

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİMDALI
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Havva ALTUNÇUL

ANTİK DNA ÖRNEKLERİNDE TİCARİ STR KİTLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fulya Eylem YEDİAY
Biyolog

İstanbul-2014

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje Numarası: 27398

TEŞEKKÜR

Öncelikle, çatısı altında bulunduğum İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. İmdat ELMAS'a, akademik yolda ilerlemem için gerekli zemini hazırladığı ve sunduğu fırsatlar için Fen Bilimleri Ana Bilim Dalı başkanı hocam Prof Dr. Salih CENGİZ'e; her zaman güçlü motivasyonu için Doç. Dr. Gökhan ERSOY'a ve bana öğrettikleri için tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Havva ALTUNÇUL'a teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalarımın büyük bir kısmını gerçekleştirdiğim Kopenhag Üniversitesi Geogenetik merkezinin yöneticisi Prof Dr. Eske WILLERSLEV'e bana güvendiği ve laboratuvarının kapılarını açtığı için, Dr. Morten E. ALLENTOF'T'a tez çalışmam boyunca motivasyonu ve bilimsel desteği için, Doç. Dr. Anders J. HANSEN'a yardımlarından ötürü ve Jesper STENDERUP'a laboratuvar aşamasında gösterdiği yardım ve desteği için minnet ve teşekkürü borç bilirim.

Kopenhag Üniversitesi Adli Genetik Bölümü yöneticisi Dr. Bo Thisted SIMONSEN'a laboratuvar imkânlarından faydalanmamı sağladığı için, Dr. Benjamin Benn HJORT'a bilgi ve deneyimlerini paylaştığı için ve Kenn Kenso'ya laboratuvar çalışmalarındaki yardımından dolayı çok teşekkür ederim.

Tüm çalışma hayatım boyunca dostluğunu, desteğini hiç esirgemeyen Dr. Selda MERCAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasındaki desteği için Doç. Dr. Hülya YÜKSELOĞLU'na, yardımları ve yorumlarıyla bana kattıkları için Dr. Bestami ÇOLAK'a çok teşekkür ederim. Örneklerin yutdışı izni aşamasında büyük yardımını gördüğüm Elvan Emral UĞUR'a, Van Arkeoloji Müzesi ve İstanbul Arkeoloji Müzesi adına emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Bu yolda beni yalnız bırakmayan arkadaşım Yasemin DEMİRBAŞ'a, pozitif enerjileri ve her zaman verdikleri destekten ötürü Arzu DÜVENCİ ve İlksen TAVACI'ya ve adlarını buraya sığdıramayacağım tüm arkadaşlarıma teşekkürler.

Ve hayatım boyunca yaptığım her şeyde maddi manevi varlıklarını her an yanımda hissettiğim AİLEM'e, özellikle anneme ve Gökçen EKİZ'e sonsuz teşekkürler.

Fulya Eylem YEDİAY

İÇİNDEKİLER

PROJE DESTEĞİ	I
TEŞEKKÜR	II
İÇİNDEKİLER	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
KISALTMALAR	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemik Dokusunun Yapısı	3
2.2. Kemik Dokusunun Sınıflandırılması	4
2.2.1. Sert Kemik Dokusu (Kompakt Kemik)	5
2.2.2. Süngerimsi Kemik Dokusu (Spongiyoz Kemik)	5
2.3. Postmortem DNA'nın Bozunma Süreci	6
2.4. Antik DNA Çalışmaları	8
2.5. Adli Bilimlerde STR'lerin (Ardışık Tekrar Dizileri) Kullanımı	10
2.5.1. STR Lokus ve Alellerin Adlandırılması	12
2.6. Degrade DNA Çalışmalarında Karşılaşılan Sorunlar ve Yaklaşımlar	13
2.7. Adli Bilimlerde STR Tiplendirme İçin Kullanılan Ticari Kitler	17
2.7.1. AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon Kiti	17
2.7.2. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti	19
2.7.3. AmpFISTR® SGM Plus® PCR Amplifikasyon Kiti	20
2.7.4. AmpFISTR® NGM™ SElect PCR Amplifikasyon Kiti	22
2.7.5. Investigator™ Hexaplex ESS Kiti	24
2.8. Alelik Cetvel	25
2.9. DNA Miktar Tayin Yöntemleri	28
2.10. Van Coğrafyası	30
2.11. Urartu Medeniyeti ve Van İli Yoncatepe Nekropolü Kazısı	30
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	32
3.1. Deneyde Kullanılan Araç ve Gereçler	32
3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.3. Deneyde Kullanılan Ticari Kitler	32
3.3.1. DNA İzolasyon Aşamasında Kullanılan Ticari Kitler	32
3.3.2. DNA Miktar Tayininde Kullanılan Ticari Kitler	32

3.3.3. PCR Aşamasında Kullanılan Ticari Kitler	32
3.4. Deneyde Kullanılan Kemik Materyali	33
3.5. Kemik Dokudan DNA İzolasyonu	35
3.5.1. Kemik Materyalinin İzolasyon İşlemi için Hazırlanması	35
3.5.2. Silika Yöntemi ile DNA İzolasyonu	36
3.6. DNA Miktar Tayini	39
3.6.1. Florometrik Yöntemle DNA Miktar Tayini	39
3.6.2. Gerçek Zamanlı (Real Time) PCR Yöntemi ile DNA Miktar Tayini	39
3.6.2.1. Quantifiler Human DNA Kitinin PCR için Hazırlanması	40
3.6.2.2. Quantifiler Human DNA Kitinin PCR Döngü Koşulları	40
3.7. Genotip Tayini	41
3.7.1. Deneyde Kullanılan Ticari Kitlere ait PCR Koşulları	41
3.7.1.1. AmpF ℓ STR® Identifiler® PCR Amplification Kiti	41
3.7.1.2. AmpF ℓ STR® Minifiler™ PCR Amplification Kiti	41
3.7.1.3. AmpF ℓ STR® SGM Plus® PCR Amplification Kiti	42
3.7.1.4. Investigator™ Hexaplex ESS Kiti	42
3.7.1.5. AmpF ℓ STR® NGM SElect™ PCR Amplification Kiti	43
3.8. Kapiler Elektroforezde STR Analizleri	43
3.8.1. PCR Ürünlerinin Elektroforez Aşaması için Hazırlanması	43
3.9. Elektroforez Sonrası Verilerin Analiz Edilmesi	45
4. BULGULAR	46
4.1. DNA İzolasyonunda Elde Edilen İzolatlara Ait DNA Miktarları	46
4.2. Ticari STR Kitleri ile Elde Edilen STR Profilleri	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	56
6. ÖZET	64
7. SUMMARY	65
8. KAYNAKLAR	66
EKLER	77
EK 1. AmpF ℓ STR® Identifiler® kiti ile çalışılan FY-26 örneğine ait elektroferogram	77
EK 2. AmpF ℓ STR® Identifiler® kiti ile çalışılan FY-50 örneğine ait elektroferogram	78
EK 3. AmpF ℓ STR® Identifiler® kiti ile çalışılan FY-66 örneğine ait elektroferogram	79
EK 4. AmpF ℓ STR® MiniFiler™ kiti ile çalışılan FY-25 örneğine ait elektroferogram	80
EK 5. AmpF ℓ STR® MiniFiler™ kiti ile çalışılan FY-26 örneğine ait elektroferogram	81
EK 6. AmpF ℓ STR® MiniFiler™ kiti ile çalışılan FY-64 örneğine ait elektroferogram	82

EK 7. AmpFISTR® MiniFiler™ kiti ile çalışılan FY-66 örneğine ait elektroferogram	83
EK 8. AmpFISTR® SGM® Plus kiti ile çalışılan FY-26 örneğine ait elektroferogram	84
EK 9. AmpFISTR® SGM® Plus kiti ile çalışılan FY-64 örneğine ait elektroferogram	85
EK 10. AmpFISTR® NGM SElect™ kiti ile çalışılan FY-64 örneğine ait elektroferogram	86
EK 11. AmpFISTR® NGM SElect™ kiti ile çalışılan F-66 örneğine ait elektroferogram	87
EK 12. AmpFISTR® NGM SElect™ kiti ile çalışılan FY-12 örneğine ait elektroferogram	88
EK 13. AmpFISTR® NGM SElect™ kiti ile çalışılan FY-50 örneğine ait elektroferogram	89
EK 14. AmpFISTR® NGM SElect™ kiti ile çalışılan FY-26 örneğine ait elektroferogram	90
EK 15. AmpFISTR® NGM SElect™ kiti ile çalışılan FY-25 örneğine ait elektroferogram	91
EK 16. Digestion Çözeltisi Hazırlanışı	92
EK 17. Çalışmada Materyal Olarak Kullanılan Arkeolojik Kemiklere Ait Etik Kurul Belgesi	92
Ek 18. Arkeolojik Kemikler için İstanbul Arkeoloji Müzesi'nden alınan yurtdışı çıkış belgesi	93
ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kemğin yapısı	4
Şekil 2. Uzun kemiğin yapısı	6
Şekil 3. Bozunma sürecinde DNA molekülündeki hidrolitik, oksidatif ve enzimatik saldırılar	8
Şekil 4. 13 CODIS STR lokusu	12
Şekil 5. Düşük miktardaki DNA analizlerinde gözlenen stokastik etkiler	14
Şekil 6. Heterozigot pik oranları	15
Şekil 7. Şematik olarak stutter oluşumu	15
Şekil 8. Mini STR ve geleneksel ticari kitlerin primer konumları	16
Şekil 9. AmpFI STR® Identifiler® PCR Amplifikasyon kitinde kullanılan floresan boyalara ait ışınma spektrumu	19
Şekil 10. AmpFI STR® Identifiler™ PCR Amplifikasyon kiti alelik cetvel	25
Şekil 11. AmpFI STR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon kiti alelik cetvel	26
Şekil 12. AmpFI STR® SGM® Plus PCR Amplifikasyon kiti alelik cetvel	26
Şekil 13. AmpFI STR® NGM SElect™ Amplifikasyon kiti alelik cetvel	27
Şekil 14. Investigator™ Hexaplex ESS kitine ait alelik cetvel	27
Şekil 15. Van-Yoncatepe nekropolü M3 oda mezarı	31
Şekil 16. Antik DNA Laboratuvarı. (The Clean Lab). Center for GeoGenetics, Copenhagen, Denmark	36

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. AmpFlSTR® Identifiler® PCR amplifikasyon kiti lokus bilgileri	18
Tablo 2. AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR amplifikasyon kiti lokus bilgileri	20
Tablo 3. AmpFlSTR® SGM® Plus PCR amplifikasyon kiti lokus bilgileri	21
Tablo 4. AmpFlSTR® NGM™ SElect PCR amplifikasyon kiti lokus bilgileri	23
Tablo 5. Investigator™ Hexaplex ESS kiti lokus bilgileri	24
Tablo 6. Van-Yoncatepe kazısından elde edilen kemik materyal listesi	34
Tablo 7. İzolasyon işleminde kullanılan kemik tozu miktarları	38
Tablo 8. Quantifiler® Human DNA Quantification kit hedef DNA bölgesi (Applied Biosystems)	40
Tablo 9. Çalışmada kullanılan kitlere ait elektroforez koşulları ve matris dosyaları	44
Tablo 10. Çalışmada kullanılan kitlere ait size standartlar	45
Tablo 11. 1. ve 2. İzolasyonda elde edilen izolatların Qubit Florometri ve qPCR ile belirlenen DNA miktarları	47
Tablo 12. Sulandırılmış ve sulandırılmamış izolatlar kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PCR sonuçlarına göre DNA miktarları	48
Tablo 13. FY12 ve FY50 örneklerine ait STR profil sonuçları	50
Tablo 14. FY26 ve FY66 örneklerine ait STR profil sonuçları	51
Tablo 15. FY25 ve FY64 örneklerine ait STR profil sonuçları	52
Tablo 16. Çalışmada elde edilen DNA örnekleri için kit sistemlerinin başarı oranları	53

KISALTMALAR

ABI	Applied Biosystems, Inc
aDNA	Antik DNA (Ancient DNA)
Bç	Baz çifti
CODIS	Combined DNA Index System (Birleştirilmiş DNA indeks sistemi)
CSF1PO	Human c-fms Proto-Oncogene for CSF-1 Receptor Gene
DNA	DeoksiriboNükleik Asit
EDNAP	The European DNA Profiling Group (Avrupa DNA Profillem Grubu)
EDTA	EtilenDiamin Tetra-Asetik asit
ENFSI	European Network of Forensic Science Institutes (Avrupa Adli Bilimler Enstitüleri Ağı)
FBI	Federal Bureau of Investigation
FGA	Fibrinogen Alpha Chain Gene
gb	Giga baz
HS	High Sensitive (Yüksek duyarlılık)
kDa	Kilo dalton
LCN	Low Copy Number (Düşük kopya sayısı)
LT-DNA	Low Template DNA (Düşük miktar kalıp DNA)
µl	Mikrolitre
MgCl₂	Magnezyum klorür
ng	Nanogram
NGM	Next Generation Multiplex (İleri nesil multipleks)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
Pop-4	Performance Optimized Polymer 4
QIA	Qiagen
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction (Kantitatif PCR)
Rfu	Relative fluorescence unit (Bağıl floresan ünite)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Sınırlayıcı enzim parça uzunluğu polimorfizmi)
Rpm	Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
SGM	Second Generation Multiplex (İkinci nesil multipleks)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Tek nükleotid polimorfizmi)
SSR	Simple Sequence Repeat (Basit dizi tekrarı)

STR	Short Tandem Repeat (Kısa ardışık tekrar)
TBE	Tris + Borik asit + EDTA tamponu
TH01	Tyrosine Hydroxylase Gene
TPOX	Thyroid Peroxidase Gene
UV	Ultraviolet (Mor ötesi ışın)
VNTR	Variable Number Tandem Repeat (Değişken sayılı ardışık tekrar)
vWA	Human von Willebrand Factor Gene

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kemik, diş gibi sert yapıya sahip dokular yumuşak dokulara göre daha dayanıklıdır. Onlarca hatta binlerce yıl sonra dahi kemik ve diş kalıntılarına rastlamak mümkündür. Yapılan birçok arkeolojik kazıda insan ve hayvan iskeletleri elde edilmektedir. Bunlar üzerinde yapılan incelemeler, geçmişte yaşayan canlıların anatomik, biyolojik antropoloji ve genetik yapıları hakkında bilgi edinilmesini sağlamaktadır. Dünyada kalıntılar üzerinde genetik incelemeler 1980’li yılların ortalarında başlamıştır (Gaensslen 1993; Höss 1995; Rogan 1994; Poinar 1994; Higuchi ve ark. 1984; Pääbo 1985; Hagelberg 1994).

Moleküler arkeolojinin gelişmesiyle Antik DNA çalışmaları çok önemli bir konuma ulaşmıştır. Fosiller üzerine yapılan ilk çalışmalarda mumyalar ve hayvan derilerinden elde edilen DNA’dan küçük dizinlerin çoğaltılması için bakteriyel klonlama yöntemi kullanılmış ve bu tekniğin reaksiyon kinetiklerinin yetersiz olduğu ortaya çıkmıştır (Higuchi ve ark. 1984; Pääbo 1985; Pääbo 1989). PCR’ın (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) keşfi ise tek bir DNA molekülünün bile çoğaltılmasına olanak tanımış ve antik DNA çalışmalarının çeşitlenmesini sağlamıştır (Pääbo 1989; Pääbo ve Wilson 1988; Thomas ve ark. 1989). Antik DNA üzerine gerçekleştirilen büyük çaptaki bir dizi çalışma, evrim süreci ve şekli hakkında bilgi edinmek, paleoekolojik değişiklikleri saptamak, populasyon genetiği ve evrim modellerinin oluşturulmasında kullanılan yaygın varsayımları test etmek için güvenilir bir yol sağlamıştır. Bunun yanı sıra, nükleik asitlerin postmortem dayanıksızlığı antik DNA araştırmalarının doğası gereği metodolojik problemlerin merkezi

NEDEN
KEMK

olmuştur (Willerslev 2005). Metabolik olarak aktif (canlı) dokularda tamir mekanizması ile hızlı ve etkin bir şekilde DNA hasarları tamir edilmesine karşın inaktif (ölü) hücrelerde spontan olarak gerçekleşen hidroliz ve oksidasyon reaksiyonları DNA hasarları oluşturmaktadır (Lindahl 1993). Bu nedenle zaman içinde DNA bozunmaya ve yok olmaya başlamaktadır. Yumuşak dokularda zaman içinde analiz edilecek DNA’ya ulaşılamazken, kemik ve diş gibi sert dokulardan 100-500 bç uzunluğunda küçük DNA parçaları elde etmek mümkün olabilmektedir (Pääbo 1989; Handt 1994; Höss ve ark. 1996). Geliştirilen moleküler arkeolojik teknikler, zamanla adli bilimler alanında da kullanılmaya başlanmıştır. Gerek fethi kabir sonrası gerekse yumuşak dokulardan DNA elde edilemeyen durumlarda kimlik tayini, babalık veya annelik belirlemek amacıyla kullanılmaktadır.

Türkiye’de adli bilimler alanında insan kalıntılarından kimlik tespiti yapmak üzere 2000’li yılların başında çalışmalar başlamıştır (Altunçul 2001; Altunçul ve İşcan 2003; Altunçul ve ark. 2003; İşcan ve ark. 2007). Adli amaçlarla rutin olarak en yaygın

kullanılan DNA-sistemi somatik STR'lerdir. Ancak ileri derecede bozulmuş örneklerde klasik STR multipleksleri ile yapılan PCR analizlerinde genetik bilgi ya kısıtlı olarak elde edilmekte ya da hiç elde edilememektedir (Mulero ve ark. 2008). Bu sorunu çözmek üzere çeşitli stratejiler geliştirilmektedir. Bunlar, STR'lere göre daha düşük ayırım gücüne sahip tek baz polimorfizmi (SNP) veya mitokondriyal dizin analizleri ve mevcut klasik STR lokuslarında kullanılan primerlerin yeniden tasarlanarak daha küçük boyutlarda PCR ürünleri elde edilen kitlerin üretilmesi şeklindedir (Butler 2005; Mulero ve ark. 2008).

Bu araştırmada da insan kalıntılarında elde edilen örneklerde çoklu STR kitleri kullanılmıştır. Örnekler yaklaşık 3000 yıllık (M.Ö. 7-9, Demir çağı) arkeolojik insan kalıntılarında oluşmaktadır. Söz konusu kemik örnekleri kontaminasyon, DNA'nın kalitesi ve PCR inhibitör içeriği açısından karşılaştırıldığında her hangi bir adli örnekten çalışılması daha zor bir materyaldir. Çalışmanın amacı bu örneklerle AmpFISTR® Identifiler®, AmpFISTR® MiniFiler™, AmpFISTR® SGM® Plus kitleri ve mini STR'leri içeren Hexaplex ESS ve AmpFISTR® NGM™ SElect kitlerini çalışarak, sonuçları karşılaştırmak ve en uygun olanını belirlemektir. Dolayısıyla yapılan bu çalışma, en zorlu adli olgularda dahi yeterli genetik bilgiyi sağlayacak yöntemin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Ayrıca çalışmadan elde edilen veriler moleküler arkeoloji çalışmalarına da katkı sağlamaktadır.

kemgn sert dokusu nasl olustu

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusunun Yapısı

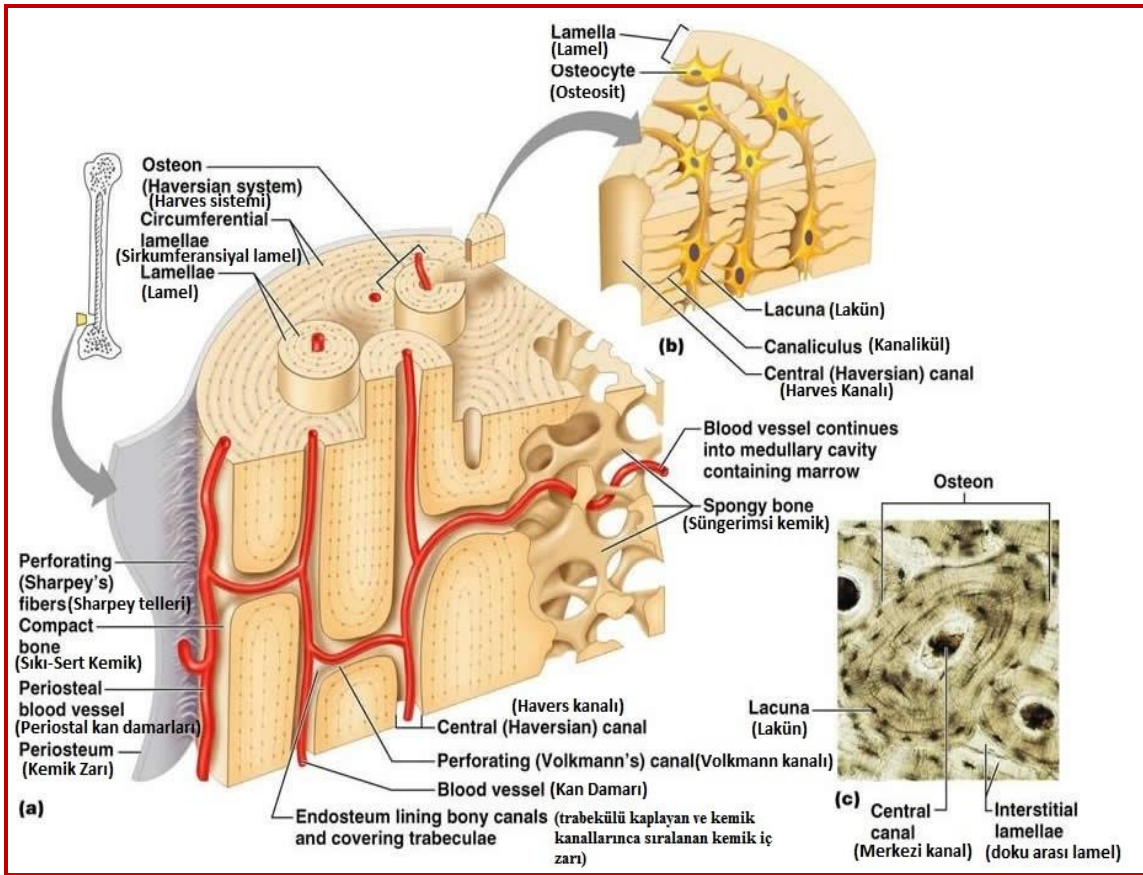
Organizmaya şekil veren ve destek görevi gören kemik doku, hücreler, ara madde (matriks) ve kollajen liflerlerden oluşmuştur. Kemik ara maddesi kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat mineral tuzları içermektedir. Bu minerallerin depolanması da kemiğin vücuttaki en sert doku olmasını sağlamıştır. Kemiğin destek dokusu olma dışında vücudun baş ve göğüs bölgesindeki organları korumak, kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğini içermek ve metabolik önemi olan kalsiyumu depolamak gibi önemli görevleri bulunmaktadır (Açıkalın 2006).

Kemik dokusu gelişimi, embriyonik mezenşim hücrelerinden gelişen olgunlaşmamış kemik hücreleri olan osteoblastların, metabolik aktivitesinin azalması ve kireçlenmesinin başlamasıyla osteositlere dönüş sürecini izler. Osteoblast yapısındaki hücrede organeller oldukça aktif ve çekirdek ökromatik yapıdadır. Osteositlerde ise organeller azalmış, çekirdek heterokromatik yapıdadır. Osteositlerden çıkan sitoplazmik ince uzantılar, kanalikül denen yapılardan geçerek diğer osteosit hücrelerle bağlantı kurar (Koç 2013) (Şekil 1).

Kemik ara maddesi (matriks) organik ve inorganik bileşenlerden oluşmaktadır. Organik matriksin % 90-95'i kollajen tip 1, geri kalan kısım ise glikozaminoglikanlar (kondroitin sülfat, keratan sülfat ve hiyaluronik asit), glikoproteinler (osteokalsin, osteonektin, osteopontin), proteoglikonlar ve proteinlerden (sialoprotein) oluşur (Koç 2013). İnorganik ara madde ise; %85 kalsiyum fosfat, %10 kalsiyum karbonat, kalsiyum florid, magnezyum florid, hidroksit ve sülfat bileşiklerinden oluşur (Tütüncü 2013). İnorganik bölüm, kemik dokunun %70'ini oluşturmaktadır (Kutlu ve Odabaşı 2004).

hdrksapat

Kemik yapısındaki kalsiyum fosfor, hidroksiapatit kristallerini oluşturur. Hidroksiapatit kristalleri, kemikte kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamaktadır. Bu iki yapının (Hidroksiapatit ve kollajen) tespiti DNA varlığıyla ilişkilendirilmiştir. Antik DNA'nın varlığının hidroksiapatit artışı ile ters, kolajen miktarı ile doğru orantılı olduğu bildirilmiştir (Götherström ve ark. 2002, Sambrook ve Russel, 2001).



Şekil1. Kemiğin yapısı

(<http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio210/chap06/lecture1.html>)

2.2. Kemik Dokusunun Sınıflandırılması

Kemik doku primer ve sekonder kemik doku olarak iki gruba ayrılmaktadır. Primer kemik doku, olgunlaşmamış kemik dokudur ve intra uterin hayatta şekillenir. Sekonder kemik doku ise olgunlaşmış kemik dokusudur. Kemik dokusu sert (kompakt) ve süngerimsi (spongiyöz) kemik olmak üzere iki farklı şekilde bulunur (Tütüncü 2013).

İnsan vücudunda şekillerine göre kemik tipleri şöyledir:

- **Uzun kemikler;** uzun kemiklerin gövdesine **diafiz**, uç kısımlarına **epifiz**, epifiz ve diafiz arasındaki bölgeye **metafiz** denir (Şekil 2). Metafiz, kemik metabolizmasının yoğun olduğu kısımdır. Bu bölge kemiğin uzunlamasına büyümesini sağlar. Uyluk kemiği (Femur), bacak kemiği (Tibia), kol kemiği (humerus) uzun kemiklerdir.

- **Kısa kemikler;** küp şeklindedirler. El ve ayak bileği kemikleri kısa kemiklere örnektir. Kısa kemikler içerisinde 'sesamoid kemik' olarak adlandırılan özel bir kemik tipi de yer almaktadır. Şekli susam tohumuna benzediği için bu adı almıştır. Sesamoidler tendonun içerisine yerleşmiş şekildedir. Farklı bireylerde değişik boyutta ve sayıda yer alır. Patella sesamoide örnektir (Marieb ve Hoehn 2007).

- **Yassı kemikler;** ince ve yassı şekilde ve biraz kıvrımlıdır. Kaburgalar, kafatası kemikleri, kürek kemikleri ve göğüs kemiği yassı kemiğe örnektir.

- **Düzensiz kemikler;** daha komplike ve diğer kemik tiplerinden farklı şekillere sahiptir. Omur kemikleri ve kalça kemiği (leğen kemiği) örnek verilebilir.

Kemik mikroskobik yapısına göre ise Sert Kemik (Kompakt) ve Süngerimsi (Spongiyoz) kemik olarak iki şekilde incelenmektedir.

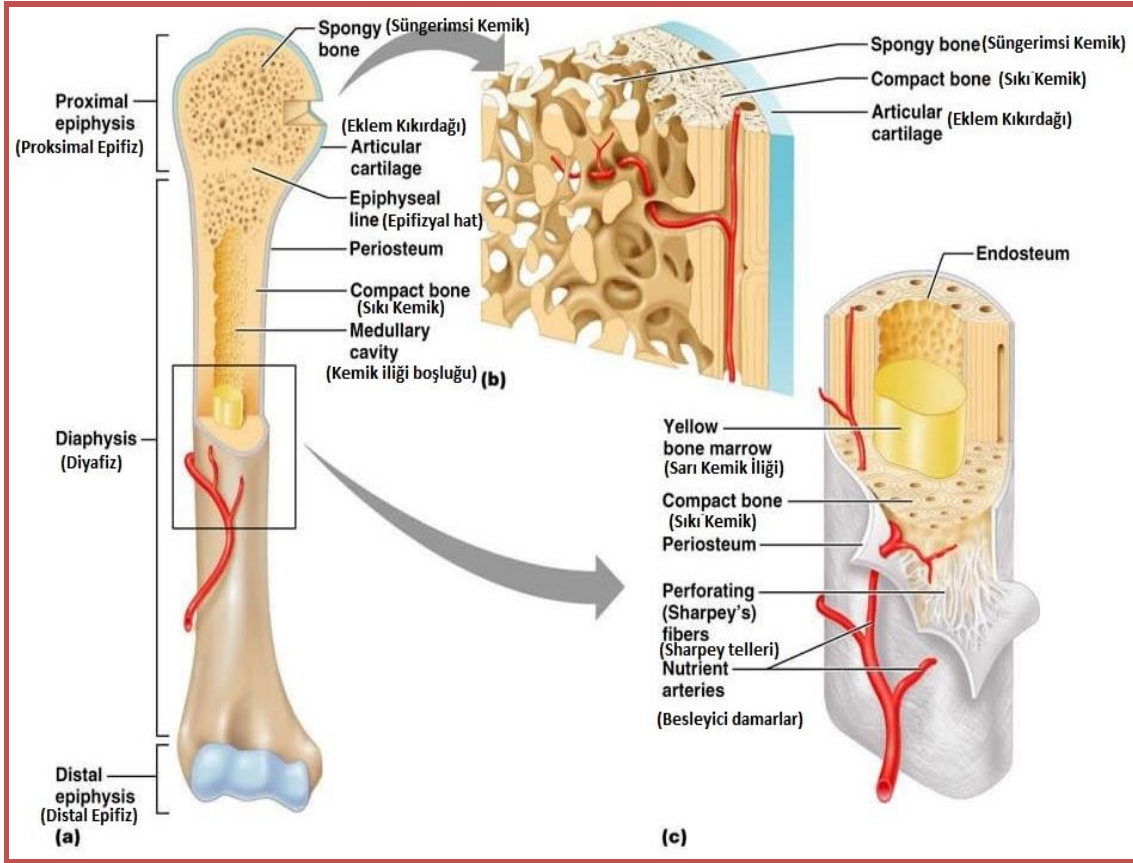
2.2.1. Sert Kemik Dokusu (Kompakt Kemik)

Tüm kemiklerin dış yüzeyi ve uzun kemiklerin gövde kısmı yani diyafizler sert kemikten oluşur. Homojen ve sıkı bir yapıya sahiptirler. Kompakt kemiğin yapısal ünitesi osteon veya harves sistemi olarak adlandırılmaktadır. Her osteon kemiğin uzun eksenine paralel olarak yerleşmiş silindirik bir uzantıdır (Şekil 1). Bir osteon kemik matriksine ait oyuk kanallar topluluğudur. Merkezi kanallar (harves kanalları), osteonun ihtiyaç duyduğu kan damarları ve sinir iplikleri sağlamak için osteonun çekirdeğine doğru ilerler. Volkman kanalları ise kemiğin uzun eksenine dik açıyla uzanan ve periosteumun kan ve sinir temini için merkezi kanal ve ilik boşluğu ile bağlantı kurar. Osteositler, lamellerin arasındaki lakünler içerisine yerleşmiştir. Kanaliküller ise tüy şeklinde olup lakünlerin birbiriyle veya merkezi kanalla bağlantısını sağlamaktadır. Kanalikül osteon içerisindeki osteositleri birbirine bağlar ve osteon boyunca bir osteositten diğerine besin geçişine olanak sağlar (Şekil 1) (Marieb ve Hoehn 2007).

Sert kemik dokusu DNA'nın en iyi korunduğu kemik kısmı olarak bilinmekte ve DNA'nın çoğu kompakt kemikteki osteositler içerisinde bulunmaktadır (Hochmeister ve ark. 1991).

2.2.2. Süngerimsi Kemik Dokusu (Spongiyoz Kemik)

Süngerimsi kemik doku, birbiriyle birleşmiş kemik lamelleri ve birbiriyle kesişen kemik trabeküllerinden oluşur. Süngerimsi kemiğin düzensiz boşluklu ve gevşek dokulu yapısından dolayı gözenekli bir görünümü vardır. Bu boşluklarda kemik iliği bulunmaktadır. Süngerimsi kemik osteon içermez. Besinler, trabeküller etrafını saran endosteumdaki kılcallardan kanalikül boyunca difüzyonla süngerimsi kemiğe ulaşır. Kısa ve uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımları ile yassı kemiklerin iç yüzlerinde süngerimsi kemik dokusu bulunur (Şekil 2) (Marieb ve Hoehn 2007). **Süngerimsi kemikten sıkı kemiğe oranla daha fazla DNA elde edildiği bildirilse de porlu yapısı nedeniyle kontaminasyona açık olduğu düşünülmektedir (Lee ve ark, 1991).**



Şekil 2. Uzun kemiğin yapısı

(<http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio210/chap06/lecture1.html>)

2.3. Postmortem DNA'nın Bozunma Süreci

Post-mortem DNA degradasyonu, hücreler tarafından salınan endojen nükleazlar veya mikroorganizmalar tarafından salgılanan ekzojen nükleazların aktivitesi ile başlar. Bunu izleyen oksidatif ve hidrolitik reaksiyonlarla gerçekleşen degradasyon ise daha yavaş ve uzun sürede DNA yapısında değişikliğe neden olmaktadır (Smith ve ark. 2003).

Enzimatik degradasyon: Hücre içi nükleazları, post-mortem DNA'nın parçalanma sürecini başlatan ilk ajanlar olarak en önemli rolü oynamaktadır. Nükleozoma bağlı histon yapısı, bozunmadan kaldığı sürece kromatin yapı içerisinde DNA'nın katlanma sıklığına bağlı olarak DNA birbini izleyen bir dizi parçalanma aşamasına maruz kalır. Lizozomal proteazlar tarafından kromatin proteinlerinin sindirilmesi, endonükleazlar tarafından DNA'nın sindirilmesine olanak sağlamaktadır. Nükleazlar DNA molekülünün fosfodiester bağlarını sindirirler. Buna karşın fosfodiester bağları enzimatik olmayan reaksiyonlara karşı oldukça dayanıklıdır (Şekil 3) (Alaeddini ve ark. 2010).

Hücre ölümünden sonra hücre zarının parçalanmasıyla salınan besince zengin içerik mikroorganizmaların gelişmesini destekler ve makromoleküllerin degradasyonu artar. Toprak mikroorganizmalarının içerdiği nükleaz enzimleri, nükleik asitleri ve onların

degradasyon ürünlerini sindirmektedir. Mikroorganizmaların uygun ortam şartlarında (sıvı, nemli) artan degradasyon süreci, hızlı kuruma, düşük sıcaklık veya yüksek tuz konsantrasyonu gibi ortam şartlarının nükleazları inaktif hale getirmesiyle yavaşlar (Alaeddini ve ark. 2010).

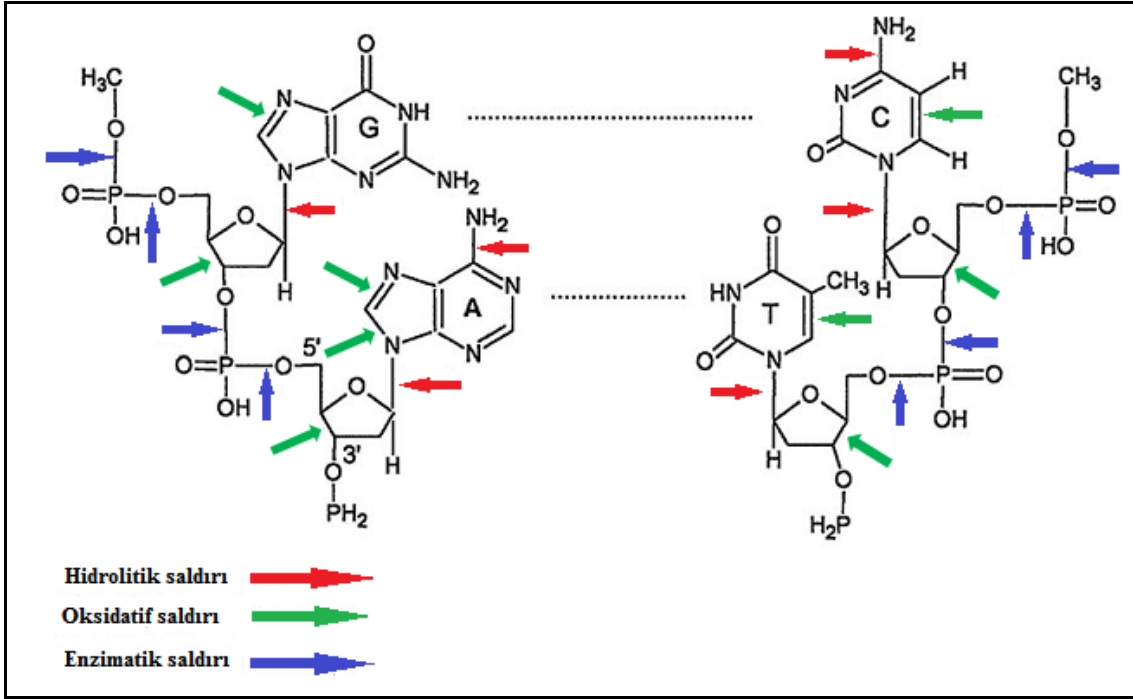
Enzimatik reaksiyonları daha yavaş ilerleyen enzimatik olmayan veya kendiliğinden gelişen reaksiyonlar izlemektedir. Bunlar; oksidatif reaksiyonlar, hidrolitik reaksiyonlar, DNA çapraz bağlanma bölgeleri ve radyasyondur (Alaeddini ve ark. 2010).

Oksidatif reaksiyonlar: Şeker rezidülerinin modifikasyonlarını, timin ve sitozinlerin hidantoine dönüşümünü ve baz kayıplarını içerir. Pirimidinler özellikle Timin pürinlere göre oksidatif hasara daha hassastır. Yıkım sürecinde oksidasyon ile timin ve sitozinin hidantoinlere dönüşmesi PCR reaksiyonunu bloke edebilir (Teoule ve ark. 1978; Höss ve ark. 1996).

Hidrolitik degradasyon: Hidrolitik saldırılar, polinükleotid zincirindeki glikozidik (baz-şeker) bağların kırılmasıyla baz kayıplarına neden olmaktadır (Alaeddini ve ark. 2010). Normalde asit ($\text{pH} < 6$) katalizli reaksiyonlarda pH'ın artmasıyla depurinasyon oranı azalır. pH 6'nın üzerinde ise reaksiyonun pH bağımlılığı azalır ve depurinasyon pH'dan bağımsız bir reaksiyonla sürer. Hidrolitik reaksiyon hızı sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. Teorik olarak 15 °C sıcaklıkta 800 bp'lık DNA parçasının tamamen degrade olması 5000-10000 yıl sürmektedir. Fizyolojik tuz konsantrasyonu, nötral pH (7.2) ve 15 °C sıcaklığın bulunduğu bir ortamda hidrolitik hasar nedeniyle DNA'nın tamamının bozunması yaklaşık 100.000 yıl sürmektedir (Pääbo ve Wilson 1991; Lindahl 1993; Geigl 2002).

Radyasyon: Radyasyon, oksidatif hasarları, tek iplik veya çift iplik kırıkları, baz modifikasyonları, şekerlerin yıkımı ve dimerlerin oluşumunu içeren çeşitli lezyonların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Alaeddini ve ark. 2010).

Oksidasyon ve arka plandaki radyasyonun hem dolaylı hem de doğrudan etkileri DNA'nın omurgasını oluşturan şeker-fosfat ve azot bazlarını değiştirebilir. Bu süreci deaminasyon, depurinasyon ve diğer hidrolitik aşamalar izler ve bu durum DNA molekülünde kırıklar meydana gelmesine ve molekülün stabil olmamasına neden olur (Hofreiter 2001).



Şekil 3. Bozunma sürecinde DNA molekülündeki hidrolitik, oksidatif ve enzimatik saldırılar (Alaeddini ve ark. 2010)

2.4. Antik DNA Çalışmaları

Paleontolojik ve arkeolojik kalıntılar gibi post-mortem materyalden elde edilen Antik DNA (aDNA), zamanda geri gitmeyi, nesli tükenmiş organizmaları ve onların günümüzdeki akrabaları ile genetik ilişkilerini incelemeye olanak sağlamaktadır. aDNA çalışmalarındaki gelişmeler, organizmalar ve DNA dizilerinin evrimi üzerine yeni bir bakış açısı sağlamakta ve mikro evrim modellerinin daha güvenilir bir şekilde değerlendirilmesine imkan vermektedir. Bu çalışmalarda birçok teknik güçlükler bulunmakla birlikte, özellikle insan kalıntılarıyla çalışıldığında sonuçların güvenilirliğinden emin olmak için katı kriterler gerekmektedir (Hofreiter 2001; Millar ve ark. 2008).

Higuchi ve arkadaşları nesli tükenmiş bir at türü olan *Equus quagga* üzerinde yaptıkları çalışmada mitokondrial klonlama yöntemiyle filogenetik ağaç oluşturarak zebralarla olan akrabalığını belirlemişlerdir. Bu yapılmış ilk aDNA çalışmasıdır (Higuchi ve ark. 1984).

Ardından, Pääbo 1985 yılında (Pääbo 1985), Mısır mumyalarının derisinden elde ettiği DNA ile çekirdek DNA tekrar bölgelerini klonlamıştır. Fakat elde edilen DNA'nın sadece çok küçük bir kısmının orijinal olduğu, büyük bir kısmının ise mikrobiyal kontaminasyon kökenli olduğu ortaya çıkmıştır (Hagelberg ve ark. 1991).

Eski ve mineralleşmiş örneklerin doğası gereği sahip oldukları düşük miktardaki DNA molekülü aDNA çalışmalarının temel sorunlarından. PCR teknolojisinin gelişmesiyle bu sorun kısmende olsa çözüme ulaşmıştır. DNA'nın degradasyonundan kaynaklı bu sorun antik DNA çalışmalarını PCR'ı kullanarak, yüzlerce hatta binlerce kopya sayısına sahip mitokondriyal veya plastid DNA'larından bilgi elde etmeye yönlendirmiştir. Hedef bir DNA dizisinin tek bir kopyasının, antik DNA çalışmaları açısından ve yeterince DNA içermeyen adli örnekler açısından da oldukça faydalı olduğu bildirilmiştir (Hagelberg ve ark. 1991; Pääbo ve ark. 2004).

Bir tür in vitro klonlama yöntemi olan PCR ile küçük DNA parçalarından çok sayıda kopya elde edilebilmesi, o dönem bazı aDNA çalışmalarından elde edilen abartılı sonuçlar bugün kontaminasyon kaynaklı olarak değerlendirilmektedir. (Sidow ve ark. 1991; Desalle ve ark. 1992; Cano ve ark. 1993; Woodward ve ark. 1994)

2000'li yılların başında nesli tükenmiş bizon ve ayılarda popülasyon çalışmaları, nesli tükenmiş Yeni Zelanda Moa'larında tüm mitokondriyal genomun dizinlenmesi ve tek kopya çekirdek DNA'sının çoğaltılmasına olanak veren moleküler cinsiyet belirlenme yöntemleri gibi başarılı çalışmalar yapılmıştır (Leonard ve ark. 2000; Haddrath ve Baker 2001; Cooper ve ark. 2001; Shapiro ve ark. 2004; Noonan ve ark. 2005).

Neandertal kalıntılarından ve Mamut tüyünden elde edilen çekirdek DNA'sındaki milyonlarca bazın dizinlenmesi geniş kapsamlı dizinleme ve dizin hizalama çalışmalarına zemin hazırlamıştır (Green ve ark. 2006; Poinar ve ark. 2006).

Yeni DNA dizinleme teknolojileri (next generation sequencing-ileri nesil dizinleme), tek yürütmede 1gb'ın üzerinde dizin üretim kapasitesine sahiptir. Bu teknolojiler, en çok bozunmuş, antik genomlarda beklenen, yaklaşık 250 bp'ne kadar olan DNA parçalarını dizinlenmesinde kullanılmaktadır. Daha sonra bu parçalar biyoinformatik araçlarla birleştirilmektedir (Lambert ve Millar 2006)

aDNA çalışmalarındaki bu gelişmeler, bozunmuş yapıdaki biyolojik örneklerden özellikle iskelet kalıntılarından elde edilen DNA'nın ve diğer adli örneklerin analizinde yol gösterici niteliktedir (Capelli ve ark. 2003; Ballantyne 2007; Fondevila ve ark. 2008).

Adli Bilimler alanında; çok eski kemik örnekleri üzerinde genellikle mitokondriyal DNA analizleri yapılmasının yanı sıra genomik DNA analizleri de uygulanmıştır. Moğolistan'daki Egyin Gol nekropolünden elde edilen yaklaşık 2000 yıllık insan kalıntıları üzerinde yapılan STR analizi sonucunda örneklerin bir kısmında başarılı bir şekilde profil elde edilmiştir (Keyser-Tracqui ve ark. 2003)

2001 yılında Bosna Hersek ve Hırvatistan'daki bazı toplu mezarlardan elde edilen 8-50 yıllık iskelet kalıntılarında STR tiplendirme çalışmaları yapılmıştır (Alonso ve ark. 2001). Lee ve arkadaşları, Kore savaşı (1950-1953) mağdurlarının akrabası olduğu düşünülen kişilerden alınan örneklerle savaştan kalan insan kalıntıları üzerinde mitokondriyal ve STR analizleri yaparak kişileri karşılaştırmışlardır (Lee ve ark. 2010).

2012 yılında yapılan bir çalışma da ise Berlin (Almanya) havaalanı inşaatı sırasında çıkarılan ve 12-13. yüzyıllara ait iskelet kalıntıları ve Eldena (Almanya) bölgesindeki kazıdan alınmış 12-15. yüzyıllara ait iskeletlerde ticari STR kitlerinin performansı değerlendirilmiştir (Harder ve ark. 2012).

2.5. Adli Bilimlerde STR'lerin (Short Tandem Repeats) Kullanımı

DNA parmak izi veya şimdilerde daha çok DNA tiplendirme olarak bilinen kavramlar ilk olarak 1985 yılında İngiliz genetikçi Alec Jeffreys tarafından tanımlanmıştır. Alec Jeffreys, art arda tekrar eden DNA dizinlerini içeren belli DNA bölgelerini bulmuş ve bu tekrar bölgelerinin sayısının kişiden kişiye farklılık gösterdiğini keşfetmiştir. İnsan genomunun yaklaşık %3'ünü kaplayan bu ardışık tekrar dizileri, tekrar ünitelerinin sayısına ve tekrar dizisinin tüm boyutuna göre iki grupta sınıflandırılmıştır. Bu iki grup, lokusa göre 6 ile 100 bç arasında değişen boyutlara sahip tekrar bölgeleri olan minisatellitler (VNTR-Variable Number Tandem Repeat) ve 1-5 bç tekrar ünitesi içeren daha çok STR (Short Tandem Repeat) veya SSR (Simple Sequence Repeat) olarak bilinen mikrosatellitlerdir (Hagelberg ve ark. 1991; Tamaki 2005; Butler 2005).

VNTR genetik işaretleyicileri, farklı uzunlukta tekrar dizilerini içeren mikrosatellit ve minisatellit genetik işaretleyicileri kapsamaktadır. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) olarak adlandırılan teknik, VNTR'ler etrafındaki DNA bölgelerini kesmek için bir kesim enziminin kullanımı prensibine dayanmaktaydı. Geliştirilen RFLP tekniğiyle bu uzun DNA dizi varyasyonları analiz edilerek insan kimliklendirmesinde uygulanabilirliği ortaya konulmuştur (Jeffreys 1985; Butler 2001).

VNTR lokuslarındaki polimorfizm, bireyler arasında belli bir baz diziliminin art arda tekrarlanma sayılarındaki varyasyonlardan kaynaklandığı için farklı VNTR lokuslarında, tekrarlanan baz diziliminin uzunluğunun değişmesinden kaynaklanmaktadır. Bu lokuslarda tekrarlanan bölgeleri 2-30 veya daha fazla sayıda baz çifti içermektedir. Bu lokuslar, çok sayıda farklı uzunlukta alele sahip olduklarından bireyleri ayırma güçleri yüksektir (Jeffreys 1985; Brinkmann 1992; Robertson 1990). VNTR lokusları bireyler arasında oldukça yüksek polimorfizm göstermesine rağmen DNA profili elde etmek için çok fazla emek,

zaman, uzmanlık ve fazla miktarda DNA gerektirmekteydi. Çok lokuslu VNTR problemlerinin analizinde otomasyon sorunları ve özellikle karışım örneklerinin deşifresindeki zorluklar gibi kısıtlayıcı nedenler, adli genetik çalışmalarını, DNA teknolojisinin de hızlı bir şekilde gelişimiyle günümüzde kısa ardışık dizilerin (STR) çoğaltılmasına kadar getirmiştir (Butler 2005).

Mikrosatellitler, minisatellitlere oranla daha düşük polimorfizm göstermesine rağmen, adli bilimler açısından yeterli ayırım gücüne sahip olan sistemlerdir. Özellikle degrade DNA ve yeterince DNA elde edilemeyen örneklerin çalışılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Mikrosatellitlerle çalışılan ilk adli olguda, bir cinayet mağdurunun iskelet kalıntıları ile genetik tiplendirme yapılmıştır (Hagelberg ve ark. 1991; Tamaki 2005).

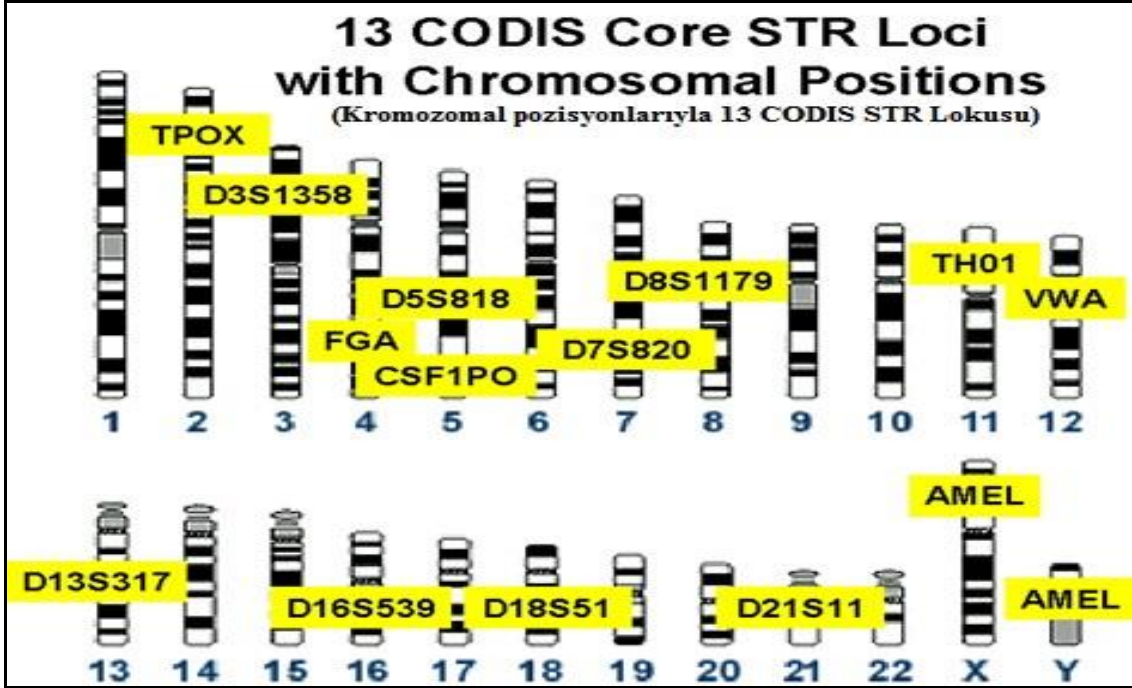
STR lokuslarının yeni kullanılmaya başlandığı yıllarda her lokus tek tek çalışılmaktaydı, bu yöntem analiz maliyetini artırdığı ve uzun zaman aldığı için birden fazla lokusun aynı anda analizini sağlayacak kitler oluşturulmaya başlandı. Çoklu STR'ler, yüksek ayırım gücü sağlaması, karışım analizlerindeki ve bozulmuş DNA içeren biyolojik materyallerdeki başarısı nedeniyle adli moleküler genetik çalışmalarında çok önemli bir yer edinmeye başladı. Ayrıca otomasyona uygunluğu, DNA örnek sayısının artması durumunda faydalanılan bir özelliktir (Butler 2005).

İlk ticari STR kit 1994 yılında Promega tarafından geliştirildi. Kit; CSF1PO, TPOX ve TH01 lokuslarını içermekteydi. CTT tripleks olarak adlandırılan bu bölgelerin aralarında akrabalık ilişkisi olmayan iki bireyde aynı genotipe rastlama olasılığı 1/500 idi. Daha sonra geliştirilen ve dört lokusa (TH01, FES/FPS, vWA ve F13A1) sahip ilk nesil multipleksler (Quadruplex) yaklaşık 10 binde 1 karşılaşma olasılığına sahip iken, 6 polimorfik lokusu (TH01, vWA, FGA, D8S1179, D18S51, D21S11) içeren ikinci nesil multipleksler yaklaşık 50 milyonda 1 karşılaşma olasılığına sahipti (Butler 2005).

1990 yılında Amerika Birleşik Devletler'inde yapılan kongrede alınan kararla, FBI (Federal Bureau of Investigation), ulusal DNA veri bankası kurulmasına öncülük etmiş ve böylece CODIS (Combined DNA Index System) sistemi pilot uygulama olarak başlamıştır. Bu sistem olay yerinden alınan örneklerden elde edilen DNA profilinin sistemde kayıtlı profiller ile karşılaştırılarak şüpheliye ulaşmaya yardımcı olmaktadır (McEwen 1995; 1994).

13-14 Kasım 1997'de FBI tarafından düzenlenen STR projesi kapsamında, 17 aday STR lokusundan 13'ü seçilmiş ve böylelikle DNA veri bankasındaki 13 CODIS lokusu (CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317,

D16S539, D18S51, D21S11) belirlenmiştir (Şekil 4). Bu lokuslardan FGA, D18S51 ve D21S11en fazla polimorfizme sahip lokuslar olmasına karşın TPOX en düşük varyasyona sahiptir. Ayrıca bu 13 lokusun akraba olmayan ve rastgele seçilmiş bireylerde aynı genotipi verme olasılığı trilyonda 1 den bile daha azdır (Butler 2005).



Şekil 4. 13 CODIS STR lokusu (<http://www.cstl.nist.gov/strbase/fbicore.htm>).

2.5.1. STR Lokus ve Alellerin Adlandırılması

STR lokuslarının isimlendirilmesi açık ve anlaşılır olmalıdır. Eğer lokus bir gen parçasıysa veya gen içerisinde yer almaktaysa o genin ismi lokusu belirlemektedir. Örneğin, TH01 lokusunda, TH ifadesi 11. kromozomda yerleşmiş olan insan tirozin hidroksilaz enzimini, 01 ise tirozin hidroksilaz geninin 1. intron bölgesini ifade etmektedir. Bazen ön ek olarak ‘HUM’ eki insanı ifade etmek için lokusun başında kullanılmaktadır. Bu durumda lokus HUMTH01 olarak adlandırılır.

STR lokusları gen bölgelerinin dışında yer alıyor ise isimlendirme şu şekilde yapılır: Örneğin D16S539 lokusunda; D harfi DNA, 16 rakamı hangi kromozomda yer aldığını, S harfi lokusun tek kopya dizisine sahip olduğu (single), 539 ise lokusun kromozom üzerinde yerleştiği yeri göstermektedir.

Tamamlanmamış tekrar ünitelerinin (mikrovaryantlar) isimlendirilmesinde ise, tamamlanmış tekrar sayısı tam sayı, tamamlanmamış tekrarlardaki baz çiftlerinin sayısı ise ondalık sayı olarak yazılarak alel isimlendirilmelidir. Örneğin; FGA lokusundaki 22,2 aleli

22 tetranükleotid tekrar ünitesi ve 2 bazlık tamamlanmamış tekrar bölgesini içermektedir (Bär ve ark. 1997).

2.6. Degrade DNA Çalışmalarında Karşılaşılan Sorunlar ve Yaklaşımlar

Büyük oranda hasar görmüş DNA kullanılarak, ticari STR multipleksleri ile yapılan PCR analizleri sonucunda genetik bilgi ya kısmen elde edilir ya da hiç elde edilemez. Birçok laboratuvar bu kısıtlı örneklerde daha ileri analizlere gitmeyi tercih etmezken bazıları ise biraz daha bilgi elde edebilmek için SNP analizleri ve mitokondriyal DNA dizinleme analizlerine yönelmektedirler (Bender 2000; Just ve ark. 2004; Dixon ve ark. 2006). Bu yaklaşımlar bu tür sorunlu örneklerde faydalı olmaktadır fakat STR multiplekslerinden daha düşük ayırım gücüne sahip oldukları gibi zaman ve maliyeti de artırmaktadırlar (Mulero ve ark. 2008).

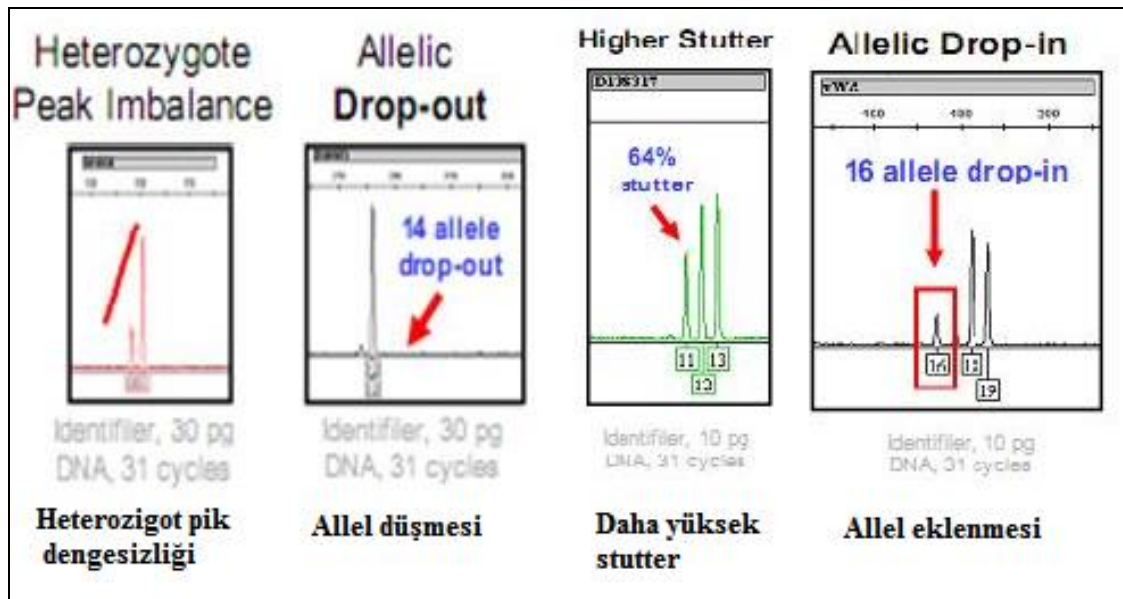
Bir başka yaklaşım da, ticari STR multipleksleri için önerilen PCR döngü sayısını artırmaktır (Mulero ve ark. 2008; Kloosterman ve Kersbergen 2003; Whitaker 2000). Bu amaçla kullanılan ‘LCN’ (Low Copy Number-Düşük kopya sayısı) veya ‘LT-DNA’ (Low Template DNA- düşük miktar kalıp DNA) olarak adlandırılan analiz teknikleri, 100 pg’dan daha az miktarda DNA içeren örneklerin analizi için kullanılmaktadır (Gill ve ark. 2000). LCN DNA profillemesi, sadece birkaç hücreyi analiz edebilecek kadar hassas bir tekniktir. PCR döngü sayısını artırmak genelde adli örneklerde özellikle kemikten elde edilen antik DNA çalışmalarında kullanılmaktadır. Gill ve arkadaşları (Gill 2001; Gill ve ark. 1994) Romanov ailesine ait 70 yıllık kemiklerde STR tiplendirme yaparken PCR analizlerinde 38-43 döngü kullanmışlardır.

Ancak düşük miktardaki DNA ile yapılan bu analizler, alel kaybı, alel eklenmesi, lokus kaybı, heterozigot pik dengesizliği, ‘stutter’ ürünlerinin oluşumu ve ‘stutter’ pik yüksekliklerindeki tutarsızlık gibi stokastik etkilere oldukça duyarlı olmakla birlikte laboratuvar kaynaklı kontaminasyon gibi riskleri de taşımaktadır (Gill ve ark.2000) (Şekil 5).

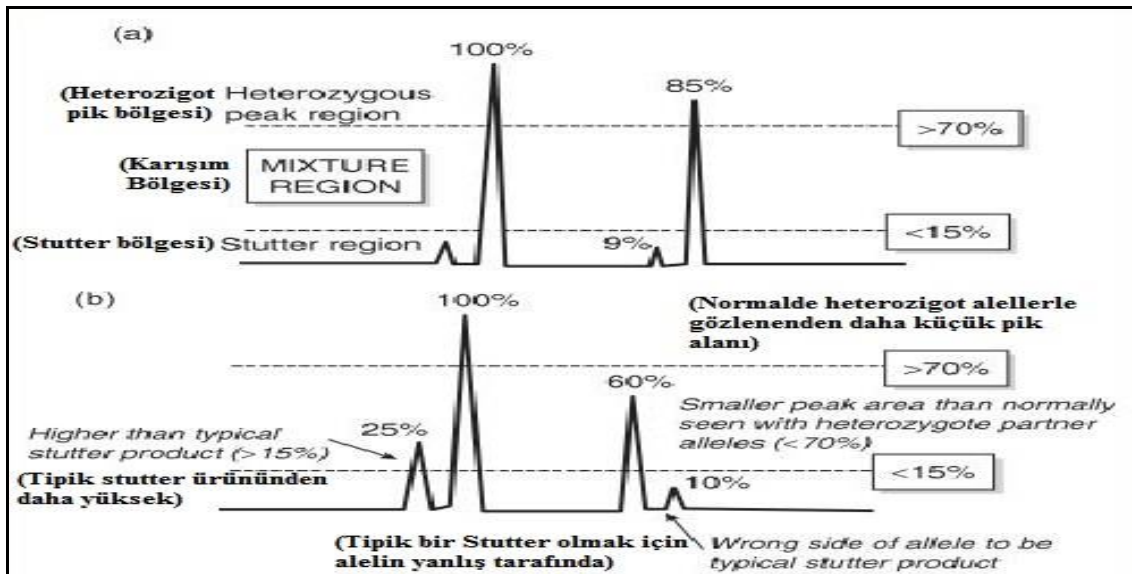
Heterozigot bir lokustaki alellerden birinin yok olması alel kaybı (düşmesi) olarak tanımlanmaktadır. Alel kaybı, heterozigot pik dengesizliğinin gözlemlendiği en uç noktadır. Heterozigot pik dengesizliği ise, heterozigot bir lokusun iki alelinin yüksekliklerinin birbirlerine göre oranlarının bozulması olarak ifade edilir (Şekil 6). Her iki alelin aynı yükseklikte olması mükemmel denge olarak kabul edilmektedir. (Buckleton 2009). Ancak bu her zaman mümkün olmamaktadır. Bu amaçla, kullanılan ticari kitler için yapılan

validasyon çalışmalarıyla her bir lokus için minimum ve maksimum pik yükseklik oranları belirlenmiştir.

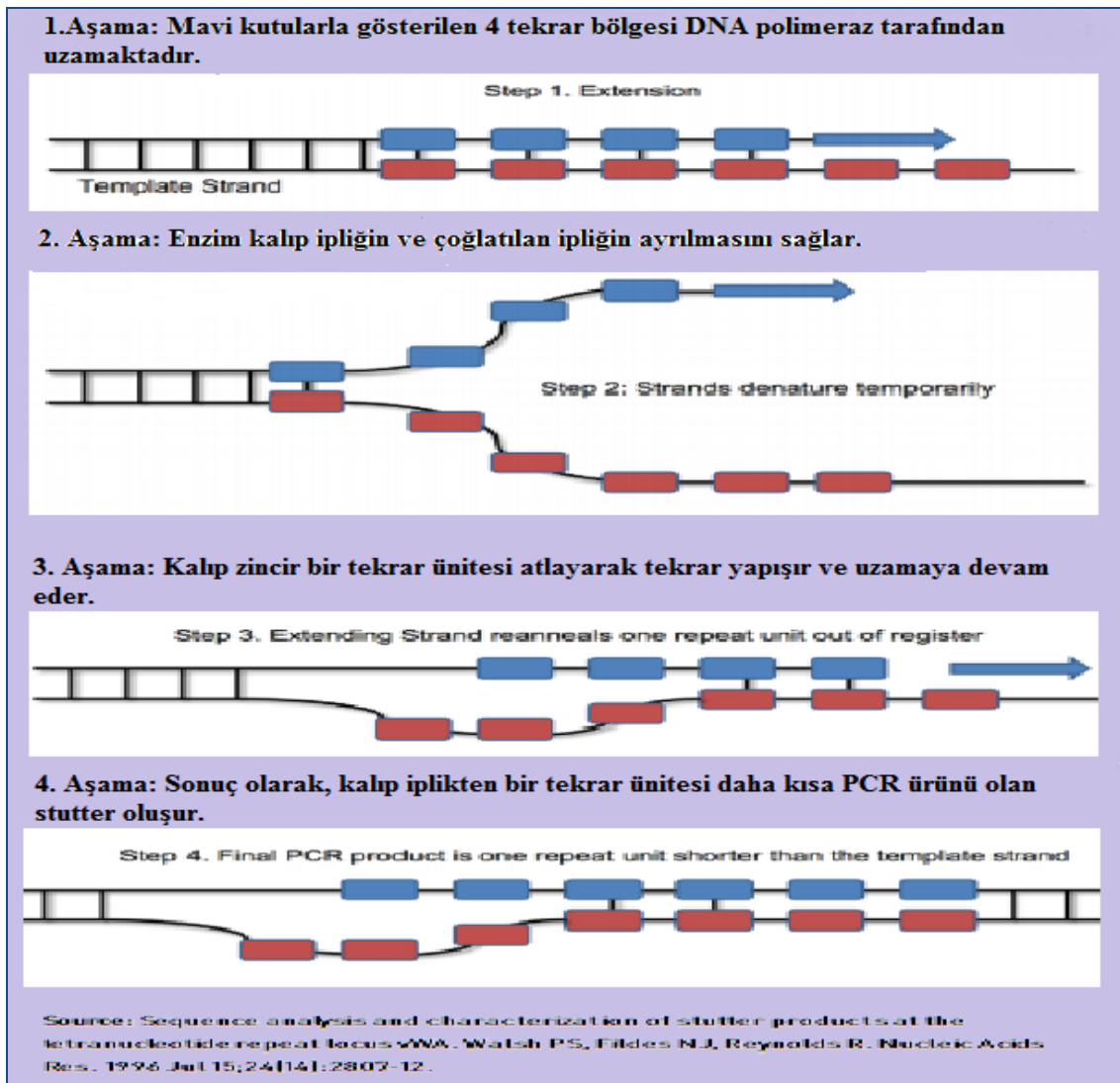
Lokus kaybı, bir lokusta hiç alel görülmemesi olarak tanımlanırken, alel eklenmesi, örneğe ait olmayan bir alelin profile gözlenmesidir (Buckleton 2009). ‘Stutter’ ürünleri, PCR artefaktı olarak da nitelendirilen, tekrar ünitesi ana alelden bir veya iki tekrar ünitesi daha az olan ve ana alelin hemen öncesinde oluşan piklerdir. Türkçe karşılığı ‘kekemelik’ olarak bilinmesine rağmen yaygın kullanımı ‘stutter’dır. PCR reaksiyonunun uzama aşamasında DNA polimeraz enzimi, bir tekrar ünitesini atladıktan sonra DNA ipliğine bağlanır ve o bölgeyi çoğaltır, bu durum DNA iplik kayması olarak nitelendirilmektedir (Şekil 7). Stutterlara, aynı lokusta yer alan uzun DNA dizileri içeren alellerde, daha kısa alellere oranla daha fazla raslanmaktadır. Ayrıca kısa tekrar ünitelerine sahip lokuslarda ise daha fazla tekrar ünitesi içeren lokuslara göre daha fazla görülmektedir. PCR reaktiflerinde $MgCl_2$ miktarının gerekenden daha fazla olması durumunda da ‘stutter’ gözlenmektedir (Sailus ve ark. 2012, Applied Biosystems; Walsh ve ark. 1996).



Şekil 5. Düşük miktardaki DNA analizlerinde gözlenen stokastik etkiler (Butler ve Hill 2010)



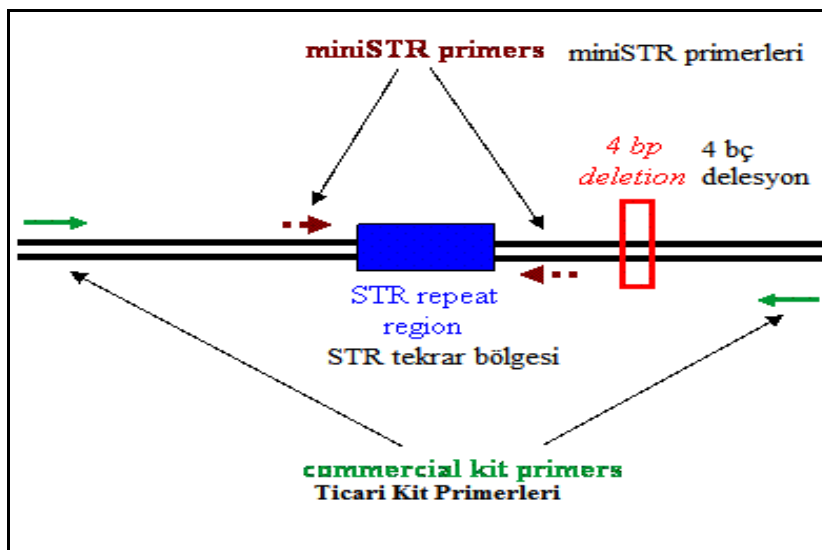
Şekil 6. Heterozigot pik oranları (Gill 1997)



Şekil 7: Şematik olarak Stutter oluşumu (Walsh ve ark. 1996)

Düşük DNA miktarı ile yapılan PCR analizlerinde gözlenen bu tür stokastik etkilere karşı PCR parametrelerinde uygulanan değişikliklerin yanı sıra alelerin ampikon boyutlarını kısaltma yoluna da gidilmiştir.

Geleneksel STR kitleri genelde aynı lokusları içermekte, fakat bunlar primer pozisyonlarının yeniden düzenlenmesi ile farklı ampikon boyutlarına sahip olmaktadır (Hill ve ark. 2011). Özellikle bozulmuş DNA'ları tiplendirmek için, STR tekrar bölgelerine oldukça yakın yeni primerler tasarlanmıştır. (Şekil 8). Küçük PCR ürünleri elde edilen bu primer değişiklikleri PCR için uygun kalıp molekül (DNA) potansiyelini artırmaktadır. Örneğin, AmpFISTR® MiniFiler™ kiti bu şekilde geliştirilmiştir (Mulero ve ark. 2008).



Şekil 8. Mini STR ve geleneksel ticari kitlerin primer konumları. (<http://www.cstl.nist.gov/strbase/miniSTR.htm>)

Yeniden tasarlanan tekrar bölgelerinin yanı sıra, bozulmuş veya düşük miktarda DNA içeren örnekleri tiplendirebilmek için, NIST (National Institute of Standards and Technology) tarafından boyutları 50-150 bç arasında değişen 26 yeni CODIS dışı mini STR lokusu geliştirilmiştir, küçük ampikon boyutları ve kromozom üzerindeki yerleşimleri esas alınarak belirlenmiştir. Bu lokuslar; ya 13 CODIS lokusunun bulunduğu kromozomların dışındaki kromozomlarda veya CODIS lokusları ile aynı kromozomda ise o lokusların en az 50 bp uzağında yer almaktadırlar (Hill ve ark. 2008).

Coble ve arkadaşları, boyutları 125 bç'den daha kısa PCR ürünleri veren 26 yeni CODIS dışı mini STR'dan 6 tanesini (D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434, D22S1045) kullanarak 3'er lokuslu 2 minipleks oluşturmuştur (Coble ve Butler 2005). Böylece, en son tanımlanan Mini STR'lerle birlikte yeni multipleksler oluşturma stratejileri geliştirilmeye başlanmıştır. Bunlardan biri; ayırım gücü diğer mini STR'lere göre daha yüksek 3 yeni Mini STR (70-125 bç) lokusunu (D10S1248, D22S1045, D2S441)

mevcut STR kitlerine ilave etmek, diğeri ise; yeniden tasarlanarak ampikon boyutları kısaltılmış mütiplekslere, midi STR'ler olarak tanımlanan boyutları 120-180 bp arasında olan 3 lokusu (TPOX, D12S391, D1S16565) ilave etmektir. Böylelikle, ampikon boyutlarının azaltılması ve daha fazla lokus belirlenmesinin sağlanmasıyla yeni geliştirilecek mütipleksler sayesinde oldukça bozulmuş örneklerde dahi başarı şansının artacağı düşünülmektedir (Gill ve ark. 2006).

2.7. Adli Bilimlerde STR Tiplendirme İçin Kullanılan Ticari Kitler

2.7.1. AmpFlSTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon Kiti

AmpFlSTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon kiti, 15 adet tetranükleotid (4 bazlı tekrar ünitesi) tekrar bölgesi ve cinsiyet belirleyici lokus olan Amelogenin lokusu ile toplam 16 STR bölgesini tek PCR'da çoğaltabilen DNA profillemesi sistemi olarak Applied Biosystems (ABI) tarafından üretilmiştir. Kit, CODIS'te yer alan 13 STR lokusunu (TPOX, D3S1358, D5S818, FGA, CSF1P0, D8S1179, D7S820, TH01, VWA, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11) içermektedir (AmpFlSTR® Identifiler® Amplification PCR Kit User's Manual) (Tablo 1).

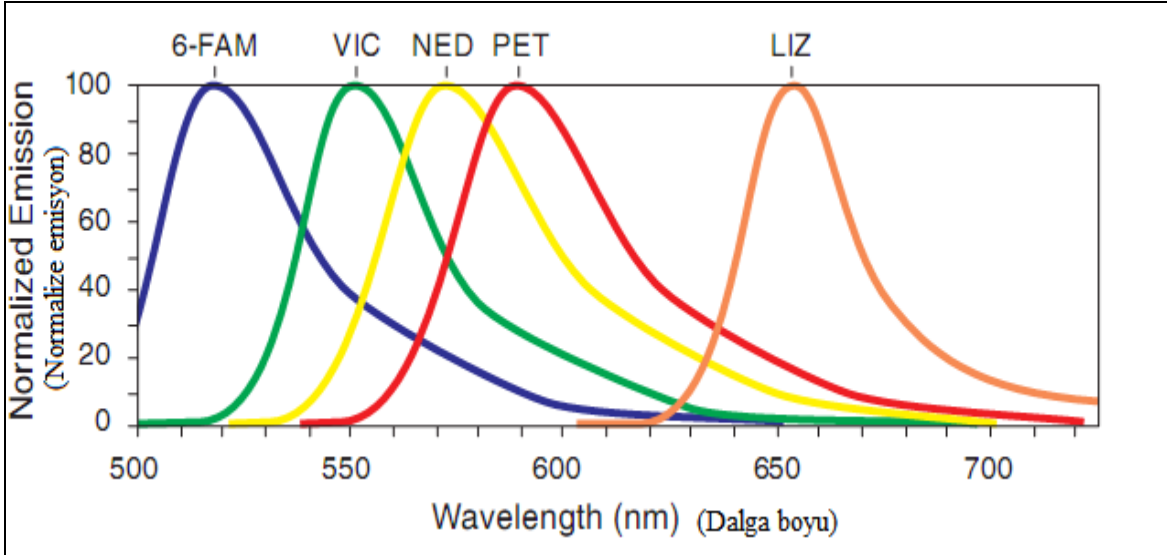
Kitte yer alan primerler, 5 farklı floresan boya kullanılarak geliştirilmiştir. Bu boya her biri (PET, LIZ, 6-FAM, VIC, NED) 660 nm'ye kadar farklı dalga boylarında floresan ışımaya yaymaktadır (Şekil 9).

CSF1P0, D2S1338, D13S317, D16S539 ve TPOX lokuslarının primer sentezinde, primer ile floresan boyalar arasında nükleotidsiz bağlayıcılar yerleştirilmiştir. Bu nükleotidsiz bağlayıcılar alellerin yeniden üretilebilirliğine olanak tanır ve multiplekstekki lokuslar arasında yeterli boşluğu sağlayarak lokusların üst üste gelmesini önler (Grossman ve ark. 1994; Baron 1996).

AmpFlSTR® Identifiler™ kit kılavuzunda, PCR reaksiyonunda optimum sonuç elde etmek için 0.5-1.25 ng/μl aralığında DNA miktarı ile analize gidilmesi önerilmektedir. AmpFlSTR® Identifiler™ kit içerisinde yer alan alelik ladder, her lokus için en yaygın alelleri içermektedir.

Tablo 1. AmpFlSTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon kiti lokus bilgileri

Lokus Adı	Kromozom Pozisyonu	Tekrar Üniteleri	Floresan Boya	Alel boyut aralığı (bp)
D8S1179	8	(TCTR) _{nc}	6-FAM	123-170
D21S11	21q11.2-q21	(TCTA) _n (TCTG) _n [(TCTA)3TA(TCTA)3TCA(TCTA)2TCCA TA] (TCTA) _n		184-239
D7S820	7q11.21-22	(GATA) _n		255-291
CSF1PO	5q33.3-34	(AGAT) _n		304-342
D3S1358	3p	TCTA (TCTG)1-3 (TCTA) _n	VIC	111-140
TH01	11p15.5	(AATG) _n		163-202
D13S317	13q22-31	(GATA) _n		216-244
D16S539	16q24-qter	(AGAT) _n		252-292
D2S1338	2q35-37.1	(TGCC) _n (TTCC) _n		307-359
D19S433	19q12-13.1	(AAGG)(AAAG)(AAGG)(TAGG)(AAGG) _n	NED	101-135
vWA	12p12-pter	TCTA(TCTG)3-4(TCTA) _n		154-206
TPOX	2p23-2per	(AATG) _n		222-250
D18S51	18q21.3	(AGAA) _n		262-345
AMEL	X: p22.1–22.3 Y: p11.2	-	PET	107 112
D5S818	5q21-31	(AGAT) _n		134-172
FGA	4q28	(TTTC)3TTTT TTCT (CTTT) _n CTCC (TTCC)2		214-355



Şekil 9. AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon kitinde kullanılan floresan boyalara ait ışım spektrumu. (AmpFISTR® Identifiler® Amplification Kit User's manual).

2.7.2. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti

AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon kiti, bozulmuş veya inhibe olmuş DNA örneklerini genotiplemek için Applied Biosystems (ABI) tarafından geliştirilmiştir. Kit 8 otozomal STR lokusu (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1P0 ve FGA) ve cinsiyet belirleyici Amelogenin lokusunu tek PCR'da çoğaltabilmektedir (Tablo 2). Kitte kullanılan STR primerleri tekrar dizinine daha yakın olduğu için, elde edilen amplicon boyutları Identifiler ve SGM Plus kitlerinden elde edilen amplicon boyutlarından daha kısadır.

AmpFISTR® MiniFiler™ kit kılavuzunda PCR reaksiyonu için en uygun DNA miktarı 0.5-0.75 ng/μl olarak bildirilmiştir. Ayrıca, hematin (80 μM) ve humik asit (30ng/μl) ile yapılan inhibasyon çalışmasında, AmpFISTR® Identifiler® ve AmpFISTR® SGM Plus® kitlerinde profil elde edilememesine karşın AmpFISTR® MiniFiler™ kiti ile tam profil elde edilmiştir.

Kit üretiminde 5 farklı floresan boya (PET, LIZ, 6-FAM, VIC, NED) kullanılmıştır (AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit User Guide).

Tablo 2. AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon kiti lokus bilgileri

Lokus Adı	Kromozom Pozisyonu	Tekrar Üniteleri	Alel boyut aralığı (bç)	Floresan Boya
D13S317	13q22-31	(GATA)n	103-132	6-FAM
D16S539	16q24-qter	(AGAT)n	74-116	NED
D2S1338	2q35-37.1	(TGCC)n(TTCC)n	120-172	VIC
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	—	102 107	VIC
D7S820	7q11.21-22	(GATA)n	149-185	6-FAM
CSF1PO	5q33.3-34	(AGAT)n	86-123	PET
D21S11	21q11.2-q21	(TCTA)n(TCTG)n[(TCTA)3TA(TCTA)3TCA(TCTA)2TCCA TA] (TCTA)n	187-243	VIC
D18S51	18q21.3	(AGAA)n	124-204	NED
FGA	4q28	(TTTC)3TTTT TTCT (CTTT)n CTCC (TTCC)2	150-283	PET

2.7.3. AmpFlSTR® SGM Plus® PCR Amplifikasyon Kiti

AmpFlSTR® SGM Plus® PCR Amplifikasyon Kiti, 10 adet tetranükleotid lokusunu ve cinsiyet belirleyicisi olan Amelogenin lokusunu tek bir PCR reaksiyonunda çoğaltabilmektedir. Kitte, 6 adet ikinci nesil multipleks (AmpFlSTR® SGM™) lokusuna (THO1, VWA, FGA, D8S1179, D18S51, D21S11) ilave olarak 4 yeni lokus (D16S539, D3S1358, D2S1338, D7S820) daha eklenerek kitin ayırım gücü yaklaşık olarak 1/50 milyondan 1/33 trilyona çıkarılmıştır (Sparkes 1996, 1996a; AmpFlSTR® SGM Plus® Amplification Kit User's Manual) (Tablo 3).

Kitin içerdiği D3S1358 ve D19S433 lokuslarının düşük boyutlara (100-150 bç) sahip olması, adli örneklerde özellikle bozulmuş örneklerde kullanışlı olmasını sağlamıştır (Cotton ve ark. 2000).

Tablo 3. AmpFISTR® SGM Plus® PCR Amplifikasyon Kiti Lokus Bilgileri

Lokus Adı	Kromozom Pozisyonu	Tekrar Üniteleri	Alel boyut aralığı (bp)	Floresan Boya
D3S1358	3p	TCTA (TCTG)1-3 (TCTA) _n	114–142	5-FAM
vWA	12p12-pter	TCTA(TCTG)3-4(TCTA) _n	157–209	
D16S539	16q24-qter	(AGAT) _n	234–274	
D2S1338	2q35–37.1	(TGCC) _n (TTCC) _n	289–341	
Amelogenin	X: p22.1–22.3 Y: p11.2	—	107 113	JOE
D8S1179b	8	(TCTR) _{nc}	128–172	
D21S11	21q11.2–q21	(TCTA) _n (TCTG) _n [(TCTA)3TA(TCTA)3TCA(TCTA)2TCCA TA] (TCTA) _n	187–243	
D18S51	18q21.3	(AGAA) _n	262–345	
D19S433	19q12–13.1	(AAGG)(AAAG)(AAGG)(TAGG)(AAGG) _n	106–140	NED
TH01	11p15.5	(AATG) _n	165–204	
FGA	4q28	(TTTC)3TTTT TTCT (CTTT) _n CTCC (TTCC)2	215–353	

Kitte kullanılan primerler 3 adet (5-FAM, JOE, NED) floresan boya ile işaretlenmiş olup dördüncü boya olan ROX ise size standart olarak işaretlenmiştir (AmpFISTR® SGM Plus® Amplification Kit User's Manual).

AmpFISTR® SGM Plus® kit kılavuzunda PCR reaksiyonu için gerekli DNA miktarı, 28 döngü için 1ng/μl-2.5 ng/μl olarak bildirilmiştir.

2.7.4 AmpFlSTR® NGM SElect™ PCR Amplifikasyon Kiti

AmpFlSTR® NGM SElect™ kiti 16 adet STR lokusunu ve cinsiyet belirleyici Amelogen lokusunu da içeren ileri nesil bir multiplekstir (NGM-Next Generation Multiplex). Kit, AmpFlSTR® SGM Plus® kitinde yer alan bütün lokusları içermektedir. Ayrıca kitte, Avrupa Adli Bilimler Enstitüleri Ağı (ENFSI) ve Avrupa DNA Profilleme Grubu (EDNAP) tarafından önerilen 5 adet mini STR lokusunun (D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656 ve D12S391) yanı sıra SE33 lokusu da yer almaktadır (Tablo 4). Kitin, yeni kimyasal formülasyonu ile inhibe örneklerdeki, düşük moleküler ağırlıklı bölgelerde daha fazla lokus kullanılarak bozulmuş örneklerdeki performansı artırılmıştır. Elektroforezde daha temiz bir arka plan elde etmek için primerler gelişmiş teknoloji ile saflaştırılıp sentezlenmiştir. (AmpFlSTR® NGM SElect™ User Guide, Applied Biosystems).

Ayrıca AmpFlSTR® NGM SElect™ kiti ile yapılan humik asit inhibasyon çalışmasında kit performansı değerlendirilmiştir. Bu çalışmada; 50 ng/μl ve 100 ng/μl konsantrasyonlarında humik asit kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu sonuçları incelenmiş ve her iki konsantrasyonda da tam profil elde edilmiştir (AmpFlSTR® NGM ve NGM SElect™ Amplification Kits, Product Bulletin, Applied Biosystems).

AmpFlSTR® NGM SElect™ kit kılavuzunda PCR reaksiyonu için, 1 ng/μl (29 döngü) ve 0.5 ng/μl (30 döngü) DNA miktarı kullanılması önerilmektedir.

Kitte yer alan primerler 6-FAM™, VIC™, NED™ ve PET™ floresan boyalarıyla, size standart ise LIZ™ ile işaretlenmiştir.

Tablo 4. AmpFlSTR® NGM SElect™ Amplifikasyon kiti lokus bilgileri

Lokus Adı	Kromozom Pozisyonu	Tekrar Üniteleri	Floresan Boya	Alel boyut aralığı (bp)
D8S1179	8q24.13	(TCTR)nc	VIC	123-170
D21S11	21q11.2-q21	(TCTA) _n (TCTG) _n [(TCTA)3TA(TCTA)3TCA(TCTA)2TCCA TA] (TCTA) _n		184-239
D18S51	18q21.3	(AGAA) _n		262-345
Amelogenin	X: p22.1–22.3 Y: p11.2	-		107 112
D3S1358	3p21.31	TCTA (TCTG)1-3 (TCTA) _n	PET	111-140
D2S441	2p14	TCTA		78-110
D1S1656	1q42.2	(TAGA) _n (TGA) ₀₋₁ (TAGA) _n (TAGG) ₀₋₁ (TG) ₅		121-169
D12S391	12p13.2	(AGAT) ₈₋₁₇ (AGAC) ₆₋₁₀ (AGAT) ₀₋₁		209-253
SE33	6q14	(AAAG) _n		
D16S539	16q24.1	(AGAT) _n	6-FAM	252-292
D2S1338	2q35	(TGCC) _n (TTCC) _n		307-359
vWA	12p13.31	TCTA(TCTG)3-4(TCTA) _n		154-206
D10S1248	10q26.3	(GGAA) _n		79-123
D22S1045	22q12.3	(ATT) _n	NED	82-115
TH01	11p15.5	(AATG) _n		163-202
D19S433	19q12	(AAGG)(AAAG)(AAGG)(TAGG)(AAGG) _n		101-135
FGA	4q28	(TTTC)3TTTT TTCT (CTTT) _n CTCC (TTCC)2		214-355

2.7.5. Investigator™ Hexaplex ESS Kiti

Investigator™ Hexaplex ESS kiti Avrupa Adli Bilimler Ağı (ENFSI) ve Avrupa DNA Profilleme Grubu (EDNAP) tarafından önerilen 5 yeni mini STR lokusunun (D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391, D22S1045) yanı sıra TH01 lokusu ve Amelogenin cinsiyet lokusunu tek PCR reaksiyonunda çoğaltabilmektedir (Tablo 5). PCR ürün boyutu (amplikon) 213 bp ile sınırlandırılmış olup kitte yer alan bu düşük moleküler ağırlığa sahip genetik işaretleyiciler bozulmuş örneklerin analizine olanak sağlamaktadır. Özellikle degrade örnekler, leke çalışmaları ve ön tarama çalışmaları için önerilmektedir (Investigator™ Hexaplex ESS Handbook).

Investigator™ Hexaplex ESS kit el kitabında, PCR reaksiyonunda optimum sonuç elde etmek için 0.2-0.5 ng/μl miktarda DNA kullanılması önerilmektedir.

Kitte kullanılan primerler 3 farklı floresan boya (6-FAM™, BTG, BTY) ile size standart ise BTO floresan boyası ile işaretlenmiştir (Investigator™ Hexaplex ESS Handbook). Kitte yer alan 5 mini STR, AmpFISTR® NGM SElect™ kitinde farklı floresan boyalarla işaretlenmiş olarak yer almaktadır.

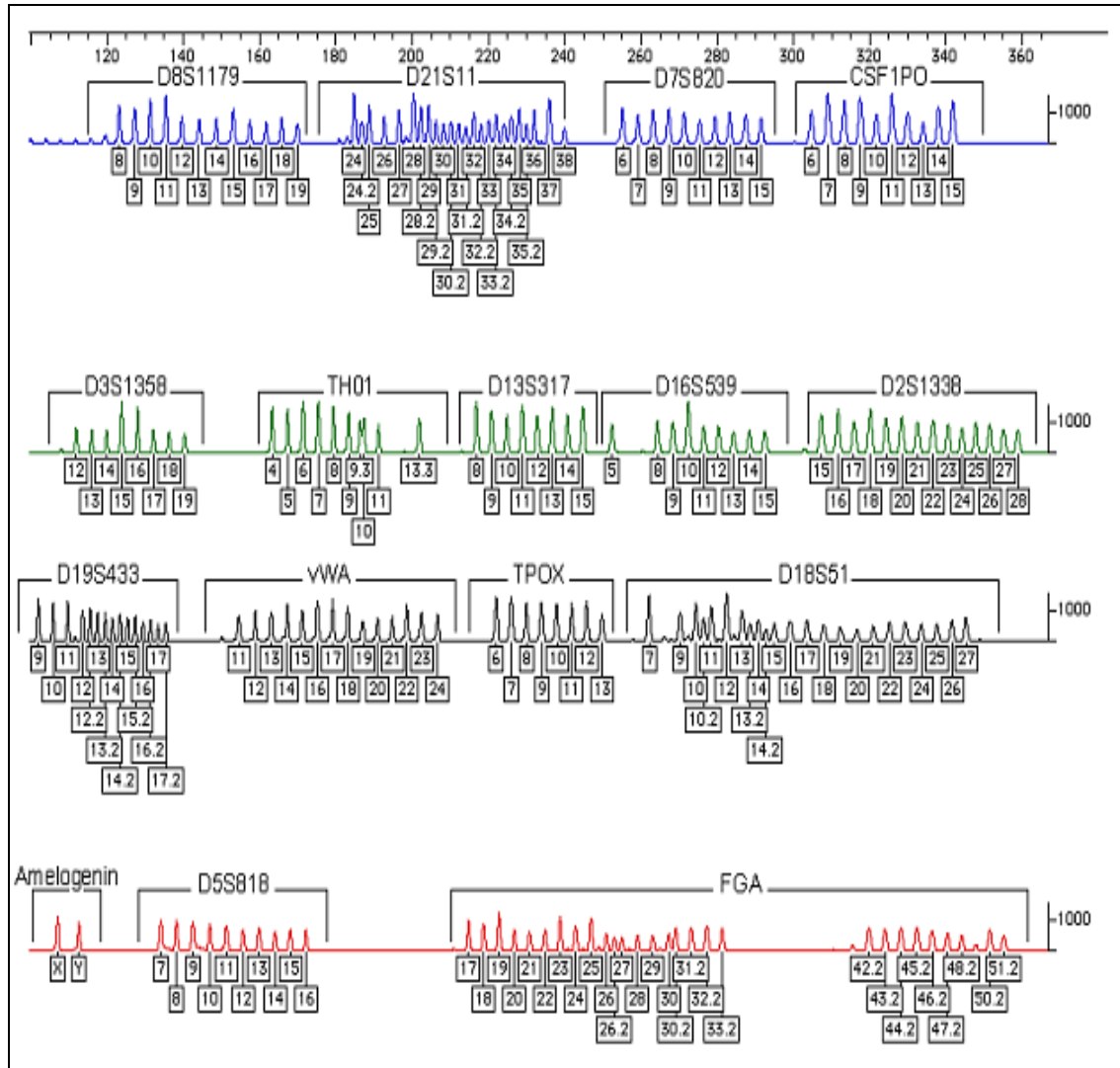
Tablo 5. Investigator™ Hexaplex ESS kiti lokus bilgileri

Lokus Adı	Kromozom Pozisyonu	Tekrar Üniteleri	Alel boyut aralığı (bp)	Floresan Boya
TH01	11p15.5	(AATG)n	165–204	BTG
D12S391	12p13.2	[AGAT]5 GAT [AGAT]7 [AGAC]6 AGAT	209–253	
D2S441	2p14	[TCTA]12	78–110	BTY
D10S1248	10q26.3	[GGAA]13	79–123	
Amelogenin	X: p22.1–22.3	—	107	6- FAM
	Y: p11.2		113	
D22S1045	22q12.3	[ATT]14 ACT [ATT]2	128–172	
D1S1656	1q42	[TAGA]16[TGA] [TAGA][TAGG]1[TG]5	121-169	

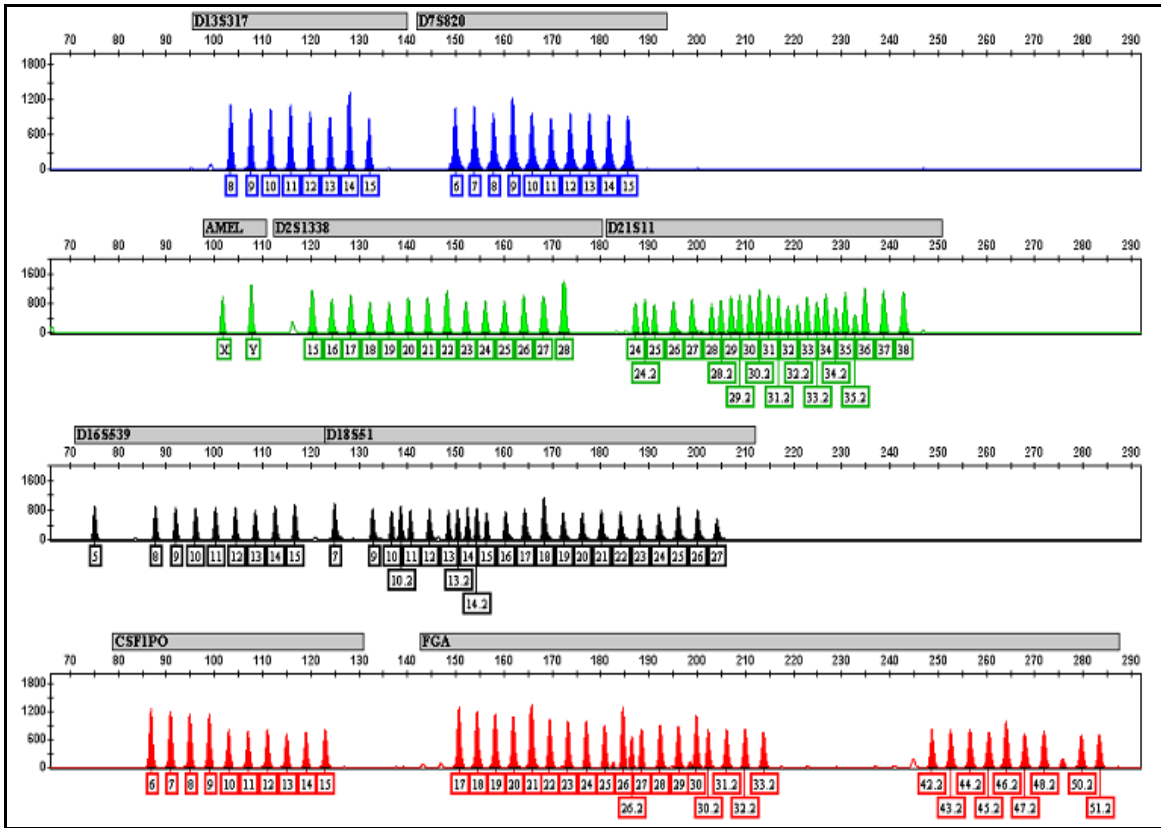
2.8. Alelik Cetvel

Alelik ladder, DNA analizlerinde özellikle elektroforetik ayırım yapan sistemlerde DNA dizilerinin boyutlarına göre değişen hareket farklılıklarını doğrulamak ve alel isimlendirmek için kullanılan bir referanstır. Genotipler, örneklerden elde edilen alel boyutları ile alelik ladderdaki alel boyutları karşılaştırılarak değerlendirilir (Butler ve ark. 1998; Bär ve ark. 1997).

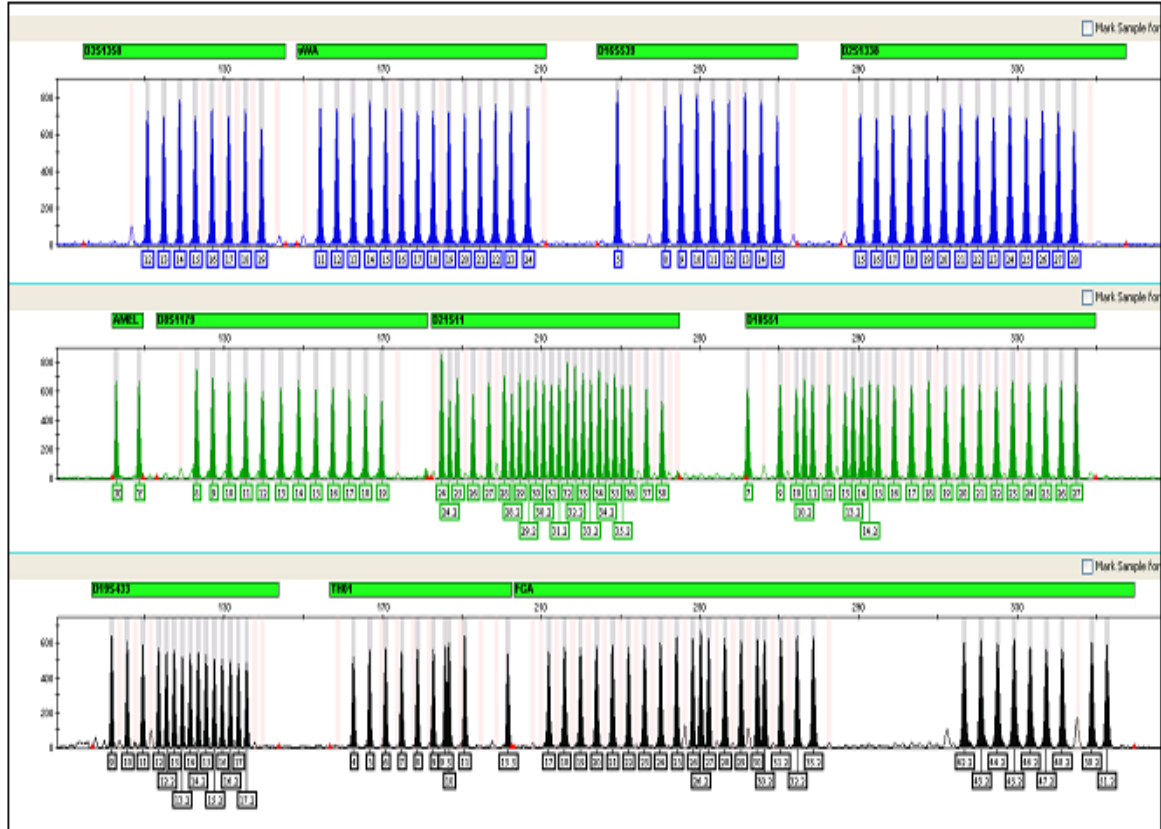
Polimorfizm, tekrar bölgelerindeki varyasyon olarak tanımlandığı için alelik ladderdaki tüm aleller bu prensip esas alınarak belirlenmeli ve en yaygın alelleri içermelidir. Dizileri değişkenlik gösteren tekrar ünitelerine sahip bölgeler için (VWA lokusu) alel isimlendirmede, diziler farklı olsa da tüm tekrarların sayısı yer almalıdır. Bir lokustaki alel, alelik ladderdaki hangi alel ile aynı boyutta (Size) ise o alelin numarasıyla adlandırılır. Ticari kitlere ait alelik ladderlar Şekil 10, 11, 12, 13 ve 14’te gösterilmektedir.



Şekil 10. AmpFISTR® Identifiler™ PCR Amplifikasyon kiti alelik cetvel (AmpFISTR® Identifiler™ Amplification Kit User's manual).



Şekil 11. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon kiti alelik cetvel (AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit User Guide)



Şekil 12. AmpFISTR® SGM Plus® PCR Amplifikasyon kiti alelik cetvel (AmpFISTR® SGM Plus® PCR Amplification Kit User Guide)

The figure displays three stacked mass spectra plots, each showing relative intensity (Y-axis, 0 to 70) versus m/z (X-axis, 80 to 240). The plots are labeled with sample names and corresponding m/z values.

- Top Plot (Blue):** Labeled "AM". The X-axis ranges from 80 to 240. The Y-axis ranges from 0 to 70. The plot shows a series of peaks corresponding to m/z values: 80, 81, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240. The peaks are labeled with numbers in brackets: [80], [81], [110], [111], [112], [113], [114], [115], [116], [117], [118], [119], [120], [150], [151], [152], [153], [154], [155], [156], [157], [158], [159], [160], [170], [171], [172], [173], [174], [175], [176], [177], [178], [179], [180], [181], [182], [183], [184], [185], [186], [187], [188], [189], [190], [191], [192], [193], [194], [195], [196], [197], [198], [199], [200], [201], [202], [203], [204], [205], [206], [207], [208], [209], [210], [211], [212], [213], [214], [215], [216], [217], [218], [219], [220], [221], [222], [223], [224], [225], [226], [227], [228], [229], [230], [231], [232], [233], [234], [235], [236], [237], [238], [239], [240].
- Middle Plot (Green):** Labeled "DE3344". The X-axis ranges from 80 to 240. The Y-axis ranges from 0 to 70. The plot shows a series of peaks corresponding to m/z values: 80, 81, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240. The peaks are labeled with numbers in brackets: [80], [81], [110], [111], [112], [113], [114], [115], [116], [117], [118], [119], [120], [150], [151], [152], [153], [154], [155], [156], [157], [158], [159], [160], [170], [171], [172], [173], [174], [175], [176], [177], [178], [179], [180], [181], [182], [183], [184], [185], [186], [187], [188], [189], [190], [191], [192], [193], [194], [195], [196], [197], [198], [199], [200], [201], [202], [203], [204], [205], [206], [207], [208], [209], [210], [211], [212], [213], [214], [215], [216], [217], [218], [219], [220], [221], [222], [223], [224], [225], [226], [227], [228], [229], [230], [231], [232], [233], [234], [235], [236], [237], [238], [239], [240].
- Bottom Plot (Black):** Labeled "DE3346". The X-axis ranges from 80 to 240. The Y-axis ranges from 0 to 70. The plot shows a series of peaks corresponding to m/z values: 80, 81, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240. The peaks are labeled with numbers in brackets: [80], [81], [110], [111], [112], [113], [114], [115], [116], [117], [118], [119], [120], [150], [151], [152], [153], [154], [155], [156], [157], [158], [159], [160], [170], [171], [172], [173], [174], [175], [176], [177], [178], [179], [180], [181], [182], [183], [184], [185], [186], [187], [188], [189], [190], [191], [192], [193], [194], [195], [196], [197], [198], [199], [200], [201], [202], [203], [204], [205], [206], [207], [208], [209], [210], [211], [212], [213], [214], [215], [216], [217], [218], [219], [220], [221], [222], [223], [224], [225], [226], [227], [228], [229], [230], [231], [232], [233], [234], [235], [236], [237], [238], [239], [240].

Şekil 14. Investigator™ Hexaplex ESS kitine ait alelik cetvel (Investigator™ Hexaplex ESS Handbook).

2.9. DNA Miktar Tayin Yöntemleri

DNA miktarının belirlenmesi, DNA izolasyon işleminden sonra elde edilen izolatta ne kadar DNA olduğunun bilinmesiyle, yapılacak olan analizler için uygun DNA konsantrasyonunun ayarlanması için gereklidir. Örnekteki DNA konsantrasyonunu belirlemek ve PCR inhibisyonunu değerlendirmek PCR analizinden önce gerekli bir aşamadır (Ricci ve ark. 2006).

DNA miktarı, spektrofotometrik, florometrik yöntemler ve kantitatif PCR (qPCR- Gerçek zamanlı PCR- Real Time PCR) yöntemleriyle belirlenebilir.

Spektrofotometrik Yöntem

Spektrofotometre ile DNA miktarı; seyreltilmiş veya seyreltilmemiş sıvı solüsyonlar (düşük iyon konsantrasyonlu) içerisindeki DNA'nın Ultraviyole ışık altında vermiş olduğu absorbans yoğunluğu üzerinden ölçülür. Spektrofotometrik ölçümde, bir çözelti içerisinde bulunan çözünmüş madde konsantrasyonunu belirlemek için ışığın çözelti içerisinde iletirme oranı kullanılır. Cihaz, maddeden geçen belirli bir dalga boyundaki ışık hüzmesini maddenin arkasındaki fotoselde ölçer. Bu ölçüm Beer-Lambert kanuna göre çalışmaktadır yani bir çözeltiden geçen ışık miktarı, ışığın çözelti içerisinde katettiği yol ve çözelti konsantrasyonu ile logaritmik olarak ters orantılı, emilen ışık miktarı ile doğru orantılıdır.

Bütün moleküller ışık enerjisini belirli bir dalga boyunda emerler. Proteinler ve nükleik asitler ışığı ultraviyole alanda 210 ila 300 nm arasında emerler. DNA ve RNA'nın maksimum emilimi 260 nm, proteinlerin ise 280 nm'de olmaktadır. Ancak DNA ve RNA ışığı kısmen 280 nm'de proteinler ise 260 nm'de soğurduğundan 260 ve 280 nm arasındaki ölçüm oranı (A_{260}/A_{280}) nükleik asitlerin saflık değerini verir. Bu oran DNA ve RNA için yaklaşık olarak 1,8 ile 2,0 arasındadır. Bu oran daha az olduğunda proteinden kaynaklı kontaminasyon olduğu düşünülür ancak RNA'dan kaynaklı kontaminasyon kesin olarak ayırt edilememektedir. Saf DNA oranı 1.8, saf RNA oranı 2.0 değerini vermelidir. 230 nm ve altında okunan örneklerde karbonhidratlar, peptitler, aromatik bileşikler veya fenol kontaminasyonu olduğu düşünülür. Saf örneklerde A_{260}/A_{230} oranı 2,2 olmalıdır (Somma 2006).

UV spektrofotometri ile DNA miktar tayini adli örnekler için çok da uygun değildir. Çünkü spektrofotometri çok düşük miktardaki DNA miktarını belirleyecek kadar hassas değildir. Olay yerinden alınan örnekler genelde degrade ve çok düşük miktarda DNA içermektedir. UV spektrofotometri ile güvenilir sonuç elde etmek için DNA konsantrasyonu en az 3 ng/ μ l olmalıdır. Bununla birlikte, spektrofotometri farklı türlere ait

DNA ve RNA'yı ayıramadığı için örnekteki insan DNA'sını ve insana ait olmayan DNA'yı ve RNA'yı da ölçmektedir (Nielsen ve ark. 2008).

Florometrik Yöntem

Bu yöntemde molekül tarafından ışığın absorbansına dayanan diğer bir spektrofotometrik tekniktir. Floresan boya DNA molekülünün zincire bağlandığında yayılan floresan ışımaya florometre cihazı ile ölçülür. DNA miktarı ile floresan ışımaya şiddetindeki artış doğru orantılıdır.

(http://www.nfstc.org/pdi/Subject03/pdi_s03_m05_05.html)

Kantitatif PCR (Quantitative PCR)

Gerçek zamanlı PCR (Real Time PCR) kullanılarak DNA miktarı tayini ilk olarak Higuchi ve arkadaşları tarafından 1993'te tanımlanmıştır ve 'kinetik PCR' olarak adlandırılmıştır (Higuchi ve ark. 1993). Günümüzde ise bu yöntem qPCR (quantitative PCR) olarak bilinmektedir (Timken 2005). Gerçek zamanlı PCR, PCR ürününü görünür hale getiren (monitörize edebilen) floresan işaretli probaların kullanımı ile her döngüde elde edilen PCR ürünün floresan ışımaya doğru orantılı olarak artması prensibine dayanarak gerçekleşen, PCR ürününe (amplikon) göre değişen floresan ışımaya ölçümüdür (Timken 2005; Günel 2007).

PCR reaksiyonu, bazen DNA izolasyonundan kaynaklı PCR inhibitörleri, bozunmuş ya da yetersiz DNA miktarı yüzünden veya tüm bu faktörlerin bir araya gelmesiyle başarısız olmaktadır. DNA kalitesini ve miktarını tayin eden bu test sayesinde hangi yöntemle analize devam edileceğine karar vermek zaman ve masraftan tasarruf etmeyi sağlamaktadır. Ayrıca, bu teknikle sınırlı miktarda DNA kullanarak DNA degradasyonu hakkında bilgi elde etmek ve PCR inhibitör varlığını belirlemek de mümkündür (Butler 2005; Ricci ve ark. 2006).

Ricci ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, degrade olmamış örneklerde (kan ve kemik iliği) spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilen DNA miktar tayin sonucu ile real time PCR ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında uyumlu ve güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, kemik ve bozunmaya maruz bırakılmış tükürük, vajinal swap ve kan lekesi gibi örneklerle yapılan çalışmada, izolatların sulandırılmasının güvenilir miktar tayini için gerekli olduğunu göstermişlerdir. Bu örneklerde 1/10 sulandırılarak yapılan real time sonucunda, direkt olarak kullanılan izolatlarla oranla daha fazla miktar tayin edilmiştir (Ricci ve ark. 2006).

2.10. Van Coğrafyası

Van, Doğu Anadolu bölgesinin Yukarı Murat-Van Bölümünde, 43°-20° doğu boylamları, 38°-28° kuzey enlemleri arasında yer almaktadır ve yükseltisi yaklaşık 2000 metredir. İlde Türkiye'nin en büyük volkanik set gölü olan Van gölü bulunmaktadır. Bölgede karasal iklim hâkimdir. Kışlar uzun ve karlı geçmesine rağmen yazlar oldukça sıcaktır (<http://www.mgm.gov.tr/veridegerlendirme/il-ve-ilceler-istatistik.aspx?m=VAN>).

2.11. Urartu Medeniyeti ve Van İli Yoncatepe Nekropolü Kazısı

M.Ö. 13. yüzyılın ortalarında Doğu Anadolu'da Hurri kökenli aşiretler yaşamaktaydı. Bu aşiretlerde merkezi bir yönetim söz konusu değildi ve halkın çoğunluğu göçebe, yarı göçebe yaşam tarzını benimsemişti. Asur kralı I. Salmaneser (M.Ö. 1274-1245) Asur belgelerinde bu dağlık bölgeden 'Uruatriu' olarak söz etmektedir. Urartular kendilerini 'Biainili' olarak adlandırırken, Asurlular onlara Urartu adını vermişlerdir. M.Ö. 9. yüzyılda Hitit ve Asur Krallığı'nın artan baskılarıyla bu aşiretler bir araya gelerek Urartu devletini kurmuşlardır. Urartu devletinin bilinen ilk kralı Aramu'dur. Urartu devletinin idari merkez niteliğindeki kalelerinden en görkemlisi olan Van kalesi, başkentleri olan Tuşpa'dadır. Urartular M.Ö. 830-730 yıllarında en geniş sınırlara ulaşmıştır. Urartu krallığının hangi tarihe dek ayakta kaldığı konusunda kesin bir bilgi bulunmamakla birlikte M.Ö. 7. yüzyılın sonlarına doğru tarih sahnesinden çekildiklerine dair bulgular elde edilmiştir (Sevin 2003; Ceylan ve ark. 2008).

Doğu Anadolu bölgesinde Demir çağını aydınlatmak üzere yapılan ilk arkeolojik çalışmalar 1879-1880 yıllarında British Museum'dan gelen bir bilim heyeti ile Van bölgesinde başlamıştır. Doğu Anadolu'da geniş bir bölgeye yayılan Urartu medeniyeti ile ilgili yapılan kazılardan ilki Erzincan Altıntepe'de Tahsin Özgüç tarafından yürütülmüştür. Daha sonra, Van ili Yoncatepe kazısı ise 1997 yılında Oktay Belli başkanlığında yürütülmeye başlanmıştır (Ceylan ve ark. 2008). Yoncatepe kazısından çıkartılan buluntular önceleri erken demir çağı olarak tarihlendirilmiştir (Sevin ve Kavaklı 1996; Sevin 1999; Belli ve Konyar 2003; Sevin 2004). Ancak daha sonra yapılan çalışmalar durumun farklı olduğunu ortaya koymuştur. Köroğlu ve Konyar, 2005 yılında (Köroğlu ve Konyar 2005) Yoncatepe kazısından çıkarılan buluntular (kırmızı astarlı ve yivli çanak çömlek, demir bilezik, yüzük, iğne ve hançer, bronz iğne ve fibula) ile Van bölgesindeki Dilkaya ve Karagündüz höyükleri ve mezarlık buluntularını karşılaştırarak, kronolojinin Urartulardan öncesi değil ancak Urartularla (M.Ö. 7-9) sınırlandırılabilirliğini ifade etmişlerdir.

Yoncatepe mezarlarının, çok odalı mezar yapısında olduğu ve bu mezar odaları ile bağlantılı ikinci ve üçüncü gömü alanların bulunduğu belirlenmiştir. Erkek kadın ayrımı yapılmadan mezar odalarına birden fazla gömü yapıldığı incelemelerden anlaşılmıştır. Ayrıca bazı odalarda normal gömülerin yanı sıra kremasyon (yakılarak gömülme) gömüler de tespit edilmiştir (Belli ve Konyar 2001). Yoncatepe nekropolünde 6 adet oda mezar (M1, M2, M3, M4, M5 ve M6) ortaya çıkarılmıştır (Şekil 15). Çok odalı bir mezar örneği olan M6'nın birinci bölümünde; birçok küçükbaş ve büyükbaş hayvan kemiği, köpek kafatasları ve 4 adet insan kafatası ile bunlara ait parçalanmış kemikler, ikinci bölümünde; 5 adet köpek kafatası ve bunlara ait kemikler, duvarları kalkerli toprağa açılmış olan üçüncü bölümde ise 1 adet insan kafatası ve 5 adet köpek kafatası kemiği çıkarılmıştır. Ölü hediyeleri olarak verilen eşyaların da çıkarıldığı bu mezarlar, Urartuların ölü gömme geleneğinde ölülerin mezarlara, ölü armağanları, kurbanlar ve özel eşyalarıyla birlikte gömüldüğünü göstermektedir (Belli 2001; Sevin 2003).



Şekil 15. Van-Yoncatepe nekropolü M3 oda mezarı (Konyar 2004)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deneyde Kullanılan Araç ve Gereçler

- Etüv
- Buzdolabı
- Derin dondurucu
- Santrifüj
- Vortex
- Rotator
- Qubit Fluorometre (Invitrogen)
- PCR Cihazı (Geneamp 9700, Applied Biosystems)
- ABI 3130 Genetik Analizör (Kapiller Elektroforez)
- Gerçek Zamanlı PCR Cihazı (7500 Real Time PCR, Applied Biosystems)
- DNA izolasyon Kabini (Laminar flow)
- Elektrikli Matkap

3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Sodyum Hipoklorid
- Etanol (%96'lık)
- Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)
- Hi-Di Formamid
- Tris
- Triton X-100 (%1)
- Proteinaz K
- Polimer (Pop-4, Performance Optimized Polymer)
- TBE çözeltisi (Tris-Borik asit-EDTA)

3.3. Deneyde Kullanılan Ticari Kitler

3.3.1. DNA İzolasyon Aşamasında Kullanılan Ticari Kitler

- QIAamp MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen)
- Amicon ultra-4 30 kDa (Milipore)

3.3.2. DNA Miktar Tayininde Kullanılan Ticari Kitler

- Quant-iT™ HS dsDNA HS Assay (Invitrogen)
- Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems)

3.3.3. PCR Aşamasında Kullanılan Ticari Kitler

- AmpFℓSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems)

- AmpF ℓ STR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems)
- AmpF ℓ STR® SGM Plus® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems)
- Investigator™ Hexaplex ESS Kit (Qiagen)
- AmpF ℓ STR® NGM SElect™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems)

3.4. Deneyde Kullanılan Kemik Materyali

Çalışmada materyal olarak, 2002 yılında Van-Yoncatepe kazısından çıkarılmış 35 adet arkeolojik insan kemiği kullanılmıştır. Bu kemikler üzerinde çalışmak için; İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Klinik Araştırmalar etik kurulundan gerekli izni ve kemiklerin yurtdışına çıkışları için gerekli izinler İstanbul Arkeoloji Müzesinden alınmıştır (Ek 17, Ek 18).

Kazıyı yapan arkeologlar tarafından söz konusu insan kemiklerinin yaklaşık 3000 yıl önce, demir çağı döneminde yaşayan Urartular'a ait olduğu bildirilmektedir. Kemikler 6 farklı oda mezardan çıkarılmıştır. Örneklerin hangi mezardan alındığı, kod numaraları ve kemik tipleri materyal listesinde detaylandırılmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. Van-Yoncatepe Kazısı'ndan elde edilen kemik materyal listesi

No	Örnek Kodu	Örnek Lokasyonu	Kemik Tipi
1	M2FD-1	Oda Mezar 2	Femur
2	M2FD-14	Oda Mezar 2	Femur
3	M2FD-16	Oda Mezar 2	Femur
4	M2FD-18	Oda Mezar 2	Femur
5	M2FD-19	Oda Mezar 2	Femur
6	M2FD-20	Oda Mezar 2	Femur
7	M2TD-1	Oda Mezar 2	Tibia
8	M2TD-7	Oda Mezar 2	Tibia
9	M2TD-10	Oda Mezar 2	Tibia
10	M2TD-12	Oda Mezar 2	Tibia
11	M6FD-1	Oda Mezar 6	Femur
12	M6FD-3	Oda Mezar 6	Femur
13	M6FD-4	Oda Mezar 6	Femur
14	M6FD-15	Oda Mezar 6	Femur
15	M6FD-16	Oda Mezar 6	Femur
16	M6TD-6	Oda Mezar 6	Tibia
17	M6TD-10	Oda Mezar 6	Tibia
18	M6TD-11	Oda Mezar 6	Tibia
19	M6TD-13	Oda Mezar 6	Tibia
20	M2DNA2 (E1)	Oda Mezar 2	Femur
21	M1DNA-4	Oda Mezar 1	Humerus
22	M4DNA-5	Oda Mezar 4	Femur
23	M5DNA1	Oda Mezar 5	Femur
24	M4DNA5	Oda Mezar 4	Patella
25	M3DNA3	Oda Mezar 3	Femur
26	M3DNA3	Oda Mezar 3	Kaburga
27	E2	Bilinmiyor	Femur
28	M5DNA2	Oda Mezar 5	Femur
29	M2DNA30	Oda Mezar 2	Femur
30	M1DNA4	Oda Mezar 1	Patella
31	M6FD5	Oda Mezar 6	Femur
32	M2FD15	Oda Mezar 2	Femur
33	M2TD6	Oda Mezar 2	Tibia
34	E3	Bilinmiyor	Tibia
35	E4	Bilinmiyor	Tibia

3.5. Kemik Dokudan DNA İzolasyon

3.5.1. Kemik Materyalinin İzolasyon İşlemi için Hazırlanması ve Çalışma Koşulları

Kemik ile yapılan genetik çalışmalarda, özellikle antik DNA çalışmalarında kontaminasyon riski çalışmanın en kritik kısmını oluşturmaktadır. Bu denli eski bir örnek çok uzun bir süre toprak altında kaldığı için birçok etmen tarafından kontamine olmuştur. Ayrıca DNA'sı aşırı derecede bozulmuş olduğundan modern insan DNA'sı tarafından kontamine edilmesi son derece kolaydır. Bu nedenle DNA izolasyon aşamasında modern kontaminasyon kaynaklarından uzak tutulması önemli bir noktadır. Yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı antik DNA çalışmalarının özel olarak tasarlanmış laboratuarlarda, özel kıyafetler giyilerek gerçekleşmesi sonuçların güvenilirliği açısından da önem arz etmektedir.

Çalışmanın DNA izolasyon aşaması Kopenhag Üniversitesi Antik DNA laboratuvarında gerçekleştirildi (Şekil 16). Laboratuvar insan, hayvan ve bitki DNA laboratuvarları olarak ayrılmaktadır. Laboratuvarı oluşturulmuş olan basınç sistemi sayesinde kapılar açıldığında dışarıdan içeriye hava akışı engellenmektedir. Laboratuvar tavanlarında bulunan UV lambalar tüm gece otomatik olarak çalışmakta ve sterilizasyonu sağlamaktadır. Ayrıca günlük olarak kapıdan duvarlara kadar hipoklorit ve etanol ile kimyasal temizlik işlemi yapılmaktadır. Laboratuvara girerken ayakkabılar dışarıda kalmakta, galoşlarla içeriye girilmekte ve maske, bone, eldiven giyildikten sonra özel bir tulum giyilerek tekrar ikinci bir eldiven takıldıktan sonra asıl çalışmaların yürütüldüğü kısma geçilmektedir. Çalışmaya başlamadan önce plastik bir kap içerisinde %10 luk hipoklorit çözeltisi hazırlanır ve eller bu çözeltide yıkandıktan sonra çalışmaya geçilir.

Kemiklerin temizlenmesi iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada %10'luk hipoklorit kullanılarak kimyasal temizlik yapıldı. İkinci aşamada ise laminar kabin içerisinde ince uçlu matkap kullanılarak kemik yüzeyinden 2-3 mm'lik kısım uzaklaştırıldı. Yeterince yumuşak olan eski doku ince uçlu matkap kullanılarak toz haline getirildi ve 2 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı. Toz halindeki örnekler derin dondurucuya kaldırılarak izolasyon aşamasına kadar -20°C'de bekletildi.



Şekil 16. Antik DNA laboratuvarı. (The Clean Lab). Center for GeoGenetics, Copenhagen, Denmark. Fotoğraf: Mikal Schlosser.

3.5.2. Silika Metoduna Dayalı QIAamp MinElute Kit ile DNA İzolasyonu

Toz haline getirilen kemik örneklerinde DNA izolasyon işlemi QIAamp MinElute PCR saflaştırma kiti kullanılarak farklı zamanlarda iki kez izolasyon işlemi gerçekleştirildi. QIAamp MinElute PCR saflaştırma kiti içerisinde; silika kolonlar, PB solüsyonu (DNA binding-bağlanma), PE solüsyonu (yıkama), EB solüsyonu (DNA elüsyon), AW1 ve AW2 yıkama solüsyonları yer almaktadır. Toz halindeki kemik örneklerinden DNA izolasyon işlemi için başlangıç miktarları Tablo 7’de, haricen hazırlanan solüsyonlar ise Ek 16’da

verilmiştir. İzolasyon aşamasında örnekler arasına rastgele olarak 5 adet negatif kontrol yerleştirildi.

Protokolün basamakları aşağıda belirtilen sıra ile gerçekleştirildi.

- 2ml'lik ependorf tüplerdeki kemik tozları üzerine 500µl Digestion çözeltisi eklendi ve örneklerin homojenize olması için tüpler rotatora yerleştirildi. Örnekler bir gece etüvde 56°C sıcaklıkta inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra etüvden alınan örnekler 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve üst faz 0,5 ml'lik Amicon ultra-4 (30kDa) kolona aktarıldı.
- Amicon kolonlar 3000 rpm'de yaklaşık 30 dk. (tüp içerisindeki üst fazdan kolonda 100 µl kalana kadar) santrifüj edildi.
- Amicon kolon içerisindeki sıvı faz, içerisine önceden 1ml PB çözeltisi eklenmiş 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı. Elde edilen karışım Qiagen mini Elute silika kolona aktarıldı.
- Tüpler santrifüje yerleştirildi ve 14000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi. Silika kolonlar yeni tüplere aktarıldı.
- Silika kolon üzerine 500 µl tuz çözeltisi (Salton wash buffer) eklendi ve 14000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi.
- Silika kolon yeni bir tüpe aktarılarak 500 µl AW1 yıkama çözeltisi eklendi ve 14000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi.
- Silika kolon yeni bir tüpe aktarılarak 500 µl AW2 yıkama çözeltisi eklendi ve 14000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi.
- Kolonları yıkama işleminden sonra silika kolon yeni bir tüpe aktarılarak 750 µl PE çözeltisi eklendi ve 14000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi.
- Silika kolon yeni bir tüpe aktarıldı ve boş olarak 14000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi ve oda sıcaklığında 2 dk. kurumaya bırakıldı.
- Kurutulmuş olan silika kolon 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 100 µl EB çözeltisi eklenerek 37 °C'de 15 dk. inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra kolon 14000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi ve üst faz (silika kolon) atılarak elde edilen izolat -20 °C'de saklandı.

Tablo 7. İzolasyon işleminde kullanılan kemik tozu miktarları

No	Örnek Kodu	Laboratuvar Kodu	1.İzolasyon Kemik Tozu miktarı (g)	2.İzolasyon Kemik Tozu miktarı (g)
1	M2FD-1	FY1-FY38	0,417	0,235
2	M2FD-14	FY2-FY39	0,375	0,231
3	M2FD-16	FY3-FY40	0,450	0,289
4	M2FD-18	FY4-FY41	0,428	0,225
5	M2FD-19	FY5-FY42	0,413	0,266
6	M2FD-20	FY6-FY43	0,450	0,241
7	M2TD-1	FY7-FY44	0,466	0,211
8	M2TD-7	FY8-FY46	0,496	0,297
9	M2TD-10	FY9-FY47	0,408	0,222
10	M2TD-12	FY10-FY48	0,515	0,294
11	M6FD-1	FY11-FY49	0,622	0,282
12	M6FD-3	FY12-FY50	0,211	0,178
13	M6FD-4	FY13-FY51	0,400	0,252
14	M6FD-15	FY14-FY52	0,324	0,158
15	M6FD-16	FY15-FY54	0,380	0,209
16	M6TD-6	FY16-FY55	0,414	0,199
17	M6TD-10	FY17-FY56	0,410	0,297
18	M6TD-11	FY18-FY57	0,575	0,272
19	M6TD-13	FY19-FY58	0,485	0,276
20	M2DNA2 (E1)	FY20-FY59	0,390	0,271
21	M1DNA-4	FY21-FY61	0,495	0,281
22	M4DNA-5	FY22-FY62	0,401	0,256
23	M5DNA1	FY23-FY63	0,515	0,230
24	M4DNA5	FY24-FY64	0,404	0,274
25	M3DNA3	FY25-FY65	0,358	0,192
26	M3DNA3	FY26-FY66	0,355	0,170
27	E2	FY27-FY67	0,401	0,244
28	M5DNA2	FY28-FY69	0,408	0,295
29	M2DNA30	FY29-FY70	0,387	0,238
30	M1DNA4	FY30-FY71	0,468	0,250
31	M6FD5	FY31-FY72	0,442	0,256
32	M2FD15	FY32-FY73	0,423	0,222
33	M2TD6	FY33-FY74	0,480	0,212
34	E3	FY34-FY75	0,460	0,294
35	E4	FY35-FY76	0,495	0,211

3.6. DNA Miktarı ve Kalitesinin Belirlenmesi

3.6.1. Florometrik Yöntemle DNA Miktar Tayini

İzolasyon aşamasından sonra elde edilen izolatların DNA miktar tayini öncelikle florometrik yöntem kullanılarak tespit edildi. Quant-iT™ HS dsDNA HS Assay (Invitrogen) kiti kullanılarak yapılan miktar tayini Qubit florometre (Invitrogen) cihazında belirlendi.

Quant-iT™ HS dsDNA HS Assay (Invitrogen) kit için miktar tayin protokolü aşağıda verilmiştir;

- Analizde kullanılacak olan reaktif ve solüsyon karışımı örnek sayısı göz önüne alınarak aşağıdaki gibi hazırlandı.
(Örnek sayısı X 199 µl kit solüsyonu) + (örnek sayısı X 1µl reaktif)
- Elde edilen karışımdan 0,5 ml'lik ependorf tüplere örnekler için 199 µl, standartlar için 190 µl dağıtıldı.
- Tüplerdeki karışımlara DNA izolatlarından 1 µl, standartlardan ise 10 µl eklenerek homojenize olması sağlandı.
- Tüpler 2-3 dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında ilk önce standartlar kullanılarak Qubit florometre cihazının kalibrasyonu yapıldı.
- Standartların cihazda ölçümünden sonra örneklerin ölçümü yapıldı ve sonuçlar kaydedildi.

3.6.2. Gerçek Zamanlı (Real Time) PCR Yöntemi ile DNA Miktar Tayini

Kemik izolatları hedef kemik DNA'sından (bu çalışmada insan DNA'sı) daha fazla bakteriyel DNA içerir. Konvansiyonel DNA miktar tayin yöntemleri ile karışım halinde bulunan bu iki DNA miktarını belirlemek mümkün değildir. PCR'da kullanılacak olan hedef DNA miktarı ise PCR analizlerini etkileyen önemli bir parametredir. Aynı zamanda PCR inhibitörlerinin varlığı gibi sebeplerden dolayı, hangi yöntemle analize devam edileceğine karar vermek için daha hassas bir miktar tayin yöntemi olan gerçek zamanlı PCR ile DNA miktar tayini yapıldı. Gerçek zamanlı PCR aşamasında insan DNA'sına özgü DNA miktar tayin kiti (Quantifiler® Human DNA Quantification Kit) kullanıldı. Kit 62 bç'lik primer kullanılarak çoğalan ürün miktarına göre DNA miktarını vermektedir (Tablo 8).

Tablo 8. Quantifiler® Human DNA Quantification Kit hedef DNA bölgesi (Applied Biosystems)

Kit Adı	Hedef Gen	Kromozom daki yeri	Amplikon boyutu	Çoğaltılan bölge	Kromozom sayısı
Quantifiler® Human DNA Quantification Kit	İnsan telomeraz revers transkriptaz geni (hTERT)	5p 15.33	62 bp	İntron	Diploid

3.6.2.1. Quantifiler® Human DNA Quantification Kitinin PCR için Hazırlanması

Öncelikle analiz sonuçlarının güvenilirliğini belirlemek için kit içerisinde bulunan 200 ng/μl stok DNA solüsyonundan 50, 16.7, 5.56, 1.85, 0.62, 0.21, 0.068 ve 0.023 ng/μl konsantrasyonlarında standart bir dilüsyon serisi hazırlandı. Daha sonra kit primer ve mix karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandı.

- Örnek sayısı X 10.5 μl Quantifiler Primer Karışımı
- Örnek sayısı X 12.5μl Quantifiler PCR Reaksiyon Karışımı

Elde edilen karışım yürütme tepsisi üzerindeki kuyucuklara 23 μl dağıtıldı. Daha sonra kuyucuklara 2'şer μl standart DNA dilüsyonları eklendi. Örnekler ise, PCR inhibitör varlığı göz önünde bulundurularak iki seri halinde hazırlandı. Birisi doğrudan, diğeri ise 1/4 oranında sulandırılmış örnek serisi olarak çalışıldı. Her iki şekilde hazırlanmış örneklerden 2'şer μl örnek kuyucuklara eklendi. Örnek tepsisi 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems) cihazına yerleştirildi. DNA miktarı, cihazda yüklü olan ABI Prism 7000 SDS (Sequence Detection Systems, Applied Biosystems) yazılım programı ile hesaplandı.

3.6.2.2. Quantifiler Human DNA Kitinin PCR Döngü Koşulları

50 °C'de	2 dk	
95 °C'de	10 dk	} 40 döngü
95 °C'de	15 sn	
60 °C'de	1 dk	

3.8. Genotip Tayini

Çalışmada genotip tayini için 5 farklı ticari STR kiti kullanıldı. Bu kitler, cinsiyet lokusu ile birlikte; AmpF ℓ STR® Identifiler® PCR Amplification kiti 16 lokus, AmpF ℓ STR® MiniFiler™ PCR Amplification kiti 9 lokus, AmpF ℓ STR® SGM Plus® PCR Amplification Kiti 10 lokus, Investigator™ Hexaplex ESS kiti 7 lokus ve AmpF ℓ STR® NGM™ SElect PCR Amplification kiti ise 17 DNA lokusunun tek reaksiyonda çoğaltılmasına ve genotip tayini yapılmasına olanak sağlamaktadır.

PCR işlemi GeneAmp 9700 termal döngü cihazında kit protokollerine uygun bir şekilde gerçekleştirildi.

3.7.1. Deneyde Kullanılan PCR Kitleri ve PCR Koşulları

3.7.1.1. AmpF ℓ STR® Identifiler® PCR Amplification Kiti

PCR reaksiyonu için hazırlanan karışım aşağıdaki gibidir:

- 10.5 μ l reaksiyon karışımı X örnek sayısı
- 5.5 μ l primer karışımı X örnek sayısı
- 0.5 μ l Taq polimeraz enzim X örnek sayısı

Hazırlanan karışımdan her bir örnek tüpüne 15 μ l karışım ve 10 μ l DNA izolatu (0,005-0,059 ng/ μ l) eklenerek son hacim 25 μ l olacak şekilde hazırlanan PCR karışımı Geneamp 9700 PCR cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki koşullarda çoğaltma işlemi gerçekleştirildi.

95 °C'de	11 dk	
94 °C'de	1 dk	} 30 döngü
59 °C'de	1 dk	
72 °C'de	1 dk	
60 °C'de	60 dk	

3.7.1.2. AmpF ℓ STR® MiniFiler™ PCR Amplification Kiti

PCR reaksiyonu için hazırlanan karışım aşağıdaki gibidir:

- 10 μ l reaksiyon karışımı X örnek sayısı
- 5 μ l primer karışımı X örnek sayısı

Hazırlanan karışımdan her bir örnek tüpüne 15 μ l karışım ve 10 μ l DNA izolatu (0,005-0,059 ng/ μ l) eklenerek son hacim 25 μ l olacak şekilde hazırlanan PCR karışımı Geneamp 9700 PCR cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki koşullarda çoğaltma işlemi gerçekleştirildi.

95 °C'de	11 dk	
94 °C'de	20 sn	}
59 °C'de	2 dk	
72 °C'de	1 dk	
60 °C'de	45 dk	

30 döngü

3.7.1.3. AmpF[®]STR[®] SGM Plus[®] PCR Amplification Kiti

PCR reaksiyonu için hazırlanan karışım aşağıdaki gibidir:

- 10.5 µl reaksiyon karışımı X örnek sayısı
- 5.5 µl primer karışımı X örnek sayısı
- 0.5 µl taq polimeraz enzim X örnek sayısı

Hazırlanan karışımdan her bir örnek tüpüne 15 µl karışım ve 10 µl DNA izolatu (0,005-0,059 ng/µl) eklenerek son hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanan PCR karışımı Geneamp 9700 PCR cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki koşullarda çoğaltma işlemi gerçekleştirildi.

95 °C'de	11 dk	
94 °C'de	1 dk	}
59 °C'de	1 dk	
72 °C'de	45 dk	
60 °C'de	45 dk	

32 döngü

3.7.1.4. Investigator[™] Hexaplex ESS Kiti

PCR reaksiyonu için hazırlanan karışım aşağıdaki gibidir:

- 5 µl reaksiyon karışımı X örnek sayısı
- 2.5 µl primer karışımı X örnek sayısı
- 0.4 µl taq polimeraz enzim X örnek sayısı

Hazırlanan karışımdan her bir örnek tüpüne 7.5 µl karışım ve 5 µl DNA izolatu (0,005-0,059 ng/µl) eklenerek son hacim 12,5 µl olacak şekilde hazırlanan PCR karışımı Geneamp 9700 PCR cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki koşullarda çoğaltma işlemi gerçekleştirildi.

94 °C'de	4 dk	
96 °C'de	30 sn	}
61 °C'de	120 sn	
72 °C'de	75 sn	
94 °C'de	30 sn	}
61 °C'de	120 sn	
72 °C'de	75 sn	
68 °C'de	60 dk	

5 döngü

25 döngü

3.7.1.5. AmpF ℓ STR® NGM SElect™ PCR Amplification Kiti

PCR reaksiyonu için hazırlanan karışım aşağıdaki gibidir:

- 10.5 μ l reaksiyon karışımı X örnek sayısı
- 5.5 μ l primer karışımı X örnek sayısı

Hazırlanan karışımdan her bir örnek tüpüne 15 μ l karışım ve 10 μ l DNA izolatu (0,005-0,059 ng/ μ l) eklenerek son hacim 25 μ l olacak şekilde hazırlanan PCR karışımı Geneamp 9700 PCR cihazına yerleştirildi aşağıdaki koşullarda çoğaltma işlemi gerçekleştirildi.

95 °C'de	11 dk	
94 °C'de	20 sn	} 32 döngü
59 °C'de	3 dk	
60 °C'de	10 dk	

3.8. Kapiler Elektroforezde STR Analizleri

PCR aşamasından elde edilen ürünler ABI 3130 genetik analizör cihazında uygun koşullarda (Tablo 9) ve POP-4 polimer kullanılarak yürütüldü.

3.8.1. PCR Ürünlerinin Elektroforez Aşaması İçin Hazırlanması

- Her bir yürütmede PCR ürünlerinin yanında alelik ladder, pozitif kontrol ve negatif kontrol örnekleri de hazırlandı.
- Yürütme işleminde kullanılan formamid ve her bir kite özgü size standart (Tablo 10) miktarları aşağıda verildiği şekilde hazırlanarak yürütme için gerekli karışım elde edildi.

Karışım: (8.7 μ l formamid X örnek sayısı) + (0.3 μ l size standart X örnek sayısı)

- Formamid ve size standart karışımından 9 μ l, PCR ürününden 1 μ l olacak şekilde toplamda 10 μ l'lik karışım ABI 3130 yürütme tepsisindeki kuyucuklara yüklendi.
- ABI 3130 genetik analizör cihazında her bir kit için Tablo 9'da verilen yürütme koşulları seçilerek elektroforez aşaması gerçekleştirildi.

Tablo 9. Çalışmada kullanılan kitlere ait elektroforez koşulları ve matriks dosyaları

Ticari Kit İsimleri	Matriks Standart Setleri	ABI 3130 Yürütme Modülü	ABI 3130 Elektroforez Yürütme Koşulları
AmpF _l STR® Identifiler® PCR Kiti	DS-33 (6FAM, VIC, NED, PET, LIZ)	GS STR POP-4 (1ml) G5	Enjeksiyon zamanı: 5 sn Enjeksiyon voltajı: 15 kV Yürütme voltajı: 15 kV Yürütme sıcaklığı: 60 °C Yürütme zamanı: 24 min
AmpF _l STR® MiniFiler™ PCR Kiti	DS-33 (6FAM, VIC, NED, PET, LIZ)	GS STR POP-4 (1ml) G5	Enjeksiyon zamanı: 5 sn Enjeksiyon voltajı: 15 kV Yürütme voltajı: 15 kV Yürütme sıcaklığı: 60 °C Yürütme zamanı: 24 min
AmpF _l STR® SGM Plus® PCR Kiti	DS-30 (5-FAM, JOE, NED, ROX)	GS STR POP-4 (1ml) F	Enjeksiyon zamanı: 5 sn Enjeksiyon voltajı: 15 kV Yürütme voltajı: 15 kV Yürütme sıcaklığı: 60 °C Yürütme zamanı: 24 min
Haxaplex ESS	BT5 (6-FAM, BTG, BTY, BTR, BTO)	GS STR POP-4 (1ml) G5	Enjeksiyon zamanı: 5 sn Enjeksiyon voltajı: 15 kV Yürütme voltajı: 15 kV Yürütme sıcaklığı: 60 °C Yürütme zamanı: 24 min
AmpF _l STR® NGM® SElect PCR Kiti	DS-33 (6FAM, VIC, NED, PET, LIZ)	GS STR POP-4 (1ml) G5	Enjeksiyon zamanı: 5 sn Enjeksiyon voltajı: 15 kV Yürütme voltajı: 15 kV Yürütme sıcaklığı: 60 °C Yürütme zamanı: 24 min

Tablo 10. Çalışmada kullanılan kitlere ait size standartlar

Kit İsimleri	Size standartlar
AmpF ℓ STR® Identifiler® PCR Kiti	Gene Scan 500 Liz
AmpF ℓ STR® MiniFiler™ PCR Kiti	Gene Scan 500 Liz
AmpF ℓ STR® SGM Plus® PCR Kiti	Gene Scan 500 Rox
Investigator™ HexaPlex ESS	550 BTO
AmpF ℓ STR® NGM SElect™ PCR Kiti	Gene Scan 600 Liz

3.9. Elektroforez Sonrası Verilerin Analiz Edilmesi

PCR ürünleri ABI 3130 genetik analizör cihazında uygun koşullarda yürütüldükten sonra elde edilen ham veriler GeneMapper IDx analiz programında analiz edilerek genotip tayini yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmanın deneysel aşaması 3 farklı laboratuarda yürütüldü. Kemik materyalden DNA izolasyonu ve florometrik yöntemle DNA miktar tayini aşaması Kopenhag Üniversitesi Antik DNA Laboratuvarında, gerçek zamanlı PCR ile DNA miktarı tayini ve AmpF ℓ STR® NGM™ SElect PCR Kiti ile DNA tiplendirme aşaması Kopenhag Üniversitesi Adli Genetik Laboratuvarında, çalışmada kullanılan diğer STR kitleri (AmpF ℓ STR® Identifiler®, AmpF ℓ STR® MiniFiler™, AmpF ℓ STR® SGM Plus® ve Investigator™ Hexaplex ESS PCR kiti) ile DNA tiplendirme aşaması ise İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Laboratuvar'nda gerçekleştirildi.

Çalışmada materyal olarak kullanılan Van-Yoncatepe kazısı arkeolojik insan kemiklerine, silika temelli yöntem uygulanarak farklı zamanlarda iki kez DNA izolasyon işlemi uygulandı. DNA izolasyon işleminden sonra Qubit florometre cihazı ile florometrik olarak DNA miktar tayini yapıldı ve elde edilen DNA miktarları Tablo 11'de gösterildiği şekilde kaydedildi. Daha sonra aynı örneklerde insan genomik DNA'sına özgü primerler kullanılarak Gerçek zamanlı PCR ile kantitatif PCR yapıldı ve genomik DNA miktarı belirlendi (Tablo 12). İnsan genomik DNA'sı belirlenen örneklerde 5 farklı ticari STR kiti ile PCR gerçekleştirildi. Sonuçlar Genemapper IDx yazılım programında analiz edilerek örnekler genotiplendirildi.

Çalışmada kullanılan 5 adet STR kiti ile yapılan tüm çalışmalarda negatif kontrol kullanılarak kontaminasyon varlığı, pozitif kontrol kullanılarak da kitin çalışıp çalışmadığı kontrol edildi. Kullanılan negatif kontrollerde herhangi çoğalma gözlenmedi. Pozitif kontroller ise kitlerde verilen profillerle karşılaştırılarak doğrulandı.

4.1. DNA İzolasyonundan Elde Edilen İzolatlara Ait DNA Miktarları

İzolasyon işleminden sonra örneklerin hem florometrik yöntemle hem de gerçek zamanlı PCR (qPCR) yöntemi ile DNA miktar tayini yapıldı. Her iki yöntem ile tayin edilen DNA miktarları örnek isim sırasına uygun bir şekilde Tablo 11'de verildi.

Tablo 11. 1. ve 2. İzolasyonda elde edilen izolatların Qubit florometri ve qPCR ile belirlenen DNA miktarları

No	Laboratuvar Kodu	1. İzolasyonda Belirlenen DNA Miktarı (ng/μl)		2. İzolasyonda Belirlenen DNA Miktarı (ng/μl)	
		Qubit	qPCR	Qubit	qPCR
1	FY1-FY38	1,88		0,138	
2	FY2-FY39	0,76		0,346	
3	FY3-FY40	0,308		<0,0005	
4	FY4-FY41	0,954		<0,0005	
5	FY5-FY42	0,666		0,11	
6	FY6-FY43	0,23		<0,0005	
7	FY7-FY44	0,606		0,124	
8	FY8-FY46	1,33		0,158	
9	FY9-FY47	1,03		0,152	
10	FY10-FY48	0,348		<0,0005	
11	FY11-FY49	0,187		0,169	
12	FY12-FY50	1,79	0,025	2,22	0,005
13	FY13-FY51	2,08		0,398	
14	FY14-FY52	2,12		1,8	
15	FY15-FY54	7,24		1,01	
16	FY16-FY55	1,87		2,0	
17	FY17-FY56	8,12		1,84	
18	FY18-FY57	1,37		0,298	
19	FY19-FY58	1,35		0,228	
20	FY20-FY59	4,5		0,658	
21	FY21-FY61	0,102		<0,0005	
22	FY22-FY62	0,672		0,532	
23	FY23-FY63	0,39		0,148	
24	FY24-FY64	1,26		1,76	0,008
25	FY25-FY65	7,78	0,022	2,84	
26	FY26-FY66	1,83	0,059	0,408	0,003
27	FY27-FY67	0,86		<0,0005	
28	FY28-FY69	2,58		0,932	
29	FY29-FY70	0,376		<0,0005	
30	FY30-FY71	0,528		<0,0005	
31	FY31-FY72	1,1		<0,0005	
32	FY32-FY73	0,432		0,114	
33	FY33-FY74	1,24		0,532	
34	FY34-FY75	2,14		2,74	
35	FY35-FY76	1,84		0,328	

Genomik DNA elde edilen 6 adet örnek, birinci ve ikinci izolasyondan elde edilmiş toplamda 4 farklı bireye ait DNA'dır. FY12-FY50 ve FY26-FY66 kodlu örneklerde hem birinci izolasyonda hem de ikinci izolasyonda genomik DNA elde edilmesine karşın FY-25, FY-64 kodlu örneklerde tek bir izolasyonda genomik DNA elde edilmiştir.

Tablo 12. Sulandırılmış ve sulandırılmamış izolatlar kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PCR sonuçlarına göre DNA miktarları

Örnek Kodu	Tüp kodu	Sulandırılmış izolatlar qPCR değeri (ng/μl)	Sulandırılmamış izolatlar qPCR (ng/μl)
M6FD-3	FY-50	0,005	0,004
M4DNA5	FY-64	0,008	0,008
M3DNA3	FY-66	0,007	0,003
M6FD-3	FY-12	0,025	0,002
M3DNA3	FY-25	0,022	0,003
M3DNA3	FY-26	0,059	0,059

4.2. Ticari STR Kitleri ile Elde Edilen STR Profilleri

Çalışmada genomik DNA elde edilen 6 adet örnek üzerinde 5 adet ticari STR kiti (AmpF_{STR}® NGM™ SElect, AmpF_{STR}® Identifiler®, AmpF_{STR}® MiniFiler™, AmpF_{STR}® SGM Plus® PCR Kiti ve Investigator™ Hexaplex ESS kiti) kullanılarak genetik tiplendirme yapıldı. Her analizde örneklerin yanı sıra negatif kontrol ve her bir kite ait pozitif kontrol örnekleri de çalışıldı.

Örnekler ABI 3130 genetik analizör cihazında yürütüldükten sonra örneklere ait ham veriler Genemapper IDX yazılım programında analiz edildi ve genotipler elde edildi.

AmpF_{STR}® Identifiler® PCR Kiti ile yapılan PCR analizinde FY-26, FY-50 ve FY-66 örneklerinde çoğalma gözlemlendi. FY-26 örneğinde D18S51 lokusu hariç diğer tüm lokuslarda alel gözlemlendi. FY-50 örneğinde 12 lokusta alel gözlenirken FY-66 örneğinde sadece 4 lokusta alel gözlemlendi. FY-12 ve FY-25 örneklerinde hiçbir lokusta alel gözlenmedi (Tablo 13, 14, 15; Ek 1, 2, 3).

AmpF_{STR}® MiniFiler™ PCR Kiti ile yapılan PCR analizinde FY-12, FY-25, FY-26, FY-64 ve FY-66 örneklerinde alel elde edilirken sadece FY-50 örneğinde alel gözlenmedi. FY-12 örneğinde 9 lokustan 5 tanesinde, FY-64 örneğinde ise 8 lokusta alel gözlemlendi. FY-25, FY-26 ve FY-66 örneklerinde tüm lokuslarda alel gözlemlendi (Tablo 13, 14, 15; Ek 4, 5, 6, 7).

AmpFI STR® SGM Plus® PCR Kiti ile yapılan PCR analizinde kitte mevcut 11 lokustan; FY-26 örneğinde 9 lokusta, FY-50 ve FY-25 örneklerinde 4 lokusta, FY-12, FY-64 ve FY-66 örneklerinde 5 lokusta alel elde tespit edildi (Tablo 13, 14, 15; Ek 8, 9).

AmpFI STR® NGM™ SElect PCR Kiti ile yapılan PCR analizinde genomik DNA belirlenen örneklerin hepsinde (FY-12, FY-25, FY-26, FY-50, FY-64 ve FY-66) çoğalma görüldü. FY-26 örneğinde tam profil elde edilirken FY-66 örneğinde kitte mevcut 17 lokustan 16'sında alel tespit edilmiştir. FY-50 örneğinde 15 lokusta, FY-64 örneğinde 14 lokusta, FY-25 örneğinde 12 lokusta ve FY-12 örneğinde ise 11 lokusta alel gözlemlendi (Tablo 13, 14, 15; Ek 10, 11, 12, 13, 14, 15).

Investigator™ Hexaplex ESS PCR Kiti ile yapılan PCR analizinde FY-26 örneğinde kitte yer alan 7 adet lokusta, FY-25 örneğinde ise 2 lokusta alel elde edilmesine rağmen diğer örneklerde çoğalma olmadı.

Kitlerin başarı yüzdesi her bir kit için her örnekte (güvenilir lokus sayısı x 100)/(kitte mevcut lokus sayısı) formülü ile hesaplanmıştır (Tablo 16). Her bir kit için tüm örneklerdeki başarı yüzdelerinin ortalaması ise şöyledir: NGM SElect; %47,1, Identifiler; %21,87, MiniFiler; %35,15, Hexaplex; %16,65, SGM Plus; %13,63.

Tablo 13. FY12 ve FY50 örnekleri ile yapılan STR analizleri sonucunda gözlenen aleller.

STR LOKUSLARI																						
<i>Örnek FY12</i>	Amelogen	TPOX	D5S818	D13S317	CSF1PO	D7S820	D2S1338	D18S51	D21S11	FGA	D16S539	VWA	D3S1358	D19S433	D8S1179	TH01	D2S441	D1S1656	D12S391	D10S1248	D22S1045	SE33
STR Kit																						
Identifiler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
MiniFiler	XY			8	10	-	18 20 23	-	-	-	11											
SGM Plus	XY						-	-	-	-	-	17	17	13	12 14	-						
NGM SElect	X						20	-	31.2	-	-	18	14	14	11	10	14	-	-	13	15 16	-
Hexaplex ESS	-															-	-	-	-	-	-	
<i>Örnek FY50</i>																						
Identifiler	XY	8	8 12	-	11	-	-	-	31.2	25	12	18 19 22	13/14/ 15/16/ 17/19	13 14 17. 2	11	7 8 9.3 10						
MiniFiler	-			-	-	-	-	-	-	-	-											
SGM Plus	Y						-	-	-	-	-	-	14	14/ 15	11	-						
NGM SElect	XY						-	10 12	-	22 24	11 12	16 18	14 17	15	14	8	14	12	16 22 23	13 14	14 15	28. 2
Hexaplex ESS	-															-	-	-	-	-	-	

Tablo 14. FY26 ve FY66 örnekleri ile yapılan STR analizleri sonucunda gözlenen aleller.

STR LOKUSLARI																						
Örnek FY26	Amelogen	TPOX	D5S818	D13S317	CSF1PO	D7S820	D2S1338	D18S51	D21S11	FGA	D16S539	VWA	D3S1358	D19S433	D8S1179	TH01	D2S441	D1S1656	D12S391	D10S1248	D22S1045	SE33
STR Kit																						
Identifiler	XY	8	10 11	12	11 12	8	17 18	-	31.2 32.2	22 23	8 13	17 18	15 17	13 15.2	13 15	8						
MiniFiler	XY			12	11 12	8	17 18	14 18	31.2 32.2	22 23	8 13											
SGM Plus	XY						-	-	31.2 32.2	22 23	8 13	17 18	15 17	13 15.2	13 15	8						
NGM SElect	XY						17 18	14 18	31.2 32.2	22 23	8 13	17 18	15 17	13 15.2	13 15	8	11 14	13 15	18 22	14 15	12 15	16.3 28.2
Hexaplex ESS	XY															8	11 14	13 15	18 22	14 15	12 15	
Örnek FY66																						
Identifiler	X	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8/13/15	8						
MiniFiler	Y			12	11 12	8	17 18	14 18	32.2	22 23	8 13											
SGM Plus	XY						-	-	-	-	-	17 18	15	13 15.2	13	-						
NGM SElect	XY						18	-	31.2 32.2	22	8 13	17	15 17	13 15.2	13/15	6 8	11 14	15	18 22	14 15	12 15	16.3
Hexaplex ESS	-															-	-	-	-	-	-	

Tablo 15. FY25 ve FY64 örnekleri ile yapılan STR analizleri sonucunda gözlenen aleller.

STR LOKUSLARI																						
Örnek FY25	Amelogen	TPOX	D5S818	D13S317	CSF1PO	D7S820	D2S1338	D18S51	D21S11	FGA	D16S539	VWA	D3S1358	D19S433	D8S1179	TH01	D2S441	D1S1656	D12S391	D10S1248	D22S1045	SE33
STR Kit																						
Identifiler	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
MiniFiler	XY			11 12	10 11	11 12	17 20 25	13 14	30 32.2	18/20/ 22	11 13											
SGM Plus	XY						-	-	-	-	-	14 16	16 18	14	-							
NGM SElect	XY						-	-	30	-	-	14 16	16 17	13.2 14	10 12	-	11	18. 3	18. 3	14 16	11 15	-
HexaplexESS	-															9 9.3	11	-	-	-	-	
Örnek FY64																						
Identifiler	XY	-	12 13	-	-	-	-	-	25 28 30	-	-	17	16	13 14 15	12 15 16	7						
MiniFiler	Y			9 14	-	7 12	20	12 19	30	22	8/9											
SGM Plus	XY						-	-	31	-	-	17	16	-	12/ 16	-						
NGM SElect	XY						20	-	30	-	9 11	17	16	13 15	12 16	7	11. 3/ 14	11 15	17	15	15 16	-
HexaplexESS	-															-	-	-	-	-	-	

Tablo 16. Çalışmada elde edilen DNA örnekleri için kit sistemlerinin başarı oranları

Örnek Adı	Kit Adı /Kapsadığı lokus sayısı	Genotip tayini yapılan lokuslar	Güvenilir bulunan lokuslar	Baz çifti sayısı	Başarı Yüzdesi
FY-50	NGM SElect/17	D18S51, FGA, D16S539, VWA, D3S1358, D19S433, D8S1179, TH01, D2S441, D1S1656, D12S391, D10S1248, D22S1045, SE33, Amelogen	Amelogen D18S51, D8S1179, FGA, TH01, D19S433, D3S1358	99-282	41,1
	Identifiler/16	TPOX, D5S818, FGA, D16S539, vWA, D3S1358, D19S433, D8S1179, TH01, Amelogen	Amelogen	105-110	6,25
	SGM Plus/11	D3S1358, D19S433, D8S1179, Amelogen	D19S433	120-125	9,1
	Minifiler/9	Lokus elde edilemedi.	-	-	-
	Hexapleks/7	Lokus elde edilemedi.	-	-	-
FY-25	NGM SElect/17	D21S11, VWA, D3S1358, D19S433, D8S1179, D2S441, D1S1656, D12S391, D10S1248, D22S1045, Amelogen	Amelogen D8S1179, D2S441	86-139	17,6
	Identifiler/16	Lokus elde edilemedi.	-	-	-
	SGM Plus/11	Amelogen	SGM Plus ile elde edilen lokuslar pik dengesizlikleri olması ve 54 rfü'dan küçük oldukları için güven aralığı dışındadır.		
	Minifiler/9	D13S317, CSF1PO, D7S820, D2S1338, D18S51, D21S11, FGA, D16S539, Amelogen	D21S11, D7S820	170-220	22,2
	Hexapleks/7	TH01, D2S441	TH01, D2S441	100-117	28,5
FY-64	NGM SElect/17	D2S1338, D21S11, D16S539, VWA, D3S1358, D19S433, D8S1179, TH01, D2S441, D1S1656, D12S391, D10S1248, D22S1045, Amelogen	D22S1045, TH01, D2S441, D3S1358, D12S391, D10S1248, VWA, D16S539, D2S1338, D21S11	90-309	58,8
	Identifiler/16	D5S818, D21S11,	D3S1358,	105-180	31,25

		VWA, D3S1358, D19S433, D8S1179, TH01, Amelogen	TH01, vWA Amelogen, D5S5818		
	SGM Plus/11	D3S1358, D8S1179, Amelogen	Amelogen	105-110	9,1
	Minifiler/9	D13S317, D7S820, D2S1338, D18S51 D21S11, FGA, D16S539, Amelogen	D7S820, D18S51	144-174	22,2
	Hexapleks/7	Lokus elde edilemedi.	-	-	-
FY-66	NGM SElect/17	D2S1338, D21S11, D16S539, FGA, vWA, D3S1358, D19S433, D8S1179, TH01, D2S441, D1S1656, D12S391, D10S1248, D22S1045, SE33, Amelogen	D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D22S1045, D19S433, D1S1656, D12S391	90-300	58,8
	Identifiler/16	D8S1179, TH01, Amelogen	TH01	180-182	6,25
	SGM Plus/11	Amelogen	SGM Plus ile elde edilen lokuslar pik dengesizlikleri olması ve 54 rfu'dan küçük oldukları için güven aralığı dışındadır.		
	Minifiler/9	D13S317, CSF1PO D7S820, D2S1338, D18S51, D21S11, FGA, D16S539, Amelogen	D13S317, D7S820, D21S11, D18S51, FGA	85-175	55,5
	Hexapleks/7	Lokus elde edilemedi.	-	-	-
FY-12	NGM SElect/17	D2S1338, D21S11, VWA, D3S1358, D19S433, D8S1179, TH01, D2S441, D10S1248, D22S1045, Amelogen	TH01, D10S1248, D22S1045	95-203	17,6
	Identifiler/16	Lokus elde edilemedi.	-	-	-
	SGM Plus/11	Amelogen	SGM Plus ile elde edilen lokuslar pik dengesizlikleri olması ve 54 rfu'dan küçük oldukları için güven aralığı dışındadır.		
	Minifiler/9	D13S317, CSF1PO, D2S1338, D16S539, Amelogen	CSF1PO, D16S539, Amelogen	100-110	33,3
	Hexapleks/7	Lokus elde edilemedi.	-	-	-
FY-26	NGM SElect/17	D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, FGA, vWA,	D10S1248, vWA, D8S1179,	86-409	88,2

		D3S1358, D19S433, D8S1179, TH01, D2S441, D1S1656, D12S391, D10S1248, D22S1045, SE33, Amelogen	D21S11, D18S51, D22S1045, TH01, FGA, D19S433, D2S441, D1S1656, D3S1358, D12S391, SE33, Amelogen		
	Identifiler/16	TPOX, D5S818, D13S317, CSF1PO, D7S820, D2S1338, D21S11, FGA, D16S539, VWA, D3S1358, D19S433, D8S1179, TH01, Amelogen	TPOX, D5S818, D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, FGA, D16S539, VWA, D3S1358, D19S433, D8S1179, TH01, Amelogen	105-320	87,5
	SGM Plus/11	D21S11, FGA, D16S539, vWA, D3S1358, D19S433, D8S1179, TH01, Amelogen	D21S11, vWA, D3S1358, D19S433, D8S1179, TH01, Amelogen	105-220	63,6
	Minifiler/9	D13S317, CSF1PO D7S820, D2S1338, D18S51 D21S11, FGA, D16S539, Amelogen	D13S317, CSF1PO D7S820, D18S51 D21S11, FGA, Amelogen	100-220	77,7
	Hexapleks/7	TH01, D2S441, D1S1656, D12S391, D10S1248, D22S1045, Amelogen	D22S1045, Amelogen, TH01, D12S391, D2S441	75-185	71,4

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Arkeolojik örneklerde DNA hasarı sıcaklık, yükselti, toprak yapısı, biyokimyasal reaksiyonlara bağlı olarak değişmektedir. Tip 1 kolajene DNA'nın bağlanması veya hidroksiapatite DNA'nın tutunması DNA'yı stabil yapabilmektedir. Bununla birlikte, ortamın sıcaklığı, su ve oksijene yakınlığı, pH'sı, tuz içeriği, radyasyona maruz kalma gibi çeşitli çevre koşulları DNA'nın bozunmasını artırmaktadır (Campos ve ark. 2012). DNA'nın kuru ve soğuk ortamlarda daha iyi korunduğu, DNA hasarının az olduğu bildirilmiştir (Höss ve ark. 1996; Wayne ve ark. 1999, Ricaut ve ark. 2005). Örneğin kutuplara yakın yerlerden (tiyal tabakası) alınan örneklerden elde edilen DNA'nın kalitesi sıcak (tropik) bölgelerden daha iyidir. Ancak bu her zaman geçerli olmayabilir. Bazen, aynı bölgelerden elde edilen örnekler arasında DNA elde etmedeki başarı oranı şaşırtıcı bir şekilde farklı olabilmektedir. Bu durumun, aynı bölgelerden alınan örneğin fosilleşme süreci ve kazı sonrası süreci ile açıklanabileceği bildirilmiştir (Campos ve ark. 2012). Bu yönde yapılan çalışmalar sonucunda, yeni kazılarak çıkarılmış kemiklerden, müzede bekletilenlere göre altı kat daha fazla DNA elde edildiği ve iki kat daha fazla DNA dizini elde edildiği belirlenmiştir (Pruvost ve ark. 2007). Özellikle, sıcaklığın antik DNA molekülünün uzun ömürlü olmasında kilit rol oynadığı düşünülmektedir (Lindahl 1993).

DNA'nın bozunma sürecini etkileyen tüm bu faktörler açısından Yoncatepe kazısından alınan örnekler değerlendirildiğinde; kazı bölgesinin denizden yüksekliği, iklimin soğuk ve kurak olması açısından DNA'nın daha iyi korunmuş olacağı düşünülebilir. Ancak, elde edilen örneklerin 2002 yılında kazıdan çıkarılması ve bugüne kadar oda sıcaklığında saklanmış olması analizleri olumsuz etkileyebileceği söylenebilir. Zira çalışılan 35 örnekten yalnız 6 tanesinde DNA elde edilmesi ve bu kemiklerden elde edilen izotlarda qPCR ile belirlenen insan DNA miktarının 0.003-0.059 ng / μ l gibi düşük düzeyde olması hem kemiklerin yaşı (yaklaşık 3000 yıl) ile hem de topraktan çıkarıldıktan sonraki süreçle açıklanabilir.

Bu çalışmada kullanılan Yoncatepe Nekropol'ünün 6 oda mezarından elde edilen farklı tipteki (femur, tibia, humerus, kaburga, patella) kemikler antik DNA içermeleri nedeniyle kontaminasyona son derece açıktır. Ayrıca düşük miktarda DNA ile çalışmada getirdiği riskler bulunmaktadır (Gill ve ark. 2000). Bu tür çalışmalarda özellikle kontaminasyonu önleyici tedbirlerin alınması ve her basamakta kontrol edilmesi sonuçların güvenilirliği açısından son derece önemlidir. Bu nedenle tüm çalışma süreçlerinde ortamdan ve araştırmacıardan kaynaklı bir kontaminasyon olmaması için gereç ve yöntemler bölümünde detaylı bir şekilde belirtildiği gibi ortam sterilizasyonuna, özel

giysiler, eldiven, maske, galoş giyilerek araştırmacı kaynaklı kontaminasyonun önüne geçilmiştir. Yine kontaminasyona yönelik diğer bir önlemden laboratuvar kaynaklı kontaminasyon riskini mümkün olduğunca minimum düzeye indirmek amacı ile çalışmada kullanılan kemiklerin ön hazırlık ve DNA izolasyon aşamasının antik DNA çalışmaları için özel olarak tasarlanmış ve sıkı laboratuvar kuralları olan antik DNA laboratuvarında (Center for Geogenetics, Kopenhag Üniversitesi, Danimarka) yapılmasıdır. Tüm bu önlemlere rağmen materyalin kendisinden kaynaklı kontaminasyonun olabileceği de bir gerçektir. Bunu minimize etmek için ise DNA izolasyon işleminden önce kemik örneklerinin dış yüzeyi %10'luk hipokloritli bez ile silindikten sonra dış yüzeyleri kazınarak uzaklaştırıldı. Daha sonra kemikler ince uçlu matkapla toz haline getirildi.

DNA izolasyonu farklı zamanlarda iki kez gerçekleştirildi. Her iki izolasyonda da aynı kemik tozları kullanıldı ve negatif kontrol uygulaması yapıldı. Negatif kontrolde izolasyon için örneklere yapılan tüm işlemler uygulandı yalnız tüplere kemik tozu eklenmedi. Negatif kontrollerden elde edilen sonuçlar bu aşamada kontaminasyonun olmadığını gösterdi.

Antik DNA oldukça hasar görmüş olduğu için izolasyon aşamasında yüksek sıcaklık veya kuvvetli deterjanlar gibi aşırı sert yöntemlerden kaçınmak gerekmektedir. Bu uygulamalar DNA'nın serbest kalmasını sağlayabilir ama antik DNA molekülüne daha fazla zarar verebilir (Rohland ve Hofreiter, 2007). DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA'nın miktarının yanısıra çoğaltılabilir olması çok önemli bir husustur. Bu nedenle DNA izolasyon işlemi, PCR inhibitörlerinin minimize edilmesi için silika temelli yöntemle gerçekleştirildi. Ayrıca inhibitörlerin uzaklaştırılmasında etkili bir yöntem olan DNA'nın tuz çözeltisi ile yıkanması önerilmektedir (Bourke ve ark. 1999). Bu çalışmada da izolasyon aşamasında kolonlar tuz çözeltisi ile yıkandı.

İzolatların başarılı bir şekilde PCR'da çoğaltılabilmesi kalıp DNA miktarının doğru belirlenmesini gerektirir. Bundan dolayı çalışmada DNA miktarı tayini ilk olarak florometrik yöntemle gerçekleştirildi. Ancak kemik gibi örneklerden elde edilen izolatlarda gerek bakteri DNA'sı gerekse mitokondrial DNA varlığından dolayı elde edilen miktarlar tam olarak genomik DNA miktarını yansıtmadığı düşünülmektedir. Bu nedenle çalışmanın bir sonraki aşamasına geçmeden önce gerçek genomik DNA miktarını belirlemek için qPCR yapıldı.

Kontaminantların varlığı PCR'ı inhibe edeceği için izolatların sulandırılarak PCR'ın gerçekleştirilmesi öngörülmektedir (Ricci ve ark. 2006). Bu nedenle qPCR analizinde her örnek için iki farklı konsantrasyon hazırlandı. Çalışılan 35 örneğin iki izolasyonundan

toplam 6 örnekte genotipleme için uygun DNA miktarı belirlendi. qPCR aşamasında bu örneklerden FY-25’de direkt ve sulandırılarak (1/4 oranında) yapılan PCR analizinde, sulandırılmış örnekte DNA miktarı 0,022 ng/μl belirlenirken, direkt olarak konulan örnekte 0,003 ng/μl DNA belirlenmiştir. Yine aynı şekilde, FY-12 örneğinde direkt olarak yapılan qPCR’da 0,002 ng/μl DNA miktarı belirlenirken sulandırılarak yapılan analizde 0,025 ng/μl DNA saptandı (Tablo 12). Diğer örneklerde ise direkt ve sulandırılarak yapılan qPCR sonucunda yaklaşık aynı DNA miktarları elde edildi. Bu da PCR analizlerinde inhibitörlerin DNA’nın çoğaltılabilmesinde önemli bir rol oynadığını ve sulandırmanın PCR’a pozitif etkisini ortaya koymaktadır.

Düşük miktar DNA ile çalışılırken (>100 pg) önemli risklerden biri tercihli amplifikasyon (alel düşmesi, allelic drop out) diğeri ise stokastik dalgalanmalardır (stochastic fluctuations). Bu sorunların üstesinden gelmek için LCN tekniği kullanılmaktadır. Bu teknikte başlangıç DNA miktarı artırılamadığı için standart çalışmalarda kullanılan PCR döngü sayısı ve kullanılan taq polimeraz enzim miktarında artış yapılarak daha fazla PCR ürünü elde etmek amaçlanır (Gill 2001; Gill ve ark. 2000). Bu çalışmada da PCR döngü sayısı 4 basamak ve NGM SElect dışındaki kitlerde taq polimeraz enzim miktarı yarım ünite (0,5 U) artırılarak PCR çalışması gerçekleştirildi. NGM SElect kitinde master miks içerisinde taq polimeraz modifiye edilmiş olduğu için sonradan polimeraz enzimi ilave edilmedi. Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik için yapılan çalışmanın farklı zamanlarda, aynı ve/veya farklı kişiler tarafından, aynı ve/veya farklı bir laboratuvarda tekrarlanması ve aynı genotipin belirlenebildiğinin gösterilmesi gerekir. Ancak elimizde yeterli miktarda DNA izolatu olmadığından, tayin edilen lokusların doğruluğu ticari kitlelere ait ortak lokuslar üzerinden değerlendirildi.

LCN tekniğinde kullanılan diğeri bir yöntemde elektroforezde enjeksiyon süresini artırarak kapiler içine daha fazla örnek alınmasını sağlamaktır. Bu uygulama, çoğaltılmış DNA miktarına bağlı olarak floresan ışımanın artması ve piklerin yüksekliklerinde (rfu) az da olsa artış sağlamaktadır. Bu çalışmada NGM SElect ile yapılan yürütmelerde enjeksiyon zamanı kit el kitabında önerilen 5 saniyeden 8 ve 16 saniyeye yükseltilerek gerçekleştirildi. İki farklı (8 ve 16 saniye) enjeksiyon zamanına göre pik yüksekliklerinde (rfu) % 80-114 oranında artış saptandı.

Tüm örneklerin genotipleri Genemapper IDx programı kullanılarak belirlendi. FY-50 örneğinin qubit ile belirlenen DNA miktarı 2,22 ng/μl olarak belirlenmişken qPCR ile insana ait DNA miktarı 0,005 ng/μl olarak saptandı. DNA miktarının çok düşük olmasına rağmen NGM SElect, Identifiler ve SGM Plus kitleriyle yapılan PCR analizlerinde birkaç

lokusta alel gözlemlendi. Aynı örneğin Minifiler kiti ve Hexaplex ESS kiti ile yapılan analizlerinden ise sonuç elde edilemedi. PCR başarısındaki düşük sonuç düşük DNA miktarı ve inhibitörlerin varlığı ile açıklanabilir. Zira 100 pg'ın altındaki DNA miktarları ile çalışırken bu beklenen bir sonuçtur (Gill ve ark. 2000)

Aynı bireye ait femur kemiğinden elde edilen ve sonuçları Tablo 13'de sunulan FY-12 ve FY-50 örnekleri karşılaştırıldığında; FY-12 örneğinden çok daha düşük DNA miktarına sahip olan FY-50 örneğinden (Tablo 11, 12) elde edilen PCR ürünü daha fazladır. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde bazı lokuslarda alelik kayıpların bulunduğu, bazı lokuslarda uyumsuzluk olduğu, bazı lokuslarda ise ikiden fazla alel saptandı. Alelik kayıpların nedeni düşük DNA miktarı ile açıklanabilir. Ancak uyumsuzluklar ve ikiden fazla alel bu örneğin kontamine olduğunu göstermektedir.

Aynı bireye ait kaburga kemiğinden elde edilen FY-26 ve FY-66 örneklerinde; qPCR miktarı yüksek örnek olan FY-26'da SGM Plus hariç bütün kitlerde tüm lokuslar elde edildi. DNA miktarının çok düşük olduğu (0,003 ng/μl) FY-66 örneğinde ise yalnız NGM Select ve MiniFiler kitleri ile yapılan PCR'nın oldukça başarılı olduğu, Identifiler ve SGM Plus ile ise çok az lokusta çoğalma gözlenirken, Hexaplex ile hiçbir lokusta çoğalma gerçekleşmedi. FY-66 örneğinin DNA miktarı düşük olmasına rağmen femurdan elde edilen örneklerle göre daha başarılı sonuçlar verdi. Bu durum kaburga kemiğinde DNA'nın daha fazla elde edildiği bilgisini desteklemektedir (Lee ve ark. 1991).

FY-25 örneğinde ise femur kemiğinden elde edilen DNA'da yalnız Minifiler kiti ile tam profil elde edilirken, Identifiler ile hiçbir lokusta alel belirlenemedi, diğer kitlerle ise bazı lokuslarda alel gözlemlendi.

FY-64 örneğinde ise patella kemiğinden elde edilen 0,008 ng/μl DNA ile Hexaplex ESS kitinde PCR'da çoğalma gözlenmemiştir. Identifiler ve SGM Plus kitlerinde birkaç lokusta alel belirlenirken NGM Select ve Minifiler kitlerinde daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

DNA miktarları çok yakın olan FY-12 (0,025 ng/μl) ve FY-25 (0,022 ng/μl) örnekleri karşılaştırıldığında; her ikisi de femur kemiğinden elde edilmesine karşın FY-25 örneği kısmen daha başarılı sonuç vermiştir. Her iki örnekte de qPCR analizinde sulandırılarak yapılan PCR'dan sonuç alınması bu örneklerde inhibitör varlığını göstermektedir. FY-25 örneğinde minifiler kiti ile tüm lokuslarda çoğalma gözlenmesine rağmen; FY-12 örneğinde sadece 4 lokusta çoğalma gözlenmiştir. Bu da DNA miktarı ile ilişkili bir çoğalma olmadığını göstermektedir.

Hexaplex ESS kiti ile tüm örneklere 3 farklı PCR uygulanmasına rağmen sadece en yüksek genomik DNA'ya sahip FY-26 örneğinde tüm profil elde edilirken FY-25 örneğinde 2 lokusta alel gözlemlendi.

Örneklerden elde edilen sonuçlar lokuslar açısından değerlendirildiğinde:

En yüksek genomik DNA'ya sahip örnek olan FY-26'da Minifiler kiti ile tüm lokuslar elde edildi ancak D16S539 lokusunda heterozigot pik dengesizliği gözlemlendi.

Aynı örnekte Identifiler kiti ile elde edilen lokuslarda alel kaybı, alel eklenmesi veya heterozigot pik dengesizlikleri gözlenmedi. Yalnızca D18S51 lokusunda alel elde edilemedi.

FY-26 örneği için SGM plus kiti kullanılarak elde edilen lokuslar değerlendirildiğinde; Identifiler kitinde olduğu gibi sadece D18S51 lokusunda alel elde edilemedi. Diğer lokuslarda alel kaybı, alel eklenmesi veya heterozigot pik dengesizlikleri gözlenmedi.

FY-26 örneği için NGM Select kiti değerlendirildiğinde; tüm lokuslarda alel elde edilmesine rağmen minifiler kitinde olduğu gibi D16S539 lokusunda pik dengesizliği gözlenmektedir. Ayrıca D8S1179 lokusu, D2S1338 lokusu ve en büyük lokus olan SE33 lokusunda da pik dengesizlikleri gözlenmektedir.

FY-26 örneği ile aynı kemik örneğine ait ve çok düşük DNA miktarına (0,006 ng/μl) sahip olan FY-66 örneğinde Identifiler kiti ile çoğaltılan D8S1179 lokusunda 3 alel gözlemlendi. FY-26 örneğindeki tüm kitlerde amelogen lokusunda X ve Y alelleri gözlenmesinden yola çıkarak bu kitle yapılan çalışmada amelogen lokusunda Y alel düşmesi olduğu söylenebilir. Ayrıca FY-66 örneğinde Minifiler kiti ile elde edilen amelogen lokusunda X aleli düşmüştür sadece Y aleli gözlenmektedir. SGM Plus ile yapılan çalışma sonucunda elde edilen piklerin rfu değerleri 110 rfu'dan düşüktür bu kit X ve Y alelini belirlemesine rağmen pik dengesizlikleri mevcuttur. Aynı örnek için NGM Select kitinde de X alelinin düştüğü gözlenmiştir.

FY-50 örneğinde Identifiler kiti kullanılarak yapılan analizde 4 lokusta (D13S317 D7S820, D2S1338, D18S51) hiç alel gözlenmezken D3S1368, D19S433, TH01 ve vWA lokuslarında birden fazla alel gözlemlendi. DNA miktarı oldukça düşük olan bu örnekte elde edilen lokuslarda birden fazla alel olması, kontaminasyon riskinin yanı sıra çok küçük parçalara ayrılmış DNA'nın varlığını da ortaya koyabilir.

FY-50 örneği amelogen lokusu açısından değerlendirildiğinde SGM Plus kiti ile elde edilen lokusta X alelinde düşme gözlenmektedir. Lokusta sadece Y lokusu görülmektedir.

FY-50 örneğinde NGM Select kiti ile D2S1338 ve D21S11 lokuslarında alel gözlenmezken cinsiyet lokusunda dengeli pikler görülmektedir. FY-50 ile aynı kemik

materyalinden kaynaklanan ve FY50'ye göre daha fazla DNA miktarına sahip olan FY-12 örneğinde amelogen lokusu, NGM select kiti ile yapılan genotiplemede sadece X aleli gözlenirken Minifiler ve SGM Plus kitinde XY olarak görülmektedir.

Alonso ve arkadaşlarının, Ampf/STR Profiler™, Ampf/STR Profiler Plus™, ve Ampf/STR COfiler™ ve PowerPlex™ 16 STR kitlerinin performansını değerlendirmek için, 8-50 yıllık kemik ve diş örnekleri ile yaptıkları çalışmada Quantiblot sistemi ile DNA miktar tayini yapılmış ve yalnız diş örneklerinde insan DNA'sı tespit edebilmişlerdir. Ancak kemik örneklerinde yaptıkları STR analizleri sonucunda PowerPlex™ 16 STR ve Ampf/STR Profiler™ Plus kitleri ile başarılı sonuçlar elde etmişler. Elde edilen DNA'nın kalitesinin dişlerde en fazla olduğunu uzun kemiklerde ise kaburga ve kafatasına göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise kaburga kemiğinden elde edilen DNA miktarı (0,059 ng/μl) diğer insan DNA'sı belirlenen örneklerle göre daha fazla tespit edildi ve tüm kitlerle yapılan analizlerde başarılı sonuçlar elde edildi. Femur kemiğinden elde edilen DNA miktarları (0,025-0,022 ng/μl) diğer örneklerle göre çok düşük olmamakla birlikte inhibitör varlığından dolayı STR çalışmasında kaburga kemiği kadar başarılı sonuçlar gözlenmedi (Alonso ve ark. 2001).

Harder ve ark. (2012), eski iskelet kalıntılarını kullanarak multiplex PCR'da hangi kitin daha iyi sonuçlar verdiğini belirlemek için 9 adet ticari kiti (PowerPlex 16, 16HS, ES, ESI17, ESX17, S5, AmpFI STR® Identifiler®, AmpFI STR® NGM™ ve SEfiler) karşılaştırmıştır. Çalışmada materyal olarak geç ortaçağ döneminden (12. ve 13. Yüzyıl) kalmış olan ve Berlin havaalanı inşaatındaki kazıdan elde edilmiş insan kalıntıları kullanmışlardır. Elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, cinsiyet lokusu ve heterozigot alellerin tespit edilme oranı açısından ESI, ESX ve NGM kitlerinin en iyi sonuçları verdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise kullanılan kitler arasında en başarılı sonuçlar Minifiler ve NGM SElect kiti ile elde edilmiştir. STR sistemlerinde başarılı olarak tiplendirilen genetik işaretleyicilerin oranı, S5 için %52 iken ESI, ESX ve NGM için %50-53 arasında hesaplanmıştır. Hesaplama ağırlıklı olarak elde edilen genetik işaretleyicilerin 50-200 bç arasındaki mini STR'ler içindir.

Bu çalışmada ise çalışmada kullanılan farklı DNA miktarına sahip örnekler üzerinden kit başarısı; pik yüksekliği 54 rfu'nun üzerinde belirlenen aleller, pik dengesizlikleri de göz önünde bulundurularak Tablo 16'da özetlenmiştir. Buna göre çalışmada kullanılan kitlerden FY-12 örneği için, Minifiler kiti %33.3 ve NGM SElect kiti %17,6 başarılı bulunmuştur. FY-50 örneği için; NGM SElect kiti %41,1, FY64 örneği için;

NGM SElect kiti %58.8, Identifiler kiti %31.25 ve Minifiler kiti %22.2 oranında başarılı bulunmuştur. FY-25 örneği için; hexaplex kiti %28.5, minifiler kiti %22.2 ve NGM SElect kiti % 17.6 oranında başarılı bulunmuştur. FY-66 örneği için, NGM SElect kiti ile %58.8 ve Minifiler kiti ile %55.5 oranında başarı saptanmıştır. En yüksek DNA miktarına sahip örnek olan FY-26 örneği için ise; Minifiler kiti %88.8, NGM SElect kiti %88.2, Identifiler kiti %87.5, Hexapleks kiti %71.4 ve SGM Plus kiti %63.6 oranında başarılı bulunmuştur.

Çalışmada başarı oranı açısından daha iyi olan AmpF_{STR}® NGM SElect™ kiti ile elde edilen lokusların baz çifti aralığı FY-26 için 86-409bç, FY-12 için 95-203bç, FY-66 için 90-300bç, FY-64 için 90-309bç, FY-25 için 86-139 bç ve FY-50 için 99-282bç olarak belirlenmiştir. En düşük DNA miktarına sahip örnekler olan FY-50, FY64, FY-66 örneklerine göre daha fazla DNA miktarına sahip FY-12 ve FY-25 örneklerinden daha geniş baz çifti aralığında çoğalma gözlenmiştir. Bu durum qPCR sonuçları göz önünde bulundurulduğunda FY12 ve FY25 örneklerinin sulandırılmış DNA miktarlarının daha yüksek olduğu yani inhibitör oranının bu örneklerde fazla olması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

DNA miktarı oldukça düşük olan antik DNA ile yapılan STR çalışmalarında heterozigot pik yüksekliklerinde dengesizliklerin olması beklenen bir durumdur. Tablo 16'da görüldüğü gibi tüm kitler ve örnekler açısından elde edilen lokus sayısı NGM SElect kitinin en başarılı kit olduğunu göstermektedir. Oldukça degrade olmuş antik DNA çalışmalarında yanlış homozigot sonuçlardan kaçınmak için en az iki kit kullanılarak çalışmanın doğrulanması gerekmektedir (Alel düşmesi). Özellikle farklı şirketlerden alınmış veya en azından farklı primer dizinlerine sahip kitlerin tercih edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Harder ve ark. 2012; Delamoye ve ark. 2004). Bu çalışmada kullanılan kitlerdeki ortak lokuslardan elde edilen aleller FY-50, FY-12, FY-25 ve FY-64 örneklerindeki birkaç lokus dışında diğer tüm lokuslarda uyumlu olarak görülmektedir. Ayrıca NGM SElect kitinde yer alan 5 adet non-codis mini STR (D22S1045, D10S1248, D12S391, D1S1656 ve D2S441) lokusları daha başarılı sonuçlar vermiştir. Fondevila ve ark. (2008), yanmış kemik örneklerinde yaptıkları çalışmada NC01 (D22S1045, D10S1248 ve D14S1434) lokuslarını içeren kit ile oldukça başarılı sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

Çalışma sonuçlarının genel değerlendirmesi yapıldığında:

1. Her örnek için çalışılan farklı kit ve aynı örneğe ait farklı izolasyon genotipleri karşılaştırıldığında ortak lokuslarda aynı genotipin belirlenmesi sonuçlara güveni

arttırırken bazı lokuslarda alel düşmesi, alel eklenmesi ve heterozigot pik dengesizliklerinin görülmesi antik DNA ile çalışılırken karşılaşılabilen bir durum olması nedeniyle sonuçların çok dikkatli yorumlanması gerektiğini göstermektedir.

2. Çalışmadaki kemik örneklerinin yaklaşık 3000 yıl öncesine ait olması, 2002 yılında kazıdan çıkarılması ve o tarihten itibaren oda koşullarında saklanması göz önünde bulundurulduğunda, kemiklerin bozunma sürecinin uzun olması ve modern DNA ile kontamine olma olasılığının çok yüksek olması sonuçları olumsuz etkileyen önemli etmenlerdir ve sonuçların değerlendirilmesinde göz önünde tutulması gereklidir. Kontaminasyondan kaçınmak için analizin her aşamasında sıkı önlemler alınması gerekmektedir.
3. Kemik gibi büyük oranda degradasyona uğramış ve özellikle bu çalışmada kullanılan kemikler gibi herhangi bir adli vakada karşılaşılandan daha fazla bozunmaya uğramış olan örneklerde dahi ayırım gücü oldukça yüksek STR sistemleri ile güvenilir sonuçlar elde edilebileceğini göstermektedir.
4. Bu çalışmada kullanılan kemiklerden genomik DNA elde edilebilmesi ve çoğaltılabilmesi aynı zamanda moleküler arkeoloji bilimine de katkı sağlamaktadır.
5. Antik DNA çalışmalarında DNA'nın çoğaltılmasından ziyade sonucun güvenilirliğinden emin olabilmek önemli bir husustur. Bu bağlamda, kazı alanlarından örneklerin çıkarılması ve korunması konusunda arkeologlara ve kazıda çalışanlara büyük görevler düşmektedir. Örneklere eldivensiz dokunulmaması ve örneklerin yıkanmadan soğuk ortamda saklanması gibi konulara dikkat edilmesi gerekmektedir.

6. ÖZET

Farklı çevre koşullarına maruz kalmış ve zamanla postmortem bozunmaya uğramış örneklerden DNA elde edilmesi geçmişten günümüze aktarılan genetik bilginin kullanımına olanak sağlamaktadır. Adli genetik çalışmalarında, kemik ve diş gibi sert dokulardan elde edilen DNA ile yapılan PCR çalışmalarından önce DNA miktarının doğru bir şekilde belirlenmesi çalışmanın en kritik noktasını oluşturmaktadır. Genetik profil elde etmek için geliştirilen çok lokuslu ticari kitler; kullanım kolaylığı, otomasyona uygunluğu, kısa zamanda ve tek bir PCR ile 15-16 DNA bölgesini çoğaltmaları ve özellikle yüksek ayırım gücüne sahip olmaları bakımından tercih edilmektedir. Çalışmada, materyal olarak seçilen 2002 yılında Van-Yoncatepe nekropolü kazısından çıkarılmış 35 adet insan kemik örneklerinde, genetik tiplendirmede kullanılan STR sistemlerinin (AmpF ℓ STR® Identifiler®, AmpF ℓ STR® Minifiler™, AmpF ℓ STR® SGM Plus®, Investigator™, Hexaplex ESS, AmpF ℓ STR® NGM SElect™) karşılaştırılması, bu kitlerin oldukça degrade örnekler için uygunluğunun belirlenmesi ve en başarılı sistemin adli çalışmalar için sunulması amaçlanmıştır. Kemik örneklerinden DNA izolasyonu silika temeline dayalı yöntem ile gerçekleştirilmiştir. qPCR yöntemi ile genomik DNA belirlenen örneklerde 5 adet STR kiti kullanılarak genotip tayini yapılmıştır. Kullanılan 35 kemik örneğinden 4 farklı bireye ait, iki farklı izolasyondan elde edilen 6 adet örnekte 0,005-0,059 ng/ μ l genomik DNA belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan 5 adet ticari kit ile yapılan PCR analizleri sonucunda elde edilen aleller pik dengesizlikleri ve rfu değeri göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Buna göre; AmpF ℓ STR® NGM SElect™ kiti ile **6 örnekte**, AmpF ℓ STR® MiniFiler™ kiti ile **5 örnekte**, AmpF ℓ STR® Identifiler® kiti ile **4 örnekte**, AmpF ℓ STR® SGM Plus® kiti ile **3 örnekte**, Investigator™ Hexaplex ESS kiti **2 örnekte** güvenilir lokuslar elde edilmiştir. Elde edilen bu lokuslar ampikon boyutu 86-409 bp aralığındadır. Güvenilir lokus sayısı ve baz çifti aralığı açısından değerlendirildiğinde AmpF ℓ STR® NGM SElect™ kiti tüm örnekler için daha fazla genetik bilgi vermektedir. Bu çalışmada, yaklaşık 3000 yıllık kemikler kullanılarak yapılan STR analizleri ve kullanılan yöntemler bozunmuş örneklerle, özellikle kemik örnekleriyle yapılan çalışmalar açısından adli bilimlere ve moleküler arkeoloji çalışmalarına önemli katkılar sunmaktadır.

7. SUMMARY

DNA recovery from samples that undergo postmortem decay, taken from different environmental conditions enable the usage of genetic information from past. In forensic genetics studies, determination of exact DNA amount which is obtained from hard tissues as tooth and bone is the most critic part of study before PCR analysis. Commercial kits that are used to obtain genetic profile are preferred because of their properties such as ease of application, suitability of automation, amplification of 15-16 loci in a short time and one PCR reaction, especially having a high discrimination of power. In this study, 35 human bones that are taken from Van-Yoncatepe necropolis excavation were used to compare 5 STR systems (AmpF ℓ STR $\circledR$ Identifiler $\circledR$, AmpF ℓ STR $\circledR$ Minifiler TM , AmpF ℓ STR $\circledR$ SGM Plus $\circledR$, Investigator TM , Hexaplex ESS, AmpF ℓ STR $\circledR$ NGM SElect TM), in order to determine availability of these kits for degraded samples and present the best system for forensic studies. DNA extraction from bone samples were performed by silica-based method. Genotype typing was made on the genomic DNA determined samples by using 5 STR systems. 0,005-0,059 ng/ μ l genomic DNA was determined in 6 samples that were obtained from different extractions and 4 individuals in 35 bones. Obtained alleles were evaluated by considering peak imbalances and rfu values. According to these evaluations, the following AmpF ℓ STR $\circledR$ NGM SElect TM , AmpF ℓ STR $\circledR$ MiniFiler TM , AmpF ℓ STR $\circledR$ Identifiler $\circledR$, AmpF ℓ STR $\circledR$ SGM Plus $\circledR$, Investigator TM Hexaplex ESS kits have shown multiple reliable loci on 6, 5, 4, 3, 2 samples respectively. Amplicon sizes of obtained loci were between 86-409 bp. AmpF ℓ STR $\circledR$ NGM SElect TM kit gave more genetic information in contrast with the other kits by considering the number of loci and base pair interval. In this study, STR analyses on bones that are about 3000 years old and the used method contribute greatly to molecular archeology studies and forensic sciences in terms of work on degraded samples and especially bone samples.

8. KAYNAKLAR

Açıkalın E, Gürer F, Bayçu C, Aral E. (2006) Histoloji, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları **894**:124-45.

Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A. (2010) Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA-A review. *Forensic Sci. Int.:Genetics.*, **4**:148–157.

Alonso A, Anđelinović S, Martín P, Sutlovic D, Erceg I, Huffine E, Simón FL, Albarrán C, Definis-Gojanovic M, Fernández-Rodríguez A, García P, Drmic I, Rezic B, Kuret S, Sancho M, Primorac D. (2001) DNA Typing from Skeletal Remains: Evaluation of Multiplex and Megaplex STR Systems on DNA Isolated from Bone and Teeth Samples. *Croatian Medical Journal*, **42 (3)**: 260-266.

Altunçul H. (2001) Kemik Dokudan DNA İzolasyon ve Tipleme Yöntemleri, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.

Altunçul H, İşcan MY. (2003) DNA'dan Kimlik Tayini: Sorun ve Çözümleri. *İstanbul Barosu Derg.*, **77(1)**:63-73.

Altunçul H, Rolf B, Abacı-Kalfoğlu E, Eisenmenger W, Atasoy S. (2003) Maternity Estimation From Skeletal Remains: A Case Report. *Forensic Sci Int*, **136**: 62.

Ballantyne KN, van Oorschot RAH, Mitchell RJ. (2007) Comparison of two whole genome amplification methods for STR genotyping of LCN and degraded DNA samples. *Forensic Sci. Int.* **166**: 35–41

Baron H, Fung S, Aydin A, Bahring S, Luft FC, Schuster H. (1996) Oligonucleotide ligation assay (OLA) for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Nat Biotechnol*, **14(10)**:1279-82.

Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill, P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B. (1997) DNA recommendations: Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J. Legal Med.*, **110**:175-176.

Belli O. (2001) 2000 yılı Van-Yoncatepe Kalesi ve Nekropolü Kazısı. 23. Kazı Sonuçları Toplantısı (2. cilt). *T.C Kültür Bakanlığı Yayınları*. Yayın No: 2765/2: 265-274.

Belli O ve Konyar E. (2001) Excavations at Van-Yoncatepe Fortress and Necropolis. *Journal of the Institute of Archaeology of Tel Aviv University*, **28 (2)**:169-219

Belli O ve Konyar E. (2003) Doğu Anadolu Bölgesi'nde erken Demir Çağı kale ve nekropoller: Early Iron Age fortresses and necropoleis in East Anatolia, İstanbul: *Arkeoloji ve Sanat Yayınları*. 1. Basım, ISBN: 9789756561386

Bender K, Schneider PM, Rittner C. (2000) Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *Forensic Sci Int*, **113(1-3)**:103-7.

Bourke MT, Scherczinger CA, Ladd C, Lee HC. (1999) NaOH Treatment to Neutralize Inhibitors of Taq Polymerase. *J Forensic Sci*. **44(5)**:1046-1450.

Brinkmann B. (1992) The use of STR's in stain analysis. In: Proocceedings from the Third International Symposium on Human Identification. Promega Corporation, Madison, USA, 357- 73.

Buckleton J. (2009) Validation issues around DNA typing of low level DNA. *Forensic Sci. Int.: Genetics* **3**:255-260

Butler JM, Li J, Shaler TA, Monforte JA, Becker CH. (1998) Reliable genotyping of short tandem repeat loci without an allelic ladder using time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Legal Med.*, **112**:45-49.

Butler JM, (2001) Forensic DNA Typing: Biology and Technology Behind STR Markers, 1st Edition, vol:1, pp 2-3-, *Academic Press, London, UK*.

Butler JM, (2005) Forensic DNA Typing: Biology, Technology and Genetics of STR Markers, 2nd Edition, vol:1, pp 1-17, *Elsevier Academic Press, London, UK*.

Butler JM ve Hill CR. (2010) Scientific Issues with Analysis of Low Amounts of DNA. Promega Corporation Website: <http://worldwide.promega.com/resources/profiles-in-dna/2010/scientific-issues-with-analysis-of-low-amounts-of-dna/>. Erişim: Aralık 2013

Campos PF, Craig OE, Turner-Walker G, Peacock E, Willerslev E, Gilbert, MTP. (2012) DNA in ancient bone – Where is it located and how should we extract it? *Ann. Anat.*, **194(1)**: 7-16

Cano RJ ve Poinar HN. (1993) Rapid isolation of DNA from fossil and museum specimens suitable for PCR. *BioTechniques*, **15**: 432-435.

Capelli C, Tschentscher F, Pascali VL. (2003) Ancient protocols for the crime scene? Similarities and differences between forensic genetics and ancient DNA analysis. *Forensic Sci Int*, **131**:59-64.

Ceylan A, Kozbe G, Polat Y, Sivas T, Sivas H, Şahin I, Tanrıver DA. (2008) Türkiye Demir Çağı Araştırmaları Üzerine Değerlendirmeler. Türkiye Arkeolojik Yerleşmeleri-6a/6b Demir Çağı, Ege Yayınları, İstanbul. Cilt ISBN: 978-975-807-182-1

Coble MD ve Butler JM. (2005) Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA. *J. Forensic Sci.* **50**:1.

Cooper A. et al. (2001) Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature* **409**: 704–707

Cotton EA, Allsop RF, Guest JL, Frazier RRE, Koumi P, Callow IP, Seager A, Sparkes RL. (2000) Validation of the AMPFISTR® SGM Plus™ system for use in forensic casework. *Forensic Sci. Int.*, **112**: 151-161

Delamoye M, Duverneuil C, Riva K, Leterreux M, Taieb S, Mazancourt P. (2004) False homozygosities at various loci revealed by discrepancies between commercial kits: implications for genetic databases. *Forensic Sci Int.*, **143(1)**: 47-52

Desalle R, Gatesy J, Wheeler W and Grimaldi D. (1992) DNA Sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications. *Science* **257**:1933–1936.

Dixon LA, Dobbins AE, Pulker HK, Butler JM, Vallone PM, Coble MD, et al. (2006) Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs—results of a collaborative European (EDNAP) exercise. *Forensic Sci. Int.*, **164(1)**:33–44.

Fondevila M, Philips C, Naveran N, Fernandez L, Cerezo M, Salas A, Carracedo A, Lareu MV. (2008) Case report: Identification of skeletal remains using short amplicon marker analysis of severely degraded DNA extracted from a decomposed and charred femur. *Forensic Sci Int*, **2**: 212-218.

- Gaensslen R, Berka K, Herrin GJ, Mishler R, Sveum L, Lee H. (1993) Amplification of a genomic sequence in 19th century human bone DNA. *Naturwissenschaften*, **80(2)**:80-1
- Geigl EM. (2002) On the circumstances surrounding the preservation and analysis of very old DNA. *Archaeometry* **44**: 337–342.
- Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G. et al. (1994) Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis, *Nat Genet* **6**: 130–135.
- Gill P, Sparkes R, Kimpton C. (1997) Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system. *Forensic Sci. Int.*, **89**:185-197
- Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. (2000) An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci. Int.*, **112(1)**:17–40
- Gill P. 2001. Application of Low Copy Number DNA Profiling. (2001) *Croatian Medical Journal*, **42(3)**:229-232.
- Gill P, Fereday L, Morling N, Schneider PM. (2006) New multiplexes for Europe-Amendments and clarification of strategic development. *Forensic Sci. Int.*, **163**:155–157
- Götherström A, Collins M.J, Angerbjörn A, Liden K. (2002) Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry*, **44 (3)**:395-404
- Green RE, Krause J, Ptak SE, Briggs AW, Ronan MT, Simons JF, Du L, Egholm M, Rothberg JM, Paunovic M and Pääbo S. (2006) Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature*, **444**:330-336.
- Grossman PD, Bloch W, Brinson E, Chang CC, Eggerding FA, Fung S, Lovannisci DA, Woo S and Winn-Deen ES. (1994) High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence-coded separation. *Nucleic Acids Research*, **22 (21)**: 4527-4534
- Günel T, 2007. Gen anlatımının kantitatif analizi Real-time PCR, Türkiye klinikleri, *J Med. Sci.*, **27**:763-767.

- Haddrath O ve Baker AJ. (2001) Complete mitochondrial DNA genome sequences of extinct birds: ratite phylogenetics and the vicariance biogeography hypothesis. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **268**: 939–945.
- Hagelberg E, Gray IC, Jeffreys AJ. (1991) Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature*, **352**:427–9.
- Hagelberg E. et al. (1994). DNA from ancient mammoth bones. *Nature* **370**: 333–334
- Handt O, Richards M, Trommsdorff M, Kilger C, Simanainen J, Georgiev O, Bauer K, Stone A, Hedges R, Schaffner W, et al. (1994) Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science*, **264**:1775–1778
- Harder M, Renneberg R, Meyer P, Krause-Kyora B, Wurmb-Schwark N. (2012) STR-typing of ancient skeletal remains: which multiplex-PCR kit is the best? *Croat Med J*, **53**:416-22
- Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC. (1984) DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, **312**:282–284.
- Higuchi R, Fockler H, Dollinger G, Watson R. (1993) Kinetic PCR analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Biotechnology*, **11**: 1026-1030.
- Hill Carolyn R, Margaret CK, Coble MD, Butler JM. (2008) Characterization of 26 MiniSTR Loci for Improved Analysis of Degraded DNA Samples. *J. Forensic Sci.*, **53**:1
- Hill CR, Cline MC, Duewer DL, Butler JM. (2011) Concordance testing comparing STR multiplex kits with a standard data set. *Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series 3*, e188–e189
- Hochmeister M, Budowle B, Borer U, Eggman U, Comey C, Dirnhofer R. (1991) Typing of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Extracted from Compact Bone from Human Remains. *J. Forensic Sci.*, **36(6)**: 320-330.
- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M ve Pääbo S. (2001) Ancient DNA. *Nature Rev. Genet.*, **2**: 353-359.
- Höss M. (1995) Ancient DNA. *Horm. Res.*, **43(4)**:118-20.

Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Pääbo S. (1996) DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res.* **24**: 1304–1307.

İşcan MY, Altunçul H, Belli O, Konyar E. (2007) Eski İnsan Kalıntılardan DNA çekilmesi. *Adli Bilimler Dergisi / Turkish Journal of Forensic Sciences*, **6 (1)**: 71-78.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. 1985. Hypervariable “minisatellit” regions in human DNA. *Nature*, **314**:67-73.

Just RS, Irwin JA, O’Callaghan JE, Saunier JL, Coble MD, Vallone PM, et al. (2004) Toward increased utility of mtDNA in forensic identifications. *Forensic Sci. Int.*, **146**:(Suppl):147–9.

Keyser-Tracqui C, Cruéby E, Ludes B. (2003) Nuclear and Mitochondrial DNA Analysis of a 2,000-Year-Old Necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *Am. J. Hum. Genet.*, **73**:247–260

Kloosterman AD ve Kersbergen P. (2003) Efficacy and limits of genotyping low copy number (LCN) DNA samples by multiplex PCR of STR loci. *J Soc. Biol.*, **197(4)**: 351–359.

Koç H, Hayvan Histolojisi. http://www.hasankoc.net/dersnot/histoloji_kemik.pdf, Erişim: Mart 2013

Konyar E. (2004) Doğu Anadolu Erken Demir Çağ Kültür: Arkeolojik Kazı ve Yüzey Araştırmaları Bulgularının Değerlendirilmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü.

Koroğlu K. ve Konyar E. (2005) Van Gölü Havzası’nda Erken Demir Çağı Problemi. *Arkeoloji-Sanat Derg.*, **119**: 25-38

Kutlu M ve Odabaşı E. (2004) Kemik doku ve fizyolojisi, *Türkiye Klinikleri J Endocrin*, 73-89

Lambert DM ve Millar CD. (2006) Ancient genomics is born. *Nature*. **444**:275-276

Lee HC, Pagliaro EM, Berka KM, Folk NL, Anderson DT, Ruano G, Keith TP, Phipps P, Herrin GL Jr, Garner DD. (1991) Genetic markers in human bone: I. Deoxyribonucleic acid (DNA) analysis. *J Forensic Sci.*, **36(2)**:320-30.

Lee HY, Park MJ, Kim NY, Sim JE, Yang WI, Shin KJ (2010) Simple and highly effective DNA extraction methods from old skeletal remains using silica columns. *Forensic Sci. Int: Genetics*, 4 **(5)**: 275–280

Lindahl T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. **362**:709–715.

Marieb EN ve Hoehn K. (2007) Human Anatomy and Physiology. Bölüm 6, pp:173-182, Pearson Benjamin Cummings press, 7. baskı.

McEwen JE ve Reilly PR. (1994) A Review of State Legislation on DNA Forensic Data Banking. *The American Society of Human Genetics*, **54**: 942-958.

McEwen JE. (1995) Forensic DNA Data Banking by State Crime Laboratories. *Am. J. Hum. Genet.* **56**:1487-1492

Millar CD, Huynen L, Subramanian S, Mohandesan E, Lambert DM. (2008) New developments in ancient genomics. *Trends Ecol Evol*, **23 (7)**: 386-393

Mulero JJ, Chang CW, Legace RE, Wang DY, Bas JL, McMahon TP, Hennessy LK. (2008) Development and Validation of the AmpFSTR MiniFiler™ PCR Amplification Kit: A MiniSTR Multiplex for the Analysis of Degraded and/or PCR Inhibited DNA. *J Forensic Sci.*, 53: 4

Nielsen K, Mogensen HS, Hedman J, Niederstätter H, Parson W, Morling N. (2008) Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Sci. Int.: Genetics* **2**: 226–230

Noonan JP, Hofreiter M, Smith D, et al. (2005) Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. *Science* **309**: 597-600.

Pääbo, S. 1985. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* **314**: 644–645.

Pääbo, S ve Wilson AC. (1988) Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. *Nature*, **334**: 387–388.

Pääbo S. (1989) Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 1939–1943.

Pääbo S ve Wilson AC. (1991) Miocene DNA sequences- a dream come true? *Current Biol.* **1**:45–46.

Pääbo S, Poinar HN, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M. (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Ann Rev Genet*, **38**: 645-679.

Poinar GO, Poinar HN, Cano RJ. (1994) Fixed and embedded samples: DNA from amber inclusions. Herrmann B, Hummel S, editors. New York: Springer-Verlag Inc.,. 92-103

Poinar HN, Schwarz C, Qi J, Shapiro B, MacPhee RDE, Buigues B, Tikhonov A, Huson DH, Tomsho LP, Auch A, Rampp M, Miller W, Schuster SC. (2006) Metagenomics to Paleogenomics: Large-Scale Sequencing of Mammoth DNA. *Science*, **311**: 392-394

Pruvost M, Schwarz R, Bessa Correia V, Champlot S, Braguier S, Morel N, Fernandez-Jalvo Y, Grange T and Geigle EM. (2007) Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *PNAS* **104**(3): 739–744

Ricaux FX, Keyser-Tracqui C, Crubezy E, Ludes B. (2005) STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples. *Forensic Sci. Int.*, **151**:31-35

Ricci U, Marchi C, Previdere C, Fattorini P. (2006) Quantification of human DNA by real-time PCR in forensic casework. *Elsevier International Congress Series*, **1288**: 750–752

Robertson J, Ross AM, Burgayne LA. (1990) DNA in Forensic Science: Theory, Techniques and Applications. London: Ellis Howard Ltd.

Rogan PK, Salvo JS. (1994) Dried Samples: Soft tissues high-fidelity amplification of ribosomal gene sequences from South American mummies. Herrmann B, Hummel S, editors. New York: Springer-Verlag, 182-93.

Rohland N ve Hofreiter M. (2007) Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques*, **42**:343-352

Sailus J, Oldroyd N, Calandro L, Mulero J, Qi L. (2012) Life Technologies Corporation Considerations for the Evaluation of Plus Stutter for AmpFlSTR® PCR Amplification Kits in Human Identification Laboratories. Forensic News, *Applied Biosystems*.

Sevin V ve Kavaklı E. (1996) Bir Erken Demir Çağ Nekropolü Van Karagündüz. An Early Iron Age Cemetery. Arkeoloji ve Sanat Yayınları, İstanbul. 1. Basım, ISBN: 9789757538851

Sevin V. (1999) “The origins of the Urartians in the light of the Van/Karagündüz excavations”, Anatolian Iron Ages 4, (ed. A. Çilingiroğlu – R. J. Matthews); *Anatolian Studies* 49: 159-164.

Sevin V. (2003) Anadolu Arkeolojisi. Der Yayınları, İstanbul. Yayın No: 215, 3. Basım, ISBN: 975-353-138-4

Sevin V. (2004) “Pastoral Tribes and Early Settlements of the Van Region, Eastern Anatolia”, A view from the highlands: archaeological studies in honour of Charles Burney. (ed. A. Sagona) *Peeters*: 179-2003.

Sambrook J ve Russel DW. (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. P: 5.2-6.6.

Shapiro B, Drummond AJ, Rambaut A. et al (27 co-authors). (2004) Rise and fall of the Beringian steppe bison. *Science*, **306**:1561–1565

Sidow A, Wilson AC, Pääbo S. (1991) Bacterial DNA in *Clarkia* fossils. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **333**: 429–433.

Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, Stringer C, Collins MJ. (2003) The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *J Hum Evol* **45**: 203-217.

Somma M. (2006) Gıda örneklerinde Genetiği değiştirilmiş organizma analizleri. Bölüm 4-DNA ekstraksiyonu ve saflaştırılması. JRC european Commission Eğitim kursu el kitabı. ISBN: 978-92-79-13574-3

Sparkes R, Kimpton C, Watson S, Oldroyd N, Clayton T, Barnett L, and Arnold J. et al. (1996) The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (I). Mixtures, ageing, degradation and species studies. *Int. J Legal Med.*, **109 (4)**: 186–94.

Sparkes, R, Kimpton C, Gilbard S, Carne P, Andersen J, Oldroyd N, Thomas D, Urquhart A and Gill P. (1996a) The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (II). Artefacts, casework studies and success rates. *Int. J Legal Med.*, **109 (4)**: 195–204.

Tamaki K, Jeffreys AJ. (2005) Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Legal Medicine* 7: 244–250.

Teoule R ve Cadet J. (1978) Comparative study of oxidation of nucleic acid component by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals. *Photochemistry and Photobiology*, **28**: 493–508

Thomas R, H., W. Schaffner A, C. Wilson ve S. Pääbo. (1989) DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature*, **340**:465-467.

Timken MD, Swango KL, Orrego C, Chong MD, Buoncristiani MR. (2005) Quantitation of DNA for Forensic DNA Typing by qPCR. U.S. Department of Justice.

Tütüncü Ş. Kemik Oluşum. <http://www2.omu.edu.tr/docs/dersnotu/1662.pdf> Erişim: Haziran 2013

Walsh PS, Filde NJ ve Reynolds R. (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res.*, 24 (**14**): 2807–2812.

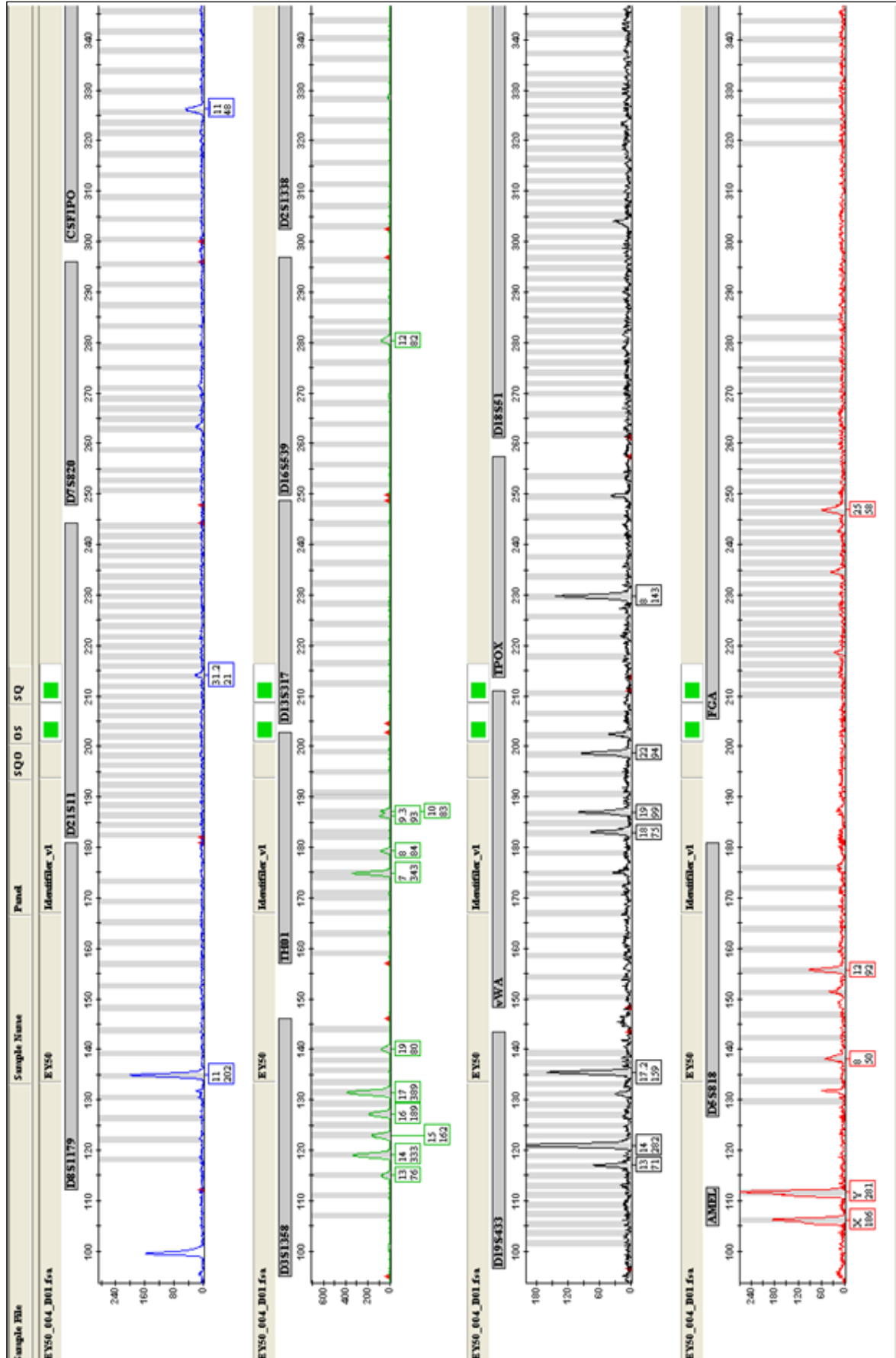
Wayne RK, Leonard JA, Cooper A. (1999) Full of sound and fury: the recent history of ancient DNA. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **30**:457-477

Whitaker JP, Cotton EA, Gill P. (2000) A comparison of the characteristics of profiles produced with the AMPFISTR SGM Plus_ multiplex system for both standard and low copy number (LCN) STR DNA analysis. *Forensic Sci. Int.*, **129(1)**:25–34

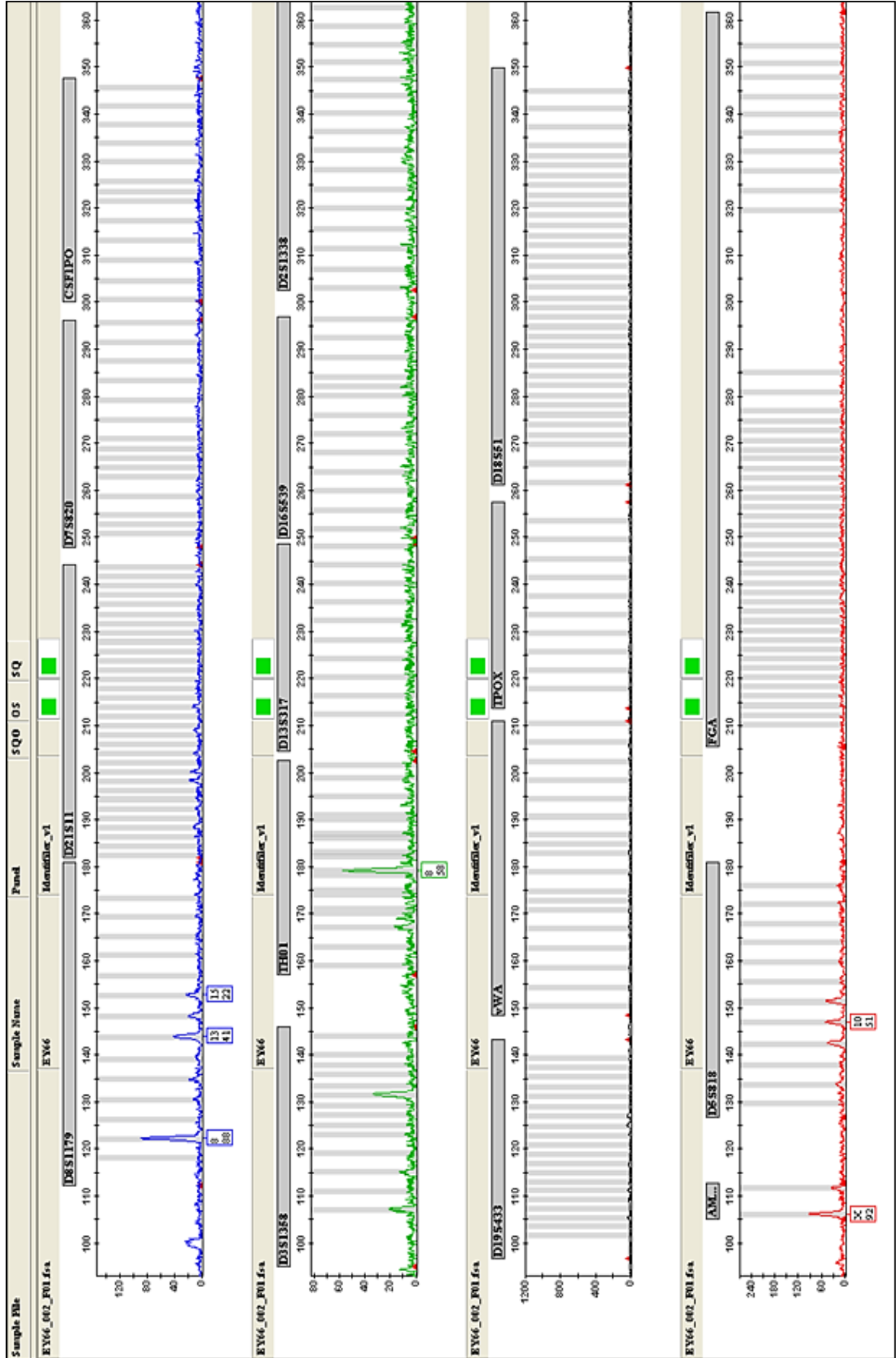
Willerslev E, Cooper A. (2005). Ancient DNA. *Proc. R. Soc. B*, **272**:3–16

Woodward SR, Weyand, NJ and Bunell M. (1994) DNA sequence from Cretaceous period bone fragments. *Science*, **266**: 1229–1232.

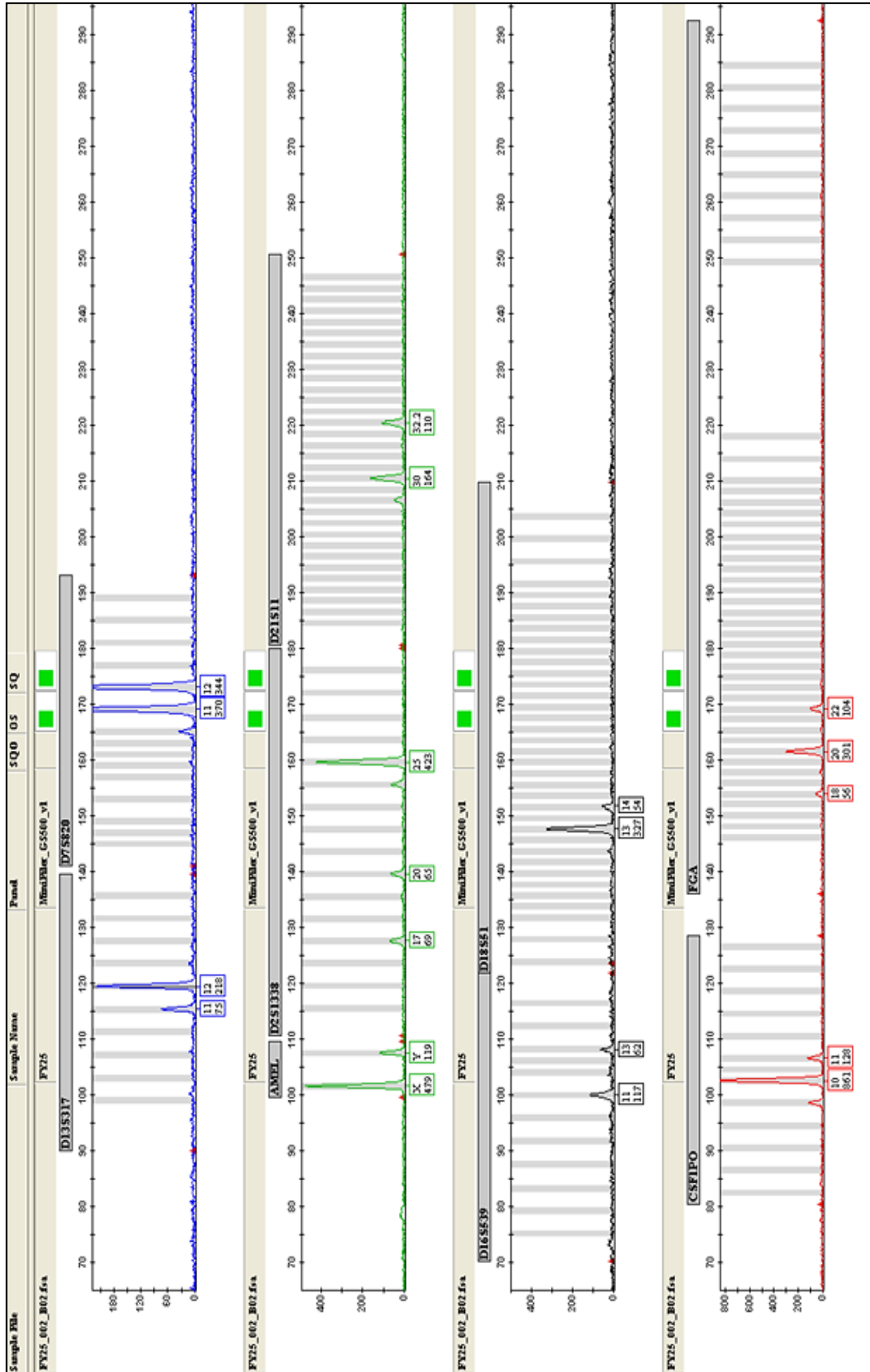
Ek 2. AmpFlSTR® Identifiler® kiti ile çalışılan FY-50 örneğine ait elektroferogram.



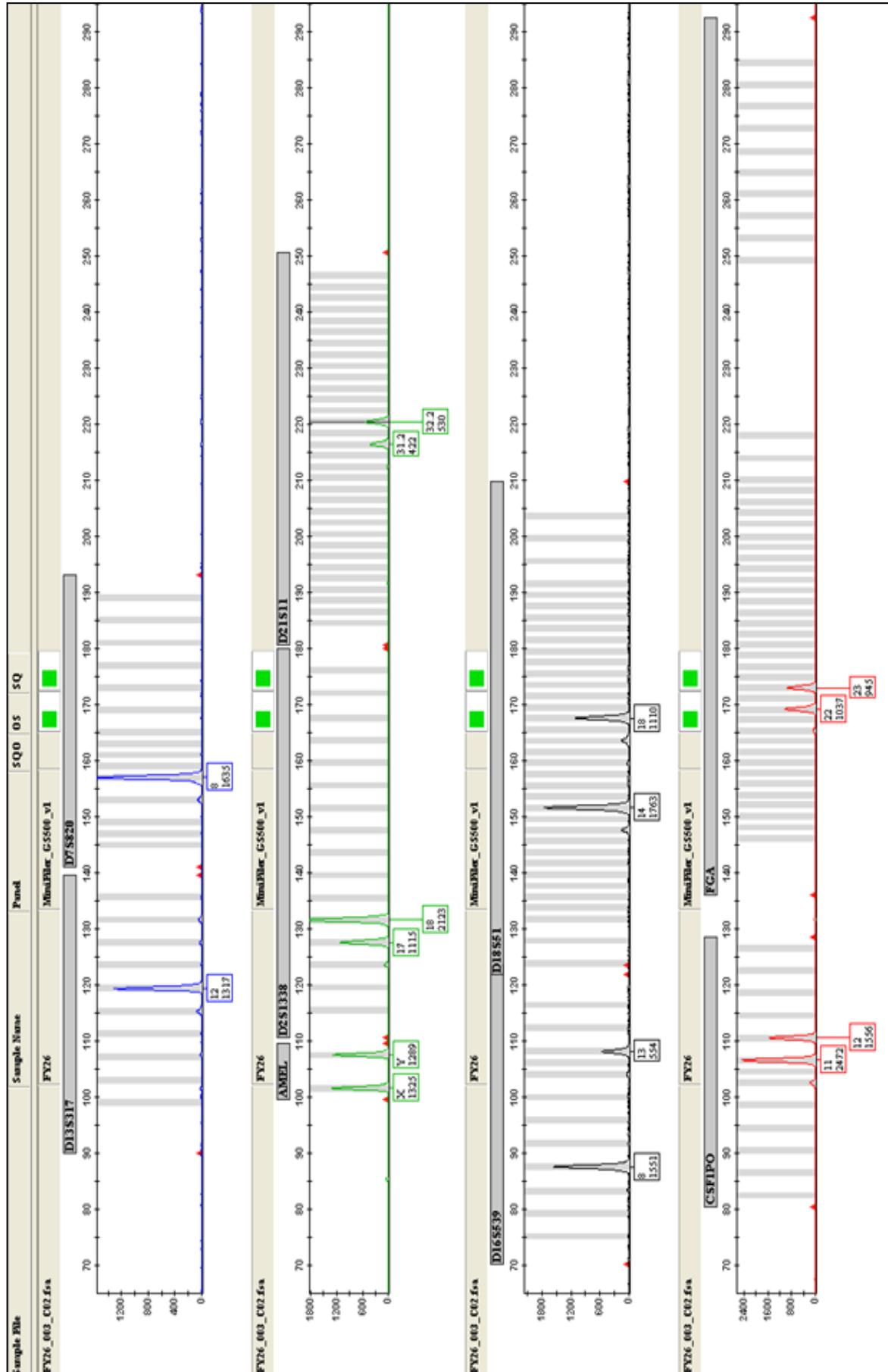
Ek 3. AmpFlSTR® Identifiler® kiti ile çalışılan FY-66 örneğine ait elektroferogram.



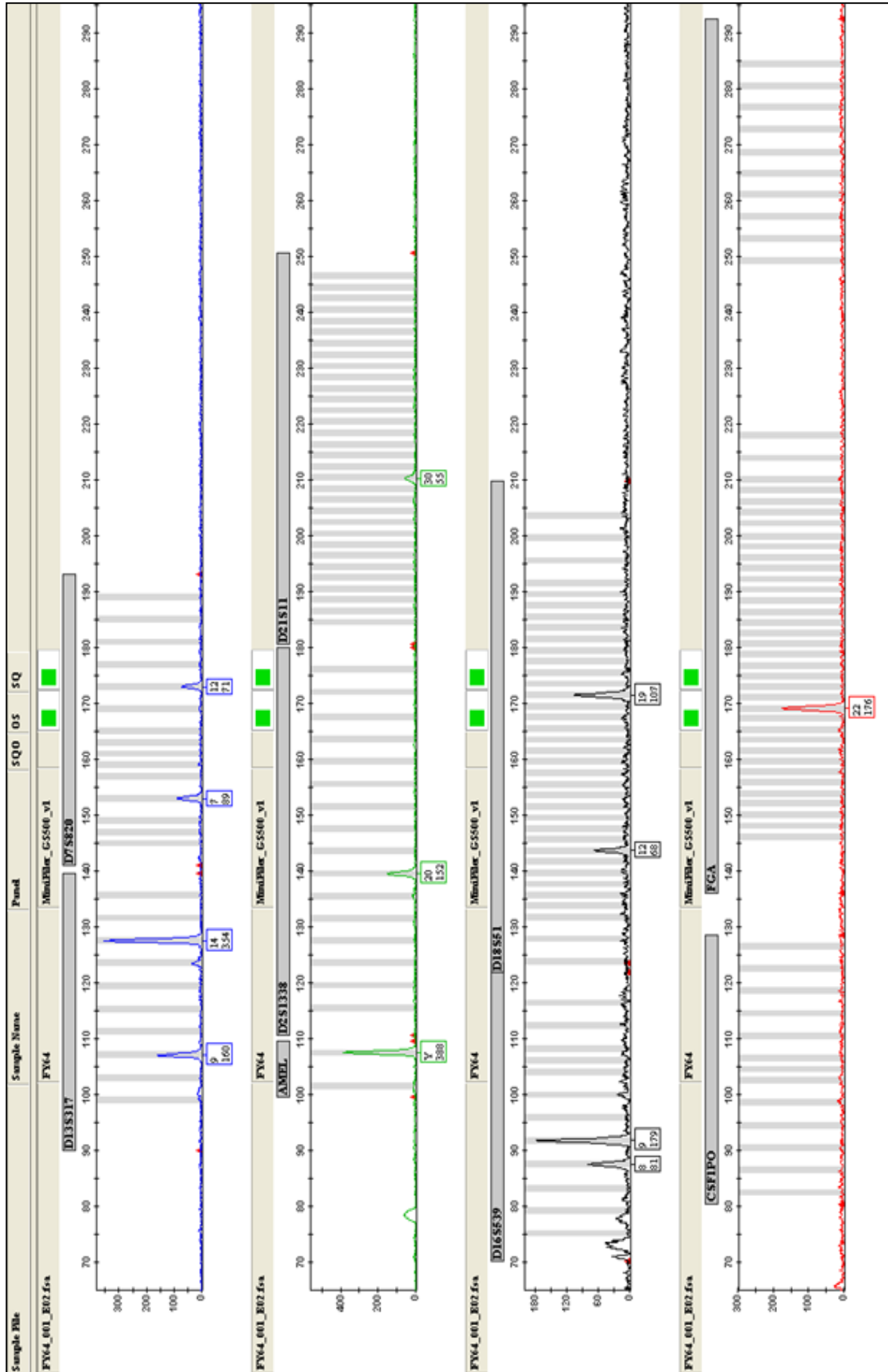
Ek 4. AmpFlSTR® MiniFiler™ kiti ile çalışılan FY-25 örneğine ait elektroferogram.



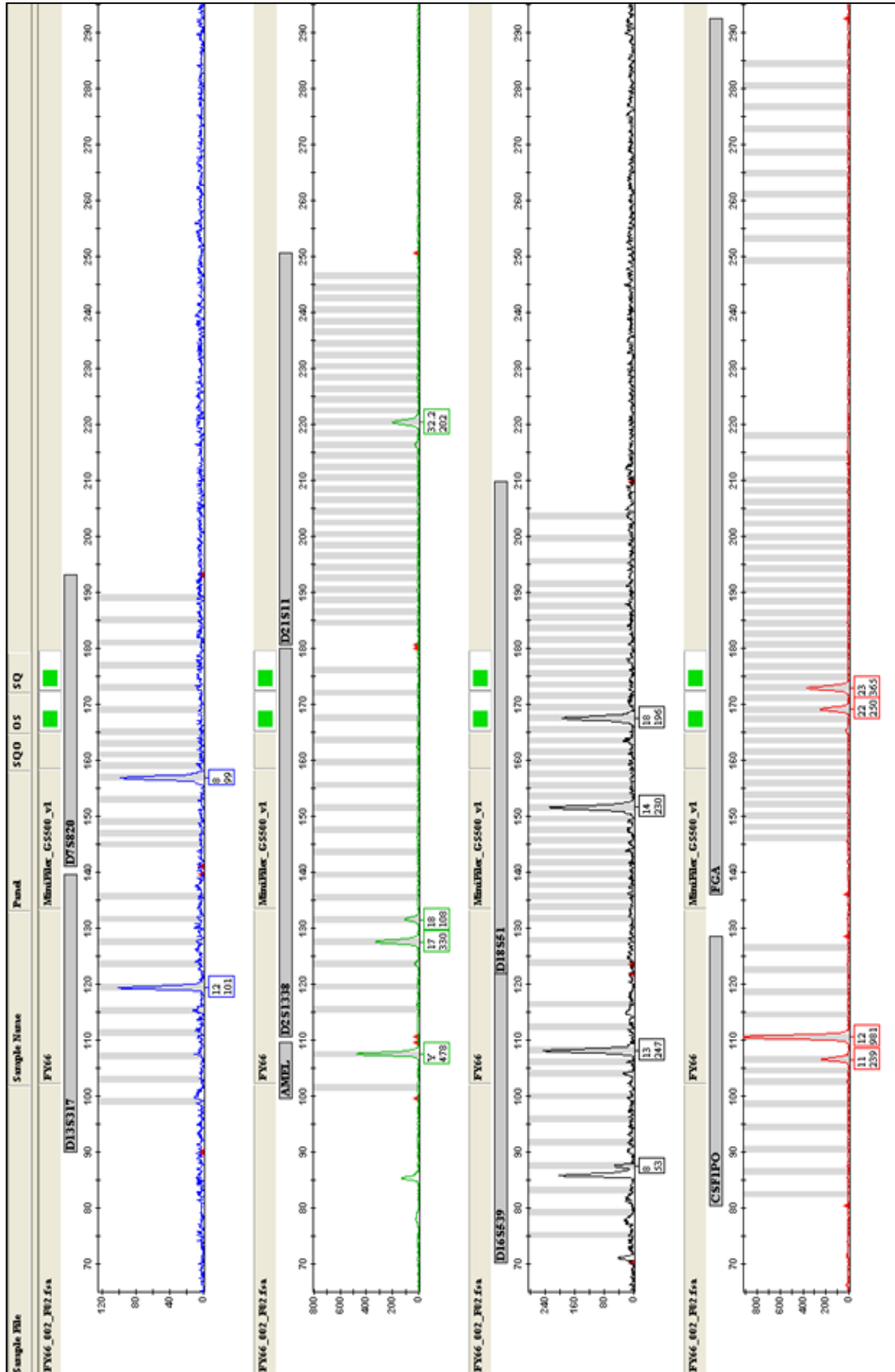
Ek 5. AmpFlSTR® MiniFiler™ kiti ile çalışılan FY-26 örneğine ait elektroferogram.



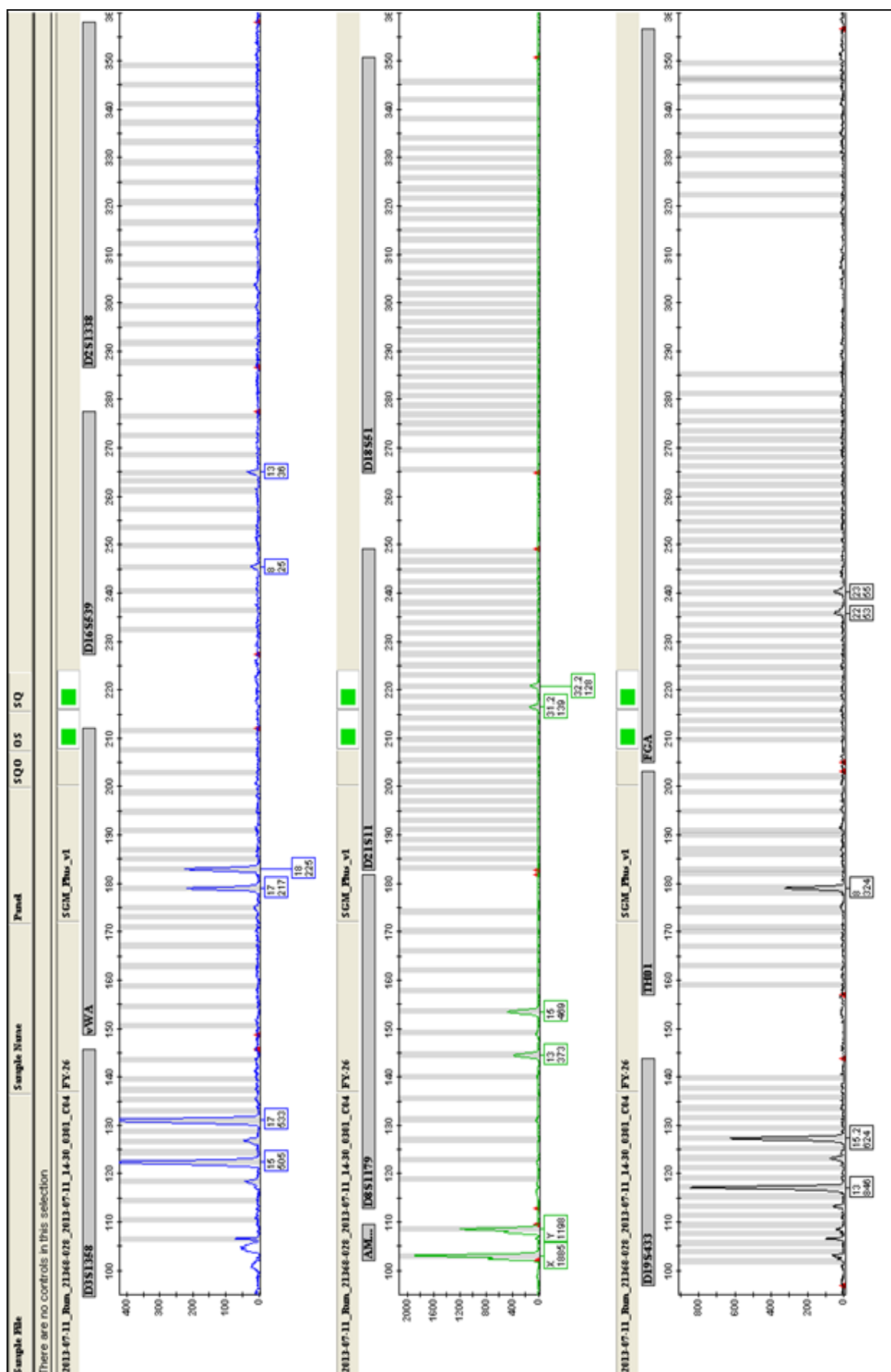
Ek 6. AmpFlSTR® MiniFiler™ kiti ile çalışılan FY-64 örneğine ait elektroferogram.



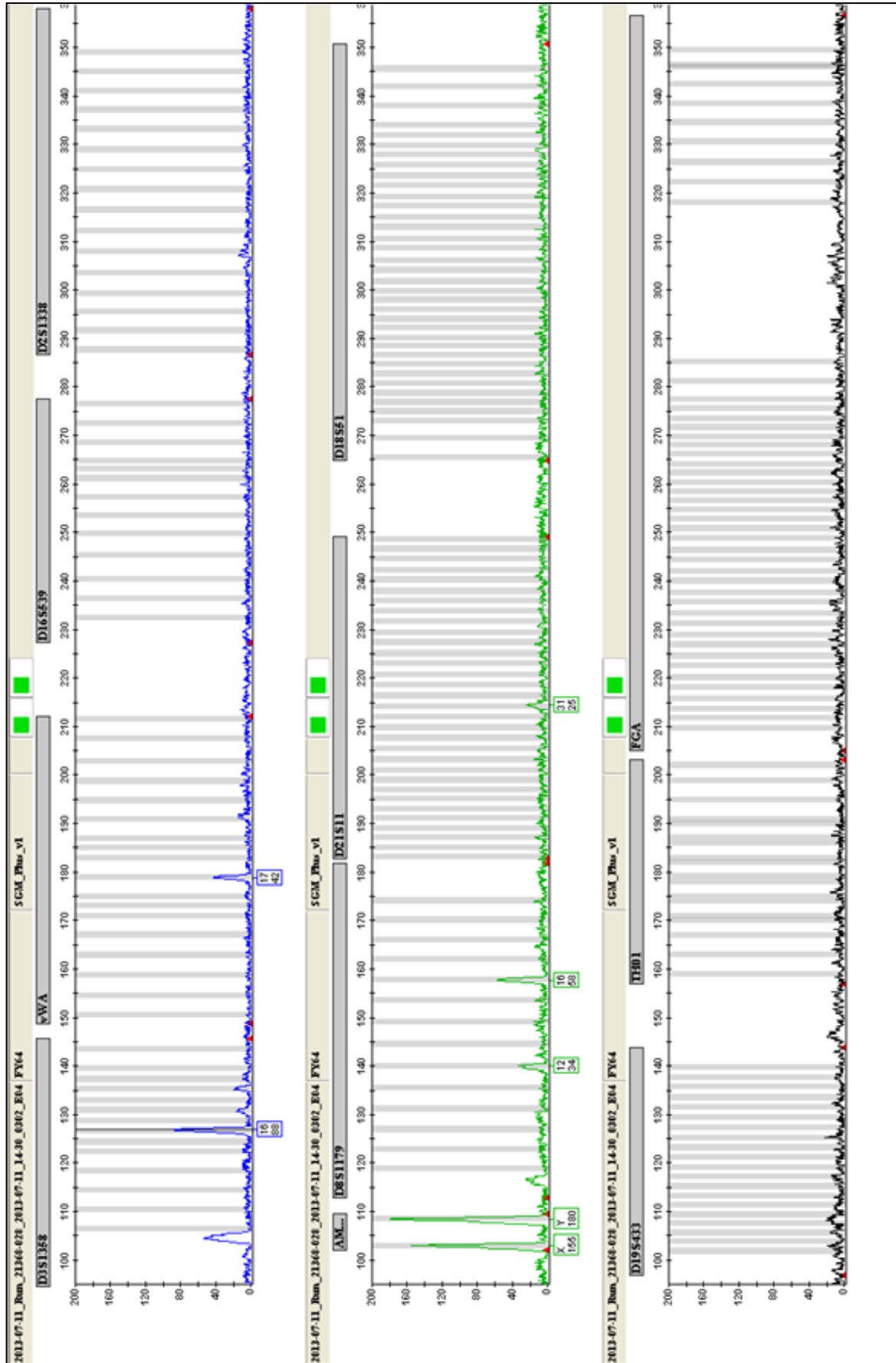
Ek 7. AmpFlSTR® MiniFiler™ kiti ile çalışılan FY-66 örneğine ait elektroferogram.



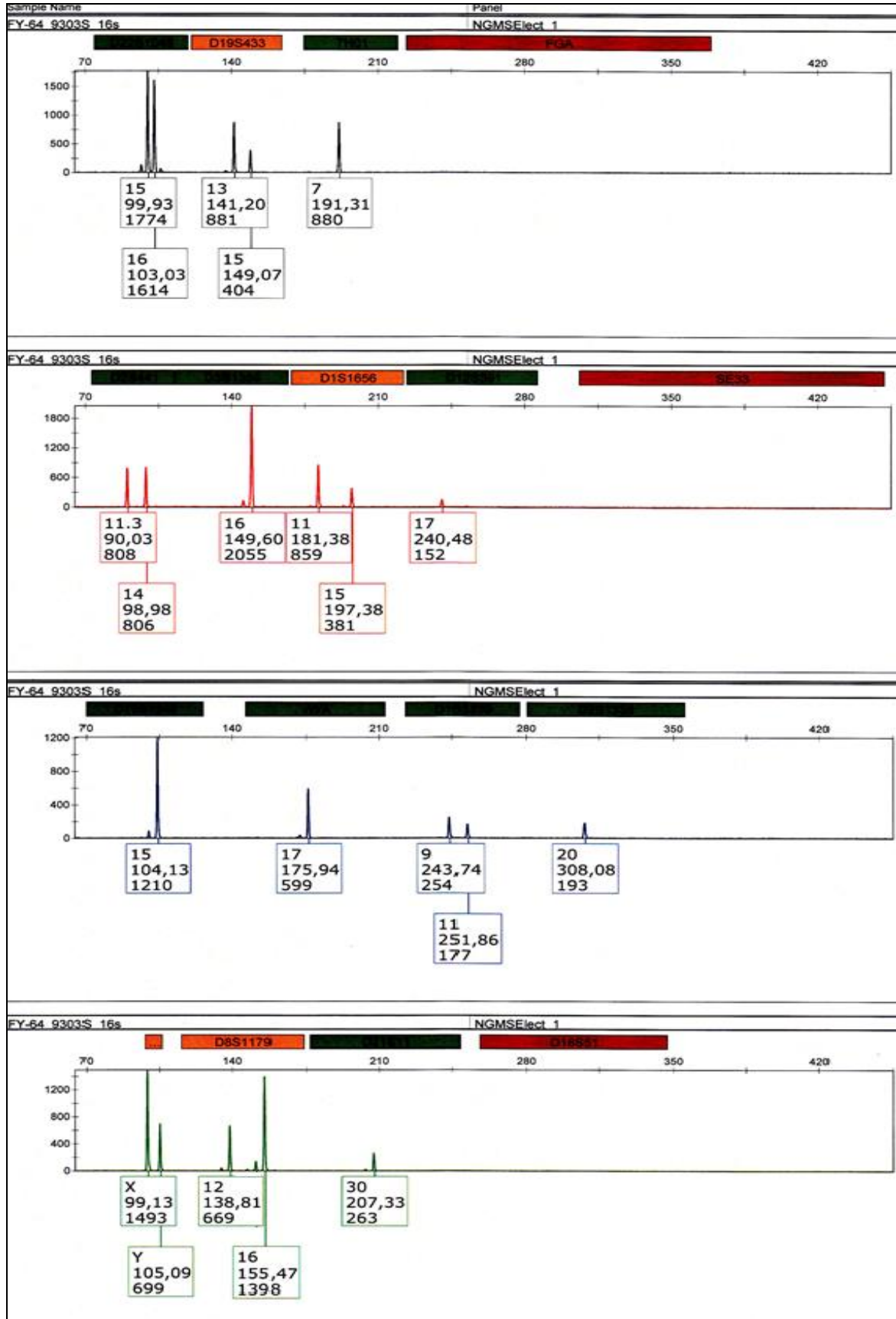
Ek 8. AmpFlSTR® SGM® Plus kiti ile çalışılan FY-26 örneğine ait elektroferogram.



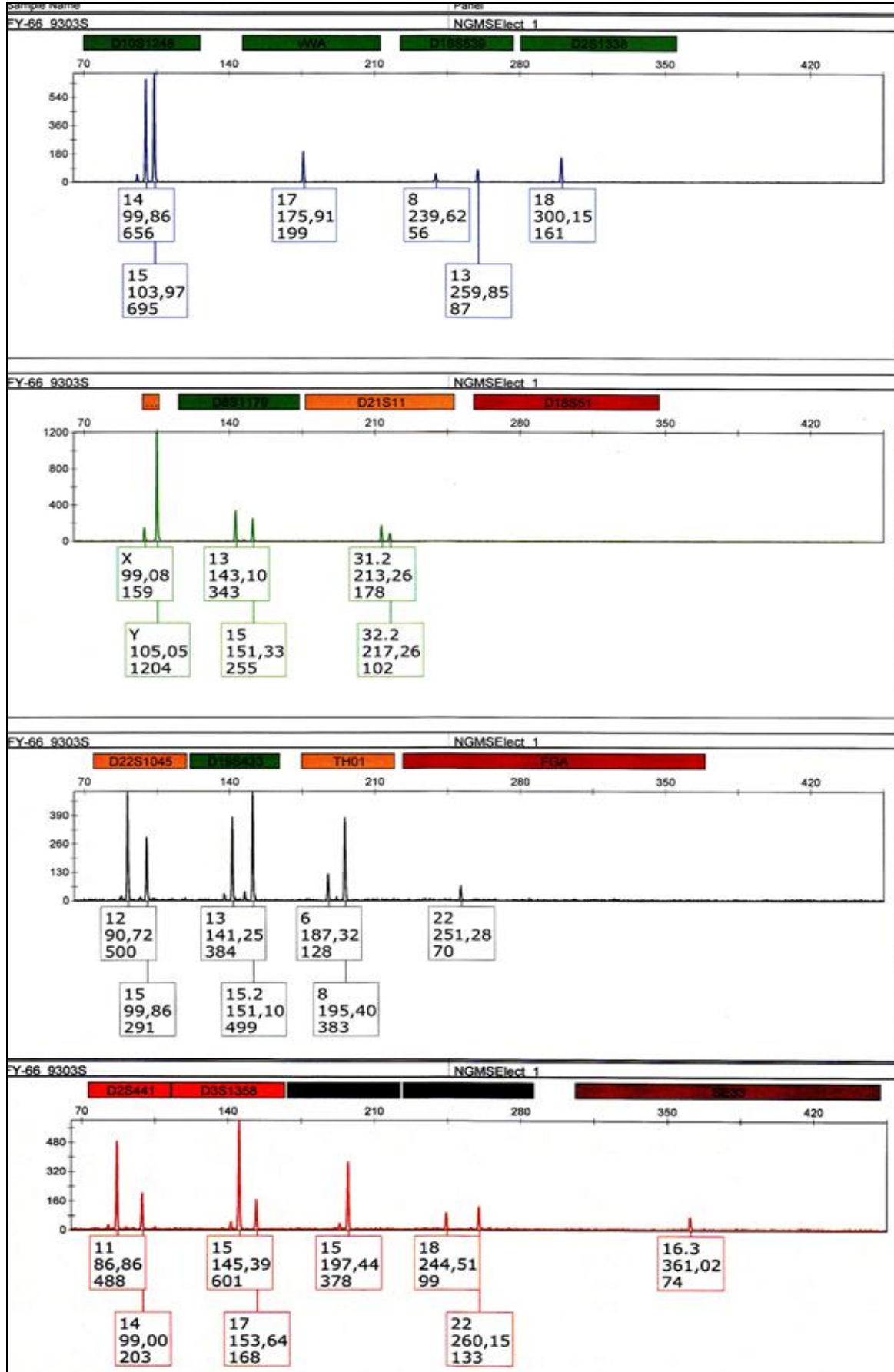
Ek 9. AmpFlSTR® SGM® Plus kiti ile çalışılan FY-64 örneğine ait elektroferogram.



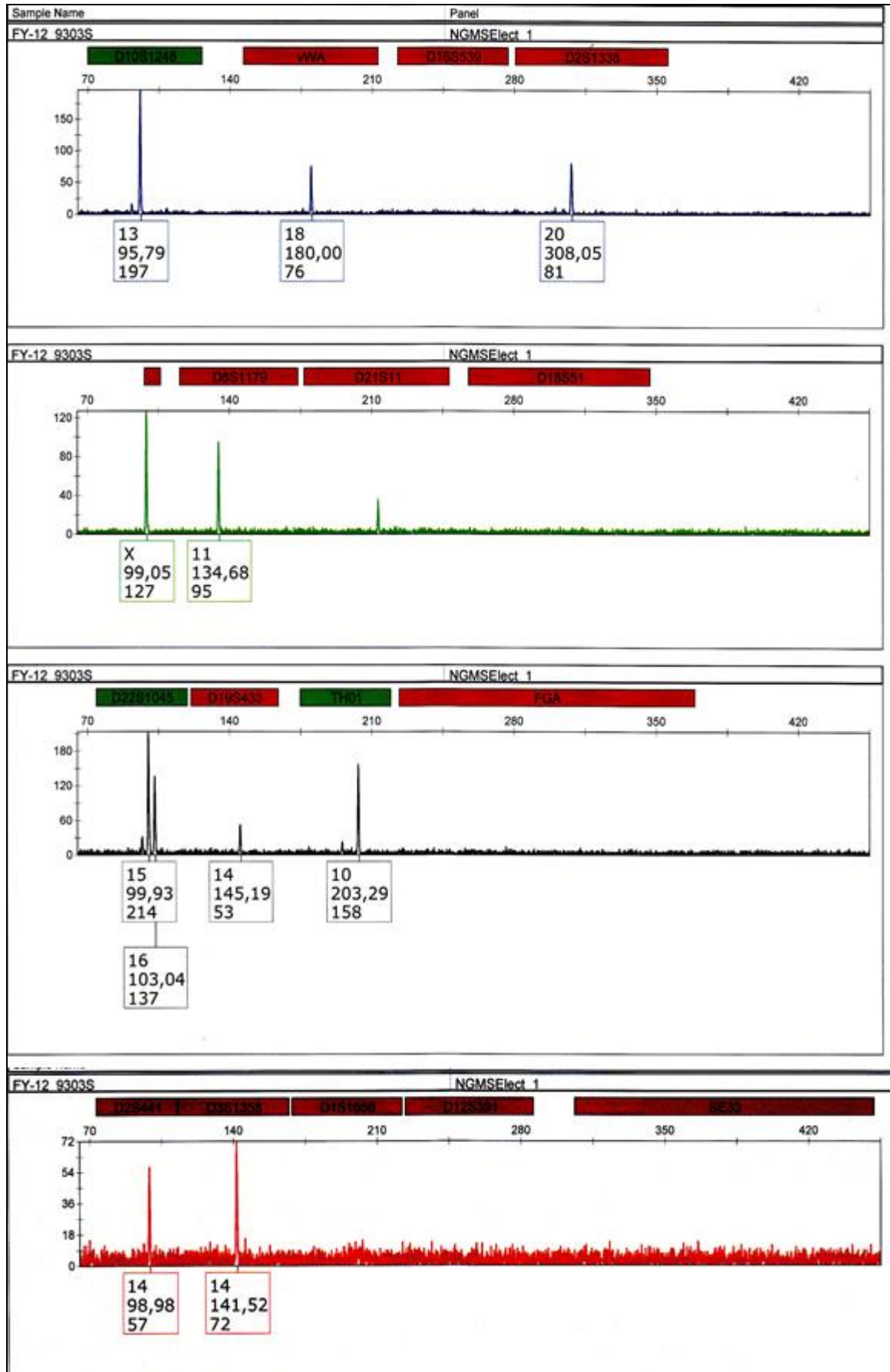
Ek 10. AmpFISTR® NGM Select kiti FY-64 örneğine ait elektroferogram (piklere ait kutulardaki rakamlar yukarıdan aşağıya doğru; alel ismi, alel size ve rfu değerini göstermektedir.)



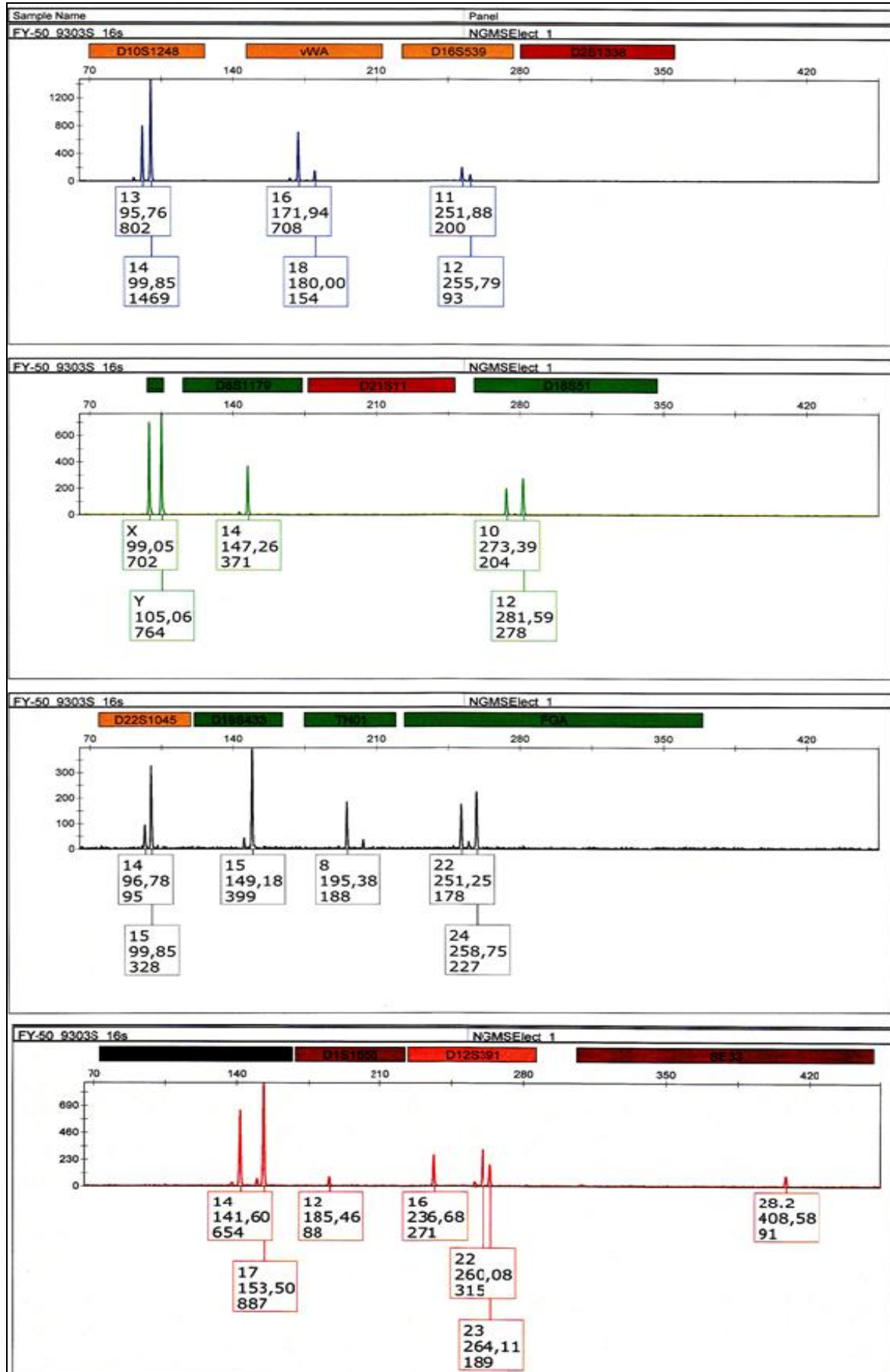
Ek 11. AmpFlSTR® NGM Select™ kiti ile çalışılan FY-66 örneğine ait elektroferogram.



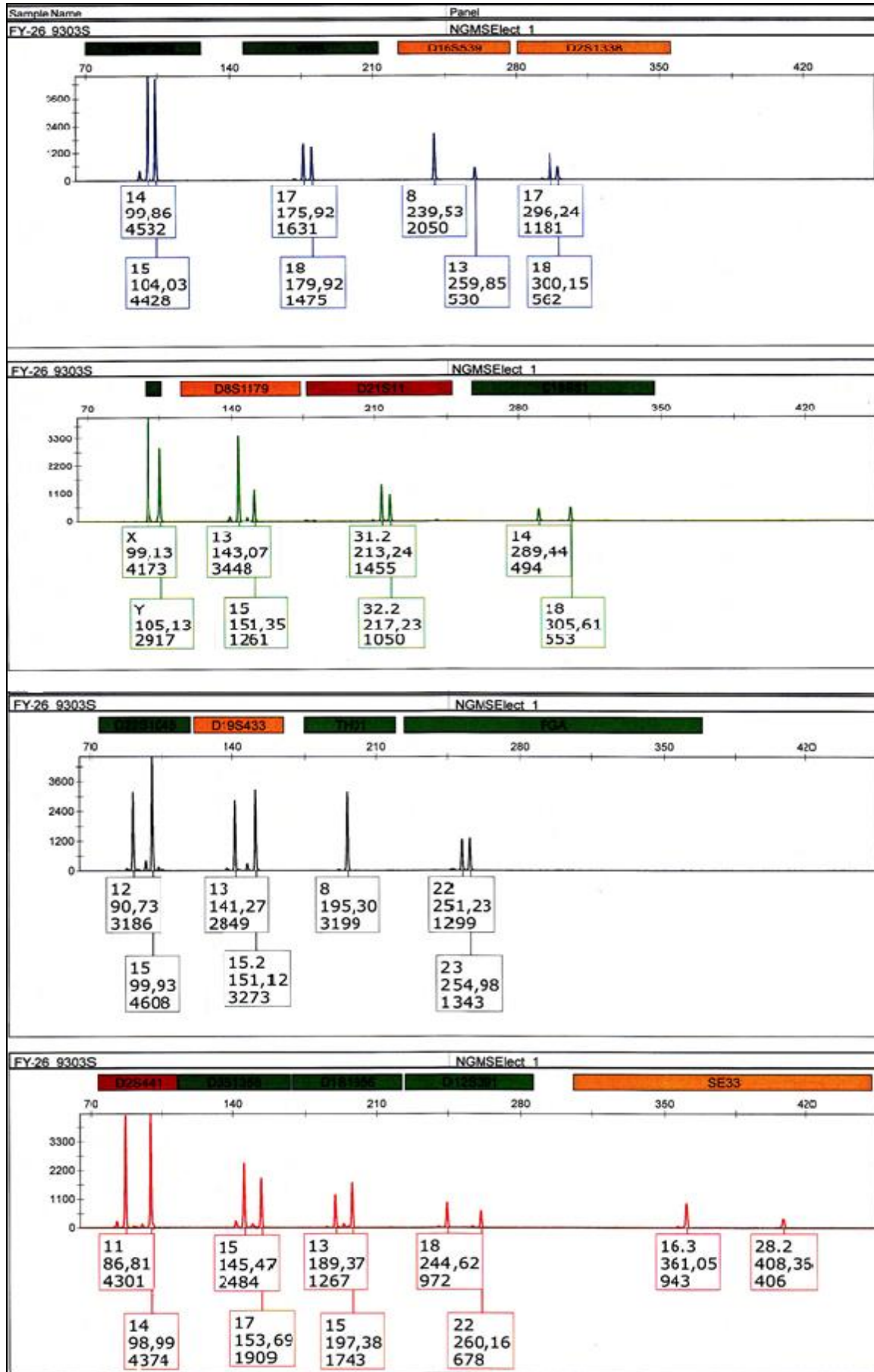
Ek 12. AmpFlSTR® NGM Select™ kiti ile çalışılan FY-12 örneğine ait elektroferogram



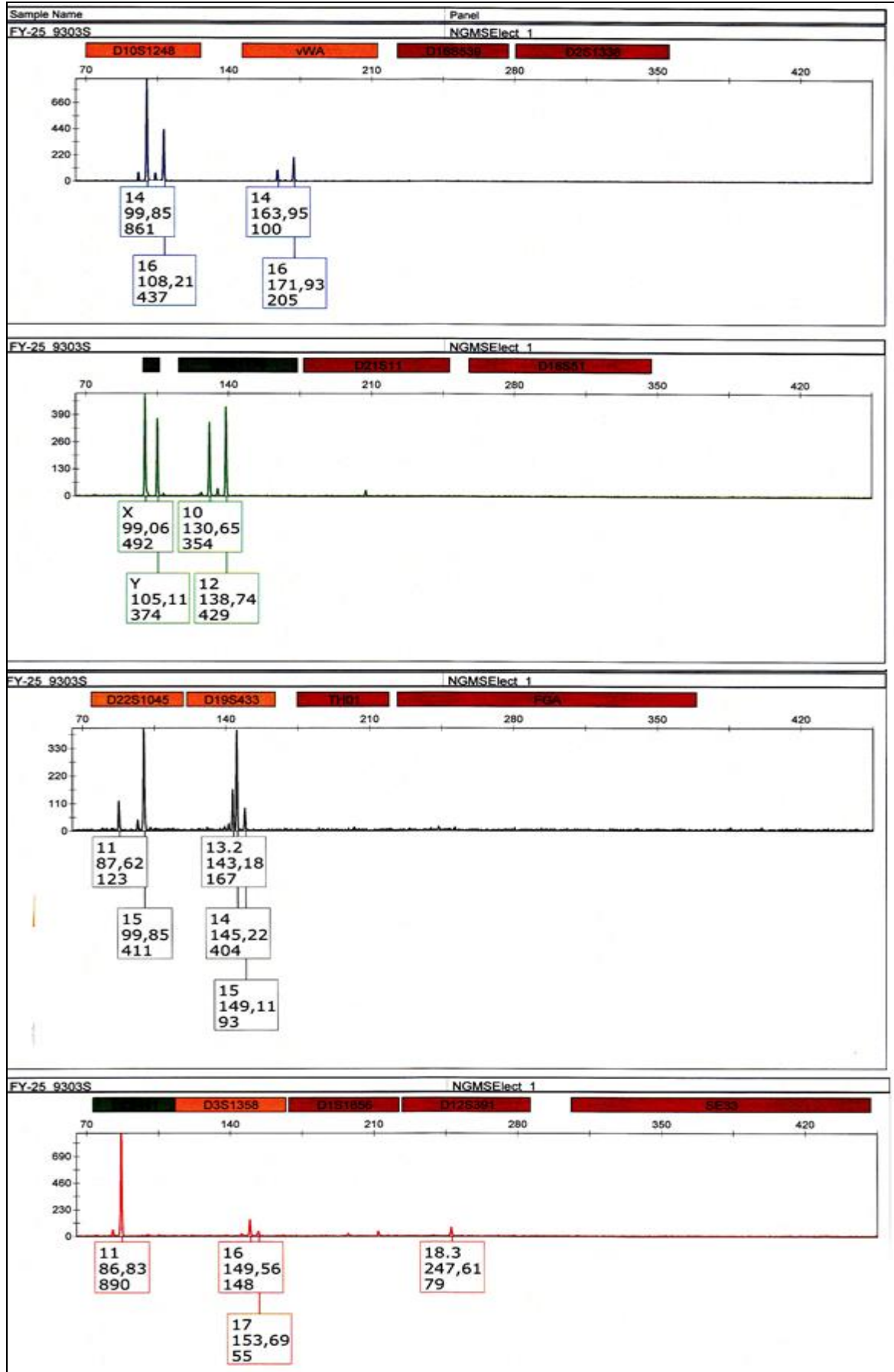
Ek 13. AmpFlSTR® NGM Select™ kiti ile çalışılan FY-50 örneğine ait elektroferogram.



Ek 14. AmpFlSTR® NGM Select™ kiti ile çalışılan FY-26 örneğine ait elektroferogram.



Ek 15. AmpFlSTR® NGM Select™ kiti ile çalışılan FY-25 örneğine ait elektroferogram.



EK 16. Digestion Çözeltisi Hazırlanışı

- 500 µl Triton X-100 %1
- 480 µl 10 mM Tris (pH:8)
- 250 µl Proteinaz K (20 mg/ml)

maddeleri, 50 ml'lik falkon tüp içerisine aktarılır ve üzerine 0,5 M EDTA (pH:8) çözeltisinden son hacmi 30 ml olacak şekilde ilave edilir. Karışım çalkalanarak homojenize edilir.

EK 17. Çalışmada Materyal Olarak Kullanılan Arkeolojik Kemiklere ait Etik Kurul Belgesi

	T.C İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
Sayı : 83045809/ 3510 Konu:	İstanbul/ /	
Sayın Yüksek Lisans Öğr.Fulya Eylem YEDİAY Fen Bilimleri Anabilim Dalı	12 Şubat 2013	
05 Şubat 2013 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunda değerlendirilip onay verilip sorumluluğunuzda yürütülecek olan “Degrede Örneklerde AmpFSTR® Identifiler® MiniFiler™ ve AmpFISTR® SGM Plus™ Sistemlerinin Karşılaştırılması” başlıklı çalışmanızın Bilimsel Araştırma Projesi desteği onay yazısının bir örneğinin kurulumuza iletilmesi gerekmektedir. Bilgilerinizi rica ederim.		
Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı		
Not: Yanıtlarımızda yazımızın gün ve sayısının belirtilmesi rica olunur. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/İSTANBUL. Telefon 0 (212) 414 32 52 Dahili: 22300 Faks: 0(212) 632 00 40 e-posta: cefetik@istanbul.edu.tr.		

EK 18. Arkeolojik Kemikler için İstanbul Arkeoloji Müzesi'nden alınan yurtdışı çıkış belgesi.



T.C.
İSTANBUL VALİLİĞİ
İL KÜLTÜR VE TURİZM MÜDÜRLÜĞÜ
İstanbul Arkeoloji Müzeleri Müdürlüğü

Sayı : 92207046 – 155.11.01 / 2013 - 1014
Konu : Analiz

02 Nisan 2013

İLGİLİ MAKAMA

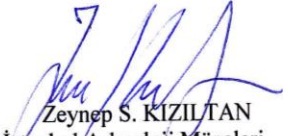
- İLGİ:** a) Bakanlığımız Kültür Varlıkları ve Müzeler Genel Müdürlüğünün 22.08.1994 tarih ve 6080 sayılı yazısı.
b) Bakanlığımız Kültür Varlıkları ve Müzeler Genel Müdürlüğünün 06.11.1995 tarih ve 8544 sayılı yazısı.
c) Bakanlığımız Kültür Varlıkları ve Müzeler Genel Müdürlüğü'nün 28.03.2013 tarih ve 61928 sayılı yazısı ve ekleri.

İlgi (c) yazı ve eklerinde; Van İli, Merkez Yukarıbakraçlı Köyü, Yoncatepe Kalesi ve Nekropolü'nde 2002 yılında yapılan kazılarda ortaya çıkartılan insan iskeletlerinin, kazının bilim kurulu üyesi Prof. Dr. Mehmet Yaşar İŞCAN tarafından incelenmek üzere Van Müzesi Müdürlüğünden gerekli izinlerin alınması sonrasında; İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Laboratuvarına getirildiği, söz konusu kemiklerin, İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programına kayıtlı, Fulya Eylem YEDİAY ve Yasemin DEMİRBAŞ isimli öğrencilerin tez konuları ile ilgili olarak Prof. Dr. Eske WILLERSLEV ile çalışma yapmak üzere ekte listesi verilen 35 adet insan kemiği parçalarının gen analizlerinin yapılması için "Ancient DNA Laboratory, Center for Geo Genetics, Natural History Museum of Denmark, University of Copenhagen, Denmark" Fulya Eylem YEDİAY ve Yasemin DEMİRBAŞ beraberinde Danimarka'ya götürülmek istendiğinin belirtildiği, çalışmanın sonrasında kemik parçalarının, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Laboratuvarına getirileceği belirtilmektedir.

İlgi (c) yazıda dökümü verilen; Yoncatepe Kalesi ve Nekropolü'nde 2002 yılında yapılan kazılarda ortaya çıkartılan, 1 plastik kutu içerisindeki 35 adet zarf içinde bulunan insan kemiklerine ait örnekler Müdürlüğümüz uzmanlarınca açıkta görülerek tek tek incelenmiş ve 2863, 3386 sayılı yasalar kapsamı dışında ilgi (a) ve (b) yazıları kapsamına giren malzeme özelliği taşıdıkları anlaşılmıştır.

Söz konusu örnekler 37x23.5x16cm. ölçülerinde 1 plastik kutu içerisine konulup bağlanarak Müzemiz mührü ile mühürlendikten sonra Danimarka'daki "Ancient DNA Laboratory, Center for Geo Genetics, Natural History Museum of Denmark, University of Copenhagen, Denmark" DNA Laboratuvarı ve Geo Genetik Merkezinde analizlerinin yapılabilmesi için beraberinde götürmek üzere Fulya Eylem YEDİAY ve Yasemin DEMİRBAŞ'a teslim edilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz / rica ederim.


Zeynep S. KIZILTAN
İstanbul Arkeoloji Müzeleri
Müdürü

Eki: 1 Yazı örneği ve ekleri
1 Komisyon Raporu
1 Adet Kapalı Mühürlü Plastik Kutu



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı	FULYA EYLEM
Soyadı	YEDİAY
Doğum Yeri ve Tarihi	ADANA-17.06.1980
E-posta Adresi	feylemy@gmail.com
Cep Telefonu	0 541 822 81 40
İş Adresi ve Telefonu	İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Cerrahpaşa Kampüsü 34303 Fatih İSTANBUL, 0 (212) 414 30 00-22840

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Üniversite	Bölüm	Yıl
Lisans	Çukurova Üniversitesi	Biyoloji Bölümü	2005
Y. Lisans	Çukurova Üniversitesi	Biyoteknoloji A.B.D.	2009
Y. Lisans	İstanbul Üniversitesi	Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri A.B.D.	2011-halen
Doktora	İstanbul Üniversitesi	Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri A.B.D.	2013-halen

STAJ

Humboldt Üniversitesi-Institut für Pflanzenbauwissenschaften, Berlin-Almanya, IAESTE Programı (The International Association for the Exchange of Students for Technical Experience); 2007 (Temmuz-Ağustos).

YURTDIŞI GÖREVLENDİRME

Kopenhag Üniversitesi- Center for GeoGenetics, The Willerslev group. Natural History Museum of Denmark, Kopenhag-Danimarka; 2013 (Mayıs-Haziran).

YABANCI DİL

İNGİLİZCE

BİLİMSEL ÇALIŞMA VE YAYINLAR

Y. Lisans Tez Konusu Ekmeklik Ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinde *1AL.1RS* ve
(Çukurova Üniversitesi) *1BL.1RS* Çavdar Translokasyonları ile Cücelik Genlerinin
2009 Araştırılması

YAYINLAR (SCI)

1. Filoglu G, Bulbul O, Rayimoglu G, **Yediay FE**, Zorlu T, Ongoren S, Altuncul H. Evaluation of reliability on STR typing at leukemic patients used for forensic purposes. **2014**. *Molecular Biology Reports*. 41(6): 3961-3972
2. **Yediay FE**, Andeden EE, Baloch FS, Börner A, Kilian B and Özkan H. The allelic state at the major semi-dwarfing genes in a panel of Turkish bread wheat cultivars and landraces. **2011**. *Plant Genetic Resources*, 9(03):423-429
3. Andeden EE, **Yediay FE**, Baloch FS, Kilian B, Nachit M and Özkan H. Distribution of vernalization and photoperiod genes (*Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3*, *Ppd-D1*) in Turkish bread wheat cultivars and landraces. **2011**. *Cereal Research Communications*, No:39, pg: 352-364
4. **Yediay FE**, Baloch FS, Kilian B, Özkan H. Testing of rye-specific markers located on 1RS chromosome and distribution of *1AL.RS* and *1BL.RS* translocations in Turkish wheat (*Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf.) varieties and landraces. **2010**. *Genetic Resources and Crop Evolution*, No: 57-1, pg: 119-129

PROJELER

Türkiye'de Ticari Olarak Yetiştirilen Ekmeklik Buğday (*T. aestivum ssp. aestivum*) Çeşitlerinde Bazı Önemli Genlerin Allelik Varyasyonu (Burslu öğrenci-TÜBİTAK araştırma projesi: 107O207)

POSTER SUNUMLARI

1. **Yediay FE**; Karatas O; Katoglu A; Bulbul O; Filoglu G; Altuncul H. A polymorphic Study of Mitochondrial Genome Encompassing Position 8389 to 8865. 6th European Academy of Forensic Science Conference. The Hague-Netherlands, **2012**

2. Filoglu G; Rayimoglu G; **Yediay FE**; Bulbul O; Ongoren S; Altuncul H. Genetic Stability of Leukemia Patients with 15 STR Loci. 6th European Academy of Forensic Science Conference. The Hague- Netherlands, **2012**
3. Sipahioglu S; Rayimoglu G; **Yediay FE**; Bulbul O; Filoglu G; Altuncul H. Two DNA Extraction Methods from Blood and Semen Stains Samples Found on Washed Clothes. 6th European Academy of Forensic Science Conference. The Hague- Netherlands, **2012**
4. Altuncul H; **Yediay FE**; Karatas O; Kataoglu A; Bulbul O; Filoglu G. Sequencing Analysis of HV1 and HV2 on the Mitochondrial DNA in Turkish Population. 22nd Congress of the International Academy of Legal Medicine, Istanbul-Turkey, **2012**
5. Bulbul O; **Yediay FE**; Filoglu G; Altuncul H. Heteropaternal Superfecundation: A case report. 22nd Congress of the International Academy of Legal Medicine, Istanbul-Turkey, **2012**
6. Bulbul O; Düvenci A; Tavacı I; Demirbaş Y; Karatas O; **Yediay FE**; Filoglu G; Altuncul H. Optimization of the 8 Mitochondrial SNPs Using Minisequencing Technique. 22nd Congress of the International Academy of Legal Medicine, Istanbul-Turkey, **2012**
7. Orhanel Y; Yukseloglu H; Erkan I; Gul E; **Yediay E**; Yorulmaz C; Ozcan S; Kalfoglu E. Personal Identification From Contaminated Fecal And Urine Materials: A Crime Scene Modelling. 19th IAFS World Meeting. Madeira Island-Portugal, **2011**
8. Oztunc A; Yukseloglu H; Gul E; Erkan I; **Yediay E**; Yorulmaz C; Ozcan S; Kalfoglu E. The Secondary DNA Transfer: Low Copy Number (LCN) DNA Profiling. 19th IAFS World Meeting. Madeira Island- Portugal, **2011**

İŞ DENEYİMLERİ

KURUM ADI	BÖLÜM	TARİH
İstanbul Üniversitesi	Adli Tıp Enstitüsü	2009- halen