağlardaki hidroliz, depürinasyon, deaminasyon gibi çeşitli süreçlerle hasar görmüştür. Agresif yöntemler her ne kadar örnekten DNA salınımını artırabiliyor olsa da antik DNA molekülüne daha fazla hasar vererek verimi azaltma potansiyeline sahiptir. Üçüncüsü ise eski kemik ve diş örneklerinin PZR inhibitör maddeleri bakımından zengin oluşu ve izolasyon sırasında DNA ile birlikte elde edilebiliyor olmasıdır. Bu inhibitör maddeler amplifikasyona müdahale ederek çalışmanın verimini yüksek oranda düşürebilir. Bu nedenle antik DNA izolasyonu yapılırken bir dizi problem ile baş edilmesi gerekmektedir [80]. Tüm bunların yanı sıra ölümden sonra meydana gelen bozunmalar da elde edilecek DNA'nın kalitesini büyük ölçüde düşürmektedir. Bu durum DNA şablonunun bozulması ve kimyasal modifikasyonlar ile sonuçlanır, böylelikle de DNA molekülünün uzunluğunun azalmasına sebep olabilir. Bozunmaya uğramış moleküllere yönelik geliştirilen izolasyon metotlarıyla antik DNA'nın izolasyonunun veriminin iyileştirilmesi, arkeolojik ve paleontolojik kalıntılardan elde edilecek veriler konusunda önemli bir adımdır [81, 82].

İzolasyon parametreleri belirlenirken antik DNA'nın elde edileceği dokunun tipi ve örneğin saklandığı koşullar önemlidir. Kemik gibi mineralize dokulardaki DNA'nın kullanılabilir olarak uzun süre kalması ortam şartları ile doğrudan ilişkilidir. Örneğin, toprakta bulunan kemiklerdeki gözenek boşluklarına ortamdaki mantar ve bakteriler yerleşerek mineralize dokuların parçalanmasına sebep olurlar. Kemik dokunun bozunmasına dair elde edilen bilgilerin yanında kemik içerisindeki DNA'nın nasıl bozulduğu ve hatta tam olarak nerede lokalize olduğu net bir cevaba kavuşmamıştır. Bu konu hakkında çeşitli görüşler sunulmuş olsa da kemik ve DNA arasındaki net ilişki tam olarak aydınlatılamamıştır. [82]. Kemikte bulunan organik birimlerin DNA için bir bariyer görevi gördüğü ve böylelikle DNA'yı koruduğu düşünülmektedir. Ancak yine de kemik matrisinde bulunan DNA'nın yoğunluğu azdır ve verimli bir şekilde eldesi zordur [83]. Diş dokusu; diş minesi ve kök olmak üzere iki bölümden oluşur. Kök kısmı pulpa, dentin ve sementi içinde barındırır. Diş minesi insan vücudunda bulunan en sert dokudur ve hücre barındırmaz, bu nedenle diş örneklerinde DNA eldesi dişin ana bileşeni olan ve diş minesine kıyasla yüksek oranda hücre barındıran pulpa/dentin kompleksinden gerçekleştirilir [83].

İskelet kalıntılarında bulunan DNA'nın verimi ve oranı bulunduğu örneğin türüne göre değişkenlik gösterebilir. Genellikle femur, tibia ve humerus gibi daha büyük kemikler ve diş örnekleri genetik analizler için ilk tercihler olmuşlardır. Uzun kemiklerdeki yoğun kortikal yüzey ve diş dokudaki sert dış yüzeyin, örneği ve dolayısıyla barındırdığı DNA'yı daha iyi koruduğu düşünülmektedir. Milos ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, analizler sonucunda femur kemikleri humerus, radius ve ulna kemiklerine kıyasla daha başarılı sonuçlar vermiştir [84]. Hangi kemik türünün daha iyi sonuç verdiğini anlamak adına geçtiğimiz yıllarda birçok çalışma yapılmıştır ancak örneğin bulunduğu koşullar, aldığı hasar ve örneğin yaşı gibi etkenler değişkenlik gösterebileceğinden, hangi örnek türünden daha verimli DNA elde edilebileceğine dair ortak bir fikre varmak çok mümkün olmamıştır. Benzer ortamlardan toplanan örnekler arasında bile elde edilen DNA'nın miktarı ve kalitesi arasında farklar oluşmaktadır. Bununla birlikte DNA eldesi için tercih edilecek izolasyon yöntemi de verimli DNA eldesinde önemli bir rol oynamaktadır [82, 83]. İzolasyon metodu iskeletin hangi bölgesinin çalışılacağına göre değişebilmekle birlikte, PZR ile amplifiye edilecek bölgeye göre de değişebilir. Bir örnek tipi veya amplifikasyon bölgesi için çok iyi çalışan bir metod diğerleri için çalışmayabilir [69].

Kemik ve diş örneklerinden yapılacak izolasyonlarda temelde dekontaminasyon, demineralizasyon ve saflaştırma basamakları olmak üzere 3 basamak izlenir ancak demineralizasyon aşaması, farklı izolasyon metodlarına ve çalışmalara göre değişiklik gösterebilmektedir. Aynı zamanda literatürde bu aşamanın gerekliliğine ve çeşitlerine dayanan farklı fikirler ve çalışmalar mevcuttur, bu nedenle demineralizasyon uygulanmadan da başarılı sonuçlara ulaşıldığı çalışmalar bulmak mümkündür [69, 85-87]. Bu tez çalışmasında fenol-kloroform izolasyonu için 2 gecelik demineralizasyon uygulanan kemik örneklerinden, kit ile gerçekleştirilen silika membran izolasyonu için demineralizasyon işlemine tabi tutulmamış kemik örneklerinden yapılan izolasyonlar daha iyi sonuç vermiş ve çalışmada bu şekilde kullanılmıştır. Demineralizasyon aşamasının DNA kaybına yol açabileceği düşünülse de fenol-kloroform izolasyonunun daha yüksek verimde çalışması, örneklerin kalsiyum ve minerallerden temizlenmesi ile mümkün olmuştur.

Literatürde denenmiş ve başarılı-başarısız olmuş birçok izolasyon metodu bulunmaktadır. Ancak antik kemik örneklerinde başarılı olduğu gözlenen ve bu çalışmalarda sıklıkla karşımıza çıkan iki yöntem vardır. Bunlar fenol-kloroform ve silika temelli izolasyon yöntemleridir [69, 88, 89]. Antik DNA çalışmalarında örneklerden DNA eldesi için kullanılan tekniklerin çoğu, bir fenol-kloroform izolasyon metodunun varyasyonlarına dayanır [90]. Fenol-kloroform tekniği eski bir teknik olsa da, uygulanabilirliğindeki kolaylığı ve başarısı ile antik DNA alanı içerisinde popülerliğini uzun süre korumuştur [87, 90]. Bu yöntem DNA'nın izolasyonu için verimli olsa da zaman alan bir yöntemdir ve uzmanlık ister. Ayrıca protokol basamakları tehlikeli kimyasalların kullanımını gerektirir ve deney aşamalarında örneğin tüpler arası aktarımını içerir, bu durum ise hataya veya kontaminasyona sebep verebilir [91, 92].

Kemik tozlarından kaotropik bir tuz ve silika partiküller kullanılarak DNA'nın izolasyonu Boom ve meslektaşları tarafından gösterilmiş ve ardından farklı çalışmalarda farklı şekillerde kullanılmıştır [93, 94]. Higuchi ve arkadaşlarının yaptığı ilk antik DNA çalışmasından bu yana çeşitli antik DNA izolasyon metotları geliştirilmiştir. Bu metotlar mumyalanmış dokular, dışkı, kemik ve diş gibi farklı kalıntı türlerinde farklı başarılar göstermişlerdir. Rohland ve arkadaşları tarafından tanıtılan ve silika temelli bir yöntem olan izolasyon yöntemi [80] diğer metotlardan daha fazla PZR başarısı göstermiş ve antik örnekler için sıklıkla kullanılan bir yöntem olmuştur. İlerleyen yıllarda ise Dabney ve arkadaşları [95], Rohland ve arkadaşlarının metodunda iyileştirmeler yaparak çok kısa DNA fragmanlarını başarılı bir şekilde elde etmeyi sağlayan silika kolon temelli bir yöntem geliştirmişlerdir [81]. Yine silika kolon temelli bir başka izolasyon metodu ise orijinal olarak Yang ve arkadaşları [17] tarafından geliştirilmiştir ve farklı şekillerde antik DNA çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Her iki yöntem de antik DNA alanında farklı varyasyonlar ile kullanılıyor olsa da birbirlerine üstünlükleri zaman zaman araştırmacılar tarafından tartışılmıştır [96].

Literatürde sıklıkla farklı protokollerle kullanılan ve antik DNA'daki kısa fragmanları eldesindeki başarılarından ötürü bu tez çalışmasında silika membran temelli bir izolasyon yöntemi tercih edilmiş ve klasik bir yöntem olan fenol-kloroform izolasyonu ile farklı parametreler altındaki verimleri karşılaştırılmıştır. PZR aşamasında hedef

bölge ve bu bölgeye özgü tasarlanan primerler türe özgüdür. Tez çalışması kapsamında incelemiş olduğumuz örnekler insana ait olup tasarlanan mitokondriyal primerler insan mitokondriyal DNA'sı Cambridge Referans Dizisi'ne (rCRS) göre hazırlanmıştır (NCBI referans sekansı: NC_012920.1). Bu nedenle örnekten kaynaklanan bir mikrobiyal veya fungal kontaminant DNA'nın, insana özgü primerler ile amplifiye olmaması beklenmektedir. Diğer yandan kazıda ve analiz aşamasına kadar ilerleyen tüm süreçlerde insanların yaygınlığı göz önünde bulundurulursa arkeolojik insan kalıntıları ile yapılan çalışmalarda yaşanan en büyük kontaminasyon problemi modern insan DNA'sıdır. Kontaminant insan DNA'sı arkeolojik örneklerde mikro damlacıklarda taşınan epitelyal hücrelerle ve cilt hücreleri yoluyla bulaşabilir. Böylelikle kontaminant DNA, izolasyon sırasında örnekten elde edilecek antik DNA miktarına yakın veya daha fazla miktarda elde edilebilir. Ancak bu tür kontaminant DNA'lar kararlı değildir ve kısa ömürlüdür, genellikle de yüzeysel olarak bulunurlar. Kemikte bulunan antik DNA çevresindeki sert doku tarafından korunur, ancak kontaminant insan DNA'sı nem ve doğal UV'ye maruz kalarak uzun süre örnek üzerinde varlığını sürdüremeyebilir [97]. Örnek üzerinde varlığını koruyan kontaminantlardan kurtulmak için ise örneğin ve içerdiği antik DNA'nın sağlam kalmasını da gözeterek yüzey temizliği ve UV ile sterilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamalarda kontaminasyondan kaçınmak için pulverizasyon işlemleri sırasında tek kullanımlık malzemeler her örnek sonrasında atılmış, çalışma ortamı ve kullanılacak malzemeler çamaşır suyu ve alkol ile temizlenmiştir.

İzolasyonu gerçekleştirilen DNA örnekleri sonraki moleküler tayinlerde kullanılmadan önce DNA miktarı ve saflığının ölçümü yapılır [98]. Pürin ve pirimidin bazlarının rezonans yapısı sebebiyle nükleik asitler 260 nm (nanometre) dalga boylarında UV ışığını absorbe eder bu nedenle DNA miktarı, 260 nm dalga boyundaki absorbansı kullanılarak belirlenir [99]. Ancak yapılan çalışma için sadece DNA'nın miktar tayini yeterli değildir. DNA eldesinde izolasyon metodundan veya örnekten kaynaklanan kirlenici maddeler PZR inhibitörü olarak karşımıza çıkabilir, bu nedenle DNA'nın saflık tayininin de yapılması gerekmektedir. DNA'nın saflığı 260/230 ve 260/280 absorbans oranlarına bakılarak yorumlanır. DNA saflığı birincil olarak 260/280 oranına bakılarak belirlenir ve genellikle 1,8 oranı saf olarak kabul edilir. Bu oran düşüldükçe 280 nm yakınında absorbans veren protein, fenol ve diğer kirlenicilerin varlığından şüphelenilir

[98]. Silika membran ve fenol-kloroform yöntemi ile izolasyonları gerçekleştirilen örnekler bakıldığında yalnızca fenol-kloroform ile izole edilen 2 adet diş örneği (1059 ve 1079 numaralı dişler) ve bir adet talus örneği (1059 numaralı talus) bu orana yakın/eşit olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2). Diğer örneklerde ise bu oran 1,8'den düşüktür. DNA saflığının ikincil ölçüsü 260/230 oranıdır ve genellikle 2,0-2,2 aralığında saf DNA'nın varlığını işaret eder. Oran beklenenden düşükse protein, GuHCL (Guanidin hidroklorür), EDTA, karbonhidratlar, tuzlar veya fenol gibi kirleticilerden şüphelenilir. Yapılan izolasyonların neredeyse tamamında bu oran beklenen değerin çok altındadır. Modern DNA çalışmalarında genellikle PZR karışımına fazla miktarda DNA eklenmesi bir amplifikasyon problemine yol açabileceğinden konsantrasyon ölçümü yapılır ancak antik DNA'da durum biraz farklıdır. İzole edilen örneklerde antik DNA'nın konsantrasyonu genellikle doğru sonuçları yansıtmayabilir. Antik DNA çalışmalarında PZR sonucu amplifikasyona ürünü elde edilememesi çoğunlukla aşırı DNA miktarından ziyade inhibitör nedeniyle olabilir. Aynı şekilde kemik örneğinin bulunduğu ortamdan edindiği mikroorganizmalar sebebiyle aslında spektroskopik yöntemlerle yapılan ölçümün sonucunda çıkan değer yalnızca örnek içerisindeki antik DNA'yı yansıtmayabilir [15, 69] Antik DNA üzerine yapılan bir tez çalışmasında da benzer bir çıkarım yapılmış, miktar ve saflık değerlerinin antik DNA çalışmalarında anlamlı bulunamayabileceği belirtilmiştir [100]. Bu nedenle antik DNA için DNA'nın varlığına ve kalitesine dair en güvenilir sonuç PZR deneyinin sonucuna dayanır.

Örnekler, Muğla'nın Yatağan İlçesi'nin 7 km batısında bulunan Eskihisar Köyü'nde gerçekleştirilen kazı çalışmalarından elde edilmiştir. Kazının yapıldığı bölge Akdeniz iklim kuşağında bulunmaktadır. Bu kuşakta yaz ayları sıcak ve kurak, kış ayları ise ılık ve yağışlıdır. Yaz aylarındaki yüksek sıcaklıklar zaman zaman 40 dereceyi geçebilmektedir (Muğla İl Kültür ve Turizm Müdürlüğü, <https://mugla.ktb.gov.tr/>, Erişim Tarihi: 28.12.2022). Antik DNA'nın korunmasındaki en önemli faktörlerden biri çevresel koşullar ve sıcaklıktır. Yüksek sıcaklık ve nemde DNA, yüksek oranda bozunmaya uğrayabilmektedir. Kazının gerçekleştirildiği bölgede yaz ayları her ne kadar kurak olsa da yüksek sıcaklık koşulları ve kış aylarında gerçekleşen yüksek yağış miktarları nem artışına sebep vererek DNA'nın bozunmasını hızlandırabilir. Bu bağlamda deneylerde kullanılan örneklerin gömü alanı içinde, literatürde DNA'nın

örnekteki korunumu için ideal koşullar olarak bahsedilen [53] koşullardan uzak bir şekilde saklanmış olduğunu söylemek mümkündür.

Bu çalışma kapsamında fenol-kloroform yöntemi ile izolasyonu gerçekleştirilen örneklerden yalnızca A amplikonundan verimli bir sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3). 162 bp olarak belirlenen ve çalışmamızda kullanılan en kısa amplikon olan A'nın, daha uzun diğer amplikonlara kıyasla daha başarılı sonuç vermesi beklenmektedir, bu bağlamda elde ettiğimiz sonuçlar literatür ile uyumluluk göstermektedir. Diş örneklerinde bulunan az miktardaki DNA düşünüldüğünde A amplikonunda, tüm diş örneklerinde femur ve talus örneklerine kıyasla daha yoğun bantlar elde edilmesi beklenmedik bir sonuç olsa da diş dokusundan elde edilen DNA'ların diğer kemik örneklerine göre daha kaliteli olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple kısa amplikon boyutlarında iyi bir sonuç elde edilmesi yine de şaşırtıcı değildir. Femur, talus ve diş örneklerinin büyük çoğunluğunun diğer primer çiftleri ile başarısız amplifikasyonu, fenol-kloroform yöntemi ile elde edilen DNA fragmanlarınının 172 ve 218 bp uzunluklarından daha kısa olduğunu düşündürmektedir.

Silika membran temelli izolasyon yöntemi ile gerçekleştirilen izolasyonlarda femur ve talus örneklerinde A, B (1003 numaralı örnek hariç) ve C amplikonlarında tüm örnekler başarılı amplifikasyon göstermiştir (Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.16, Şekil 4.17). Tüm amplikonların PZR sonuçları agaroz jel üzerinde kıyaslandığında en net ve yoğun bantlar B amplikonunda elde edilmiştir. Kullanılan primerlerin kalitesi, hassaslığı ve özgüllüğü PZR deneyindeki amplifikasyon başarısı için kritik bir öneme sahiptir. Bu nedenle farklı primer çiftlerinin uzunluktan bağımsız olarak antik DNA üzerinde farklı amplifikasyon başarısı gösterebileceği düşünülebilir. Böylelikle femur ve talus örneklerinde tüm amplikon boyutlarından başarılı sonuç alınan silika temelli izolasyon yöntemi için mitS5D-F ve mit16560-R primerlerinin (B amplikonu) diğer primerlere kıyasla daha başarılı bir amplifikasyon gösterdiği söylenebilir. Femur ve talus örnekleri arasından yalnızca 1003 numaralı örnekte B amplifikasyonunun başarısız olması bu örnekte amplifikasyonu gerçekleştirilmek istenen bölge üzerinde 218 bp kadar bir uzunlukta amplifiye edilebilir DNA fragmanı bulunmamasından kaynaklanmış olabilir. Aynı zamanda tasarlanan her primer çifti mitokondriyal DNA'nın farklı bölgelerini amplifiye ettiği için DNA'nın bu örnek üzerinde eşleşeceği yerlerde hasara

uğraması ve bu nedenle jelde görüntülenebilir bir amplifikasyon sonucu gözlenmemiş olması muhtemeldir.

Silika membran yöntemi ile izolasyonu gerçekleştirilen diş örnekleri A ve C amplikonlarında başarılı amplifikasyon gösterirken (Şekil 4.12, Şekil 4.18) B amplikonunda sonuç vermemiştir (Şekil 4.15). Amplikonların PZR reaksiyonu sonucu agaroz jel görüntüleri kıyaslandığında 162 bp uzunluğundaki A amplikonu 177 bp'lik C amplikonuna kıyasla daha net bantlar vermiştir. Bu bağlamda en uzun amplikon olan B amplikonundan sonuç alınamaması ve en kısa amplikon olan A'dan daha net sonuçlar elde edilmesi antik DNA literatürü ile tutarlıdır.

Antik DNA'da uygulanacak izolasyon yöntemi seçilirken, arkeolojik örneklerde bolca bulunan PZR inhibitörlerinden kurtulmak ve az miktardaki DNA'yı elde edebilmek çok önemlidir. İnhibitörlerin temizlenmesi ve başarılı DNA eldesi için DNA'nın silikaya bağlanması ve uygun bir elüsyon tamponu ile eldesinin oldukça verimli bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Bu yaklaşım fenol-kloroform izolasyonlarında oluşabilecek DNA kaybını en aza indirmesinden dolayı elde edilen DNA'nın miktar ve kalitesi bakımından da daha başarılı görülmüştür [15, 89, 96]. Rohland ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada silika temelli izolasyon yöntemleri, fenol-kloroform yöntemi ve çeşitli kitlerle yapılan antik DNA izolasyonları verim açısından karşılaştırılmış ve silika temelli izolasyon yöntemleri en verimli yöntem olarak bulunmuştur. Aynı zamanda fenol-kloroform izolasyonlarında, kullanılan kitlerin bir kısmına göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir [96].

Yapılan tez deneylerinde fenol-kloroform ve silika membran izolasyon metotları örnek türü özelinde karşılaştırıldığında femur ve talus örnekleri silika membran izolasyon yöntemi ile hem daha yoğun hem de daha uzun amplikon boyutlarında elde edilebilmiştir. Diş örneklerinde ise fenol-kloroform yönteminde en kısa amplikon boyutunda yoğun bantlar elde edilmiş ve silika membran yönteminde ise daha az yoğun ancak daha uzun amplikon boyutlarında sonuç alınmıştır. Tüm bunlar göz önüne alındığında izolasyon yöntemlerindeki verimin örnek bağlamında değişebileceği de düşünülerek tez çalışmasından elde edilen veriler tutarlı bulunmuştur. Çalışılacak örneğin türüne göre değişiklikler olabilmekle birlikte hem amplifiye edilebilir DNA

boyutları hem de izolasyon ve PZR uygulamaları düşünüldüğünde silika membran izolasyonu daha yüksek verimde çalışmıştır. Antik örneklerde silika ve fenol-kloroform izolasyonlarının femur kemikleri üzerinden karşılaştırıldığı benzer bir tez çalışmasında silika izolasyonundan sonuç alınamamış ve fenol-kloroform izolasyon yöntemi daha başarılı bulunmuştur [101]. Ancak izolasyon yönteminin başarısızlığı örneklerin içerdiği DNA'dan bağımsız olarak araştırmacının tecrübesizliği, yöntemin hassaslığı ve protokol basamaklarının doğru izlenmemesinden kaynaklanabilir. Tez kapsamında yürütülen deneylerde antik örneklerde silika partikül temelli izolasyon yöntemi denenmiş ancak yöntemden tekrar edilebilir şekilde başarılı sonuç alınamamıştır. Bu nedenle silika membran temelli izolasyon yöntemine geçilmiş ve kit yardımı ile yapılan izolasyonlar başarılı sonuç vermiştir. Fenol-kloroform izolasyonu için 2 gecelik dekalsifikasyon ve 3. kuşak PZR uygulaması gerekirken silika membran izolasyonunda doğrudan kemikten DNA elde edilebilmiş ve 2. kuşakta sonuç alınmıştır. İş gücü ve çalışma basamaklarının kısalmasına ek olarak kontaminasyon riskini azaltması nedeniyle bu çalışmada silika membran izolasyonu daha verimli ve başarılı bir yöntem olarak bulunmuştur.

6. KAYNAKLAR

- [1] M. Schubert, A. Ginolhac, S. Lindgreen, J.F. Thompson, K.A.S. Al-Rasheid, E. Willerslev, A. Krogh, L. Orlando, Improving ancient DNA read mapping against modern reference genomes, *BMC Genomics*, 13 (2012) 178.
- [2] R. Higuchi, B. Bowman, M. Freiberger, O.A. Ryder, A.C. Wilson, DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family, *Nature*, 312 (1984) 282-284.
- [3] H.M. İyras, Y. Doğan, Antik DNA Çalışmaları ve Karşılaşılan Sorunlar, *Antropoloji*, (2015) 53-60.
- [4] S. Paabo, H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Despres, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant, M. Hofreiter, Genetic analyses from ancient DNA, *Annu Rev Genet*, 38 (2004) 645-679.
- [5] C. Schrader, A. Schielke, L. Ellerbroek, R. Johne, PCR inhibitors - occurrence, properties and removal, *J Appl Microbiol*, 113 (2012) 1014-1026.
- [6] R. Alaeddini, S.J. Walsh, A. Abbas, Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA--a review, *Forensic Sci Int Genet*, 4 (2010) 148-157.
- [7] J.Y. Ghannam, J. Wang, A. Jan, *Biochemistry, DNA Structure*, StatPearls, Treasure Island (FL), 2022.
- [8] L.A. Pray, *Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick*, 2013.
- [9] J.A. Leonard, Ancient DNA applications for wildlife conservation, *Mol Ecol*, 17 (2008) 4186-4196.
- [10] M. Hofreiter, J. Sneberger, M. Pospisek, D. Vanek, Progress in forensic bone DNA analysis: Lessons learned from ancient DNA, *Forensic Sci Int Genet*, 54 (2021) 102538.
- [11] L. Orlando, R. Allaby, P. Skoglund, C. Der Sarkissian, P.W. Stockhammer, M.C. Ávila-Arcos, Q. Fu, J. Krause, E. Willerslev, A.C. Stone, C. Warinner, Ancient DNA analysis, *Nature Reviews Methods Primers*, 1 (2021) 14.
- [12] S. Pääbo, R.G. Higuchi, A.C. Wilson, Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology, *J Biol Chem*, 264 (1989) 9709-9712.
- [13] S. Pääbo, Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA, *Nature*, 314 (1985) 644-645.
- [14] E. Willerslev, A. Cooper, Ancient DNA, *Proc Biol Sci*, 272 (2005) 3-16.
- [15] T.A. Brown, K.A. Brown, Ancient DNA: using molecular biology to explore the past, *Bioessays*, 16 (1994) 719-726.
- [16] R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, N. Arnheim, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230 (1985) 1350-1354.
- [17] D.Y. Yang, B. Eng, J.S. Wayne, J.C. Dudar, S.R. Saunders, Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns, *Am J Phys Anthropol*, 105 (1998) 539-543.
- [18] M.G. Ghannam, M. Varacallo, *Biochemistry, Polymerase Chain Reaction*, StatPearls, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL), 2022.
- [19] A. Panet, H.G. Khorana, Studies on polynucleotides. The linkage of deoxyribopolynucleotide templates to cellulose and its use in their replication, *J Biol Chem*, 249 (1974) 5213-5221.
- [20] F.T. Ishmael, C. Stellato, Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 101 (2008) 437-443.

- [21] R. DeSalle, J. Gatesy, W. Wheeler, D. Grimaldi, DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications, *Science*, 257 (1992) 1933-1936.
- [22] E. Hagelberg, B. Sykes, R. Hedges, Ancient bone DNA amplified, *Nature*, 342 (1989) 485-485.
- [23] S. Horai, K. Hayasaka, K. Murayama, N. Wate, H. Koike, N. Nakai, DNA Amplification from Ancient Human Skeletal Remains and Their Sequence Analysis, *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 65 (1989) 229-233.
- [24] C. Hänni, V. Laudet, M. Sakka, A. Bègue, D. Stéhelin, Amplification of mitochondrial DNA fragments from ancient human teeth and bones, *C R Acad Sci III*, 310 (1990) 365-370.
- [25] H. Nielsen, J. Engberg, I. Thuesen, DNA from Arctic Human Burials, in: B. Herrmann, S. Hummel (Eds.) *Ancient DNA: Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens*, Springer New York, New York, NY, 1994, pp. 122-140.
- [26] P.H. Johnson, C.B. Olson, M. Goodman, Isolation and characterization of deoxyribonucleic acid from tissue of the woolly mammoth, *Mammuthus primigenius*, *Comp Biochem Physiol B*, 81 (1985) 1045-1051.
- [27] S. Pääbo, J.A. Gifford, A.C. Wilson, Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain, *Nucleic Acids Res*, 16 (1988) 9775-9787.
- [28] M. Hofreiter, D. Serre, H.N. Poinar, M. Kuch, S. Pääbo, Ancient DNA, *Nature Reviews Genetics*, 2 (2001) 353-359.
- [29] M. Jackes, R. Sherburne, D. Lubell, C. Barker, M. Wayman, Destruction of microstructure in archaeological bone: a case study from Portugal, *International Journal of Osteoarchaeology*, 11 (2001) 415-432.
- [30] B. Shapiro, M. Hofreiter, Ancient DNA: methods and protocols, *Methods Mol. Biol.*, (2012).
- [31] A. Cooper, H.N. Poinar, Ancient DNA: do it right or not at all, *Science*, 289 (2000) 1139.
- [32] M. Knapp, C. Lalueza-Fox, M. Hofreiter, Re-inventing ancient human DNA, *Investigative Genetics*, 6 (2015) 4.
- [33] F.A. Kaestle, K.A. Horsburgh, Ancient DNA in anthropology: methods, applications, and ethics, *Am J Phys Anthropol, Suppl* 35 (2002) 92-130.
- [34] R.E. Green, J. Krause, A.W. Briggs, T. Maricic, U. Stenzel, M. Kircher, N. Patterson, H. Li, W. Zhai, M.H. Fritz, N.F. Hansen, E.Y. Durand, A.S. Malaspinas, J.D. Jensen, T. Marques-Bonet, C. Alkan, K. Prüfer, M. Meyer, H.A. Burbano, J.M. Good, R. Schultz, A. Aximu-Petri, A. Butthof, B. Höber, B. Höffner, M. Siegemund, A. Weihmann, C. Nusbaum, E.S. Lander, C. Russ, N. Novod, J. Affourtit, M. Egholm, C. Verna, P. Rudan, D. Brajkovic, Ž. Kucan, I. Gušić, V.B. Doronichev, L.V. Golovanova, C. Lalueza-Fox, M. de la Rasilla, J. Fortea, A. Rosas, R.W. Schmitz, P.L.F. Johnson, E.E. Eichler, D. Falush, E. Birney, J.C. Mullikin, M. Slatkin, R. Nielsen, J. Kelso, M. Lachmann, D. Reich, S. Pääbo, A draft sequence of the Neandertal genome, *Science*, 328 (2010) 710-722.
- [35] D. Reich, R.E. Green, M. Kircher, J. Krause, N. Patterson, E.Y. Durand, B. Viola, A.W. Briggs, U. Stenzel, P.L. Johnson, T. Maricic, J.M. Good, T. Marques-Bonet, C. Alkan, Q. Fu, S. Mallick, H. Li, M. Meyer, E.E. Eichler, M. Stoneking, M. Richards, S. Talamo, M.V. Shunkov, A.P. Derevianko, J.J. Hublin, J. Kelso, M. Slatkin, S. Pääbo, Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia, *Nature*, 468 (2010) 1053-1060.

- [36] K. Prüfer, F. Racimo, N. Patterson, F. Jay, S. Sankararaman, S. Sawyer, A. Heinze, G. Renaud, P.H. Sudmant, C. de Filippo, H. Li, S. Mallick, M. Dannemann, Q. Fu, M. Kircher, M. Kuhlwilm, M. Lachmann, M. Meyer, M. Ongyerth, M. Siebauer, C. Theunert, A. Tandon, P. Moorjani, J. Pickrell, J.C. Mullikin, S.H. Vohr, R.E. Green, I. Hellmann, P.L. Johnson, H. Blanche, H. Cann, J.O. Kitzman, J. Shendure, E.E. Eichler, E.S. Lein, T.E. Bakken, L.V. Golovanova, V.B. Doronichev, M.V. Shunkov, A.P. Derevianko, B. Viola, M. Slatkin, D. Reich, J. Kelso, S. Pääbo, The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains, *Nature*, 505 (2014) 43-49.
- [37] A.C. Stone, A.T. Ozga, Chapter 8 - Ancient DNA in the Study of Ancient Disease, in: J.E. Buikstra (Ed.) *Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains (Third Edition)*, Academic Press, San Diego, 2019, pp. 183-210.
- [38] B.T. Arriaza, W. Salo, A.C. Aufderheide, T.A. Holcomb, Pre-Columbian tuberculosis in Northern Chile: Molecular and skeletal evidence, *American Journal of Physical Anthropology*, 98 (1995) 37-45.
- [39] A. Rafi, M. Spigelman, J. Stanford, E. Lemma, H. Donoghue, J. Zias, *Mycobacterium leprae* DNA from ancient bone detected by PCR, *The Lancet*, 343 (1994) 1360-1361.
- [40] W.L. Salo, A.C. Aufderheide, J. Buikstra, T.A. Holcomb, Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (1994) 2091-2094.
- [41] B. Chavarro-Portillo, C.Y. Soto, M.I. Guerrero, *Mycobacterium leprae*'s evolution and environmental adaptation, *Acta Trop*, 197 (2019) 105041.
- [42] M. Keller, M.A. Spyrou, C.L. Scheib, G.U. Neumann, A. Kröpelin, B. Haas-Gebhard, B. Pääffgen, J. Haberstroh, A. Ribera i Lacomba, C. Raynaud, C. Cessford, R. Durand, P. Stadler, K. Nägele, J.S. Bates, B. Trautmann, S.A. Inskip, J. Peters, J.E. Robb, T. Kivisild, D. Castex, M. McCormick, K.I. Bos, M. Harbeck, A. Herbig, J. Krause, Ancient *Yersinia pestis* genomes from across Western Europe reveal early diversification during the First Pandemic, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116 (2019) 12363-12372.
- [43] M. Feldman, M. Harbeck, M. Keller, M.A. Spyrou, A. Rott, B. Trautmann, H.C. Scholz, B. Pääffgen, J. Peters, M. McCormick, K. Bos, A. Herbig, J. Krause, A High-Coverage *Yersinia pestis* Genome from a Sixth-Century Justinianic Plague Victim, *Molecular Biology and Evolution*, 33 (2016) 2911-2923.
- [44] M. Drancourt, G. Aboudharam, M. Signoli, O. Dutour, D. Raoult, Detection of 400 year old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (1998) 12637-12640.
- [45] K.V. Zhur, V.A. Trifonov, E.B. Prokhortchouk, Progress and Prospects in Epigenetic Studies of Ancient DNA, *Biochemistry (Moscow)*, 86 (2021) 1563-1571.
- [46] B. Llamas, M.L. Holland, K. Chen, J.E. Cropley, A. Cooper, C.M. Suter, High-resolution analysis of cytosine methylation in ancient DNA, *PLoS One*, 7 (2012) e30226.
- [47] S.V. Zhenilo, A.S. Sokolov, E.B. Prokhortchouk, Epigenetics of Ancient DNA, *Acta Naturae*, 8 (2016) 72-76.
- [48] J. Antheunisse, Decomposition of nucleic acids and some of their degradation products by microorganisms, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 38 (1972) 311-327.
- [49] Ö.U. YOCA, E. Hande, Y. Zeynep, Ancient DNA Research: Ongoing Challenges and Contribution to Medical Sciences, *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, 5 (2021) 182-189.

- [50] A.W. Briggs, U. Stenzel, P.L. Johnson, R.E. Green, J. Kelso, K. Prufer, M. Meyer, J. Krause, M.T. Ronan, M. Lachmann, S. Paabo, Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (2007) 14616-14621.
- [51] G. Eglinton, G.A. Logan, Molecular preservation, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 333 (1991) 315-327; discussion 327-318.
- [52] J. Dabney, M. Meyer, S. Paabo, Ancient DNA damage, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5 (2013).
- [53] J. Burger, S. Hummel, B. Hermann, W. Henke, DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains, *Electrophoresis*, 20 (1999) 1722-1728.
- [54] M.E. Allentoft, M. Collins, D. Harker, J. Haile, C.L. Oskam, M.L. Hale, P.F. Campos, J.A. Samaniego, M.T. Gilbert, E. Willerslev, G. Zhang, R.P. Scofield, R.N. Holdaway, M. Bunce, The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils, *Proc Biol Sci*, 279 (2012) 4724-4733.
- [55] T. Lindahl, Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature*, 362 (1993) 709-715.
- [56] T. van der Valk, P. Pečnerová, D. Díez-del-Molino, A. Bergström, J. Oppenheimer, S. Hartmann, G. Xenikoudakis, J.A. Thomas, M. Dehasque, E. Sağlıcan, F.R. Fidan, I. Barnes, S. Liu, M. Somel, P.D. Heintzman, P. Nikolskiy, B. Shapiro, P. Skoglund, M. Hofreiter, A.M. Lister, A. Götherström, L. Dalén, Million-year-old DNA sheds light on the genomic history of mammoths, *Nature*, 591 (2021) 265-269.
- [57] S.R. Woodward, N.J. Weyand, M. Bunnell, DNA Sequence from Cretaceous Period Bone Fragments, *Science*, 266 (1994) 1229-1232.
- [58] A. Sidow, A.C. Wilson, S. Pääbo, S. Hummel, J.L. Bada, P. Westbroek, E. Hagelberg, G.B. Curry, G. Eglinton, G.B. Curry, Bacterial DNA in *Clarkia* fossils, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 333 (1991) 429-433.
- [59] O. Handt, M. Hoss, M. Krings, S. Paabo, Ancient DNA: methodological challenges, *Experientia*, 50 (1994) 524-529.
- [60] S. Paabo, Ancient DNA, *Sci Am*, 269 (1993) 86-92.
- [61] H. Zischler, M. Hoss, O. Handt, A. von Haeseler, A.C. van der Kuyl, J. Goudsmit, Detecting dinosaur DNA, *Science*, 268 (1995) 1192-1193; author reply 1194.
- [62] E.M. Golenberg, D.E. Giannasi, M.T. Clegg, C.J. Smiley, M. Durbin, D. Henderson, G. Zurawski, Chloroplast DNA sequence from a Miocene *Magnolia* species, *Nature*, 344 (1990) 656-658.
- [63] S. Kim, D.E. Soltis, P.S. Soltis, Y. Suh, DNA sequences from Miocene fossils: an *ndhF* sequence of *Magnolia latahensis* (Magnoliaceae) and an *rbcL* sequence of *Persea pseudocarolinensis* (Lauraceae), *Am J Bot*, 91 (2004) 615-620.
- [64] P.S. Soltis, D.E. Soltis, C.J. Smiley, An *rbcL* sequence from a Miocene *Taxodium* (bald cypress), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (1992) 449-451.
- [65] A.J. Jeffreys, Palaeomolecular biology: Raising the dead and buried, *Nature*, 312 (1984) 198-198.
- [66] M. Krings, A. Stone, R.W. Schmitz, H. Krainitzki, M. Stoneking, S. Pääbo, Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans, *Cell*, 90 (1997) 19-30.
- [67] M.T.P. Gilbert, A.J. Hansen, E. Willerslev, G. Turner-Walker, M. Collins, Insights into the processes behind the contamination of degraded human teeth and bone samples with exogenous sources of DNA, *International Journal of Osteoarchaeology*, 16 (2006) 156-164.
- [68] C.J. Mulligan, Anthropological Applications of Ancient DNA: Problems and Prospects, *American Antiquity*, 71 (2006) 365-380.

- [69] T. Brown, K. Brown, Susanne Hummel (editor) Ancient DNA typing: methods, strategies and applications, *Human Genetics*, 114 (2003) 124-125.
- [70] J. Bessetti, An introduction to PCR inhibitors, *Profiles DNA*, 10 (2007) 9-10.
- [71] K.L. Opel, D. Chung, B.R. McCord, A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR, *Journal of Forensic Sciences*, 55 (2010) 25-33.
- [72] M. Scholz, I. Giddings, C.M. Pusch, A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I, *Anal Biochem*, 259 (1998) 283-286.
- [73] H.L. Katcher, I. Schwartz, A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol, *Biotechniques*, 16 (1994) 84-92.
- [74] L. Rossen, P. Nørskov, K. Holmstrøm, O.F. Rasmussen, Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions, *International Journal of Food Microbiology*, 17 (1992) 37-45.
- [75] E.H. Kaya, Stratonikeia Antik Kenti Batı Cadde Kilise İskeletlerinin Antropolojik Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, , 2020, pp. 70.
- [76] S.M. Latorre, P.L.M. Lang, H.A. Burbano, R.M. Gutaker, Isolation, Library Preparation, and Bioinformatic Analysis of Historical and Ancient Plant DNA, *Curr Protoc Plant Biol*, 5 (2020) e20121.
- [77] C. Anderung, P. Persson, A. Bouwman, R. Elburg, A. Götherström, Fishing for ancient DNA, *Forensic Sci Int Genet*, 2 (2008) 104-107.
- [78] C. Cattaneo, O.E. Craig, N.T. James, R.J. Sokol, Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences, *J Forensic Sci*, 42 (1997) 1126-1135.
- [79] A. Vince, M. Poljak, K. Seme, DNA extraction from archival Giemsa-stained bone-marrow slides: comparison of six rapid methods, *British Journal of Haematology*, 101 (1998) 349-351.
- [80] N. Rohland, M. Hofreiter, Ancient DNA extraction from bones and teeth, *Nature Protocols*, 2 (2007) 1756-1762.
- [81] C. Gamba, K. Hanghøj, C. Gaunitz, A.H. Alfarhan, S.A. Alquraishi, K.A. Al-Rasheid, D.G. Bradley, L. Orlando, Comparing the performance of three ancient DNA extraction methods for high-throughput sequencing, *Mol Ecol Resour*, 16 (2016) 459-469.
- [82] P.F. Campos, O.E. Craig, G. Turner-Walker, E. Peacock, E. Willerslev, M.T.P. Gilbert, DNA in ancient bone – Where is it located and how should we extract it?, *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 194 (2012) 7-16.
- [83] C. Raffone, M. Baeta, N. Lambacher, E. Granizo-Rodríguez, F. Etxeberria, M.M. de Pancorbo, Intrinsic and extrinsic factors that may influence DNA preservation in skeletal remains: A review, *Forensic Science International*, 325 (2021) 110859.
- [84] A. Milos, A. Selmanović, L. Smajlović, R.L. Huel, C. Katzmarzyk, A. Rizvić, T.J. Parsons, Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements, *Croat Med J*, 48 (2007) 486-493.
- [85] O.M. Loreille, T.M. Diegoli, J.A. Irwin, M.D. Coble, T.J. Parsons, High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization, *Forensic Sci Int Genet*, 1 (2007) 191-195.
- [86] D.L. Fisher, M.M. Holland, L. Mitchell, P.S. Sledzik, A.W. Wilcox, M. Wadhams, V.W. Weedn, Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone, *J Forensic Sci*, 38 (1993) 60-68.
- [87] E. Hagelberg, J.B. Clegg, Isolation and characterization of DNA from archaeological bone, *Proc Biol Sci*, 244 (1991) 45-50.

- [88] H. Baron, S. Hummel, B. Herrmann, Mycobacterium tuberculosis Complex DNA in Ancient Human Bones, *Journal of Archaeological Science*, 23 (1996) 667-671.
- [89] M. Höss, S. Pääbo, DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method, *Nucleic Acids Res*, 21 (1993) 3913-3914.
- [90] R. Barnett, G. Larson, A Phenol–Chloroform Protocol for Extracting DNA from Ancient Samples, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 840 (2012) 13-19.
- [91] J.M. Butler, Chapter 2 - DNA Extraction Methods, in: J.M. Butler (Ed.) *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, Academic Press, San Diego, 2012, pp. 29-47.
- [92] W. Sun, Chapter 4 - Nucleic Extraction and Amplification, in: W.W. Grody, R.M. Nakamura, C.M. Strom, F.L. Kiechle (Eds.) *Molecular Diagnostics*, Academic Press, San Diego, 2010, pp. 35-47.
- [93] R. Boom, C.J. Sol, M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M. Wertheim-van Dillen, J. van der Noordaa, Rapid and simple method for purification of nucleic acids, *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (1990) 495-503.
- [94] J. Dabney, M. Meyer, Extraction of Highly Degraded DNA from Ancient Bones and Teeth, *Methods Mol Biol*, 1963 (2019) 25-29.
- [95] J. Dabney, M. Knapp, I. Glocke, M.-T. Gansauge, A. Weihmann, B. Nickel, C. Valdiosera, N. García, S. Pääbo, J.-L. Arsuaga, M. Meyer, Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (2013) 15758-15763.
- [96] N. Rohland, M. Hofreiter, Comparison and optimization of ancient DNA extraction, *Biotechniques*, 42 (2007) 343-352.
- [97] M.D. Leney, Sampling Skeletal Remains for Ancient DNA (aDNA): A Measure of Success, *Historical Archaeology*, 40 (2006) 31-49.
- [98] G. Lucena-Aguilar, A.M. Sánchez-López, C. Barberán-Aceituno, J.A. Carrillo-Ávila, J.A. López-Guerrero, R. Aguilar-Quesada, DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis, *Biopreserv Biobank*, 14 (2016) 264-270.
- [99] N.D. Olson, J.B. Morrow, DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation, *BMC Res Notes*, 5 (2012) 668.
- [100] Y. Doğan, Diş dokularından DNA analizi ile cinsiyet tayini ve sonuçların odontometrik veriler ile karşılaştırılması, Doktora tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, 2007.
- [101] K.C. Tok, Antik Örneklerden Dna Eldesinde İki Temel Metodun Verimlilik Ve PCR İnhibitörlerini Uzaklaştırma Kriterleri Açısından Kıyaslanması, Yüksek Lisans Tezi, Disiplinlerarası Adli Bilimler, Ankara Üniversitesi, 2019.

<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2022/press-release/>

<http://www.mugla.gov.tr/stratonikeia-antik-kenti>

<https://mugla.ktb.gov.tr/>

