

## FARKLI KOŞULLARDA BULUNAN ANTİK İSKELET ÖRNEKLERİNDEN DEKONTAMİNASYON SÜRECİ İLE İLGİLİ METODOLOJİK YAKLAŞIM

Merve İYRAS APAK\*, Yeşim DOĞAN\*\*

Gönderim/Received: 15 Ekim/October 2017  
Kabul/Accepted: 27 Kasım/November 2017

### Öz

*Antik kalıntılardan DNA elde edilebileceğinin anlaşılması antropologların çalışmalarına yeni bir boyut kazandırmıştır. Bu önemli katkıya rağmen antik DNA analizleri, üzerinde çalışılan örneklerin doğası gereği birçok güçlüğü de beraberinde getirir. Bu çalışmalarda en önemli sorun yeterince korunmuş örnekleri seçmek ve bu örneklerden mümkün olan en kaliteli DNA'yı elde etmektir. Antik örnekler DNA eldesinden önce farklı aşamalarda maruz kaldıkları dış kontaminantlardan arındırılmalıdır. Arındırma sürecinin başarısı, alınacak sonuçların güvenilirliği açısından büyük önem taşır. Süreç sonunda alınan her sonuç araştırmacı tarafından kontaminasyon nedeni ile gerçekleşmediği gösterilerek savunulmalıdır. Antik DNA çalışmalarında kullanılan metodolojik yaklaşım bu nedenle büyük önem taşır. Çalışmada Femur ve Talus kemikleri bu metodolojiye uygunlukları açısından kıyaslanmıştır. Korunma düzeyleri farklı olan örnekler DNA eldesi öncesi hazırlık sürecinde farklı uygulamalar gerektirmiştir. Sonuç olarak iki örnek tipinden elde edilen DNA miktarı arasında belirgin bir fark bulunamamış ve örneklerin modern insan DNA'sı kontaminasyonundan arındırılabilirdiği gözlenmiştir.*

**Anahtar Kelimeler:** Antik DNA, dekontaminasyon, DNA ekstraksiyonu, Talus, Femur

\* Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü | merveyiras@gmail.com

\*\* Doç. Dr., Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü | ydalakoc@gmail.com

### ***A Methodological Approach Related to the Decontamination Process from Ancient Skeletal Samples in Different Conditions***

#### ***Abstract***

*Understanding that DNA can be obtained from ancient remains has made valuable contribution to the work of anthropologists. Despite this important contribution, ancient DNA analysis brings many challenges due to the nature of the studied specimens. The most important problem in these studies is to select well-preserved samples and to obtain the best quality DNA possible from these samples. Ancient samples should be purified from external contaminants that they are exposed to at different stages prior to DNA extraction. The success of the purification process is of great importance in terms of the reliability of the results. Results obtained at the end of the process should be defended by researcher showing that they did not take place due to contamination. The methodological approach used in ancient DNA studies is therefore of great importance. In the study, the femur and talus bones were compared in terms of their suitability for this methodology. Samples with different levels of preservation required different applications in the pre-DNA preparation stage. As a result, no significant difference was found between the amount of DNA obtained from the two sample types and it was observed that the samples were successfully purified from modern human DNA contamination.*

**Key Words:** *Ancient DNA, decontamination, DNA extraction, talus, femur*

#### **Giriş**

Anadolu, çok sayıda tarih öncesi medeniyete ev sahipliği yapan tarihi ve biyolojik açıdan çok zengin bir coğrafyadır. Bu bölge antropologlar için değerli bilgiler sağlayan kazı alanları ve antik materyaller ile doludur (Kuhn, 2002). Söz konusu kazı materyallerini inceleyen araştırmacılar ilgili döneme ait toplumların sosyal yapıları, gelenekleri, evrimsel geçmişleri, göçleri, diğer popülasyonlar ile etkileşimleri ve hatta hastalıkları hakkında bilgi sahibi olurlar. Son yıllarda hızla gelişen antik DNA analizleri de, insan ve hayvan kalıntılarından elde edilen değerli bilgilere yeni bir boyut kazandırmış ve bu alanda yeni bir dönemin başlamasına neden olmuştur (Boberova, 2012). Antik DNA analizleri, kullanılan teknikler açısından modern DNA analizlerinden çok farklı olmamasına rağmen modern DNA çalışmalarında uzmanların çoğu zaman öngöremeyeceği çetin bir mücadele gerektirir (Lindahl, 1994; Handt, 1994). Antik DNA analizleri doğalarından kaynaklanan birçok sebepten dolayı kontaminasyona fazlasıyla açıktır ve analiz sürecinde çeşitli önlemler alınması şarttır (Yang, 2005). Bu nedenle bu analizler problemlerle örnekler ile çalışma deneyimi ve standart moleküler genetik çalışmalarından farklı bazı ekipmanlar gerektirir. Üstelik bütün bu

gereklilikler dikkate alındığında bile örneklerin çok azından sonuç alınabilecektir (Handt, 1994). Aslında en büyük engel üzerinde çalışılacak iskelet örneğinin korunma düzeyidir. Her ne kadar bu korunma düzeyine etki eden çok sayıda faktörden bahsedilse de kuşkusuz en önemlisi örneğin içinde bulunduğu koşullar ve bu koşullarda kalma süresidir (Boberova, 2012).

Antik DNA literatürü ağırlıklı olarak kaliteli DNA eldesi ile ilgili protokol oluşturulmasını konu alır. Gerçekleştirilen çalışmalarda farklı koşulların farklı yaklaşımlar gerektirdiği önemle vurgulanmaktadır. Çalışmaların başlangıç noktası öncelikli olarak en korunmuş örneğin seçilmesidir. Yapıları gereği olumsuz koşullara dayanıklılık açısından önemli avantajlara sahip olan diş örnekleri bu nedenle karşımıza sıklıkla çıkar (Malaver, 2003; Meyer, 2000). Diş örneklerinden elde edilen DNA'nın miktarca az olmasına rağmen daha kaliteli olduğunu gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır (Gilbert, 2005; Alakoç, 2009). Ancak dişlerden elde edilen DNA, günümüzde yaygın olarak kullanılan yüksek işlem hacimli moleküler teknikler için miktar olarak yetersizdir. Bu nedenle farklı iskelet bölümlerinden mümkün olan en kaliteli DNA'nın elde edilmesi önemli hedeflerden biri haline gelmiştir. Çalışmalardan elde edilen sonuçların ortak noktası elde edilen DNA'nın kalitesinde iklimsel ve çevresel faktörlerin büyük bir önem taşıdığıdır (Garcia,1996; Cipollaro,1998; Simon,1998; Burger, 1999). Bu nedenle her çalışmada kazı ve örnek spesifik stratejiler geliştirmek zorunlu hale gelmektedir (Von Wurmb-Schwark 2003).

Antik DNA çalışmalarında sık rastlanılan kontaminasyon problemi özellikle insan buluntularından gerçekleştirilen çalışmalarda, modern insan DNA'sı kontaminasyonunun sonuçlara direkt etki etme riski nedeniyle, daha da önem kazanır. Kazılardan elde edilen iskelet parçaları antropologlar tarafından kendi çalışmalarına konu olmak üzere bir seri temizleme ve ölçüm sürecinden geçer. Bu örnekler bu süreçte çok sayıda araştırmacının temasına maruz kalır (Martinez, 2015). Moleküler analiz sürecine hâkim olmayan araştırmacılar kontaminasyonu önlemek için almaları gereken önlemler konusunda da çoğunlukla bilgi sahibi değildir. Bu nedenle antik DNA uzmanlarının DNA eldesi için örneklerin hazırlanması sürecinde ilk aşama olan dekontaminasyona –kontaminantların uzaklaştırılması- ayrıca önem vermeleri gerekir. Dekontaminasyon işlemi farklı şekillerde gerçekleştirilebilir. Örnek seçiminde dekontaminasyonun rahat uygulanabilir olması da önemli bir kriterdir (Yang, 2005).

Antik DNA eldesine yönelik literatürde dişlerden sonra en sıklıkla karşımıza çıkan örnek femurdur (Hanna, 2012). Diğer iskelet bölümleri çevresel koşullar nedeni ile yok olduğunda bile, kuvvetli korteks yapısı

gereği femur varlığını koruyabilmektedir. Femuru güçlü kılan yapısı, örneğin dekontaminasyonunun da kıyasla rahat yapılabilmesini sağlar (Gilbert, 2005; Yang, 2005). Ancak yine aynı nedenden femur örneklerinden DNA eldesi öncesi toz haline getirme aşaması da daha zordur.

Bunun yanında yakın tarihli, kimliklendirme amaçlı gerçekleştirilen toplu gömü çalışmalarında manipülasyonu daha kolay olan talus sıklıkla kullanılan örnekler arasındadır. Talus kemiğinin boyutu onun kazılarda tek parça olarak bulunma olasılığını arttırırken aynı zamanda sahadan laboratuvara transfer sürecini de kolaylaştırır. Fakat femur kadar kuvvetli bir korteks yapısına sahip olmadığından bu örnek dekontamine edilirken daha hassas uygulamalar gerektirmektedir (Gilbert, 2005; Yang, 2005).

Bu bilgiler ışığında farklı tarihlere ait, farklı iklimsel koşullardan elde edilen talus ve femur örneklerinin, ön hazırlık süreçleri ve sonuçta elde edilen DNA verimi açısından kıyaslanması, bundan sonra ülkemizde gerçekleştirilecek antik DNA çalışmaları için bir ön bilgi edinilmesi açısından önemlidir.

## Gereç ve Yöntemler

### *Örnek seçimi*

Çalışmada farklı tarihler ve farklı iklimleri temsil etmesi açısından dört kazı bölgesi seçilmiştir. Kazı alanlarının konumları Resim 1’de, kazı bölgelerinin yeri, tarihi ve iklim koşullarına ait ayrıntılar ise Tablo 1’de verilmiştir.



**Resim 1.** Kazı alanlarının konumları

**Tablo 1.** Belirlenen kazı bölgelerinin yeri, iklim bölgesi ve tarihleri.

Kazı ismi	Yeri	Tarihi	İklim
Parion	Çanakkale	≈1500	Akdeniz iklim kuşağı
Patara	Antalya	≈3250	Akdeniz iklim kuşağı
Seyitömer	Kütahya	≈3000	Karasal iklim kuşağı
Çavlum	Eskişehir	≈3750	Karasal iklim kuşağı

Çalışmada seçilen kazı bölgelerinden elde edilen iskeletlerden, antropologlar tarafından uygulanan yaş ve cinsiyet kriterleri de göz önüne alınarak birey ayrımı gerçekleştirilmiştir. Literatürdeki bilgiyi destekleyecek şekilde ağırlıklı olarak en çok görülen ve en sağlam iskelet parçasının femur olduğu gözlemlenmiş ve çalışmada değerlendirilecek ilk iskelet bölümün femur olmasına karar verilmiştir. Bunun yanında toplu gömülerden kimliklendirme yapan laboratuvarların deneyimlerine göre toz haline getirme kolaylığı ve sonuç alma oranı açısından son günlerde tercih edilen talus kemiği de bu çalışmaya dâhil edilmiştir. Aynı bireye ait hem femur hem de talus örneğinin bulunmadığı durumlarda örnek sayısını tamamlamak adına seçilen birey sayısı artırılmıştır (Tablo 2). Femur ve Talus kemikleri seçilirken mümkün olduğunca bütünlüğü bozulmamış örnekler öncelik verilmiştir (Resim 2).

**Tablo 2.** Kazı alanlarına göre seçilen bireyler ve kemik örnekleri

KAZI İSMİ	YERİ	BİREY#	Birey Yaşı ve Cinsiyeti	Femur	Talus
Çavlum	Eskişehir	M45	38, erkek	+	+
		M35 birey 1	45+, kadın	+	+
		F4 Pithos1 B	44, kadın	+	+
		M20 birey 1	39, erkek	+	+
		M72 birey 1	56, kadın	+	+
Seyitömer	Kütahya	J 1356 birey 1	Genç erişkin, erkek	-	+
		K951	Erişkin, erkek	+	+
		J1467 birey 1	Çocuk, ?	+	+
		K 784 birey 4	Erişkin, kadın	+	+
		O 1657	Çocuk, ?	+	+
		V1660 birey 4	-	+	-
Parion	Çanakkale	SDS 5 1nolu oda mezar	25-28, erkek	+	+
		ÖM 2 tahta kasa 2	25-28, erkek	+	+
		OM 3 Doğu Oda Mezar	28-34, erkek	+	+
		PM 3 pitos mezar nekropol	İleri erişkin, kadın	+	-
		M181	İleri erişkin, erkek	+	-
Patara	Antalya	M47 kasa 62	28, erkek	+	+
		M9 kasa 46, birey 10	47-50, erkek	+	+
		M9 kasa 76 birey 1, kaynak kilise	12-15, çocuk	+	-
		M11 Kasa 16 kaynak kilise	56-70, kadın	+	+
		K57 Kasa 57	56-70, erkek	+	-



**Resim 2.** Çalışma için seçilen örnekler mümkün olduğu kadarıyla bütünlüğünü en iyi koruyanlar arasından seçilmiştir.

### ***Dekontaminasyon***

Toplanma sürecinde çok sayıda bireyin temasına maruz kalan ve uzun süre DNA analizlerinde kullanılacak bir materyal için uygun olmayan koşullarda depolanan örnekler, dış yüzeylerinin kontaminantlardan arındırılması için bir seri temizleme işlemine maruz bırakılmıştır. Örnekten DNA elde edilmesine kadar olan hazırlık aşamalarının modern insan DNA'sı çalışılmamış bir laboratuvarında gerçekleştirilmesi gerektiğinden bu aşamalar adli antropoloji laboratuvarında bu amaç için tasarlanan UV ile steril edilebilir cam kabinlerde gerçekleştirilmiştir.

Dekontaminasyon için Kemp ve Smith (2005) tarafından kullanılan prosedür modifiye edilmiştir. İlk aşamada örnekler %10'luk SDS solüsyonu kullanılarak yıkanmış ve ardından her yüzey 10dk süreyle 20cm mesafeden UV uygulanması ile steril kabinler içerisinde dekontamine edilmiştir (Kemp ve Smith, 2005).

***Kemik örneklerinin toz hale getirilmesi***

Dekontamine edilen örnek DNA eldesi için toz haline getirilmeden önce tek kullanımlık zımparalar kullanılarak dremel aracılığı ile yüzeyi temizlenmiştir. Temizlenen bölge steril dremel uçları yardımıyla toz haline getirilmiştir (Resim 3). Uçlar çalışma öncesi ve sonrasında otoklavlanmıştır.



**Resim 3.** Kemik örneklerinin toz haline getirilmesi

Toz haline getirme işlemi bağımsız bir ortamda bu işlem için tasarlanmış özel kabin içerisinde yapılmıştır. Kabin her işlem sonrasında %10'luk çamaşır suyu ve UV ışık uygulaması ile dekontamine edilmiştir.

***Dekalsifikasyon***

Toz haline getirilen örnekler kalsiyum fazlasının uzaklaştırılması için DNA eldesi öncesi dekalsifikasyon aşamasına tabi tutulur (Prado, 1997; Peter, 2015). Dekalsifikasyon +4 derecede 0.5M EDTA içerisinde çalkalamalı inkübatörde 4 saat bırakılarak gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte 3 aşamada EDTA yenilenecek dekalsifikasyon etkinliği arttırılmıştır. Örnekler 4 saatin sonunda iki kez steril distile su ile yıkanarak DNA eldesi için hazır hale getirilmiştir.

### ***DNA eldesi ve miktar tayini***

Çalışmada DNA eldesi için antik DNA literatüründe en çok kabul gören yöntem olan fenol kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır (Hoff-Olsen, 1999). Dekalsifiye edilen kemik tozu üzerine eklenen 500µl lizis çözeltisi (STE -Sodium-Tris-EDTA, %10 luk SDS, ve Proteinaz K(20 mg/ml), pH:8.0) ile örnek gece boyu 56 °C’de inkübe edilmiştir. Ardından eşit hacim fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1) ile pürifiye edilmiştir. Sonuçta elde edilen pelet 25µl steril distile suda çözülerek miktar tayini aşamasına kadar -20 °C’de saklanmıştır.

Dört farklı kazıya ait örnekler birbirlerinden bağımsız zamanlarda negatif kontrol varlığında çalışılmıştır. Her örnek için eş zamanlı 3 tekrar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA’lar Nanodrop ND-1000 cihazı kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

### ***Amplifikasyon***

Amplifikasyon aşamasında Amelogenin genindeki 126bp ‘lik bölgenin çoğaltılması için sentezlenen primer çifti kullanılmıştır. Reaksiyon 2mM MgCl<sub>2</sub> varlığında 60 °C bağlanma ısısında gerçekleştirilmiştir. Her PCR reaksiyonunda negatif ve pozitif kontroller kullanılmıştır.

### ***Bulgular***

Dört kazı bölgesinden elde edilen iskelet materyalleri, kazıda buldukları lokasyon, yaş ve cinsiyet özellikleri değerlendirilerek bireyler halinde ayrılmıştır. Bu ayırmadan sonra femur örneklerinin sayıca diğer iskelet parçalarından fazla olduğu göz önünde bulundurularak ve aynı bireylere ait talus kemiklerinin de bulunması hedeflenerek çalışmada değerlendirilecek bireyler seçilmiştir. Ancak örneklerin korunum düzeyleri farklı olduğundan femur kemiği sayısı kadar talus kemiği bulunamamıştır (Tablo 3). Beş femur ve talus sayısına ulaşabilmek adına Seyitömer kazısında 6 birey çalışmaya dahil edilmiş ancak Patara ve Parion kazısında Talus sayısı sınırlı olduğundan birey sayısının artırılmasında bir kazanım olmadığı anlaşılmıştır.

**Tablo 3.** Kazılara göre bulunan femur / talus sayısı

Kazı Alanı	Birey Sayısı	DNA analizi yapılan iskelet bölümleri
Çavlum	5	5 femur, 5 talus
Seyitömer	6	5 femur, 5 talus
Parion	5	5 femur, 3 talus
Patara	5	5 femur, 3 talus



Örnekler öncelikle DNA analizlerine uygunlukları açısından morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Mümkün olduğunca bütünlüklerini koruyan örneklerin seçilmesi yoluna gidilmiştir. Ancak karasal iklim bölgesinden çıkartılan örneklerin (özellikle Çavlum) diğer örneklerle göre daha kırılğan olduğu ve hassasiyet gerektirdiği gözlenmiştir.

Her bireye ait belirlenen kemik örnekleri 3 tekrarlı olarak izole edilmiştir. İzole edilen DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları Tablo 4'te görülmektedir.

Örneklerin üç tekrarlı izolasyonları içerisinde en iyi absorbans değerlerine sahip olanlara öncelik verilerek amplifikasyon gerçekleştirilmiş, pozitif kontrol örneklerinde 126bp'lik ampikonun başarılı olarak amplifiye olmasına rağmen örneklerimiz ve negatif kontrollerde amplifikasyon sonucu gözlenmemiştir.

**Tablo 4.** Örneklerden elde edilen DNA'ların nanodrop sonuçları

KAZI İSMİ	YERİ	BİREY #	KAZI YAŞI	FEMUR		TALUS	
				ng/ul	260/280	ng/ul	260/280
Çavlum	Eskişehir	M45	≈3750	98,0	1,67	40,3	1,65
				125,9	1,69	280,1	1,49
		104,5		1,75	983,8	1,45	
		56,1		1,69	73,4	1,59	
		M35		85,78	1,7	171,2	1,46
				15,25	1,73	523,5	1,38
		F4 pitos 1B		96,4	1,62	217,6	1,5
				218,9	1,7	199,3	1,54
				199,6	1,57	178,7	1,56
				150,8	1,69	960,6	1,45
		M20		126,5	1,67	1691,1	1,46
				97,4	1,66	389,6	1,45
				88,3	1,54	450,7	1,56
				35,6	1,55	462,7	1,45
Seyitömer	Kütahya	K951	≈3000	149,3	1,61	262,0	1,5
				75,2	1,56	208,5	1,57
		51,7		1,53	243,7	1,53	
		74,5		1,57	189,4	1,58	
		J1467		67,7	1,44	166,94	1,67
				57,2	1,6	178,9	1,74
		O1657		77,9	1,54	73,5	1,6
				54,8	1,52	220,8	1,58
				33,24	1,56	269,3	1,56
				82,01	1,51	138,0	1,57
		K784		48,1	1,53	253,8	1,63
				58,8	1,58	181,0	1,73
		V1660		65,7	1,54	202,0	1,68
				42,1	2,62	-	-
93,7	1,66		-	-			
294,3	1,08		-	-			
J1356	-	-	204,2	1,59			
	-	-	198,2	1,56			
	-	-	314,3	1,54			
	-	-	-	-			

**Tablo 4.** Örneklerden elde edilen DNA'ların nanodrop sonuçları (devamı)

Parion	Çanakkale	SDS 5.1	≈1500	105,5	1,57	154,0	1,71
				133,6	1,59	177,4	1,66
				139,3	1,46	368,7	1,49
		ÖM 2		97,4	1,57	130,8	1,46
				142,6	1,48	345,3	1,59
				158,0	1,47	295,0	1,65
		OM 3		171,8	1,5	318,3	1,55
				170,6	1,53	383,0	1,47
				192,4	1,51	178,5	1,55
		PM 3		120,8	1,4	-	-
				152,1	1,5	-	-
				152,5	1,55	-	-
				121,5	1,54	-	-
		M181		181,2	1,52	-	-
126,1	1,54		-	-			
Patara	Antalya	M47	≈3250	70,1	1,51	89,1	1,53
				11,3	1,76	82,7	1,6
				74,9	1,66	59,1	1,62
		M 9		26,22	1,42	113,4	1,54
				115,3	1,56	91,1	1,55
				27,8	1,61	66,3	1,61
		M9 B1		99,1	1,51	-	-
				94,1	1,5	-	-
				84,8	1,53	-	-
		M11		60,4	1,62	-	-
				73,9	1,57	-	-
				152,7	1,67	-	-
		K57		24,2	1,53	425,8	1,36
				52,7	1,49	418,5	1,37
120,8	1,48		369,1	1,39			

### Tartışma

Antik DNA analizleri tarihi toplumlar hakkında geçmişte hayal dahi edemediğimiz bilgiler sağlayarak antropolojide yeni bir dönemin başlamasını sağlamıştır. Ancak bu alanda örneklerin DNA analizleri için uygun kalitede ve miktarda olmamasından kaynaklanan birçok zorluk yaşanmaktadır. Örneğin, birçok antik materyalde mevcut tekniklerle saptanabilecek endojen DNA bulunmaz. Avrupa'da farklı yüksekliklerden elde edilen 24 Neandertal kalıntısı üzerinde gerçekleştirilen çalışmalarda bunların sadece 4 tanesinin Neandertal DNA'sı içerdiği tespit edilmiştir (Paabo, 2004). Ancak aynı örneklerden çağdaş insan DNA'sı amplifiye edebilecek primerler kullanılarak deneme yapıldığında sonuç alınmıştır. Bu da antik DNA çalışmalarındaki önemli bir sorunun modern DNA kontaminasyonu olduğunu göstermektedir. Bu sorun ile başa çıkmak için iki yaklaşım önemlidir. Birincisi laboratuvar kontaminasyonun önlenmesidir. Bunun en iyi yolu da antik örnekler için ayrılmış bağımsız bir laboratuvar da bu çalışmaların gerçekleştirilmesidir. İkincisi de DNA'nın güvenilirliğini

gösteren bir seri kriterin uygulanmasıdır. Bu kriterler arasında örneklerin dış kontaminantlardan temizlenmesi için uygulanması gereken dekontaminasyon süreci de yer alır (Paabo, 2004; Yang, 2005).

Çalışmamızda DNA eldesine kadar olan örnek hazırlığı aşamaları herhangi bir DNA çalışması yapılmamış, adli antropolojik incelemeler için hazırlanmış boş bir odada gerçekleştirilmiştir. Oda tamamen bu sürece ayrılmış olmasına rağmen özel havalandırma koşulları uygulanmadığından örneklerin hazırlanma sürecinde kontrol edilebilir steril alan yaratmak amacı ile tasarlanmış, UV ile dekontamine edilebilen cam kabinler kullanılmıştır.

Örneklerin dekontaminasyonu için tercih edilecek protokol, hangi iskelet parçalarının kullanıldığına ve bu örneklerin korunma düzeylerine göre farklılık gösterir. Literatürde yaygın olarak fiziksel uzaklaştırma ile dekontaminasyon ve kimyasal ile dekontaminasyon olmak üzere iki tip uygulama vardır (Watt, 2005). Çalışmamızda her iki yöntem de ardışık olarak uygulanmıştır. Öncelikle örneklerin dış yüzeyleri %0,1'lik SDS çözeltisi ile yıkanmıştır. SDS, DNA eldesi aşamasında lizis çözeltisi içinde de yer alan ve DNA'ya zarar vermediği bilinen bir deterjandır. Örneklerin endojen DNA'larına zarar vermemek için ön temizleme aşaması olarak tercih edilmiştir. Dekontaminasyonda yaygın olarak kullanılan çamaşır suyu, iyi korunmamış örneklerde içeri nüfuz edip, endojen DNA'ya zarar verme riski nedeniyle tercih edilmemiştir (Yang, 2005). SDS ile yıkanan örnekler daha sonra UV uygulaması gerçekleştirilecek cam kabinler içerisinde her yüzey 10dk, 20cm mesafeden UV ışınması ile dekontamine edilmiştir. Literatürde doğru süreler ve doğru mesafe tercih edildiği takdirde UV uygulamasının örneklere zarar vermediğini gösteren çok sayıda çalışma vardır (Watt, 2005; Yang, 2005; Martinez, 2015). Bu aşamalardan geçen örnekler ardından toz haline getirilmeden bir kez de fiziksel yöntemlerle dekontamine edilmiştir. Bu aşamada herhangi bir kazıma yöntemi kullanılabilir (Watt, 2005). Çalışmamızda örneklerin toz haline getirilmesi amacı ile kullanılacak olan dremel, bu amaç için de kullanılmıştır. Dremel'e takılan tek kullanımlık zımpara uçları ile örneğin elde edileceği alan dış yüzeyinden arındırılmıştır.

Antik DNA çalışmalarında ilk aşama morfolojik özellikleri de göz önüne alınarak DNA eldesine en uygun olabilecek örneklerin seçilmesidir. İklimsel ve dönemsel farklılıkları nedeni ile seçilen 4 kazı bölgesinden elde edilen insan iskelet kalıntıları incelendiğinde, ağırlıklı olarak en fazla bulunan örneğin femur olduğu gözlenmiştir. Femur, insan iskeleti içerisindeki en uzun, kütlece en ağır ve yapısal olarak en güçlü kemik olduğu için bu durum şaşırtıcı değildir (White, 2012). Ayrıca antik DNA çalışmalarının önemli bir kısmında da yoğunluk ve kalın korteks yapısı

gereği en çok tercih edilen kemikler arasında yer almaktadır (Hanna, 2012; Damgaard, 2015). Yine felaket kurbanlarının kimliklendirildiği, toplu ölüm olgularında da femur iskeletinin kimliklendirme ve DNA analizleri için önerildiği görülmektedir (Prinz, 2007). Çalışmamızda da bu nedenle metodoloji açısından değerlendirilecek örneklerden birisinin femur olmasına karar verilmiştir. İkinci örneğimiz olan talusun seçilmesinde de göz önünde bulundurulan kriter, küçük olması nedeniyle bütün olarak ele geçirilme olasılığı yüksek iskelet parçalarından birisi olması, yakın tarihli kimliklendirme çalışmalarında tercih edilen bir örnek olması ve yine boyutları nedeni ile sahadan laboratuvara transfere uygun olmasıdır. Yapısal özellikleri ve dolayısıyla fiziksel korunma düzeyleri farklı olan bu iki örnek dekontaminasyon verimliliğinin kıyaslanması açısından önemli bilgiler verebilecekleri düşünülerek de tercih edilmiştir. Literatürde yoğunluğu, transfer kolaylığı ve DNA verimi açısından en iyi örnekler arasında gösterilen petrous kemiği, kazılardan elde ettiğimiz örnekler arasında yeterli sayıda bulunmadığı için bu çalışmaya dâhil edilememiştir (Gamba, 2014). Yine güçlü yapısı nedeniyle kazılarda sıklıkla karşımıza çıkan diş örnekleri de, kaliteli DNA elde edilebildikleri halde günümüz moleküler çalışmaları için miktar olarak yeterli DNA elde edilemediği bilindiğinden çalışmanın dışında tutulmuştur (Alakoç, 2009; Rohland, 1994).

Antropologlar tarafından gerçekleştirilen ön çalışma ile kazılardan elde edilen insan iskelet kalıntıları bireyler olarak ayrılıp, yaş ve cinsiyetleri de belirlenerek isimlendirilmiştir. Bu bireyler arasında femur ve talus kemikleri bulunan 5'er birey seçilmeye çalışılmıştır. Ancak Seyitömer kazısında femur kemiği bulunmayan tek örnek dışında, seçilen tüm bireylerin femur kemiği bulunduğu halde 21 bireyden 5 tanesinin talus kemiği bulunmamıştır. Bu durumda femurun kalın korteksinin onu süreçte koruduğunu söylemek mümkündür. Örnek seçiminin rastgele yapılmamasının nedeni örnek yaşı ve cinsiyetinin korunum düzeyine etki ediyor olabileceğini söyleyen çalışmalardır (Gamba, 2012). Örneklerin aynı bireylerden seçilmesi kemik yaşı ve cinsiyet faktörleri devreye girmeksizin iki iskelet bölümünün dekontamine edilebilirlik ve DNA verimi açısından kıyaslanmasına olanak vermiştir.

Femur örneklerinin kuvvetli korteks yapısına rağmen genelde daha zayıf yapıdaki femur başı bölgelerinden hasara uğradığı görülmüştür. Bu nedenle femurlardan örnek alınırken sert ve dayanıklı gövde bölümü tercih edilmiştir. Her ne kadar farklı yıllara ait, farklı çevresel koşullara sahip kazılardan elde edilen örnekler farklı dayanıklılıklarda olsa da femur gövdesi kuvvetli yapısı gereği her 4 kazıda da talus örneklerine göre daha zor toz haline getirilmiştir.

Talus örnekleri küçük yapıları gereği genelde tek parça halinde bulunmuştur. Gözenekli yapısı bu örneklerle dekontaminasyon uygulanırken hassas davranılmasını gerektirmiştir. Örnekler DNA eldesi için toz haline getirilirken de femur örneklerinde yaşanan zorluklar yaşanmamıştır. Boyutları nedeni ile kolay depolanan ve transfer edilen talus örneklerinin kolaylıkla toz haline getirilebilmesi, yakın tarihli kazılardaki kimliklendirme olgularında neden tercih edildiklerini de açıklamaktadır.

Farklı iskelet bölümlerinin DNA'yı koruma düzeyleri açısından farklılık gösterdiğini söyleyen çalışmaların yanında, DNA veriminin iklimsel farklılıklar, depolama süre ve koşulları ve toprak yapısından da etkilendiğini söyleyen çalışmalar vardır (Hagelberg, 1991; Hummel, 2003). Çalışmamızda yer verdiğimiz kazılar için bu bağlamda bir toprak incelemesi yapılmamıştır. Ancak kazıların tarihleri, bölgeleri ve kazıdan elde edilen örneklerin depolanma süreleri bilinmektedir. Çavlum kazısı  $\approx 3750$  yıl ile en eski döneme tarihlendirilmiş olan örnekleri içerir. Bu örnekler ayrıca 15 yıl ile en uzun depolama sürelerine de sahiptir. Kemik örneklerinin uzun bekleme süreleri içinde organik/inorganik yapılarında meydana gelen oransal farklılık nedeni ile dayanıklılıklarını kaybettikleri ve kırılgan hale geldikleri bilinmektedir (Brothwell, 1981). Ön hazırlık olarak yapılan çalışmalarda Çavlum örneklerinin en kırılgan ve manipülasyonu en zor örnekler olduğu da görülmüştür. Toprak analizleri yapılmamış olduğu için bu kırılganlıkta ayrıca toprak içeriğinin etkisi olduğunu anlamak mümkün olmamıştır. Ancak elde edilen DNA'nın miktar ve kalitesi ile modern DNA kontaminantlarının uzaklaştırılması açısından Çavlum örneklerinin diğer kazı örneklerinden önemli bir farkı olmadığı görülmektedir.

Çalışmaya dâhil edilen örnekler arasında kemik bütünlüğü en iyi korunanlar Parion (Çanakkale) kazısındaki örneklerdir. Bu kazı  $\approx 1500$  yıl öncesine tarihlendirilmiştir. Bu açıdan en yakın tarihli örnekleri içerir. Ayrıca Parion kazısının örneklerinin depolama süreleri de 10 yıldan daha kısadır. Bunun yanında antropologların kazı materyali ile çalışma öncesi gerçekleştirdikleri yıkama işlemi bu örneklerle uygulanmamış, örnekler çalışma öncesi suyla temas edilmeksizin temizlenmişlerdir. Bu farklılıkların nem oranı yüksek Akdeniz İklimine rağmen örneklerin daha iyi korunmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

Örneklerden elde edilen DNA'nın miktar ve saflık düzeylerinin anlaşılması için spektrofotometrik analiz yapılmıştır. 260nm'de gerçekleşen absorbans DNA miktarını gösterirken, 260/280nm'deki absorbans oranı ise DNA'nın saflığı ile ilgili bilgi verir. Saf bir DNA örneğinin 260/280nm oranı 1.8-2.2 arasında olmalıdır. Aynı bireye ait femur ve talus örneklerinde

safılık açısından kayda değer bir fark bulunmamış ve aynı örneklerin 3'lü tekrarlarında tutarlılık olduğu görülmüştür. Bu da ekstraksiyon yönteminin doğru uygulandığını göstermektedir. Elde edilen DNA miktarı açısından aynı bireyin femur ve talusu kıyaslandığında örneklerin önemli bir kısmında talus'dan daha çok miktarda DNA elde edildiği göze çarpmaktadır. İlk bakışta kuvvetli yapısı gereği femurun DNA verimi açısından daha yüksek sonuçlar vermesi beklendiği için bu sonuç şaşırtıcı olsa da, ön hazırlık aşamasındaki farklılıklar ve kemiklerin yapısal farklılıklarının yanıltıcı etki göstermiş olabileceği düşünülmektedir. Dremel yardımı ile toz haline getirme işlemi ısınmaya ve dolayısıyla örneğin zarar görmesine neden olabilecek bir süreçtir. Örnek ne kadar uzun sürede toz haline getirildi ise bu zararlı sürece o kadar uzun süre maruz kalmış olması gerekir. Her ne kadar kısa süreli temaslarla ısınma engellenmeye çalışılsa da femur örneklerinin toz haline getirilmesi talus örneklerine göre daha uzun sürmüş ve bu olumsuzluktan daha çok etkilenmiş olabilirler. İkinci ihtimal de talusun gözenekli yapısı ile ilgilidir. Her ne kadar bir seri dekontaminasyon işlemi ile örnekler temizlenmiş olsa da, talusun gözenekli yapısı muhtemel bakteriyal kontaminasyonların temizlenmesini engellemiş olabilir. Nanodropta çıkan yüksek DNA konsantrasyonlarının bir nedeninin de bu bakteri DNA'larının varlığı olabileceği düşünülmektedir.

DNA molekülü canlıda hücre içi mekanizmalarla korunur. Hücre canlılığını yitirdiğinde DNA üzerindeki koruma kalkar ve DNA hasarı meydana gelir. Geçen zaman ve koşullar bu hasarın derecesinde etkilidir. Hasar tipleri farklı olmakla birlikte en etkili olanı DNA'nın küçük parçalara ayrılmasıdır. Degradasyon olarak adlandırdığımız bu süreç nedeni ile antik örneklerden elde edilen DNA molekülünün PCR ile çoğaltılabilmesi güçtür. Bu nedenle antik DNA çalışmalarında temel olarak 200bp üzerindeki amplifikasyonlar modern DNA kontaminasyonu olarak görülmektedir (Ricaud, 2005). Buzul ve kehribar örneklerinde daha uzun antik DNA fragmentleri görülmüştür, ancak bunlar koruma düzeyleri standartın üzerinde antik örneklerdir. Çalışmamızda örneklerin amplifikasyonunda 126bp'lik amelogenin bölgesi tercih edilmiştir. Örneklerimizin hiçbiri bu boyutta fragment için pozitif amplifikasyon sonucu vermemiştir. Bu da örneklerin daha küçük fragmentlere degrade olduğunu ve modern DNA kontaminantlarından arındırılabilirdiğini göstermektedir. Degradasyon derecesini belirleyebilmek için daha küçük ampliconlarla amplifikasyonları denemeye devam etmek gerekir. Alakoç (2009) tarafından antik diş örnekleri ile gerçekleştirilen çalışmada da 60 örnekten sadece bir tanesi 125bp'lik faktör V Leiden geni için pozitif sonuç vermiştir.

## Sonuç ve Öneriler

Bir ön çalışma olarak kabul edilebilecek bu araştırmanın ardından ek bir bütçe ile farklı fragment boylarında yeni amplifikasyon denemeleri yapılması, var olan DNA'nın bir kısmının bakteriyal DNA olma olasılığına karşı bakteri genomuna yönelik denemeler yapılması, olumsuz koşullarda kalan örneklerde daha iyi sonuç verdiği bilinen mitokondriyal DNA genomuna yönelik amplifikasyon denemeleri yapılması elde edilen sonuçları daha tartışılabilir kılacaktır.

## KAYNAKLAR

- Alakoc, Y. D. ve Aka, P. S. (2009). "Orthograde entrance technique to recover DNA from ancient teeth preserving the physical structure", *Forensic Sci Int*, 188(1-3): 96-8.
- Boberova K., Drozdova E. ve Pizova K. (2012). "Application of Molecular Genetic Methods in Antropological and Paleodemographic Studies of Fragmentary and Damaged Skeletal Material from Resque Excavations", *Journal of Life Science*, 6, 961-969
- Gilbert, M. T., Bandelt H. J., Hofreiter M. ve Bernas I. (2005). "Assessing ancient DNA studies", *Trends Ecol Evol*, 20(10), 541-4
- Brothwell DR. (1981) *Digging up Bones*. Cornell University Press, ss. 18-21.
- Burger J., Hummel S., Herrmann B. ve Henke W. (1999). "DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains", *Electrophoresis*, 20, 1722-1728.
- Cipollaro M., Bernardo G., Galano G., Galderisi U., Guarino F., Angelini F. ve Cascino A. (1998). "Ancient DNA in human bone remains from Pompeii Archeological Site", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247, 901-904.
- Rizzi, E., Lari, M., Gigli, E., de Bellis, G. ve Caramelli, D. (2012). "Ancient DNA studies: new perspectives on old samples", *Genetics Selection Evolution*, 44(1), 21.
- Hagelberg E., Clegg J. B. (1991). "Isolation and characterization of DNA from archaeological bone", *Proc Biol Sci.*, 244(1309), 45-50.
- Handt, O., Hoss M. ve Pääbo S. (1994). "Ancient DNA: methodological challenges", *Experientia*, 50(6), 524-529
- Hanna, J., Bouwman, A.S., Brown, K.A., Parker Pearson, M. ve Brown, T. A. (2012). "Ancient DNA typing shows that a Bronze Age mummy is a composite of different skeletons", *Journal of Archaeological Science*, 39(8), 2774-2779

- Hoff-Olsen P., Mevag B., Staalstrom E., Hovde B., Egeland T. ve Olaisen B. (1999). "Extraction of DNA from decomposed human tissue: An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing", *Forensic Science International*, 105, 171-183.
- Hummel S. (2003). *Ancient DNA typing: methods, strategies and applications*. Springer-Verlag, Berlin.
- Gamba, C., Jones, E. R., Teasdale, M. D., McLaughlin, R. L., Gonzalez-Fortes, G., Mattiangeli, V., ... , Pinhasi, R. (2014). "Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory", *Nature Communications*, 5(5257), 1-9.
- Gamba, C, Fernández, E., Tirado, M., Deguilloux, M. F., Pemonge, M. H., Utrilla, P., ... , Arroyo-Pardo, E. (2012). "Ancient DNA from an Early Neolithic Iberian population supports a pioneer colonization by first farmers", *Molecular Ecology*, 21(1), 45-56.
- Garcia A. A., Munoz, I., Pestoni, C., Lareu, M. V., Rodriguez Calvo, M. S., Carracedo, A. (1996). "Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp", *International Journal of Legal Medicine*, 109(3), 125-159.
- Gilbert, M. T., Bandelt H. J., Hofreiter M. ve Bernas I. (2005). "Assessing ancient DNA studies", *Trends Ecol Evol*, 20(10), 541-544.
- Kemp B. M. ve Smith D. G. (2005). "Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth", *Forensic Science International*, 154, 53-61.
- Kuhn, S. L. (2002). "Paleolithic Archeology in Turkey" *Evolutionary Anthropology*, 11, 198-210.
- Lindahl, T. (1993). "Recovery of antediluvian DNA", *Nature*, 365(6448), 700.
- Malaver, P. C. ve Yunis J. J. (2003). "Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases", *Croat Med J.*, 44(3), 306-309.
- Martinez S. M. (2015). *Ancient DNA: A multifunctional Tool for Resolving Anthropological Questions*, Doktora Tezi, Universitat Autònoma de Barcelona, ss. 33-42.
- Meyer, E., Wiese, M., Bruchhaus, H., Claussen, M. ve Klein, A. (2000). "Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains", *Forensic Science International*, 113, 87-90.
- Damgaard, P. B., Margaryan, A., Schroeder, H., Orlando, L., Willerslev, E. ve Allentoft, M. E. (2015). "Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth", *Scientific Reports*, 5(11184), 1-12.
- Rohland, N., ve Hofreiter, M. (2007). "Ancient DNA extraction from bones and teeth", *Nat Protoc.*, 2(7), 1756-1762.



- Prado, V. F., Castro, A. K. F., Oliveria, C. L., Souza, K. T. ve Pena S. D. J. (1997). "Extraction of DNA from human skeletal remains: practical applications in forensic sciences", *Genetic Analysis: Biomolecular engineering*, 14, 41-44.
- Prinz, M., Carracedo, A., Mayr, W. R., Morling, N., Parsons, T. J, Sajantila, A., Scheithauer, R., Schmitter, H. ve Schneider, P. M. (2007). "DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI)", *Forensic Science International: Genetics*, 1, 3-12.
- Simon, M. (1998). *Archeology of Human Bones*. Routledge UK, London, ss. 42-206.
- Paabo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., ... , Hofreiter, M. (2004). "Genetic Analyses from Ancient DNA", *Annu. Rev. Genet.*, 38, 645-679.
- Von Wurmb-Schwark, N., Harbeck, M., Wiesbrock, U., Schroeder, I., Ritz-Timme, S. ve Oehmichen, M. (2003). "Extraction and amplification of nuclear and mitochondrial DNA from ancient and artificially aged bones", *Leg Med (Tokyo)*, 5(Suppl 1), S169-72.
- Watt, K. E. (2005). *Decontamination techniques in ancient DNA analysis*. Yüksek Lisans Tezi, Simon Fraser University, ss. 12-25.
- White, T. D., Black, M. T. ve Folkens, P. A. (2012). *Human Osteology, Third Edition*. Elsevier Academic Press, ss. 241-252.
- Yang, D. Y ve Watt, K. (2005). "Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis", *Journal of Archaeological Science*, 32, 331-336.

