

ANTROPOLOJİK KEMİK ÖRNEKLERİNDEN ANTİK DNA ÇALIŞMALARI

Evrım TEKELİ*, Cüneyt ELMA**

Gönderim/Received: 13 Ekim/Oct. 2016

Kabul/Accepted: 14 Kasım/Nov. 2016

Öz

Anadolu, çok sayıda prehistorik medeniyete ev sahipliği yapan tarihi ve biyolojik açıdan çok zengin bir coğrafyadır. Bu coğrafyanın dört bir yanı arkeologlar ve antropologlar için değerli bilgiler sağlayan kazı alanları ve antik materyaller ile doludur. Yapılan kazılardan çıkarılan çeşitli materyaller arkeologlar için geçmişin aydınlatılması için önemli olurken, antropologlar için de kazıdan çıkarılan iskelet örnekleri üzerinde yapılan morfolojik çalışmalar, merak edilen birçok soruyu cevaplamaktadır. Genetik teknolojinin ilerlemesi ve antropolojinin diğer bilim dalları ile koordineli çalışması sonucunda antik DNA çalışmaları ve buna bağlı olarak moleküler antropoloji ortaya çıkmıştır. Antik DNA ile geçmiş zamandan günümüze türlerin birbiri ile ilişkileri, evrimsel gelişimleri, bireylerin ve popülasyonların göç yolları gibi birçok antropolojik bilgiler sağlanabilir. Antik örneklerde DNA'nın çok az miktarda olması, örneğin tarihi ve içinde bulunduğu şartlara göre değişen derecelerde degrade olması ayrıca kontaminasyon riskinin yüksek olmasından dolayı sonuç elde edilmesi oldukça zor olan bu örnekler dikkatli ve zahmetli bir çalışma gerektirir. Antik DNA çalışmalarında kazı alanından başlayarak laboratuvar analizleri ile sonuçlanan çalışmalarda uygulanacak prosedürler ve alınması gereken önlemler başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinde geçmişe ait merak edilen sorular cevaplanmış olacaktır.

Anahtar Kelimeler: antik DNA, antropoloji, moleküler antropoloji, kontaminasyon

* Ankara Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Paleoantropoloji Anabilim Dalı |
tevrin@gmail.com

** Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı

Ancient DNA Studies from Anthropological Bone Samples

Abstract

Anatolia is very rich geography which has received many pre-historic civilisations historically and biological. Excavation sites and antique materials which provide valuable information for archeologists and anthropologists around all sides of this geography. While various materials which have been taken out of the excavations have been significant to illuminate the past, morphological studies on skeleton samples which have been taken from the excavations have replied many concerned questions for anthropologists. Ancient DNA studies and accordingly molecular anthropology have occurred as a result of the development in the genetic technology and the coordinated studies with other sciences of anthropology. Many anthropological information can be gotten from aDNA as the relations between species from past to the day, their evolutionary developments, individuals and populations' migratory routes. These samples which are very difficult to be concluded due to very little DNA in ancient samples, for example, their degradation at varying degrees by history and its conditions, and furthermore, the high contamination risk require careful and hard studies. When procedures that will be applied in the studies which have been concluded from the excavation sites to laboratory analyses in ancient DNA studies and precautions to be taken are successfully done, the concerned questions belonging to past will have been replied.

Keywords: *ancient DNA, anthropology, molecular anthropology, contamination*

Giriş

İnsanlar her zaman kökenleri hakkında bilgi sahibi olmak istemişlerdir. Geçmişten günümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda insan popülasyonlarının kökeni hakkında çeşitli kanıtlar elde edilmiştir. Günümüzde moleküler antropolojinin ve DNA analiz tekniklerinin ilerlemesi sonucu daha fazla bilgi edinme imkânı doğmuştur. DNA çalışmalarından elde edilen genetik bilgi kişilerin ataları hakkında biyolojik veriler elde etmemize, eski popülasyonlar ile ilgili hipotezler geliştirmemize yardımcı olmaktadır.

Uzun yıllar öncesine ait olan, biyolojik örneklerden elde edilen DNA “geçmişte kalan”, “geçmişe ait” anlamına gelen “ancient” ifadesi kullanılmaktadır (Hummel, 2003). Türkçe kaynaklarda da aDNA için “eski” anlamında kullanılan ‘antik DNA’ kelimesi kullanılmıştır (Gökçümen, 2004, Güral, 2007). Antik DNA, binlerce yıllık arkeolojik kazılar sonucu

ortaya çıkarılan biyoarkeolojik örneklerde çok az miktarda bulunan DNA'dan çalışma imkânı sunar. Antik DNA çalışmaları günümüzden yaklaşık olarak 32 yıl önce başlamıştır. Literatürlere geçen ilk çalışma 1984 yılında yapılmıştır, bu çalışmada soyu tükenmiş olan bir quaggadan (zebranın alt türü) mitokondriyal DNA dizileri çıkarılmıştır. Daha sonra 1985 yılında Mısır'da bir müzede bulunan yaklaşık 2400 yıllık bir insana ait mumyadan nükleer DNA dizilimi elde edilmiştir. Genetik alanındaki teknolojilerin ilerlemesi ve farklı bilim dallarının bir araya gelmesi ile aDNA'nın araştırma alanı genişlemiştir (Pääbo, 1985).

Antik DNA Çalışmalarının Kullanım Alanları

Antik DNA çalışmalarında kullanılan moleküler teknikler ile eski iskelet kalıntılarındaki arkeolojik, paleontolojik ve antropolojik sorular cevaplanabilmekte böylece atalarımız hakkında daha fazla bilgi edinilmektedir. Bununla birlikte hayvan ve bitki DNA'ları ile yapılan çalışmalar sayesinde geçmişten günümüze yaşayan canlı türleri ve türler arası ilişkiler belirlenebilmekte bu sayede evrim çalışmalarına katkı sağlamaktadır. İnsan DNA'sı bazı kişisel genetik karakterleri içerir ve bu genetik kodlarda geçmişte yaşamış olan atalarımız ile aramızdaki soy bağıını bulmamıza yardımcı olmaktadır. aDNA çalışmaları ile geçmişten günümüze kadar uzanan bu genetik kodlar ve kod gurupları belirlenebilmektedir. Antik DNA çalışmaları, populasyonlar arasındaki genetik farklılıkların ve gen akışının izlenmesinde, filogenetik ağacın oluşturulmasında ve dünyada zaman ile değişen diğer demografik süreçlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Singh ve Garg, 2014).

Cinsiyet Belirleme

DNA kromozom çiftlerinden oluşur ve cinsiyet belirleyici olan X ve Y kromozomlarıdır. Cinsiyeti babadan alınacak X veya Y kromozomu belirler. Adli antropoloji alanı, kimliklendirmeye dayalı çalışmaları kapsadığı için cinsiyet belirleme önemli bir rol oynamaktadır. İskeletler üzerinde antropologlar tarafından yapılan morfolojik inceleme ile cinsiyet tespiti yapmak mümkündür, ancak iskeletin bozulmuş, parçalanmış veya çürümüş olduğu durumlarda cinsiyetin belirlenmesi zor olup, kesin bir tespit yapılamamaktadır. Bu durumda iskelet kalıntıları ile yapılacak olan DNA çalışmaları önemli olmaktadır (Stone, 2008). Antik DNA çalışmalarında da göç yollarının belirlenmesi başta olmak üzere genetik hastalıklarda ve eski

toplumların yaşamış olduğu coğrafik bölgede oluşan varyasyonların belirlenmesi için öncelikle iskeletlerin cinsiyetlerinin belirlenmesi gerekir (Tekeli vd., 2015).

Göç Yollarının belirlenmesi

Kemik ve diş gibi iskelet kalıntılarından DNA'nın ortaya çıkartılması ile insanların tarihsel evrimi ve genetiği ortaya çıktığı gibi eski insanların göç yolları da belirlenebilmektedir. Göç yollarının belirlenmesinde haplogruplar kullanılır. Mitokondriyal DNA ve Y kromozomunda yüzlerce hatta binlerce kuşak sonrasında zararsız olan mutasyonlar oluşabilir. Mutasyonlar sonrasında oluşan genetik işaretler bireyin geçmişe ait ataları ile arasındaki genetik bağı belirler. Bireylerin soyunu devam ettirmesi ile bu genetik işaretler kuşaktan kuşağa aktarılır ve göç ederek gittikleri popülasyonlarda haplogruplar ile izlenilen yol belirlenebilir (Singh ve Garg, 2014). DNA haplogrupları, Mitokondriyal DNA haplogrubu ve Y kromozomu haplogrubu olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Y kromozomu sadece erkeklerde bulunduğundan babadan oğula geçmektedir. Y kromozomu üzerinde nadir gerçekleşen mutasyonlar ile bir erkeğin hangi haplogruba ait olduğu ve baba soyunun izi belirlenebilecektir. Anne tarafından olan soy ağacını ve göç izini belirlemek içinde mitokondriyal DNA'da oluşan mutasyonlar sonucunda ortaya çıkan haplogrupları incelemek gerekir (Gültekin ve Gökçümen, 2009). Anadolu'nun kültürel ve genetik çeşitliliğine ışık tutmak amacı ile Gökçümen ve arkadaşları (2011) tarafından, Y kromozomu, mitokondriyal DNA ve otozomal DNA çalışması yapılmıştır. Anadolu'nun Yüksek yerleşim bölgesinin dört farklı yerleşim yerinde (Göçmenköy, Doğuköy, Merkez ve Eskiköy) yaşayan 140 insandan ve Kızılyer'de yaşayan 30 insandan toplanan kan örnekleri çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda dört farklı yerleşim merkezinde baba soyundan gelen genetik çeşitlilik farklılık gösterirken, anne soyundan gelen genetik çeşitliliğin daha homojen şekilde yayıldığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, insanlarda ki yerel ve dini kimliklerin genetik çeşitliliğin farklı şekilde yayılmasında önemli bir faktör olduğunu vurgulamışlardır (Gokcumen vd., 2011).

Hastalıkların belirlenmesi

İskeletler üzerinde yapılan morfolojik çalışmalar ve aDNA çalışmaları ile geçmişte yaşamış insanlarda var olan hastalığa neden olan mikroorganizmaların tespiti yapılabilir. Kalıtsal olarak geçen hastalıkların,

genetik delesyonlar ile oluşan çiçek hastalığı ve veba gibi tarih öncesinde ölüm nedeni olan hastalıkların belirlenmesinde önemli olmaktadır. Bazı bulaşıcı hastalıklar insan iskeletleri üzerinde benzer şekilde iz bırakır ve bu hastalıkların birbirinden ayırt edilmesi zor olur. Bu aşamada iskelet üzerinde iz bırakan hastalığa yönelik yapılacak DNA çalışmaları ile geçmişte yaşamış olan insanların ölümüne neden olan hastalık veya popülasyonların kalıtsal hastalıkları belirlenebilir. İskeleler üzerinde morfolojik olarak patojen izi gösteren *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Yersinia pestis* bakterilerinin varlığı aDNA analizleri ile de desteklenmiştir (Salo vd., 1994). Yapılan bir başka çalışmada yaklaşık 5000 yıllık bir Mısır mumyasından tüberküloz ve difteri hastalığına neden olan *Mycobacterium tuberculosis* ve *Corynebacterium diphtheriae* bakterilerine ait DNA'lar elde edilmiştir (Marchant, 2011).

Kimyasal bazı etkenlere sürekli maruz kalan insanların mitokondriyal DNA'larında hasarlar (mutasyonlar) meydana gelmektedir. Antik iskelet kalıntılarında bu mutasyonların tespit edilmesi ile kişilerin ne gibi zararlı kimyasal etkenlere maruz kaldıkları buna bağlı olarak meslekleri ve kültürleri hakkında bilgi edinilebilmektedir.

Evrin ve Filogenetik Araştırmalar

İnsan genetik çeşitliliği ile popülasyonlardaki türler arası genetik yakınlıklar ve tarih boyunca gelişimleri için önemli veriler sağlamaktadır. Moleküler antropolojinin ortaya çıkması ve genetik teknolojinin ilerlemesiyle birlikte, popülasyonlar arasındaki ata-torun ilişkisi, filogenetik bağın tekrardan ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır. Kazılar sonucunda ortaya çıkarılan iskeletlerin antropologlar tarafından morfolojik olarak incelenmesi ve moleküler biyologlar tarafından da DNA analizlerinin yapılması ve arkeolojik buluntuların da incelenerek, hepsinin birbiri ile örtüşmesiyle insan evrimine dair bilinmeyenler aydınlatılmaktadır.

Hayvan ve Bitkilerin Tarihsel Gelişimi

Hayvan ve bitki DNA'ları ile bunların eski zamanlardan günümüze evrimsel gelişimi, bitkilerin ve evcilleşmiş hayvanların tür kökenleri hakkında önemli veriler sağlamaktadır. aDNA verileri bitki ve hayvan popülasyonlarının zaman içinde oluşan genetik çeşitliliğinin değişiminde, coğrafik olarak popülasyon çeşitliliği ve filogenetik ilişkilerinin belirlenmesinde, yok olmuş olan türlerin geçmişi hakkında bilgi vermektedir. Van-Yoncatepe Kalesi'nden çıkartılan, 2500 yıllık keçi kemikleri ile yapılan bir çalışmada

17 kemik örneği kullanılmıştır ve bunlardan 9 tanesinden başarılı bir şekilde DNA elde edilmiştir. Araştırmacılar, örneklerin bu kadar eski olması ve DNA'nın günümüze kadar korunmuş olmasını bölgenin coğrafik konumu ve iklim etkisi ile bağlantılı olduğu görüşündedir (Akış, 2014). Arkeozooloji alanında Dağtaş (2013) antik DNA çalışması yapmıştır. Yapılan bu çalışmada Kilis Oylum Höyüğü'nden ve Niğde Tepe Çiftliği'nden çıkarılan koyunlara ait mandibula ve metapodya kemiklerinde mitokondriyal DNA çalışılmıştır. Elde edilen mitokondriyal DNA'lardan haplogrupları belirlenerek koyun evcilleştirme merkezinin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde özellikle Kilis'te baskın olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile koyunların evrimsel tarihinin aydınlatılmıştır (Dağtaş, 2013).

Kültür Olarak Etkisi

İnsanların avcılık ve beslenme alışkanlıklarını belirlemede, çeşitli türleri evcilleştirilmesinde, tarih öncesi hastalıklarının izini bulmada ve insan davranışlarını anlamada aDNA çalışmaları kullanılmaktadır. İnsan iskelet kalıntılarından aDNA çalışmaları ile elde edilen moleküler veriler geçmişte yaşamış insanların sosyal statülerini, evlilik modellerini, ölü gömme şekillerini, cinsiyete göre ölüm ve hastalık şekillerini belirlemede kullanılabilir (Singh ve Garg, 2014).

Beslenme Şeklinin Belirlenmesi

Geçmişte yaşamış hayvanlara ait buluntuları günümüzde bulmak zor olduğundan dolayı onlara ait koprolit (fosilleşmiş dışkı) gibi kalıntıları aDNA analizlerinde kullanmak mümkün olmaktadır. Koprolitler, hem bitkisel hem de hayvansal besin kalıntılarını içerdiği için geçmişte yaşamış olan insanların beslenme şekilleri koprolitlerden elde edilen mitokondriyal ve kloroplast genomlarında yapılacak olan DNA analizleri ile belirlenebilir (Chobe vd., 1997). Türkiye'de başta Çatalhöyük olmak üzere Anadolu'nun diğer kazılarında çıkartılan kömürleşmiş buğday tohumlarından Bilgiç ve arkadaşları (2016) tarafından DNA dizisi çıkartılarak günümüz buğday türleri ile karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar, antik buğday tohumlarının altı kromozomlu (hekzaploid) olduğu ve günümüzdeki ekmek buğdayına (*Triticum aestivum*) veya kabuksuz buğdaya (*Triticum spelta*) benzediği sonucunu elde etmişlerdir. Yapılan bu çalışma, Orta Anadolu Bölgesi'nin buğdayın evcilleştirilmesinde önemli bir bölge olduğunu ortaya koymuştur (Bilgiç vd., 2016).

Antik DNA Kaynağı Olarak Kullanılan Biyoarkeolojik Örnekler

Arkeolojik kazılardan elde edilen çeşitli biyoarkeolojik materyaller aDNA çalışmaları için kullanılmaktadır. Genellikle kemik, diş, kurumuş yumuşak doku, saç, koprolit ve bitki kalıntıları aDNA çalışmalarında materyal olarak kullanılmaktadır (Pääbo vd., 2004; Rizzi vd., 2012). Antik DNA çalışmalarında, kemik ve diş gibi insan iskelet buluntularının genetik materyal olarak değerleri giderek artmakta ve bundan dolayı en çok kullanılan biyoarkeolojik örnekler olmaktadır (Pääbo vd., 2004; Adler vd., 2011). İnsan kaynaklı yapılan aDNA çalışmalarında yumuşak doku da kullanılmaktadır, 1985 yılında Pääbo, M.Ö. 2300 yıllık 23 Mısır mumyası üzerinde sol alt bacağına ait kurumuş yumuşak dokudan örnek olarak DNA analizi yapmıştır (Pääbo, 1985). Ölüm sonrası yumuşak doku örnekleri mikroorganizmalar tarafından yok edilirler, ancak kuru ve sıcak ortamlarda bulunan cesetlerde meydana gelen mumyalaşmadan dolayı oluşan kurumuş doku örnekleri mikroorganizmaların yaşaması için uygun ısı ve nem olmadığından uzun yıllar bozulmadan kalabilir bu nedenle yumuşak doku örnekleri önemli bir DNA kaynağıdır.

Kemikler ve dişler sert yapılarından dolayı dış etkenlere karşı korunaklı olduklarından içerdikleri DNA'yı uzun yıllar bozulmadan muhafaza edebilirler dolayısı ile kemikler ve dişler önemli aDNA kaynaklarıdır. (Hagelberg ve Cleg, 1991; Higgins ve Austin, 2013).

Dişler insan vücudunun en sert yapısı olduğu için nem, yüksek ısı ve mikrobiyal olaylar gibi çevre koşullarına dayanıklı olmasından dolayı DNA analizlerinde kullanılmaktadır (Daskalaki, 2004; Higgins ve Austin, 2013). DNA dişin pulpasındaki çekirdekli hücrelerde ve dişin dentin tabakasındaki mitokondrilerde bulunur. Dişin sert ve dayanıklı mine tabakası DNA'yı dış etkilere karşı korumakta degradasyon ve kontaminasyon riskini en aza indirmektedir ancak, DNA'dan yoksundur. Bu yüzden diş örneği çalışılacağı zaman mine dokusu ile diğer diş dokuları karıştırılırsa minenin içerdiği kalsiyum ve fazla miktarda mineralden dolayı DNA ekstraksiyonu ve PZR amplifikasyonunu engelleyebilir. Dişteki en zengin DNA pulpada bulunmaktadır, ancak yaşa bağlı olarak veya hastalıklı dişlerde pulpa kalitesi farklı olabilir (Higgins ve Austin, 2013).

Kemikteki DNA'nın varlığı ve miktarı lokasyona bağlı olarak farklılık göstermesine rağmen femur, humerus ve mandibula gibi sert kemikler de iyi korunmaktadır (Pääbo vd., 2004, Rizzi vd., 2012).

Süngerimsi kemikler, sert kemiklere göre daha fazla DNA içermektedir, ancak gözenekli yapılarından dolayı kontaminasyon riski vardır (Parsons ve Weedn, 1996; O'Rourke vd., 1996) Antik DNA çalışmalarının başlıca sorunu olan kontaminasyon riskinden dolayı da süngerimsi dokuların aDNA çalışmalarında kullanılması çok uygun değildir.

Antik DNA'nın Elde Edilmesini Kısıtlayan Sorunlar

Antik DNA çalışmalarında karşılaşılan sorunlar kontaminasyon, degradasyon ve PZR inhibitörleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sorunlar genelde analizlerden sonuç alınamamasına ve dikkat edilmezse yanlış sonuç alınmasına neden olmaktadır. Bunun için laboratuvar koşullarının ve çalışan uzmanın bilgi ve tecrübesinin yeterli olması gerekmektedir.

1. Kontaminasyon

Kontaminasyon sadece aDNA çalışmalarında değil, modern DNA çalışmalarında da sorun olmaktadır. aDNA çalışmalarında kullanılan örnekler çok eski olduğundan hem DNA degradasyona uğradığı için hem de örneklerde ki DNA miktarı çok az olduğu için çalışmalar sırasında modern DNA'dan kontamine olma olasılığı oldukça yüksektir (Yang ve Watt, 2005).

Kontaminasyon direk temas ya da dolaylı yoldan gerçekleşebilir. Kontaminasyonun analizi etkilemesi için aynı türe ait DNA'ların kontamine olması gerekir. Farklı türlere ait canlıların DNA'ları birbirini kontamine etmezler. Bunun nedeni PZR aşamasında DNA üzerinde insana özgü gen bölgelerinin kullanılmasıdır. İnsan kalıntıları ile yapılan çalışmalarda ortaya çıkabilecek kontaminasyonlar gene insan kaynaklıdır. Bu kontaminasyonlar genellikle sahada çalışan kazı ekibi, incelemeyi yapan antropologlar veya DNA analizinin yapıldığı laboratuvardan kaynaklı olabilir. Bu durumda antik DNA çalışmalarındaki kontaminasyon kaynaklarını üç kısımda inceleyebiliriz.

1.1. Kazı İşlemleri sırasında oluşan kontaminasyon

Kazıyı yapan ekip veya arkeologlar tarafından kazı sırasında el ile temastan dolayı kontaminasyon olabilir. Bunun için aDNA çalışılacağı biliniyorsa mutlaka eldiven, maske ve bone kullanılmalıdır. Kazıdan çıkarılan iskeletlere ait alınan örnekler ayrı ayrı paketlenmelidir. Paketleme işlemi

yapılırken kuru ve temiz paket kâğıtları ile yapılmalı nem oluşmaması için örnekler kağıt ambalajlarda saklanmalıdır. Antik DNA çalışmalarının yapılacağından önceden biliniyor olması kazı işlemleri sırasında önemlidir, çünkü oluşabilecek kontaminasyon riskini en aza indirmek için çalışmaların en başından önlem alınması gereklidir.

1.2. Antropolojik İncelemeler sırasında oluşan kontaminasyon

Antik DNA çalışması antropologlar tarafından biliniyor ise ve kazıdan çıkarılan örnekler üzerinde antropolojik çalışmalar yapılacak ise bu aşamada kontaminasyon riskini düşünerek aDNA çalışmalarına öncelik vermek gerekir. Çünkü iskelet ve antropolog arasında el ile çok fazla temas olacağı için kontaminasyon oluşabilir ve yapılması gereken işlemlerde mutlaka eldiven ve maske kullanılmalıdır. Laboratuvara getirilmeden önce yapılacak olan morfolojik incelemeler için kemikler fırça ile temizlenebilir, ancak kesinlikle yıkama yapılmamalıdır.

1.3. Laboratuvar ortamı kaynaklı kontaminasyon

Sadece aDNA çalışmaları değil, laboratuvarda yapılacak bütün çalışmalarda kontaminasyon riski vardır ve özellikle laboratuvar aşamasında çok dikkat edilmelidir. Laboratuvarın yapısı, çalışma koşulları ve personelin dikkati kontaminasyon riskinin derecesini belirler. Öncelikle laboratuvar rutin olarak başka analizlere bakıyorsa, kemik örneklerinin çalışılacağı ortamın ayrı tutulması gerekmektedir. Analizin her aşaması için birbirinden farklı ve temiz ortamlar sağlanmalı ayrıca steril malzeme kullanılmasına özen gösterilmelidir. Örneklerin birbirini kontamine etmemesi için her bir örnekten sonra çalışma ortamının ve kullanılan ekipmanın temizlenip steril edilmesi gerekir. Laboratuvar personelinin her aşamada önlük, eldiven, maske ve bone kullanması ayrıca eldivenlerin sık sık değiştirilmesi gerekir. Kullanılacak malzeme, ekipman, kimyasallar ve solüsyonların kontamine olmamasına ve sürekli steril edilmelerine özen gösterilmelidir. Kemik örneklerinin temizliği ve çalışma sırasında olan tozlar kontaminasyona neden olacağı için DNA analizleri yapılan alanlarda kemik örneklerinin fiziksel temizliği yapılmamalıdır. Laboratuvar personelinin ve kazıyı yapan ekibin DNA'larının da alınması, kontaminasyonun belirlenmesi ve bunun hangi aşamada oluştuğunun bulunmasında kolaylık sağlayacaktır.

2. Degredasyon

Antik DNA çalışmalarında DNA'da çevresel faktörlerin oluşturduğu DNA hasarı (degredasyon) ve buna bağlı olarak uzun yıllar boyu meydana gelen DNA miktarının azalması karşılaşılan önemli bir sorundur. Örneklerin karşılaştığı çevresel olumsuzlukların şiddetine ve süresine göre DNA hasarı çoğalabilir ve analizlerde sonuç alınacak kalitede DNA elde edilemeyebilir. DNA'nın hasar görmesine neden olan sebepler;

Isı

DNA'nın korunmasındaki en önemli faktörlerden biri sıcaklıktır (Daskalaki, 2004). Düşük sıcaklıkta kimyasal reaksiyonlar ve mikrobiyal faaliyetler yavaşlar. Yapılan araştırmalarda düşük ısıda kemik apatitinin çözünürlüğünün azaldığı görülmüştür (Nielsen-Marsh ve Hedges, 2008). Serin ve soğuk iklimlerde yapılan kazılardan çıkarılan kemik örneklerinden elde edilen aDNA örnekleri sıcak iklimlerde bulunan kemik örneklerinden elde edilen aDNA örneklerine göre daha iyi sonuçlar vermektedir (Bollongino vd., 2008). Örneklerin kazıdan çıkarıldıktan sonra sıcaklığı düşük ortamlarda muhafaza edilmesi DNA'nın korunmasını sağlamaktadır (Hardy vd, 1995). Diş örnekleri kemiklere göre daha sert ve korunaklı yapıları nedeniyle yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır ve ısı farkından kolay etkilenmezler.

Nem

Antik DNA çalışmalarında sorun oluşturan DNA degradasyonu için temel problemlerden biri nemdir. Su, DNA'daki hidrolitik ve oksidatif hasarların oluşmasına neden olur. Ayrıca özellikle kemiğin su altında yıkanması antik DNA çalışmaları için kesinlikle yapılmaması gereken bir işlemdir, çünkü süngerimsi doku gibi gözenekli yapılarda oluşacak nem mikroorganizmaların üremesine ortam sağlayacak bu da kontaminasyona ve DNA hasarına neden olacaktır (Daskalaki, 2004; Yang ve Watt, 2005; Bollongino, 2008; Kirsanow ve Burger, 2012).

Toprak ve pH

Antik DNA çalışmalarında kullanılan örnekler, yapılan arkeolojik ve antropolojik kazılardan çıkarıldığı için iskeletler çoğunlukla toprak ile temas

halindedir. Toprak yapısı yani alkali veya asidik olması ile ölçülen pH değeri DNA'nın korunması açısından önemlidir. Toprağın asidik olması DNA'ya zarar verirken, hafif alkali ortamlar DNA'nın korunması açısından uygun olmaktadır. Diş ve kemiğin yapısında bulunan hidroksiapatit asidik çözücülerde çözüldüğü için toprağın asidik olması yapılacak olan aDNA çalışmalarını olumsuz etkilemektedir (Burger, 1999).

Mikroorganizmalar

Uygun sıcaklık, nem ve pH ortamlarında mikroorganizmaların çoğalması hızlanacak ve kemik dokusuna daha fazla zarar verecektir. Düşük sıcaklıklar ve nemli olmayan kuru ortamlar mikroorganizmaların faaliyetlerini yavaşlattığı için kazıdan çıkarılan örneklerin düşük sıcaklık ve serin ortamda muhafaza edilmesi gerekir.

Fiziksel hasarlar

DNA analizi için kemikler morfolojik olarak incelenmelidir ve iyi korunmuş kortikal kemikler seçilmelidir. Lezyonlu kemikler oluşabilecek kontaminasyon riskinden dolayı tercih edilmemelidir. Ayrıca gözle görülebilen çatlak ve kırık olan kemikler seçilmemelidir (Resim 1). Topraktan gelebilecek mikroorganizmalar bu çatlaklardan kemiğin korunaklı iç katmanlarına ulaşarak degradasyona ve kontaminasyona neden olabilir. Buna göre Morfolojik olarak iyi durumda olmayan veya patolojik bulguları olan kemikler DNA analizi için seçilmemelidir.



Resim 1. Laboratuvarımızda incelenen hasarlı kemiklerden üzerinde çatlaklar bulunan femur ile parçalanmış tibia örnekleri

3. PZR inhibitörleri

Ortamda bulunan kimyasalların yeterince uzaklaştırılamaması PZR'ı inhibe eder. Bunun için örneklerin DNA izolasyonundan önce iyi temizlenmesi gerekir. Kemikte yoğun olarak bulunan başta kalsiyum iyonlarının dekalsifikasyonla uzaklaştırılması önemlidir. DNA izolasyonunu yönteminin iyi seçilerek ve dikkatli uygulanarak DNA saflığının sağlanması gerekirse kolon purifikasyonu ile saflığın artırılması seçilebilir.

Antik DNA Çalışmasında Laboratuvarda Uygulanan Protokoller

Kazılardan çıkarılan iskelet kalıntıları laboratuvara getirildiği zaman sırasıyla uygulanması gereken bazı basamaklar vardır. Öncelikle kemiklerin dış yüzeylerinin temizlenmesi, kesit alınarak öğütülüp toz haline getirilmesi gerekir.

Fiziksel Temizlik

Laboratuvara getirilen kemik örneklerinin öncelikle dış yüzeyinin temizlenmesi gereklidir. Kemiğin dış yüzeyine yapışmış bulunan toprak ve diğer partiküllerin iyice temizlenmesi gerekir. Bu aşamada kesinlikle yıkama yapılmaması gerekir. Çünkü su kemik dokusuna hidrolitik zarar verebileceği gibi DNA'nın bozunmasına neden olacaktır. Bu temizlik aşamasında oluşacak tozlar ortamda kontaminasyon riskini artıracığı için bu aşama laboratuvar dışında ya da özel bir odada yapılmalıdır.

Kimyasal Temizlik

Örnekler üzerindeki topraklar ve yabancı partiküller uzaklaştırıldıktan sonra kontaminasyon etkilerinden arındırmak için kimyasal temizlik aşamasına geçilir (Resim 2). Bu aşamada kemik yüzeyinde bulunan kontaminantların uzaklaştırılması için çeşitli dezenfektanlar (Sodyum dodesil sülfat, sodyum hipoklorit) kullanılabilir. Kullanılacak olan kimyasal madde sulandırılarak kemik veya dişin dış yüzeyi fırça yardımıyla temizlenir. Kontaminasyon riskinin bu aşamada da oluşmaması için kullanılacak malzemeler her bir örnekte ayrı ayrı hazırlanarak kullanılmalıdır. Örneklerin kimyasal temizliği bittikten sonra ultraviyole ışığı altında kısa süreli sterilize edilebilir.



Resim 2. Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda kemik örneklerinin temizlenmesi

Kesit alınması ve Pulverizasyon

Temizlik aşaması biten örneklerin DNA izolasyonunun yapılabilmesi için toz haline getirilmesi (pulverizasyon) gerekir (Resim 3). Bunun için kemik örneğinden kesitler alınması gerekir. El frezesesi yardımıyla kemik yüzeyinden iç kısma doğru kazılarak toz kemik elde edilebilir. Bu durumda oluşacak ısı DNA'ya zarar vermesi söz konusudur ve riskli bir yöntemdir. Demir testeresi ile alınan kesitlerin porselen havanda ezilerek toz haline getirilmesi DNA'ya zarar vermeden uygulanacak bir yöntemdir. Bunun için geliştirilmiş otomatik havan sistemleri de mevcuttur. Kemik örneklerinin bütünlüğünün bozulmaması gereken durumlarda el frezesi yardımıyla kemiği bölmeden alınacak kesitler kullanılabilir.



Resim 3. Laboratuvarımızda yapılan çalışmalardan kemik örneklerinden kesit alınması ve pulverizasyon işlemi

Antik DNA çalışmasında materyal olarak dış kullanılacak ise, daha sonra ki yapılacak olan antropolojik çalışmalar da göz önünde

bulundurularak dişin tamamını toz haline getirmemek gerekir. Dişte pulpaya doğrudan ulaşmak uygun bir yöntemdir ve bunun için farklı yöntemler kullanılabilir. Diş ortadan ikiye parçalanabilir, ancak dişin ortadan parçalanması morfolojik olarak diş zarar vereceği için bu yöntem tavsiye edilmemektedir. Dişin morfolojisine zarar vermeden uygulanacak kanal veya ters kanal yöntemi ile pulpa elde edilebilir (Cobby, 2002; Doğan Alakoç, 2007).

Dekalsifikasyon

Kemik ve dişte kalsiyum iyonlarının birikmesi ile oluşan hidroksiapatit tuzu kemik ve dişin en önemli inorganik kısmını oluşturmaktadır. Kemik ve dişte bulunan DNA'nın varlığı kollajen proteinin korunması ile doğru orantılı, hidroksiapatit kristalin birikmesi ile ters orantılıdır (Özcan, 2010). Toz haline getirilen kemik ve diş örneklerindeki birikmiş olan yoğun kalsiyum iyonu DNA elde etmeyi zorlaştıracak ve pcr inhibitörü olarak etki edecektir. Bunun için kalsiyumun uzaklaştırılması gereklidir. Bu aşamada kalsiyumu uzaklaştırmak için şelatlayıcı olarak EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit) kullanılmaktadır. EDTA kalsiyum iyonlarını tutar ve DNA'nın ortaya çıkmasına yardımcı olur (Loreilla vd., 2007). Dekalsifikasyonun uzatılması aDNA çalışmalarında bazen DNA kaybına yol açmaktadır özellikle antik kemik örneklerinde buna dikkat etmek gerekir.

DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için laboratuarda ayrı bir oda ayrılmalıdır, sağlanabiliyorsa steril oda olması daha uygun olacaktır. Kullanılacak olan malzemelerin tek kullanımlık ve steril olması gerekir. Rutin olarak başka DNA örneklerinin çalışıldığı bir laboratuvar ise kontaminasyon riskine karşı kullanılan çözeltilerin ayrı olarak hazırlanması gerekir. Dekalsifikasyonu tamamlanan örneklerle çeşitli DNA izolasyon yöntemleri uygulanabilir. Fenol kloroform izolasyon yöntemi, silika metodu kullanılarak yapılan izolasyon yöntemi (Hagelberg ve Clegg, 1991; Höss ve Pääbo, 1993) ve ticari kit'ler ile yapılan izolasyon yöntemleri genel olarak kullanılan metodlardır. Antik DNA çalışmalarında saf ve kaliteli DNA'ya ulaşmak modern DNA'ya göre daha zordur çünkü aDNA genelde az miktarda bulunur ve kısmen ya da tamamen degrade olmuş durumdadır. Bunun için aynı örnekten farklı DNA

izolasyonları yapılarak karşılaştırma yapılabilir. Kullanılan yöntemlere çeşitli manipülasyonlar yapılarak yeterli miktar ve kalitede DNA elde edilebilir.

DNA'nın Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi

Elde edilen DNA'nın saflığını ve kalitesini belirlemek için genelde spektrofotometre kullanılmaktadır. Bunun için Absorbans değeri (A) (260 /280) ve A(260 /230) değerlerine bakılarak ölçüm yapılmaktadır. Burada 260 nm nükleik asitlerin, 280 nm proteinlerin ve 230 nm fenolün maximum absorbans değerini ölçmektedir. Yapılacak ölçüme göre DNA izolasyonunun başarısı ve DNA miktarının saflığı ve kalitesi belirlenir.

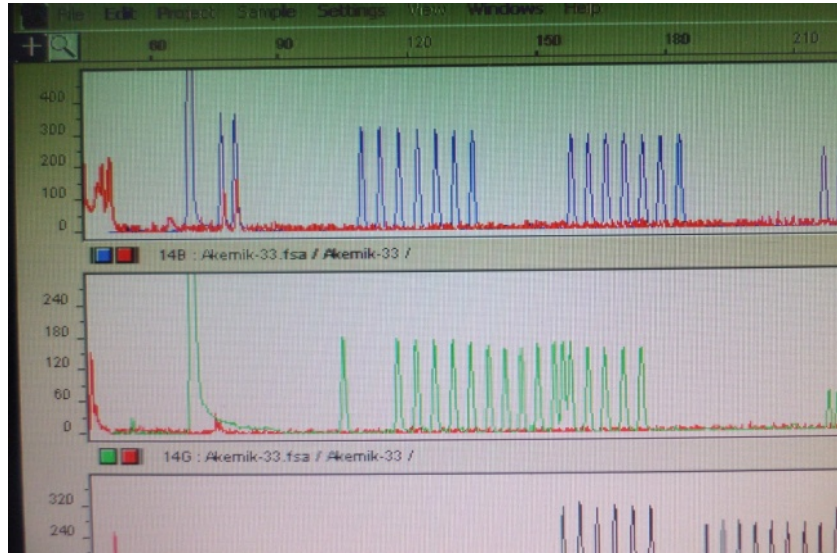
Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PZR yöntemi ile çok az miktardaki DNA örneklerinden bile milyarlarca kopya çıkartılarak sonuç alınabilme imkanı vardır. Bu avantaj kontaminasyona dikkat edilmezse dezavantaja dönüşebilir çünkü az miktardaki aDNA iyi durumdaki modern DNA ile kontamine olduğunda rekabet şansı olmaz (Yang ve Watt, 2005).

Antik DNA analizlerinde genelde degradasyon olduğu için tüm genomun veya profilin sonuç vermesi beklenmez. En uygun şartlarda bile aDNA örneklerinde 200bp'den daha uzun gen bölgelerinden sonuç alınması zordur (Burger vd., 1999). Antik DNA çalışmalarında genelde cinsiyet belirlemede kullanılan 106- 112 bp'lik amelogenin bölgesi gibi kısa bölgeler analiz edilir. Mitokondriyal DNA daha küçük bir genoma sahip olması, yapısal avantajı ve hücrede binlerce kopyasının olması nedeniyle aDNA çalışmalarında sonuç alma oranı çekirdek DNA'sına göre çok daha yüksektir. DNA miktarının çok az olması nedeniyle PZR'daki döngü sayısını artırmak iyi sonuçlar alınmasını sağlar. DNA örneklerinde PZR inhibitörlerinin bulunma riski yüksektir. Örneğe bulaşan kimyasalların miktarının fazla olması veya iyi temizlenememeleri, dekalsifikasyonun yeterli olmaması gibi durumlarda risk fazladır. DNA izolasyonundan sonra uygulanacak kolon pürifikasyonu yöntemi ile kısmen uzaklaştırılrsa da uygulanan her ek işlemin DNA miktar kaybına neden olabileceği de unutulmamalıdır. PZR çalışmalarında pozitif ve negatif kontrol örneklerinin kullanılması sonuçların değerlendirilmesi açısından önemlidir.

Elektroforez

PZR ürünleri elektroforez yöntemi ile görüntülenerek değerlendirilir. Agar jel elektroforezi ucuz bir yöntem olsa da hassasiyetinin düşük olması nedeniyle zayıf DNA örneklerinde sonuçların görüntülenmesinde yeterli olmayabilir. Kapiller kolonlu otomatik genetik analiz cihazlarında hassasiyetlerinin yüksek olması ve kontaminasyon riskinin daha az olması nedeniyle daha verimli sonuçlar alınmaktadır (Resim 4).



Resim 4. Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda elde edile aDNA'nın, cinsiyet belirleyen amelogenin bölgesinin kapiller kolonlu genetik analiz cihazındaki görüntüsü

Elektroforez sonrasında sonuçlar değerlendirilirken kontaminasyon kaynaklı pozitifliğin gözden kaçırılarak yanlış değerlendirilmesi, zayıf sonuçların iyi değerlendirilememesi gibi riskler göz ardı edilmemelidir.

Sonuç

Tarih boyunca birçok medeniyete ve kavime evsahipliği yapmış olan ve göç yolları üzerinde önemli bir köprü olan Anadolu'da bulunan zengin antropolojik buluntuların moleküler açıdan değerlendirilmesinin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Moleküler çalışmaların masraflı olması bir dezavantaj olmakla birlikte tecrübesiz ve yetersiz laboratuvarlarda yapılan çalışmalar

önemli veri kayıplarına neden olmaktadır. Oluşturulacak tecrübeli ve yeterli yapıya sahip moleküler antropoloji laboratuvarlarında örneklerin incelenmesi ve elde edilen verilerin bilgi ağında paylaşılmasının önemi büyüktür. Ülkemizde bu alana daha fazla maddi kaynak ayrılmasına ve moleküler antropoloji alanında yetişecek moleküler biyologlara ihtiyaç vardır. Arkeolog ve antropologların DNA çalışmaları konusunda daha fazla bilgilendirilmeleri örneklerin laboratuvara daha hasarsız ve kontaminasyonsuz ulaşması açısından önemlidir.

Sonuç olarak, aDNA'daki miktarın azlığı, kontaminasyon ve degradasyon nedeniyle aDNA çalışmaları oldukça zahmetli ve dikkatli uygulanan analiz sürecini kapsamaktadır. Yapılacak küçük hatalar bile sonuçları olumsuz etkileyeceği için her aşamada oldukça tedbirli çalışmak gereklidir. Mümkünse her örnekten farklı izolasyonlar ve PZR'ler deneyerek sonuçlar teyit edilmelidir. Antropoloji alanında yapılan çalışmalara genetik yaklaşımla yani moleküler düzeyde bakılıp değerlendirildiğinde kazılardan elde edilen en ufak kalıntıdan bile çok ayrıntılı bilgi elde edilebilir. Böylece fen bilimlerinin verileriyle, arkeolojik kazılardan çıkarılan bireylerden antropologlar tarafından yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilerin birleştirilmesiyle birçok soru işaretini cevaplamak mümkün olacaktır.

KAYNAKÇA

- Akış, I. (2014) “Antik DNA Çalışmaları ve Türkiye”, *Journal of Cell and Molecular Biology* 12(1&2), 1-9, Haliç University.
- Bilgic, H., Hakkı, E.E., Pandey, A., Khan, M.K. ve Akkaya, M.S. (2016), “Ancient DNA from 8400 Year- Old Çatalhöyük Wheat: Implications for the Origin of Neolithic Agriculture”, *PLoS one* 11, E0151974
- Bollongino, R. ve Vigne, J.D. (2008) “Temperature monitoring in archaeological animal bone samples in the Near East arid area, before, during and after excavation”, *J. Archaeol. Sci.* 34 (4), 873–881.
- Chobe, L.P., Chadha, M.S., Banerjee, K. ve Arankalle, V.A. (1997) “Detection of HEV RNA in faeces, by RT-PCR during the epidemics of Hepatitis E in India (1976-1995)”, *J. Viral Hepat.* 4(2), 129-133.
- Dağtaş Diltas, N., (2013) *Kısa bir antik DNA bölgesi ve bu bölgenin Güneydoğu Anadolu'daki koyunların mitokondriyal DNA haplogrupların belirlenmesinde kullanımı*, Yüksek Lisans Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Ankara

- Daskalaki, E. (2004) *Archaeological Genetics - Approaching Human History through DNA Analysis*, Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 1101,bUppsala University, Sweden.
- Doğan Alakoç, Y. (2007) *Diş dokularından DNA analizi ile cinsiyet tayini ve sonuçların odontometrik veriler ile karşılaştırılması*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adli Tıp Anabilim Dalı, Ankara.
- Gokcumen, O., Gultekin ,T., Dogan Alakoc, Y., Tug, A., Gulec, E., Schurr, TG. (2011) “Biological Ancestries, Kinship Connections and Projected Identities in Four Central Anatolian Settlements: Insights from Culturally Contextualized Genetic Anthropology”, *American Anthropologist* 113(1), 116–131.
- Gökçümen, Ö., Gültekin, T. (2009) “Genetik ve Kamusal Alan”, *Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi* 49(1), 19-31.
- Gültekin, T., Gökçümen,Ö., (2009) “Genetik Bilgi ve Antropoloji”, *Bilim ve Teknik Dergisi* 494.
- Güral, D. (2007) *Arkeolojide Biyolojik Yöntemler: aDNA*. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Arkeoloji Anabilim Dalı
- Hagelberg, E., Clegg, J. (1991) “Isolation and characterisation of DNA from archaeological bone”. *Proceeding of the Royal Society of London Series B*244, s: 45-50
- Hardy, C., Callou, C., Vigne, J.D., Casane, D., Dennebouy, N., Mounolou, C. ve Monnerot, M. (1995) “Rabbit mitochondrial DNA diversity from prehistoric to modern time” *J Mol Evol.* 40: 227-237.
- Higgins, D., Austin, J.J. (2013), “Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review”, *Science & Justice* 53(4), 433–441.
- Höss, M., Pääbo, S. (1993) “DNA extraction from Pleistocene bones silice-basen purification method”, *Nucleic Acids Res* 21(16), 3913-3914.
- Hummel, S. (2003) *Ancient DNA typing: methods, strategies and applications*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- İmamoğlu Ö., Karapirli, M., Akboyun, N. (2011) “Diş Örneklerinden DNA Elde Edilme Metotlarının Karşılaştırılması ve Adli Bilimler Açısından Değerlendirilmesi”, *Adli Tıp Dergisi* 26(1), 38-48.
- Kirsanow, K. ve Burger, J. (2012) “Ancient human DNA” *Annals of Anatomy* 194, 121-132.
- Loreille, O.M., Diegoli, T.M., Irwin, J.A., Coble, M.D. ve Parsons, T. J. (2007) “High efficiency DNA extraction from bone total demineralization”, *Forensic Science International: Genetics* 1, 191–195.

- Marchant, J., (2011), "Curse of The Pharaoh's DNA", *Nature* 472, 404-406.
- Nielsen-Marsh, C. ve Hedges, R. (2000) "Patterns of Bone Diagenesis in Bone I: The effect of Site Environments", *J Archaeol Sci.* 27, 1139- 1150.
- Özcan, Ş.Ş. (2010) *Arkeolojik Toplumlarda Akrabalık İlişkileri : Bir Moleküler Antropolojik Yaklaşım*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Ana Bilim Dalı.
- Pääbo, S. (1985) "Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA", *Nature* 314, 644-645.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Després, V., Hebler, J., Rohland, N., ... ve Hofreiter, M. (2004), "Genetic analyses from ancient DNA", *Annu Rev Genet*, 38, 645-679.
- Parsons, T.J. ve Weeden V.W. (1996) "Preservation and recovery of DNA in postmortem specimens and trace samples", Haglund WD ve Sorgy M.H, (Eds.), *Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remains*, 109-138. Boca Raton, FL:CRC Press.
- 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), 1.
- Salo, W.L., Aufderheide, A.C., Buikstra, J. Ve Holcomb, T.A. (1994) "Identification of Mycobacterium tuberculosis in a pre Columbian mummy", *Proc Natl Acad Sci*, 91(6), 2091-2094.
- Singh, J. ve Garg, A. (2014) "Ancient DNA Analysis And Its Probable Applications In Forensic Anthropology", *J Punjab Acad Forensic Med Toxicol*, 14(1), 43-50.
- Stone, A.C. (2008) "DNA Analysis of Archaeological Remains", *Biological Anthropology of the Human Skeleton*, M.A. Katzenberg ve S.R. Saunders (Eds.), Chapter: 15, 461-482.
- Tekeli, E., Vural, H.C. ve Tırpan, A.A. (2015) "Identification Gender of Ancient Human DNAs from Koranza Skeletal Remains in Turkey Using Molecular Techniques", *Genomics and Applied Biology*, 6(1), 1-10.
- Tilotta, F., Brousseau, P., Lepareur, E., Yasukawa, K. ve de Mazancourt, P. (2010) "A comparative study of two methods of dental pulp extraction for genetic fingerprinting", *Forensic Science International*, 202(1), e39-e43.
- Yang, D.Y. ve Watt, K. (2005) "Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis", *Journal of Archaeological Science* 32, 331-336.
- Q'Rourke, D.H., Carlyle, S.W. ve Parr, R.L (1996) "Ancient DNA: methods, progress, and perspectives", *Am J Hum Biol*, 8, 557-571.