TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİK ÖRNEKLERDEN DNA ELDESİNDE İKİ TEMEL METODUN VERİMLİLİK VE PCR İNHİBİTÖRLERİNİ UZAKLAŞTIRMA KRİTERLERİ AÇISINDAN KIYASLANMASI

Kenan Can TOK

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Yeşim DOĞAN

ANKARA
2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİK ÖRNEKLERDEN DNA ELDESİNDE İKİ TEMEL METODUN VERİMLİLİK VE PCR İNHİBİTÖRLERİNİ UZAKLAŞTIRMA KRİTERLERİ AÇISINDAN KIYASLANMASI

Kenan Can TOK

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Yeşim DOĞAN

ANKARA
2019

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum Antik Örneklerden DNA Eldesinde İki Temel Metodun Verimlilik ve PCR İnhibitörlerini Uzaklaştırma Kriterleri Açısından Kıyaslanması başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Kenan Can TOK
Tarih: 26.08.2019
İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalında
Kenan Can TOK tarafından hazırlanan
"*Antik Örneklerden DNA Eldesinde İki Temel Metodun Verimlilik ve PCR İnhibitörlerini Uzaklaştırma Kriterleri Açısından Kıyaslanması*" adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26.08.2019

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

Doç. Dr. Yeşim DOĞAN
Ankara Ü. Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi
Üye

Doç. Dr. İ. Çağatay KARAASLAN
Hacettepe Ü. Fen Fakültesi
Üye

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

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. DNA'nın Yapısı	3
1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	5
1.3. PCR İnhibitörleri	7
1.4. Postmortem Örneklerdeki DNA Degradasyonu	8
1.5. Antik DNA ve Adli DNA	9
1.6. Amelogenin Gen Bölgesi	12
1.7. Antik DNA Çalışmaları ve Moleküler Antropoloji	13
1.8. Antik DNA Ekstraksiyonu ve İzolasyon Yöntemleri	16
1.8.1. Dekontaminasyon	17
1.8.2. Demineralizasyon (Dekalsifikasyon)	17
1.8.3. Ekstraksiyon ve Saflaştırma	18
1.9. Örneklerin Elde Edildiği Kazı Alanı	20
2. GEREÇ ve YÖNTEM	21
2.1. Laboratuvarlar	21
2.2. Kullanılan Ekipmanlar	21
2.3. Kontaminasyon Önleyici Uygulamalar	22
2.4. Kemiklerden Örnek Alınması ve DNA İzolasyonuna Hazırlanması	22
2.5. Kemik Örneklerinden DNA İzolasyonu	25
2.5.1. Demineralizasyon (Dekalsifikasyon)	25
2.5.2. Fenol-kloroform Ekstraksiyonu ve Alkol Presipitasyonu	26
2.5.3. Silika Jel Ekstraksiyon Yöntemi	27
2.6. Antik DNA Miktar ve Kalite Tayini	29
2.6.1. Nanodrop Ölçümü	29
2.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	29
2.6.3. Agaroz Jel Elektroforezi	30
3. BULGULAR	31
4. TARTIŞMA	41
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	47
ÖZET	49
SUMMARY	50

KAYNAKLAR 51
EKLER 56
ÖZGEÇMİŞ 57

ÖNSÖZ

Bu çalışma ile kazı alanlarından elde edilen iskelet örneklerinden DNA eldesi ve bu DNA'nın eldesi esnasında kullanılacak olan yöntemlerin karşılaştırılarak optimize edilmesi amaçlanmıştır. Test edilecek olan iki temel metodun, DNA kazanım oranları ve PCR inhibitörlerini yok etme başarıları karşılaştırılarak, antik DNA çalışmaları için hangisinin daha uygun olduğunun belirlenmesi hedeflenmiştir.

Yaptığımız çalışma, ülkemizde ilk kez kazı alanlarından elde edilen insan iskeletleri üzerinden DNA elde etmek için kullanılacak metotların geliştirilmesini ve karşılaştırılmasını içermektedir. Bu sayede ülkemizde ve dünyada kullanılmak üzere hem antik DNA ekstraksiyon metotlarının geliştirilmesini, optimize edilmesini ve karşılaştırılmasını sağlanacak hem de ülkemiz adına oldukça yeni bir alan olan moleküler antropolojiye ve antik DNA çalışmalarına metot bakımından öncü olacaktır.

Tez konusu seçiminde ve tezimin hazırlanmasında yol gösteren, sorunların çözümünde bilimsel ve sosyal desteğini her zaman yanımda hissettiğim danışmanım Doç. Dr. Yeşim Doğan'a,

Antik örneklere ulaşmam konusunda gerekli yardımı sağlayan Prof. Dr. Ayla Sevim Erol'a,

Maddi, manevi hiçbir desteği esirgemeyen, çalışmalarımın her aşamasına destek olan Adli Bilimler Enstitüsü Müdürü, Prof. Dr. H. Sinan Süzen'e,

Çalışmalarımda ihtiyacım olan her tür malzemeye ulaşmam konusunda yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Gümüştaş'a,

Tezimin yazım ve düzenleme aşamalarında sağladığı değerli katkılardan dolayı Simge Dülgar'a,

Son olarak tüm hayatımı borçlu olduğum annem Nurgün Tok ve babam Ali Ertan Tok'a sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
aDNA	AntikDNA
bç	Baz Çifti
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Sitozin
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
G	Guanin
HCl	Hidroklorik Asit
KCl	Potasyum Klorür
KOH	Potasyum Hidroksit
M	Molar
$MgSO_4$	Magnezyum Sülfat
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mtDNA	Mitokondriyal DNA
mV	Milivolt
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
ng	Nanogram
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
rpm	Bir Dakikadaki Dönüş Hızı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SiO_2	Silisyum Dioksit, Silika Jel
STR	Kısa Tekrarlı Diziler
T	Timin
TE Tamponu	Tris-EDTA Tamponu

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. DNA'nın yapısı. 4
Şekil 1.2. PCR'ın basamakları. 6
Şekil 1.3. Amelogenin gen bölgesi dizisi. 12
Şekil 2.1. Kemiklerin gravür cihazı ile kesimi. 23
Şekil 2.2. Kemiklerin üst tabakasının gravür cihazı ile zımparalanması. 23
Şekil 2.3. Kemik örneklerinden öğütülmek üzere kesilip çıkarılan parça. 24
Şekil 2.4. Çıkarılan parçanın zımparalandıktan sonraki görüntüsü. 24
Şekil 2.5. Sıvı azot eşliğinde havanda toz haline getirilmiş kemik örneği. 25
Şekil 3.1. Tek aşamalı demineralizasyon ve fenol-kloroform yöntemi ile ekstrakte edilmiş örneklerin PCR sonrasında jel üzerindeki görüntüsü. 38
Şekil 3.2. Çok aşamalı demineralizasyon ve fenol-kloroform yöntemi ile ekstrakte edilmiş örneklerin PCR sonrasında jel üzerindeki görüntüsü. 38
Şekil 3.3. Tek aşamalı demineralizasyon ve silika jel yöntemi ile ekstrakte edilmiş örneklerin PCR sonrasında jel üzerindeki görüntüsü. 39
Şekil 3.4. Her bir ekstraksiyon için DNA kalıbı içermeyen negatif kontrol örnekleri. 40

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. PCR inhibitörleri ve etki mekanizmaları 8

Çizelge 2.1. PCR reaksiyon karışımı bileşenleri 30

Çizelge 2.2. PCR programı 30

Çizelge 3.1. Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) ile tekrarlı demineralizasyon ve fenol-kloroform izolasyonu yöntemi ile yapılan DNA izolasyonundan elde edilen DNA miktarları. 32

Çizelge 3.2. Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) ile tek seferli demineralizasyon ve fenol-kloroform izolasyonu yöntemi ile yapılan DNA izolasyonundan elde edilen DNA miktarları. 34

Çizelge 3.3. Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) ile tek seferli demineralizasyon ve silika jel yöntemi ile yapılan DNA izolasyonundan elde edilen DNA miktarları. 36

Çizelge 3.4. Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) ile yapılan ölçümlerin yönteme bağlı ortalamaları. 37

1. GİRİŞ

Antik DNA (aDNA) çalışmaları her ne kadar arkeolojik ve paleontolojik örnekler üzerinde yapılan DNA çalışmaları gibi algılansa da Hummel (2007), ileri derecede hasar görmüş ve DNA ayrıştırması için özel koşullarda tutulmamış biyolojik örnekler üzerinde yapılan DNA elde etme ve analiz çalışmalarını aDNA çalışmaları olarak tanımlamaktadır. Bu çalışmalar Higuchi ve meslektaşları tarafından 1984 yılında soyu tükenmiş bir zebra türü olan quagga'nın bir parça DNA'sının elde edilmesi ve dizilenmesi ile başlamıştır (Higuchi ve ark., 1984). Hemen ardından Pääbo'nun yapmış olduğu çalışmalar bunun yalnızca müzede bulunan örneklerle kısıtlı olmadığını ve binlerce yıl geriye dönülebileceğini göstermiştir (Paabo, 1985, 1986). O dönemde DNA'nın dizilenmesindeki laboratuvar yöntemlerinin ve tekniklerinin yetersizliği (bakteriyel klonlama gibi) bu alana bir engel oluşturmuş olsa da 1980'lerin sonlarında geliştirilen polimeraz zincir reaksiyonu sayesinde bu alandaki çalışmalar tekrar hız kazanmıştır.

DNA'nın yapısında biyolojik bilgiler depolanmaktadır. Yaşayan bir organizmanın her bir hücresinin yaşamsal faaliyetlerini yerine getirebilmesi için gereken her tür bilgi bu molekülde saklıdır. Bu bilgiler ölümden sonra bile bizlere organizma hakkında bilgi vermektedir. Bu bilgiler, tür filogenisi, popülasyon tarihi ve filocoğrafya, hominidler ve insanlık tarihi, beslenme ve davranış, enfeksiyon hastalıkları, evcilleştirme kökeni ve adli olaylar hakkında yorum yapabilmemize olanak sağlamaktadır (Paabo ve ark., 2004; Poinar, 2003). Fakat modern genetik analizlerin aksine, aDNA çalışmaları düşük kalite DNA ile karakterize olmuştur. Bu durum analizden alınabilecek sonuçları kısıtlamaktadır. aDNA'nın düşük kalite olmasının en büyük sebebi zaman, sıcaklık, serbest suyun varlığı gibi faktörlerle ilgileşim içinde olan DNA'nın bozulması (degradasyonu) durumudur.

Canlı hücrelerde DNA'nın enzimatik olarak düzenlenmesi sürekli olarak devam eden bir işlemdir. Canlılığın kaybolmasıyla duran bu enzimatik düzenleme DNA'yı oluşacak bozulmalara karşı açık bir hale getirir. Bunun yanında ölümle birlikte bozulan

biyokimyasal denge sonucunda serbest hale gelen lizozomal nükleazlar gibi katabolik enzimler DNA'yı oldukça hızlı bir şekilde yıkmaya başlar (Paabo ve ark., 2004). Nadiren görülen hızlı bir şekilde kuruma, donma gibi bazı durumlarda DNA normale göre daha yavaş bozulabilir. Ayrıca mineral matriks tarafından absorbe edilmiş olan genetik materyal dış etkilere karşı (enzimatik, mikrobiyal vb.) daha dayanıklı olabilir fakat kimyasal degradasyon nihayetinde DNA'yı etkilemeye başlayacaktır. Bu bozulma süreçleri aslında canlı hücrelerin de her an karşılaştığı olaylardır ve DNA üzerinde oluşan bu bozulmalar sürekli olarak DNA onarım sitemleri tarafından düzeltilmektedir. Ancak ölüm sonrasında hücresel tamir mekanizmalarının bozulmasıyla oluşan hasar katlanarak artar ve geri dönüşümsüz kayıplar oluşur.

aDNA çalışmalarında kullanılan örneklerin büyük bir kısmı arkeolojik kazılardan elde edilen örneklerdir. Uygun koşullar altında saklanmamış olmasının yanı sıra bulunduğu ortam nedeniyle pek çok kimyasala maruz kalan örnekler, yapılacak aDNA çalışmalarında yararlanılacak olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminde kullanılan enzimatik reaksiyonları inhibe edebilecek bileşenler içerebilirler. Bunun yanı sıra örneklerin kazı alanından çıkarılmasından sonra maruz kalacağı hatalı işlemler de bu bileşiklerin örneği kirletmesine sebep olabilir. Bu inhibisyon, yetersiz DNA çoğaltımına ve/veya hatalı DNA çoğaltımına neden olarak PCR'ın başarısız olmasına ve hatalı sonuç vermesine neden olabilir (İyras ve Doğan, 2015).

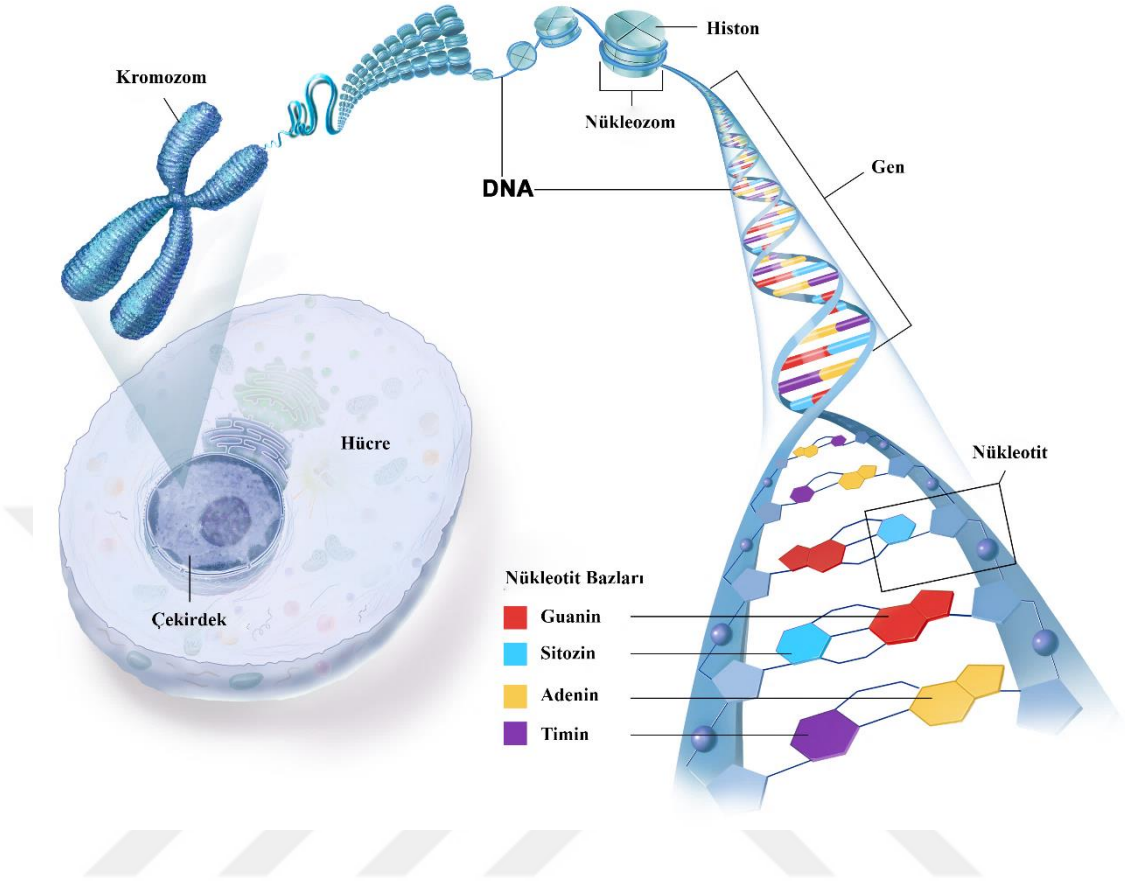
Yukarıda belirtilen nedenlerin yanı sıra aDNA çalışmalarının en zorlu yanlarından birisi de modern DNA veya mikrobiyal DNA ile kontaminasyondur. Ne yazık ki aDNA çalışmalarının geçmişinde bu tarz hatalı sonuçlarla sıklıkla karşı karşıya kalınmıştır (Grigorenko ve ark., 2009). Özellikle laboratuvar içi çalışmalar esnasında oluşabilecek kontaminasyonlar, aDNA çalışmalarındaki en temel problemdir ve bu yüzden de laboratuvar aşamasındaki işlemler ve yöntemler aDNA analizlerinin anahtar basamağıdır.

Son yıllarda aDNA literatüründeki makalelerde DNA izolasyon yöntemi olarak başarılı sonuçlarıyla bilinen birkaç yöntem ön plana çıkmaktadır. Bunlardan birisi 1996 yılında Baron ve arkadaşlarının ekstraksiyon amacıyla fenol kloroform yöntemini kullandıkları çalışmadır (Baron, 1996). Başarılı olduğu gösterilmiş olan diğer bir protokol ise 1993 yılında Höss ve Pääbo tarafından gerçekleştirilen silika ekstraksiyon yöntemidir (Hoss ve Paabo, 1993). Günümüzde önerilen ve başarılı oldukları kanıtlanmış bu protokollerin uygulamalarındaki küçük farklılıkların kazı örneklerinin durumuna, yaşına ve içinde bekledikleri çevresel koşullara göre büyük önem kazandığı bilinmektedir (Hummel, 2003).

1.1 DNA'nın Yapısı

Canlılarda kalıtımdan sorumlu molekülün deoksiribonükleik asit (DNA) olduğunun bulunması, bu molekülün yapısının anlaşılmasına yönelik çalışmaları büyük oranda arttırmıştır. DNA yapısında nükleik asitler, 5 karbonlu şeker ve fosfat bulunduran organik bir moleküldür. İkili sarmal yapıda, canlıya ait tüm kalıtımsal bilgileri barındırmaktadır.

Bireyin cinsiyeti, karakteristik özellikleri ve kimliklendirmede kullanılan diğer farklılıkları kodlayan DNA zinciri, ancak bir mikroskop yardımıyla görebileceğimiz bir hücrede sıkıca paketlenmiş halde bulunur. Fakat bu yapı, onu sıkıca paketleyen proteinler uzaklaştırıldığında yaklaşık 1,5 metre uzunluğunda, son derece kırılgan bir moleküle dönüşür. DNA'yı hücreye sığacak şekilde sıkıca paketleyen proteinler bu şekilde onu mekanik ve enzimatik hasardan da korur. Bu koruma hücrenin yaşamsal faaliyetlerinin bitmesi ile son bulur ve DNA için olumsuz koşullar başlar (Poinar ve ark., 2003). Antik DNA çalışmalarında DNA örneklerinin yüksek oranda parçalanmış olmasının nedeni de bu olumsuz koşullarda uzun süre kalmış olmasıdır.



Şekil 1.1. DNA'nın yapısı (National Cancer Institute, 2015).

İnsan hücresindeki DNA'nın tamamı protein kodlamak için kullanılmaz. Hatta kodlanan kısım DNA'nın çok düşük bir yüzdesini kapsamaktadır. Kodlanan bölgelerin dışında kalan DNA'nın işlevinin uzun süre anlaşılamaması bu bölgelerin bilim adamları tarafından çöp DNA olarak adlandırılmasına neden olmuştur (Zuckerkandl, 1997). Ancak insan genom projesinin bugün geldiği noktada DNA'nın çöp olarak adlandırılan bu bölümlerde de düzenleyici bilgilerin olduğu, evrimsel öneme sahip kısımlar ve bireyler arası farklılıklar içerdiği görülmüştür (Biemont, 2010a, 2010b; Doolittle, 2013; Doolittle ve ark., 2013). Doğrudan proteine dönüşmeyen bu kısımlarda meydana gelen mutasyonlar hayati sorunlar oluşturmadığından yıllar boyunca birikerek canlılarda genetik varyasyonlar oluşturmuştur. Alec Jeffreys ve ekibi yaptıkları çalışmalar ile bu varyasyonları adli kimliklendirme amacıyla kullanmışlardır. Jeffreys o dönemde Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) adı verilen teknik ile insanlardaki bu genetik farklılıkları görülür hale getirmiş

ve adli olgularda insanları kimliklendirmek amacıyla kullanmıştır (Gill ve ark., 1985; Jeffreys ve ark., 1985).

İlerleyen zaman içerisinde moleküler biyoloji ve genetik çalışmalarında devrim yaratacak teknik bir gelişme yaşanmıştır. Hücrede DNA molekülünün kendi kopyasını yapmak için kullandığı sistemi laboratuvar koşullarında gerçekleştirilmesini sağlayan PCR tekniği elimizdeki DNA molekülünün spesifik bölümlerinin çoğaltılarak daha sonraki analizlerin gerektirdiği miktarlara ulaşmamızı sağlamaktadır. Bu gelişme adli DNA analizleri için de önemli gelişmeleri beraberinde getirmiştir. Bugün PCR tekniğinin gelişmesi sayesinde oldukça az miktardaki DNA örneklerinden DNA profillemesi yapılabilmektedir.

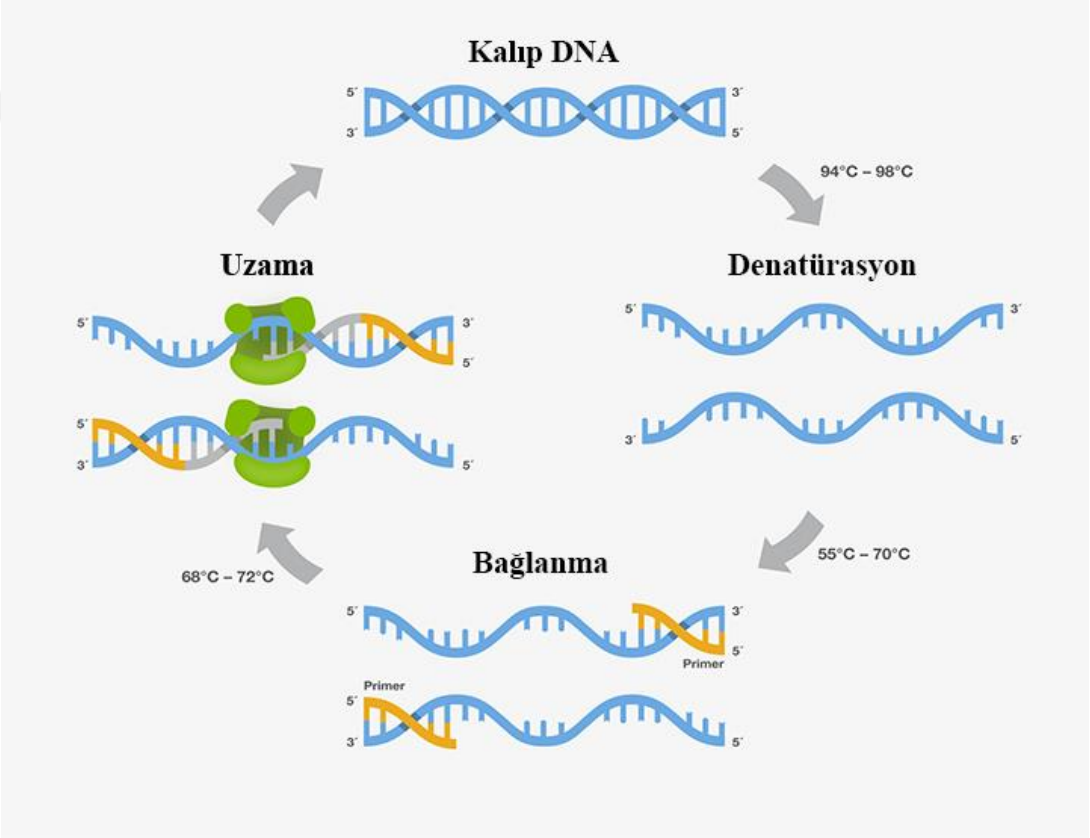
1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu belirli bir DNA parçasının milyonlarca kopyasını çıkarmaya yarayan ve yaygın bir şekilde kullanılan moleküler biyolojik bir yöntemdir. PCR ilk olarak 1983 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir. Mullis geliştirdiği bu teknik sayesinde 1993 yılında Nobel Kimya ödülüne layık görülmüştür.

Enzimatik DNA çoğaltma işleminin gerçekleşmesi için yalnızca birkaç komponent gerekmektedir. Reaksiyon için $MgCl_2$, KCl ve Tris içeren tampon çözelti, primerler, nükleotit bazları, yüksek sıcaklıkta stabil kalabilen DNA polimeraz ve gerçek DNA örneği gerekmektedir. Buradaki primer ve polimeraz olarak adlandırılan reaktantlar, DNA zincirinin çözülmesi sonrasında enzim ile sürdürülen DNA kopyalama işlemini sağlamaktadır.

PCR metodunun önemli ve en büyük parçası termal döngüdür. Termal döngü, reaktantların tekrarlanan çeşitli sıcaklık döngüleri ile sıcaklığa bağlı birden fazla reaksiyonu gerçekleştirmesini sağlamaktadır.

PCR'ın ilk basamağında, çift sarmal adı verilen yapı yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılarak DNA denatürasyonu (ergimesi) gerçekleşir. İkinci basamakta sıcaklık azalarak primerlerin komplementeri olduğu bölgeye bağlanması gerçekleşir. Bağlanma sonrasında DNA'nın iki zinciri arasında DNA polimerazın çalışması için bir şablon oluşur ve DNA polimeraz enzimatik olarak serbest nükleotitlerden yeni DNA zincirleri yaratır. Tekrarlanan bu süreçte yaratılan her yeni zincirin, yeni bir kalıp haline gelmesiyle katlanarak artan bir DNA kopyalama işlemi gerçekleşir.



Şekil 1.2. PCR'ın basamakları (Thermo Fisher Scientific, 2019).

Bu yöntem, DNA klonlama, DNA dizileme, gen klonlama, mutasyon analizleri, DNA tabanlı filogeni, genlerin foksiyonel analizi, kalıtsal hastalıkları teşhisi ve takibi, antik DNA'nın çoğaltılması, adli bilimlerde genetik parmak izinin analizi ve DNA profilleme, patojenlerin tespiti ve enfeksiyon hastalıklarının tanısı gibi pek çok klinik ve bilimsel alanda kullanılmaktadır.

1.3. PCR İnhibitörleri

PCR inhibitörleri PCR esnasında nükleik asitlerin kopyalanmasını engelleyen faktörlerin her birine verilen isimdir. Yeterli DNA'nın bulunmasına karşın PCR'ın başarısız olmasının en büyük nedeni PCR inhibitörleridir. İnhibitörler genellikle DNA polimerazın aktivitesini engelleyerek ya da DNA ile etkileşime geçerek reaksiyonu inhibe ederler.

İnhibitörler, örneğin kaynağı ile birlikte gelebileceği gibi ekstraksiyon esnasında kullanılan KCl ve NaCl gibi tuzlar, sarkosil, SDS gibi iyonik deterjanlar, etanol, izopropanol ve fenol gibi reaktifler de PCR inhibisyonuna veya PCR veriminin düşmesine sebep olabilir.

Antik örnekler bulundukları koşullar nedeniyle üstlerinde pek çok inhibitör barındırmaktadırlar. Antik örnekler ile çalışmanın en büyük zorluklarından biri de ileri derecede yıkıma uğramış DNA'nın yanı sıra bu inhibitörler ile başa çıkmaktır. Pek çok ekstraksiyon sonrasında DNA elde edilmesine karşın inhibitörler nedeniyle PCR ile DNA'nın çoğaltılamadığı literatürde karşımıza çıkmaktadır. Çizelge 1.1.'de örnek eşliğinde gelen inhibitörler tablolaştırılmıştır.

Çizelge 1.1. PCR inhibitörleri ve etki mekanizmaları

İnhibitör	**Etki Mekanizması**	**Referans**
Antiviraller	Nükleotitler ile rekabet, DNA uzama basamağının inhibisyonu.	(Yedidag ve ark., 1996)
Bakteriyel Hücreler	Nükleik asitlerin degredasyonu.	(Burkardt, 2000; Rossen ve ark., 1992; Schrader ve ark., 2012; Weyant ve ark., 1990; Wilson, 1997)
Çivit Boyası	-	(Shutler ve ark., 1999)
Deterjanlar (Sarkosil, SDS)	DNA polimerazın degredasyonu.	(Rossen ve ark., 1992; Saulnier ve Andremont, 1992; Wilson, 1997)
EDTA	Mg^{++} dâhil metal iyonlarının şelasyonu.	(Rossen ve ark., 1992)
Fenol	DNA polimerazın denatürasyonu.	(Katcher ve Schwartz, 1994)
Hemoglobin, Laktoferrin	Demir iyonlarını bırakma.	(Abu Al-Soud ve Radstrom, 2000)
Heparin	Nükleik asitlere bağlanma.	(Satsangi ve ark., 1994)
Hümik Asit	Nükleik asitlere ve enzimlere bağlanma/tutunma.	(Abbaszadegan ve ark., 1993)
İmmünoglobin G	Nükleik asitlere bağlanma.	(Abu Al-Soud ve Radstrom, 2000)
Kalsiyum, Kalsiyum İyonları	DNA polimerazın inhibisyonu. Polimerazın ko-faktörü ile rekabet.	(Abu Al-Soud ve Radstrom, 2000; Al-Soud ve Radstrom, 2001; Bickley ve ark., 1996; Eckhart ve ark., 2000; Opel ve ark., 2010)
Kollajen	Nükleik asitlerde çapraz bağlanma, nükleik asitlerin kimyasal yapılarını değiştirme. DNA polimerazı inhibe etme.	(John, 1992; Opel ve ark., 2010)
Melanin, Ömelanin	DNA polimerazın inhibisyonu.	(Eckhart ve ark., 2000)
Metal İyonları	Primerlerin spesifitesinin azalması.	(Abbaszadegan ve ark., 1993)
Miyoglobin	DNA polimerazı inhibe etme.	(Abu Al-Soud ve Radstrom, 2000; Al-Soud ve Radstrom, 2001; Eckhart ve ark., 2000; Opel ve ark., 2010)
Modern DNA	Kalıp DNA ile rekabet (Antik DNA çalışmalarında)	(Tamariz ve ark., 2006)
Polisakkaritler	Nükleik asitlerde çapraz bağlanma, nükleik asitlerin kimyasal yapılarını değiştirme. Nükleik asitlerle birlikte presipitasyon.	(John, 1992; Wan ve Wilkins, 1994)
Proteinazlar	DNA polimerazın degradasyonu.	(Schrader ve ark., 2012)
Tannik Asit	DNA polimerazı inhibe etme.	(Abbaszadegan ve ark., 1993; Opel ve ark., 2010)
Tuzlar (KCl, NaCl)	-	(Schrader ve ark., 2012)
Üre	-	(Khan ve ark., 1991)

1.4. Postmortem Örneklerdeki DNA Degredasyonu

Postmortem DNA'nın bozulmasındaki en önemli faktör, hücresel nükleazların endojen DNA'yı bozma hızıdır. DNA daha sonra bakteriyel, fungal saldırılara maruz kalmaktadır. Kalan DNA'nın ise hidroliz ve oksidasyon ile hala kimyasal degradasyona maruz kalması söz konusudur (Poinar, 2003).

DNA molekülü çoğunlukla hidrolitik hasara meyillidir. Fosfodiester bağlar görece stabil olmasına karşın glikozidik baz şeker bağı doğrudan hidrolitik saldırının ana hedefi konumundadır. İkincil amino grubuna sahip olan adenin, sitozin, 5-metilsitozin ve guanin gibi DNA bazları, amino gruplarını kaybederek sırasıyla hipoksantin, urasil, timin ve ksantine dönüşürler. Özellikle sitozinin urasile dönüşerek DNA zinciri üzerinde C-G baz çiftinin T-A baz çiftine dönüşmesine sebep olur (Friedberg, 1995).

Antik DNA hidrolitik olarak hasara uğramış bir moleküldür. İzole edilip çoğaltılabilen DNA parçaları çoğunlukla 200-300 bç uzunluğunu aşmamaktadır. Bunun nedeni fosfodiester bağlarının depürinasyonu ve hidrolitik kesimi ve de kurumaya bağlı olarak gerçekleşen zincir kırılmasıdır.

Antik DNA ayrıca oksidatif olarak da hasara uğramış bir moleküldür. Fosil kalıntılarından çıkarılan DNA moleküllerinin endonükleaz IV ve endonükleaz III ile kesilmeye yatkın olduğu ve bu nedenle oksidatif kararsız bölgeyi içerdiği gösterilmiştir (Paabo, 1986). Daha yakın zamanlarda, gaz kromatografisi / kütle spektrometrisi tekniği (GC / MS) ile çeşitli ortamlardan ve yaşlardan birçok paleontolojik numunenin oksitlenmiş baz grupları içerdiği gösterilmiştir.

1.5. Antik DNA ve Adli DNA

Antik DNA genel olarak müze örnekleri gibi bazı korunmuş veya fosilleşmiş biyolojik materyallerde bulunan DNA parçalarına verilen isimdir. Antik DNA çalışmaları 1984 yılında Russel Higuchi'nin bir *quagga*'ya ait 140 yıllık bir deriden iki kısa mtDNA bölgesinin sekansını yapmasıyla başlamıştır (Higuchi ve ark., 1984). Kısa bir süre sonra Svante Paabo, Mısırlı bir çocuğa ait 2400 yıllık bir mumyadan elde ettiği bir DNA'dan, kısa bir DNA dizisi çıkarmıştır (Paabo, 1985). 80'li yılların sonunda PCR'ın keşfiyle bu çalışmalar hız kazanmış ve bağımsız pek çok grup tarafından aDNA çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. Arkeoloji ve antropolojideki aDNA uygulamaları görece az olsa da genetikçiler ve adli bilimciler hem adli bilimlere hem de insan evrimi çalışmalarına uygun olan, STR, Y-STR ve cinsiyete bağlı dimorfik amelogenin geni gibi yeni genetik sistem ve teknikleri geliştirmeye ve uygulamaya devam etmektedirler (Hagelberg ve ark., 2015).

Adli DNA profillendirmesinin temelinde DNA'nın polimorfik bölgelerine bakıldığında yeryüzündeki her bireyin (tek yumurta ikizleri hariç) eşsiz olduğu gerçeği yatmaktadır. Aslında gen bölgelerinin dizilimi açısından bireylerin DNA'sı çok farklı değildir. Ancak bu genomun küçük bir yüzdesini içeren benzer gen dizilimlerinin arasında bireyler arası farklılıklar gösteren polimorfik bölgeler yer alır. Günümüzde adli DNA profillendirmesinde dizilim açısından aynı olup tekrar sayısı açısından bireyler arası farklılık gösteren STR (kısa bağlı tekrarlar) bölgeleri kullanılmaktadır (Butler ve ark., 2003). Birey ayrımının yapılabilmesi için birden fazla STR bölgesinin bir arada değerlendirildiği kitler kullanılmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan STR kiti içerisinde 16 farklı STR bölgesi değerlendirilmektedir. Geliştirilen kitler ile de STR profillendirmesi için ihtiyaç duyulan örnek miktarı giderek azalmaktadır (Grubwieser ve ark., 2006; Westen ve ark., 2014).

Özellikle diğer kimliklendirme yöntemlerinin mümkün olmadığı, DNA'nın ileri derecede hasar görmüş olduğu ve toplu gömü alanlarından elde edilen örnekler üzerinden cinsiyet ve akrabalık ilişkileri gibi kimliklendirmede kullanılacak bilgilerin

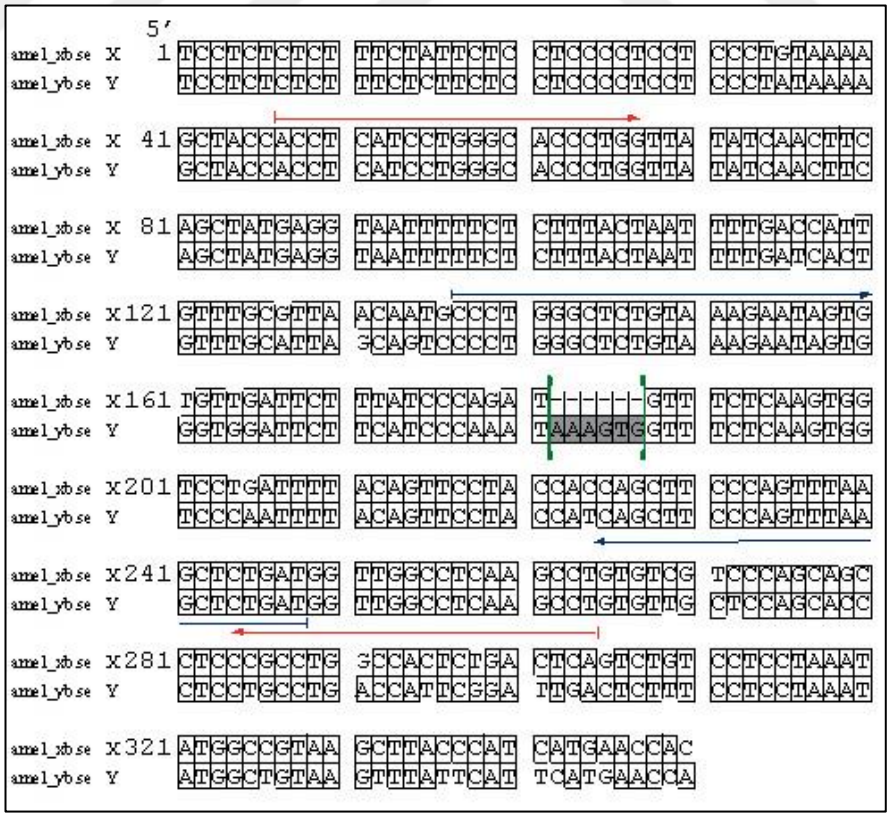
elde edilmesinde DNA çalışmaları oldukça önemlidir (Jobling ve Gill, 2004; Prinz ve ark., 2007).

Adli bilimlerde ve antropolojik çalışmalarda bireyin cinsiyetinin belirlenmesi kimliklendirmenin ilk aşaması olarak büyük önem taşımaktadır. Bu analiz antropolojik yöntemlerle yapılamadığında sürece moleküler genetik çalışmalar dahil olur.

Tıbbi ve adli cinsiyet tayini için PCR kullanılarak çeşitli moleküler metotlar geliştirilmiştir (Aasen ve Medrano, 1990; Akane ve ark., 1992; Cui ve ark., 1994; Ebensperger ve ark., 1989; Nakahori ve ark., 1991). Fakat bu yöntemlerin pek çoğu antik DNA çalışmaları için uygun değildir. Çünkü çoğaltılması gereken DNA parçası, rutin antik DNA çalışmalarında elde edilen DNA parçalarına göre oldukça büyüktür. Diğer yöntemler Y kromozomunun varlığı veya yokluğu üzerine kurulmuştur (Honda ve ark., 1990; Hummel ve Herrmann, 1991). Bireyin cinsiyetinin belirlenmesinde en temel yöntem Y kromozomunun varlığının aranmasıdır. Y kromozomunun sadece erkeklerde bulunmasından dolayı, Y kromozomu üzerinde var olduğundan emin olunan gen bölgeleri ile yapılan çalışmaların pozitif çıkması bireyin erkek olduğu sonucunu verir. Ancak örnekte bu çalışmanın başarılı ve güvenilir bir şekilde sonuçlanabilmesi için kontrol edilmesi gereken gen bölgesi sayısı ve dolayısıyla ihtiyaç duyulan DNA miktarı bu uygulamanın adli ve antik DNA çalışmalarında kullanılmasını oldukça zorlaştırmaktadır. Bununla birlikte PCR sonrasında Y kromozomuyla ilgili bir bölgenin çoğaltılması sonucunda bireyin erkek olarak düşünülmesini sağlar iken Y kromozomu ile ilgili bölümün çoğalmamış olması o bireyin kesin dişi olduğu anlamına gelmemektedir. Bu sonuç yalnızca düşük miktarda ve düşük kalitede DNA'nın elde edildiği ya da antik DNA çalışmalarında sıklıkla karşılaşılan bir durum olan, çeşitli kontaminantlar nedeniyle PCR'ın inhibe olduğu anlamına da gelebilir (Hagelberg ve Clegg, 1991). Bu nedenle günümüzde cinsiyet tayininde STR kitlerine de dâhil edilen amelogenin gen bölgesinden faydalanılır.

1.6. Amelogenin Gen Bölgesi

Amelogenin geni Y kromozomunun Yp11.2 bölgesinde ve bu bölgenin X kromozomundaki homoloğu olan Xp22.31-p.22.1 bölgesinde bulunan tek kopya bir gendir (Hummel, 2003). Bu gen diş enamelinde bulunan bir proteini kodlamaktadır. Yakın geçmişte X kromozomu üzerindeki bölgede 6 bç'lik bir bölgenin delesyona uğramış olduğu keşfedilmiştir (Mannucci ve ark., 1994; Thangaraj ve ark., 2002). Dolayısıyla XY kromozomuna sahip bireylerde bu gen bölgesi çoğaltılıp jel üzerinde yürütüldüğünde iki farklı bant elde edilirken, XX kromozomuna sahip bireylerde yalnızca tek bant elde edilir. Literatürde en çok karşılaşılan ve hala ticari kitlerde de kullanılan Sullivan'ın. kullandığı amelogenin primer seti ile bu bölgeden 106 ve 112 bç'lik ürünler edilmektedir. Çok nadir görülen vakalarda Y kromozomunun da bu delesyona sahip olduğu ve dolayısıyla hatalı cinsiyet tayinine sebebiyet verebileceği belirtilmiştir (Santos ve ark., 1998). Şekil 1.3.'de amelogenin gen bölgesine ait bir DNA dizisi ve bu bölgeyi çoğaltmak için kullanılan iki farklı primer gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Amelogenin gen bölgesi dizisi (NIST, 2008).

1.7. Antik DNA Çalışmaları ve Moleküler Antropoloji

Moleküler antropoloji 75 yıldan daha eski olan antik biyolojik materyallerin analizi olarak tanımlanmaktadır (Graham, 2007). İleri derece hasar görmüş ve DNA eldesi için özel koşullarda tutulmamış biyolojik örnekler üzerinde yapılan DNA elde etme ve analiz çalışmaları genel olarak aDNA çalışmaları olarak tanımlanmaktadır (Hummel, 2003). Bu tanımlamadan yola çıkıldığında aDNA analizleri ile antik DNA analizlerinin karşılaşılan teknik güçlükler açısından çok sayıda ortak noktası olduğu görülmektedir.

Hızla gelişen teknolojiden moleküler genetik çalışmaları da olumlu yönde etkilenmiştir. Günümüzde az miktarlardaki örneklerden ve hatta fosilleşmiş örneklerden bile DNA izolasyonu yapılabilmektedir (Hofreiter ve ark., 2001; Pruvost ve ark., 2007). DNA çalışmalarındaki en büyük zorluk DNA'nın elde edileceği örneğin korunma düzeyidir. Söz konusu antik örnekler olduğunda da bu büyük bir sorun haline gelmektedir. Bu çalışmalarda seçilen örneğin niteliğinin ve yapılması planlanan çalışmalara uygun olarak alandan çıkarılmasının ve depolanmasının DNA korunumunu etkilediği düşünülmektedir (İyras ve Doğan, 2015).

Antik DNA analizlerinde ve benzer problemlere sahip adli DNA analizlerinde araştırmacıların karşılaştıkları güçlükleri üç başlık altında toplamak mümkündür.

1. Kontaminasyon
    - Laboratuvar dışı
    - Laboratuvar içi
2. DNA degredasyonu
3. PCR inhibitörlerinin varlığı

Kontaminasyon örnek laboratuvara ulaşmadan meydana gelen kontaminasyon ve moleküler analiz gerçekleştirilirken laboratuvar koşullarında meydana gelen kontaminasyon olarak iki sınıfta ele alınabilir.

Kontaminasyon tüm moleküler genetik çalışmalarında önemli olmasının yanında antik DNA çalışmaları için hayati bir sorudur. Bunun nedeni antik örneklerde bulunan hali hazırda az ve düşük kalitedeki DNA örneğinin dışardan gelen bulaş DNA ile rekabet edememesidir.

Kazı alanından çıkarılan örnekler bulundukları ortam koşulları nedeni ile pek çok kontaminanta (bakteriler, mantarlar vb.) maruz kalmaktadırlar. Bunun ardından örneğin çıkarılması ve çalışma ortamına taşınması sürecinde de pek çok kişinin teması sonucu modern DNA kontaminasyonu söz konusudur. Aynı zamanda örneklerin birbirleri ile temas etmemelerine dikkat etmeksizin çalışılması örnekler arası kontaminasyonun oluşmasına da neden olmaktadır. Kazı alanlarında çalışan antropolog ve arkeologların bulunan biyolojik materyallerden DNA analizi gerçekleştirilme olasılığını her zaman akıllarında bulundurmaları ve bu örnekler için alınacak önlemler açısından antik DNA uzmanları ile koordine olmaları hayati önem taşımaktadır. Kazı alanında belirlendikleri andan itibaren DNA analizi yapılacak örnekler ile antropologlar mümkün olduğunca teması azaltmalı ve bunu sağlayacak ekipmanlar kullanmalıdır. Örneklere temas sonucu oluşacak modern DNA kontaminasyonu örneğin az miktarda ve zarar görmüş olan DNA'sının analizini olanaksız hale getirecek ya da sonuç alınsa dahi güvenilirliğini etkileyecektir. Bu nedenle örnekler ile temas mümkün olduğunca engellenmeli, kazıda görev yapan ve daha sonra antropoloji laboratuvarlarında örnekleri inceleyen uzmanlar çıplak elle örneklere dokunmamalıdır. Antik DNA çalışmalarında en iyi sonuç veren örneklerin reçinede saklanmış örnekler gibi çevresel etkilerden korunmuş olarak saklanan örneklerden elde edildiği görülmektedir. Bu da bize örneğin korunduğu koşulların ve elde edildikten sonra da o koşullarda tutuluyor olmasının ne denli önemli olduğunu göstermektedir (Brown ve Brown, 1994).

Örnek laboratuvara geldikten sonra moleküler genetik uzmanı tarafından bir seri kontaminantlardan arındırma (dekontaminasyon) uygulaması gerçekleştirilir. Ancak bu uygulamaların da örneklerin hassasiyeti düşünülerek yapılması önemlidir. Kimi zaman iyi niyetle örneklerin dış kontaminantlardan temizlenmesi için yapılacak

uygulamalar da aDNA çalışmalarını içinden çıkılamaz problemlerle karşı karşıya getirebilir. Laboratuvar koşullarında dekontamine edilen örnekler için en önemli kontaminasyon riski daha önce yapılmış çalışmalardan arda kalan DNA parçalarıdır. Bu nedenle modern DNA çalışması yapılan laboratuvarlarda aDNA çalışmaları yapmak bu riski arttıracağından uygun değildir.

DNA çalışmaları yapılırken sonuç alınmasını engelleyen en önemli sorunlardan birisi de DNA'nın ileri derecede parçalanmasıdır (Graham, 2007). DNA'nın parçalanması, dokunun bozulmasıyla birlikte gerçekleşen tabii bir durumdur. Ancak kazı çalışmalarından elde edilen örnekler bir dereceye kadar bu dokuların bozulmasına neden olan koşullardan daha korunaklı bir ortamda kaldıkları için günümüze kadar varlıklarını koruyabilmişlerdir. Bu örnekleri kazı ile ortaya çıkartmak var oldukları olumlu koşullardan da çıkartmak anlamına gelir. Bu açıdan DNA eldesi için kullanılacak bir örneğin, kazıda kendisi için ideal şartlardan çıkartıldığı zaman herhangi bir uygulama yapılmaksızın DNA'nın bozulmasını engelleyecek soğuk ve kuru bir ortamda tutulması, DNA'nın daha fazla zarar görmesini engelleyebilir. Oysa günümüzde kazılardan elde edilmiş ve yıllarca depo ya da müze koşullarında bekletilmiş örneklerden DNA elde edilmeye çalışılmakta ve dolayısıyla DNA eldesindeki verim düşmektedir (İyras ve Doğan, 2015).

Genetik ve moleküler biyoloji çalışmalarının her alanında yeni bir dönemin başlamasını sağlayan PCR'ın keşfi ile çok düşük miktardaki DNA bile kısa sürede çoğaltılabilir hale gelmiştir. Antik örneklerden DNA analizini etkileyen kritik faktörlerden bir tanesi de PCR'ın örneklerin içlerinde bulundukları ortamdan kaynaklı olarak inhibe olmasıdır. Toprak, içerisinde bulundurduğu mineraller ve diğer maddeler nedeni ile PCR inhibitörleri açısından zengindir. Kuşkusuz DNA elde edilecek örneğin bu koşullarda kalma süresi de elde edilecek DNA'nın kalitesi ve miktarı ile de ters orantılıdır. Bu nedenle eski tarihli ve görece daha yeni tarihli kazılardan elde edilen DNA'nın kalite ve miktar verimleri karşılaştırıldığında görece daha yeni olan örneklerin veriminin daha yüksek olması beklenmektedir. Ancak kazı bölgelerinin farklı toprak yapılarına ve farklı iklimsel koşullara sahip olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu farklılıklar kazılardan temin edilmiş örneklerden elde edilecek

olan DNA'nın kalitesinin ve miktarının öngörülmesini oldukça imkânsız hale getirmektedir.

Antik DNA ile ilgili literatürde farklı örnek tipleri (kıl, kemik, doku parçası vb.) üzerinde çalışmalar yapıldığı görülmektedir (Brown ve Brown, 1994). Aslında her ne kadar belli iskelet bölümlerinin daha iyi DNA sonucu verdiğini gösteren çalışmalar yapılmış olsa da moleküler genetik uzmanının elinde her zaman çok fazla seçenek olmadığından kendisine verilen örnekten sonuç almaya çalışmak zorunda kalmaktadır. Kompakt yapıları gereği kazı alanlarında en yaygın olarak bulunan örneklerin diş ve kemik örnekleri olması kaçınılmazdır. Diş örnekleri üzerinde yapılan çalışmalarda bu örneklerden elde edilen DNA'nın miktarca az ancak nispeten daha yüksek kalitede olduğu görülmektedir. Diş örneklerinden elde edilen DNA daha kaliteli olacağından, tek ya da birkaç mutasyonun varlığını tespit etmek için yapılacak çalışmalarda ya da cinsiyet tayini için yapılacak çalışmalarda tercih edilebilir. Ancak günümüzde giderek yaygınlaşan yüksek işlem hacimli moleküler tekniklerin gerektirdiği kalıp DNA miktarına diş örneğinden ulaşmak mümkün değildir. Bu durum araştırmacıları diğer iskelet bölümlerinden de kaliteli DNA elde etmek için çalışmaya zorlamaktadır. Literatürde farklı iskelet bölümlerinin de DNA eldesi için uygun olduklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Leney, 2016; Misner ve ark., 2009).

1.8. Antik DNA Ekstraksiyon ve İzolasyon Yöntemleri

İskelet parçaları üzerinde yapılan antik DNA çalışmalarında DNA eldesi için temel olarak her yöntemde bulunan 3 basamak bulunur. Bunlar dekontaminasyon, demineralizasyon, ekstraksiyon - saflaştırma basamaklarıdır.

Antik DNA içinde bulunduğu koşullar ve DNA'nın kendi yapısının hassasiyeti nedeniyle oldukça hassas örneklerdir. Bu nedenle taze örneklere uygulanan yöntemlerin antik örneklerde bulunan DNA miktarında kayba neden olma ihtimali şaşırtıcı olmayacaktır. Fakat bununla birlikte örnekte bulunan kontaminant ve PCR

inhibitörlerinin taze örneklere kıyasla fazla olması, ekstraksiyon ve izolasyon sırasında çok daha sert dekontaminasyon ve saflaştırma basamakları gerektirmektedir.

1.8.1. Dekontaminasyon

Antik DNA çalışmalarında kaçınılmaz olan dekontaminasyon aşaması, ekstraksiyon basamağından hemen önce gerçekleştirilmektedir. Bu aşamada örnekler seyreltik çamaşır suyu ve distile su ile yıkama, akan su altında fırçalama, UV'ye maruz bırakma gibi her biri mevcut DNA'ya hasar verebilecek yöntemler uygulanmaktadır. Dolayısıyla bu basamakların olabildiğince kısa tutulması veya şiddetinin azaltılması, elde edilecek olan DNA'nın daha bütün ve çok miktarda olmasını sağlayacaktır. Fakat dekontaminasyon işleminin yeterli olmadığı çalışmalarda modern DNA kontaminasyonu ve PCR inhibitörlerinin varlığının kaçınılmaz olacağı bir gerçektir. Dolayısıyla yapılacak olan çalışmalarda örneğin doğru seçimi, uygulanacak olan tekniklerin esnetilmesi açısından önem arz etmektedir (Apak ve Doğan, 2017).

1.8.2. Demineralizasyon (Dekalsifikasyon)

DNA iskelet parçaları içerisinde oldukça sıkı şekilde korunmaktadır. DNA'nın açığa çıkarılması için bu kompakt yapının bozulması ve hücrelerin açığa çıkarılması gerekmektedir. Bunun için literatürdeki tüm çalışmalarda toz haline getirilen kemik EDTA ile muamele edilmektedir. Bazı çalışmalarda örneklerin bütün halde de kullanıldığı görülmektedir. Kalsiyumun şelasyonu için EDTA kullanımı ortak olmasına karşın, uygulama şekli çalışmadan çalışmaya farklılık göstermektedir. Bu farklılıkla 3 grup altında toplanabilir.

Tek Aşamalı EDTA İnkübasyonu: Bu yöntemde örneğin üzerine örneğin ağırlığının yaklaşık 10 katı haciminde EDTA (0,5 M, pH 8.0) çözeltisi eklenir. Çalışmadan çalışmaya farklılık göstermekle birlikte 18-24 saat ile 72 saate kadar

çalkalamalı ortamda inkübasyon yapılabilir. Bununla birlikte inkübasyonun oda sıcaklığında, 4°C veya 56°C sıcaklıkta yapıldığı uygulamalar mevcuttur. İnkübasyon süreci sonrasında örnek santrifüj edilerek süpernatanta ekstraksiyon işlemi uygulanır (Hummel, 2003).

Çok Aşamalı EDTA İnkübasyonu: Bu demineralizasyon yönteminin tek aşamalı EDTA inkübasyonundan farkı belirli periyotlarla örneğin santrifüj edilerek EDTA çözeltisinin yenilenmesidir. Burada süre genellikle EDTA çözeltisinin berrak bir hale gelmesine bağlı olarak değişmektedir. İnkübasyon süreci sonrasında örnek santrifüj edilerek süpernatanta ekstraksiyon işlemi uygulanır (Jakubowska ve ark., 2012).

Tek Aşamalı EDTA-Proteinaz K İnkübasyonu: Diğer iki demineralizasyon yönteminden farklı olarak bu yöntemde EDTA çözeltisinin içerisine örnek başına yaklaşık 200 µg Proteinaz K eklenir. Bu sayede Proteinaz K inkübasyonu için ikinci bir süre harcanmaz. İnkübasyon sıcaklığı çalışmadan çalışmaya değişmekle birlikte literatürde oda sıcaklığında, 36°C ve 56°C sıcaklıkta olacak şekilde uygulamalar mevcuttur. İnkübasyon süreci sonrasında örnek santrifüj edilerek süpernatanta ekstraksiyon işlemi uygulanır (Rohland ve Hofreiter, 2007).

1.8.3. Ekstraksiyon ve Saflaştırma

DNA ekstraksiyonu ve saflaştırması, DNA'nın hücre ve çekirdek dışına çıkarıldıktan sonra bulunduğu ortamdan alınması uzaklaştırılması ve DNA üzerinde kalan kontaminantların çeşitli kimyasallarla yıkanarak uzaklaştırılmasıdır. Literatürde bununla ilgili olarak pek çok yöntem ve yöntem kombinasyonları mevcuttur. Sayısal anlamda bakılacak olursa literatürde en sık kullanılan ve en başarılı olan iki yöntem Fenol-Kloroform ve Silika Jel yöntemleridir

Fenol-Kloroform Yöntemi: Fenol-kloroform yöntemi moleküler biyolojide kullanılan, nükleik asit ile proteinleri ve lipitleri ayrıştırmaya yarayan bir sıvı-sıvı

ekstraksiyon yöntemidir. Genellikle eşit orandaki fenol ve kloroform karışımı sıvı örneklere, hücre lizatlarına veya homojenize edilmiş dokulara muamele edilerek kullanılır. Gerekli sürede gerçekleştirilen santrifüj sonrasında deney tüpünde iki faz oluşur. Bu faz oluşumunun sebebi fenol-kloroform karışımının sudan daha yoğun olmasıdır. Dolayısıyla organik faz sulu fazın altında kalır. Hidrofobik özellikte olan yağlar organik fazda ve proteinler iki fazın arasında kalırken, DNA ve tuzlar, şekerler gibi bazı kontaminantlar sulu fazda kalırlar. Daha saf bir DNA elde etmek için bu işlem birden fazla kez tekrarlanabilmektedir. İşlemi tekrarlamak DNA kaybına sebep olabilmektedir. Başka bir tüpe dikkatle transfer edilen sulu fazdan daha sonra çeşitli presipitasyon yöntemleriyle DNA ayrıştırılmaktadır.

Fenol tabanlı yöntemler modern DNA izolasyonu için neredeyse her genetik laboratuvarında kullanılmış ya da kullanılmakta olan yöntemlerdir. Aynı şekilde literatürde Antik DNA ve Adli DNA çalışmaları için de fenol tabanlı yöntemlerin sıklıkla tercih edildikleri görülmektedir.

Silika Jel Yöntemi: DNA'nın silikaya adsorbsiyonu ile ekstraksiyon yöntemi, DNA'nın uygun tuz konsantrasyonu ve pH koşulları altında, silikaya tutunması prensibi ile gerçekleştirilen bir ekstraksiyon yöntemidir. Silikaya tutturulan DNA birkaç kez çözücülerle yıkanıp inhibitörler uzaklaştırıldıktan sonra, tris-EDTA tamponu veya steril su ile silika üzerinden elüe edilir. Bu yöntem günümüzde kolon kitlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çalışmamızda literatürde sıklıkla kullanılan bu iki yöntem karşılaştırılmak üzere seçilmiştir. Bunların haricinde her iki yöntemin birlikte kullanıldığı protokoller ve manyetik DNA saflaştırması gibi yöntemler de mevcuttur. Yapılan çalışma sonucunda yöntemlerin birbirine olan üstünlüğü elde edilen DNA miktarı ve çoğaltılabilme başarısı bakımından kıyaslanmıştır. Bununla birlikte laboratuvarda harcanan zaman ve iş gücü bakımından da değerlendirilmiştir.

1.9. Örneklerin Elde Edildiği Kazı Alanı

Belentepe, Muğla'nın Milas ilçesinin Ören beldesinde bulunan Çakıralan Köyünün güneyinde yer almaktadır. Bu bölgede yapılan kazı çalışmalarında bulunan pitos mezarlar kalıntıların Eski Tunç Çağı I-II evresinden olduğuna işaret etmektedir. Bununla birlikte bölgenin güneyinde yapılan kazı çalışmalarında Geç Geometrik Dönem'e, Klasik Dönem'e ve Hellenistik Dönem'e ait mezarların birlikte bulunduğu bir nekropol alanı da bulunmuştur. Kazı çalışmalarında elde edilen veriler bölgede yerleşimin M.Ö 4. yy'ın başlarından M.S 1. Yy'ın başlarına kadar devam ettiğini göstermektedir. 2011 yılında yine yakın bir bölgede Doğu Roma Dönemi'ne ait bir nekropol alanı daha bulunmuştur. Bu alan M.S 10. yy ve M.S 11 yy'da kullanılmıştır. Doğu Roma mezar tipolojisi gösteren bu mezarlıkların neredeyse hepsi bölgenin jeolojik yapısından dolayı kireç taşından yapılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Laboratuvarlar

Örnek temini sonrasında örneklerin morfolojik olarak incelenmesi, kesim işlemleri ve DNA izolasyonuna hazırlık aşamaları Adli Antropoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Moleküler biyoloji çalışmaları Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Enstitü bünyesinde DNA izolasyonu ve PCR çalışmaları için iki ayrı laboratuvar bulunmaktadır.

2.2. Kullanılan Ekipmanlar

Antik Örnek Kesim Kabini (UV Lambalı)	El Yapımı
Gravür Cihazı	Dremel 3000
Laminar Akış Kabini	Esco
Termal Döngü Cihazı	Techne TC 512
Jel Görüntüleme cihazı	Syngene
Güç Kaynağı	Bio-Rad Power Pac1000
Soğutmalı Santrifüj Cihazı	Hettich Zentrifügen R22
NanoDrop Spektrometre	Thermo ND1000
Otoklav	Nüve
İnkübatör	Nüve
pH Metre	Mettler, Toledo
Hassas Terazi	Mettler, Toledo
Distile Su Cihazı	Nüve
Su Saflaştırma Sistemi	Human UP 900
Derin Dondurucu	Arçelik
Mikrodalga Fırın	Arçelik

2.3. Kontaminasyon Önleyici Uygulamalar

Antik DNA ve Adli DNA analizlerinin en önemli sorunu çevresel kontaminantların örnekler üzerinden uzaklaştırılmasının ve yeni çevresel kontaminantların engellenmesinin zorluğudur. Bunun için çalışmamızda, mevcut kontaminantları uzaklaştırmak ve yeni kontaminantları engellemek için çeşitli önlemler alınmıştır. Öncelikle kazıdan alınan kemikler kaba kirlerinden fırça yardımıyla arındırılmıştır. Daha sonra kemikler yaklaşık 10 dk UV ışığına maruz bırakılmıştır.

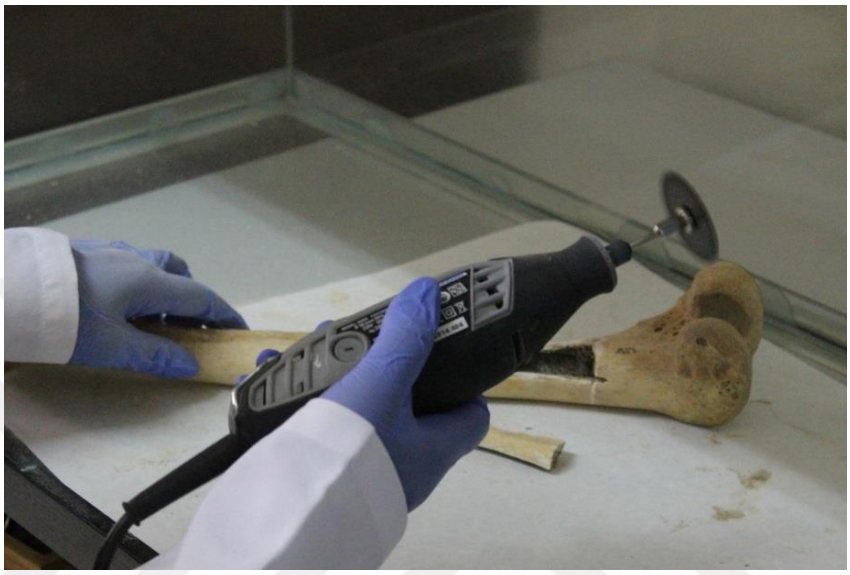
Kesme işlemi için Dremel marka gravür cihazı kullanılmıştır. Kullanılan çelik kesme diskleri her bir kemik için değiştirilmiş ve %6'lık çamaşır suyu ve UV ile dekontamine edilmiştir. Öğütme işlemi öncesinde kesilen kemik parçaları hafifçe zımparalanarak üst tabaka uzaklaştırılmıştır. Öğütme işlemi için sıvı azot, havan ve gerektiği durumlarda Dremel marka gravür cihazı kullanılmıştır. Kullanılan zımpara uçları her kemik için değiştirilmiştir.

Her çalışılan kemik örneğinden sonra ortam kemik tozlarından arındırılmış, kabin çamaşır suyu ile temizlenmiş ve UV ile dekontamine edilmiştir. Çalışmada kemiğin öğütülmesi, DNA'nın izole edilmesi ve PCR işlemlerinin gerçekleştirilmesi için farklı laboratuvarlar kullanılmıştır. Tüm işlemler sırasında tek kullanımlık eldiven, maske ve bone takılmıştır.

2.4. Kemiklerden Örnek Alınması ve DNA İzolasyonuna Hazırlanması

Kemikler, kontaminasyon önleyici uygulamalara sadık kalınarak kabin içerisinde kesilmiştir. Literatürde belirtildiği üzere femur antik DNA analizlerinde barındırdığı DNA miktarı açısından önem taşımaktadır. Adli antropolog rehberliğinde femur kemiklerinin belirtilen bölgelerden yaklaşık 8 cm^2'lik parçalar çıkarılmıştır. Bu

çıkarılan parçalar olası kontaminasyona karşı tekrar UV sterilizasyonundan geçirilerek zımpara ile üst tabakası ve süngerimsi tabakası uzaklaştırılmıştır. Daha sonra örnekler işlem öncesinde sterilize edilen pirinç havan ve sıvı azot yardımıyla toz haline getirilmiştir.



Şekil 2.1. Kemiklerin gravür cihazı ile kesimi.



Şekil 2.2. Kemiklerim üst tabakasının gravür cihazı ile zımparalanması.



Şekil 2.3. Kemik örneklerinden öğütülmek üzere kesilip çıkarılan parça.



Şekil 2.4. Çıkarılan parçanın zımparalandıktan sonraki görüntüsü.



Şekil 2.5. Sıvı azot eşliğinde havanda toz haline getirilmiş kemik örneği.

2.5. Kemik Örneklerinden DNA İzolasyonu

Kemik örneklerinden DNA izolasyonu için literatürde en çok kullanılan iki yöntem olan Fenol-kloroform ve Silika Jel yöntemi seçilmiştir. Bu yöntemler çalışmadan çalışmaya çeşitli farklılıklar göstermekle birlikte temel prensipleri değişmemektedir. Dolayısıyla Hummel ve. Rohland'dan referans alınan bu iki yöntem üzerinde, laboratuvarımız şartlarında daha verimli çalışmamızı sağlayacak çeşitli değişiklikler yapılmıştır (Hummel, 2003; Rohland ve Hofreiter, 2007).

2.5.1. Demineralizasyon (Dekalsifikasyon)

Hummel ve ark., (2003) kemiğin demineralizasyonu için kemiği 18-24 saat boyunca oda sıcaklığında, çalkalamalı bir şekilde 0.5 M EDTA içerisinde bekletmişlerdir. Buna karşılık bazı çalışmalarda +4°C'de 18-24 saat bekleme süresi içerisinde tekrarlı (2-3 tekrar) bir şekilde solüsyon berraklaşana kadar EDTA çözeltisini değiştirmişlerdir (Malhi, 2001, Hagelberg et al., 1989). Rohland ve Hofreiter (2007) çalışmalarında EDTA'nın yanında solüsyon içerisine proteinaz K eklemişler ve 18-24 saatlik bekleme süresini karanlık ortamda gerçekleştirmişlerdir. Bunların yanı sıra bazı çalışmalarda demineralizasyon süresinin 1 haftaya kadar çıkarıldığı fakat bununla birlikte DNA miktarının süreye bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir.

2.5.2. Fenol-Kloroform Ekstraksiyonu ve Alkol Presipitasyonu Yöntemi

Çalışmamızda fenol-kloroform ekstraksiyonu için Susanne Hummel'ın metodu benimsenmiş laboratuvar koşullarımıza göre adapte edilmiştir. Ekstraksiyon sırasında EDTA (Sigma), Proteinaz K (Sigma), Fenol:Kloroform:İzoamil alkol (Applied), Kloroform (Merck), 2- Propanol (Merck), Etanol (Sigma) kullanılmıştır.

Fenol-kloroform ekstraksiyonu için aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

- 50 mg homojenize kemik tozu 2 ml mikrosantrifüj tüpüne konur,
- Üzerine 500 ml 0.5 M EDTA (pH 8.3) eklenir,
- 24 saat oda sıcaklığında 40 rpm hızda inkübasyona bırakılır,
- İnkübasyon sonrasında 6000 rpm hızda 3 dk santrifüj edilir,
- Süpernatant yeni bir santrifüj tüpüne alınarak üzerine 300 ml lizis tamponu ve proteinaz K eklenir,
- 56°C'de 4 saat inkübasyona bırakılır,
- Üzerine mikrosantrifüj tüpünde mevcut olan örnek kadar (~800 µl) fenol:kloroform eklenir,

- Santrifüj edilerek faz ayrımı sağlanır,
- Süpernatant yeni bir santrifüj tüpüne alınarak üzerine mevcut olan örnek kadar (~800 µl) kloroform eklenir,
- Santrifüj edilerek faz ayrımı sağlanır,
- Süpernatant yeni bir santrifüj tüpüne alınarak üzerine 800 µl 2-propanol eklenir ve 10 dk boyunca hafifçe sallanarak DNA'nın presipitasyonu beklenir,
- Santrifüj edilerek süpernatant atılır,
- Üzerine 800 µl %80 etanol eklenir ve 10 dk boyunca hafifçe sallanarak DNA'nın yıkanması sağlanır,
- Santrifüj edilerek süpernatant atılır,
- DNA görünmeyecek kadar az olduğu için dikkatle santrifüj tüpünden etanolün uçması beklenir.
- DNA yaklaşık 30 µl saf su veya TE tamponu eklenerek çözdürülür. Sonrasında PCR için kullanılabilir ve/veya -20 derin dondurucuya kaldırılabilir.

2.5.3. Silika Jel Ekstraksiyon Yöntemi

Çalışmamızda silika ekstraksiyonu için Rohland ve Hofreiter'ın (2007) metodu benimsenmiş laboratuvar koşullarımıza göre adapte edilmiştir. Ekstraksiyon sırasında EDTA (Sigma), Proteinaz K (Sigma), Tris Base (Sigma), Guanidin HCl (Sigma), NaCl (Merck), SiO_2 (Merck), HCl (Merck), Etanol (Sigma) kullanılmıştır. Ekstraksiyon öncesinde ekstraksiyon çözeltisi, silika süspansiyonu, bağlanma tamponu ve yıkama tamponu hazırlanmıştır.

Ekstraksiyon Çözeltisi

0.5 M EDTA (pH 8) ve 0.25 mg/ml Proteinaz K ile hazırlanır.

Bağlanma Tamponu

6 M Guanidin HCl, 25 mM NaCl ve 50 mM Tris ile hazırlanır.

Yıkama Tamponu

%50 h/h etanol, 125 mM NaCl, 10 mM Tris ve 1 mM EDTA (pH 8) ile hazırlanır.

Silika Süspansiyonu

4.8 gr SiO_2 40 ml distile su içerisine eklenir. Karıştırıldıktan sonra 1 saat beklenir. 39 ml üst fazdan alınarak yeni bir tüpe konur ve 4 saat daha beklenir. Üst fazdan 35 ml atıldıktan sonra kalan peletin üzerine 48 µl %30'luk HCl eklenir.

Silika jel ekstraksiyonu için aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

- 50 mg homojenize kemik tozu 2 ml mikrosantrifüj tüpüne konur,
- 1 ml ekstraksiyon solüsyonu eklenerek çalkalamalı ve karanlık ortamda 18-24 saat inkübe edilir.
- 2 dakika 5000 rpm hızda santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant yeni bir tüpe alınır.
- 4 ml bağlanma tamponu ve 10 µl silika süspansiyonu eklendikten sonra karışımın pH'si HCl ile 4'e ayarlanarak 3 saat hafif çalkalamalı ve karanlık ortamda inkübasyona bırakılır.
- 2 dakika 5000 rpm hızda santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant yeni bir 2 ml mikrosantrifüj tüpüne alınır.
- 100 ml bağlanma tamponu eklenerek silika yeniden süspansiyon hale getirilir.
- 15 saniye 16000 rpm hızda santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atılır.
- 100 ml yıkama tamponu eklenerek pipetlenir.
- 15 saniye 16000 rpm hızda santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atılır.
- Silika oda sıcaklığında 15 dk kurutulur.
- 30 µl TE tamponu ya da steril su ile pelet süspanse edilir.
- 2 dakika 16000 rpm hızda santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant yeni tüpe alınır. Sonrasında PCR için kullanılabilir ve/veya -20 derin dondurucuya kaldırılabilir.

2.6. Antik DNA Miktar ve Kalite Tayini

DNA izolasyonu sonrasında elde edilen DNA'nın miktarı ve kalitesini belirlemek için jelde yürütme, spektrofotometrik ölçüm ve PCR ile belirlenen bir bölgenin çoğaltılması olmak üzere 3 teknik uygulanmaktadır (Rohland ve Hofreiter, 2007). Elde edilen DNA'nın jelde görüntülenebilmesi için miktarı ve bütünlüğü korunmuş olması gerekmektedir. Oldukça yıpratıcı şartlara maruz kalmış örneklerden elde edilen DNA'nın miktarının çok olması ve bütünlüğünün korunmuş olması beklenemez. Dolayısıyla direkt jelde yürütülmesi ile sonuç alınması oldukça zordur ve çalışmamızda bu aşama atlanmıştır

2.6.1. Nanodrop Ölçümü

Çalışmamızda 16 örnekten iki farklı teknikle izole edilen DNA'ların NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) spektrofotometrik ölçüm cihazı ile kalite ve miktar tayini yapılmıştır. 3 tekrar ile yapılan ölçüm sonuçları bulgular bölümünde tablo haline getirilmiştir. Literatürde NanoDrop ile yapılan ölçümlere şüphe ile yaklaşan yazarlar bulunmaktadır. Dolayısıyla örneklerin tamamında PCR ile DNA çoğaltılmaya çalışılmış ve sonrasında agaroz jel elektroforezi ile yürütülerek görüntülenmiştir.

2.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Çalışmamızda literatürdeki antik örneklerden elde edilen DNA fragmentlerinin uzunluğu göz önünde bulundurularak 200 bç'den daha küçük ürün veren (X kromozomu için 83 bç, Y kromozomu için 89 bç) primer tasarlanmıştır. Primer dizilimi Çizelge 2.2.'de gösterilmektedir.

Çalışma sırasında literatürde ilk kez kullanılacak olan primer çiftinin optimum çalışma koşullarının belirlenebilmesi amacı ile daha öncesinde çalıştığından emin

olunan kontrol DNA örnekleri ile farklı bağlanma sıcaklıklarında (50, 55, 60 ve 65°C) ve farklı $MgSO_4$ konsantrasyonlarında (1 mM, 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM) PCR optimizasyonu yapılmıştır. Bu çalışma sonrasında primer için optimum çalışma koşullarının 60°C bağlanma sıcaklığı ve 2 mM $MgSO_4$ konsantrasyonu olduğu gözlemlenmiştir. PCR için optimize edilen koşullar Çizelge 2.1. ve 2.2.'de tablolaştırılmıştır.

Çizelge 2.1. PCR reaksiyon karışımı bileşenleri

Bileşenler	**Hacim**	**Son Konsantrasyon**
Steril Distile Su	25 µL 'ye kadar	-
10X Tampon	2.5 µL	1X
50 mM $MgSO_4$	1 µL	2 mM
2 mM dNTP Mix	2.5 µL	0.2 mM
10 µM primer	0.5-0.5 µL	0.2 µM
DNA < 500 ng	4 µL	-
Platinum HiFi Taq DNA Polimeraz (5 U/µL)	0.1 µL	1U/reaks.

Çizelge 2.2. PCR Programı

Primer			***Döngü***		***Sıcaklık (°C)***	***Süre (sn)***
Amelogenin	**F:** ctgggctctgtaaagaatagt	**R:** ctggtggtaggaactgtaaaat	*İlk Denatürasyon*		94	150
			35 Döngü	*Denatürasyon*	94	30
				Bağlanma	48	30
				Uzama	68	30
			Son Uzama		68	600
			Bekleme		4	∞

2.6.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonrasında örnekler izolasyonun başarısını gözlemlemek için %1 veya %1.5'lik agaroz jel (Sigma) üzerinde 100 mV'ta ortalama 40 dk süreyle yürütülmüştür. İşlem sırasında PowerPac 1000 (BIO-RAD) güç kaynağı ve multiSUB Maxi (Cleaver Scientific) elektroforez tankı kullanılmıştır.

3. BULGULAR

Bu tez çalışmasında incelenen 16 bireye ait kemik örnekleri (femur) çalışma öncesinde morfolojik olarak incelenerek bütünlükleri ve çalışmaya uygunlukları değerlendirilerek çalışmaya alınmıştır. Kemiklerin öğütme işlemi esnasında dayanıklı olduğu ve dolayısıyla görece daha uygun çevresel koşullar altında kalmış olabileceği düşünülebilir.

Kazı alanından çıkarılmış ve bir süre depoda bekletilmiş olan bu örneklerden elde edilen kemik tozunun yaklaşık 50 mg'ı kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen DNA'nın arkeolojik bir örnekten elde edilmiş olmasından dolayı miktar, kalite ve DNA parça uzunluklarının düşük olması beklenmektedir. Dolayısıyla DNA izolasyonu sonrasında elde edilen DNA'nın miktarını ve kalitesini belirlemek için kullanılan üç yöntemden biri olan doğrudan jelde yürütme yöntemi sonuç vermeyeceğinden bu basamak atlanmıştır.

İkinci yöntem olan spektrofotometrik yöntem ile bütün örnekler 3'er tekrarlı bir şekilde analiz edilmiştir. Analiz sonucunda yazılımın verdiği değerler ng/µl cinsinden DNA miktarı ve saflık tayininde kullanılan 260/280 nm ile 260/230 nm dalga boylarının oranı Çizelge 3.1., 3.2., 3.3. ve 3.4.'de derlenmiştir.

Çizelge 3.1. Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) ile tekrarlı demineralizasyon ve fenol-kloroform izolasyonu yöntemi ile yapılan DNA izolasyonundan elde edilen DNA miktarları.

Örnek	Okutma	DNA Miktarı (ng/ul)	260/280	260/230
1003	I	24,10	1,44	0,37
	II	24,70	1,43	0,37
	III	24,20	1,44	0,36
	Ortalama	**24,33**	**1,44**	**0,37**
1012	I	20,40	1,58	0,34
	II	21,60	1,52	0,35
	III	20,80	1,56	0,35
	Ortalama	**20,93**	**1,55**	**0,35**
1014	I	68,80	1,34	0,56
	II	70,70	1,38	0,55
	III	69,10	1,38	0,55
	Ortalama	**69,53**	**1,37**	**0,55**
1022	I	55,40	1,40	0,49
	II	58,10	1,34	0,50
	III	55,90	1,38	0,50
	Ortalama	**56,47**	**1,37**	**0,50**
1040	I	43,60	1,34	0,54
	II	43,90	1,42	0,54
	III	43,10	1,38	0,53
	Ortalama	**43,53**	**1,38**	**0,54**
1045	I	24,40	1,61	0,35
	II	25,90	1,59	0,37
	III	23,90	1,60	0,36
	Ortalama	**24,73**	**1,60**	**0,36**
1050	I	65,10	1,44	0,41
	II	66,10	1,42	0,41
	III	65,80	1,44	0,40
	Ortalama	**65,67**	**1,43**	**0,41**
1068	I	35,90	1,41	0,47
	II	35,70	1,41	0,47
	III	35,70	1,40	0,46
	Ortalama	**35,77**	**1,41**	**0,47**
1075	I	100,80	1,31	0,68
	II	100,40	1,31	0,68
	III	101,00	1,32	0,69
	Ortalama	**100,73**	**1,31**	**0,68**
1084	I	40,30	1,35	0,48
	II	40,20	1,40	0,47
	III	40,20	1,38	0,46
	Ortalama	**40,23**	**1,38**	**0,47**

Çizelge 3.1. Devam.

Örnek	Okutma	DNA Miktarı (ng/ul)	260/280	260/230
1090	I	34,70	1,40	0,40
	II	33,80	1,40	0,41
	III	34,20	1,40	0,40
	Ortalama	**34,23**	**1,40**	**0,40**
1093	I	18,80	1,55	0,29
	II	17,90	1,55	0,29
	III	18,10	1,55	0,29
	Ortalama	**18,27**	**1,55**	**0,29**
1097	I	129,00	1,34	0,76
	II	126,00	1,33	0,76
	III	126,00	1,34	0,76
	Ortalama	**127,00**	**1,34**	**0,76**
1100	I	64,50	1,36	0,58
	II	64,80	1,34	0,58
	III	64,90	1,36	0,58
	Ortalama	**64,73**	**1,35**	**0,58**
1104	I	114,90	1,36	0,77
	II	117,70	1,35	0,77
	III	111,80	1,35	0,78
	Ortalama	**114,80**	**1,35**	**0,77**
1110	I	60,10	1,35	0,57
	II	60,90	1,31	0,58
	III	60,50	1,35	0,58
	Ortalama	**60,50**	**1,34**	**0,58**

Çizelge 3.2. Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) ile tek seferli demineralizasyon ve fenol-kloroform izolasyonu yöntemi ile yapılan DNA izolasyonundan elde edilen DNA miktarları.

Örnek	Okutma	DNA Miktarı (ng/ul)	260/280	260/230
1003	I	506,00	1,43	0,76
	II	507,30	1,42	0,76
	III	506,20	1,43	0,76
	Ortalama	**506,50**	**1,43**	**0,76**
1012	I	423,70	1,46	0,67
	II	420,70	1,45	0,67
	III	421,50	1,45	0,67
	Ortalama	**421,97**	**1,45**	**0,67**
1014	I	733,80	1,49	0,58
	II	729,60	1,46	0,57
	III	731,60	1,46	0,58
	Ortalama	**731,70**	**1,47**	**0,58**
1022	I	834,20	1,42	0,71
	II	791,00	1,40	0,72
	III	816,30	1,40	0,75
	Ortalama	**813,83**	**1,41**	**0,73**
1040	I	460,60	1,45	0,71
	II	463,70	1,45	0,72
	III	461,20	1,45	0,71
	Ortalama	**461,83**	**1,45**	**0,71**
1045	I	651,60	1,45	0,60
	II	658,80	1,45	0,60
	III	656,30	1,46	0,60
	Ortalama	**655,57**	**1,45**	**0,60**
1050	I	667,00	1,41	0,67
	II	662,10	1,41	0,61
	III	659,50	1,44	0,65
	Ortalama	**662,87**	**1,42**	**0,64**
1068	I	379,30	1,40	0,83
	II	382,50	1,41	0,81
	III	381,20	1,40	0,81
	Ortalama	**381,00**	**1,40**	**0,82**
1075	I	446,60	1,43	0,74
	II	449,00	1,44	0,74
	III	448,50	1,43	0,73
	Ortalama	**448,03**	**1,43**	**0,74**
1084	I	438,40	1,34	0,82
	II	438,90	1,44	0,80
	III	438,10	1,44	0,82
	Ortalama	**438,47**	**1,41**	**0,81**

Çizelge 3.2. Devam.

Örnek	Okutma	DNA Miktarı (ng/ul)	260/280	260/230
1090	I	783,90	1,45	0,64
	II	788,70	1,42	0,63
	III	775,60	1,45	0,64
	Ortalama	**782,73**	**1,44**	**0,64**
1093	I	523,30	1,45	0,76
	II	524,30	1,45	0,76
	III	524,90	1,45	0,76
	Ortalama	**524,17**	**1,45**	**0,76**
1097	I	300,40	1,44	0,64
	II	298,60	1,44	0,64
	III	301,80	1,45	0,64
	Ortalama	**300,27**	**1,44**	**0,64**
1100	I	510,60	1,44	0,84
	II	516,60	1,43	0,84
	III	516,70	1,43	0,84
	Ortalama	**514,63**	**1,43**	**0,84**
1104	I	813,90	1,43	0,64
	II	810,70	1,46	0,64
	III	815,60	1,44	0,64
	Ortalama	**813,40**	**1,44**	**0,64**
1110	I	374,70	1,44	0,71
	II	375,50	1,43	0,71
	III	374,90	1,44	0,72
	Ortalama	**375,03**	**1,44**	**0,71**

Çizelge 3.3. Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) ile tek seferli demineralizasyon ve silika jel yöntemi ile yapılan DNA izolasyonundan elde edilen DNA miktarları.

Örnek	Okutma	DNA Miktarı (ng/ul)	260/280	260/230
1003	I	19,60	2,84	0,04
	II	19,30	2,73	0,04
	III	19,40	2,90	0,04
	Ortalama	**19,43**	**2,82**	**0,04**
1012	I	24,10	2,23	0,05
	II	23,60	2,20	0,05
	III	23,10	2,21	0,05
	Ortalama	**23,60**	**2,21**	**0,05**
1014	I	19,80	3,29	0,04
	II	19,50	3,29	0,04
	III	19,60	3,29	0,04
	Ortalama	**19,63**	**3,29**	**0,04**
1022	I	28,70	1,75	0,06
	II	27,90	1,76	0,06
	III	24,50	1,75	0,06
	Ortalama	**27,03**	**1,75**	**0,06**
1040	I	22,10	2,77	0,04
	II	22,50	2,75	0,04
	III	20,60	2,75	0,05
	Ortalama	**21,73**	**2,76**	**0,04**
1045	I	16,80	3,24	0,03
	II	16,50	3,25	0,03
	III	16,85	3,25	0,03
	Ortalama	**16,72**	**3,25**	**0,03**
1050	I	15,10	5,31	0,03
	II	15,10	5,33	0,03
	III	15,30	5,31	0,03
	Ortalama	**15,17**	**5,32**	**0,03**
1068	I	18,40	3,22	0,04
	II	18,40	3,20	0,04
	III	18,30	3,15	0,04
	Ortalama	**18,37**	**3,19**	**0,04**
1075	I	16,80	3,55	0,04
	II	16,50	3,55	0,04
	III	16,50	3,56	0,05
	Ortalama	**16,60**	**3,55**	**0,04**
1084	I	17,90	2,97	0,04
	II	17,85	2,95	0,04
	III	17,60	2,85	0,04
	Ortalama	**17,78**	**2,92**	**0,04**

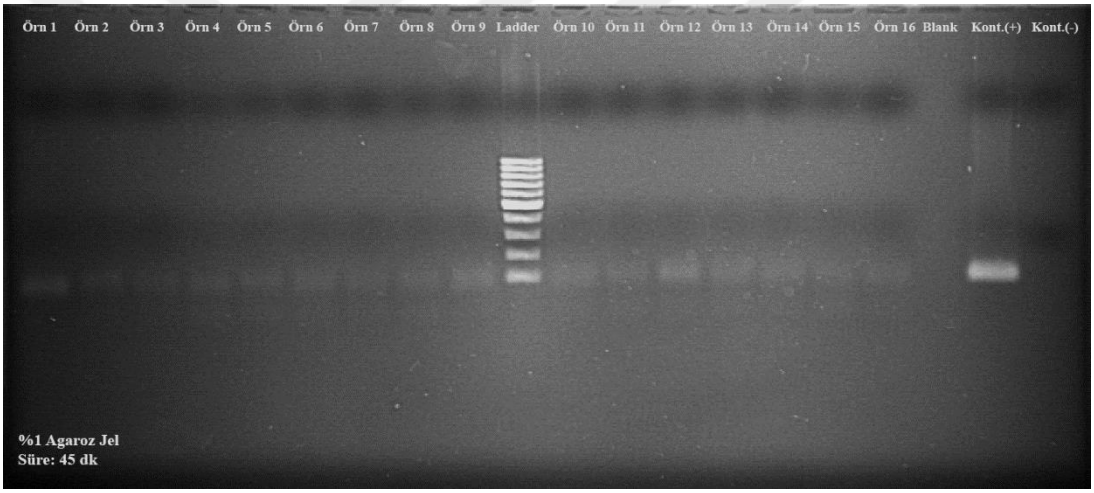
Çizelge 3.3. Devam.

Örnek	Okutma	DNA Miktarı (ng/ul)	260/280	260/230
1090	I	17,10	3,80	0,03
	II	17,15	3,80	0,03
	III	17,60	3,80	0,03
	Ortalama	**17,28**	**3,80**	**0,03**
1093	I	14,30	3,35	0,03
	II	14,20	3,30	0,03
	III	14,30	3,30	0,03
	Ortalama	**14,27**	**3,32**	**0,03**
1097	I	16,30	3,38	0,03
	II	16,30	3,35	0,03
	III	16,20	3,35	0,03
	Ortalama	**16,27**	**3,36**	**0,03**
1100	I	30,30	2,02	0,06
	II	30,30	2,00	0,06
	III	30,20	2,10	0,06
	Ortalama	**30,27**	**2,04**	**0,06**
1104	I	19,50	2,67	0,04
	II	19,20	2,65	0,04
	III	19,60	2,65	0,04
	Ortalama	**19,43**	**2,66**	**0,04**
1110	I	16,10	3,00	0,03
	II	16,10	3,10	0,03
	III	16,20	3,10	0,03
	Ortalama	**16,13**	**3,07**	**0,03**

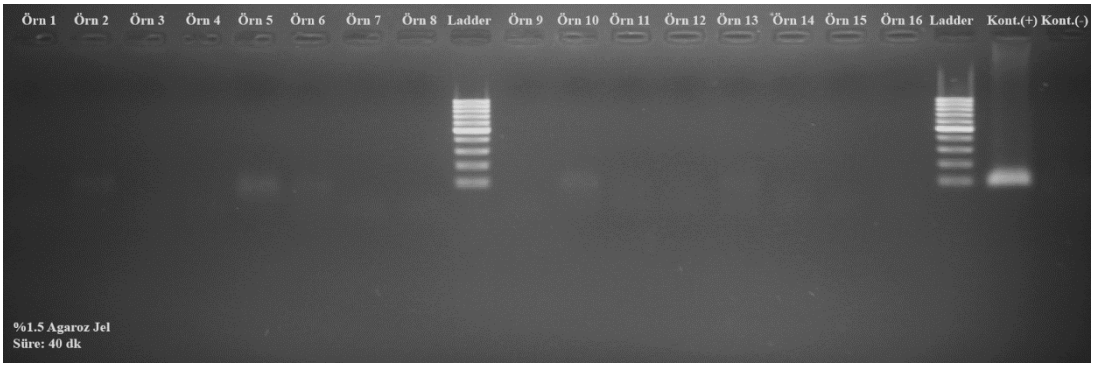
Çizelge 3.4. Spektrofotomete (NanoDrop ND-1000) ile yapılan ölçümlerin yönteme bağlı ortalamaları.

Yöntem	n	Ortalama DNA Miktarı (ng/µl)	Ortalama 260/280	Ortalama 260/230
Fenol-Kloroform Yöntemi Tek Aşamalı Demineralizasyon	16	560,53	1,44	0,71
Fenol-Kloroform Yöntemi Çok Aşamalı Demineralizasyon	16	56,34	1,41	0,50
Silika Jel Yöntemi	16	19,36	3,08	0,04

Üçüncü ve altın standart olarak düşünülebilecek olan yöntem, PCR tekniği ile istenen bir gen bölgesinin çoğaltılarak jel üzerinde yürütülmesidir. Bu sayede doğrudan yürütülerek görünemeyecek kadar az ve parçalanmış olan DNA'dan istenilen kısım milyonlarca kez çoğaltılarak görülebilir hale getirilebilmektedir. Bu çalışmada DNA'nın arkeolojik örneklerde oldukça parçalanmış bir şekilde var olduğu göz önünde bulundurularak 83 ve 89 bç uzunluğunda ürün verecek bir primer tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerin 2 erkek, 1 kadından elde edilmiş DNA örnekleri üzerinde başarılı bir şekilde çalıştığı gösterildikten sonra antik örnekler üzerinde denenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda alınan jel görüntüleri Şekil 3.1., 3.2., 3.3. ve 3.4.'te görülmektedir.

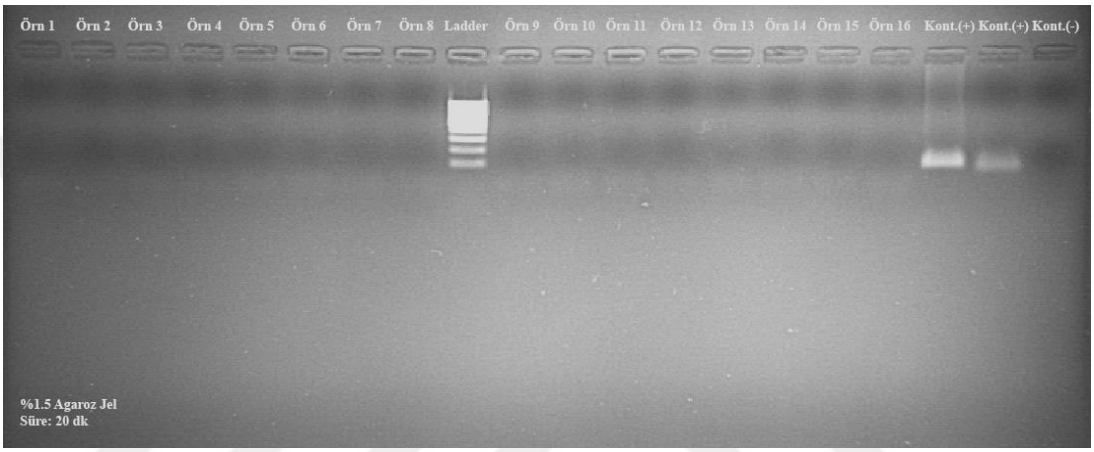


Şekil 3.1. Tek aşamalı demineralizasyon ve fenol-kloroform yöntemi ile ekstrakte edilmiş örneklerin PCR sonrasında jel üzerindeki görüntüsü.



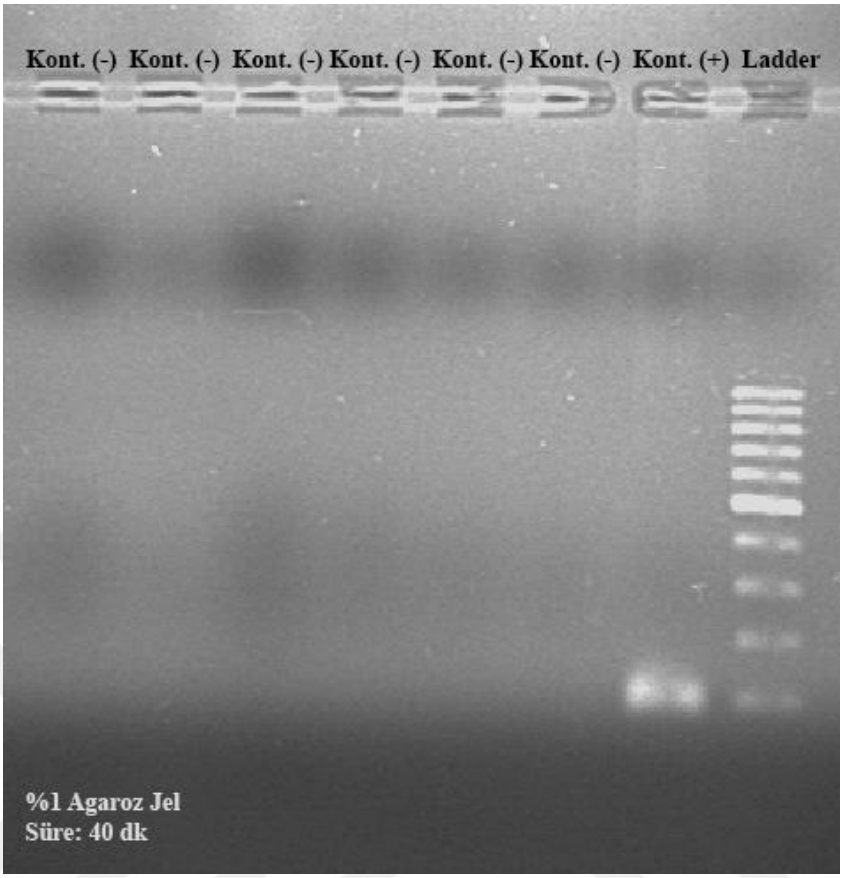
Şekil 3.2. Çok aşamalı demineralizasyon ve fenol-kloroform yöntemi ile ekstrakte edilmiş örneklerin PCR sonrasında jel üzerindeki görüntüsü.

Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.'de jel görüntülerinde Fenol Kloroform yöntemi ile izolasyon yapılmış olmasına karşın başlangıçta kullanılan ve izolasyonun en önemli aşaması olan demineralizasyonda bir değişiklik yapılmıştır. Şekil 3.3.'de jel görüntüsünde Silika jel yöntemi ile yapılan izolasyon çalışması görülmektedir. Silika jel izolasyonu için izlenen protokol ile çoğaltılabilir miktarda ve kalitede DNA elde edilememiştir.



Şekil 3.3. Tek aşamalı demineralizasyon ve silika jel yöntemi ile ekstrakte edilmiş örneklerin PCR sonrasında jel üzerindeki görüntüsü.

İzolasyon çalışmaları esnasında, izolasyon sırasındaki kontaminasyon riski göz önünde bulundurularak aynı yöntem saf su üzerine uygulanmıştır. Negatif kontrol sonuçları Şekil 3.4'deki jel görüntüsünde görülmektedir.



Şekil 3.4. Her bir ekstraksiyon için DNA kalıbı içermeyen negatif kontrol örnekleri.

4. TARTIŞMA

Adli bilimlerin öncelikli ilgi alanlarından biri ölümle sonuçlanmış bir olay sonrası ölen bireyin kimliklendirilmesidir. Bu alanda kullanılmakta olan yöntemler bilim ve teknolojinin ilerlemesiyle birlikte her geçen gün gelişme göstermiş ve çok disiplinli bir yaklaşım göstermeye başlamıştır. Günümüzde kimliklendirme için kullanılan altın standart yöntemlerden birisi DNA profillemesidir.

Ölüm sonrasında, ölümün üzerinden geçen zamana bağlı olarak bireylerin kimliklendirilmesi gittikçe zorlaşmakta, özellikle adli genetik uzmanlarının kullanabileceği biyolojik örnek miktarı giderek azalmaktadır. Yumuşak doku olarak tabir edilen kas, tendon, ligament, sinir, fibröz doku, yağ doku, damarlar ve sinoviyal membranlarla, diğer biyolojik sıvı olarak adlandırılan biyolojik örnekler ölümden kısa bir süre sonra bozunmaya uğrar. Bu bozunma esnasında hücre içerisinde bulunan kalıtsal materyal de parçalanır ve analizi oldukça zorlaşır. Vücudumuzda bozunmaya direnç gösterebilecek ve sahip olduğu kalıtsal materyali en iyi şekilde saklayacak organımız iskeletimizdir. Fakat iskelet örneklerinden DNA analizi yapmak diğer yumuşak doku ve biyolojik sıvılardan DNA analizi yapmaktan çok daha zordur.

Adli antropologlar bütünlüğü bozulmamış ya da bireye ait yeterli iskelet parçalarının bulunduğu durumlarda bireyin yaş, cinsiyet, boy gibi karakteristik bazı özelliklerini belirleyebilmektedirler. Bu sayede moleküler teknikle yapılacak olan kimliklendirme için hem karşılaştırma verisi oluşturulabilmekte hem de çalışılacak örnek havuzu daraltılabilmektedir.

Toprak altından çıkarılan örneklerin korunumu toprak altında geçirdiği süreye, toprağın nemine, coğrafi bölgenin iklim koşullarına, toprak yapısına ve bunun gibi pek çok çevresel ve fiziksel etmene göre değişkenlik göstermektedir. Bu etmenlere bağlı olarak bütünlüğü bozulmuş iskelet parçaları üzerinde yapılan antropolojik çalışmalar

kimliklendirme çalışmalarını güçlendirdiği kadar moleküler biyolojik çalışmaları da sonuç alınamayacak duruma getirebilmektedir.

Adli antropologların kimliklendirmedeki öncelikli yaklaşımı iskeletin ait olduğu bireyin yaş ve cinsiyetinin belirlenmesi şeklindedir. İskelet bütünlüğü korunmuş olan bireylerde kimliklendirme büyük başarı oranı ile gerçekleştirilebilmektedir. Fakat cinayetler, toplu gömüler, felaketler gibi adli olaylarda ve arkeolojik kazı alanlarında bütün iskelet bulma olasılığı azalmaktadır. Antropologlar için genellikle tek bir bireye ait kafatası ve pelvis iskelet bölümlerinin bulunduğu durumlarda bireyin cinsiyet ve yaş tayini mümkün olabilmektedir. Ancak pelvis ve kafatası gibi cinsiyet ve yaş için ipucu niteliğinde olan bu bölümlerin olmadığı durumlarda ya da kemik gelişimini henüz tamamlamamış bireylerde yaş tayininin yapılması oldukça zordur. Bu gibi morfolojik yöntemlerle tayin yapılamadığı durumlarda, bireyin her hücresinde bulunan, kişiye özel olan ve değişme olasılığı olmayan DNA, kimliklendirme için oldukça önem taşımaktadır.

Kemiklerin biyolojik yapıları gereği barındırdıkları DNA miktarları, fiziksel yapıları gereği ise barındırdıkları DNA'yı koruma miktarları değişkenlik göstermektedir. Literatürde bu alanda yapılmış çalışmalar ve değerlendirmeler bulunmaktadır. Bu çalışmalarda yalnızca DNA miktarı değil aynı zamanda elde edilen DNA'nın ne kadar çoğaltılabildiği de göz önünde bulundurulmuştur. Antik DNA çalışmalarında sıklıkla kullanılmakta ve önerilmekte olan femur ve talusun yanı sıra son zamanlarda temporal kemik de barındırdığı DNA miktarı nedeniyle ön plana çıkmaktadır (Gamba ve ark., 2014). Fakat kalıntılarda bulunma olasılığı diğer büyük kemikler kadar yüksek değildir. Kazılarda bulunma sıklığı, dayanıklılığı, barındırdığı DNA miktarı, elde edilen DNA'nın çoğaltılmasındaki başarı oranı yüksek olduğu için femur çalışmamızda izolasyonda kullanılacak örnek olarak seçilmiştir.

Femur insan vücudundaki en uzun, en ağır ve en güçlü kemiktir (White, 2011). Evrimsel süreçte insanın dört ayak üzerinden iki ayak üzerine geçişiyle beraber yürüme ve dengede kalma aktiviteleri için önemli bir rolü olmuştur. Fiziksel yapısı

gereği kazı alanlarında bütünlüğü bozulmamış şekilde sıklıkla rastlanan, kişinin cinsiyeti, yaşı ve yaşam tarzı gibi özellikleri hakkında fikir veren bir kemik olması nedeniyle antropologlar için önemlidir. Antik DNA analizleri için yapılan çalışmalarda da yoğunluğu ve kalın korteks yapısı nedeniyle araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir (Damgaard ve ark., 2015). Bununla birlikte toplu gömülerden çıkarılan örneklerin ve felaket kurbanlarının kimliklendirilmesi gibi çok bireyli olgularda yapılacak ön kimliklendirme işlemlerinde ve sonrasında yapılacak DNA çalışmaları için de önerilmektedir (Prinz ve ark., 2007).

Yukarıda bahsedilen dayanıklılık ve sertlik gibi özellikleri nedeniyle, uzun yıllar toprak altında kalmasına ve çevresel pek çok etmene maruz kalmasına karşın çalışmamızdaki femur örneklerinin toz haline getirilme aşaması oldukça güç olmuştur. Bu durum kemik bütünlüğünün korunması ve moleküler boyutta da DNA'nın korunuyor olması konusunda bilgi verici olabilir.

DNA'nın korunumu için yalnızca kemiğin yapısı değil, çevresel koşulların sertliği de önemlidir. Örneklerimiz Muğla ilinin, Milas ilçesinin Ören beldesinde bulunan Çakıralan köyünde bulunan Belentepe kazısında gün yüzüne çıkarılmıştır. Ege bölgesinde bulunan bu kazı alanı Akdeniz iklimi etkisinde kalmaktadır. Yaz aylarında 40 °C üzerine çıkabilen hava sıcaklığı ortalama 26 °C'dir. Kışın ortalama 5 °C'a düşen sıcaklık zaman zaman -11 °C'a ulaşabilmektedir. Yağış kışın 259 mm seviyeye çıkarken yazın 7.8 mm seviyesine düşmektedir (Orman ve Su İşleri Bakanlığı Meteoroloji Genel Müdürlüğü, Resmi İstatistikler, 2019).

DNA miktarını ve kalitesini etkileyen bir diğer değişken ise örneğin yaşıdır. Gamba ve arkadaşları tarafından yapılmış olan çalışmada farklı dönemlere ait iskelet materyalleri kıyaslanmış ve dönemler arası farklılıklar olduğu ortaya konmuştur. Örneklerimizin kazının yapıldığı bölge incelemeleri ve yapılan yaşlandırma çalışmaları sonrasında yaklaşık 1000 yıllık olduğu öngörülmüştür.

Literatürde örneğin gün yüzüne çıkarılmasından sonraki saklanma koşulları ve üzerinde yapılan işlemlerin, DNA ekstraksiyonunu, elde edilecek DNA'nın kalitesini ve daha sonraki DNA çoğaltma işlemlerini etkileyebileceği belirtilmektedir. Örneklerimiz kazı alanından elde edildikten sonra DNA çalışmalarına uygun şartlarda bekletilmemişlerdir. Çıkarıldıktan sonra yaklaşık dört yıl kadar depolanmış ve daha sonra tarafımızca analiz için kullanılmıştır.

Örneklerin fiziki yapısının ve bütünlüğünün iyi olmasının DNA izolasyonunun başarısını ve DNA çoğaltımının başarısını olumlu etkilediği aDNA çalışmaları yapanlar tarafından belirtilmektedir. Farklı bir açıdan bakarsak müze örneklerinden, farklı şekillerde mumyalanmış (doğal yolla veya insan eliyle) örneklerden ve de reçine içerisinden çıkartılmış örneklerden oldukça başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir (Brown ve Brown, 1994). Dolayısıyla çalışmamızda bütünlüğü bozulmamış femur örnekleri seçilmiştir.

DNA canlı hücre içerisinde proteinlerce sıkıca paketlenmiş ve korunaklı bir ortamda bulunmaktadır. Ancak hücre canlılığını yitirdiğinde biyokimyasal dengenin bozulması nedeniyle DNA dış etmenlere açık hale gelmekte ve hızla parçalanmaya başlamaktadır. Bununla birlikte uygun ortamda saklanmayan örneklerde de zamanla DNA'daki hasar miktarı artmakta ve çoğaltılabilir DNA miktarı azalmaktadır. Uzunluk ve miktar anlamında kayba uğramış olan bu örneklerden elde edilen DNA'ların, çok miktardaki ve tek parça halindeki modern DNA ile PCR koşullarında rekabet etme olasılığı bulunmamaktadır. Dolayısıyla aDNA çalışmaları için seçilen örneklerin modern DNA kontaminasyonuna karşı örneğin hassasiyetine bağlı olarak, mümkün olan en sert dekontaminasyon işleminden geçirilmesi gerekmektedir. Dekontaminasyon işlemi bu aşamada modern DNA'nın örnekten uzaklaştırılmasını sağlamakla birlikte kazı alanından, üzerinde yapılan antropolojik çalışmalardan ya da depolama ortamından kaynaklanabilecek PCR inhibitörlerinin de uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Literatürde diş örneklerinin bu aşamada en sağlam ve en rahat dekontamine olabilen örnekler olduğu belirtilmektedir. Fakat yapısı gereği dişlerden yüksek miktarda DNA eldesi mümkün değildir. Bu nedenle çalışmamızda diş örnekleri tercih edilmemiştir.

Çalışmamızda literatürde en çok kullanılan ve en başarılı olan iki farklı DNA izolasyon yöntemi karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda izole edilen DNA örneklerine öncelikli olarak ND1000 model NanoDrop Spektrofotometre cihazı ile miktar ve saflık tayini yapılmıştır. 230, 260 ve 280 nm dalga boyları ile çalışan bu spektrofotometre 260 nm dalga boyuyla okutulan örnekteki DNA'nın absorbansını ölçmekte ve miktarını ng/µl cinsinden vermektedir. 230 nm dalga boyu ile örnekteki karbonhidrat, fenol, guanidin, glikojen absorbansı ölçülmektedir ve 260/230 nm oranının azalması, elde edilen DNA'nın saflığının azaldığını göstermektedir. 280 nm dalga boyu protein, fenol ve diğer ekstraksiyon bileşenlerinin veya kontaminantların absorbansını ölçmektedir. 260/280 nm oranı azaldıkça yine aynı şekilde saflığın azaldığı düşünülür. Her iki oran içinde 1.8-2.0 değeri DNA'nın saf olduğunu göstermektedir. 260/280 nm oranının 1.8-2.0 üzerinde olması herhangi bir sorunu işaret etmez iken 260/230 nm oranının yüksekliği kalibrasyon için kullanılan saf sudaki bir problemi işaret edebilmektedir (Matlock, 2015).

Elde edilen sonuçlara göre tek aşamalı EDTA inkübasyonu ile demineralize edilen ve fenol-kloroform yöntemi ile ekstrakte edilen örneklerden elde edilen DNA miktarı çok aşamalı yönteme göre oldukça yüksektir. Literatürde de geçtiği üzere demineralizasyon aşaması uzatıldıkça ve aşamaları arttırıldıkça DNA kaybı gerçekleşmektedir. Ayrıca tek aşamalı demineralizasyon ile elde edilen DNA'lar NanoDrop sonuçlarına göre saflık referans değerlerine çok daha yakın değerler verdiğinden daha saf DNA elde edildiği düşünülebilir.

Silika Jel ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilen örneklerin NanoDrop sonuçları DNA miktarı açısından diğer iki yönteme göre oldukça düşüktür. Bununla birlikte 260/280 nm oranı 1.8'in üzerinde olmasına karşın 260/230 nm oranı 0'a yakındır. Cihazın teknik dokümanları incelendiğinde bu değerin düşük olması karbonhidrat, fenol, guanidin, glikojen kirliliğini göstermektedir. Kullanılan yöntemde guanidin kullanıldığından değerin düşük olması, yöntemdeki yıkama aşamalarının

yetersiz kaldığını ve dolayısıyla son üründe guanidin birikiminin olduğunu düşündürmektedir.

Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonrasında tasarlanan yeni primer ile bütün örneklerin amelogenin gen bölgesi PCR ile çoğaltılmaya çalışılmıştır. Tek aşamalı EDTA inkübasyonu ile demineralize edilen ve fenol-kloroform yöntemi ile ekstrakte edilen 16 örneğin hepsinde aranan bölge çoğaltılabilmiştir. Buna karşın çok aşamalı EDTA inkübasyonu ile demineralize edilen ve fenol-kloroform yöntemi ile ekstrakte edilen 16 örneğin yalnızca 4'ünde aranan bölge çoğaltılabilmiştir. Bunun nedeni olarak çok aşamalı demineralizasyon yönteminin elde edilen DNA miktarını azalttığı ve aşamalar esnasında gerçekleşebilecek kontaminasyonun PCR'ı olumsuz etkilediği düşünülebilir.

Silika Jel ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilen örnekler NanoDrop sonuçlarına paralellik göstermiş ve ne yazık ki aranan bölgeler 16 örneğin hiçbirinde çoğaltılamamıştır. Silika Jel ekstraksiyonu yönteminde protokolde belirtilen basamakların aynen uygulanmasına karşın başarısız olmasının iki nedeni olabilir. Birinci olarak uygulayıcının tecrübeye bağlı olarak hata yapmış olması, ikinci olaraksa yöntemin hatalara karşı oldukça hassas olmasıdır. Her iki sebebin de benzer olması, yöntemi rutin olarak uygulamayan laboratuvarlar için zor olduğunu göstermektedir.

Yöntemler iş yükü, gereken deneyim, süre ve gereken malzeme bakımından karşılaştırıldığında fenol-kloroform yöntemi silika jel yöntemine göre daha uygulanabilir bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Antik DNA ve Adli DNA çalışmaları bilim dünyasında ilgi çekici oldukları kadar zorlayıcı çalışmalar olmuşlardır. İncelenen örneklerin doğası gereği her örnekte bir nevi bilimsel meydan okuma gerçekleşmektedir.

Bu çalışmamızda adli DNA ile benzer problemlere sahip bir alan olan antik DNA için kullanılmakta olan iki yöntem birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Bu yöntemlerden fenol-kloroform yöntemi aldığımız sonuçlara göre silika jel yöntemine nazaran çok daha başarılı bulunmuştur.

Tek aşamalı demineralizasyon ile Fenol-kloroform yöntemi uyguladığımız 16 örnekte de başarılı sonuçlar elde edilmiş buna karşın çok aşamalı demineralizasyon ile uyguladığımız Fenol-kloroform yöntemi ancak %25 oranda başarılı olabilmiştir. Tartışmada belirtildiği gibi demineralizasyon nedeni ile DNA miktarının daha düşük olması veya işlem esnasındaki olası bir kontaminasyon başarının düşmesine neden olabilir.

PCR inhibisyonunun düşünüldüğü durumlarda bunun giderilmesi amacıyla literatürde alınabilecek bazı önlemler bulunmaktadır. Bunlardan en kolayı mevcut DNA'nın seyreltilmesidir. Bu sayede PCR karışımına eklenen DNA'nın içerisindeki inhibitörler de seyrelecektir. Fakat düşük DNA miktarına sahip örneklerde seyreltme işlemi kalıp DNA'nın da seyrelmesine neden olacağından PCR'ın yine başarısız olmasına neden olabilir.

PCR inhibitörlerinden kurtulmanın ikinci yolu izole edilen mevcut aDNA'nın yeniden saflaştırma işleminden geçirilmesidir. DNA izolasyonunda hiçbir prosedür %100 verimlilik sağlamadığından bu işlem sırasında da belirli bir miktar DNA kaybı yaşanacaktır. Benzer şekilde DNA izolasyonu sırasında saflaştırma basamaklarının tekrarı artırılarak veya birden çok ve farklı saflaştırma yöntemleri kombine edilerek

inhibitörlerin uzaklaştırılması sağlanabilmektedir. Fakat aynı şekilde eklenen her yeni saflaştırma basamağı daha fazla DNA kaybına neden olmaktadır.

PCR karışımı hazırlanırken eklenen bazı bileşenler PCR'ın inhibitörlere karşı direncini arttırabilmektedir. DMSO, BSA gibi maddeler inhibitörlere karşı PCR'ı korurken aynı zamanda verimini de artırmaktadır. Literatürde bu maddelerin özellikle aDNA çalışmalarında sonucu dramatik bir şekilde değiştirdiği belirtilmektedir.

Son olarak inhibitörlere karşı dirençli olan DNA polimerazların kullanımı PCR inhibitörlerine karşı kullanıcıyı bir adım öne taşıyacaktır.

Silika jel yöntemi için yöntemin en baştan optimize edilerek basamakların kontrolden geçirilmesi ve hangi basamakta DNA kaybının yaşandığının bulunması gerekmektedir.

Çalışmamız ülkemizde her geçen gün daha fazla ilgi görmeye başlayan antik DNA alanında yol gösterici niteliktedir. Fakat çalışmamızın eksik kalan ve geliştirilebilecek yanları mevcuttur. Finansal ve zamansal yetersizlikler nedeniyle literatürde bulunan bütün teknikler ve çözüm yolları örnekler üzerinde denenememiştir. Bununla birlikte çalışmamız ileri araştırmalar için güzel bir başlangıç noktası oluşturmaktadır. İleri araştırmalarda özellikle her yöntem için farklı demineralizasyon teknikleri tek tek denenebilir, sonuç alınamayan DNA örnekleri farklı saflaştırma metotları ile saflaştırılabilir, PCR bileşenleri eklenerek PCR'ın çalışması için reaksiyon zorlanabilir. Ayrıca birden fazla primer denenerek ekstrakte edilen DNA fragmentlerinin uzunluğu tespit edilebilir. Yeni nesil sekans teknikleri kullanılarak çoğaltılan gen bölgelerinin dizileri oluşturulabilir, akrabalık ilişkileri araştırılabilir.

ÖZET

Antik Örneklerden DNA Eldesinde İki Temel Metodun Verimlilik ve PCR İnhibitörlerini Uzaklaştırma Kriterleri Açısından Kıyaslanması

Antik DNA çalışmalarında örneklerden DNA izolasyonu en önemli ve kısıtlayıcı aşamadır. Örneğin içinde bulunduğu ortam ve bu ortamda kaldığı süre, örneklerden elde edilecek DNA'nın kalitesi için belirleyicidir. Ayrıca farklı kemik örneklerinin DNA verimi açısından farklı sonuçlar verdiğini gösteren çalışmalar vardır. Literatürde femur kemiğinin yapısal özelliklerinden dolayı DNA eldesinde daha verimli olacağı yönünde bilgiler bulunmaktadır. Bu çalışma ile Belentepe kazısından elde edilen insan iskeletlerinin femur kemiklerinden yine literatürde verimliliği bakımından başarılı bulunan iki yöntem olan fenol-kloroform ve silika jel ekstraksiyon yöntemi ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Örneklerden elde edilen DNA'ların kalitesi spektrofotometrik yöntem ve PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler, yöntemler arasındaki DNA ekstraksiyon verimliliğini karşılaştırmamıza olanak sağlamış ve elde edilen örneklerdeki antik DNA'nın korunma oranları hakkında da bilgi vermiştir.

Anahtar Sözcükler: Antik DNA, DNA izolasyonu, Femur, Kontaminasyon, Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SUMMARY

The Comparison of Two Basic Methods of DNA Purification From Ancient Samples in Terms of Efficiency and Removal of PCR Inhibitors

DNA isolation from samples are the most important and restrictive stage of ancient DNA studies. The environment in which the sample is located and the time it remains in this environment are decisive factors for the quality of the DNA to be obtained from the samples. There are also studies showing that different bone samples give different results in terms of DNA yield. There are evidences in the literature that femur bone is more efficient in isolation of DNA due to its structural features. In this study, DNA isolation was performed by using phenol-chloroform and silica gel extraction methods, which are found to be successful in the literature, from the femur bones of human skeletons obtained from Belentepe excavation area. The quality of DNA obtained from the ancient samples was analyzed by spectrophotometric method and PCR amplification. The data obtained from this study allowed us to compare the efficiency of DNA extraction between the methods and gave information about the preservation of the ancient DNA in the obtained samples.

Keywords: Ancient DNA, Contamination, DNA isolation, Femur, Polymerase Chain Reaction

KAYNAKLAR

AASEN E, MEDRANO JF (1990). Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology (N Y),* **8**(12): 1279-1281

ABBASZADEGAN M, HUBER MS, GERBA CP, PEPPER IL (1993). Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol,* **59**(5): 1318-1324

ABU AL-SOUD W, RADSTROM P (2000). Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J Clin Microbiol,* **38**(12): 4463-4470

AKANE A, SEKI S, SHIONO H, NAKAMURA H, HASEGAWA M, KAGAWA M, MATSUBARA K, NAKAHORI Y, NAGAFUCHI S, NAKAGOME Y (1992). Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-Y homologous gene. *Forensic Sci Int,* **52**(2): 143-148

AL-SOUD WA, RADSTROM P (2001). Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol,* **39**(2): 485-493

APAK Mİ, DOĞAN Y (2017). Farklı Koşullarda Bulunan Antik İskelet Örneklerinden Dekontaminasyon Süreci ile İlgili Metodolojik Yaklaşım. *Antropoloji,* **34**: 31-47

BICKLEY J, SHORT JK, MCDOWELL DG, PARKES HC (1996). Polymerase chain reaction (PCR) detection of Listeria monocytogenes in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett Appl Microbiol,* **22**(2): 153-158

BIEMONT C (2010a). A brief history of the status of transposable elements: from junk DNA to major players in evolution. *Genetics,* **186**(4): 1085-1093

BIEMONT C (2010b). From genotype to phenotype. What do epigenetics and epigenomics tell us? *Heredity (Edinb),* **105**(1): 1-3

BROWN TA, BROWN KA (1994). Ancient DNA: using molecular biology to explore the past. *Bioessays,* **16**(10): 719-726

BURKARDT HJ (2000). Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin Chem Lab Med,* **38**(2): 87-91

CUI KH, WARNES GM, JEFFREY R, MATTHEWS CD (1994). Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification. *Lancet,* **343**(8889): 79-82

DAMGAARD PB, MARGARYAN A, SCHROEDER H, ORLANDO L, WILLERSLEV E, ALLENTOFT ME (2015). Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth. *Sci Rep,* **5**: 11184

DOOLITTLE WF (2013). Is junk DNA bunk? A critique of ENCODE. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **110**(14): 5294-5300

DOOLITTLE WF, FRASER P, GERSTEIN MB, GRAVELEY BR, HENIKOFF S, HUTTENHOWER C, OSHLACK A, PONTING CP, RINN JL, SCHATZ MC, ULE J, WEIGEL D, WEINSTOCK GM (2013). Sixty years of genome biology. *Genome Biol,* **14**(4): 113

EBENSPERGER C, STUDER R, EPPLEN JT (1989). Specific amplification of the ZFY gene to screen sex in man. *Hum Genet,* **82**(3): 289-290

ECKHART L, BACH J, BAN J, TSCHACHLER E (2000). Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. *Biochem Biophys Res Commun,* **271**(3): 726-730

FRIEDBERG EC (1995). Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair. *Trends Biochem Sci,* **20**(10): 381

GAMBA C, JONES ER, TEASDALE MD, MCLAUGHLIN RL, GONZALEZ-FORTES G, MATTIANGELI V, DOMBOROCZKI L, KOVARI I, PAP I, ANDERS A, WHITTLE A, DANI J, RACZKY P, HIGHAM TF, HOFREITER M, BRADLEY DG, PINHASI R (2014). Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nat Commun,* **5**: 5257

GILL P, JEFFREYS AJ, WERRETT DJ (1985). Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature,* **318**(6046): 577-579

GRAHAM EA (2007). DNA reviews: Ancient DNA. *Forensic Sci Med Pathol,* **3**(3): 221-225

GRIGORENKO AP, BORINSKAYA SA, YANKOVSKY NK, ROGAEV EI (2009). Achievements and peculiarities in studies of ancient DNA and DNA from complicated forensic specimens. *Acta Naturae,* **1**(3): 58-69

GRUBWIESER P, MUHLMANN R, BERGER B, NIEDERSTATTER H, PAVLIC M, PARSON W (2006). A new "miniSTR-multiplex" displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA. *Int J Legal Med,* **120**(2): 115-120

HAGELBERG E, CLEGG JB (1991). Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc Biol Sci,* **244**(1309): 45-50

HAGELBERG E, HOFREITER M, KEYSER C (2015). Introduction. Ancient DNA: the first three decades. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,* **370**(1660): 20130371

HIGUCHI R, BOWMAN B, FREIBERGER M, RYDER OA, WILSON AC (1984). DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature,* **312**(5991): 282-284

HOFREITER M, SERRE D, POINAR HN, KUCH M, PAABO S (2001). Ancient DNA. *Nat Rev Genet,* **2**(5): 353-359

HONDA K, HARIHARA S, NAKAMURA T, HIRAI M, MISAWA S (1990). [Sex identification by analysis of DNA extracted from hard tissues]. *Nihon Hoigaku Zasshi,* **44**(4): 293-301

HOSS M, PAABO S (1993). DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res,* **21**(16): 3913-3914

HUMMEL S (2003). Ancient DNA Typing - Methods, Strategies and Applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

HUMMEL S, HERRMANN B (1991). Y-chromosome-specific DNA amplified in ancient human bone. *Naturwissenschaften,* **78**(6): 266-267

İYRAS HM, DOĞAN Y (2015). Antik DNA Çalışmaları ve Karşılaşılan Sorunlar. *Antropoloji,* **30**: 53 - 60

JAKUBOWSKA J, MACIEJEWSKA A, PAWLOWSKI R (2012). Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation. *Int J Legal Med,* **126**(1): 173-178

JEFFREYS AJ, WILSON V, THEIN SL (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature,* **316**(6023): 76-79

JOBLING MA, GILL P (2004). Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet,* **5**(10): 739-751

JOHN ME (1992). An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res,* **20**(9): 2381

KATCHER HL, SCHWARTZ I (1994). A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol. *Biotechniques,* **16**(1): 84-92

KHAN G, KANGRO HO, COATES PJ, HEATH RB (1991). Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J Clin Pathol,* **44**(5): 360-365

LENEY MD (2016). Sampling Skeletal Remains for Ancient DNA (aDNA): A Measure of Success. *Historical Archaeology,* **40**(3): 31-49

MANNUCCI A, SULLIVAN KM, IVANOV PL, GILL P (1994). Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int J Legal Med,* **106**(4): 190-193

MISNER LM, HALVORSON AC, DREIER JL, UBELAKER DH, FORAN DR (2009). The correlation between skeletal weathering and DNA quality and quantity. *J Forensic Sci,* **54**(4): 822-828

NAKAHORI Y, HAMANO K, IWAYA M, NAKAGOME Y (1991). Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer. *Am J Med Genet,* **39**(4): 472-473

OPEL KL, CHUNG D, MCCORD BR (2010). A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci,* **55**(1): 25-33

PAABO S (1985). Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature,* **314**(6012): 644-645

PAABO S (1986). Molecular genetic investigations of ancient human remains. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol,* **51 Pt 1**: 441-446

PAABO S, POINAR H, SERRE D, JAENICKE-DESPRES V, HEBLER J, ROHLAND N, KUCH M, KRAUSE J, VIGILANT L, HOFREITER M (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet,* **38**: 645-679

POINAR H, KUCH M, MCDONALD G, MARTIN P, PAABO S (2003). Nuclear gene sequences from a late pleistocene sloth coprolite. *Curr Biol,* **13**(13): 1150-1152

POINAR HN (2003). The top 10 list: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples. *International Congress Series,* **2003**(1239): 575–579

PRINZ M, CARRACEDO A, MAYR WR, MORLING N, PARSONS TJ, SAJANTILA A, SCHEITHAUER R, SCHMITTER H, SCHNEIDER PM, INTERNATIONAL SOCIETY FOR FORENSIC G (2007). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci Int Genet,* **1**(1): 3-12

PRUVOST M, SCHWARZ R, CORREIA VB, CHAMPLOT S, BRAGUIER S, MOREL N, FERNANDEZ-JALVO Y, GRANGE T, GEIGL EM (2007). Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **104**(3): 739-744

ROHLAND N, HOFREITER M (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc,* **2**(7): 1756-1762

ROSSEN L, NORSKOV P, HOLMSTROM K, RASMUSSEN OF (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol,* **17**(1): 37-45

SATSANGI J, JEWELL DP, WELSH K, BUNCE M, BELL JI (1994). Effect of heparin on polymerase chain reaction. *Lancet,* **343**(8911): 1509-1510

SAULNIER P, ANDREMONT A (1992). Detection of genes in feces by booster polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol,* **30**(8): 2080-2083

SCHRADER C, SCHIELKE A, ELLERBROEK L, JOHNE R (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol,* **113**(5): 1014-1026

SHUTLER GG, GAGNON P, VERRET G, KALYN H, KORKOSH S, JOHNSTON E, HALVERSON J (1999). Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human-canine stains from a five year old case. *J Forensic Sci,* **44**(3): 623-626

TAMARIZ J, VOYNAROVSKA K, PRINZ M, CARAGINE T (2006). The application of ultraviolet irradiation to exogenous sources of DNA in plasticware and water for the amplification of low copy number DNA. *J Forensic Sci,* **51**(4): 790-794

THANGARAJ K, REDDY AG, SINGH L (2002). Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis? *Int J Legal Med,* **116**(2): 121-123

WAN CY, WILKINS TA (1994). A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (Gossypium hirsutum L.). *Anal Biochem,* **223**(1): 7-12

WESTEN AA, KRAAIJENBRINK T, ROBLES DE MEDINA EA, HARTEVELD J, WILLEMSE P, ZUNIGA SB, VAN DER GAAG KJ, WEILER NE, WARNAAR J, KAYSER M, SIJEN T, DE KNIJFF P (2014). Comparing six commercial autosomal STR kits in a large Dutch population sample. *Forensic Sci Int Genet,* **10**: 55-63

WEYANT RS, EDMONDS P, SWAMINATHAN B (1990). Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase. *Biotechniques,* **9**(3): 308-309

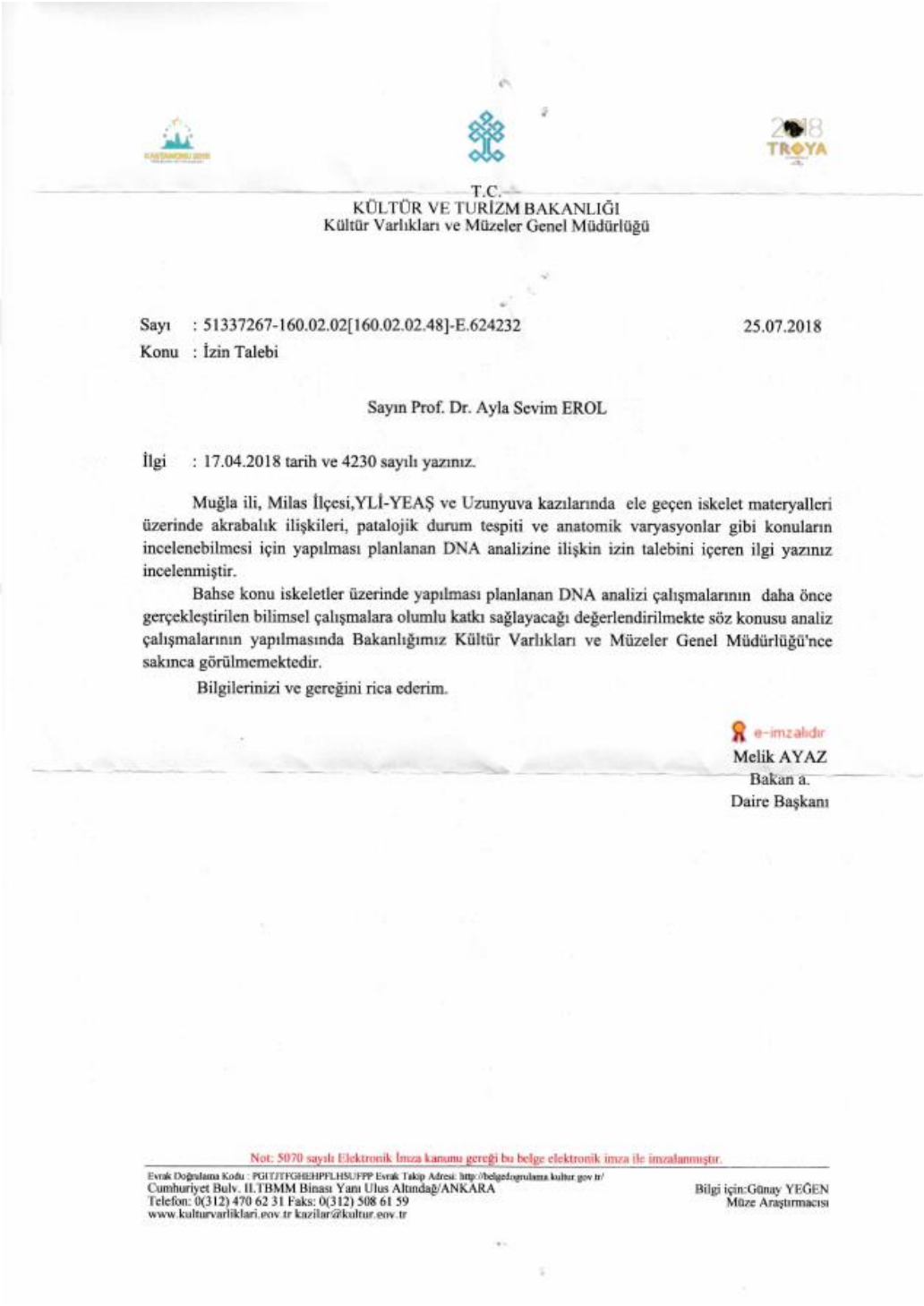
WILSON IG (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol,* **63**(10): 3741-3751

YEDIDAG EN, KOFFRON AJ, MUELLER KH, KAPLAN B, KAUFMAN DB, FRYER JP, STUART FP, ABECASSIS M (1996). Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus. *Transplantation,* **62**(2): 238-242

ZUCKERKANDL E (1997). Junk DNA and sectorial gene repression. *Gene,* **205**(1-2): 323-343

EKLER

EK-1. Kazı Materyali Kullanım İzni



T.C.
KÜLTÜR VE TURİZM BAKANLIĞI
Kültür Varlıkları ve Müzeler Genel Müdürlüğü

Sayı : 51337267-160.02.02[160.02.02.48]-E.624232 25.07.2018
Konu : İzin Talebi

Sayın Prof. Dr. Ayla Sevim EROL

İlgi : 17.04.2018 tarih ve 4230 sayılı yazınız.

Muğla ili, Milas İlçesi,YLİ-YEAŞ ve Uzunyuva kazılarında ele geçen iskelet materyalleri üzerinde akrabalık ilişkileri, patalojik durum tespiti ve anatomik varyasyonlar gibi konuların incelenebilmesi için yapılması planlanan DNA analizine ilişkin izin talebini içeren ilgi yazınız incelenmiştir.

Bahse konu iskeletler üzerinde yapılması planlanan DNA analizi çalışmalarının daha önce gerçekleştirilen bilimsel çalışmalara olumlu katkı sağlayacağı değerlendirilmekte söz konusu analiz çalışmalarının yapılmasında Bakanlığımız Kültür Varlıkları ve Müzeler Genel Müdürlüğü'nce sakınca görülmemektedir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır
Melik AYAZ
Bakan a.
Daire Başkanı

Not: 5070 sayılı Elektronik İmza kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrak Doğrulama Kodu : PGI7JTFGHEHPFLH5UFPP Evrak Takip Adresi: http://belgedogrulama.kultur.gov.tr/
Cumhuriyet Bulv. 11.TBMM Binası Yanı Ulus Altındağ/ANKARA
Telefon: 0(312) 470 62 31 Faks: 0(312) 508 61 59
www.kulturvarlikları.gov.tr kazilar@kultur.gov.tr

Bilgi için:Günay YEĞEN
Müze Araştırmacısı

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı: Kenan Can
Soyadı: TOK
Doğum yeri ve tarihi: Ankara, 1989
Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu: Bekar
Askerlik durumu: Yapıldı

II- Eğitimi

- ANKARA ÜNİVERSİTESİ ADLİ KİMYA VE ADLİ TOKSİKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI (2015- DEVAM)
- ANKARA ÜNİVERSİTESİ ADLİ BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI (2014-2019)
- ANKARA ÜNİVERSİTESİ ADLİ KİMYA VE ADLİ TOKSİKOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI (2013-2015)
- HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ BİYOLOJİ LİSANS PROGRAMI (2007-2012)

- Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

- Araştırma Görevlisi

IV- Mesleki Deneyimi

- Araştırma Görevlisi (2018-Devam)

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology (IATDMCT)

VI- Bilimsel İlgi Alanları

- Adli Bilimler
- Adli Biyoloji
- Adli Toksikoloji
- Analitik Toksikoloji

VII- Bilimsel Etkinlikleri

- Rapid Determination of Clozapine and Main Metabolite by HighPerformance Liquid Chromatography. TOK KENAN CAN, OZDEMIR FEZILE,

GÜMÜŞTAŞ MEHMET, SÜZEN HALİT SİNAN (2019). 1st INTERNATIONAL CONGRESS on ANALYTICAL and BIOANALYTICAL CHEMISTRY (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:4921320)

VIII- Diğer Bilgiler

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

- 1st INTERNATIONAL CONGRESS on ANALYTICAL and BIOANALYTICAL CHEMISTRY
- XX. EUROANALYSIS 2019