

T.C
AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER ANTROPOLOJİDE ANTİK DNA (aDNA)
ÇALIŞMALARI VE KONTAMİNASYON PROBLEMİ

Ali AKBABA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANTROPOLOJİ BÖLÜMÜ

KIRŞEHİR
ARALIK 2012

T.C
AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**MOLEKÜLER ANTROPOLOJİDE ANTİK DNA (aDNA)
ÇALIŞMALARI VE KONTAMİNASYON PROBLEMİ**

Ali AKBABA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANTROPOLOJİ BÖLÜMÜ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Erksin GÜLEÇ

KIRŞEHİR
ARALIK 2012

SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE,

Bu çalışma jürimiz tarafından Antropoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Erksin GÜLEÇ

Üye Doç. Dr. Şakir Önder ÖZKURT

Üye Yrd. Doç. Dr. Ahmet Cem ERKMAN

Üye.....(İmza)

Akademik Unvanı, Adı-Soyadı

Üye.....(İmza)

Akademik Unvanı, Adı-Soyadı

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

11/12/2012

(İmza Yeri)

Akademik Unvan, Adı-Soyadı

Enstitü Müdürü

Özet

Moleküler biyoloji ile korelasyon içerisinde gelişen moleküler antropoloji alt disiplini, modern insanın tarih öncesi yolculuğuna ışık tutmaktadır. 1900’lü yıllarda başlayan moleküler antropoloji çalışmaları 2003 yılında insan genom projesinin tamamlanmasıyla birlikte oldukça yaygın ve önemli bir çalışma alanı haline gelmiştir. Moleküler antropolojinin çalışma materyalini özellikle 1985’den itibaren (Polymerase Chain Reaction) PCR’ın keşfiyle birlikte DNA, mitokondriyal DNA (mtDNA) ve Y kromozomu molekülleri oluşturmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalar, genel olarak antik DNA (aDNA) çalışmaları olarak adlandırılmaktadır. Çalışmalarda kullanılan moleküllerin elde edilmesinde de yine moleküler biyolojik yöntem ve metotlar kullanılmaktadır. Ancak eski materyallerden DNA elde etmenin birçok zorluğu bulunmakla birlikte bu zorluklardan en önemlisini ‘‘kontaminasyon’’ problemi oluşturmaktadır. 1980’lerin ortalarından itibaren bu alanda karşılaşılan problemlerin giderilmesi için birçok çalışma yayınlanmıştır. Bu tez çalışmasında da moleküler antropolojinin kronolojik gelişimi ile birlikte bu alanda kullanılan DNA moleküllerini elde etmek için geliştirilen yöntem ve teknikler ile başta kontaminasyon olmak üzere, bu çalışmalarda karşılaşılan problemler incelenmektedir.

Anahtar kelimeler: Moleküler Antropoloji, aDNA, Kontaminasyon

Abstract

Sub-discipline of molecular anthropology developed in correlation with molecular biology, sheds light on prehistoric journey the modern human. Molecular anthropology studies began in 1900s, and it is quite common and has become a major area of work with the completion of the human genome project in 2003. Since 1985, molecular anthropology's study material especially consist of (Polymerase Chain Reaction) PCR's with discovery of DNA, mitochondrial DNA (mtDNA) and Y chromosome molecules. In general, studies in this area is called ancient DNA (aDNA) work. Molecular biological methods used to obtain again in the studies of molecules methods. However, there are many challenges to obtain DNA from old materials, and the most important of these challenges is the problem of 'contamination'. Since middle of the 1980s, many studies have been published to overcome the problems which are face in this area. In this thesis, the chronological development of molecular anthropology with DNA molecules that used in this field to succeed with developed methods and techniques, in particularly, contamination, the encountered problems analyzed in these studies.

Key words: Molecular Anthropology, aDNA, Contamination

Önsöz ve Teşekkür

Yaşadığımız 21. yüz yılın bilim ve teknoloji çağı olması ve teknolojinin her gün daha çok gelişmesi ve değişmesi, bilimde kullanılan yöntem ve tekniklerinde bu değişimden yararlanmasını kaçınılmaz kılmaktadır. Bilimin teknolojiyi geliştirdiği ve teknolojinin de bilimi güncellediği bu karşılıklı ilişkide antropoloji bilim dalı da 1950'lerden itibaren nasibini alarak kendini yenilemeyi başarmıştır. Kullanılan yöntem ve tekniklerin değişmesiyle birlikte yeni bilim dalları ortaya çıkmış, antropoloji de kendi devinimi içinde moleküler antropolojinin doğmasına ve gelişmesine imkân vermiştir. Ülkemizde de antropoloji bilim dalındaki bu yenilenme gelişerek devam etmektedir.

Gerek yüksek lisans sürecimde, gerekse de tez konumu uzun yıllardır ilgi alanım olan moleküler antropoloji de seçmemi olanak sağlayan ve çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve deneyimi ile her zaman bana destek olan ve yönlendiren tez danışmanım Prof. Dr. Erksin GÜLEÇ başta olmak üzere,

Çalışmalarım sırasında motivasyonumu hep canlı tutmamı sağlayan bölüm başkanım Yrd. Doç. Dr. Ahmet Cem ERKMAN'a, tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen hocalarım Doç. Dr. Mehmet SAĞIR, Doç. Dr. İsmail ÖZER, Doç. Dr. Cesur PEHLEVAN ve Dr. İsmail BAYKARA'ya, desteğini her daim yanımda hissettiğim hocam Arş. Gör. Serkan ŞAHİN'e ,

Sabırlarından ve desteklerinden dolayı ailem, dostlarım ve arkadaşlarıma,

En İçten Duygularıyla Teşekkür Ederim...

İçindekiler Dizini

Özet	i
Abstract	ii
Önsöz ve Teşekkür	iii
İçindekiler	iv
Tablolar Dizini	vii
Şekiller Dizini	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Giriş.....	1
BÖLÜM I.....	2
1. TARİHÇE	2
1.1. MOLEKÜLER ANTROPOLOJİNİN TARİHÇESİ.....	2
1.2. PCR'İN TANIMI VE TARİHÇESİ.....	12
BÖLÜM II.....	14
2. ANTİK DNA ÇALIŞMALARINDA DNA MOLEKÜLÜNÜN YAPISI VE KONTAMİNASYON PROBLEMİ.....	14
2.1. ANTİK DNA'NIN ELDE EDİLMESİNDE KULLANILAN KAYNAK BİYOLOJİK MOLEKÜLLER.....	14
2.1.1. Kemik.....	15
2.1.2. Diş	18
2.1.3. Yumuşak dokular	21
2.2. ANTİK DNA DİZİLEME ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN BİYOLOJİK MOLEKÜLLER.....	22
2.2.1. Mitokondrial DNA (mtDNA)	22
2.2.2. Y-Kromozomu	24

2.3. ANTİK DNA'NİN BOZULMASI VE KONTAMİNASYON.....	25
2.3.1. DNA'nın Bozulması	26
2.3.2. Kontaminasyon Problemi.....	29
2.3.2.1. Kontaminasyonun kaynağı.....	29
2.3.2.2. Laboratuvar öncesi kontaminasyon kontrolleri.....	31
2.3.2.3. aDNA laboratuvar içi kontaminasyon kontrolü	37
2.3.2.4. Negatif testler	41
2.3.3. aDNA Laboratuvarı Ve Özellikleri.....	43
BÖLÜM III	51
3. ANTİK DNA'NİN İZOLASYONU VE ANALİZİ.....	51
3.1. DNA'NİN İZOLASYONU	51
3.1.1. Antik Kemikten DNA İzole Etmede Kullanılan Yöntemler	52
3.1.1.1. Fenol kloroform yöntemi	52
3.1.1.2. Silika yöntemi	53
3.2. RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZLAR ARACILIĞI İLE DNA'NİN KESİLMESİ.....	54
3.3. JEL ELEKTROFOREZİ KULLANILARAK FARKLI BOYUTLARDA Kİ DNA'LARIN AYRILMASI	54
3.4. JELDE KALAN DNA'LARIN DESTEK MEMBRANA ALINMASI	54
3.5. DNA'NİN KOPYALANMASI VE ANALİZİ	54
3.5.1. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	55
3.5.2. Gerçek Zamanlı PCR (Real -Time PCR).....	58
3.5.3. Yeni Nesil DNA Dizileme (NGS)	60
3.5.4. RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism).....	61

3.5.5. STR (Short Tandem Repeat) Kısa Ardışık Tekrar Dizileri.....	63
BÖLÜM IV	65
4. ANTİK DNA ÇALIŞMALARININ KULLANIM ALANLARI	65
4.1. CİNSİYET TAYİNİ.....	67
4.2. SOY VE AKRABALIK İLİŞKİLERİ	68
4.3. NÜFUS HAREKETLERİ VE GÖÇLER.....	69
4.4. EVRİM VE FİLOGENETİK ARAŞTIRMALAR.....	72
4.5. HAYVAN VE BİTKİ KAYNAKLI ANTİK DNA ÇALIŞMALARI.....	77
Sonuç ve Öneriler.....	83
Kaynakça.....	86

Tablolar Dizini

Tablo 1: Modern Sentez Öncesi ve Sonrası Fiziksel Antropoloji.....	5
Tablo 2: Moleküler Biyolojide Yıllara Göre Önemli Çalışmalar	9
Tablo 3: DNA'nın Bozulmasında ve Korunmasında Etkili Olan Faktörler.....	27
Tablo 4: aDNA'nın Antropolojide Kullanım Alanları	66

Şekiller Dizini

Şekil 1: aDNA Çalışmalarında Kullanılan Kemik Örnekler	15
Şekil 2: Dişin Yapısı	18
Şekil 3: Tam olarak çıkmamış diş örneği.....	19
Şekil 4: Diş Pulpasından DNA Alınması.	20
Şekil 5: aDNA İçin Kullanılan Yumuşak Dokular	21
Şekil 6: mtDNA'nın Yapısı.....	23
Şekil 7: Antik Kalıntının Soğutucuda Depolanması	28
Şekil 8: Antik Kalıntının Toprakta Çıkarılması.....	32
Şekil 9: Toprakta Çıkan Kalıntının Folyoya Alınması	34
Şekil 10: aDNA Laboratuvarı	45
Şekil 11: Soyunma Odası	46
Şekil 12: Özel Kıyafetlerin Giyildiği Oda	46
Şekil 13: UV Işınlarla Örneklerin Temizlendiği Oda	47
Şekil 14: Örneklerin Hazırlandığı Oda	47
Şekil 15: Örneklerin Kesildiği Oda.....	48
Şekil 16: Örneklerin Toz Haline Getirilmesi	48
Şekil 17: Toz Haline Getirilen Örneklerin DNA Tüplerine Alınması	49
Şekil 18: aDNA'nın Kopyalandığı PCR Odası	49
Şekil 19: PCR Döngüsü	58
Şekil 20: Neanderthal genomlarının şempanze ve modern insan genomlarıyla karşılaştırılması.	75
Şekil 21: Denisova Mağarası	77
Şekil 22: DNA dizileri tespit edilmiş bazı soyu tükenmiş canlılar.	79

Şekil 23: Buz Adam Ötzi 81

Simgeler ve Kısaltmalar

Adna	: Antik DNA
bç	: Baz Çifti
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotit Tri Fosfat
EDTA	: Etien Diamin Tetra Asetik Asit
HV1/HVR1	: Hypervariable Region
Kb	: Kilo baz
ml	: Mililitre
mtDNA	: Mitokondrial DNA
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
STR	: Kısa Ardışık Tekrar Dizileri
TAq polimeraz	: Thermus aquaticus bakterisinden elde edilen polimeraz enzimi
UV	: Ultraviyole Işını
μ	: Mikro
yy	: Yüzyıl

Giriş

Moleküler antropoloji biliminin 1950'lerden itibaren şekillenmesiyle birlikte bu alanda kullanılacak yöntem ve tekniklerde, uygulama alanlarına göre belirmeye başlamıştır. Genetik bilimi alanında geliştirilen yöntemlerle paralel bir gelişim izleyen bu yöntemler günümüzde teknolojinin de gelişmesiyle birlikte çok önemli bir noktaya taşınmıştır. İnsanın evrim ve göç yollarının, soy ve akrabalık ilişkilerinin, cinsiyet tayinlerinin, hastalıkların kökeni ve yayılımının, soyu tükenmiş canlıların biyolojik özelliklerinin ve tarih öncesi yaşam çevrelerinin ve şartlarının belirlenmesinde önemli bir araç olarak kullanılan antik DNA çalışmaları moleküler antropolojinin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Özellikle yüksek teknolojik donanımların ve geniş alan bilgisinin gerekli olduğu antik DNA çalışmaları bir biri ile ilişkili birçok farklı safhadan oluşmaktadır. Bu safhalar en genel hatlarıyla antik kalıntının topraktan çıkartılması, antik örnekten DNA elde edilmesi, elde edilen bu DNA'nın çoğaltılması ve dizilimidir. Her bir safhanın kendine özgü zorlukları olmakla beraber bir antik DNA çalışmasının bütün süreçleri boyunca karşılaşılan en büyük sorun kontaminasyon olarak adlandırılan DNA'nın özgün olmaması yani güncel DNA verileriyle kirlenmesidir. Bu sorunun ortadan kaldırılması için kazı alanından başlanıp en son DNA'nın dizilimine kadar geçen safhalarda uygulanacak kriterler ve çalışmalarda kullanılan araç ve gereçler ile çalışmaların yapıldığı laboratuvarların özellikleri detaylı bir şekilde bu alandaki araştırmacılar tarafından "kontaminasyon önlemleri" adı altında belirtilmiştir.

Bu çalışmada literatür taraması yöntemiyle, antik DNA çalışmalarının önemi, uygulama alanları ve bu çalışmalarda kullanılan yöntemler ile kontaminasyon sorunu ve bu sorunun ortadan kaldırılması için alınması gereken önlemler incelenmiştir.

BÖLÜM I

1. TARİHÇE

1.1. MOLEKÜLER ANTROPOLOJİNİN TARİHÇESİ

Modern insanın ortaya çıkışı ve göç yolları geçmişten günümüze büyük merak konusu olmuştur. Bu konunun aydınlatılması için antropologlar Afrika'nın savanalarında tüm zor koşullara rağmen kazı çalışmalarını sürdürmektedirler. Bu araştırmacıların buldukları fosiller, iskeletler ve arkeolojik veriler bize atalarımızla ilgili en önemli ipuçlarını vermekte ve bu üç veri kaynağı 1980'li yıllara kadar insanın göç yollarıyla ilgili ortaya atılan bütün fikirlerin temelini oluşturmaktaydı. Fakat bazı çevreler bilinçli ve önyargılı olarak kazılarda elde edilen fosil ve iskeletlere dayanılarak ortaya atılan bu fikirlerin sağlıklı olamayacağını her defasında dile getirmişlerdir. Bu nedenle antropologların insan evrimi ve bu evrimleşme sürecindeki göç yolları üzerindeki hipotezleri her defasında bilim dünyasında tartışma yaratmıştır. Günümüzde moleküler genetik bilimindeki müthiş ilerlemeler sayesinde atalarımızın izi, geçmişten günümüze daha güvenilir bir şekilde izlenmektedir (Güleç, 2009).

1900'lü yıllarda başlayan bu genetik çalışmalarda, 1953 yılında James Watson ve Francis Crick tarafından keşfedilen DNA'nın çift sarmallı yapısı ve 1985'te Kary B. Mullis tarafından keşfedilen PCR yöntemi, moleküler genetik biliminin geleceği açısından çok büyük dönüm noktaları olmuştur.

Genetik bulgular geçmişte antropologların ileri sürdükleri fikirleri doğrulamakla birlikte, aynı zamanda bize yeni ipuçları da sağlamaktadır. Bu gelişmelere paralel olarak ilerleyen moleküler antropoloji bilimi de insanlık tarihiyle ilgili cevapsız kalan birçok soruya; fosil kayıtlar, iskeletler ve arkeolojik verilerle

birlikte cevap aramaya ve bilinmeyenleri aydınlatmaya devam etmektedir. Antropologlar bu çalışmalar ışığında farklı topluluklara ait mtDNA ve Y kromozomlarını karşılaştırarak göçler sırasında bu toplulukların yollarının nerede ve ne zaman ayrıldığı konusunda görece fikir sahibi olabiliyor (Güleç, 2009).

Moleküler antropoloji, bir disiplin olarak 1962 yılında kabul edilmesine rağmen bu alanın gelişmesine neden olan ve paleoantropolojinin insan evrimi çalışmalarına yeni anlayışlar getirmesini sağlayan tarihsel dönüşümü, yaklaşık olarak 1950’li yılların başlarında gerçekleştirmiştir. 1950 yılında gerçekleşen bu tarihsel dönüşümün mekanı ABD’de New York eyaletinde Cold Spring Harbor Laboratuvarında düzenlenen ve 9 gün süren “*Origin and Evolution of Man* (İnsanın Evrimi ve Kökeni)” temalı sempozyum ve bu değişimin mimarları da tüm katılımcıların katkısının yanı sıra biyolog Dobzhansky ile antropolog Sherwood Washburn olmuştur. Dünyanın en ileri gelen antropologlarının katıldığı bu sempozyuma, ülkemiz adına da önemli bir isim olan Muzaffer Süleyman Şenyürek’te katılmıştır. Bu sempozyumun antropologlar için önemi, Dobzhansky, Mayr, Simpson, Haldane, Stewart, Schultz ve Howells’in katkıları ile modern sentezi, yani Mendel ve popülasyon genetiğini öğrenmeleri olmuştur. Ernst Mayr’da 1950 Cold Spring Harbor sempozyumunda önemli bir rol üstlenmiş ve bu sempozyumu, modern evrimsel sentezin insan evrimi çalışmalarına entegre edildiği bir dönüm noktası olarak değerlendirmiştir.

Fiziksel antropolojinin (Paleoantropoloji) gelişmesini ve bu alandaki yeni gelişmelerle birlikte yaklaşık olarak on yıl sonra ortaya çıkacak olan moleküler antropolojinin doğmasını sağlayacak olan kırılma noktası fizik antropolojide uygulanan yöntem ve metotların yetersiz olduğunu belirten Simpson ve

Dobzhansky'nin, ortak bir kararla antropologların popülasyon düzeyinde evrimsel ilişkileri anlamakta ve yorumlamakta sorunlar yaşadığını ve ayrıca yeni tür isimlerini sistematik ve taksonominin isimlendirme kurallarına uymadan verdiklerini belirtmeleriyle olmuştur. 1800'lü yılların sonları ve 1900'lü yılların neredeyse ortalarına kadar antropologlar buldukları her yeni fosil buluntuya yeni bir tür ismi vermişlerdir. Dobzhansky, belirli bir zaman diliminde birden fazla hominid türünün aynı anda var olamayacağını belirtmiştir. Çünkü evrimsel değişimin birey düzeyinde değil popülasyon düzeyinde anlaşılabilceğini ileri sürerek, tek bireye ait hominid fosillerinin farklı popülasyonlar arası evrimsel ilişkileri çözemeyeceğini ve zira popülasyonlar arası morfolojik varyasyonların anlaşılabilmesi için daha fazla buluntuya ihtiyaç olduğunu belirtmiştir. Bu nedenle her yeni keşfe yeni bir tür ismi vermeyi sakıncalı bulmuştur. Ayrıca bir anatomist olan Adolph Schultz'un kuyruksuz büyük maymunların tür içi morfolojik varyasyonun derecesini anlamak için yaptığı çalışma sonucunda, tür içi varyasyonun popülasyonlar arası varyasyondan daha büyük olduğunu anlamıştır. Bu nedenle Dobzhansky de Mayr'ın önerisini takip ederek antropologlara, iki farklı popülasyonu salt bir bireyin morfolojik özelliklerini tanımlayarak ayıramayacaklarını anlatmıştır (Kaya, 2012).

George Gaylord Simpson ABD'de New York eyaletinde Cold Spring Harbor Laboratuvarında düzenlenen sempozyumda insan evrimi çalışmaları konusunda uzmanlaşmış dinleyicilere modern sistematığın prensiplerini öğreterek, antropologları kaba antropometrik ölçümlere dayalı cinsiyet ve yaşlandırma yöntemleri kullanarak, türler arasındaki morfolojik farklılıkları belirlemeye çalıştıkları için eleştirmiştir. Mayr, Dobzhansky ve Simpson antropologların; modern evrimsel sentezi, biyolojik tür konseptini ve taksonomik tür isimlendirme kurallarını

kabul etmelerini ve çalışmalarında kullanmalarının önemini altını çizerek, paleoantropoloji biliminin, modern evrimsel sentezin çatısı altında çalışmalarını sürdürmesi gerektiğini belirtmişlerdir. 1953 yılında Sherwood Washburn bu gelişmeleri bir makale içerisinde toparlamış ve “*New Physical Anthropology (Yeni Fiziksel Antropoloji)*” başlığı altında bu disiplini yeniden kimliklendirerek tanıtmıştır. Washburn manifestosunda Modern Sentez öncesi eski fiziksel antropoloji ve Modern Sentez sonrası yeni fiziksel antropoloji çalışmalarını Tablo 1’de gösterildiği gibi karşılaştırmıştır (Kaya, 2012).

Tablo 1: Modern Sentez Öncesi ve Sonrası Fiziksel Antropoloji

	<u>1950 Modern Sentez Öncesi Eski Fiziksel Antropoloji</u>	<u>1950 Modern Sentez Sonrası Yeni Fiziksel Antropoloji</u>
Amaç	Farklılıkların basit tanımı.	Sınıflandırma sadece çalışmanın küçük bir parçası, önemli olan nedenleri, süreçleri, değişimleri ve görünümleri fonksiyonel ve çok yönlü bağlamda anlayabilmek için gerekli ve doğru bilimsel sorulara sahip olabilmek.
Kuram	Görece az ve önemsiz.	Kuram çok önemli, çünkü bilimsel değişimin sürekliliğini yansıtıyor ve en önemlisi deneyler ve analizler ile sınanan hipotezin bir kuram içerisinde sunulabilmesi ya da o alanda mevcut bilimsel paradigmaya kuramsal katkı yapması o çalışmanın kalitesini yansıtıyor.
Metot	Sınıflandırma amaçlı basit morfometrik ölçümlere ve kaba tipolojik karşılaştırmalara dayalı analizler ile ilerleyen ve ağırlıklı olarak (%80) antropometrinin kullanıldığı yöntem.	Araştırmacının çalışmasını disiplinler arası çok yönlü ve çeşitli analizler ile desteklemiş olması beklenir. Antropometrik ölçüm çalışmanın ana metodu değil sadece % 20’si olabilir.
Yorum	Spekülasyon.	Çalışmanın omurgasını oluşturan hipotezin gerçekliği ve doğruluğunun kanıtların çok yönlü analizler ile sınındığı tartışma ve devamında araştırmacının ilgili konuda sonuca ulaşan yorumu.

1950 yılına kadar biyolojik antropolojinin kullandığı yöntem ve tekniklerin oldukça sınırlı olduğunu belirten Sherwood Washburn ve arkadaşları, bu tarihte

“Yeni Fiziksel Antropoloji”nin tanımını yeniden yaparak, biyolojik antropolojinin multidisipliner bir çalışma alanı olduğunu ve biyolojik antropoloji ile etkileşim içinde olan her bir disiplinin de birden çok yöntem ve analiz tekniği kullandığını belirterek antropolojinin de bu yöntem ve teknikleri kullanması gerektiğini dile getirmişlerdir (Kaya, 2012).

Biyolojide kullanılan yöntem ve tekniklerin (modern evrimsel sentez, sistematik ve taksonomi prensiplerinin gerektirdiği yöntemler) fizik antropolojide uygulanmasıyla birlikte de yeni bir disiplin olan moleküler antropoloji bilimi ortaya çıkmıştır.

Moleküler antropoloji terimi 1962’de Wenner Gren Vakfı’nca antropolojik bir araştırmayla ilgili olarak Avusturya’da Burg Wartenstein’de düzenlenen bir toplantıda, Kaliforniya, Linus Pauling Enstitüsü’nden Emile Zuckerkandl tarafından önerilmiştir. Zuckerkandl, Pauling’inde katkısıyla, genetik benzerliklere ve farklılıklara dayanarak türler arası filogenetik ilişkileri izlemeye yönelik bir yöntem geliştirmiştir. “ Sınıflandırma ve İnsanın Evrimi” konulu toplantıda Zuckerkandl, evrimsel ilişkiler bağlamında genetik moleküllerinde geleneksel anatomik yöntemler kadar, hatta kimi olaylarda onlardan daha da aydınlatıcı olabileceğini ısrarla savunmuştur. George Gaylord Simpson, Ernst Mayr, Theodosius Dobzhansky, Louis Leakey, Sherwood Washburn gibi ünlü antropologların hepsi bu toplantıya katılmışlardır (Lewin, 2000).

Moleküler antropoloji her ne kadar bir disiplin olarak 1962 de kabul edilmiş olsa da bu alanla ilgili çalışmalar 1900’lü yıllara kadar gitmektedir. 1900’lerde kimya profesörü George Henry Nuttal, Alman biyolog Paul Ehrlich ile ortaklaşa yürüttüğü bir çalışmada, türler arasındaki genetik ilişkilerin incelenmesine yönelik, bağışıklığa

dayalı bir yöntem geliştirmiştir. Bu çalışmasında, incelenen türlerin kanlarının bir dizi antiseruma tepkisini karşılaştırmış ve sonuç olarak, birbiriyle yakın akraba olan türlerin aynı antiseruma benzer biçimde tepki göstermeleri gerektiğini belirtmiştir. İnsanları da kapsamak üzere, yaptığı bir dizi deneyde belirli primatları incelemiştir. 28 Kasım 1901 de Londra Üniversitesi Tropikal Tıp bölümü'nde verdiği konferansta, ‘‘ Eğer kanın tepkime derecesini Anthropoidler arasındaki akrabalık derecesinin bir göstergesi sayarsak, Eskidünya insansı maymunlarının insana, Yenidünya insansı maymunlarından daha yakın olduğunu görürüz ki bu, Darwin'in kuramına tıpatıp uyar’’ demiştir. Nuttal'ın bu çalışmasından sonra 1962'de moleküler antropoloji ile ilgili çalışmalar Morris Goodman tarafından geliştirilerek devam ettirilmiştir. Goodman'nın kalıtım materyalinin özüne çok yaklaşan serum proteinlerini karşılaştırarak elde ettiği sonuçlarla birlikte moleküler antropoloji bilimi gerçek anlamıyla doğmuştur. Böylelikle insanın en yakın atası konusunda antropologlar arasında çoktandır süregelen şempanze mi yoksa goril mi tartışmaları da böylece açıklığa kavuşmuştur. Goodman, insanın atasının şempanze olmadığını, insanın yanı sıra şempanze ve gorillerinde ortak atasının, değişik bir tür kuyruksuz insansı maymun olduğunu ortaya koymuştur. Goodman insansı maymunlarla insanlardan alınan kan örneklerindeki protein albüminlerine antikor yanıtının gücüne dayalı yetkin bir sınaama yöntemi kullanımına dayanarak, insanın soyağacı biçimini kestirebilmişse de, evrimsel olayların zamanını gösteren bir takvim geliştirememiştir (Lewin, 2000).

Yıl 1967, Vincent Sarich ile Allan Wilson mutasyonların birikiminin düzenli ve kararlı bir hızla gerçekleşmesi esasından yola çıkarak ‘‘Moleküler Saat’’ fikrini geliştirmişler ve moleküler saati; insan, insansı maymun ilişkisine uyarlamışlardır.

Moleküler saat, mutasyonların DNA’da belirli zamanlarda gerçekleştiğini ve biriktiğini kabul ederek, bu birikimin milyonlarca yıl devam edebileceğini savunmaktadır. DNA’nın bir parçasının moleküler bir saat gibi davrandığı böyle durumlarda, soyların birbirinden ayrıldıkları zamanı tahmin etmek çok güçlü bir araç haline gelmektedir. İki biyokimyacı insanla insansı maymunların, zamanın antropologlarınca ileri sürüldüğü gibi, 15 milyon yıl ya da daha fazla bir zaman önce değil de 5 milyon yıl önce ayrıştıklarını ileri sürdükleri “İnsanın Evrimine İlişkin Bağımsız Zaman Göstergesi” başlıklı bildirimlerini Science’de yayımladıklarında, kendilerine yöneltilen eleştirilerden biri, mutasyon birikimi bağlamında sabit bir hız varsaymış oldukları savıydı. Sarich ve Wilson’un ileri sürdüğü tarih, on beş yıla yakın bir süre antropologlarca kabul görmemiştir. Ancak zamanla, bu tarihin doğruluğunu sınınamaya yönelik yeni genetik yöntemler geliştirilmiş ve sonuç olarak kullanılan yeni yöntemler de moleküler saatin çalıştığını, insan ile insansı maymunların atalarının bir birinden ayrılma tarihinin 7,5 milyon yıl önce olduğunu ortaya koymuştur. Bu tarih fosil kayıtlarla da örtüşmektedir (Lewin, 2000).

1987 yılında Allan Wilson, meslektaşları Rebecca Cann ve Mark Stoneking Ocak Nature dergisinde “ Mitokondriyal DNA ve İnsanın Evrimi” başlıklı bir inceleme yayınlamışlardır. Bu biyokimyacılara göre, yaşayan tüm insanların genetik özelliklerinin bir kısmı, yaklaşık 200 bin yıl önce Afrika da yaşamış bir dişi bireye dek izlenebilmekteydi. Böylece, bugünkü insanın kökenlerine ilişkin tartışmalarda önemli bir yer tutan mitokondriyal DNA (mtDNA) diğer adıyla da ‘Mitokondriyal Havva’ doğmuştur (Lewin, 2000).

Mitokondriyal DNA’nın bundan yaklaşık 200 bin yıl önce yaşamış olan bir dişi ataya kadar izlenmesi bütün dikkatleri üzerine çekmişti. Bu çalışma 121’i Afrika

kökenli olmak üzere toplamda 189 değişik coğrafik kökenli insanın mtDNA'sı incelenerek yapılmıştır. Sonuç itibariyle bütün insanların anneden kalıtılan mtDNA'ları yaklaşık olarak 166 ile 249 bin yıl önce Afrika'da yaşamış bir anneye kadar izlenebiliyordu. Bu da modern insanın Afrika kökenli olduğu hipotezini desteklemiştir (Vigilant ve ark.,1991).

Tablo 2 : Moleküler Biyolojide Yıllara Göre Önemli Çalışmalar

1900	George Henry Nuttal ve Paul Ehrlich	Türler arasındaki genetik ilişkilerin incelenmesine yönelik, bağımsızlığa dayalı bir yöntem geliştirilerek Eskidünya İnsansı Maymunlarının insana, Yenidünya İnsansı Maymunlarından daha yakın olduğunu göstermişlerdir.
1919	L. Hirszfild ve H. Hirszfild	İnsan kan gruplarının Mendel'in kalıtım kanunlarına uygunluğunu ve kan gruplarının genetik karakterlerini incelemişlerdir.
1945	Charles Davenport	Popülasyonlarda genetik farklılıklardan kaynaklanan diyet farklılıkları ve hareket örüntüsüne bakmıştır.
1949	J.B.S. Haldene	Orak hücreli aneminin sıtma ile ilişkisini coğrafi örüntüler çerçevesinde ilk kez açıklamıştır.
1953	K. Singer	Afrika'da orak hücreli anemin muhtemel lokus kökenini araştırmıştır.
1954	A.E. Mourant	"İnsan Kan Gruplarının Dağılımı" başlıklı, kan gruplarının dil ve genetik tarihiyle ilişkisine baktığı ve gen frekans verilerinin ilk kez prehistoryayı yazmakta kullanılan araştırmasıdır.
1960	L. Pauling ve E. Zuckerdandl	Farklı türlerdeki eş proteinlerde amino asit sekanslarını karşılaştırmışlardır.
1962	Morris Goodman	İnsanın atasının şempanze olmadığını, insanın yanı sıra şempanze ve gorillerinde ortak atasının, değişik bir tür kuyruksuz insansı maymun olduğunu ortaya koymuştur.
1963	Cavalli-Sforza ve Edwards	Yaşayan nüfuslardan alınan örneklerle klasik genetik veriler sayesinde insan evriminin yeniden canlandırmaya dair ilk çalışmasıdır.

Tablo 2'nin Devamı

1967	Vincent Sarich ve Allan Wilson	‘‘Moleküler Saat’’ fikrini geliştirerek insan ile insansı maymunların atalarının bir birinden ayrılma tarihinin 7,5 milyon yıl olduğunu ortaya koymuşlardır.
1971	L. L. Cavalli-Sforza ve A. W. F. Edwards	İlk kez genetik verilerin bir arkeolojik sorunda uygulanmasına dair, Avrupa'nın genetik tarihini açıklamaya çalışmışlardır.
1973	L.L. Cavalli-Sforza ve arkeolog A.J. Ammerman	Nüfus yayılımı ve ilerleme dalgası ile ilgili çalışmışlardır.
1981	S. Anderson ve arkadaşları	Cambridge Reference Sequence (CRS) olarak da ifade edilecek, sekansların rakamsal olarak ifade edildiği bir sistem geliştirmişlerdir.
1984	Higuchi ve Wilson	140 yıllık, soyu tükenmiş quagga derisinden aldıkları örnekten DNA izole edebilmeleri mümkün olmuştur.
1985	Svante Paabo	Mısır'da 23 farklı mumyadan alınan örnek arasından birinde antik DNA ve bir <i>Neanderthal</i> türüne ait mitokondriyal DNA'nın 380 baz çifti elde edilmiştir.
1987	Allan Wilson, meslektaşları Rebecca Cann ve Mark Stoneking	‘‘ Mitokondriyal DNA ve İnsanın Evrimi’’ isimli çalışmalarıyla <i>Homo sapienslerin</i> yaklaşık olarak bundan 200 bin yıl önce Afrika'da ortaya çıktıklarını göstermişlerdir.
1988	Wilson ve Paabo'nun içinde bulunduğu bir ekip	PCR tekniği ile 7000 yıllık bir beyin örneğinden aDNA elde edilmiştir.
2000	Peter Underhill ve Peter Oefner	Y-kromozomlarını ilk kez aDNA çalışmalarında kullanmışlardır.

Moleküler biyolojinin gelişmesiyle birlikte modern DNA ve özellikle mtDNA, insan atalarının göç yollarının ve tarih öncesine ait genetik bilgilerinin anlaşılmasında günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu genetik çalışmalardan önce elde edilen bilgiler sadece fosil kayıtlara ve arkeolojik verilere dayandığından yanıltıcı olabiliyordu. Moleküler genetik biliminin gelişmesiyle elde edilen DNA ve

özellikle son on yılda ki mtDNA verilerinin arkeolojik ve paleoklimatolojik verilerle birleştirilmesi, insan atalarının tarih öncesi göçleri ve nüfus dağılımlarıyla ilgili tutarlı bilgiler vermektedir (Forster, 2004).

2000 yılından sonra moleküler antropolojide aDNA ile ilgili, özellikle insanın evrimini konu alan çalışmalar oldukça artmış ve bilim dünyasının en popüler çalışmaları haline gelmiştir.

Antik DNA terimi ölü bir vücuttan ya da eski iskelet kalıntılardan elde edilen DNA anlamına gelir ve antik DNA çalışmalarının bütün süreçlerini içine alan genel bir terimdir (Rollo, 1999). Antik DNA tarihi Higuchi ve ark. tarafından 1984 yılında moleküler klonlama yoluyla, quagga olarak bilinen bir zebra türüne ait (*Equus quagga quagga*, Güney Afrika yaşamış ve 19.yy'da yok olmuş bir zebra türüdür) müze örneğinden DNA'nın elde edilmesi ve dizilmesiyle başlamıştır. Bu keşif moleküler biyoloji alanında bir devrimdi çünkü uzak geçmişteki bir organizmadan DNA'nın alınabileceğinin mümkün olduğunu göstermiştir. aDNA alanındaki en ilginç başarılarından biri Svante Paabo ve ekibi tarafından 1985'de gerçekleştirilen bir *Neanderthal* türüne ait mitokondriyal DNA'nın 380 baz çiftinin elde edilmesiydi. aDNA araştırmalarındaki bu gelişmeler yine 1985 yılında K. Mullis tarafından geliştirilen Polymerase Chain Reaction (PCR) keşfiyle büyük bir sıçrama yaşayacaktır. Bu yöntem çok kısa bir sürede özel bir DNA dizisinin binlerce hatta milyonlarca kopyasını üretebilmektedir (Gigli, 2011).

1985 yılında PCR'in keşfiyle birlikte aDNA çalışmaları, daha geniş bir araştırmacı topluluğu için, son yirmi yılda çok yönlü ve erişilebilir bir hale gelmiştir. Antik DNA analizleri arkeolog ve antropologların geçmişi çözümlmek amacıyla yaptıkları çalışmalar için yepyeni bir yöntem sağlamaktadır. Bu çalışmalar belli başlı

bazı arkeolojik ve antropolojik sorulara cevap getirmesi açısından önem kazanmıştır. Bu sorular arasında insan evrimi ve göç yolları, insana özgü genetik ve enfeksiyon hastalıklarının belirlenmesi, evcilleştirilen hayvan ve bitki türlerinin tespiti gibi çok önemli konular yer almaktadır (Yang ve Watt, 2005).

aDNA çalışmalarındaki son teknolojik gelişmeler insanlık tarihi ile ilgili araştırmalara yeni bir boyut kazandırmıştır. Kemik kalıntıları ve taş aletlerin incelenmesinin yanı sıra atalarımızın DNA'larının analizlerinin yapılması da bugün genetik bilimindeki gelişmelerle birlikte mümkün olmuştur. Bununla birlikte genellikle mtDNA'yı temel alarak gerçekleştirilen; quagga, mamut ve mağara ayısı gibi çeşitli aDNA çalışmaları, yok olmuş türlerin filogenetik ilişkilerini ortaya koymaktadır. Bu ve benzeri diğer çalışmalar son buzul çağdan geriye giderek yok olmuş hayvan türlerinin nüfus tarihlerinin yeniden oluşturulmasının mümkün olduğunu göstermiştir (Hofreiter ve ark. 2001; Higuchi ve ark., 1984; Gignac, 2011; Hanni ve ark., 1994).

1.2. PCR'İN TANIMI VE TARİHÇESİ

PCR, genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinde seçilmiş, bir veya birden fazla bölgenin, kimyasal olarak sentezlenmiş olan oligonükleotid primerler ve saflaştırılarak elde edilmiş olan TAq polimeraz enzimleri kullanılarak bir otomatik thermocycle sistem yardımıyla laboratuvar şartları altında çoğaltılması metodudur. DNA'nın kopyalanması ya da çoğaltılması (amplifikasyon) prensibi olarak tanımlanan PCR ilk kez 1974'te kimyasal gen sentezine bir alternatif olarak Panet ve Khorana tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntem adını, 1985'te tek kopya genlerinin çoğaltılmasını tanımlayan, K. Mullis ve arkadaşlarından almıştır. PCR ilk defa 1985 yılında orak hücre anemisinin teşhisi amacıyla geliştirilmiş ve kullanılmış bir

tekniktir. 1988 yılında *Thermus aquaticus* adlı bakteriden yüksek sıcaklıklara dayanıklı DNA polimeraz enziminin izole edilmesi ve bu enzimin DNA amplifikasyonu için kullanıma sunulması, PCR uygulama alanlarını genişletmiştir. Daha sonraki yıllarda çeşitli amaçlarla kullanılan bu metot sayesinde tıp, veterinerlik, biyoloji ve genetik ile ilgili bilim dallarında çok sayıda yeni buluşlar ve gelişmeler olmuştur. 1980'li yılların ortalarında geliştirilmesinin ardından, temel moleküler biyolojik araştırmalar da ve birçok hastalığın DNA temeline dayalı tanısı için de klinik tıpta hızlı bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. PCR ile insan genomik DNA'sı gibi karmaşık DNA kalıplarından, çok özel DNA parçalarının sentezinin birkaç saat içinde gerçekleştirilebilir hale gelmesi, bu teknolojinin yaygınlaşmasında başlıca neden olmuştur (Devrim ve Kaya, 2004; Temizkan, 2008).

PCR keşfiyle birlikte aDNA çalışmalarıyla ilgili yayınların listesi katlanarak artmıştır. Bazı dergiler milyonlarca yıl yaşında olan örneklerden başarılı bir şekilde DNA elde edilebileceğini ve elde edilen DNA'nın sıralanabileceğini belirten aDNA ile ilgili makaleler yayınlamaya başlamıştır. Bu makalelerde 80 milyon yıl öncesine tarihlenen dinazor kemiklerinden elde edilen DNA, miyosen bitkilerine ait DNA ve kehribar içinde korunmuş DNA gibi milyonlarca yıl yaşındaki numunelerin olduğu da iddia edilmiştir. Daha sonra moleküler genetik alanındaki gelişmelerle birlikte ortaya çıkan sayısız teknik sorunlar nedeniyle, bütün bu sıra dışı keşiflerin yanlış olduğu ortaya çıkmış ve bu çalışmalar ağır bir şekilde eleştirilmiştir (Gigli, 2011).

BÖLÜM II

2. ANTİK DNA ÇALIŞMALARINDA DNA MOLEKÜLÜNÜN YAPISI VE KONTAMİNASYON PROBLEMİ

2.1. ANTİK DNA'NIN ELDE EDİLMESİNDE KULLANILAN KAYNAK BİYOLOJİK MOLEKÜLLER

Antik DNA çeşitli organik kalıntılarda bulunabilir. DNA'nın en iyi bilinen kaynakları fosil ya da antik organizmaların yumuşak dokuları, dişleri ve kemikleridir; fakat dışkı gibi daha az belirgin kaynaklarda diğerleriyle eşit oranda önemli bir DNA kaynağı olabilir. Bu tür maddeler, çeşitli yerlerde muhafaza edilebilir. aDNA çalışmalarında kullanılacak malzemelerin, çalışmanın en başından itibaren bu iş için tahsis edilmesi çalışmanın güvenilirliği için çok büyük avantajlar sağlar. Bu gibi durumlarda çalışılan malzeme kolayca kontrol edilebilir ve aDNA çalışmalarında sıklıkla karşılaşılan kontaminasyon problemi azaltılmış olur.

aDNA analizi için antik kalıntıları seçerken özgün DNA'nın korunması gerektiğinin farkında olunmalıdır. Genellikle, antik kalıntılar, son on bin yıl içinden bugüne kadar antik DNA analizi için ciddi bir şekilde dikkate alınmayı hak ederler. Arktik ve Sub-kutup alanları gibi bazı soğuk bölgelerde, DNA analizi için gerekli olan numuneler çok daha eski olabilir. Bunun nedeni de bu ortamlarda ki sıcaklığın düşük olmasıdır. aDNA analizleri için numuneler seçilirken diş, kortikal kemik veya süngerimsi kemik gibi morfolojik olarak iyi korunmuş numunelerden biri seçilmelidir. Kemik (1-2 gr) veya bir dişin küçük bir miktarı bir aDNA çalışması için genellikle yeterlidir. Tekrarlanabilirlik testleri için, numuneler (kemik ya da diş) arasında ikinci bir dizi de elde edilmelidir (Yang ve Watt, 2005).

Bazılarının diğerlerinden daha başarılı olmasıyla birlikte, biyolojik kökenli herhangi bir madde, aDNA elde etmek için potansiyel bir adaydır. Özellikle insanla ilgili çalışmalarda kullanılan aDNA kaynakları kemikler, dişler ve yumuşak dokulardır.

2.1.1. Kemik

Şekil 1: aDNA Çalışmalarında Kullanılan Kemik Örnekler



Kemik genellikle potansiyel bir aDNA kaynağı olarak kabul edilir çünkü; hidroksiapatit DNA'nın bozulmasını yavaşlatır. Hidroksiapatit, dişlerin mine ve dentin tabakası ve kemikte bulunan, kimyasal formülü $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ olan kalsiyum tuzudur. Biyoaktif yapıda bir biyomateryaldir. Tatsız ve kokusuzdur. Organik çözücülerde çözünmez. Asit çözücüler hariç inorganik çözücülerde de çözünmez. Hidroksil iyonlarıyla (asit) yapı taşlarına ayrışabilir. Ekstraksiyon ve amplifikasyonun başarısı doku tipinden bağımsız görünmesine rağmen deneysel sonuçlar kemikte elde edilen DNA verimliliğinin yumuşak dokudan elde edilenden daha fazla olduğunu desteklemektedir. Hagelberg ve arkadaşları (1991) kullanılacak örneğin yaşını da dikkate alarak DNA'nın elde edilmesi ile kemik örneklerin mikroskobik morfolojilerinin korunması arasında bir korelasyon görmüşlerdir.

Çünkü örneğin bütününe kötü korunması, mikroskobik parçalardaki korunmanın da kötü olduğunu her zaman göstermez ve her antik örnek verimli bir aDNA kaynağı olabilir (Paabo ve ark., 2004).

İskelet doku küçük kemiklerden parçacıklar alınarak ya da uzun kemiklerden sondaj veya kesit alınarak çeşitli şekillerde kullanılabilir. İskelet elamanları kullanılırken bunlardan lezyonsuz olanlar seçilmelidir; çünkü lezyonlar kontaminasyon için ciddi bir kaynak oluştururlar. aDNA çalışmalarında hem birey başına düşen sayılarının fazla olması hem de morfolojik ve paleopatolojik önemlerinin diğer kemiklere oranla daha az olması nedeniyle küçük parçalı kaburga örnekleri tercih edilmelidir. Bununla birlikte güvenilirlikleri tartışılmasına rağmen kaburga gibi süngerimsi dokulardan DNA elde edilmesi kompakt dokulardan on ya da yirmi kat daha verimlidir (O'Rourke, 2000).

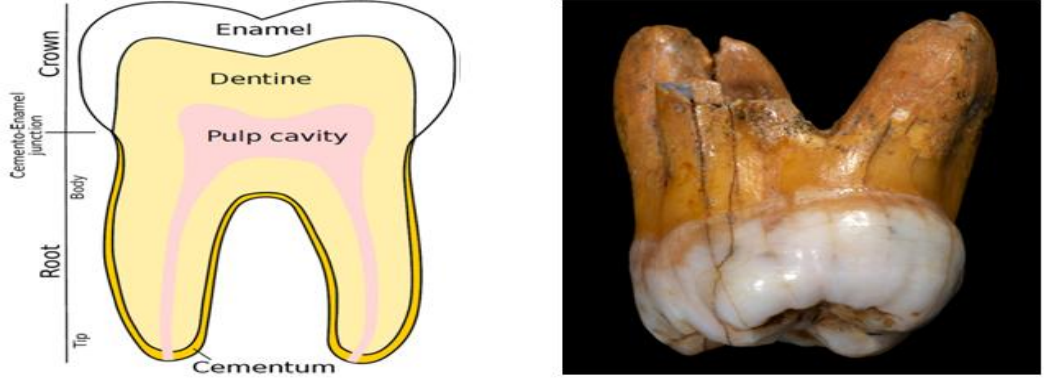
Küçük kemikler ya da kemik parçaları mevcut olduğunda büyük kemikleri aDNA çalışmaları için tekrardan kesmeye gerek yoktur. Bu kemiklerden de aDNA laboratuvarı için kullanılmak üzere yeteri kadar numune alındıktan sonra geriye kalan kısmı geri iade edilebilir. Bir kemiğin daha küçük parçalara kesilmesi gerekiyorsa süngerimsi kemik doku üzerindeki kortikal kemik doku, kesmek için seçilmelidir; çünkü kortikal kemik daha az gözenekli ve dolayısıyla da kontaminasyon için daha az hassastır. Kortikal kemiklerin yoğun dokusunda, antik DNA analizi için gerekli olan antik DNA moleküllerinden daha çok mevcuttur ve kortikal kemiklerin yoğun dokusu DNA için çok daha korunaklı bir ortam sağlar (Yang ve Watt, 2005).

Korunmuş sert iskelet malzemedeki genetik materyal elde edilmesi, antik DNA, arkeoloji ve adli bilimlerin önemli bir parçasıdır. Ancak farklı dokulardaki DNA'nın göreceli yoğunluğu ile DNA elde edilmesinde kullanılan yöntemler ve

çevresel etkilerin DNA'nın bozulması ve parçalanması üzerindeki rollerinin oranı yeterince anlaşılmamaktadır. Adler ve arkadaşları 2006 yılında "Fosil kemik ve dişlerden DNA elde edilmesi ve çoğaltılması" adıyla yayınladıkları çalışmalarında, 42 antik insan ve toynaklı fosillerinden PCR ile elde ettikleri DNA'ların parça uzunluklarına bakarak farklı sertlik ve yumuşaklıktaki dokuların mitokondriyal yoğunluklarını incelemişlerdir. Kemiklerde DNA elde etmek için farklı iki yöntem kullanmışlardır. Bu yöntemlerden birincisi fosil kemiğin, yüksek hızlı bir matkapla delinerek PCR için gerekli DNA'nın elde edilmesi, ikincisi de kemiğin öğütülerek, gerekli kemik tozunun elde edilmesidir. Yapılan çalışma sonucunda birinci yöntemle elde edilen DNA yoğunluğunun ikinci yöntemle elde edilenden DNA yoğunluğundan otuz kat daha az olduğunu gözlemlenmiştir. Araştırmacılar yüksek hızlı matkap ile delme yönteminin verimsizliğinin nedenini, delme esnasında matkabın ısınmasına bağlamaktadırlar. Daha sonra düşük hızlı matkaplarla yapılan delme işlemlerinde bu sorunun ortadan kalktığını gözlemlenmiştir. Sonuç olarak belirli bir orandaki ısınma DNA'nın yok olmasına neden olmakla birlikte çalışmanın sonucunun hatalı olmasına da neden olabilmektedir (Adler ve ark., 2011). Bu çalışmada da anlaşıldığı üzere aDNA çalışmalarında, DNA elde etmek için kullanılan antik kalıntıların niteliği kadar bu süreçte uygulanan yöntemlerde araştırmanın sonucunu etkilemektedir.

2.1.2. Diş

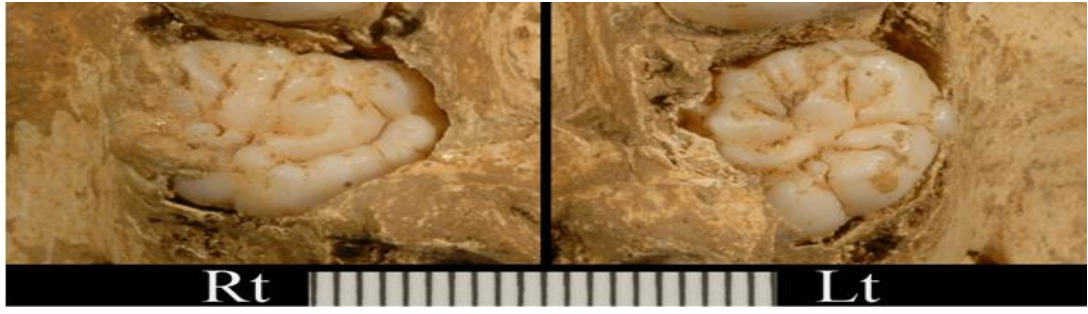
Şekil 2: Dişin Yapısı



İnsan vücudundaki en dayanıklı doku olan dişler yapıları gereği arkeolojik kazılardan elde edilebilecek insan yerleşimi ile ilgili ele geçirilen tek delil olabilirler. Dental kalıntılar sadece fiziksel antropologların değil ayrıca bu konuda çalışan diğer tüm bilim adamlarını da ilgilendirmektedir. aDNA kaynağı olarak dişlerin kullanılması, dişlerin sayılarının fazlalığı nedeniyle bir avantaj sağlamaktadır. Dişler mine dokusu sayesinde vücudun en sert ve dayanıklı dokusudur. Bu da dişleri DNA'nın bozulmasına sebep olan nem, yüksek ısı, mantar ve bakteriyel bozulma gibi koşullara karşı oldukça dayanıklı kılar (Özcan, 2010).

aDNA çalışmasında kullanılacak olan dişin çürüksüz olması çok önemlidir; çünkü diş çürüğü aDNA'nın elde edildiği pulpaya kadar girdiği için DNA'nın kontaminasyona uğramasına izin vermektedir. Bu durumda kontaminasyon riskini azaltmak için henüz tam olarak büyümesini tamamlamamış bir diş kullanılabilir.

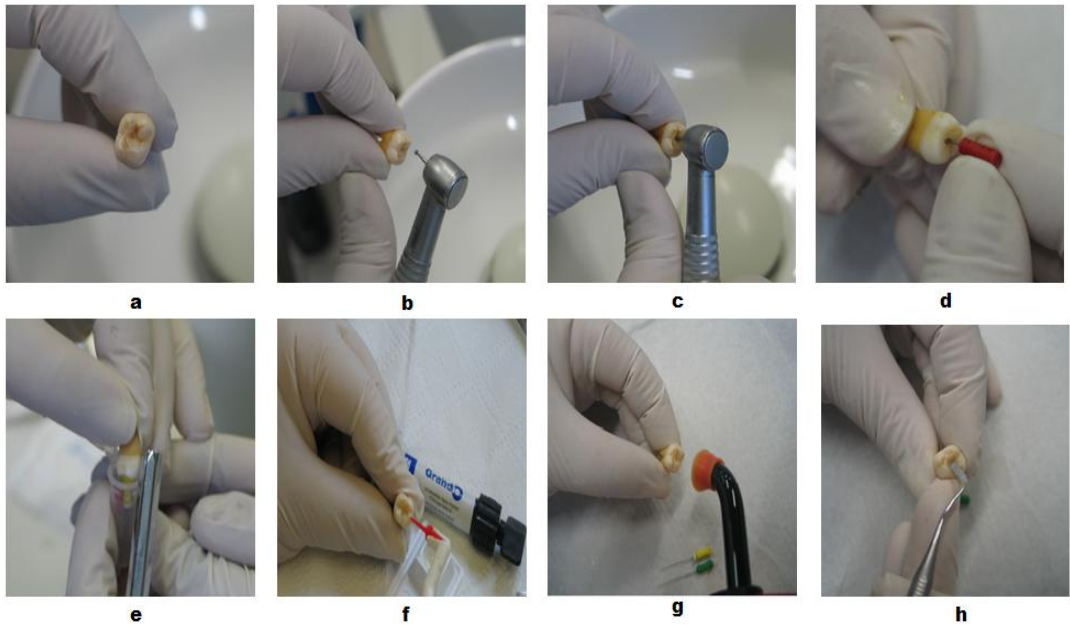
Şekil 3: Tam olarak çıkmamış diş örneği (Trinkaus, 2010)



Dişten aDNA elde edebilmek için yaygın olarak üç metot kullanılır. Bunlardan birincisi dişin tamamen toz haline getirilmesi, ikincisi dişin pulpa boşluğunun çıkarılması için dişten kesit alınması, üçüncüsü de endodontik yöntemlerle pulpaya inilmesidir. Amplifikasyonun başarısında renklerdeki farklılığın hiçbir önemi olmamasına rağmen, diş toz haline getirilirken beyaz ve kahverengi olmak üzere iki renk diş tozu elde edilir. DNA elde etmek için dişin tamamının toz haline getirilmesi DNA'nın yapısına daha fazla zarar vermesine rağmen DNA'nın elde edilmesi açısından, pulpa boşluğundan kesit alınması yönteminden daha verimlidir. İkinci metot dişin pulpasından örnek alındıktan sonra dişin yeniden yapıştırılarak eski haline getirilmesine izin verir ve sonuç olarak da kullanılacak antik malzeme üzerinde daha az bir yıkıcı etkiye sahiptir. Üçüncü yöntem ise endodontik yöntemlerle diş kökünün kanalına yani pulpaya inilmesidir (O'Rourke, 2000). Pulpa, dişin canlı dokusu olarak çekirdek DNA'sı çalışmaları için uygundur. Pulpa içerisindeki hücrelerden elde edilen DNA, STR analizlerine imkân sağlar. Pulpa aracılığı ile gerçekleştirilecek bir DNA analizi için dişin öz odasında bulunan pulpanın çıkartılması yeterlidir. Bunu yaparken de öncelikle dişler dış ortamdan kaynaklanan tozlardan hava filtresi aracılığıyla temizlenir ve diş üzerinde kalan küçük harici partiküller hassas bir matkap veya kazıyıcı aracılığıyla ortadan kaldırılır. Dişin pulpasına girebilmek için genellikle dişin tacı ve kökü arasındaki

bölgeye küçük bir delik açılır. Bu deliği açarken oluşan ve dişin dış yüzeyinin temizlenmesinden kaynaklanan toz ve parçalar iyice temizlenir. Daha sonra alkol veya ucu yakılarak iyice temizlenmiş küçük çaplı bir matkap ucu, delik açılacak bölge üzerine yerleştirilerek belirlenmiş bölge delinir. Burada ortaya çıkan diş tozları yine temiz ve yeni malzemeler kullanılarak DNA tüplerine alınır (Özcan, 2010; Woodward, 1994). Dental kalıntılardan antik DNA analizinin gerçekleştirilebilmesi için dişe zarar veren parçalama ve kesme yöntemlerinden birinin kullanılması diğer araştırmacılar için önemli bilgiler sağlama olasılığı olan taç ve kök morfolojisine zarar verir. Bu zararı en aza indirmenin yollarından biri ters kök kanal sistemi uygulamasıdır. Ters kök kanal sistemi kullanıldığında, dişin morfolojik yapısına herhangi bir zarar verilmeksizin dentince zengin bir örnek alınması mümkün olacaktır. Ters kök kanal sistemi aracılığı ile örnek alınması diş örnekleri üzerinde yapılan moleküler genetik çalışmaların diş morfolojisinden faydalanılarak elde edilebilecek verilere zarar vermesini engeller (Özcan, 2010).

Şekil 4: Diş Pulpasından DNA Alınması (Özcan, 2010).



- a. Dişten pulpaya inip diş özünün çıkartılması işleminden önce dişin bazı kimyasallar ve UV ışınlarıyla sanitize edilmesi
- b. Ön hazırlığı biten diş örnekleri üzerinde giriş boşluğunun hazırlanması
- c. Dişin pulpaya giden öz odasının açılması
- d. Açılan öz odasından pulpaya inilip diş özünün çıkartılması
- e. Antik diş örneklerinde diş özünün DNA tüplerine alınması
- f. Mikro yüzey oluşturulan dişin yüzeyine bağlantı malzemesinin uygulanması
- g. Halojen ışık ile bağlantının sağlanması
- h. Dişin pulpa boşluğunun kompozit dolgu malzemesi ile doldurulması ve dişe eski şeklinin verilmesi (Özcan, 2010).

2.1.3. Yumuşak dokular

Şekil 5: aDNA İçin Kullanılan Yumuşak Dokular (Ötzi)



Eğer yumuşak doku aDNA için kaynak materyal olarak kullanılacaksa yüzeyle teması olmayan malzemeler seçilmelidir. Bu durum kontaminasyon riskini azaltmaktadır. Kurumuş haldeki yumuşak doku, normal yumuşak dokuyla karşılaştırıldığında aDNA için muhtemel en iyi kaynaktır; çünkü kuruluk dokudaki sıvı oranını düşürerek dokuyu hidrolitik (suyun ya da nemin neden olduğu zararlar)

zararlardan koruyabilir. Bununla birlikte özellikle adli olaylarda yaygın olarak kullanılan saç veya kıllarda DNA için alternatif kaynaklar oluşturmaktadır (O'Rourke, 2000).

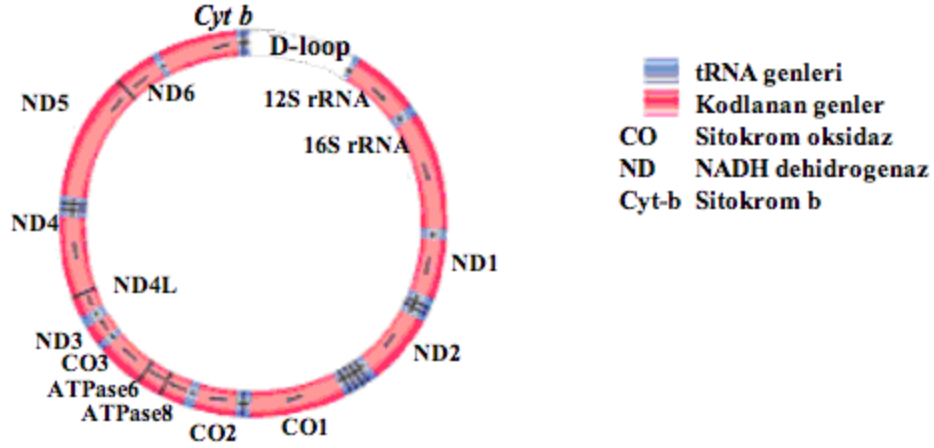
2.2. ANTİK DNA DİZİLEME ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN BİYOLOJİK MOLEKÜLLER

2.2.1. Mitokondril DNA (mtDNA)

Mitokondri, sürekli bölünen ve birleşen, çift membranlı bir biyolojik moleküldür ve oksijenli solunum yapan ökaryotik hücrelerde bulunur. Yunanca mitos (μίτος-iplik) ve khondrion (χονδρίον-tanecik) sözcüklerinden türetilmiş ve Alman patolog Altmann tarafından, 1890 yılında kendine ait metabolik ve genetik otonomiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Mitokondri içerisinde, sayıları 2-15 arasında değişen mitokondril DNA (mtDNA) kopyaları bulunmaktadır. Dairesel bir forma sahip olan mtDNA, insanlarda 16.569 bazdan oluşmaktayken, hayvanlarda 16-18 kilobaz (kb) arasında değişkenlik göstermektedir. Mitokondriler ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunurlar. Başlıca işlevleri hücreye enerji sağlamaktır. Mitokondrilerin bir zamanlar serbest yaşayan simbiyotik bakterilerin işlevini kaybetmiş kalıntıları olduğu düşünülmektedir. Mitokondrilerin bir zamanlar serbest yaşayan organizmalar olduğunun en büyük belirtisi, mitokondriyal DNA (mtDNA) olarak adlandırılan, nispeten küçük dairesel bir DNA parçasına sahip olmasıdır. İnsan DNA'sının çok büyük bir kısmı hücre çekirdeğindeki kromozomlarda bulunur ama mtDNA bir istisnadır ve sadece anneden aktarılır. Kişiler sitoplazma ve onda bulunan biyolojik moleküller annelerinden alırlar, çünkü bunlar yumurta hücresinden kaynaklanır, spermden değil. Mitokondriyal DNA'da bir mutasyon meydana gelince bu mutasyon dişilerden oluşan bir sülale boyunca aktarılır. mtDNA'da çekirdek

DNA'dan daha fazla mutasyon hızı görülür. Kontrol bölgesi (HVR1) adı verilen, 500 baz uzunluğunda mutasyonların en sıklıkla görüldüğü bir bölgesi vardır. mtDNA'nın diğer kısımlarının aksine bu bölgede herhangi bir şeye özgü kod bulunmaz, belli bir fonksiyonu yoktur (Kul ve Ertuğrul, 2010; Güral, 2007; Demirsoy, 2000).

Şekil 6: mtDNA'nın Yapısı (Ertuğrul, 2010).



Özellikle filogenetik çalışmalarda mtDNA biyolojik molekülü kullanılmaktadır. Filogenetik teriminin sözlük anlamı, bir türün ya da yüksek taksonomik grupların soy gelişimi ve evrimsel geçmişi. Türler arasındaki ilişkiler, ırkların tarihi ve genetik çeşitlilik çalışmaları filogenetik çalışmalardır. Filogenetik çalışmalarda önceleri morfolojik karakterler ve protein çeşitliliği kullanılırken, moleküler genetikteki ilerlemelerle birlikte çekirdek DNA polimorfizmleri ve organel genomları (mitokondri ve kloroplast DNA'sı) daha fazla tercih edilir hale gelmiştir. Özellikle mtDNA filogenetik çalışmalar için bazı avantajlara sahiptir. Mitokondrial DNA memelilerde, nükleer DNA'dan daha hızlı mutasyon biriktirir ve sadece anneden gelen kalıtımının bir sonucu olarak popülasyonun büyüklüğündeki azalmalara karşı, çekirdek DNA'sından daha duyarlıdır. Mitokondrial DNA dizilerinin popülasyonlarda karşılaştırılması filogenetik ağaçların çizilmesine olanak sağlar. Bu tür çalışmalarda mtDNA üzerinde bulunan 12S rRNA, 16S rRNA,

sitokrom-b ve D-loop bölgeleri sıklıkla kullanılmaktadır (Kul ve Ertuğrul, 2010). Ancak antik DNA çalışmalarında ağırlıklı olarak kullanılan mitokondriyal DNA sekans tekniği, nükleer DNA'nın kullanıldığı diğer tekniklere göre kontaminasyona daha açıktır. Bunun sebebi ise kontamine eden tek bir hücrede bir tek nükleer DNA örneği varken binlerce mitokondriyal DNA kopyası bulunmasıdır. (Yang ve Watt, 2005).

2.2.2.Y-Kromozomu

Bugün yapılan birçok aDNA analizinde mtDNA kullanılmasına rağmen, unutulmaması gereken bir şey vardır, mtDNA tek bir gendir ve bu nedenle istatistiksel dalgalanmalara neden olup tüm insan genetiğinin bütünü temsil etmeyebilir. Hofreiter ve arkadaşlarının 2001'de yayınlamış oldukları makalelerinde, birbirine yakın olmayan türlerin incelenmesinde, mtDNA analizlerinin sorun olmadığını, çünkü türleşme vakalarının arasında yeterince zaman geçtiğinde genomun tüm kısımlarının aynı filogenetiği gösterebileceğini söylemektedirler. Ancak birbirine yakın türler veya nüfusların genetik sorunları araştırıldığında mtDNA'nın, genomun tüm tarihini veremeyeceğini çünkü mtDNA'nın tek bir genetik lokusu temsil ettiğinin unutulmaması gerektiğini belirtmişlerdir. Ayrıca antik kalıntılarda mtDNA'nın sadece birkaç bin kopyası bulunmaktadır. Bununla birlikte araştırmacıların bu eski insan kalıntılarında elleriyle küçük bir dokunuşları bu eski kalıntıların kirlenmesine kolayca sebep olabilir ve 1000'lerce mtDNA bu numunelere bulaşabilir. Bu durumda özgünlüğü bozulan aDNA, PCR'da yanlış sonuçlar verebilir ve bununla birlikte güncel olan DNA'nın PCR'de çoğalması daha olasıdır (Yang ve Watt, 2005). Araştırmacıların genellikle kullandıkları mtDNA ile ilgili kuşkular ortaya çıkınca, Y-kromozom analizleri önem kazanmaya başlamıştır. Doğa, türleri

farklılaştırırken, cinsiyetleri de farklılaştırmayı sürdürmüş ve bu özelliklerini kalıtımla geçirirken o cinsiyet özelliklerini aynı cinsten alınması gibi bir farklılık yaratmıştır. Nasıl mitokondri sadece anneden geliyorsa, Y-kromozomu da sadece babadan geçer. Ama Y-kromozomunun bir ileri özelliği daha vardır ki, herhangi bir anomali olmadığı takdirde sadece erkek çocuklarına geçer, kadınlarda Y-kromozomu bulunmaz. Böylece Y-kromozomunun incelenmesi de mitokondri gibi özgün sonuçlar doğurmaktadır. Y-kromozomundaki polimorfizmlere bakarak ilk erkek ataya kadar iz sürmek mümkündür. Y-kromozomunun nüfus genetiğindeki önemi, 16,000 nükleotidli mtDNA'ya karşın 50 milyon nükleotidinin olmasıdır. Böylece mutasyonların oluşmuş olduğu birçok bölgesi vardır, yani üzerinde birçok polimorfizm izlenebilir (Gral, 2007).

2.3. ANTİK DNA'NIN BOZULMASI VE KONTAMİNASYON

aDNA çalışmalarıyla ilişkilendirilen iki temel problem vardır. Bunlardan birincisi DNA'nın zamanla bozulması, ikincisi ise antik DNA örneklerinin modern DNA örnekleriyle kontaminasyonu yani kirlenmesidir. Fiziksel ve kimyasal bozulma antik kalıntılarda bulunan DNA moleküllerinin çoğunu yıkabilir. Ancak kötü şartlar altında korunmuş çok az miktarda DNA bile antik DNA moleküllerinin analizine izin vermektedir. Ancak modern moleküler biyolojide uygulanan PCR tekniği aşırı derecede hassas bir tekniktir, öyle ki bu teknikle özel DNA molekülünün çok küçük bir parçası belirlenebilir ve birkaç saatte bu belirlenen molekülün milyonlarca kopyası yapılabilir. PCR tekniğinin aşırı hassasiyeti diğer yandan kopyalama yaparken DNA'nın kolay bir şekilde kontamine olmasına da izin verir. Kontaminasyon aslında tüm DNA çalışmaları için ortak bir sorundur. Çağdaş örnekler ile gerçekleştirilen çalışmalarda DNA miktarı yeterli olduğundan iz

miktardaki kontamine DNA baskılanır ve analizin sonucu etkilenmez, ancak antik DNA örnekleri ile çalışılırken örnekten elde edilen iz miktardaki antik DNA ile dışarıdan reaksiyona giren güncel DNA, PCR’da rekabet eder ve çoğunlukla dışarıdan analize katılan kontamine DNA örneği bu rekabeti kazanır (Yang ve Watt, 2005).

2.3.1. DNA’nın Bozulması

Ölümden sonraki kimyasal süreçlerin bir sonucu olarak antik DNA’da değişimler ve bozulmalar olur. Endonükleazların ürettiği otolizler (enzimlerin kendi kendilerini tüketmesi) tarafından organizmanın ölümünden hemen sonra bozulmalar başlar ve oksidatif ve hidrolitik etkilerle bu bozulmalar devam eder. Zamanla DNA’nın bozulmasına neden olan bu faktörlerin birikerek artması antik kalıntı içinde bulunan DNA’nın yoğunluğunu ve özgünlüğünü azaltmaktadır. Ancak aDNA’nın korunmuş olması sadece antik kalıntının yaşına değil, aynı zamanda bulunduğu çevresel şartlara da bağlıdır. Nemin az olduğu, sıcaklığın düşük olduğu ve nötr ya da hafif bazik pH’lı ortamlar DNA’nın korunmasına yardımcı olur. Aynı zamanda kemik üzerinde hidroksiapatit gibi bir tabakanın bulunması antik kalıntı içindeki DNA’yı muhafaza eder ve korur. Ancak antik kalıntılar içindeki DNA’nın korunmasını etkileyen en önemli faktör onlarla temas halinde bulunan mikro organizmaların varlığıdır. Mikro organizmalar, serbest dolaşım ve mekanik hareket etme yeteneklerine sahip olmalarından dolayı aDNA’nın parçalanmasına neden olurlar. DNA’ya zarar veren fiziksel ve kimyasal süreçler üzerine yapılan bilimsel çalışmalar, en uygun şartlar altında bile DNA’nın yüz bin yıldan daha fazla yaşamayacağını göstermiştir (Kefi, 2011).

Tablo 3: DNA'nın Bozulmasında ve Korunmasında Etkili Olan Faktörler
(Burger, 1999)

Mikroorganizmaların varlığı	Mikroorganizmalar ve metabolitleri DNA'yı tamamen parçalayabilir.
UV ışın ve radyo izotopların varlığı	UV ışınları örneğin sadece yüzeyinde etkilidir. Sert dokular ile çalışılırken çoğunlukla örneğin dış yüzeyi uzaklaştırılarak temizlendiğinden çok fazla etkili olmadığı düşünülür.
Kuruluk ve nem	Kuru ortamlarda hidrolitik ve oksidatif hasar minimize olacaktır.
Hidroksiapatit gibi mineral yüzeye bağlanma	Mineral yüzeyin DNA molekülünü sabitlemesi.
Ölümden hemen sonra gömülme.	Gaz ve parçalanmanın oluşması ile yumuşak dokular mikroorganizmalar tarafından hızlı bir şekilde işgal edilir.
Dokunun sertliği	Özellikle dış örnekleri içlerindeki DNA moleküllerini birçok dış etkenden korur.
Sıcaklık farklılıkları	Düşük sıcaklıklar birçok kimyasal reaksiyonu ve mikrobiyal faaliyetleri yavaşlatır.
Ortamın pH değerleri	Nötral ve hafif alkalın ortamlar hem dokuyu hem de içindeki DNA moleküllerini korur.
EDTA tüplerin kullanılması	Fenolik polimerler ile hava aktiviteleri önlenir.
Dondurucuların kullanılması	Numuneler en uygun sıcaklık şartlarında muhafaza edilmeliler.

Hummel ve arkadaşları DNA'nın korunması üzerine çevresel faktörlerin etkisini incelemek için farklı kazı ortamlarında elde edilmiş, yaklaşık aynı yaşlardaki

fosil dişlerden elde edilen DNA'nın yoğunluğunu gözlemlenmişlerdir. Fosil dişlerin elde edildiği ortamların pH değeri, sıcaklığı, nemi, toprağın jeokimyasal özelliği, organik maddelerin miktarı ve fosil malzemelerin depolandığı ortamın özellikleri dikkate alınarak dişlerden PCR ile DNA elde edilmiştir. Ortam şartlarının aDNA üzerindeki etkisine bakıldığında nemin az olduğu, sıcaklığın düşük olduğu ve mikroorganizmaların olmadığı kuru ortamlarda DNA'nın daha iyi korunduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte fosillerin kısa süreliğine oda sıcaklığında depolanması DNA verimliliği açısından sakınca oluşturmazken sonuğların tekrarlanabilirliği üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Bundan dolayı depolamanın soğutucular içerisinde uygun şartlar altında yapılması, ęalıřma sonuçlarının tekrarlanabilirliğini de sağlamaktadır (Yang ve Watt, 2005).

şekil 7: Antik Kalıntının Soğutucuda Depolanması



Antik DNA analizlerinin paleontoloji, arkeoloji ve zooarkeoloji araştırmalarında kullanılması memnuniyet verecek bir şekilde artmaktadır. aDNA çalışmaları için sınırlayıcı faktör DNA'nın korunma derecesidir. Avrupa, Yakın Doğu ve Kuzey Afrika'da 291 antik kalıntı üzerinde yapılan çalışma bu kalıntıların coğrafik ve iklim koşullarından etkilenmiş olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak sıcak iklimlerde antik malzemenin korunması daha kötü olmakla beraber bu kalıntıların kazı öncesi ve kazı sonrası bozulmaya ve kirlenmeye daha eğilimli olduğu grlmştir (Bollongino, 2008).

2.3.2. Kontaminasyon Problemi

aDNA çalışmalarında kontaminasyon riskinin yüksek olması nedeniyle kontaminasyon ihtimali çok dikkatli bir şekilde göz önünde bulundurulmalıdır. aDNA sonuçlarının arkeolojik ve antropolojik soruların cevapları için uygulanabilirliğinden önce çalışılan DNA'nın özgünlüğünün dikkatle değerlendirilmesi gerekir (Yang ve Watt, 2005).

2.3.2.1. Kontaminasyonun kaynağı

Kontaminant DNA, antik kalıntılardan elde edilen DNA analizlerinde, pozitif sonuç verme riski taşıyan aynı organizmaya ait güncel DNA molekülleri olarak tanımlanabilir. İnsan DNA'sı ile ilgili çalışmalarda bu DNA'ya bakteri ya da mantar DNA'sının bulaşması kontaminasyon olarak adlandırılmaz; çünkü insana özgü primerler kullanıldığından bu örnekler amplifiye olmayacaktır. Antik DNA çalışmalarında insan DNA'sı ile kontaminasyon farklı aşamalarda gerçekleşebilir. Bunlar içerisinde en sık rastlanılan, örneklerin toplandığı saha çalışmalarını yapan ekibin neden olduğu kontaminasyon ile moleküler analizler gerçekleştirilirken laboratuvar ekibinin neden olduğu kontaminasyonlardır (Mulligan, 2006).

Kontaminasyonun kaynağı büyük ölçüde aDNA çalışmasının tipine ve çalışmanın amacına bağlı olarak değişir. Bu çalışmalar genel olarak üç madde halinde sıralanabilir. Bunlar:

1. Eski insan kalıntıları çalışılırken; DNA'nın kirlenmesi kazı alanında çalışırken ya da kalıntılara dokunulduğunda olabildiği gibi, kirlenme laboratuarda kimyasal maddelerden hatta deney tüplerinden olabilmektedir.

2. Eski bitki ve hayvan DNA'ları çalışırken; kontaminasyona genellikle kalıntının morfolojik tanımlanması sürecinde karşılaştırma yapmak için kullanılan o türün güncel örnekleri neden olmaktadır. Bu çalışmalarda insan DNA'sı bir kirlenmeye neden olmamaktadır.

3. Bakteri türlerinin antik patojen DNA'ları çalışırken; kirletici DNA toprak ve çevre ortamlarda ayrıca yakın türlerden gelebilir. PCR tekniğinde olası kirlenmiş türlerden hedef patojenik türü ayırabilmek için özel olarak hazırlanmış DNA markerler kullanılabilir (Yang ve Watt, 2005).

Binlerce yıllık örneklerle çalışılırken örneklerin kendi içlerinde kontamine olma olasılıkları oldukça düşüktür. Çünkü her bir örnek iz miktarda DNA içermektedir. Dikkate alınması gereken en önemli kontaminasyon risklerinden biri de bir önceki PCR örneklerinden PCR esnasında gerçekleşen kontaminasyondur. Açıkçası, en büyük potansiyele sahip kontaminasyon kaynağı aynı veya yakın akraba türlerin daha önceden gerçekleştirilmiş PCR amplifikasyonlarından bulaşan kirlenmelerdir. Bu tür kontaminasyonların önlenmesi için aDNA çalışmalarının yapılacağı ortamlar sadece bu iş için tahsis edilmeli ve uzmanlar çok dikkatli çalışmalıdırlar (Poinar, 2003).

2.3.2.2. Laboratuvar öncesi kontaminasyon kontrolleri

Kazı süresince toplanan numunelerin temizlenmesi:

Kazı alanında ki çalışanlar ve daha sonraki laboratuvar çalışanlarının laboratuvar öncesi gerçekleştirdikleri etkin kontaminasyon önlemleri genel kontaminasyon kontrolleri başarısında çok önemli olabilir. Kontaminasyon kontrolleri antik kalıntıların yerden çıkarıldığı anda ve kazı alanında yapılmalıdır. İdeal olarak, alandaki kontaminasyon önlemleri de laboratuvarda uygulanacak kontaminasyon önlemleri kadar sıkı olmalıdır, ancak kazının yapıldığı açık arazi koşulları sıkı bir kontaminasyon kontrolünü engelleyebilir. Kontaminasyon olasılığını en aza indirmek için kazı alanında ve daha sonraki depolama esnasında izlenmesi gereken bazı genel kurallar bulunmaktadır. Bunlar:

1. Antik DNA analizi için belirlenen örnekler temizlenmemelidir, çünkü bu temizleme esnasında kemik dokuların içine kadar giren kontamine maddeler sonraki temizlemeyi daha da zorlaştırabilir. Bu durumda dekontaminasyonun laboratuvarda uygulanması daha kolay olur.

2. Numuneler suyla yıkanmamalıdır, çünkü su kemik dokulara derinlemesine nüfuz ederek antik DNA'yı kirletebilir ayrıca antik DNA'ya hidrolitik (maddenin kimyasal yapısının bozulması) zarar verebilir.

3. Mümkünse, antik numunelere herhangi bir koruyucu kimyasal madde eklemekten kaçınılmalıdır; çünkü bu kimyasallar PCR amfilikasyonunu inhibe edebilir ve numuneler için potansiyel bir kontaminasyona neden olabilirler.

4. Antik DNA'nın bozulmasını önlemek için numuneler serin ve kuru ortamlarda depolanmalıdır.

5. Çapraz kontaminasyonu önlemek için antik numuneler modern numunelerden ayrı depolanmalıdır.

6. Mümkünse, bir numuneden diğerine geçerken kullanılan eldiven ve benzeri araç ve gereçler değiştirilmelidir.

7. Numuneler, tamamen kuru olduklarından emin olunduktan sonra, ayrı ayrı plastik kaplarda ya da tüplerde saklanmalıdırlar. Aksi takdirde ıslak ya da nemli bir haldeyken bu numunelerin tamamen havayla temasının kesilmesine neden olan kaplarda saklanması, numunelerin bozulmasına neden olabilmektedir. Bu durumlarda numuneleri saklamak için kağıt kaplar kullanılmalıdır (Yang ve Watt, 2005).

Şekil 8: Antik Kalıntının Toprakten Çıkarılması



Alana çıkan arkeolog ve antropologların önceden antik DNA analizi için numune toplama olasılığını değerlendirmeleri ve bu numunelerin toplanması için gerekli araç ve gereçleri önceden hazırlamaları gerekir. Ne yazık ki, alanda çalışan arkeologlar ve antropologların laboratuvar ortamında çalışan antik DNA teknisyenleri

gibi koruyucu giysilerle ve uygun ekipmanlarla donatılmış olacağını beklemek çokta gerçekçi değildir. Bununla birlikte, numunelerin temiz bir şekilde toplanması için sağduyulu davranmak gerekmektedir (Yang ve Watt, 2005). Genellikle, bir antik DNA numune toplama kiti, tek kullanımlık eldivenler, temiz kâğıt torbalar, alüminyum folyo, maskeler, saç filesi, kapatılabilen plastik torba, çamaşır suyu çözültisi, mala ve dişçi aletleri gibi temiz kazı aletlerini içermelidir. Kullanılan araç ve gereçlerin temizliği için % 10 ticari çamaşır suyu kullanılmalı. Numune toplama kiti steril olmak zorunda ve bu kitin temiz tutulması gerekmektedir. Aynı aracın birden fazla numune veya iskelet için kullanılmaması gerektiği unutulmamalıdır (Richards ve ark., 1995).

DNA analizi için insan örnekleri toplanırken her zaman özel bir dikkat gösterilmelidir. Eğer kazının bütününde tüm personel için koruyucu önlemler almak mümkün değilse, tüm personeli belirli aralıklarla çalışan iki gruba bölmek mantıklı olabilir. Toplanan bütün kalıntılar DNA analizi için kullanılmayacağından DNA analizi için kullanılacak olan çok küçük boyuttaki numunelerin kontaminasyona karşı en sıkı denetimler altında toplanması gerekmektedir. Çoğu durumda antik DNA çalışmaları için birkaç küçük kemik parçası, kemiğin ufak bir kısmı veya bir diş yeterli olmaktadır. Ancak antik DNA analizinin yıkıcı doğasından dolayı morfolojik ve patolojik incelemeler için kullanılmaya uygun olan kemikler aDNA çalışmaları için seçilmemelidir. Mümkünse tekrarlanabilir testler için örnekler arasında çoklu parçalar alınmalıdır (Degusta ve White, 1996).

aDNA çalışmaları için seçilen kemikler toplanırken, bunlar alüminyum folyo içine sarılmalı ve doğal kurutma için temiz bir kâğıt torbaya konulmalıdır. Eğer numuneler ıslaksa bu numuneler, kapalı plastik bir kutuya konulmamalı; çünkü içi

nemli ve ağzı kapalı plastik bir kutu bakterilerin üremesi için ideal bir ortam yaratacaktır ve sonuç olarak da bu ortamda oluşacak mikrobiyal faaliyetler antik kalıntının dolayısıyla da antik DNA'nın bozulmasına neden olabilecektir. aDNA için kullanılacak numuneler ancak tamamen kuruduktan sonra kapanabilir plastik bir kaba konulmalıdır (Yang ve Watt, 2005).

Şekil 9: Toprakten Çıkan Kalıntının Folyoya Alınması



Kazının yapıldığı yerin çevresel şartlarının (toprağın yapısı, nemi, ısısı vb.) bilinmesi de DNA'nın korunması hakkında bazı yararlı ipuçları sağlayabilir. Mümkünse, kazı alanındaki toprak örnekleriyle birlikte diğer hayvan ve bitki türlerine ait örneklerin de toplanması gerekir. Toprağın kimyasal yapısının incelenmesi DNA'nın bozulma oranının tespitinin yanı sıra diğer taksonların korunan DNA'larının belirlenmesine de izin verecektir. Ana araştırma odağı sadece eski insan DNA'sı olmasına rağmen, kazı alanı üzerinde toplanan diğer türlere ait kalıntılardan elde edilen DNA'da laboratuvar ortamında insan DNA'sının özgünlüğü için ikincil delil olarak daha sonra kullanılabilir (Yang ve Watt, 2005; Poinar, 2003).

Alandan laboratuara numune taşırken, DNA analizi için belirlenen örnekler serin, kuru ortamlarda saklanmalıdır. Antik DNA analizi için, araştırmacılar ve kazı

alanındaki personelin saç veya yanak içi sürüntü örneklerinden DNA alınmalı ve çalışılacak olan insan aDNA'sı ile sonraki karşılaştırma için kullanılabilir hale getirilmelidir. Çalışanlardan ve kazı personelinden alınan bu referans DNA örnekleri de ayrı ayrı temiz test tüplerinde kapalı olarak tutulmalıdır (Yang ve Watt, 2005).

aDNA çalışmalarında kullanılan antik kalıntılarda araştırmacıların çalışma esnasında elle temaslarından kaynaklanan kontaminasyonun miktarı tam olarak anlaşılacakla birlikte bu sorun aDNA çalışmaları için temel bir problemdir. Sampietro ve arkadaşları (2006) elle temastan kaynaklanan kontaminasyon oranını ölçmek için yapmış oldukları çalışmayı 2006 yılında yayınlamışlardır. Granollers'de (Barselona, İspanya) yapılan neolitik döneme ait 23 kazıda elde edilen antik dişlerden alınan 572 klon mtDNA analizleri incelenmiştir. Bu araştırmada antik kalıntının çıkartılması ve temizlenmesi için sadece altı kişi çalışmıştır. Klonlanan dizilimlerin sonuçlarına bakıldığında bu dizilimlerden %17,13'nün özgün olmayan kontamine DNA olduğu gözlenmiştir. Kontaminasyonun kaynağına ve oranına bakıldığında, antik kalıntının çıkartılması ve temizlenmesi esnasında elle temastan kaynaklanan kontaminasyonun daha sonraki antropolojik ve genetik çalışmalar esnasında oluşan kontaminasyondan daha fazla olduğu belirtilmiştir. Buda aDNA çalışmalarında antik kalıntı üzerindeki ilk uygulamaların daha fazla kontaminasyona neden olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte araştırmacıların belirttiği şaşırtıcı sonuçlardan biride kontamine olmuş DNA'nın yapısal bozulmalara daha açık olması ve zamanla bu bozulma oranının artmasıdır (Sampietro ve ark., 2006).

Önceki kazılarda elde edilen eski malzemeler:

Daha önce çıkarılan arkeolojik kalıntılar antik DNA çalışmaları için büyük potansiyele sahiptir. Bu örneklerin bazıları, antik DNA analizi için kullanılmaya

karar verilmeden önce, yoğun bir şekilde arkeolojik veya antropolojik çalışmalar kapsamında kullanılmış olabilir. Bu kalıntıların çoğu, modern DNA ile kontamine olma olasılıklarından dolayı aDNA'nın özgünlüğünün korunmasını zorlaştırmaktadırlar. Eski insan kalıntıları için aDNA çalışmaları yapılmadan önce bu malzemeleri çalışanların ve malzemelere dokunanların kaydının izlenmesi zordur ve daha önce bu malzemeleri çalışan herkesten de referans DNA örneklerin alınması neredeyse imkânsızdır. Bu kaçınılmaz kontaminasyon gerçeğinden dolayıdır ki laboratuvar içi etkili dekontaminasyon işlemlerini yürüten antik DNA laboratuvar teknisyenlerine güvenmek esastır. Kemik örnekler üzerinde yapılan araştırmaların kısa bir tarihçesine (bunların ne zaman çalışıldığı, kaç kişinin bunları çalıştığı ve numune kayıtlarının doğruluğu gibi) ulaşılması, uygulanacak olan dekontaminasyon çalışmalarında hangi dekontaminasyon stratejisinin kullanılması konusunda antik DNA teknikleri için çok faydalı olacaktır. Esasen bu dekontaminasyon önlemleri en başından dikkate alınmamışsa bu alandaki arkeolog ve antropologların sonradan bu önlemleri almasına gerek yoktur ve hatta bu durum yeni kontamine DNA'ların oluşmasına da neden olabilmektedir (Yang ve ark., 2003).

Antik DNA analizi için örnekler seçilirken ve hazırlanırken en temel kaygı, özellikle de uygun numune miktarlarının elde edilmesi için kullanılacak olan kemik kesilirken, çapraz kontaminasyondan kaçınmak olmalıdır. Uzun kemikleri 1-2 cm küçük parçalar halinde kesmek için küçük bir testere kullanılmalıdır. Her bir numune için ayrı ayrı testere ağzı kullanılmalıdır. Bu testere ağızları yeniden kullanmadan önce deterjan ile temizce yıkanmalı ve çamaşır suyu ile iyice silinmelidir. Delici aletler ve matkaplarda aynı yollarla temizlendikten sonra kullanılabilirler; ancak bu aletler kemik tozlarının etrafa saçılmasını önlemek için düşük hızlarda

çalıştırılmalıdırlar. Her bireye ait numune çalışıldıktan sonra üzerinde çalışılan tezgâh ya da masa yüzeyi çamaşır suyu çözeltisi ile silinmeli ve numuneler için kullanılan kâğıt havlu gibi malzemeler her numune için değiştirilmelidir. Çalışılan her numune tamamen kuruduktan sonra kapanabilen plastik kutular içinde ayrı ayrı muhafaza edilmelidir (Yang ve Watt, 2005).

2.3.2.3. aDNA laboratuvar içi kontaminasyon kontrolü

“Laboratuvar kontaminasyon kontrolleri” terimi, bir aDNA laboratuvarındaki sıkı tedbirleri ve önlemleri adlandırmak için kullanılmaktadır. Burada belirtilen önlemler bu alanda çalışma yapan bilim adamlarına başarılı aDNA çalışmaları için katkı sağlayacaktır. Etkin bir laboratuvar kontaminasyon kontrolleri için özel bir antik DNA laboratuvarı gereklidir. Bu gerekliliğin nedenlerini maddeler halinde sıralarsak:

- 1) Antik örneklerden özgün DNA elde etmek (Hiçbir modern DNA bu laboratuvarda hazırlanmamalıdır),
- 2) DNA ekstraksiyon sürecine giren ve antik DNA örnekleri ile karışabilecek amplifiye PCR ürünleri önlemek
- 3) İşlenmiş veya laboratuvarda daha önce işlem görmüş olanların diğer örneklere bulaşmasını önlemek
- 4) Eski insan DNA'sı üzerinde çalışırken, antik DNA laboratuvar teknisyenlerinin, antik DNA örnekleri içine kendi DNA'larını bulaştırmalarını önlemek (Yang ve Watt, 2005).

Etkili kontaminasyon kontrollerini uygulamak için birkaç diğer tedbirde yerinde alınmalıdır. Bu tedbirler:

- Tamamen aDNA çalışması için kurulmuş antik DNA laboratuvarlarında, çalışılacak antik kalıntılar hazırlanmalı, DNA ekstraksiyonu ve

PCR'in kurulması amacıyla ideal donanım ve odalar amacına uygun olarak hazırlanmalıdır.

- DNA analizi için seçilen örneklerin kazı alanında, taşınırken veya toprak altında kontaminasyona maruz kalabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışılacak bu materyallerin kirlenmiş yüzeylerinin temizlenmesi için zımpara veya elektrikli matkaplar gibi fiziksel yöntemler kullanılmaktadır.

- PCR amplifikasyonu fiziksel olarak ayrılmış PCR laboratuvarında veya alanında yürütülmelidir. Bu çalışmalar minimum sürede ve en az kişi ile yapılmalıdır. Çünkü süre ve çalışan kişi sayısı arttıkça kontaminasyon riski de artmaktadır

- Antik DNA laboratuvarında, hava UV – HEPA ile filtrelenmeli,
- UV ışınlaması mevcut DNA kalıntılarını yok etmek için kullanılmalı,
- Tezgâh, araç ve gereçler çamaşır suyu ile silinmeli,
- Laboratuvar teknisyenleri koruyucu elbise, eldiven ve maske giyinmelidir.

Bu basit uygulamaların en etkili kontaminasyon kontrollerinden biri olduğu kanıtlanmıştır (Cooper ve Poinar, 2000; Hofreiter ve ark., 2001).

Tüm ‘‘laboratuvar kontaminasyon kontrolleri’’ uygulandığında, antik DNA laboratuvarındaki çalışmalar sırasında oluşabilecek kontaminasyon olasılığı önemli ölçüde azaltılabilir. Ne yazık ki, bu tedbirler eski kalıntılarda, aDNA laboratuvarına gönderilmeden önce oluşmuş kirlenmeleri önleyemez. Şu anda müze ve üniversitelerde tutulan çok önemli arkeolojik ve antropolojik eski kalıntılar büyük ölçüde kontaminasyona maruz kalmışlardır. 20 yıl önce arkeologların ya da antropologların kazı yaparken, gelecekte antik DNA çalışmalarının gelişeceğini

tahmin edip çalışma esnasında koruyucu önlük, eldiven ve maske gibi kirlenmeyi önleyici koruyucu elbiseler giymeleri mümkün olmamıştır. Bu kalıntılar kazı esnasında kirlenmemiş olsa bile, türlerin karşılaştırılmaları için yapılmış olan sonraki laboratuvar çalışmalarında mutlaka kontaminasyona uğramışlardır (Gigli, 2011).

Antik DNA çalışmaları için laboratuvar öncesi kontaminasyon ciddi bir problem olabilir. Antik DNA laboratuvarlarında antik kalıntılarda meydana gelmiş kirlenmeyi ortadan kaldırmak için çok farklı yöntemler kullanmak zorunda kalınabilir. Bu dekontaminasyon süreçlerine antik kalıntıların kontamine yüzeylerinin fiziksel olarak ortadan kaldırılması ya da kirli DNA'nın kimyasallarla temizlenmesi de dâhildir ki bu durumda kimyasallar antik kemik dokunun içine kadar sızabilir. Dekontaminasyon, doğası gereği yıkıcıdır ve dekontaminasyon için uygulanan her metot farklı seviyelerde antik kalıntıyı etkileyebilir. Her numunenin kazı ve depolama süreci farklıdır ve buna bağlı olarak kontaminasyon seviyeleri de önemli ölçüde değişebilir. Sonuç olarak dekontaminasyon süreçleri kontamine DNA'nın tamamen ortadan kalkacağı anlamına gelmez. Eğer dekontaminasyon çok yıkıcıysa bu durum bugüne kadar gelebilmiş özgün DNA'yı da yok edebilir. Eğer dekontaminasyon yeterli değilse bu durumda da kontamine DNA tamamen temizlenmemiş olabilir. Antik DNA çalışmalarında araştırmacılar dekontaminasyon protokolleri ile ilgili dengeli kararlar almalı ve ardından da kontaminasyonu tespit etmek için farklı araştırma planları uygulamalıdır. Tüm bu süreç yoğun bir emek gerektirmekte ve çok zaman almaktadır (Kolman ve Tuross, 2000).

Malmstrom ve arkadaşları 2005 yılında, aDNA çalışmalarında çok yaygın bir DNA kaynağı olarak kullanılan müzelerdeki kemik ve dişlerde elde edilen DNA'larda insan kaynaklı kontaminasyonun kökenini ve kapsamını araştıran bir

makale yayınlamışlardır. Bu çalışmada özgün DNA'yı ayırt edebilmek için köpek kemiğinden elde edilen DNA kullanılmıştır. Çalışmanın sonunda bütün negatif önlemler alınmasına karşın PCR'da elde edilen mtDNA'nın 152 bp'si köpeğe ait iken 148 bp'sinin insana ait mtDNA olduğunu gözlemlemişlerdir. Kontaminasyonu engellemek için bütün standart prosedürler uygulanmasına rağmen 29 köpeğe ait bütün örneklerde köpek DNA'sından daha fazla insan DNA'sına rastlanmıştır. Bu çalışmada negatif önlemler ve standart kontaminasyon önlemleri alınmış olmasına rağmen DNA'nın kontamine olması engellenememiştir. Sonuç olarak araştırmacılar kontaminasyonun kaynağının laboratuvar prosedürlerinin standartlarına uygun olarak uygulanmadığından kaynaklandığını anlamışlardır. Bu çalışmada da anlaşıldığı üzere aDNA analizleri, insana ait olmayan bir kemikte bu kadar kontamine olabiliyorsa, özelliklede insan kökenli olanlarda, moleküllerin hasarlı olması ve kontaminasyon nedeniyle oldukça zordur (Malmstrom ve ark., 2005).

Antik insan kalıntılarında hastalıkların tanımlanması için kullanılan aDNA çalışmalarının sayısında belirgin bir artış gözlemlenmesine rağmen yayınlanmış çalışmalarda uygulanan yöntem ve metotların sınanması konusunda sorunlar devam etmektedir. Arkeolojik kazılarda elde edilen mumya ve insan kalıntılarında aDNA kullanılarak hastalıkların tanımlanması ile ilgili 1993 ve 2006 yılları arasında yayınlanmış 65 makale, aDNA çalışmalarında herkes tarafından kabul edilmiş onbeş kriter açısından değerlendirilmiştir. Bu kriterler:

1. Kazı boyunca doğru kontaminasyon önleme prosedürlerinin uygulanması
2. Örneğin kontamine olmuş yüzeyinin tamamen ortadan kaldırılması
3. PCR öncesinde ve sonrasında farklı laboratuvarların kullanılması

4. Antik DNA laboratuvarının özellikle bu çalışmalar için hazırlanmış olması
5. Laboratuvarında çalışan tüm personelin DNA veri tabanı oluşturulmalı ve aDNA çalışmasının sonuçlarıyla karşılaştırılmalı
6. Laboratuvar içinde kontaminasyonu engelleyici kıyafetler giyilmeli
7. mtDNA veya nükleer DNA analizleri kaydedilmeli
8. Uygun negatif kontroller kullanılmalı
9. Uygun moleküler davranış tanımlanmalı
10. Sonuçlar yeniden sınanmalı
11. DNA analiz prosedürleri belirlenmeli
12. Sonuçlar başka bir laboratuvarında yeniden tekrar edilmeli
13. Örnekteki diğer biyokimyasal bileşenler kaydedilmeli
14. DNA elde etmek için kullanılan malzemenin miktarı kaydedilmeli
15. Kontroller için, aDNA için kullanılacak malzemeyle ilişkili diğer kalıntılar ve toprakta incelenmeli

Araştırmanın sonunda bu yayınlardan %90'nın temel kontaminasyon kontrollerini, %85'inin de bağımsız sonuçları doğrulamak için gerekli olan prosedürleri uygulamadıkları görülmüştür. Sonuç olarak bu on beş kriterin günümüzdeki ve gelecekteki aDNA çalışmalarında çok önemli olduğu belirtilmiştir (Roberts ve Ingham, 2008).

2.3.2.4. Negatif testler

aDNA çalışmalarında, kontaminasyonun tespitine yardımcı olacağı için negatif testler (numunenin morfolojik bilgileri ve diğer tanımlamaları) mutlaka uygulanmalıdır. Bu alandaki arkeologlar ve antropologlar negatif testlerin

uygulanmasına yardımcı olabilirler. Antik DNA analizi için numune hazırlanırken bu numunelere ait tüm morfolojik ve diğer kimlik bilgileri çıkarılmalı ve örneklere yeniden numara verilmelidir. Varsa hayvan ve bitki örnekleri ile insana ait olmayan kemik parçaları numune setlerine dahil edilmelidir. aDNA analizi bu sahte numuneleri (insana ait olmayan, hayvan ve bitkiye ait DNA'lar) farklı DNA dizilimlerinden dolayı insan kalıntılarında ayırabilir. En iyi biçimde uygulanan kontaminasyon kontrolleri etkinlikleri, antik DNA analizlerini daha güvenilir bir hale getirmektedir. Negatif test dediğimiz bu uygulamaların göz önünde bulundurulması, kontamine DNA'nın ya da antik DNA'nın özgünlüğünün belirlenmesinde çok bilgilendirici olmaktadır (Yang, 1997; Yang ve Watt, 2005).

aDNA alanında çalışan bütün bilim adamları kontaminasyonun ciddi bir sorun olduğu konusunda hemfikirdir. Dolayısıyla da kontaminasyonun ortadan kaldırılması bu alandaki çalışmalar için en öncelikli dikkate alınması gereken bir sorun niteliği taşımaktadır. Yapılan çalışmalar incelendiği zaman kontaminasyonun önlenmesi ve ortadan kaldırılması ile ilgili en etkili çalışmaların teknolojinin gelişimiyle paralellik arz ettiği görülmektedir. Bu çalışmalarda belirtilen kontaminasyon önlemlerine baktığımızda genelinde, sıralamaları değişmekle birlikte aynı kriterlerin maddeler halinde sıralandığı görülmektedir. Ancak aDNA çalışmalarında yukarıda belirttiğimiz kriterlerin herkes tarafından kabul görmesiyle birlikte uygulamada ortaya çıkan farklılıklar, çalışmanın sonuçlarını doğrudan etkilemektedir. Bütün kontaminasyon önlemleri uygulandıktan sonra, aDNA'nın özgünlüğünün sınanması için gerekli olan kriterleri, bu alanda öncü bilim adamlarından biri olan Svante Paabo 2004 yılında "aDNA'dan Genetik Analizler" adı altında yayımladığı makalesinde sekiz madde halinde sıralamıştır.

1. Amplifikasyon ürünlerinin klonlanması ve birden fazla klonun sekanslanması
2. Örnek alımın kontrolleri ile PCR kontrollerinin yapılması
3. Aynı veya farklı örneklerden tekrarlanan amplifikasyonlar yapılması
4. Amplifiye edilen DNA molekül sayı miktarlarının ölçülmesi
5. Amplifikasyon etkililiği ile amplifikasyon uzunluğunun tersine ilişkisi
6. Makromolekülerin korunması konusunda dikkatli olunması
7. mtDNA'yı nükleer girdilerden arındırılması
8. İkinci bir laboratuarda örneklerin analizi (Paabo, 2004).

2.3.3. aDNA Laboratuvarı Ve Özellikleri

Bir aDNA laboratuvarının en temel amacı, antik kalıntılardan elde edilen DNA'nın modern DNA ile kontaminasyonunu engellemektir; çünkü ölümden sonra oluşan hidrolitik, oksidatif ve enzimatik süreçler antik kalıntı içerisindeki DNA yoğunluğunu azaltmaktadır. aDNA laboratuvarları özellikle antik insan kalıntılarının DNA analizi için çok önemlidir. Bu laboratuvarlar müze ve kazıda çalışan arkeolojik ve antropolojik personel tarafından neden olunan kontaminasyonu (ki bu kontaminasyon riski hayvan örnekleri ile kıyaslandığında insan kalıntılarında çok daha yüksektir) minimize etmek için özellikle insan kalıntıları çalışmalarında bir zorunluluktur.

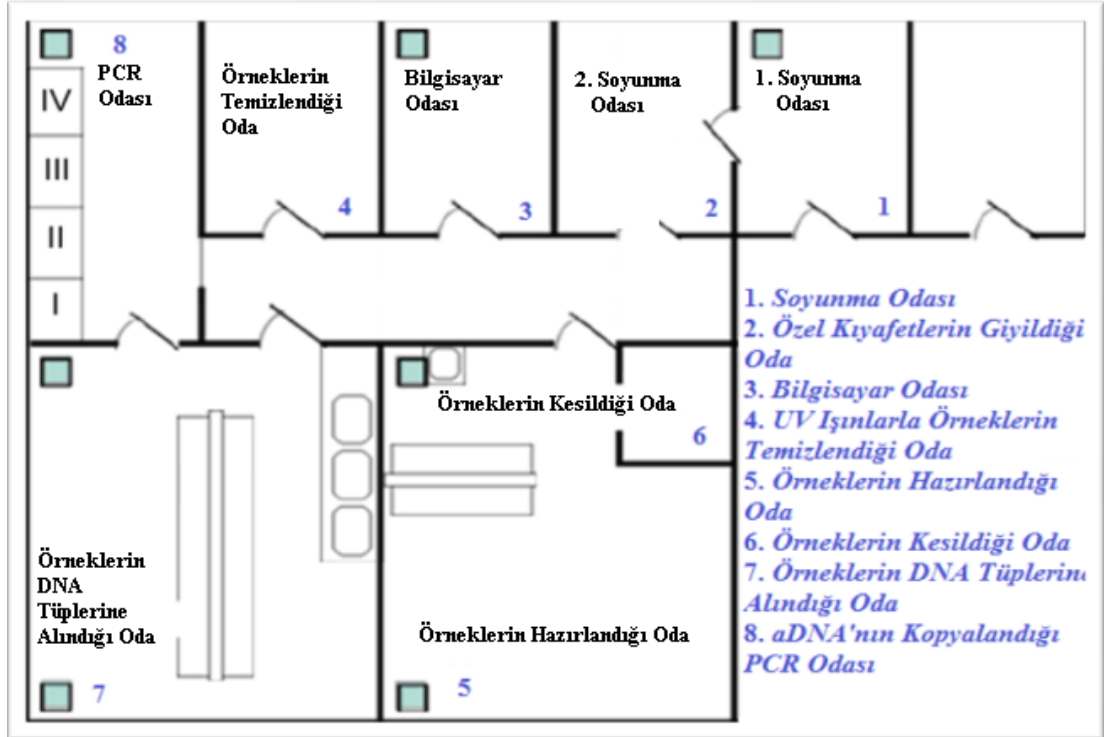
aDNA çalışmaları iki ayrı laboratuarda gerçekleştirilir. Bunlardan ilki, antik DNA laboratuvarıdır (pre-PCR). Burası numune hazırlama, DNA ekstraksiyonu ve PCR süreçlerinin tümünü kapsar. İkinci laboratuvar (post-PCR), jel elektroforezi ve DNA dizi analizinin yapıldığı standart bir moleküler genetik laboratuvarıdır.

PCR öncesi ve sonrası laboratuvarlar bir birinden ayrı binalarda olmalıdır. Laboratuvarlar arasındaki bu zorunlu mekânsal ayırım özellikle iki mekân arasında kontaminasyona neden olabilecek modern DNA'nın taşınmasını engellemek için çok önemlidir. PCR öncesi ve sonrası için gerekli donanımlara sahip farklı laboratuvarların hazırlanması gerekmektedir. Laboratuvarlar ve tüm ekipmanlar bu iş için hazırlanmış olmalıdır. Hiç bir modern DNA çalışması bu laboratuvarlarda yapılmamalıdır. İdeal olarak ön PCR laboratuvarında UV filtreli havalandırma sistemi ve pozitif basınçlı hava akımı olmalıdır. Steril tek kullanımlık malzemeler ve filtreler kullanılmalıdır. Eldiven, maske, çizme ve laboratuvar önlüğü giyilmelidir. %10'u çamaşır suyundan oluşan temizlik malzemesi ile ekipmanlar temizlenmeli, ortamın ışıklandırılması için de UV ışık kullanılmalıdır (Yang, 2003).

Bir aDNA laboratuvarında kullanılacak alanların tümü bir birinden bağımsız olmalıdır. Antik DNA alanında çalışan Paabo, Yang, Cooper ve Poinar gibi bilim adamları kontaminasyonun önlenmesi için alınması gereken önlemleri sıralarken, aDNA laboratuvarlarının bu özelliğini önemle vurgulamışlardır. Yine bu alanda çalışmakta olan Burger, bir aDNA laboratuvarının nasıl olması gerektiğini ve oluşturulan her bir alanın özelliklerini şekil 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ve 18'da gösterildiği gibi şematize etmiştir. Burger aDNA laboratuvarını bir birinden bağımsız sekiz alana bölmüştür. Bu alanlar:

1. Soyunma odası
2. Özel kıyafetlerin giyildiği oda
3. Bilgisayar odası
4. UV odası
5. Örneklerin hazırlandığı oda
6. Örneklerin kesildiği oda
7. DNA alınan oda
8. PCR odası

Şekil 10: aDNA Laboratuvarı



1. *Soyunma Odası*: Bütün giysilerin çıkarıldığı birinci soyunma odasıdır.

Şekil 11: Soyunma Odası



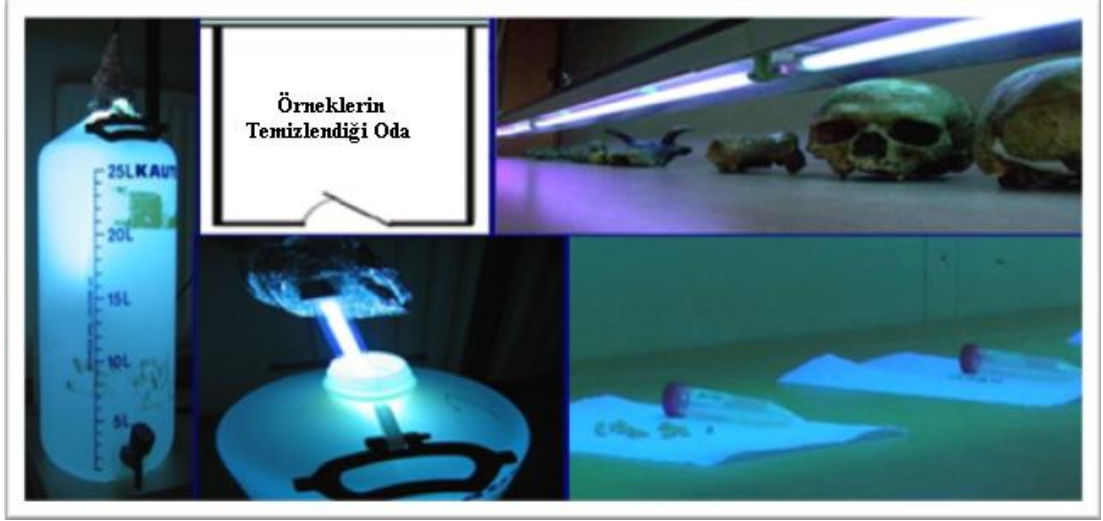
2. *Özel Kıyafetlerin Giyildiği Oda*: Bütün kıyafetler çıkarıldıktan sonra kontaminasyonu engellemek için tasarlanmış özel kıyafetlerin giyildiği ikinci soyunma odasıdır.

Şekil 12: Özel Kıyafetlerin Giyildiği Oda



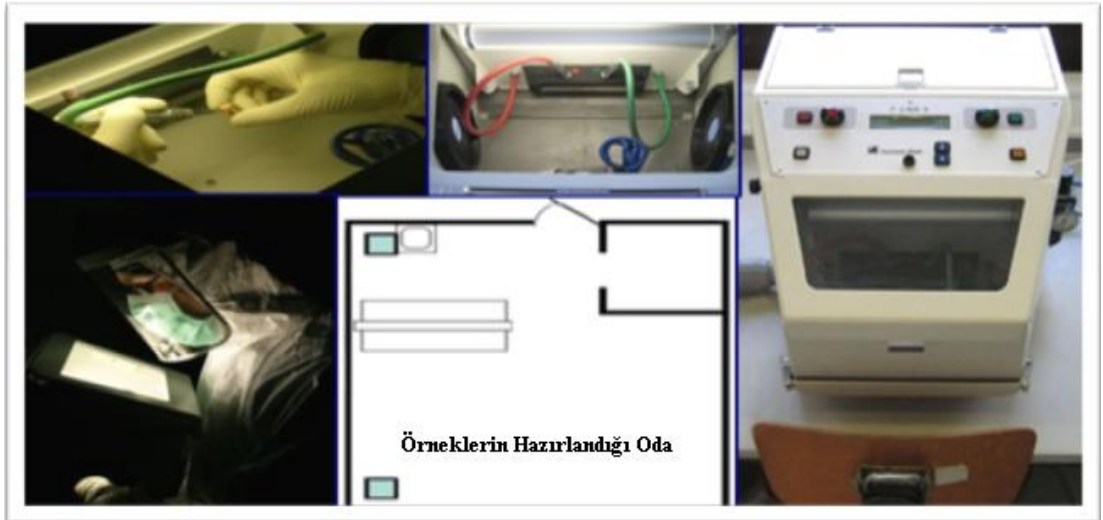
3. *UV Işınlarla Örneklerin Temizlendiği Oda:* UV ışınları mevcut kontamine DNA kalıntılarını yok etmek için kullanılmaktadır.

Şekil 13: UV Işınlarla Örneklerin Temizlendiği Oda



4. *Örneklerin Hazırlanıldığı Oda:* aDNA çalışmasında kullanılacak örneklerin kontamine yüzeylerinin temizlendiği odadır. Bu temizleme işlemi tamamen sanitize edilmiş matkap, zımpara, kazıyıcı ve kompresör gibi aletlerle yapılmaktadır.

Şekil 14: Örneklerin Hazırlanıldığı Oda



5. *Örneklerin Kesildiği Oda:* Antik DNA'nın elde edilmesi için antik kalıntının kesildiği odadır. Burada özellikle vurgulanması gereken, DNA'nın elde

edilmesi için kullanılacak malzemede oluşabilecek hasarlardır. Bu kalıntıların daha sonraki morfolojik çalışmalarda kullanılma ihtimalide de göz önünde bulundurularak önem derecesi daha az olan malzemeler seçilmelidir.

Şekil 15: Örneklerin Kesildiği Oda



6. *Örneklerin Toz Haline Getirilmesi:* Fosil kalıntılar kesildikten sonra DNA elde edebilmek için toz haline getirilir.

Şekil 16: Örneklerin Toz Haline Getirilmesi



7. *Toz Haline Getirilen Örneklerin DNA Tüplerine Alınması:* Burada toz haline getirilmiş antik kalıntının 1-2 gramı DNA ekstraksiyonu için DNA tüplerine

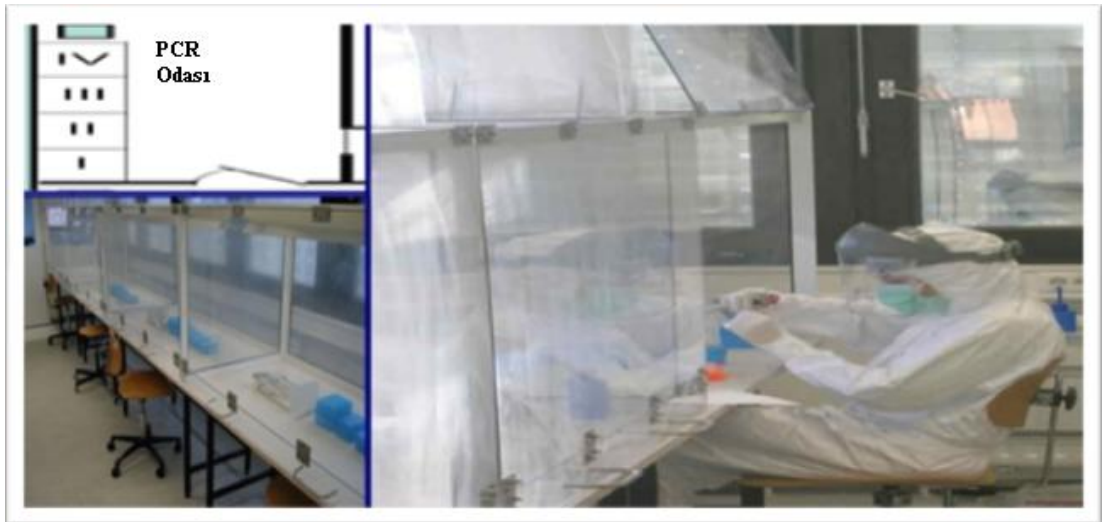
alınır. Daha sonra uygun kimyasal maddeler ve yöntemler kullanılarak antik DNA elde edilir.

Şekil 17: Toz Haline Getirilen Örneklerin DNA Tüplerine Alınması



8. *aDNA'nın Kopyalandığı PCR Odası:* Antik kalıntıdan DNA elde edildikten sonra, analiz için gerekli olan DNA'nın elde edilmesi için mevcut DNA PCR yardımıyla yeterli oranda kopyalanır.

Şekil 18: aDNA'nın Kopyalandığı PCR Odası



Bütün bu aşamalardan sonra çok sayıda kopyası elde edilen antik DNA örneği standart bir moleküler genetik laboratuvarında sekanslanır. Son olarak

Çalışmanın amacına bağlı olarak bu sekanslar bilim adamları tarafından yorumlanır. Günümüzde uygulama alanları çok daha genişleyen aDNA çalışmaları doğayı ve canlıları daha iyi tanımamızı sağlamaktadır.

BÖLÜM III

3. ANTİK DNA’NIN İZOLASYONU VE ANALİZİ

DNA’nın hemen hemen bütün canlıların kalıtım materyali olduğunun keşfi ve 1953’te çift sarmallı yapısının keşfiyle birlikte insan DNA çalışmaları farklı bir boyuta taşınmıştır. 1985’te PCR’ın keşfi ve 1990-2003 yılları arasında gerçekleştirilen “İnsan Genom Çalışmaları” ile insanın DNA diziliminin tamamlanması bu alandaki çalışmaları en uç noktaya taşımıştır. Ancak tüm bunlara rağmen uygulamadaki bazı teknik güçlükler antik DNA çalışmaları ile ilgilenen araştırmacılar için kısıtlayıcı olmaktadır (Yang ve Watt, 2005).

Moleküler biyoloji ve antropolojide kullanılan aDNA’nın analizi çalışmaları bir takım aşamalardan oluşmaktadır. Bu aşamalar:

1. DNA ‘nın izolasyonu
2. Restriksiyon endonükleazlar aracılığıyla DNA’nın kesilmesi
3. Jel elektroforezi kullanılarak farklı boyutlarda ki DNA’ların ayrılması
4. Jelde kalan DNA’ların destek membrana alınması
5. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

3.1. DNA’NIN İZOLASYONU

Moleküler biyolojide DNA analizlerinde PCR tekniğinin kullanılması ile birlikte eski materyallerden DNA izolasyonu ve DNA’nın çoğaltılması mümkün hale gelmiş ve eski DNA çalışmaları antropolog ve arkeologlar için geniş bir çalışma alanı oluşturmuştur (Paabo ve ark., 1989). Ancak bu alanda yapılan çalışmalarda bir takım teknik yetersizlikler ve sorunlar mevcuttur. Bu sorunlardan en önemlisi de çalışılacak örneğin özgün olup olmadığıdır (Wayne et al., 1999). Eski DNA örneklerinde kontaminasyon riski yüksek olmakla birlikte çok az miktarlarda

meydana gelecek kirlenmeler dahi materyalin özgünlüğünü bozabilmektedir. Kontaminasyon bu nedenle aDNA çalışmalarında son derece büyük bir sorun haline gelmiştir.

Kontaminasyon sorunu DNA izolasyonunda kullanılacak malzemenin toprağın altında beklemesi ile başlar. Bu esnada malzemeye temas edebilecek en küçük bir canlı bile malzemenin özgünlüğünü bozabilmektedir. Kontaminasyonla ilgili bölüm iki de belirtilen bütün önlemler alındıktan sonra numuneden DNA izolasyonuna başlanılabılır.

DNA molekülleri hücre içerisinde ve diğer hücre organelleri ile birlikte bulunmaktadır. Bu nedenle DNA çalışmalarında öncelik bu kalıtım materyalinin diğer organellerden izolasyonudur. Burada dikkat edilmesi gereken en önemli husus çoğaltılabılacak kadar DNA'nın izole edilmesidir. DNA'nın izolasyonu, değişik organizma gruplarında hatta aynı organizma grubu içerisinde farklılıklar gösterse de temelde üç aşamadan meydana gelir.

1. Hücre duvarının parçalanması
2. DNA protein kompleksinin çözülmesi
3. DNA'nın ortamdaki diğer moleküllerden ayrılması

Değişik organizmalardaki yapısal farklılıklar bu organizmalardan DNA izolasyonunda da farklı kimyasalların kullanımı zorunlu kılmaktadır (Kotan, 2010).

3.1.1. Antik Kemikten DNA İzole Etmede Kullanılan Yöntemler

3.1.1.1. Fenol kloroform yöntemi

Bu yöntem protein komponentlerini uzaklaştırarak nükleik asitleri saflaştırmayı hedeflemektedir. Temel olarak fenol kloroform ekstraksiyon yönteminde;

- Fenol proteini bağlar ve etkili bir şekilde denatüre eder.
- Kloroform ise fenolü bağlar.
- Fenol benzen halkasına OH- molekülünün bağlanmasıyla oluşan bir

kimyasaldır. İyi bilinen bir kanserojen olmasının yanı sıra son derece aşındırıcıdır ve ciddi yanıklara neden olabilir. Kimyasal adı triklorometan olan kloroform ise yağları çözen ve toksin etkisi yüksek bir maddedir. Bu nedenle fenol ve kloroform hem DNA'nın bozulmasına neden olabilir hem de kullanıcıya zarar verebilir. Ayrıca fenol kloroform ekstraksiyonunun çok basamaklı bir metot olması dolayısıyla DNA kayıplarının oluşmasını ve kontaminasyon riskini arttırması açısından uygulanması zor bir yöntemdir (Kotan, 2010).

3.1.1.2. Silika yöntemi

Silika yönteminde hücre parçalayıcı olarak Guanidium izotiyosiyanat kullanılmaktadır. Guanidium izosiyanat hücrelerin parçalanması ile açığa çıkan RNA'nın degradasyonunu engelleyen bir kimyasaldır.

Silika yöntemi ile; DNA ekstraksiyonu guanidium izotiyosiyanatın pozitif yüklü amin grupları içeren ucuna DNA, diğer ucuna da silika parçacığının bağlanması esasına dayanan bir metottur. DNA'nın silikaya bağlanması sonrası yapılan yıkama işleminde ortamda bulunan protein ve istenmeyen komponentler uzaklaştırılır ve DNA ortamdaki daha saf halde elde edilir. Bu sayede PCR inhibitörlerinin bir kısmı da ortamdaki uzaklaştırılmış olur ve PCR için daha yüksek kalitede ve miktarda DNA izolasyonuna imkân sağlar. Fakat fazla kontaminasyon olması veya farklı iyon değişimi DNA'nın silikaya bağlanması engelleyebilir ve bu gibi durumlarda pozitif sonuç alınamayabilir. Yine de yüksek molekül ağırlıklı DNA geri kazanımları için tercih edilecek en uygun metot silika yöntemidir(Kotan, 2010).

3.2. RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZLAR ARACILIĞI İLE DNA'NIN KESİLMESİ

Bu aşamada izole edilen DNA molekülleri restriksiyon endonükleaz (RE) denilen enzimlerle kesilirler. RE enzimleri, kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki çok özel bölgelerden DNA'yı kesen yapılardır. Günümüzde 300'e yakın farklı DNA dizilimini tanıyan yaklaşık 3000'den fazla RE enzimlerinin varlığından söz edilmektedir. RE enzimlerinin çok büyük bir kısmı bakterilerden, çok az bir kısmı da virüs ve ökaryotlardan izole edilmiştir (Temizkan ve ark., 2008).

3.3. JEL ELEKTROFOREZİ KULLANILARAK FARKLI BOYUTLARDA Kİ DNA'LARIN AYRILMASI

Elektroforez, elektriksel bir alanın etkisi altında sıvı bir ortamda yüklü partiküllerin göçüdür. Genel olarak DNA kantasyonu yani miktarını belirlemek için kullanılır. Bu aşamada RE enzimleri aracılığıyla kesilen DNA parçaları boyutlarına göre bir birinden ayrılır.

3.4. JELDE KALAN DNA'LARIN DESTEK MEMBRANA ALINMASI

Jel elektroforezi işlemi bittikten sonra jeldeki DNA destek membrana aktarılır. Bu aktarma için birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. En bilinenleri;

- Kapiller transfer
- Elektroforetik transfer
- Vakumlu transfer

3.5. DNA'NIN KOPYALANMASI VE ANALİZİ

Bu son aşamada elde edilen DNA parçaları çoğaltılıp görüntülenmeye hazır hale getirilir. DNA'nın çoğaltılması ve diziliminin görüntülenmesin de, yapılan

araştırmanın amacına göre birçok farklı araç ve yöntem kullanılmaktadır (Gigli, 2011; Kotan, 2010).

Bunlar:

1. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
2. Gerçek Zamanlı PCR (Real -Time PCR)
3. Yeni Nesil DNA Dizileme (Next Generation Sequencing (NGS))
4. RFLP (Restriction fragment length polimorphism)
5. STR (Short Tandem Repeat) Kısa Ardışık Tekrar Dizileri

3.5.1. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin Kary Mullis tarafından 1985 yılında tanımlanmasından sonra nükleik asit amplifikasyon yöntemleri hızla tanı laboratuvarlarına girmiştir. Hızlı sonuç vermesi, konvansiyonel yöntemlerle saptanması zor ya da imkânsız mikroorganizmaları saptayabilmesi ve yüksek duyarlılığı nedeniyle klinik mikrobiyoloji alanında önemli bir tanısal yöntem haline gelmiştir (Pınar ve ark., 2009).

PCR işleminde amaç, dizilimi bilinen iki bölge arasında bulunan bir DNA parçasını çoğaltmaktır. Bir DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri sentetik tepkimenin primerleri olarak iki oligonükleotit kullanılır. Bu oligonükleotitler tipik olarak farklı dizilere sahiptir. Yine bu oligonükleotitler, kalıp DNA'nın karşı dizilerinde uzanan ve kopyalanacak DNA'nın parçası yanında bulunan dizilere eştirler. Kalıp DNA ilk önce iki oligonükleotidin ve dört deoksiribonükleozid trifosfatın (Dntp) varlığında, ısıyla denatüre edilir. Daha sonra tepkime karışımının ıslısı, oligonükleotid primerlerinin kalıp dizilere yapışmasına olanak verecek şekilde düşürülür. Primerler yapıştıktan sonra uygun bir ısıya çıkarılarak DNA polimeraz ile

uzatılır. Denatürasyon, annealing (yapışma) ve DNA sentezi döngüleri bu şekilde birçok kez tekrarlanır. Amplifikasyonun bir döngüsünün ürünleri sonraki için kalıp görevi gördüğünden her bir başarılı döngü temel olarak istenilen DNA ürününün miktarını ikiye katlar (Devrim ve Kaya, 2004; Temizkan, 2008).

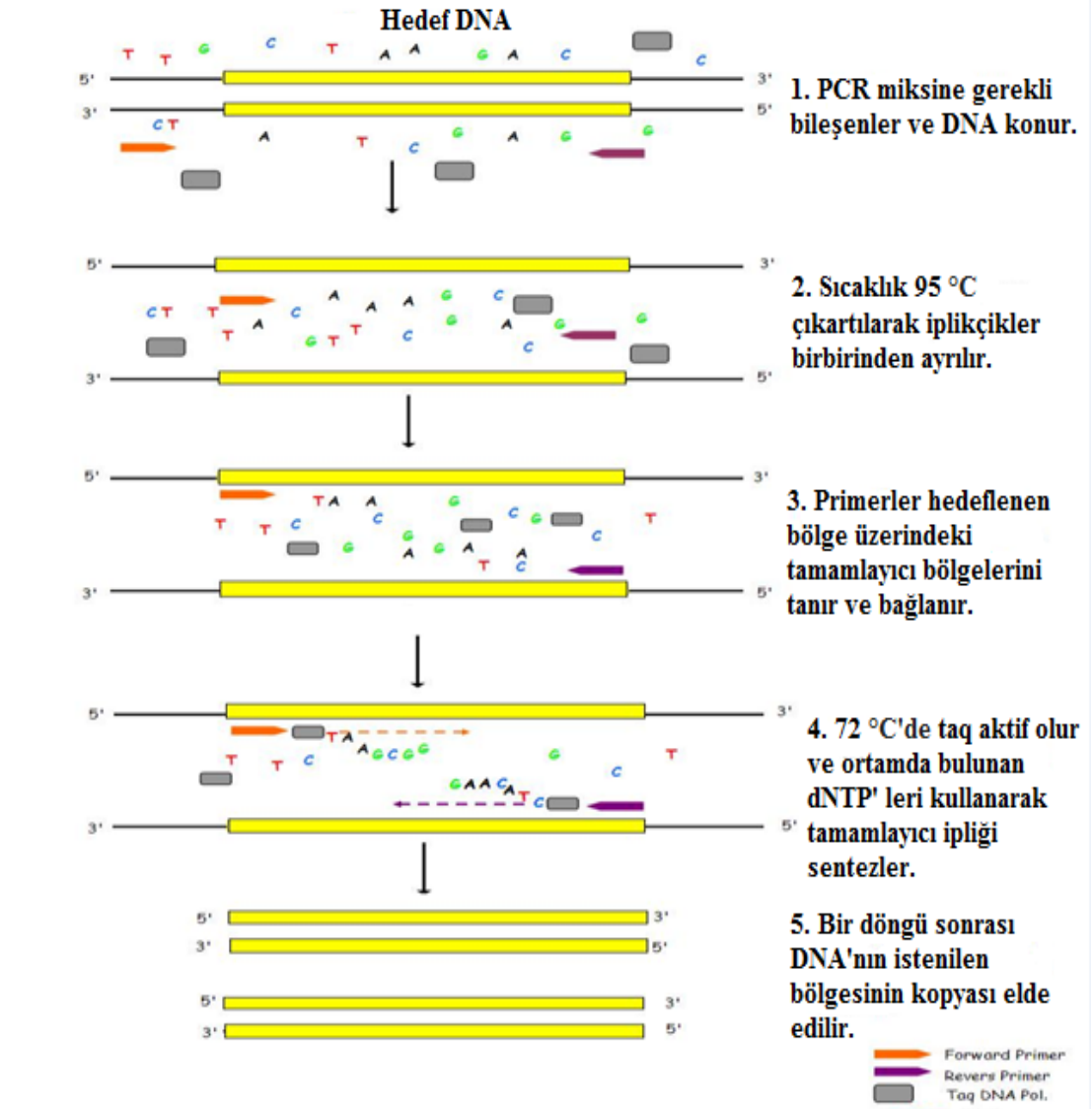
PCR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. İlk basamak denatürasyondur ve 94°C'ye ısıtılan DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılması söz konusudur. İkinci basamak birleşmedir (annealing). Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları ile bağlanırlar. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 50-70°C arasındadır. Üçüncü basamak polimerizasyon ya da sentez aşamasıdır. Reaksiyon karışımı sıcaklığa dirençli DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklık olan 72 °C getirildiğinde, primerlere bağlanan enzim molekülleri dizinin 3' ucuna kalıp DNA'ya uygun nükleotitleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanişta iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının birer kopyası çıkartılarak başlangıçtaki DNA miktarı her döngüde geometrik olarak çoğaltılır (Pınar ve ark., 2009).

Antik DNA çalışmalarında bu alana özgü en ciddi sorun yeterli miktarda özgün DNA elde edilememesidir. Cooper ve Poinar 2000 yılında antik DNA veri ve sonuçlarının kalitesini sağlamak için hazırlanmış dokuz kriter yayınladı. Daha sonra bu kriterler 2005 yılında Gilbert ve arkadaşları tarafından daha detaylı ve kapsamlı bir hale getirildi. Bu kriterler uygulanmasına rağmen özellikle antik insan kalıntılarıyla ilgili çalışmalarda, önceden oluşma ihtimali yüksek olan kontaminasyon özgün DNA verimini azaltmaktadır. Bu sorunun ortadan kaldırması

için son yıllarda PCR teknolojisinde bir takım değişikliklere gidilmiştir. Kantitatif PCR (Q-PCR) ve çoklu PCR (Multiplex-PCR) bu amaçla geliştirilmiş PCR uygulamalarıdır. Kantitatif PCR, bir PCR ürünün başlangıç miktarını ölçmek için, çoklu PCR'da birden fazla primer çifti kullanılarak birden fazla sekansı eş zamanlı gerçekleştirmek için kullanılır (Gigli, 2011).

Yukarıda belirtildiği üzere aDNA çalışmaları, özgün ve az miktarda hasarsız DNA'ya ulaşılması ve PCR sürecinde ortaya çıkan problemler nedeniyle oldukça zor bir süreçtir. Bu zorlukların aşılması için teknolojik gelişmelerle paralel olarak yeni yöntemler uygulanmaktadır. Bu yöntemlerden biride Blow ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve uygulanan "Genomewide adapter-mediated emulsion PCR amplification" (Genom içinde adaptör emülsiyonu ile PCR amplifikasyonu) yöntemidir. Araştırmacılar tahminen 45 bin ile 69 bin yıllık fosil memeli kalıntılarında bu yöntemi uygulamışlardır. Sonuç olarak daha önce mtDNA elde edilememiş bu örneklerde, soyu tükenmiş memelilerin filogenetik sınıflandırmalarını ve diğer canlılarla karşılaştırmalarını yapabilecek kadar nükleer DNA elde edilmiştir. Bu çalışmada da gösterildiği gibi aDNA çalışmalarında gelişen teknolojiyi ve farklı yöntemleri kullanmak, geçmişte yaşamış canlıların tanımlanması ve sınıflandırılmasını çok daha mümkün kılmaktadır (Blow ve ark., 2010)

Şekil 19: PCR Döngüsü



3.5.2. Gerçek Zamanlı PCR (Real -Time PCR)

Gerçek zamanlı PCR (Real-time PCR) yöntemi çeşitli amaçlarla nükleik asitlerin kalitatif veya kantitatif olarak saptanabilmesi amacıyla kullanılabilir. Realtime PCR yöntemini, daha önceden geliştirilmiş olan standart PCR yönteminden ayıran iki önemli özellik vardır: Birincisi, real-time-PCR yönteminde termal döngü cihazıyla birleştirilmiş bir optik okuma sisteminin kullanılmasıdır. İkincisi ise, PCR işlemi sırasında amplifikasyonu bilgisayar ekranına yansıtacak bir probun veya problemin bulunması gereğidir. Bu nedenle özellikle uygun prob seçimi, real-time

PCR işleminin verimliliğini etkileyen en önemli basamaklardan biridir. Proben işlevi, cihaz içerisinde gerçekleştirilmiş olan çoğaltma işleminin, gözle görülür hale getirilmesidir. Prob kullanılmadan da, PCR tüpü içerisinde uygun primerlerin, dNTP'lerin ve enzimin kullanımıyla PCR işlemi gerçekleşecektir. Ancak prob kullanılmadan sonucun real-time PCR cihazının bilgisayarında görüntülenmesi mümkün olmayacaktır. Problar, florofor denem ve belirli dalga boyundaki ışıkla uyarıldığında florsan ışımaya yayılabilme özelliğine sahip sentetik oligonükleotidlerdir. Genel olarak bakıldığında prob dizileri, PCR tüpü içerisinde çoğaltma işlemi gerçekleşirken, çoğaltılmış olan hedef DNA zincirlerine bağlanarak florsan ışımaya oluşmasına neden olurlar. Bu işlemin gerçekleşebilmesi için problar, hedef DNA'nın belirli bir dizisine komplementer olacak şekilde dizayn edilmelidirler. Prob, tek zincirli hedef DNA üzerinde komplementer olduğu bölgeye bağlandıktan sonra, real-time PCR cihazının ışık kaynağı, PCR tüpü içine uyarıcı kısa dalga boylu ışık gönderir. Kısa dalga boylu ışığın absorpsiyonu sonrasında, uzun dalga boylu ışık salınımı oluşur. Böylece gerçekleşen florsan ışımaya, cihaz tarafından algılanır. PCR tüpü içerisinde ne kadar çok hedef DNA varsa o kadar çok prob bağlanacak ve florsan ışımaya miktarı da o derecede fazla olacaktır. Real-time PCR işlemi ile çoğaltılmış olan hedef dizilerin görüntülenebilmesi amacıyla kullanılan çeşitli problar mevcuttur. Buradaki temel amaç, çoğaltılmış olan PCR ürünleriyle, kullanılan probun etkileşime girmesinin sağlanmasıdır. Bunun sonucunda hedef DNA'ya florsan veren boyların bağlanmasıyla DNA kantitasyonu mümkün olabilmektedir. Real-time PCR yönteminde florsan kimyası, iki sınıf altında incelenebilir: Jenerik (genel) yöntemler ve zincire özgül yöntemler. Jenerik yöntemlerde DNA'ya özgül olmadan bağlanan problar kullanılır. Bir başka deyişle

bu yöntemde kullanılan proplar PCR tüpü içerisindeki her çift zincirli DNA'ya bağlanarak florsan oluşmasına neden olurlar. Zincire özgül yöntemlerde kullanılan proplar ise, primer bağlanma bölgeleri arasındaki hedef DNA'nın komplementer bir bölgesine bağlanarak florsan ışımaya neden olurlar. Bu yöntemlerin avantajı, primer-dimer bağlanması gibi özgül olmayan çoğaltma ürünlerinin florsan ışımaya sonuçlanmamasıdır. Bu nedenle özgüllükleri daha yüksektir ve daha iyi sinyal oluşumu sağlarlar (Pınar ve ark., 2009).

3.5.3. Yeni Nesil DNA Dizileme (Next Generation Sequencing (NGS)) Yöntemi

Yeni nesil DNA dizileme sistemleri ile fosil, saç ve kemik gibi donmuş veya korunmuş örneklerden elde edilen DNA'ların geniş kapsamlı analizlerini yapmak mümkündür. Dizileme sonucunda, atasal hedef diziler çevresel kontaminasyondan ayırt edilebilir. Yeni nesil DNA dizileme sistemleriyle yüksek doğrulukla, ultra hızlı olarak dizileme yapılabilmektedir. Bu yöntemle elde edilen bir mikrobiyal genom dizisi araştırmacılara başka hiçbir deneysel yöntem ile elde edilemeyecek kadar zengin ve özgün bilgi sağlamaktadır. Yeni nesil DNA dizileme tekniği "De nova dizileme", "Shotgun ve Paired-end dizileme" yöntemlerini kapsamaktadır. Bütün genom dizileme sistemi ile dizileme küçük DNA parçacıkları ve adaptör dizilerinin pikolitre hacimlerde büyük çaplı paralel dizileme ile dizilenmesi prensibine dayanmaktadır. Shotgun dizileme metodu uzun DNA parçalarını dizilemek için kullanılır. Bu metotta büyük boyutlardaki genomik DNA veya bakteri yapay kromozomları fiziksel olarak, rastgele küçük (300-800 bp) boyutlara parçalanır. Bu DNA parçacıkları, uçlarına eklenen adaptörlerden DNA yakalama boncukları tarafından tutularak bir DNA kütüphanesi oluşturulur. Daha sonra her bir boncuk tarafından yakalanan DNA parçacığı ayrı ayrı dizilenir ve okunan bütün parçalar

biyoinformatik yazılımlarla birleştirilir. Günümüzde kullanılan yeni nesil dizileme sistemleri; Roche 454 genome analyzer, Illumina Genome Analyzer, Applied BioSystem SOLID, Complete Genomics, Helios, Pacific Biosciences ve Ion Torrent'dir. Yeni nesil DNA dizileme teknolojisi hayal bile edilemeyecek kadar çok bilgi ve yeni yaklaşımlar sağlar. Fakat bu kadar çok bilginin depolanması, analizi ve değerlendirilmesinde büyük güçlükler vardır. Yeni nesil DNA dizileme teknolojisinin başarılı bir şekilde kullanılması için gelişmiş biyoinformatik analiz araçlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca çok sayıda kısa okuma elde edilmesinde önemli bir problemdir. Okuma uzunluğu ve hata oranı konusu hala geliştirilmektedir. İnsan evrimiyle ilgili çalışmalarda yeni nesil dizileme ile 38 bin ile tarihlendirilmiş bir *Neanderthal* fosilinden elde edilen antik DNA, dizilerek günümüz insan ve şempanze DNA'ları ile karşılaştırılmış ve *Neanderthal* DNA dizisinin modern insan DNA dizilerinden 500 bin yıl kadar önce birbirinden ayrıldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada *Neanderthal* kemiğinden (0,3 gr) elde edilen parçalanmış 8341 mtDNA dizisi, yazılım programı ile birleştirilerek 4.8 Gb'lık tam mtDNA dizisi elde edilmiştir. *Neanderthal* mtDNA'sı ile modern insan mtDNA'sı dizilerek karşılaştırılmış ve *Neanderthal* mtDNA'sında kodlanan 13 protein ve elektron transpor zincirinde sitokrom-c oksidaz'ın iki alt biriminde çok sayıda amino asit değişimleri tespit edilmiştir (Üstek ve ark., 2011).

3.5.4. RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism)

Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism) olarak adlandırılır. Restriksiyon endonükleazları (RE) olarak bilinen enzimler DNA'yı 4-6 baz çiftinden oluşan tanıma bölgelerini kullanarak keserler. Enzim tanıma bölgesinde oluşan bir

değişiklik, bölgenin enzimlerce tanınmamasına ve kesme işleminin gerçekleşmemesine sebep olur. Bu yöntem polimorfizm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. İlki Hamilton tarafından keşfedilen Hind III başta olmak üzere, 200 den fazla farklı bakteri türünden, her biri bakterinin orijinal isminin kısaltması ile anılan çok sayıda restriksiyon enzimi bulunmuştur. Her DNA molekülü farklı kesim noktalarına sahip bölgeleri içerir. Bu DNA bölgeleri aynı restriksiyon enzimi kullanılarak kesildiğinde bireylerin taşıdığı mutasyonlara bağlı olarak değişik miktar ve uzunlukta parçalar elde edilebilmektedir. Yöntem temelde dört adımdan meydana gelmektedir; DNA izolasyonu, PCR, elde edilen PCR ürününün restriksiyon enzimleri kullanılarak kesimi ve elektroforez ile kesilen fragmanların ayrımı, görüntülenmesi (Boyacıoğlu ve Dündar, 2012).

İnsan genomunun yalnızca %3'ünü protein kodlayan genler yani ekzonlar, geri kalan %97'sini ise intronlar ile görevi bilinmeyen veya tespit edilmemiş DNA oluşturur. Bu %97 DNA, çöp DNA olarak adlandırılır. İnsan DNA'sı kişiden kişiye yapısal değişiklik gösterebilmektedir. Bu değişikliklerin çoğu kodlayıcı olmayan bölgelerde olmakla birlikte kodlayıcı bölgelerde de olabilir ve bu olay bir proteinde saptanabilir bir değişiklik olarak ifade edilir veya sessiz kalır. Bu yapısal değişikliklerin yaygın bir şekli, baz çiftlerinin bir ile yüzlerce kez ardışık değişken tekrarıdır (Tandem Repeats). Baz çiftlerindeki bu farklı dizilimler, çeşitli sınırlayıcı enzimler tarafından kesilen DNA'nın, kesilme bölgelerinde değişikliklere neden olur ve bu bölgeler arasındaki DNA uzunluğu değişir. Bu yüzden farklı kişilerin restriksiyon enzimlerince kesilmiş DNA parçalarında uzunluk polimorfizmi (RFLP) vardır. Özetlenecek olursa polimorfik bir bölge restriksiyon enzimlerinden biri için hedef kesim bölgesi oluşturuyorsa, RFLP yöntemiyle kesim bölgesinin varlığı veya

yokluğuna bakılarak polimorfizm belirlenebilir. RFLP analizi, suçluların araştırılması, babalık tayini ve popülasyon genetiği çalışmalarında belirgin bir değere sahiptir. İnsan ve hayvan evriminin incelenmesi ve kalıtsal hastalıklara neden olan genlerin kromozom üzerindeki yerleşimini saptamada da değeri vardır. Bu yöntem dört temel adımda gerçekleştirilmektedir. Bunlar DNA'nı izolasyonu, DNA'nın RE ile kesimi, kesilen DNA'nın elektroforezi ve en son aşamada ise jeldeki DNA parçalarının görüntülenmesidir (Devrim ve Kaya, 2004).

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

“STR” kısa ardışık tekrarlardır. Zarar görmüş DNA örneklerinden bile çalışmayı kolay hale getirmeleri açısından büyük avantaj sağlayan STR bölgeleri genomda hemen hemen bütün kromozomların üzerinde bulunur. STR bölgelerindeki tekrar sayısının bireyden bireye farklılık göstermesi ve düşük mutasyon oranına sahip olması kimliklendirme çalışmalarında STR'leri genetik işaretleyici olarak ön plana çıkarmıştır. STR çalışmaları Y ve X kromozomları üzerindeki STR'ler olmak üzere iki çeşittir. Y-STR analizleri, otozomal STR bölgelerinden farklı olarak sadece erkeklerde bulunan Y kromozomu üzerindeki kısa tekrar bölgelerinde yapılan çalışmalardır. Y kromozomunun otozomal genler taşıyan küçük bir parçası dışında kalan bölgeleri mayozda rekombinasyona girmez ve bu sebeple Y-STR'ler birbirleri ile bağlı haplotipler olarak kalıtılır. Bu da kuşaklar boyunca baba tarafından tüm erkek akrabalarda Y-STR profilinin aynı olması ile sonuçlanır. Bu özellikleri sebebi ile Y-STR sistemleri antropolojik çalışmalarda, geniş ailelerde soy ağacı çıkartılmasında ve adli olaylarda babaya ulaşılamadığı durumlarda babalık testlerinde büyük avantajlar sağlar. Yakın zamana kadar rutin olarak kullanılmayan X-STR analizleri otozomal STR ve Y-STR analizlerine göre daha sınırlı bir kullanım

alanına sahiptir. Ancak büyük anne torun ilişkisinin ortaya konulması ve çocuğun kız olduğu ve anneden örnek almanın mümkün olmadığı babalık testleri gibi bazı özel durumlarda yararlı bilgiler sağlamaktadır.

Y kromozomal STR polimorfizmi, göç yollarının araştırılmasında, antropolojik, evrimsel ve adli bilimlerde son yıllarda gittikçe artan bir kullanıma sahiptir. Bu tekrarlar sadece erkek ebeveyn tarafından kalıtıldığından aynı soydan gelen tüm erkeklerde yeni bir mutasyon olasılığı dışında birçok nesil boyunca aynı haplotip görülecektir. Özellikle baba adayının bulunamadığı ya da baba adayının biyolojik materyalinden DNA elde edilemediği durumlarda çocuk erkek ise baba adayının soy ağacında yer alan dede, amca, kuzen vs. gibi herhangi bir erkeğin Y-STR sonuçları olayın aydınlatılmasında yardımcı olmaktadır. Eski Amerika Birleşik Devletleri Başkanlarından Thomas Jefferson'un hizmetçisinden oğlu olduğu Y-STR'yi de kapsayan Y kromozom polimorfizmine bağlı bir dizi parametre çalışılarak ortaya konmuştur (Aşıcıoğlu, 2002).

BÖLÜM IV

4. ANTİK DNA ÇALIŞMALARININ KULLANIM ALANLARI

Son yıllarda aDNA çalışmalarının artması bu alana büyük ilgi olduğunu göstermekle birlikte, aDNA çalışmaları değişik alanlarda ki birçok konuya da ışık tutmaktadır (Kefi, 2011). Yüksek kapasiteli dizileme teknolojisinin, insan ve hayvan genomlarının tamamının dizilenmesi için gerekli olan maliyet ve zamanı büyük ölçüde azaltmasıyla birlikte bu teknolojiler doğayı ve var olan çeşitliliği daha iyi anlamamıza olanak sağlamıştır (Shapiro ve Hofreiter, 2010).

Kaestle ve Horsburgh, 2002 yılında yayınladıkları makalelerinde aDNA çalışmalarının kullanım alanlarını, kullanılan kaynak materyal ve çalışma amacına göre iki temel başlık altında incelemiştir. Bunlar:

1. *İnsan kaynaklı aDNA çalışmaları*

- a. Bireysel seviyede; cinsiyet tayinleri
- b. Ailesel seviyede; soy ve akrabalık ilişkileri
- c. Popülasyon seviyesinde; nüfus hareketleri ve göçler
- d. Tür seviyesinde; evrim ve türleşme

2. *Hayvan ve bitki kaynaklı aDNA çalışmaları*

- a. Çevresel şartların belirlenmesi; yaşam ortamlarının anlaşılması
- b. Mevsimsel göçler ve nüfus hareketleri; hayvan göçlerine bağlı insan hareketleri
- c. Beslenme; tarih öncesi dönemlerde beslenme alışkanlıkları
- d. Diğer biyolojik kalıntılar; tedavi amaçlı kullanılan bitkiler ve araç-gereç olarak kullanılan biyolojik maddeler
- e. Hayvanların evcilleştirilmesi; evcilleştirme sürecinin anlaşılması

f. Enfeksiyon hastalıkları; hastalıklara sebep olan bakterilerin kökeninin belirlenmesi

g. Primatlar; insan evrimine ışık tutmak (Kaestle ve Horsburgh, 2002), aDNA çalışmalarının antropolojide kullanım alanlarını da Kaestle ve Horsburgh (2002), genel olarak beş temel başlık altında toplamıştır. Bunlar:

1. Cinsiyet tayini
2. Soy ve akrabalık ilişkileri
3. Nüfus hareketleri ve göçler
4. Evrim ve filogenetik araştırmalar
5. Hayvan ve bitki kaynaklı aDNA (Kaestle ve Horsburgh, 2002).

Tablo 4: aDNA'nın Antropolojide Kullanım Alanları (Kaestle ve Horsburgh, 2002)

Uygulama	İçerdiği Konular	Kullanılan Biyolojik Moleküller
Cinsiyet tayini	Evlilik ve defin şekillerini anlama, cinsiyetler arasındaki ölüm oranları, hastalıkların dağılımı, diyet ve sosyo-ekonomik durumun belirlenmesi	Cinsiyet kromozomları
Hayvan ve bitki aDNA'sı	Avcılık ve beslenme alışkanlıkları, hayvan ve bitkilerin evcilleştirilmesi ve çevresel şartların belirlenmesi; insanlarla aynı ortamda yaşayan hayvan ve bitkilerin belirlenmesi, tarih öncesi ve günümüzdeki hastalıklar arasındaki ilişkilerin izlenmesi	mtDNA, kloroplast ve otozomal DNA
Soy ve akrabalık ilişkileri	Sosyal yapıyı, statüyü, evlilik biçimlerini, ölü gömme geleneklerini ve göçleri anlama	mtDNA, Y- kromozom, otozomal mikrosatellitler
Nüfus Çalışmaları	Tarih öncesi nüfus hareketlerini, gruplar arasındaki ata torun ilişkilerini, benzer ya da farklı morfolojiler veya kültürel kalıntılar yardımıyla antik gruplar arasındaki ilişkileri anlama	mtDNA, cinsiyet kromozomları ve otozomal DNA
Filogenetik çalışmalar	Türlerin evrimsel ilişkilerini ve modern insanın kökenini anlama	mtDNA, cinsiyet kromozomları ve otozomal DNA

4.1. CİNSİYET TAYİNİ

DNA analizlerinin paleodemografi, antropoloji ve arkeolojideki en önemli kullanım alanlarından biri cinsiyet tayinleridir. DNA analizlerinin gelişmesiyle, eski kemiklerden, DNA aracılığı ile cinsiyet tayini artık yapılabilmektedir. aDNA çalışmaları X ve Y kromozomlarını kullanarak kişinin cinsiyetini belirlememizi ve kim olduğunu tespit etmemizi sağlar. Cinsiyet tayinlerinin DNA analizleri ile yapılabilmesi, morfolojik yapılarından cinsiyet tayini yapılamayan iskeletlerde ve özellikle bebek iskeletlerinde çok önemli rol oynamaktadır. Çocuk iskeletlerinin önemi, hem mezar tipinin anlaşılması hem de cinsiyetin bir infantisit (kendi çocuğunu öldürme) veya çocuk kurban olayına bağlı bir rolü olup olmadığı sorusunun cevaplanması açısından önemlidir. Bu konuyla ilgili ilginç bir örnek; Ashkelon'da yapılan kazılarda, 4 ve 6. y.y'lar arasında genelev olarak işletilen bir Roma hamamının altındaki kanalizasyonda 100'e yakın bebek kalıntısı ortaya çıkarılmıştır. 43 sol femur kullanılarak yapılan genetik cinsiyet analizleri ile 19 bireyin 14'ünün erkek ve 5'inin kız olduğunu anlaşılmıştır. Erkek çocukların %74 gibi yüksek bir oranda ölü olması ya da öldürülmesi şaşırtıcıydı; çünkü toplum genelinde kız çocuklarının daha az olduğu bilinmekteydi. Bundan dolayı bebek kalıntılarının genelev çalışanlarına ait olduğu fikri ileri sürülmüştür. Ortada bir tercih söz konusuydu ve kadınlar bilinçli olarak erkek çocukları öldürüp kız çocuklarının yaşamalarına izin veriyorlardı. Kalıntıların cinsiyetinin belirlenmesi farklı cinsteki bireylerin ölüm oranlarının test edilmesi bakımından önemlidir. Böylece durumun doğal olarak mı yoksa insan faaliyeti ile mi gerçekleştiği hakkında fikir sahibi olunmuştur (Gral, 2007; Kaestle ve Horsburgh, 2002).

aDNA çalışmaları tanınmayan ve kimliklendirmenin yapılamadığı insan kalıntılarında kimliklendirme yapmak için kullanılmaktadır. Buna örnek olarak Vietnam savaş kurbanları, Tsunami gibi doğal afet kurbanları verilebilir. aDNA çalışmaları aynı zamanda bazı annelik-babalık davalarında ebeveyn tespiti için de belirleyici olmuştur. Bazı şüpheli tarihsel olayların aydınlatılması aDNA çalışmaları sayesinde gerçekleşmiştir. Örneğin Rusya'nın son Çarı Romanow ailesinin 1918'de kaybolan kalıntıları 1996 yılında mtDNA ve STR ile yapılan aDNA çalışmaları sayesinde bulunmuştur. Ve yine benzer şekilde 1795'de Temple'de ölmüş olduğu bilinen XVII. Louis'e ait kalıntılardan elde edilen mtDNA çalışmaları ile XVII. Louis'in, XVI. Louis ve Kraliçe Marie Antoinette'nin oğlu olmadığı ortaya çıkmıştır (Kefi, 2011).

4.2. SOY VE AKRABALIK İLİŞKİLERİ

Arkeolojinin DNA analizlerinin yardımı ile yanıt vermeye çalıştığı başlıca sorulardan biri, kültürlerin gelişmesinde ve yerleşimlerde aynı soy ve akrabalık ilişkilerinin derecesine bakılmasıdır (Güral, 2007). Soy ve akrabalık analizleri antropoloji alanında çok uzun süredir kullanılmakla birlikte bu analizler geçmişe de ışık tutmaktadır. Basit düzeyde, anasal ve babasal soylar mtDNA ve Y kromozomu kullanılarak ortaya çıkarılabilmektedir. Eğer uzun ve birbirinden çok farklı DNA bölgeleri dikkatle gözden geçirilecek olursa, bireylerde görülen ortak mutasyonların bireyler arasındaki yakınlık derecesine işaret ettiği belirlenmiştir. Mayotik bir mutasyon olmadığı takdirde, dişi bir birey aynı mtDNA mutasyonunu annesi, teyzesi, dayısı ve anne tarafından kuzenleriyle paylaşır. Erkekler de yine benzer şekilde, mayotik bir mutasyon olmadığı sürece, aynı Y kromozom mutasyonunu babası, amcası, erkek kardeşleri ve baba tarafından kuzenleriyle paylaşır. Örneğin St.

Margareth kilisesinde (İngiltere) yapılan kazılar sonucu açığa çıkan gerçekler oldukça şaşırtıcı olmuştur. Kilisedeki mezar taşları üzerindeki yazıtlar Königsfeld ailesinin 8 erkek üyesinin (7 kuşaktan) 1546-1749 yılları arasında oraya gömüldüğünü işaret eder. Fakat 8. iskelet, mezarlık hırsızları tarafından yerinden kaldırılmıştır. Bu 7 birey üzerinde yapılan genetik testlerin sonuçları ile tarih kaynakları arasında uyuşmayan bazı noktalar vardır. Erkek olduğu düşünülen bu 7 bireyin 2 sinin bayan olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca otozomal ve Y kromozomu mikrosatellit analizleri bazı başka anomalileri ortaya çıkarmıştır. Markerlar, yaşça büyük ve en kıdemli iki kontu (Hanns Christoph ve Hans Sigmund) ait iskeletlerin muhtemelen kazılar sırasında yer değiştirdiğini ve Georg Josef'in önceki kontu (Josef Wilhelm) biyolojik oğlu olamayacağını göstermiştir. Bu nedenle, bu kişi, ya Königsfeld ailesinin bir üyesi değildi ya da babası bu aileden değildi. Bayan bireylerden birinin otozomal haplotipi bu kişinin Georg Josef'in kızı ve Karl Albrecht'in kız kardeşi olduğunu ortaya çıkardı, oysaki tarihsel delillere göre bu kişinin Karl Albrecht'in kendisi olduğu sanılmaktaydı. Diğer bayanın otozomal haplotipi ise o kişinin Maria Ann'in annesi olduğunu doğrulamıştır (Kaestle ve Horsburgh, 2002).

4.3. NÜFUS HAREKETLERİ VE GÖÇLER

Son zamanlarda aDNA çalışmaları ve DNA dizileme yöntemlerinde uygulanan yöntem ve tekniklerin geliştirilmesi ve uygulanabilirliklerinin artması, antik dönemlerde yaşamış insanların genetik çeşitliliğine ve dağılımına daha net ışık tutmaktadır (Shapiro ve Hofreiter, 2010). Tarih öncesi dönemlere ait nüfus hareketleri, nüfus yoğunluğu ve göç gibi konular aDNA çalışmaları sayesinde aydınlanmaktadır.

Genetik varyasyon bir grubun atalarından miras olduğundan bu varyasyon modern gruplarda da gözlenmektedir. aDNA çalışmalarından elde edilen DNA dizilimleriyle modern gruplara ait DNA dizilimleri karşılaştırıldığında bu varyasyona rastlanabiliyorsa tarih öncesine ait bir grubun nüfus hareketleri ve ata-torun ilişkileri hakkında yorum yapılabilinmektedir. Bununla birlikte antik ve modern grup arasındaki DNA diziliminin bir birinden çok farklı olması bu iki grubun bir birinden uzak olduğunu göstermektedir (Kaestle ve Horsburgh, 2002).

Tarih öncesi insanların nüfus hareketleri ve göçleri ile ilgili aDNA çalışmaları, birçok cevapsız soruya çözüm aramakla birlikte temelde en çok tartışılan iki soru üzerine odaklanmıştır. Bunlardan birincisi; Orta Doğuluların Avrupalıların atası olup olmadığı sorusu, ikincisi de Avrupa’da tarımın ne zaman ve kimler tarafından başlatıldığı ve yayıldığı sorusudur. Orta Doğu’luların Avrupalıların atası olup olmadığı ile ilgili tartışmalar, Bereketli Hilal üzerinde gelişen tarımın, Anadolu üzerinden Avrupa’ya yayılırken bunun sadece kültürlerin değil, aynı zamanda genlerin ve dillerin de yayılımına yol açması teorisi ile ortaya çıkan tartışmadır. 1970’lerde başlayan ve Ammerman ile Cavalli-Sforza’nın ileri sürdükleri “nüfus yayılımı” adı verilen bir model ile yıllarca devam eden bir tartışma başlamıştır: Bu modeli öne süren araştırmacılar, Avrupa’nın birçok yerinden, esas olarak kan örnekleri alınarak yapılan genetik araştırmalar sonucunda, gen frekanslarına bakmışlar ve bunlara göre genleri gruplamışlardır. Nüfus yayılımı modelinin doğruluğu, matematikçi Arthur Mourant ve istatistik genetikçi R.A. Fisher tarafından sınanmış ve bu modele “ilerleme dalgası” adı verilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuca göre, çiftçiler Avrupa’da yayılırken, kendi genetik özelliklerini de Avrupa’ya taşımışlardır. Cavalli-Sforza’nın hipotezine karşı görüş İngiltere’den Martin Richards

ve arkadaşlarından gelmiştir. Richards ve arkadaşları, kaynak grup olduğu ileri sürülen Batı Asya (Orta Doğu dahil) ve Kuzey Afrika'daki topluluklarda mtDNA analizi yapmış ve bu grupların mitokondril haplotiplerini mevcut Avrupalı nüfuslarla karşılaştırmışlardır. Richards, Avrupa ve Batı Asya'dan alınan 821 örneğin araştırıldığı ilk çalışmasında, bugünün Avrupa mtDNA'sının birçok göç dalgasını yansıttığını ortaya çıkarmış ve daha sonra yaptığı başka araştırmaların da sonuçlarını göz önüne alarak, Orta Doğu'dan gelen çiftçilerin bugünkü Avrupalıların mtDNA'larının %20'sini teşkil ettiğini belirtmiştir. Bu oranın, yapılan Y-kromozomu analizleri ile de örtüştüğü görülmüştür. Bugün gelinen noktada, Cavalli-Sforza Orta Doğu'nun tüm Avrupa'nın genetik yapısını oluşturmadığını, iddialarında bu oranın %26-28 olduğunu söylemektedir. Karşı görüştekiler ise, Orta Doğu ve Avrupa'nın birbirinden kesinlikle ayrı olmadığını, ancak hem Orta Doğu'dan gelenlerin hem de Avrupalı avcı-toplayıcıların genetik yapılarının ortak olarak bugünün Avrupa gen haritasına katkısı olduğunu belirtmektedirler (Gural, 2007).

Tarımın Avrupa'da ne zaman ve kimler tarafından başlatıldığı ve yayıldığı soru ile ilgili de karşıt iki görüş vardır. Bunlardan birincisi, Luigi Luca Cavalli-Sforza ve arkadaşları tarafından savunulan ve yukarıda da değinilen nüfus yayılımı modelinin, tarımın Orta Doğu'dan Avrupa'ya gelmesine de katkısı olduğu biçimindedir. Cavalli-Sforza, kültürel yayılımın da nüfus yayılımıyla birlikte olduğunu savunmakta, tarımın gelişmesinin ve hayvan evcilleştirmenin de bununla beraber geldiğini savunmaktadır. Marek Zvelebil ve Martin Richards gibi araştırmacılar ise tarımın Avrupa'da yayılımını daha çok belli bölgelerde temaslar ile gerçekleştiğini savunmaktadır. Bu görüşte olanlar, Avrupa Mezolitik toplulukları ile Neolitik çiftçilerin, öncü bölgelerde belli temaslarda bulduklarını, aralarında bir

gen alışverişi olduğunu ve bunların sonucunda da farklı kültürlerinin ortaya çıktığını belirtmektedir (Gral, 2007).

4.4. EVRİM VE FİLOGENETİK ARAŞTIRMALAR

Modern insan ve diğr hominidler arasındaki akrabalık ilişkilerinin aydınlatılmasında aDNA araştırmaları oldukça verimli sonuçlar sunmaktadır. *Neanderthallerin* modern insanlara benzedikleri fakat aynı olmadıkları kabul edilmekle beraber evrimsel hikâyemizdeki yerleri hala önemli bir tartışma konusunun başlığıdır (Kaestle ve Horsburgh, 2002).

Almanya'daki Leipzig Max Planck Evrimsel Antropoloji Enstitüsü'nden Paleogenetikçi Svente Paabo 11 Temmuz 1997 Science dergisinde *Neanderthal* DNA'sının 400 bazını belirlediğini ve modern insan DNA'sıyla karşılaştırıldığında *Neanderthallerin* farklı bir tür olduğunu belirtmiştir. Paabo ve arkadaşları eski kalıntılardan DNA izolasyonu çalışmalarının kontaminasyon sorunundan dolayı sağlıklı sonuçlar vermediğini gözlemleyerek, 2005 yılında itibaren kalıntılardan daha sağlıklı DNA izolasyonu için yeni yöntemler geliştirmişlerdir. Uygulanan bu yeni yöntemler ile Paabo Cell Dergisi'nin 8 Ağustos 2008 sayısında *Neanderthal* mtDNA'nın 16,500 bazını belirlediğini ve genom dizilimlerinin tamamını belirlemek için çalışıldığını yayımlamıştır. *Neanderthallerin* mtDNA çalışmalarından elde edilen bilgiler moleküler antropolojinin son zamanlardaki gündeminin büyük bir bölümünü işgal etmiştir. *Neanderthallerle* ilgili cevabı aranan en temel iki sorudan birincisi *Neanderthal* türünün neden ve nasıl yok olduğu, ikincisi de bu türle modern insanın genlerinin karışıp karışmadığıdır (Krings ve ark., 1997).

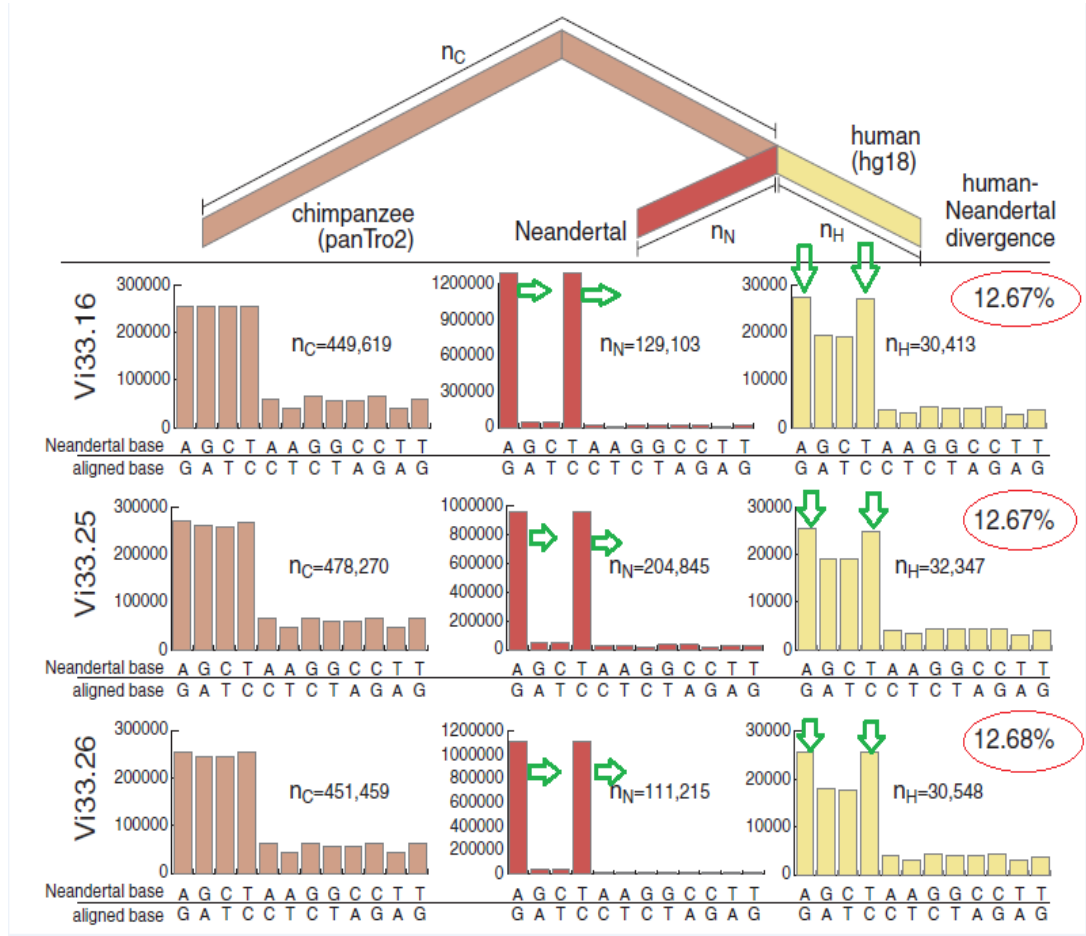
Neanderthal genom dizilimi ile ilgili artan çalışmalarla birlikte, *Neanderthallerden* elde edilen aDNA'lar modern insan ve maymun DNA'larıyla

karşılaştırmış, *Neanderthal* genomlarının modern insan DNA dizilimlerine daha yakın olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmalar modern insan ve *Neanderthaller* arasında son birkaç yüz bin boyunca doğal seçilimden kaynaklanan genetik farklılıkların ve bu iki türü bir birinden ayıran genetik özelliklerin belirlenmesini de izin vermiştir. *Neanderthallerin* modern insanla melezleşip melezleşmediği sorusu halen tartışmalı bir konudur. Araştırmacılar morfolojik analizlerden elde edilen bilgiler üzerinde anlaşamamaktadır. Birden fazla *Neanderthale* ait mtDNA'ler ile modern insan genomları karşılaştırıldığında bu türün modern insan varyasyonlarından oldukça farklı olduğu gözlenmiştir. Bu farklılık *Neanderthal* ve modern insanın melezleşmediğine bir kanıt olarak gösterilmekle birlikte, çok az miktarlarda meydana gelen melezleşme olasılığını da ortadan kaldıramamaktadır. Gelişen yeni tekniklerin nükleer genom dizilimlerinin tamamlanmasına imkân vermesiyle birlikte *Neanderthal* ve modern insan arasındaki bu cevapsız sorular aydınlanmaya başlamıştır (Lalueza-Fox ve ark., 2010; Gignoux, 2011).

Green ve arkadaşları 2010 yılında, Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojisi yardımıyla *Neanderthal* genomunun büyük bir bölümünü dizilemeyi başarmışlardır. Karmaşık bir süreç olan bu çalışmanın birinci aşamasında Hırvatistan'da bulunan Vindija Mağarası'nda elde edilen 21 *Neanderthal* kemiği incelendi. Bu örnekler PCR ile Vi33.16, Vi33.25 ve Vi33.26 *Neanderthal* mtDNA varlığını tespit etmek için taranmış ve sonraki analizler için uygun olan örnekler belirlenmiştir. Elde edilen toplam dokuz aDNA, "Roche/454 sequencing libraries" (Yeni Nesil DNA Dizileme tekniklerinden biri, bölüm 2'de belirtilmiştir) yöntemiyle analiz edilmek için kullanılmıştır. İkinci aşamada, elde edilen DNA içerisindeki özgün *Neanderthal* DNA'sının yüzdesi tahmin edilmiştir. Bu aşamada elde edilen aDNA, 454 Life

Sciences GS FLX yöntemiyle insan, şempanze, rhesus maymunu ve fare genomlarının yanı sıra GenBANK'ta bulunan bütün nükleotit dizilimleriyle karşılaştırılarak, aDNA dizilimlerinin primat genomlarıyla yakınlığı test edilmiştir. Son aşamada Illumina/Solexa GAII yöntemi ile dizileme işlemi tamamlanmış ve 400mg kemik tozundan 5.3 Gb *Neanderthal* DNA sekansı elde edilmiştir. *Neanderthal* DNA dizilim sonuçları, *Neanderthal* ve modern insanın yaklaşık olarak 800 bin yıl önce ortak bir atayı paylaştıklarını, *Neanderthal* ve modern insan ataları arasında ki ayrımın 270-440 bin yıl önce olduğunu göstermiştir. Ayrıca modern insan DNA'larıyla kıyaslandığında *Neanderthal* DNA'sının birkaç genomik bölgesinin farklı olduğu gözlemlenmiştir. Bilişsel yetenek ve kafa morfolojisinde değişikliğe neden olan bu farklılığın doğal seçilimin modern insana giden yolda bir avantajı olarak değerlendirilmektedir. Araştırmada ayrıca, Asyalı ve Güney Amerikalıların, Avrupalılara kıyasla daha fazla *Neanderthal* genine sahip olduğu anlaşılmıştır. *Neanderthaller*, Avrupa ve Asya'nın batısında yaşamış olmasına rağmen, Asya'nın doğusunda yaşamış olan ilk modern insanlarla karışmış olabilecekleri, ancak Taş Devri insanların Asya'ya daha fazla gelmesiyle geride bıraktıkları genlerin giderek azalmış olabileceği ifade edilmiştir. (Green ve ark., 2010; Lalueza-Fox ve ark., 2010; Gignoux, 2011).

Şekil 20 : *Neanderthal* genomlarının şempanze ve modern insan genomlarıyla karşılaştırılması (Green ve ark., 2010).



Son zamanlarda modern insanın evrimine ışık tutacak önemli bir çalışmada, Denisova Mağarasında bulunan parmak kemiği ve diş buluntusundan elde edilen genetik verilerdir. Denisova Mağarası Sibirya'nın güneyinde Altay Dağları'nda yer almaktadır. İlk kazıları 1977 yılında Nicholas Ovodova tarafından yapılan Denisova mağarasında, Novosibirsk Arkeoloji ve Etnografya Enstitüsü 1982 yılında sistematik kazıları başlatmıştır. Bunun sonucu en eskisi yaklaşık 300 bin yıla ait çeşitli arkeolojik buluntuların yer aldığı 22 tabaka saptanmıştır. 2008 yılında Denisova mağarasında, 48-30 bin yılları arasına tarihlendirilmiş insana ait bir küçük parmak kemiği 11. tabakada bulunmuştur. Ayrıca Denisova Mağarasının özellikle Üst Paleolitik endüstrisinin genellikle modern insan ile ilişkili olduğu düşünülen

mousterian ve levallois taş alet teknolojisine ait buluntular bakımından da zengin olduğu görülmüştür. Araştırmacılar bu mağaradan 2008 yılında keşfedilmiş olan parmak kemiği fosilinden bütün bir mtDNA dizilimini elde etmişlerdir. Araştırmacılar, Denisova insanının mtDNA dizilimini 54 modern insan, 6 *Neanderthal* ve 30 bin yıllık bir modern insan buluntusu ile karşılaştırmış ve Denisova insanının hepsinden farklı bir dizilime sahip olduğunu belirtmişlerdir. Örneğin *Neanderthal* mtDNA genomu ortalama 202 nükleotit pozisyonunda *Homo sapiensten* farklı iken Denisiova buluntusunun genomu ortalama 385 nükleotit pozisyonunda *Homo sapiensten* farklılık göstermiştir. Bu parmak kemiğinden elde edilen mtDNA dizilimi, araştırmacılara göre yeni bir insan türüne işaret etmekteydi. Yine yapılan çalışmalarda bu türün, anatomik olarak *Neanderthal* ve modern insan ile benzer karakterler taşıdığı ve bu üç türün yaklaşık 1 milyon yıl önce ortak bir atayı paylaştıkları belirtilmiştir. Bütün bu veriler sonucunda yeni bir tür olarak nitelendirilen Denisova insanının, kazılarda elde edilen bir parmak kemiği ve dişinden başka hiçbir fiziksel özelliği bilinmemektedir. Buda Denisova buluntusunun sonuçları hakkında bazı şüphelere neden olmuştur. Örneğin, kimi araştırmacılar sadece mtDNA verilerine göre yeni bir tür olduğunu düşünmenin doğru olmadığı kanaatindedir, çünkü mtDNA sadece anneden aktarılır ve buna göre, Denisova buluntusunun aslında daha erken dönemlerden *Homo erectus*, *Neanderthal*, Arkaik sapiens ya da henüz bilmediğimiz bir insan türü ile melezleşme sonucu ortaya çıkmış, farklı bir mtDNA yapısına sahip, modern insan ya da *Neanderthal*in 40 bin yıl önce Siberya'da yaşamış bir örneği olması da muhtemeldir (Krause ve ark., 2010; Reich ve ark., 2010; Gignoux, 2011).

Şekil 21: Denisova Mağarası



4.5. HAYVAN VE BİTKİ KAYNAKLI ANTİK DNA ÇALIŞMALARI

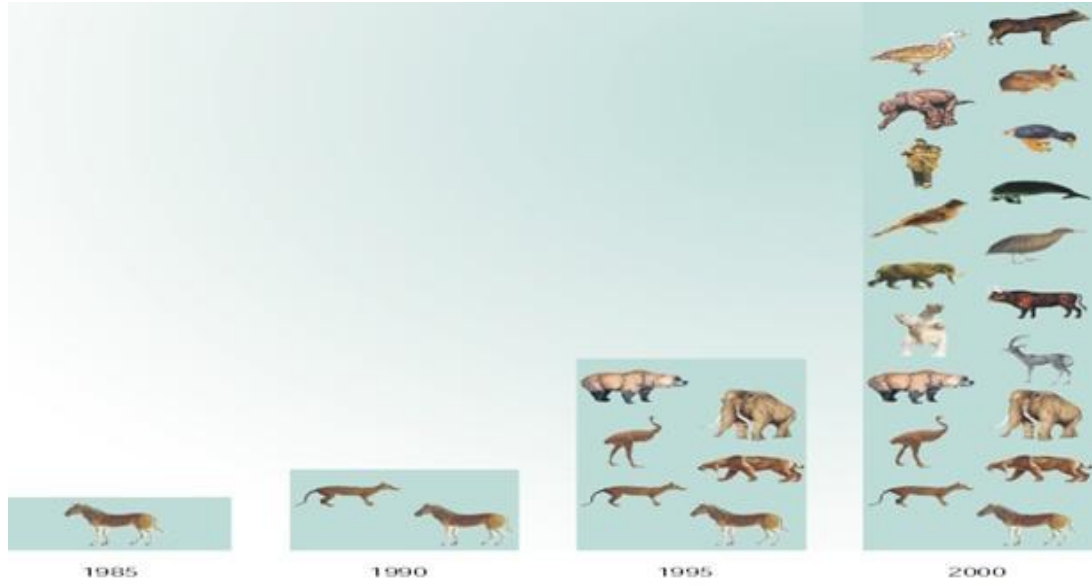
Türlerin kökenine dair genetik araştırmalar tüm canlıları kapsamakta, insan yanı sıra hayvan ve bitki türlerinin evrimsel süreçlerini anlamamıza yardımcı olmaktadır. Özellikle hayvanların evcilleştirilmesi ve bitkilerin kültüre alınması gibi olgular insana bağlı olduğu gibi, bunların muhtemelen nüfus hareketlerine ve yerleşim örüntülerine de etkileri vardır (Gural, 2007). Bununla birlikte aDNA çalışmaları, tarih öncesi ve günümüzde görülen hastalıkların kökenine ait sorulara cevap bulabilmek için ve soyu tükenmiş canlıların biyolojik özelliklerini ve evrimlerini aydınlatmak için de güçlü bir araçtır.

Evcilleşme üzerine yapılan araştırmalar, günümüz evcil hayvanlarının hangi türlerden evrildiğine veya hangi hayvanlarla akrabalıklarının olduğuna bakıldığı araştırmalardır. Mitokondril DNA analizleri, mevcut evcil hayvanların farklı yabani toplulukların katkısı ile mi yoksa evcilleşmenin sadece tek bir bölgeden mi ortaya

çıkacağı gibi sorulara önemli yanıtlar verebilmektedir. Son yıllara kadar çeşitli türlerin evcilleşmesinin tek merkezden olduğu konusunda yaygın bir inanç varken şimdi bazı araştırmacılar bunların çok merkezli olabileceğini iddia etmektedirler. Örneğin, sığır, koyun, su buffalosu ve domuzların evcilleşme kökenlerine dayalı bir araştırmada, bu dört türün her birinin en az iki olmak üzere, muhtemelen daha fazla yerde evcilleştiği, örneğin domuzun hem Bereketli Hilal hem de Çin’de evcilleştirilmiş olabileceği öne sürülmektedir. Bununla birlikte neolitik döneme ait domuz iskeletlerinden elde edilen aDNA çalışmaları ile Avrupa’daki domuzların coğrafik kökenleri ve Avrupa’da yaşayan yaban domuzlarının evcilleşme zamanları belirlenmiştir. Ayrıca aDNA çalışmaları, atların evcilleşmesinin birkaç farklı atasal türde olduğunu ve köpeklerinde yaklaşık olarak 15 bin yıl önce evcilleştiklerini göstermiştir. Bitkilerin kültüre alınmasına dair yayınlanan bir araştırmada da, aynı hayvan evcilleşmesi gibi, bitki türlerinin de birden çok merkezde kültüre alındığına dair bir iddia öne sürülmüştür (Kefi, 2011; Güral, 2007).

aDNA çalışmaları ile quagga, keseli kurt, kılıç dişli kaplan, mamut, Yeni Zellanda moa’ları (bir tür uçamayan kuş), karasal tembel hayvan ve mağara ayısı gibi soyu tükenmiş canlıların biyolojik özelliklerini ortaya çıkarılmıştır. Loreille ve arkadaşları tarafından 2001’de yayınlanan araştırmada, Avrupa ve Batı Asya’da 10,000 yıl önce yaşayıp, soyu tükenmiş olan mağara ayılarının aDNA’ları incelenmiştir. Bu ayıların mtDNA’ları halen yaşamakta olan ayıların mtDNA’ları ile karşılaştırıldığında, mağara ayılarının günümüz ayılarından, iki türün mtDNA sekans ayrımından çok daha önce ayrıştığı görülmüştür. Mağara ayılarının küçük bir alanda yaşamış oldukları da bu araştırma ile ortaya çıkmıştır (Kaestle ve Horsburgh, 2002; Güral, 2007).

Şekil 22 : DNA dizileri tespit edilmiş bazı soyu tükenmiş canlılar.



aDNA çalışmaları hastalıkların kökenini ve doğasını anlamak içinde çok güçlü bir araçtır. Bir kişide, bir genetik hastalığın varlığına dair morfolojik veya tarihe dayalı delillerin bulunduğu durumlarda, hastalığa neden olan gen bölgesi aDNA'dan amplifiye edilebilir ve bu hastalıkla ilgili mutasyonlar ortaya çıkartılabilir. Bu çalışmalarla ilgili örneklere baktığımızda; Fransa'nın belirli bir bölgesinde ortaçağda yaşamış bir grup insanda, yüksek oranda görülen doğuştan kalça çıkıklığı hastalığının genetik temelli olup olmadığına bakmak için yapılan aDNA çalışmalarında bu hastalığın genetik temelli olmadığı anlaşılmıştır. Tüberküloz hastalığının Amerika'da ne zaman ortaya çıktığını anlamak için Kolomb öncesi yaşamış bir mumyadan elde edilen aDNA çalışması bu hastalığın Amerika'da, Avrupalıların kıtayı keşfinden öncede var olduğunu göstermiştir ve yine benzer şekilde bu çalışmalar, Tüberküloz hastalığına neden olan "Mycobacterium tuberculosis" bakterisinin Mısır'da 2.500 ile 5.000, Macaristan'da 300 ile 1.300 yılları arasına tarihlendirilmiş insan kalıntılarında ve Ortaçağ İngiltere'sindeki bireylerde, Kara Humma olarak bilinen vebaya neden olan bakterinin (Yersinia

pestis) 400 yıllık diş kalıntılarında ve cüzam hastalığına neden olan bakterinin de Almanya ve Macaristanda 300 ile 1.300 yılları arasına tarihlendirilmiş arkeolojik kalıntılarda olduğunu göstermiştir (Kefi, 2011; Kaestle ve Horsburgh, 2002).

1991 yılında iki Alman turist tarafından Alp dağlarının İtalya-Avusturya sınırında bulunan ve 5300 yıl ile tarihlendirilen Buz Adam Ötzi, aDNA çalışmaları için iyi bir örnek teşkil etmektedir. Son yıllarda yükselişe geçen genetik bilimi ile birlikte 2008 yılında, Ötzi'nin pelvis kemiğinden örnek alınarak genomunun %96'sını haritalanmıştır. Ayrıca mitokondrilerinden alınan DNA zincirlerinin de tamamı incelenmiş ve detaylı analiz sonuçları bilim dünyasına sunulmuştur. Analiz sonuçları Ötzi'nin saç renginden hastalıklarına kadar çok çeşitli alanlarda bilgiler vermektedir. Bu çalışmalarla birlikte Ötzi'nin, bulunduğu bölge halkıyla genetik yapısının pek benzeşmediği, muhtemelen genetik olarak İtalya veya çevresindeki gen havuzundan çok Sardunya ve Korsika adaları, hatta Orta Doğu gen havuzlarına daha yakın olduğunu bilinmektedir. Yakın-Doğu ve Akdeniz genetik mirasına sahip olan bu 5300 yıllık mumyanın saç ve gözlerinin kahverengi olduğu ve *laktöz intoleransı* nedeniyle süt ürünleri ile arasının pekiyi olmadığını anlaşılmıştır. Bronz Çağı'nda yaşayan toplumlarda, laktöz intoleransı oranının bugüne oranla daha yüksek olduğu sanılıyor. Nedeni ise hayvancılığa daha yeni geçilmiş olması ve yetişkinlerin süt ürünlerini henüz çok yaygın olarak kullanmaması. Ötzi'nin, yapılan gen analizi sonucunda, genomunda kenelerden geçen Lyme hastalığı etkeni olan *Borrelia* bakterisine ait genlerin saptanması, Ötzi'ye tarihte bilinen ilk Lyme hastalığı vakası unvanını vermiştir. Genetik özellikleri Ötzi'nin kalp ve damar hastalığına karşı genetik yatkınlığı olduğunu da göstermektedir. Otopsi sonucunda damarlarının içinde kolesterol birikim odaklarının bulunmuş olması da bu verileri destekler niteliktedir.

Bu bulgu, kalp ve damar hastalıklarının kökenindeki genetik yatkınlığın ne kadar önemli olduğunu bir kez daha gözler önüne seriyor, çünkü Ötzi'nin kalp ve damar hastalıklarına ilişkin çevresel faktörlerden hemen hiçbirine sahip olmadığını bilinmektedir. Şişman değildi, oldukça hareketli bir yaşam sürüyordu ve işlenmiş besinler tüketmiyordu. Sonuç olarak aDNA çalışmaları bu hastalıkların evrimini ve dağılımını anlamamızı sağlamıştır.

Şekil 23: Buz Adam Ötzi



Tarih öncesi dönemlerdeki insanların yaşadıkları ortamlar ve çevresel koşullar bilim adamları tarafından merak edilen konulardır. Ekosistemin anlaşılması tarih öncesi insanların, beslenme davranışları ve buna bağlı oluşan mevsimsel göçler gibi çevresel şartların belirlediği kültürel adaptasyonları ve davranış biçimlerini anlamamızı sağlamaktadır. Tarih öncesi yaşamış insanların diyetlerini anlamak için kullanılan aDNA çalışmaları ile bu insanların evcilleştirdikleri ve avladıkları hayvan ve bitki türleri belirlenebilmektedir. Bu çalışmalarda organik kalıntılar, taş aletler ve dışkı örnekleri kullanılmaktadır. Örneğin Poiner ve arkadaşlarının (2001) Teksas'ta bulunan Hinds Mağarası'nda elde ettikleri fosil dışkı örneklerini kullanarak yapmış oldukları aDNA çalışmasında antilop, tavşan, sincap, çitlembik, meşe ve baklagil

gibi çeşitli bitki ve hayvan türlerine ait DNA'lar belirlenmiştir (Kaestle ve Horsburgh, 2002).

Sonuç ve Öneriler

Moleküler biyoloji ve genetik alanındaki büyük gelişmeler antik DNA çalışmalarını günümüzün en popüler çalışma alanı haline getirmiştir. PCR tekniğinin geliştirilmesi ve 2003 yılında insan genomunun haritalanması ile birlikte genetik biliminin önemi artmış ve çalışma alanı genişlemiştir. İnsanı her yönü ile konu alan ve multidisipliner bir bilim dalı olan antropolojide moleküler biyolojinin gelişen yöntem ve metotlarını kullanarak moleküler antropoloji ve antik DNA (aDNA) çalışmaları adı altında evrim, tarih öncesi göç yolları, cinsiyet tayinleri, soy ve akrabalık ilişkileri gibi konulara ışık tutmaktadır.

aDNA çalışmalarında karşılaşılan en büyük problem, dilimize "kirlenme" olarak çevirebileceğimiz kontaminasyon problemidir. En genel anlamıyla güncel DNA'nın antik DNA'ya bulaşması olarak tanımlayabileceğimiz kontaminasyon, aDNA çalışmalarının başladığı 1985 yılından beri özellikle de insanı konu alan çalışmalarda ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu problemin ortadan kaldırılması için yapılmış birçok çalışmada, kazı alanından başlayan ve laboratuvar sürecinin sonuna kadar devam eden bir takım olmazsa olmaz önlemler geliştirilmiştir. Sonuç itibariyle aDNA çalışmalarında dekontaminasyon olarak adlandırılan bu önlemlerden en önemli ve en kritik olanları, laboratuvar öncesi ve laboratuvar içi olmak üzere iki başlık adı altında sıralayabiliriz. Bunlar:

a) Laboratuvar öncesi kontaminasyon önlemleri:

1. Alana çıkan arkeolog ve antropologların önceden antik DNA analizi için numune toplama olasılığını değerlendirmeleri ve bu numunelerin toplanması için gerekli olan koruyucu giysileri ve uygun ekipmanları önceden hazırlamaları gerekir.

2. aDNA çalışmasında kullanılacak malzemenin topraktan çıkarılması ve depolanması sürecinde mümkün olduğunca az personelle çalışılmalıdır; çünkü personel sayının fazlalığı kalıntıya teması arttıracığından kontaminasyon riskini de arttırmaktadır.

3. Antik kalıntının çıkarıldığı alandaki tüm personelden daha sonra kontaminasyon riskine karşı aDNA ile karşılaştırma yapabilmek için DNA elde edilebilecek doku örneği alınmalıdır.

4. DNA elde edilecek antik kalıntının korunma oranının tespiti için kazı alanının çevresel şartları ve toprak yapısı bilinmeli ayrıca kazı alanında bulunan diğer hayvan ve bitki türlerine ait örneklerde alınmalıdır.

5. Çapraz kontaminasyonu önlemek için antik numuneler modern numunelerden ayrı depolanmalıdır.

6. Mümkünse, bir numuneden diğerine geçerken kullanılan eldiven ve benzeri araç ve gereçler değiştirilmelidir.

7. Numuneler, tamamen kuru olduklarından emin olunduktan sonra, ayrı ayrı plastik kaplarda ya da tüplerde saklanmalıdırlar.

Ayrıca bunlara ek olarak antik DNA analizi için belirlenen örnekler su veya kimyasal maddeler ile temizlenmemeli ve antik numunelere herhangi bir koruyucu kimyasal madde eklenmemelidir. Antik DNA'nın bozulmasını önlemek için numuneler serin ve kuru ortamlarda depolanmalıdır.

b) Laboratuvar içi kontaminasyon önlemleri

1. Antik DNA laboratuvarı aDNA çalışmalarının yapılabileceği özel ekipman ve araçlarla donatılmalı, mekansal ayrımlar dikkate alınmalı ve laboratuvar sadece bu iş için kullanılmalıdır.

2. aDNA analizi için seçilen örneklerin kazı alanında, taşınırken veya toprak altında kontaminasyona maruz kalabileceği göz önünde bulundurulmalı ve çalışılacak bu materyallerin kirlenmiş yüzeyleri temizlenmelidir.
3. PCR amplifikasyonu fiziksel olarak ayrılmış PCR laboratuvarında, minimum sürede ve en az kişi ile yapılmalıdır.
4. Antik DNA laboratuvarında hava UV – HEPA ile filtrelenmelidir.
5. UV ışınlaması mevcut DNA kalıntılarını yok etmek için kullanılmalıdır.
6. Tezgâh, araç ve gereçler çamaşır suyu ile silinmelidir.
7. Laboratuvar teknisyenleri özel koruyucu kıyafetler giyinmelidir.

Bütün bu kontaminasyon önlemleri alındıktan sonra çalışmanın amacına bağlı olarak en uygun DNA dizileme yöntemi kullanılmalıdır. En yeni teknoloji ve yöntemlerin kullanıldığı ve sonuç alma bakımından diğerlerinden önde olan ‘‘Yeni Nesil DNA Dizileme (NGS)’’ yöntemi, kontaminasyona karşı hassasiyetinin azlığı da dikkate alınacak olunursa en uygun yöntem olarak değerlendirilmektedir.

Son yıllarda ülkemizde de antik DNA çalışmalarının önemi moleküler biyoloji, genetik, antropoloji ve arkeoloji gibi farklı bilim dallarında dikkate değer bir şekilde artmıştır. Yüksek bir teknoloji ve çok yönlü bir bilgi birikimi gerektiren aDNA çalışmalarının yapılabilmesi için gerekli olan laboratuvarlar üniversiteler bünyesinde oluşturulmaktadır. Ancak bu laboratuvarlar, aDNA çalışmalarının yapıldığı gelişmiş ülkelerde ki laboratuvarlar ile karşılaştırıldığında oldukça basit bir düzeyde kalmaktadır. Ülkemizde aDNA çalışmalarında kullanılacak antik malzemelerin bolluğu da dikkate alınacak olursa bu alanın en kısa zamanda hak ettiği noktaya taşınması ve dünya literatüründe ki yerini alması gerekmektedir.

Kaynakça

A) KİTAPLAR

1. DEMİRSOY, Ali; **Kalıtım ve Evrim**, Meteksan Matbaacılık, Ankara, 2000.
2. KAESTLE, Frederika A. and HORSBURGH, Ann K.; **Ancient DNA in Anthropology: Methods, Applications, and Ethic**, Yearbook of Physical Anthropology, 45:92–130, 2002.
3. LEWİN, Roger; **Modern İnsanın Kökeni**, (Çev.: N. Özüaydın). TÜBİTAK, Şelale Matbaacılık, Ankara, 1993.
4. TEMİZKAN, Güler ve ARDA Nazlı; **Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler**, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, 2008.

B) MAKALELER

1. ADLER, C.J., HAAK, W., DONLON, D., COOPER, A.; ‘‘Survival and Recovery of DNA From Ancient Teeth and Bones’’, **Journal of Archaeological Science**, vol.38, 956-964, 2011.
2. AŞICIOĞLU, Faruk; ‘‘Y STR Polimorfizmin Adli Genetikteki Önemi ve Uygulaması’’, **Adli Bilimler Dergisi**, Vol./No.1(1). pp.55 – 61, 2002.
3. BLOW, M.J., ZHANG, T., WOYKE, T., SPELLER, C.F., KRIVOSHAPKIN, A., YANG, D.Y., DEREVIANKO, A. and RUBIN, E.M.; ‘‘Identification of Ancient Remains Through Genomic Sequencing’’, **Genome Research**, 18:1347–1353; ISSN 1088-9051/08, 2010.
4. BOLLONGINO, R., TRESSET, A. and VIGNE, J.D.; ‘‘Environment and Excavation: Pre-lab Impacts on Ancient DNA Analyses’’, **Published by Elsevier Masson SAS**, 2008.

5. BOYACIOĞLU, Seda ve DÜNDAR, Munis; ‘‘Gen Haritalama Stratejileri’’, **Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)**, 21(1) 50-60, 2012.
6. COOPER, Alan and POİNAR, Hendrik N.; ‘‘Ancient DNA: do it right or not at all’’, **Science**, 289-1139, 2000.
7. BURGER, J., HUMMEL, S., HERRMANN, B., and HENKE, W.; ‘‘DNA preservation: A microsatellite-DNA Study on Ancient Skeletal Remains’’, **Electrophoresis**, 20, 1722-1728, 1999.
8. DEGUSTA, David and WHITE, Tim.D.; ‘‘On the use of Skeletal Collections for DNA Analysis’’, **Ancient Biomolecules**, 1, 89–92, 1996.
9. DEVRİM, Kadir A. ve KAYA, Necati; ‘‘Polimeraz Zincir Reaksiyonu’’, **Kafkas üni. Vet. Fak. Der.**, 10(2); 209-214, Kars, 2004.
10. FORSTER, Peter; ‘‘Ice Ages and the Mitochondrial DNA Chronology of Human Dispersals: a review’’, **The Royal Society**, 2004.
11. GİGLİ, Elena; ‘‘Evolutionary Genetics of Homo Neanderthalensis: Adaptive Traits and Methodological Problems’’, **Tesi Doctoral UPF, Institut de Biologia Evolutiva (CSIC-UPF)**, Yayınlanmamış doktora tezi, İspanya, 2011.
12. GİLBERT, M.T.P., HANSEN, A.J., WİLLERSLEV, E., RUDBECK, L., BARNES, L., LYNNERUP, N. and COOPER, A.; ‘‘Characterization of Genetic Miscoding Lesions Caused by Postmortem Damage’’, **The American Society of Human Genetics**, 72:48-61, 2003.
13. GİLBERT, M. Thomas P., ‘‘Assessing Ancient DNA Studies’’, **Trends in Ecology and Evolution**, 20: 541-4, 2005.

14. GREEN, R., KARAUSE, J., BRIGGS, A.W., MARICIC, T., STENZEL, U., KIRCHER, M., PATTERSON, N., LI, H., ZHAI, W., HSI, M.-FRITZ, Y., HANSEN, N.F., DURAND, E.Y., MALASPINAS, A.S., JENSEN, J.D., BONET, T.M., ALKAN, C., PRÜFER, K., MEYER, M., BURBANO, H.A., GOOD, J.M., SCHULTZ, R., PETRI, A.A., BUTTHOF, A., HÖBER, B., HÖFFNER, B., SIEGEMUND, M., WEIHMANN, A., NUSBAUM, C., LANDER, E.S., RUSS, C., NOVOD, N., AFFOURTIT, J., EGHOLM, M., VERNA, C., RUDAN, P., BRAJKOVIC, D., KUCAN, Z., GUSIC, I., DORONICHEV, V.B., GOLOVANOVA, L.V., LALUEZA-FOX, C., RASILLA, M., FORTEA, J., ROSAS, A., SCHMITZ, R.W., JOHNSON, P.L.F., EICHLER, E.E., FALUSH, D., BIRNEY, E., MULLIKIN, J.C., SLATKIN, M., NIELSEN, R., KELSO, J., LACHMANN, M., REICH, D. and PAABO, S.; ‘‘A Draft Sequence of the *Neanderthal* Genome’’, **Science** 328, 710, 2010.
15. GÜLEÇ, Erksin; ‘‘Afrika’dan Anadolu’ya En Eski İnsan Göçleri’’, **Bilim ve Gelecek Dergisi**, sayı 73, 2009.
16. GÜRAL, Demet; ‘‘Arkeolojide Biyolojik Yöntemler: aDNA’’, **İstanbul Sosyal Bilimler Estitüsü Arkeoloji Anabilim Dalı Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi**, 2007.
17. HANNI, C., LAUDET, V., STEHELIN, D. and TABERLET, P. ; ‘‘Tracking the Origins of the Cave Bear (*Ursus spelaeus*) by Mitochondrial DNA Sequencing’’, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 91(25):12336-40, 1994.

18. HIGUCHI, R., BOWMAN, B., FREIBERGER, M., RYDER, O.A. and WILSON, A.C.; ‘DNA Sequences from the Quagga, an Extinct member of the Horse Family’, **Nature** 312:282– 84, 1984.
19. HOFREITER, M., JAENICKE, V., SERRE, D., HAESLER, A. and PAABO, S.; ‘DNA Sequences from Multiple Amplifications Reveal Artifacts Induced by Cytosine Deamination in Ancient DNA’, **Nucleic Acids Research**, 29(23): 4793-9, 2001.
20. HOFREITER, M., SERRE, D., POINAR, H.N., KUCH, M. and PAABO, S.; ‘Ancient DNA’, **Nature Review Genetics**, 2, 353–359, 2001.
21. KAYA, Ferhat; ‘Adımlarımızın Kökeni; Ayağın Evrimi’, **Bilim ve Gelecek Dergisi**, sayı 99, 2012.
22. KEFI, Rym; ‘Ancient DNA Investigations: A Review on Their Significance in Different Research Fields’, **International Journal of Modern Anthropology**, 2011.
23. KOLMAN, Connie J. and TUROSS, Noreen; ‘Ancient DNA Analysis of Human Populations’, **American Journal of Physical Anthropology**, 111, 5–23, 2000.
24. KOTAN, Leman D.; ‘Silika Metodu ile Kemikten DNA Ekstraksiyonu’, **Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi**, Adana, 2010.
25. KRAUSE, J., FU, Q., GOOD, J.M., VIOLA, B., SHUNKOV, M.V., DEREVIANKO, A.P. and PAABO, S.; ‘The Complete Mitochondrial DNA Genome of an Unknown Hominin from Southern Siberia’, **Nature**, Vol. 464, 2010.

26. KRINGS, M., STONE, A., SCHMITZ, R.W., KRAİNITZKİ, H., STONEKING, M. and PAABO, S.; “*Neanderthal* DNA Sequences and the Origin of Modern Humans”, **Cell**, Vol. 90, 19–30, 1997.
27. KUL, Bengi Ç. ve ERTUĞRUL, Okan; “Keçilerin Evciltme Tarihinin mtDNA Yoluyla Aydınlatılması”, **Vet. Hekim Der. Derg.** 81(2): 33-36, 2010.
28. LALUEZA-FOX, C., ROSASB, A., ESTALRRİCHB, A., GİGLİA, E., CAMPOSC, P.F., TABERNEROB, A.G., VARGASB, S.G., QUİNTOA, F.S., RAMİREZA, O., CİVİTD, S., HUGUETE, R., SANTAMARİAF, D., GİLBERT, M.T.P., WİLLERSLEV, E. and RASİLLAF, M.; “Genetic Evidence for Patrilocal Mating Behavior among *Neanderthal* Groups”, **PNAS**, 250-253, vol. 108, 2010.
29. MALMSTROM, H., STORA, J., DALEN, L., HOLMLUND, G., and GÖTHERSTROM, A.; “Extensive Human DNA Contamination in Extracts from Ancient Dog Bones and Teeth”, **Mol. Biol. Evol.** 22(10):2040–2047, 2005.
30. MULLİGAN, Connie J.; “Anthropological Applications of Ancient DNA: Problems and Prospects”, **American Antiquity**, 71(2), 2006, pp. 365-380, 2006.
31. O’ROURKE, Dennis; “Ancient DNA Studies in Physical Anthropology” **Annual Reviews Anthropology**, 29:217–42, 2000.
32. ÖZCAN, Şeyda Ş.; “Arkeolojik Toplumlarda Akrabalık İlişkileri: Bir Moleküler Antropolojik Yaklaşım”, **Yayınlanmamış Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü**, 2010.

33. PAABO, S., HIGUCHI, R.G. and WILSON, A.C.; "Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction. The emerging field of molecular archaeology", **Journal of Biological Chemistry** 264:9709-9712, 1989.
34. PAABO, S., POINAR, H., SERRE, D., DESPRES, V.J., HEBLER, J., ROHLAND, N., KUCH, M., KRAUSE, J., VIGILANT, L. and HOFREITER, M.; " Genetic Analyses from Ancient DNA", **Annu. Rev. Genet.** 38:645–79, 2004.
35. PINAR, A., ESER, Ö., ALP, A., SARIBAŞ, Z. ve ERGÜNAY, K.; "Real-Time PCR Kursu", **Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarları**, kurs notları, 2009.
36. POINAR, Hendrik N.; "The top 10 list: Criteria of Authenticity for DNA from Ancient and Forensic Samples", **International Congress Series**, 1239, 575–579, 2003.
37. REICH, David; "Genetic History of an Archaic Hominin Group from Denisova Cave in Siberia", **Nature**, Vol. 464, 2010.
38. RICHARDS, Marti and SYKES, B.C.; "Authenticating DNA Extracted from Ancient Skeletal Remains", **Journal of Archaeological Science**, 22, 291–299, 1995.
39. ROBERTS, Charlotte and INGHAM, Sarah; "Using Ancient DNA Analysis in Palaeopathology: A Critical Analysis of Published Papers, with Recommendations for Future Work" **International Journal of Osteoarchaeology Int. J. Osteoarchaeol.** 18: 600–613, 2008.

40. ROLLO, Franco and MAROTA, Isolina; ‘‘How Microbial Ancient DNA, Found in Association with Human Remains, can be Interpreted’’, **The Royal Society**, 354, 111-119, 1999.
41. SAMPIETRO, M.L., GILBERT, M.T.P., LAO, O., CAMELLI, D., LARI, M., BERTRANPETIT, J. and CARLES-FOX, C.; ‘‘Tracking down Human Contamination in Ancient Human Teeth’’, **Mol. Biol. Evol.**, 23(9):1801–1807. 2006.
42. SHAPIRO, Beth and HOFREITER, Michael; ‘‘Analysis of Ancient Human Genomes’’ **Bioessays**, 32: 388–39, 2010.
43. TRINKAUS, Erik; ‘‘Denisova Cave, Peştera cu Oase, and Human Divergence in the Late Pleistocene’’, **PaleoAnthropology**, 196–200. doi:10.4207/PA.2010.ART39, 2010.
44. ÜSTEK, D., ABACI, N., SIRMA, S. ve ÇAKIRIS, A.; ‘‘Yeni Nesil DNA Dizilimi’’, **Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi**, Cilt 1, Sayı 1, Sayfa 11-18, 2011.
45. VIGILAND, L., STONEKING, M., HARPENDING, H., HAWKES, K. and WILSON, A.C.; ‘‘African Populations and the Evolution of Human Mitochondrial DNA’’, **Science**, Vol. 253, Issue 5027 (sep.27, 1991). 1503 – 1507, 1991.
46. WAYNE, R.K., LEONARD, J.A. and COOPER, A.; ‘‘Full of sound and fury: The recent history of ancient DNA’’, **Annual Review of Ecology and Systematics**, 30:457-477, 1999.
47. WOODWARD, Scot R.; ‘‘Amplification of Ancient Nuclear DNA From Teeth and Soft Tissues’’, **Genome Res.**, 3: 244-247, 1994.

48. YANG, Dongya Y.; ‘‘Contamination Controls and Detection in Ancient DNA Studies’’, **Acta Anthropologica Sinica**, 22:163-173. 2003.
49. YANG, Hong, GOLENBERG, E.M. and SHOSHANI, J.; ‘‘A Blind Testing Design for Authenticating Ancient DNA Sequences’’, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 7, 261–265, 1997.
50. YANG, Dongya Y. and WATT, Kathy; ‘‘Contamination Controls when Preparing Archaeological Remains for Ancient DNA Analysis’’, **Journal of Archaeological Science** 32, 331–336, 2005.
51. YANG, Dongya Y.; ‘‘Hypersensitive PCR, Ancient Human mtDNA, and Contamination’’, **Human Biology**, vol. 75, no. 3, pp. 355–364, 2003.