

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/337427512>

Hacettepe Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Antropoloji Anabilim Dalı ÇİNE-TEPECİK İNSAN İSKELET KALINTILARININ ARKEOGENOMİK ANALİZİ

Thesis · September 2019

DOI: 10.13140/RG.2.2.15180.36480

CITATIONS

0

READS

326

2 authors, including:



Sevgi Yorulmaz

Middle East Technical University

14 PUBLICATIONS 225 CITATIONS

SEE PROFILE



Hacettepe Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü

Antropoloji Anabilim Dalı

ÇİNE-TEPECİK İNSAN İSKELET KALINTILARININ ARKEOGENOMİK ANALİZİ

Sevgi YORULMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Ankara, 2019

ÇİNE-TEPECİK İNSAN İSKELET KALINTILARININ ARKEOGENOMİK ANALİZİ

Sevgi YORULMAZ

Hacettepe Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü

Antropoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans

Ankara, 2019

KABUL VE ONAY

Sevgi YORULMAZ tarafından hazırlanan “ÇİNE-TEPECİK İNSAN İSKELET KALINTILARININ ARKEOGENOMİK ANALİZİ” başlıklı bu çalışma, 11.09.2019 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr.Öğr. Üyesi Mehmet SOMEL (Başkan)



Dr.Öğr. Üyesi Ali Metin BÜYÜKKARAKAYA (Danışman)



Dr.Öğr. Üyesi Kameray ÖZDEMİR (Üye)



Bu tez çalışmasında Sayın Dr. Öğr. Üyesi Füsun ÖZER Ortak Danışman olarak görev almıştır.

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Musa Yaşar SAĞLAM

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinleri yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾


13.09.2019

Sevgi YORULMAZ

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(1) **Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.**

(2) **Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.**

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

*** Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğr. Üyesi Ali Metin BÜYÜKKARAKAYA danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Sevgi YORULMAZ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin ortalarında tanışmış olsam da tanıdığım ilk günden bu yana beni hayata duruşu, bakışı ve insanlara karşı olan samimi yaklaşımı ile etkileyen, öğrencisi olmamın ötesinde bana duyduğu güven ile her zaman ayakta kalmamı sağlayan ve umut ışığım olan, bir arkadaş gibi çekinmeden her derdimi anlatabildiğim, zorlandığım her çıkmaz anda bana sabırla yol gösteren ve motivasyon sağlayan değerli hocam, sevgili danışmanım Dr. Öğr. üyesi Ali Metin Büyükkarakaya'ya çok teşekkür ederim. Laboratuvar ekibine katılmamı onaylayan, deneyler konusunda bana tüm bilgilerini bir öğretmen olmanın ötesinde anne şefkati ile aktaran ve benim kendime güvenmem gerektiğini bu yaşta bana öğreten, takıldığım her süreçte kendi kendime cevaplar bulmayı öğreten ve her sorunumu sabır ile çözen sevgili eş danışmanım, değerli hocam Dr. Öğr. üyesi Füsun Özer'e çok teşekkür ederim. Bu mesleğe ilk adımımı attığım andan itibaren benim kararlılığıma inanan ve her an elimden tutan, bana inanarak ve değer verdiğini göstererek, büyük sabırla nasıl bir yol izlemem gerektiğini bana her zaman hatırlatan ve geleceğim için benden daha fazla umutlu olan değer verdiğim sevgili hocam Dr. Öğr. üyesi Kameray Özdemir'e sonsuz teşekkür ederim. Ekibine katılmamı kabul eden ve beni hiçbir zaman grubundan ayırmayan, her zaman çalışkanlığına hayran olduğum ve sorduğu sorular ile her daim gelişmemi sağlayan ve çalışmamda nasıl yol izlemem gerektiğini gösteren sevgili hocam Doç. Dr. Öğr. üyesi Mehmet Somel'e çok teşekkür ederim. Tezimin zorlu sürecinde gerek deney gerekse analizler aşamasında bana yardımcı olan Reyhan Yaka'ya, Eren Yüncü'ye, Dilek Koptekin'e, Mustafa Özkan'a, Evrim Fer'e ve Compevo grubuna çok teşekkür ederim. Tezimin son zamanlarında bana moral veren ve motive eden Kıvılcım Başak Vural'a çok teşekkür ederim. Her kararımda beni maddi ve manevi olarak destekleyen ve her zaman her ne yaparsam arkamda duran sevgili anneme, babama ve kardeşlerime çok teşekkür ederim. En büyük teşekkürüm ise küçüklüğümden beri bana sonsuz güven duyan ve her an beni umutlandıran O'nadır. Çine-Tepecik eski insan kalıntıları üzerinde yapılan genetik araştırmalar Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından proje numaraları 14528 ve 16769 olan iki proje ile desteklenmiştir.



Dizlerinde uyuduğum vicdanlı, O güzel insana...

ÖZET

YORULMAZ Sevgi. *Çine-Tepecik İnsan İskelet Kalıntılarının Arkeogenomik Analizi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2019.

Antik DNA çalışmalarında son dönemde artış görülmektedir. Bu yeni çalışmalarla incelenen arkeolojik insan topluluklarının genetik yapıları, demografik bilgileri ve çağdaşları olan diğer arkeolojik topluluklar ile olan ilişkileri ortaya çıkarılmaktadır. Bunun yanı sıra arkeolojik ve antropolojik değerlendirmelerle belirlenmiş olan eski insan topluluklarının iç dinamikleri hakkında edinilen bilgilere de yeni çözümler getirilmektedir.

Bu tez çalışmasında Batı Anadolu'da yer alan Çine-Tepecik arkeolojik yerleşiminden gün ışığına çıkarılmış insan iskelet kalıntıları incelenmiştir. Çine-Tepecik, Geç Neolitik/Kalkolitik dönemden itibaren Tunç Çağına kadar kesintisiz kültür tabakalarına sahiptir, aynı zamanda yerleşimde Helenistik/Roma dönemlerine tarihlendirilen mezarlar da bulunmaktadır. Bahsi geçen tabakalardan 10 birey arkeogenomik inceleme için seçilmiştir. 10 bireyin tamamından diş örnekleri, aynı bireylerin beşinden de ayrıca pars petrosa kemikleri seçilmiştir. Bu örneklerden aDNA elde edilmesi yapılarak, mitokondri kalıtsal yapısında yer alan ve anasal soy hakkında fikir veren HVRI ve HVRII bölgeleri analiz edilmiş ve bu bireylere ait haplogruplar tespit edilmiş ve bunlar yayınlanmış diğer antik topluluklara ait verilerle berabere değerlendirilmiştir. Ek olarak bireylere ait genomik kütüphaneler oluşturulmuş tüm genom analizleri yürütülmüştür. Elde edilen tüm genom verileri, antik genom bilgileri yayınlanmış diğer arkeolojik topluluklar ile karşılaştırılarak, Çine-Tepecik insan örneklerinin eski Anadolu ve Batı Avrasya popülasyonlarındaki konumu tartışılmıştır.

mtDNA analizleri ve tüm genom çalışmaları sonucunda dört örnekte haplogrup tayini yapılabilmektedir. Genom çalışmalarından elde edilen veriler ışığında 8 bireyin biyolojik cinsiyetleri belirlenmiştir. Beş bireye ait PMD (ölüm sonrası baz değişimi) grafikleri çizilmiştir. Beş bireyin dördünde otantiklik düzeyi görülmüştür. Genom sonuçlarından elde edilen PCA grafiğine ve mtDNA haplogruplarına (J1d, H2 ve R) bakıldığında Çine-Tepecik örneklerinin eski Anadolu popülasyonları ile genetik benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Moleküler Antropoloji, Güneybatı Anadolu, antik DNA, mtDNA Haplogrupları, Tüm Genom.



ABSTRACT

YORULMAZ Sevgi. *Archeogenomic Analysis of Çine-Tepecik Human Skeletal Remains*, Master Thesis, Ankara, 2019.

There has been an increase in ancient DNA studies recently. With these new studies, the genetic structures, demographic information and relationships with other archaeological communities of contemporaries are revealed. In addition to this, new analyzes are introduced to the information obtained on the internal dynamics of the old human communities determined by archaeological and anthropological evaluations.

In this thesis, human skeletal remains unearthed from the archaeological settlement of Çine-Tepecik in Western Anatolia were investigated. Çine-Tepecik has cultural layers covering the period from the Late Neolithic /Chalcolithic to the Bronze Age. It has also a cemetery dated Hellenistic/Roman Period. Ten individuals were selected for archaeogenomic examination. 10 dental specimens were selected from all individuals and *Pars petrosa* bones were selected from five of the same individuals. By obtaining aDNA from these samples, the HVRI and HVRII regions in the mitochondrial hereditary structure, which gave an idea about the maternal lineage, were analyzed and haplogroups of these individuals were identified and evaluated together with the data of other published ancient communities. In addition, genomic libraries of individuals were created and all genome analyzes were conducted. All genome data obtained were compared with other archaeological communities with ancient genome information published and the position of Çine-Tepecik human samples in ancient Anatolian and Western Eurasian populations was discussed.

As a result of mtDNA analysis and whole genome studies, haplogroup determination was made in 4 samples. In the light of the data obtained from genome studies, biological sexes of 8 individuals were determined. PMD (postmortem damage) graphs of five individuals were plotted. Authenticity was observed in four of five individuals. When PCA graph and mtDNA haplogroups (J1d, H2 and R) obtained from genome results were examined, it was seen that Çine-Tepecik samples showed genetic similarity with the ancient Anatolian populations.

Keywords: Molecular Anthropology, Ancient DNA, Southwestern Anatolia, mtDNA Haplogroup, Whole Genome



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI.....	ii
ETİK BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
İÇİNDEKİLER.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
TABLolar DİZİNİ.....	xvii
KISALTMALAR.....	xix
GİRİŞ.....	1
1. BÖLÜM: KAVRAMSAL KURAMSAL ÇERÇEVE.....	6
1.1. MOLEKÜLER ANTROPOLOJİ.....	6
1.2. ANTİK DNA.....	8
1.3. CİNSİYET.....	15
1.4. ANTİK DNA'DA KULLANILAN BİYOARKEOLOJİK MATERYALLER.....	17
1.5. TOPLULUK DÜZEYİNDE ANTİK DNA ÇALIŞMALARI.....	21
2. BÖLÜM: KONU, SORUN, AMAÇ.....	28
2.1. KONU.....	28
2.2. SORUN.....	30

2.3. AMAÇ.....	32
3. BÖLÜM: MATERYAL METOT.....	33
3.1. MATERYAL.....	33
3.1.1. Çine-Tepecik İnsan Örnekleri.....	33
3.1.2. Çalışma Grubunun Modern Örnekleri.....	35
3.2. METOT.....	35
3.2.1. mtDNA Çalışmaları.....	35
3.2.1.1. mtDNA Deneysel Çalışmaları.....	35
3.2.1.1.1. Örneklerin Hazırlanması.....	35
3.2.1.1.2. Öğütme.....	36
3.2.1.1.3. DNA İzolasyonu.....	37
3.2.1.1.4. Amplifikasyon.....	37
3.2.1.1.5. Örneklerin Agaroz Jel Elektroforezinde Değerlendirilmesi.....	39
3.2.1.1.6. Sanger Sekanslama.....	40
3.2.2. mtDNA Hesaplamalı Çalışmalar.....	40
3.2.2.1. Hizalama.....	40
3.2.2.2. Haplogrup Tayini.....	40
3.2.2.3. Diğer Popülasyonların Mtdna Verileri İle Çine-Tepecik Mtdna Verilerinin Karşılaştırılması.....	41
3.2.3. Tüm Genom Çalışmaları.....	42
3.2.3.1. Tüm Genom Kütüphanesi Hazırlığı.....	43
3.2.3.1.1. DNA Moleküllerinin Kırık Uçlarını Kütleştirme.....	43
3.2.3.1.2. Adaptör Yapıştırma.....	44

3.2.3.1.3. Adaptör Doldurma.....	44
3.2.3.1.4. QPZR Karışımı.....	45
3.2.3.1.5. Kütüphane PZR Hazırlığı.....	46
3.2.3.1.6. Zenginleştirilmiş Kütüphanelerin AMPURE Boncukları İle Saflaştırılması..	48
3.2.3.1.7. Kütüphane Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	49
3.2.3.1.8. Kütüphanelerin Ön Tarama Dizilemesi İçin Birleştirilmesi.....	50
3.2.4. Tüm Genom Hesaplamalı Çalışmalar.....	51
3.2.4.1. Hiseq Sekans Veri İşleme.....	51
3.2.4.2. Biyolojik Cinsiyet Tayini.....	52
3.2.4.3. Anasoylu Haplogrup Tahmini.....	52
3.2.4.4. Temel Bileşenler Analizi (TBA-PCA).....	52
3.2.4.5. F4 İstatistiği Testi.....	54
3.2.4.6. Tüm Genom Verisinde Kontaminasyon Ve Kalite Kontrol Testleri.....	56
3.2.5. Kontaminasyonu Engelleyici Önlemler Ve Otantiklik.....	57
3.2.5.1. Otantiklik İçin Beklenen Kriterler.....	57
3.2.6. Çalışma Grubunun Modern DNA Çalışmaları.....	57
3.2.6.1. Çalışma Ekibinden Kaynaklı Olası Kontaminasyonun Test Edilmesi.....	57
3.2.6.2. Yanak İçi Sürüntüsü.....	59
3.2.6.3. Yanak İçi Sürüntü Örneklerinin DNA İzolasyonu.....	59
3.2.6.4. Yanak İçi Sürüntü Örneklerinin Amplifikasyonu.....	59
3.2.6.5. Yanak İçi Sürüntü Örneklerinin Agaroze Jel Elektrofrezisi.....	62
3.2.6.6. Yanak İçi Sürüntü Örneklerinin Hizalanması.....	62
3.2.6.7. Yanak İçi Sürüntü Örneklerinin Haplogruplarının Belirlenmesi.....	62

4. BÖLÜM: BULGULAR.....	63
4.1. mtDNA BULGULARI.....	64
4.1.1. Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri.....	71
4.1.2. Bioedit Sonuçları.....	74
4.1.3. Haplogrupların Belirlenmesi.....	76
4.2. TÜM GENOM BULGULARI.....	76
4.2.1. QPZR Sonuçları.....	78
4.2.2. Biyoanalizör Sonuçları.....	78
4.2.3. Ön Dizileme Sonuçları.....	80
4.2.4. Temel Bileşenler Analizi (PCA).....	86
4.2.5. F4 Testi.....	87
4.2.6. mtDNA Otantikliği Ve Haplogrup Değerlendirmesi.....	88
4.2.6.1. Haplogrup Değerlendirmesi.....	88
4.2.6.2. mtDNA OTANTİKLİĞİ.....	89
5. BÖLÜM: TARTIŞMA VE SONUÇ.....	91
5.1. ANTİK DNA ELDESİ, KONTAMİNASYON VE VERİMLİLİK.....	91
5.2. CİNSİYETLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	97
5.3. MTDNA HAPLOGRUPLARI.....	100
5.4. GENOM ANALİZİ: POPULASYONLAR ARASINDA ÇİNE-TEPECİK'İN YERİ.....	107
SONUÇ.....	111
KAYNAKÇA.....	114
EK 1. ORJİNALLİK RAPORU.....	140
EK 2. ETİK KURUL MUAFİYET FORMU.....	141

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: mtDNA bölgeleri, ileri değişken bölgeler HVR-I (1) ve HVR-II (2) bölgeleri	11
Şekil 2: Filogenetik ağaç	13
Şekil 3: Çine-Tepecik Höyüğü konumu	29
Şekil 4: Çine-Tepecik Höyüğü'nün Stratigrafik Gelişimi	29
Şekil 5: PCR ürünlerinin AmPure Beads ile temizlenmesi	48
Şekil 6: Merdiven olarak 15 farklı okuma	49
Şekil 7: Biyoanalizör için kullanılan mikroçip	50
Şekil 8: D-istatistiği ağacı	56
Şekil 9: Diş örneklerinin HVRI bölgesinin B fragmanının 1. izolasyonunun PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü	64
Şekil 10: Diş örneklerinin HVR-I bölgesinin A, C ve D fragmanlarının 1. izolasyonunun 2. PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü	65
Şekil 11: Diş örneklerinin 1. izolasyonunun HVRI bölgesinin E fragmanı ile HVRII bölgesinin F ve G fragmanlarının 3. PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü	66
Şekil 12: Diş örneklerinin 1. izolasyonunun HVRI bölgesinin A ve B fragmanlarının 4. PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü	67
Şekil 13: Diş örneklerinin negatif kontrollerinin 1. izolasyonunun HVRI bölgesinin A ve B fragmanlarının 5. PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü	67
Şekil 14: Diş örneklerinin 2. izolasyonunun HVRI bölgesinin A ve B fragmanlarının 1. PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü	68
Şekil 15: Diş örneklerinin 2. izolasyonunun HVRI bölgesinin C ve D fragmanlarının 1. PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü	68
Şekil 16: Diş örneklerinin 2. izolasyonunun HVRI bölgesinin E fragmanı ile HVRII bölgesinin F fragmanının 1. PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü	69
Şekil 17: Diş örneklerinin 3. izolasyonunun HVRI bölgesinin jel görüntüsü	69
Şekil 18: Modern örneklerin HVRI ve HVRII jel görüntüsü	70
Şekil 19: G19 numaralı diş örneğinin HVRI ve HVRII bölgelerinin tüm fragmanlarının CRS'ye göre Bioedit ile düzenlenmesi	72

Şekil 20: G21 numaralı diş örneğinin HVRI ve HVRII bölgelerinin tüm fragmanlarının CRS'ye göre Bioedit ile düzenlenmesi	72
Şekil 21: G24 numaralı diş örneğinin HVRI bölgelerinin tüm fragmanları CRS'ye göre Bioedit ile düzenlenmesi	73
Şekil 22: G19, G21 ve G24 numaralı örneklerin HVRI sekans verileri ile arkeolojik ve modern Anadolu topluluklarının (22 popülasyon) HVRI sonuçlarının PCoA ile 2D gösterimi	76
Şekil 23: Çine-Tepecik diş örneklerinin ve negatif kontrollerin biyoanalizör sonuçları	79
Şekil 24: Çine-Tepecik G1, G11, G15, G21 ve G25 numaralı pars petrosa örneklerinin ve negatif kontrollerinin biyoanalizör sonuçları	80
Şekil 25: G1 <i>Pars petrosa</i> örneğinin PMD grafiği	84
Şekil 26: G11 <i>Pars petrosa</i> örneğinin PMD grafiği	84
Şekil 27: G15 <i>Pars petrosa</i> örneğinin PMD grafiği	85
Şekil 28: G21 <i>Pars petrosa</i> örneğinin PMD grafiği	85
Şekil 29: G25 <i>Pars petrosa</i> örneğinin PMD grafiği	86
Şekil 30: Çine-Tepecik popülasyonunun PCA grafiği	87
Şekil 31: f4 (Yoruba, Çine-Tepecik; PopX, PopY) testi sonucunda elde edilen f4 istatistiklerinin grafiksel gösterimi	88
Şekil 32: G25 tüm genom mtDNA kontaminasyon grafiği	90

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Çalışmada kullanılan Çine-Tepecik insan örnekleri	34
Tablo 2: Tüm örneklerden elde edilen toz miktarları (gr)	36
Tablo 3: PZR karışımı oranları, bir örnek için	38
Tablo 4: PZR programı, döngü ve sıcaklık değerleri	38
Tablo 5: PZR de çoğaltmak istediğimiz bölgeler (primerler) ve uzunlukları	39
Tablo 6: Temel Bileşenler Analizinde (PCoA) kullanılan HVRI verilerinin ait olduğu popülasyonlar	42
Tablo 7: Kütleştirme reaksiyonu karışımı	43
Tablo 8: Adaptör yapıştırma karışımı	44
Tablo 9: Adaptör doldurma karışımı	45
Tablo 10: Kantitatif PZR (QPZR) karışımı	46
Tablo 11: Kütüphane PZR karışımı	47
Tablo 12: PZR programı	47
Tablo 13: TBA ve f4 testlerinde kullanılan popülasyonlar ve referansları	53
Tablo 14: Yanak içi sürüntü örneklerinde kullanılan primerler	60
Tablo 15: Modern örneklerin (yanak içi sürüntü örneklerinin) PZR karışımı	61
Tablo 16: PZR Programı	61
Tablo 17: Örneklerin izolasyon ve sekanslamada başarılı olan fragman sayıları	64
Tablo 18: G19-G21 ve G24 nolu bireylerinin HVRI ve HVRII nükleotit değişimleri ve mtDNA haplogrupları	74
Tablo 19: Örneklerle temasta bulunan araştırmacıların HVRI ve HVRII	75

varyasyonlarına göre ait oldukları haplogruplar

Tablo 20: Çine-Tepecik diş örneklerinin ve negatif kontrollerin qPZR döngü sayıları	77
Tablo 21: <i>Pars petrosa</i> örneklerinde ve negatif kontrollerde qPZR döngü sayıları	78
Tablo 22: Çine-Tepecik diş örneklerinin ön dizileme sonucu	81
Tablo 23: <i>Pars petrosa</i> örneklerinin ön dizileme sonucu.	83
Tablo 24: G25 numaralı bireyin tüm genom verisinden elde edilen mtDNA haplogrup sonucu	89
Tablo 25: Örneklemelere göre başarı oranı	96
Tablo 26: Örneklerin antropolojik ve biyolojik cinsiyetler	99
Tablo 27: Anadolu'da bulunan haplogruplar	101
Tablo 28: Tunç Çağına tarihlenen topluluklardaki bireylerin haplogrupları	104

KISALTMALAR

aDNA: Antik DNA

bç: Baz çifti

DNA: Deoksiribo nükleik asit

HVRI: Hiper variable region 1

HVRII: Hiper variable region 2

l: Litre

mM: Milimolar

mtDNA: mitokondriyal DNA

ng: Nanogram

pg: Pikogram

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

TBA: Temel bileşenler analizi

V: Volt

µl: Mikrolitre

GİRİŞ

Antropoloji çalışmalarının odak noktası insandır. İnsanın dili, kültürü, morfolojisi ve ürettikleri üzerine çalışmalar yapılır. Bu çalışmalar dört temel başlık altında toplanmaktadır; bunlar arkeoloji, lingustik antropoloji, sosyal antropoloji ve biyolojik antropolojidir (Boaz ve Almquist, 2002).

Yaşayan insan ve insan toplumlarının çeşitliliğini tarihi bir bütünlük içinde anlamaya odaklanan biyolojik antropoloji de çalışmalarını farklı alt dallara ayrılarak sürdürmektedir. Söz konusu olan bu alanlar Primatoloji, Paleoantropoloji, İnsan Biyolojisi, İskelet Biyolojisi, Osteoloji, Paleopatoloji, Adli Antropoloji, Moleküler Antropoloji (Moleküler Biyoloji ve Genetik) olarak bilinmektedir (Stanford vd., 2011; Boaz ve Almquist, 2002). Biyolojik antropolojinin nispeten yeni bir alt dalı olarak ortaya çıkan biyoarkeoloji ise arkeolojik toplulukların demografik yapısını, beslenme ve sağlık durumlarını incelemektedir (Larsen, 2002; Lewis, 2009).

Son yıllarda artan bir ivme ile çalışmalarına devam eden moleküler antropoloji, insanın genetik çeşitliliğinin temellerine dair ortaya çıkardığı doğrudan verilerle biyolojik antropoloji çalışmalarına destek olmaktadır (Larsen, 2015; Stoneking, 2017). Moleküler antropolojinin araştırdığı konular içinde modern insan ve insan olmayan primatlar arasındaki genetik çeşitliliğin karşılaştırılması ve doğrudan insana ait eski kalıntılardan genetik bilgi elde etmek yer almaktadır (Crawford, 2007; Stoneking, 1997; Stoneking, 2017; Paabo, 1999). Daha yakın zamanlarda gündeme gelen antik DNA (aDNA) çalışmaları ise ortaya çıkardığı yeni bilgilerle insanın geçmişini anlama çabalarına yeni bir boyut katmıştır. Bu amaç doğrultusunda arkeolojik örneklerden DNA eldesi, özellikle 1983 yılında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) teknolojisinin gelişmesiyle önem kazanmıştır (Crawford, 2007). Özellikle mitokondriyal DNA (mtDNA) ve Y kromozom haplogrupları ya da çekirdek (nukleus) DNA'sı (nuDNA) dizileri analiz edilerek eski insan topluluklarında biyolojik yakınlık düzeyi belirlenmeye çalışılmış ve bireylerin genetik karakterizasyonu yapılmaya başlanmıştır (Bouwman vd., 2008; Deguilloux vd., 2014; Gifford, 2013; Haak vd., 2008; Knipper vd., 2014; Lee vd., 2014; Ludes ve Keyser-

Tracqui, 2005; Nunez vd., 2012; Olalde vd., 2015). Antik DNA (aDNA) terimi dışında Arkeogenomik ve/veya Paleogenomik başlıkları da bu yeni alanın tanımlanmasında kullanılmaktadır.

Eski insan topluluklarının genetik çeşitliliği üzerine yakın zamanlara kadar yürütülen biyoarkeolojik incelemeler, arkeolojik topluluklardan ele geçirilen organik materyallerin (diş, kemik vd.) morfolojik açıdan incelenmesine ve değerlendirilmesine (osteolojik analizler) odaklanmıştır. Örneğin dişlerin boyut ve biçimleri arasındaki topluluk düzeyinde veya alt gruplar arasında gözlemlenen ilişki, toplum içinde bireylerin biyolojik yakınlıklarının üzerine fikir yürütülmesine yardımcı olabilmektedir (Scott ve Turner II, 1997; Pilloud ve Larsen, 2011). İskelet morfolojisindeki değerlendirmeler (kraniyal ve postkraniyal iskelete ait metrik ve non-metrik incelemeler), yüzün öne doğru yaptığı açı, zygomatik kemik genişliğinin yüzdeki oranı (Eroğlu, 2011), torus palatinus (Eroğlu ve Erdal, 2008), boy uzunluğu (Eroğlu, 2011) gibi karakterler biyolojik yakınlığı (birçok yayımda *biyolojik uzaklık* olarak da ifade edilmektedir) belirlemede kullanılan özelliklerdendir (Eroğlu, 2004, 2011; Eroğlu ve Erdal, 2007). Tüm bu morfolojik özelliklerin gelişimi genetik altyapının yanı sıra çevresel özelliklerin de etkisi ile ilişkili olabildiğinden kesin sonuçlar elde etmede güvenilir olmayabilir. Bu nedenle topluluk içerisinde ve topluluklar arasındaki biyolojik yakınlık ilişkilerini belirlemede daha doğru ve kesin bilgi veren bir yöntem olarak moleküler antropolojik çalışmalar araştırmacılara destek vermektedir (Brown ve Brown, 2011; Crawford, 2007; Klug vd., 2011; Ortner ve Aufderheide, 2003; Stoneking, 2017; Eroğlu ve Erdal, 2007; Eroğlu, 2004, 2011).

Moleküler düzeydeki çalışmaların bu kadar önem arz etmesi arkeolojik toplumların demografik yapısını daha net bilgilerle ortaya çıkarılması için de gereklidir. Arkeolojik toplulukların demografik yapısı, mezarlık içerisinde bulunan kadın, erkek ve çocuk bireylerin sayıları tespit edilerek ve aynı zamanda mezar eşyaları gibi kültürel uygulamalar göz önünde bulundurularak arkeologlar ve antropologların ortaklaşa çalışmalarıyla mümkün olduğunca açıklanmaya çalışılır. Bununla birlikte eski nüfus yapısının belirlenmesi birçok zorluk içerir. Örneğin, paleodemografik yöntemlerle cinsiyet tahmininin bir takım sınırlılıklar içermesi (örneğin 15 yaş altı bireylerde cinsiyet tahmininin ikincil cinsiyet karakterlerinin tam olarak gelişmemiş olması nedeniyle net olarak gerçekleştirilememesi) moleküler antropolojik yaklaşımların paleodemografiye

katkı sunabileceği alanlar yaratmaktadır (Byers, 2016). Ayrıca, çeşitli arkeolojik kontekslerden elde edilen kemik örneklerin kırılgan doğası nedeniyle çoğu zaman parçalı ya da eksik şekilde ele geçmesi de paleodemografik yapının inşasında sınırlamalar ortaya koyar ve moleküler antropolojik tekniklerin kullanılabileceği alanlar yaratır. Bu nedenle de moleküler düzeydeki çalışmalar daha da önem kazanmaktadır.

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda, arkeolojik toplulukların günümüz toplumlarına genetik yakınlığının incelenmesi ve dönemdaşları olan topluluklar ile ilişkilerini belirlemek mümkün hale gelmiştir. Buna ek olarak paleolitik dönemlerde yaşamış türler (Neandertaller, Denisovanlar) ile yine paleolitik dönemde yaşamış anatomik açıdan modern insan arasındaki genetik ilişkiler, aynı zamanda tüm bu eski soyların günümüz insan toplumlarıyla genetik yakınlıkları/benzerlikleri de çalışılmaktadır (Gomez-Robles, 2019; Reich vd., 2010; Skoglund ve Mathieson 2018). Antik DNA çalışmalarındaki bu avantaj biyolojik yakınlık ve sosyokültürel yapıların belirlenemediği durumlarda eski insan kalıntılarının küçük bir parçasından elde edilebilen veriler ile topluluk ve/veya bireyler hakkında bilgi elde edilmektedir (Gomez-Robles, 2019).

Eski insan topluluklarındaki en büyük değişimlerden biri, yerleşik hayata geçiş ve tarımın başlangıcı, bir diğer ifade ile Neolitikleşme sürecidir (Childe, 1925; Larsen, 1995). Dünyanın farklı bölgelerinde birbirinden bağımsız olarak yaşanmış olan bu süreçlerin ilki Zagroslar, Levant ve Mezopotamya'yı kapsayan ve "Bereketli Hilal" adı verilen bölgede, günümüzden yaklaşık 12 bin yıl önce adımları atılmıştır (Hillman, 1996). Son Buzul Çağının peşi sıra değişen bitki örtüsü ve iklim ile toplayıcılık faaliyetlerinin bölgede yoğunlaşması ve nüfusun giderek artması, binlerce yıllık süre içinde tarımın/tarımcı kültürün ilerlemesine ve uzak coğrafyalara çeşitli yollarla ulaşmasına yol açtığı düşünülmektedir. Tarıma geçişin uzun zamana yayılmış bir süreç olduğu ise göz ardı edilmemelidir (Hillman, 1996; Baird, 2012). İlk yerleşik toplumlar uzun süre toplayıcılık ve avcılık yapmaya devam etmişler; ağırlıkla ıslah edilmiş ürün ve hayvanlara dayanan ekonomiler yerleşikliği takip eden bin yıllar içinde ortaya çıkmıştır (Sagona ve Zimansky, 2009). Burada, farklı bitki ve hayvanların da Yakın Doğu'nun farklı bölgelerinde ortaya çıktığını belirtmeliyiz. Örneğin domuz ve sığırın Güneydoğu Anadolu'da, keçinin İran'da, koyunun Orta ve Güneydoğu Anadolu'da evcilleştirildiği yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (Zeder, 2008). Yerleşik ve tarım yapan, küçük köyler biçiminde yaşayan toplumlar Bereketli Hilal'de yaygınlaştıktan sonra, bu yaşam biçimi Orta Anadolu'ya ve

Kıbrıs'a günümüzden 11 ila 10 bin yıl önce yayılmıştır (Özdoğan, 2011; Baird, 2012). Tarımın, Batı Anadolu ve Avrupa'ya yayılması ise M.Ö. 7000'lerden sonra başlamıştır (Özdoğan, 2011). Neolitik Döneme dair yapılan tartışmalar, Avrupa'ya yayılma sürecinin kültürel aktarım mı yoksa göç yoluyla mı gerçekleştiği üzerine olmuştur (Cavalli-Sforza, 1997; Özdoğan, 2011). Modern insan popülasyon genetiği verisiyle yapılmış çalışmalarda, Anadolu'dan Avrupa'ya geçmişte yaşanmış bir göçün izleri tespit edilmiş (Cavalli-Sforza, 1997), ancak bu çalışmalar kullanılan yöntem ve çıkarımlar nedeniyle eleştirilmiştir (Novembre ve Stephens, 2008). Bunlara ek olarak 2000'lerde antik mtDNA araştırmaları, Orta Avrupa'da bulunan ilk çiftçilerin günümüz Yakındoğuluları ile benzerlik gösterdiklerini bulmuştur (Haak vd., 2010). Malmström vd. (2009) mtDNA çalışmasında, İsveç'te bulunan ilk çiftçilerin aynı dönem Mezolitik (avcı-toplayıcı) gruplardan farklı genotipe sahip olduğu sonucuna varmıştır. Yapılan bu çalışmalar ile tarımın Avrupa'ya kültürel aktarım yolu ile değil göç yoluyla yayıldığı düşüncelerini desteklenmiştir. Lakin çalışmaların sadece mtDNA verileri ile yapılmış olması göç eden bireylerin kimliği ve göç yoğunluğu hakkında yeterli fikir sağlamamaktadır. mtDNA'nın tek bir lokustan oluşması (ana soylu olması) ve rekombinasyon içermemesi nedeni ile bireyin tüm genom bilgisinden kısmen farklılık (tarihsel olarak) göstermektedir (Reich vd., 2010). Bu nedenle mtDNA'dan elde edilen bu verilerin tüm genom verileri ile de kontrol edilmesi gerekmektedir.

Daha yakın zamanda yapılmış çalışmalarda *Neolitikleşmenin Avrupa'ya göç ile mi yoksa kültürel aktarım ile mi?* sorusunun yanıtının antik genomlar kullanılarak incelendiği görülmektedir (Lazaridis vd., 2014; Skoglund vd., 2014). Lazaridis ve Skoglund'ın çalışmalarında, Avrupa'dan Neolitik ve Mezolitik dönemlerine tarihlendirilmiş bireylere ait örneklerden, yeni nesil dizileme yoluyla tüm genom verisi üretilmiş ve bazı istatistiksel yöntemler uygulanarak örnekler kendi aralarında ve modern bireylere ait örneklerle karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, Avrupa'da izleri bulunan ilk Neolitik grupların, kendi aralarında benzer, Mezolitik'den farklı olduklarını, günümüz Avrupalılarının ise bu iki grubun bir karışımı olduklarını göstermektedir (Skoglund vd., 2014).

Antik genomlar kullanılarak yapılan çalışmalar Anadolu coğrafyasının eski insan toplumlarının ve kültürlerinin yayılımında kilit noktada olduğunu göstermiştir. Nitekim özellikle Avrupa'nın ilk çiftçi topluluklarının genetik kompozisyonunun daha iyi

anlaşılması için Batı Anadolu'da yer alan Geç Neolitik ve Kalkolitik dönem arkeolojik yerleşmelerinden (Barçın Höyük ve Kumtepe) elde edilmiş insan iskelet kalıntıları üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. Bu topluluklara ait antik DNA elde edilebilen bireylerin genetik profilleri çıkarılmış ve Avrupa'daki Neolitik çiftçilerle genel benzerliklerinin olduğu sonucuna varılmıştır (Mathieson vd., 2015; Hofmanová vd., 2016; Omrak vd., 2016). Bir diğer çalışmada ise Orta Anadolu'da yer alan Boncuklu ve Tepecik-Çiftlik Neolitik dönem topluluklarına ait bazı bireylerin genetik profilleri incelenmiştir (Kılınç vd., 2016). Çalışmanın sonucunda, Avrupa'ya göç eden tarımcıların Orta Anadolu'da yaşamış ilk Neolitik tarımcılara benzediğini gösterilmiştir. Konuyla ilgili daha ileri analizlerde, Anadolu'daki bu çalışmalar ile Anadolu topluluklarının birlikte ve yine birbirlerinden ayrı iki grup şeklinde kümelenen Güney Levant ile İran'daki Neolitik Dönem topluluklarının uzağında kümelendiğini yapılan analizler ile gösterilmiştir (Kılınç vd., 2017). Aynı çalışmada, Batı Anadolu ve Kuzey Ege Neolitik dönem topluluklarının Orta Anadolu'dan Batıya doğru çok sayıda göçün olabileceğini, Ege Bölgesinin çiftçilikle uğraşan epipaleolitik topluluklarının da olabileceğini göstermiştir (Kılınç vd., 2017).

Genom düzeyinde yapılan çalışmalardan sonuçların elde edilmesi ile birlikte Anadolu'daki diğer arkeolojik dönemler için de çalışmalara başlanmış ve bazı arkeolojik toplumlarla ilgili çalışmalar da yayımlanmıştır. Lazaridis vd. (2017) çalışmasında Ege Bölgesinde Tunç Dönemine tarihlendirilen, Miken ve Minos kültürlerinin yansımalarının görüldüğü topluluklardan genetik veriler elde edilmiştir. Batı Anadolu, Yunanistan ve Girit örneklerinden elde edilen bu veriler ışığında Miken ve Minos örneklerinin genetik benzerliklerinin olduğu, atasal soy olarak da Batı Anadolu ve Ege Neolitik çiftçilerine büyük oranda benzerlik gösterdikleri, aynı zamanda da İran ve Kafkas etkisinin de olduğu sonucuna varılmıştır (Lazaridis vd., 2017).

Yapılan tüm çalışmalar ışığında, moleküler çalışmaların sunduğu imkanların önem arz ettiği görülmektedir. Moleküler çalışmalar ile farklı arkeolojik dönemlere ait insan kalıntılarının genetik profilleri çıkarılmaktadır. Elde edilen veriler ile toplulukların kendi içinde ve diğer topluluklarla olan biyolojik yakınlıkları belirlenmektedir.

1. BÖLÜM

KAVRAMSAL KURAMSAL ÇERÇEVE

1.1. MOLEKÜLER ANTROPOLOJİ

Moleküler antropoloji; Primatoloji, Paleoantropoloji ve demografi ile birlikte biyolojik antropolojinin gelişmekte olan bir alt dalı olarak kabul edilmektedir (Stoneking, 2017). Moleküler antropoloji yaklaşımı, her birimizin atalarımızdan miras aldığımız DNA'mızda geçmişimizin bir kaydını taşıdığı gerçeğine dayanmaktadır (Stoneking, 2017). Böylelikle insanlar ve topluluklar arasındaki evrimsel ilişkiler, toplulukların göç yolları, akrabalık ilişkileri ile toplumlarda rastlanılan enfeksiyonel hastalıkların ortaya çıkışı ve yayılışı çözümlenebilmektedir (Donoghue vd., 2015; Perrin, 2015).

Moleküler antropoloji çalışmaları I. Dünya Savaşından bu yana antropoloji disiplini içinde yer almakta ve antropolojinin sorularına moleküler biyoloji metotları ile cevap bulmayı hedeflemektedir (Griffiths vd., 2014). Günümüzde moleküler antropoloji biyolojik antropolojinin teorik arka planı ve uygulama kısmı iyi gelişmiş alt dallarından biri olarak kabul edilmektedir (Stoneking, 2017). Son dönemlerde üniversitelerin antropoloji bölümleri öğretim programlarında yer almaya başlamıştır.

Moleküler antropolojinin veri kaynağı olan insan genomu iki farklı kısımdan oluşur. Bunlar çekirdek ve mitokondri genomudur. Çekirdek genomu, en kısası 5×10^7 ve en uzununu ise 26×10^7 nükleotit uzunluğunda, her biri farklı kromozomda yer alan 23 doğrusal moleküle (kromozoma) ayrılmaktadır. Genomda bulunan yaklaşık 32×10^8 nükleotit 22 otozom ve iki eşey (X-Y) kromozomun üzerinde yer alır. İnsan çekirdek kromozomlarında 35 bin gen bulunur (Brown vd., 2015). Diğer taraftan mitokondri genomu, hücrede bulunan ve mitokondri olarak adlandırılan enerji üreten organelde yer almaktadır. Çoklu kopyalar halinde yerleşik olan mitokondri genomu 16,569 nükleotitlik halkasal bir yapıda bulunmaktadır. İnsan mitokondri genomu 37 gen içermektedir. Erişkin insan bedenindeki $\sim 10^{13}$ hücrenin her biri kendi genomunun kopyasına ve atasal

kopyalarına sahiptir (çekirdekten yoksun olan kırmızı kan hücreleri gibi sadece birkaç istisna hücre tipi dışında) (Brown vd., 2015).

Genomların içeriği ile içeriği oluşturan yapıların işlevsel yönlerinin belirlenmesi genomik düzeyde analizler ile mümkündür. Genomik analizlerde çeşitli yöntemler kullanılır; biyoinformatik, karşılaştırmalı genomik ve fonksiyonel genomiktir (Griffiths vd., 2014).

Biyoinformatik, bütün bir genom içeriğindeki bilginin analizidir. Bu bilgi genlerin tiplerini, sayılarını ve gen ürünlerini içerdiği gibi, fonksiyonel ürünlerin doğru zamanda ve doğru yerde üretilmesine izin veren DNA ve RNA üzerindeki bağlanma bölgelerinin tiplerini, sayılarını ve yerlerini de içermektedir.

Karşılaştırmalı genomik, evrimsel bakış açısıyla yakın veya uzak akraba türlerin genomlarını göz önünde tutar ve korunmuş dizilerin gen fonksiyonunun analizinde rehber olarak kullanılmasına olanak sağlar.

Fonksiyonel genomik, artan çeşitlilikteki metotları kullanır, geri yönlü genetiği kapsar, gen fonksiyonunu anlama ve biyolojik süreçte etkileşen gen ve protein ağlarını betimler.

Genomik dizilerin eldesi, önce küçük parçalara ayırma ve daha sonra da bu parçaları bir araya getirilerek yapılır. Ancak antik DNA çalışmalarında elde edilmek istenilen DNA zaten zaman içerisinde küçük parçalara ayrılmaktadır. Bu nedenle DNA eldesi çalışmalarında fiziksel olarak veya kimyasal olarak parçalamayı hedefleyen uygulamalar tercih edilmemektedir (Brown vd., 2015; Griffiths vd., 2014).

Genom dizisinin bir araya getirilip ortaya çıkarılması için uygulanan strateji, tüm genom shotgun dizileme (WGS) olarak adlandırılır (Griffiths vd., 2014). Bu dizileme uzun kromozom DNA'larının çok daha kısa segmentlere parçalanmasıyla oluşturulmuş çok sayıda genomik DNA segmentinin dizisinin saptanmasına dayanır. Yeni nesil WGS' nin hedefi, geleneksel WGS ile aynıdır. Kontiglerin (Kontig: Bir kromozom bölgesini kaplayan üst üste çakışan bitişik klonların genomik kütüphanesi) içinde bir araya toplanabilen çok sayıda birbiri üstüne binen dizi okumaları elde edilir. Tüm genom shotgun dizileme de, ilk olarak dizi okumaları arasında üst üste binen özgün dizi, kontig oluşturmak için kullanılır. Daha sonra iki uçlu okumalar boşlukları bağlamak ve kontigleri

skafoldlar olarak adlandırılan daha büyük birimler halinde düzenlemek ve yönlendirmek için kullanılır (Griffiths vd., 2014).

Moleküler genetik ve moleküler antropolojinin interdisipliner çalışmalarında, otozomal markerlar (belirteçler), kolajen genleri (COLIA2), SNPs, tandem repeatler (STRs ve VNTRs), telomerik dizilimler ve satellitler, retro elementler, RAPD (polimorfik DNA'nın rastgele büyütülmesi), Y kromozom markerları (haplogruplar), mitokondriyal DNA belirteçleri kullanılmaktadır (Brown ve Brown, 2011; Crawford, 2007). Uygun olan teknoloji ile ve aynı zamanda çalışmanın amacına uygun olarak örneklem ve belirteçler seçilerek, topluluğun demografik yapısı belirlenebilir, topluluk içerisindeki biyolojik soy ağacı çizilebilir ve farklı topluluklar arasındaki biyolojik ilişki kıyaslanabilir. Bu yöntem ile birey bazında çalışmalar yapılabildiği gibi popülasyonlar arasında da kıyaslamalar yapılabilmektedir. (Brown ve Brown, 2011; Crawford, 2007; Paabo vd., 2004).

1.2. ANTİK DNA

Son yıllarda moleküler düzeydeki incelemelerde/çalışmalarda eski insan topluluklarında yapılan antik DNA çalışmalarının ön planda olduğu görülmekte ve çalışmaların hedeflerine göre yöntem ve analizlerin farklılık gösterdiği bilinmektedir. Paleogenomik alanında yapılan mtDNA analizleri ile toplulukların göç yollarından popülasyonların büyüklüğüne kadar pek çok bilgiye ulaşılabilmektedir (Shapiro ve Hofreiter, 2014). Antik DNA farklı kalıtsal yapılardan elde edilebilir. Bunlar memeli hayvanlar için mtDNA veya otozomal DNA olduğu gibi, bitkiler için ek olarak kloroplast DNA (ctDNA)'sı eldesidir.

İnsanda mitokondriyal DNA dairesel çift sarmal yapıdadır. Yaklaşık olarak 16,6 kb uzunluğundadır ve 37 gen kodlamaktadır. İç kısımda yer alan halka hafif (*Light, L*) ve dış kısımda yer alan halka ağır (*Heavy, H*) olarak adlandırılır. Biri büyük (16S) biri küçük (12S) olmak üzere iki ribozomal RNA (rRNA) bölgesi, 22 transfer RNA (tRNA) ve 13 polipeptit içermektedir (Wallece, 1994). mtDNA da kodlama yapmayan 1100 bç'lik bölüm D-Loop (*Displacement Loop*) veya ileri değişken kontrol bölgesi (HVR, *Hyper Variable Control Region*) olarak isimlendirilmektedir (Şekil 1), bu bölge iki kısımdan oluşmaktadır; HVRI (16024-16365) ve HVRII (73-340) (Anderson vd., 1981; Stoneking, 2017; Budowle vd., 2003). Bu bölgelerde yer alan çeşitlilik popülasyonlara özgüdür ve bazı mitokondriyal SNP'ler yüksek mutasyon oranları ile aile düzeyinde de inceleme

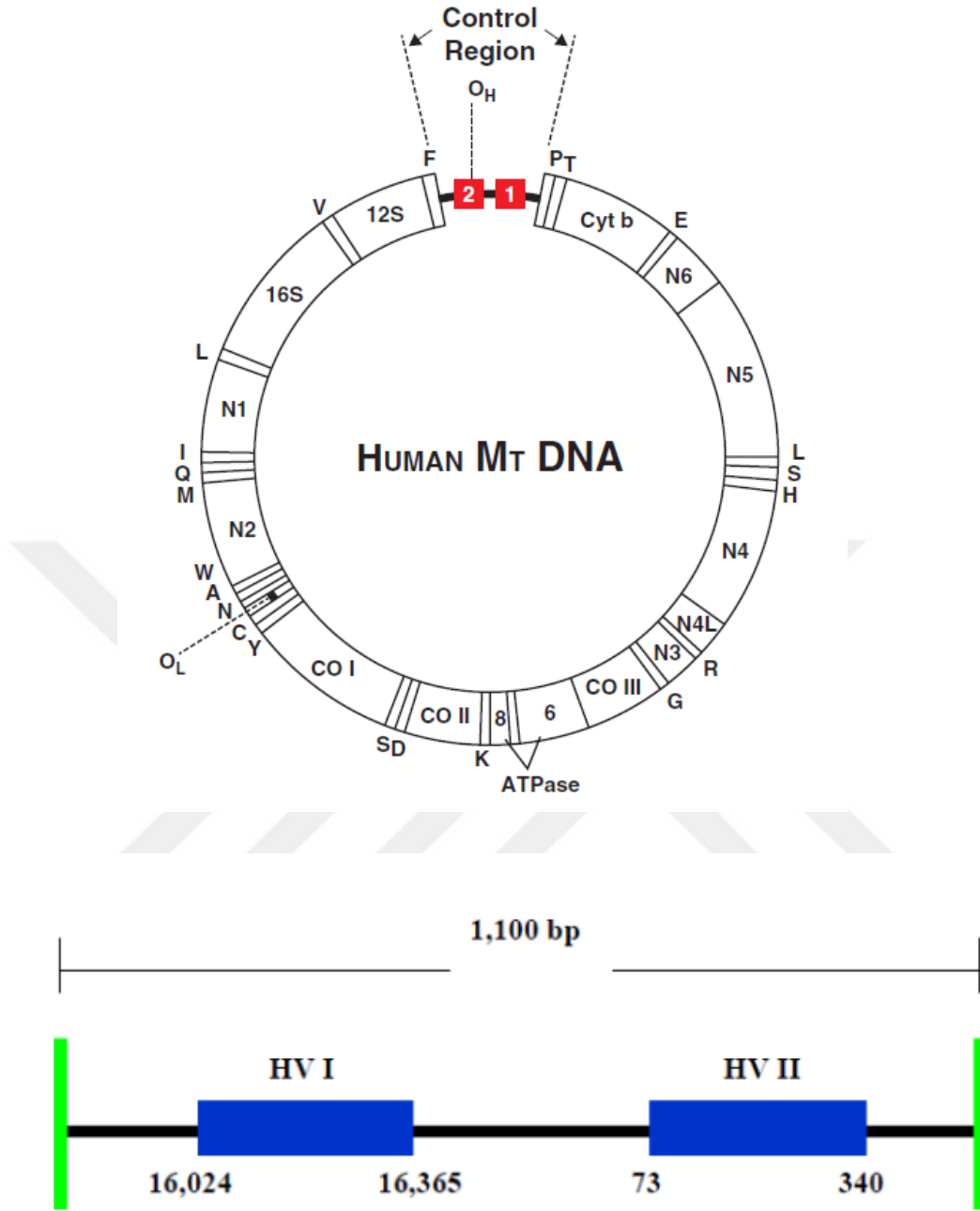
bilmektedir. HVR bölgeleri bireyler arasında %3 farklılık göstermektedir (Stoneking, 2000). Polimorfizm düzeylerinin yüksek olmasından dolayı HVR bölgeleri bireylerde ve populasyonlarda kıyaslanabildiğinden aDNA çalışmalarında çok fazla kullanılmaktadır (Hummel, 2003). Bu bölgenin uzunluğu toplam mtDNA uzunluğunun küçük bir kısmını içeriyor olsa da aslında antik DNA çalışmalarında tek seferde amplifiye olmayacağından dolayı üst üste çakışan parçalara ayırarak çalışmak tercih edilen bir yöntemdir (Bouwman vd., 2006; Dissing vd., 2007; Gao vd., 2007; Hummel, 2003; Krings vd., 1997). İnsan mtDNA'sının tam dizisi 1981 yılında Anderson vd. tarafından belirlenmiştir. İlk kez yapılan bu dizi, referans dizisi olarak kullanılmaya başlanmıştır ve Anderson ya da Cambridge Referans Dizisi (Cambridge Reference Sequence, CRS) olarak isimlendirilmiştir. Yapılan bu çalışmada molekülün tüm nükleotidleri numaralandırılmıştır (Martinez, 2015; Gustafson, 2007; Hoptay, 2013; Hummel, 2003; Daskalaki, 2014). 1999 yılında CRS dizini yenilenerek yayınlanmış ve rCRS (revised Cambridge Reference Sequence) olarak isimlendirilmiştir. Bu dizinin CRS den farkı ise mtDNA dizisinde düzeltilmiş ve doğrulanmış 18 nükleotit içeriyor olmasıdır (Andrews vd., 1999).

HVRI-II bölgelerinde mtDNA tamir mekanizmaları yer almadığı için nesiller boyunca mutasyonları belirli oranda biriktirmektedir. Mutasyonlar, rastlantısal gerçekleştiğinden, mtDNA'nın kodlama yapan ve yapmayan herhangi bir bölgesinde baz değişimlerine neden olabilir. Oluşan bu mutasyonlar, somatik doku hücrelerinde DNA mekanizmaları ile onarılırken dişi üreme hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar yeni nesillere polimorfizm olarak aktarılmaktadır (Wallace, 1994).

mtDNA'daki mutasyonların artışı ile 'heteroplazmi' adı verilen hem normal hem de mutant molekülleri içeren hücreler meydana gelir. Heteroplazmik mtDNA'lar mitoz ve mayoz bölünmeler sırasında yavru hücrelere rastgele dağılırlar. Bu rastgele dağılım sonucunda bazı hücrelerde mutant molekül oranı yüksek iken bazı hücrelerde de normal moleküllerin yüzdesi yüksektir. Bu yeni dağılım sonucunda oluşan hücrelere de 'homoplazi' adı verilmektedir (Wallace, 1994). Heteroplazmi farklı şekillerde görülmektedir; homoplazmik mtDNA içeren hücreler olabilir, her bir mitokondri homoplazmik olup farklı mtDNA içerebilir veya birbirinden farklı mtDNA tipleri içeren mitokondriler olabilir (Lutz-Bonengel vd., 2004). Heteroplazminin görülme sıklığı ve dağılımı net olarak bilinmemekle beraber, her insanda bir miktar heteroplazminin olduğu

düşünülmektedir. Farklı dokularda ve aynı dokunun farklı hücrelerinde dahi farklı oranlarda heteroplazmi görüldüğü araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Salas vd., 2001; Rudin ve Inman, 2002; Bini ve Pappalardo, 2005).

mtDNA dizilerindeki çeşitlilik coğrafi izolasyonun veya bariyerlerin olduğu popülasyonlarda yüksektir. Bu varyasyonlar ilk olarak Asya, Avrupa ve Afrika'dan toplanan örneklerin HpaI bölgelerine, RFLP analizi yapılmış ve analizin sonucunda etnik ve coğrafi farklılıklarda korelasyonun olduğu gösterilmiş. Dünyadaki 62 farklı popülasyondan 3065 mtDNA'da yer alan ve yüksek polimorfizm gösteren Avall, BamHI, HaeII, HpaI, HhaI ve MspI enzimleri ile restriksiyon bölgelerinin farklılıkları analiz edilmiş ve insan mtDNA çeşitliliğinin evrim sürecindeki birkaç temel ilkesi açıklanmıştır (Torroni ve Wallace, 1994). Özetle bunlardan bahsetmek gerekirse, ilk olarak mtDNA mutasyonları kuşaktan kuşağa aktarılırken birikim gösterir. İkinci olarak, bireylerin etnik ve coğrafi kökenleri ile mtDNA çeşitlilikleri arasında yüksek korelasyon vardır. Üçüncü olarak, mtDNA çok az rekombine olur ya da hiç rekombinasyon gerçekleştirmez. Dördüncü olarak, insan mtDNA'sı tek orijinlidir ve mtDNA ağacı tek bir koldan kıtalara yayılım gösterir. Son olarak, bireysel popülasyonlarda mtDNA dizi çeşitliliği en yüksek Afrika popülasyonlarında görülürken, sonrasında Asya ve Avrupa popülasyonlarında, en düşük olarak da Amerika yerlilerinde görülmektedir. Mitokondriyal DNA varyasyonları değerlendirildiğinde insanın ilk olarak Afrika kıtasına, sonrasında Asya ve Avrupa kıtalarına, son olarak ise Amerika kıtasına yayılım gösterdiği söylenmektedir (Wallace, 1994).



Şekil 1: mtDNA bölgeleri (Stoneking, 2017), ileri değişken bölgeler HVR-I (1) ve HVR-II (2) bölgeleri (Budowle vd., 2003).

mtDNA'nın maternal kalıtım göstermesi, hücrelerde yüksek kopya sayısına sahip olması, rekombinasyonunun gerçekleşmemesi ve mutasyon oranının D-loop bölgesinde yüksek olması sebebiyle antik DNA çalışmalarında önemli bir özellik taşımaktadır. Birçok dizi polimorfizmi D-loop kontrol bölgesinin mitokondriyal genomun başlangıcına yakın olduğunu göstermiştir (Torroni vd., 1994). HVR bölgeleri bireyler arasında oldukça değişkendir. Bireyler arasında %3 farklılık görülmektedir, yani bu rastgele seçilen iki

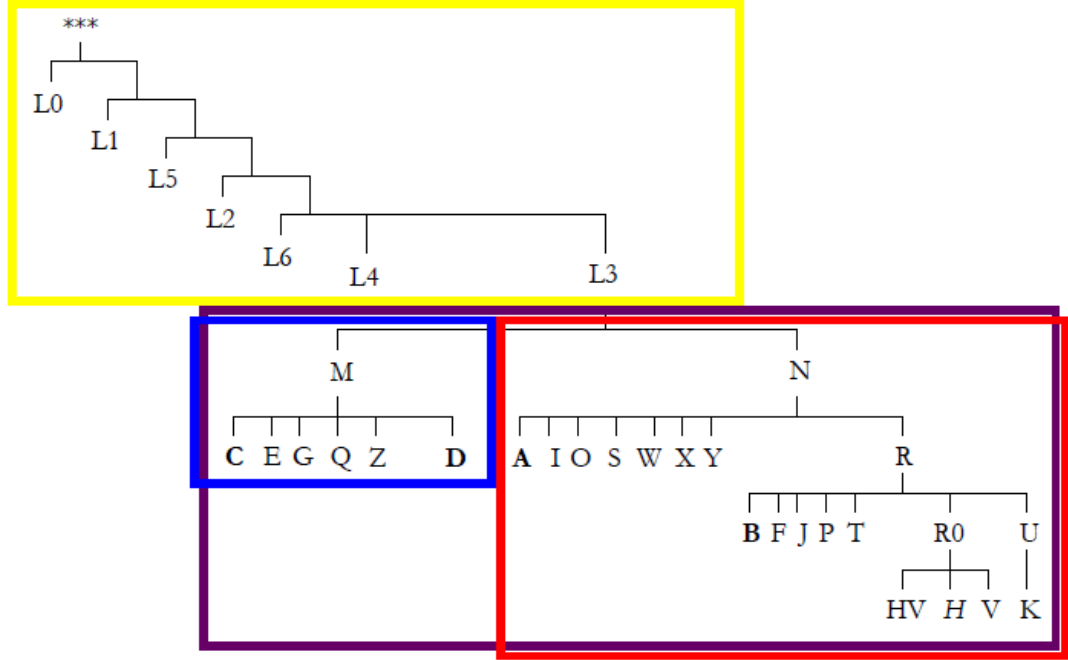
bireyin 100 bç'nin üçünün farklı olduğu anlamına gelmektedir. HVRI ve HVRII içinde polimorfik bölgeler düzgün bir şekilde dağılmamıştır, sıcak bölgeler (*hotspots*) göstermektedir. Bu bölgelerde ortalamadan 10 kat daha fazla mutasyon birikimi saptanmıştır (Brown ve Brown, 2011; Crawford, 2007; Hummel, 2003). aDNA çalışmalarında, bu sıcak bölgelerin en çok hasar gören bölgeler olduğu van Oven ve Kayser (2008) tarafından tespit edilmiştir. Yüksek derecedeki polimorfik bölgeler, bireylerin soyağacındaki yerlerini belirlemede kullanılabilir. Bu durum popülasyon genetiği çalışmaları için önem arz etmektedir.

mtDNA'nın farklı bölgelerinde yer alan mutasyonlara göre sınıflandırılan her bir çeşitliliğe haplogrup adı verilmiştir. Haplogrup isimlendirilmesini sistematik olarak ilk kez Richard vd. (1998) önermiştir. Ardından ise van Oven ve Kayser'in (2008) yaptığı çalışmada tüm haplogrupları içeren phylotree soy ağacı oluşturulmuştur. Bu haplogruplar, zaman içerisindeki dağılımlarına göre popülasyonların sürekliliğini ve göç yollarını belirlemede kullanılmaktadır (Brown ve Brown, 2011; Crawford, 2007). Mitokondriyal DNA haplogrupları filogenetik olarak sınıflandırıldığında coğrafik yayılımlarla değişkenlik gösterdiği görülmüş ve Afrikalıların L, Asyalıların B, Avrupa ve Batı Avrasyalıların H, I, J, K, Amerikan yerlilerinin de A, B, C ve D haplogruplarına özgün olduğu belirlenmiştir (Arias vd., 2018; Chen, Torroni ve Wallace, 1993,1994). Ancak zaman içerisinde kıtalar arası ulaşımın daha olanaklı hale gelmesi ve kültürel etkileşimlerin artışıyla bu haplogruplarda karışımların olduğu ve zaman içerisinde değişim gösterdiğini de dikkate almamız gerekmektedir.

Haplogrup çalışmaları günümüzde modern türlerin soy ağaçlarını, akrabalık ilişkilerini, göç yollarını belirlemede kullanılan etkili bir yöntemdir. Bunun yanı sıra son zamanlarda gelişen teknolojinin sunduğu imkanlar ve arkeolojik veriler üzerinde yapılan çalışmaların artışıyla da eski toplumlarda haplogrup çalışmalarının yapıldığı görülmektedir (Weissensteiner vd., 2016).

Haplogrup çalışmaları için öncelikle gerekli olan çalışılmak istenilen materyalin DNA kaynağıdır. Bu kaynak, modern örneklerde kolaylıkla elde edilse de arkeolojik örneklerde elde edilebilirliği daha kısıtlıdır. Antik DNA çalışmalarında biyoarkeolojik örnekler veri olarak kullanıldığı için DNA elde edilebilen materyaller iskelet, diş, koprolit, geçmişe ait

bitki ve tohumlar, müze örnekleri olarak saç ve deri, polenler ve korunmuş yumuşak dokular örnek olarak verilebilir (Brown ve Brown, 2011; Ottoni, 2011).



Şekil 2: Filogenetik ağaç (van Oven ve Kayser, 20019; Andrews, 1999). Sarı çerçevedeki haplogrpler Afrika orijinlidir. Mor çerçeve Afrika'dan çıkış. Mavi çerçeve, büyük bir çoğunluğu Asya topluluklarında görülmektedir. Kırmızı çerçeve Avrupa topluluklarında görülmektedir. M, N ve R den gelişen C, D, A, ve B haplogrpları ise yerli Amerikalıları temsil etmektedir.

mtDNA kimliklendirme çalışmalarında son derece yararlı bilgiler içermektedir. HVRI ve HVRII bölgelerinin küçük boyutlu olması PZR amplifikasyonu için idealdir. Bu iki bölgedeki yüksek mutasyon hızlarının olması ve tüm genomun monoklonal olması, kişileri kimliklendirmede kullanılan bir yöntemdir. Buna örnek olarak Rus Çarı, Romanov ailesinin son kuşağını belirlemede STR lokuslarının PZR ile tiplendirilmesinin ardından mtDNA haplogrplarına bakılıp bireyler arasında karşılaştırma yapılmış ve bireylerin kimliklendirilmesi gerçekleştirilmiştir (Gill vd., 1994; Ivanov vd., 1996; Caramelli vd., 2007). Bir diğer örnek olarak da, Keasthle ve Horsburgh (2002) yaptığı çalışma verilebilir. Bu çalışmaya göre bir genelevde bulunan bebek iskeletlerinin büyük bir çoğunluğunun cinsiyeti belirlenmiş ve erkek olduğu tespit edilmiştir.

Diğer yandan kromozomal DNA çalışmalarında nükleer DNA analizleri 1985 yılına kadar sadece taze ve çok miktardaki örnekler ile parçacık uzunluk polimorfizm (RFLP) yöntemi

kullanılarak çalışılmıştır. Kary Mullis'in PZR'yi tanımlaması ile az miktardaki örneklerde de DNA çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Mullis vd., 1986; Mullis ve Faloona, 1987, Brown vd., 2015). PZR, biyolojik örneklerdeki belirli bir DNA bölgesinin miktarını sayıca artırmak için kullanılan bir tepkime olarak bilinmektedir. PZR sistemine dayanan tüm yöntemler aracılığı ile sınırlı miktarda veya degrade olmuş örneklerde dahi (özellikle antik örnekler) DNA çoğaltılmasında başarılı olunmuştur (Rudin ve Inman, 2002). Diğer taraftan Jaffreys'in 1985 yılında genomdaki tekrar bölgelerinin kişilerde farklılık gösterdiğini bildirmesi ile ilk kez adli olguda kimliklendirmede kullanılmıştır (Jeffreys vd., 1985; Saferstein, 2004). Genomda farklı tekrar bölgeleri mevcuttur. Bunlar basit dizin tekrarları olarak isimlendirilen minisatellitler (VNTR) ve mikrosatellitlerdir (STR). Dinükleotid tekrarlarının, aDNA tiplendirilmesinde uygun nükleer DNA dizinleri olmadığı Ramos vd. (1995) çalışmalarında gösterilmiştir. Von Wurmb-Schwark vd., (2004) yaptığı çalışmada STR analizlerinde kullanılacak olan antik DNA miktarının 100 pg (pikogram) olması gerektiği belirtmiştir. Degrade olan antik örneklerin STR çalışmalarında PZR'deki döngüleri göz önünde bulundurularak enzimlerin ve örneklerin konsantrasyonlarının ayarlanması, başarılı olmayan çalışmalarda da optimizasyonun sağlanarak yeniden analiz edilmesi ve bu analizlerin doğru yorumlanabilmesi içinde uygun bilgisayar yazılımlarının kullanılması önerilmektedir (Schneider vd., 2004). Yapılan çalışmalar otozomal STR primerlerinin uzunluğunu azaltma yönünde gelişmiş ve kısa tekrar bölgeleri olarak isimlendirilen mini STR'ler elde edilmiştir. Mini-STR'lerin uzunlukları çok kısa olduğu için kemik ve saç gibi antik örneklerde kullanılmaktadır (Butler vd., 2003; Coble vd., 2006; Opel vd., 2006; Pizzamiglio vd., 2006; Asamura vd., 2007a, Fondevila vd., 2008). Degrade olmuş antik örneklerin Y-STR bölgelerinin analizleri için de mini Y-STR primerleri geliştirilmiştir (Asamura vd., 2007b). Antik DNA çalışmalarında elde edilen parçaların çok kısa olması nedeniyle analizlerde kullanılacak olan STR'lerin de kısa boyutlarda olması gerekmektedir (Dixon vd., 2006). Genom düzeyinde bireyler arasındaki baz farklılıkları belirli noktalarda yer alır ve tek nükleotid polimorfizmi (TNP) (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) olarak isimlendirilir. İnsanlarda hem nükleus DNA'sında hem de mitokondriyal DNA'da milyonlarca SNP bulunur ve bunlar kişilerin kimliklendirilmesinde (idendifikasyonunda) kullanılmaktadır. SNP analizleri için birçok analiz yöntemi vardır ve günümüzde de teknolojinin ilerlemesi ile birlikte bu analizlere yenisi eklenmektedir. SNP analizlerinde çalışılması hedeflenen bölge STR

analizlerindeki gibi 20-60 nükleotitden oluşmayıp sadece bir nükleotitden oluşmaktadır. Bu nedenle analizler daha başarılı sonuç vermektedir. Arkeolojik insan kalıntıları degradasyona açık olduğundan diğer yöntemlerin yanı sıra SNP analizleri kullanılarak da birey düzeyinde kimliklendirme yapılmaktadır (Hummel, 2003; Larcombe vd., 2005; Fondevilla vd., 2008).

1.3. CİNSİYET

Moleküler antropoloji çalışmalarında cinsiyet, genom çalışmalarında elde edilen cinsiyet kromozomlarının varlığı ile tespit edilmektedir. Biyolojik cinsiyeti belirlenen bireylerde demografik yapıdaki rollerinin anlaşılmasının yanı sıra bu kromozomlardan yola çıkarak göçler üzerine de yorumlar yapılmaktadır.

Antropoloji çalışmalarında bir topluluğu değerlendirebilmemiz ve topluluğun demografik yapısını ortaya çıkarabilmemiz için bazı bilgilere (yaş ve cinsiyet gibi) ihtiyaç duyarız ve bunlar arasında en önemlilerinden biri de bireylerin cinsiyetidir. Antropolojik analizler ile bireylerin yaşı ve cinsiyeti belirlene bilmektedir (Ubelaker vd., 1989). Ancak iskelet kalıntılarının eksikliği ve tahribatı gibi nedenlerden ötürü bireylerin cinsiyeti hakkında bir bilgiye ulaşmak bazen mümkün olmamaktadır. Bu durumlara ikincil gömüler sonrasında iskelet parçalarının bir bütün halde taşınmaması, kazalar ve kötü hava şartları sonucunda kemiklerin iyi korunmaması örnek olarak verilebilir. Bu gibi durumların yanı sıra çocuklarda ve bebeklerde ikincil cinsiyet özellikleri gelişmediğinden dolayı cinsiyet tayini yapmak pek mümkün olmamaktadır. Antropolojik yöntemler ile belirlenen cinsiyet tahminleri çevresel etkenlere maruz kalma ve bireyin işlevselliği nedeni ile her zaman biyolojik cinsiyet ile aynı olmamaktadır. Tüm bu durumlar göz önünde bulundurulduğunda biyolojik cinsiyeti tespit edebilmek için moleküler yöntemlerin kullanılması gerektiği yönünde araştırmacılar hem fikirdir.

Moleküler teknikler ile ilk cinsiyet tayini Y kromozomuna özgün bölgelerin çoğaltılması ile olmuştur (Hummel ve Herrmann, 1991, 1994). İlerleyen dönemlerde ise her iki cinsiyet kromozomunda (X ve Y kromozomu) da yer alan ve farklı uzunlukta olan amelogenin lokusları kullanılmaktadır. Amelogenin lokusu X kromozomunda 6 bç kadar daha kısadır. Yapılan analiz sonucunda dişi bireylerde sadece bir değer şeklinde görülürken, erkek

bireylerde iki birim biçiminde gözlenmektedir. Ancak bu yöntem bazı sorulara net olarak cevap vermemektedir. Antik DNA örneklerinde kısa parçalar görüldüğü kadar kaybolan olan bölgelerin varlığı da bilinmektedir. Bu nedenle tek kopya sayısından dolayı amelogenin bölgesi cinsiyet tayininde başarılı bir yöntem olarak kabul edilmemektedir. Yani erkek bireylerdeki amelogenin bölgesinin bir sebeple tahrip olmuş olması o bireyin cinsiyet tayininde hata yapmaya sebebiyet vermektedir. Amelogenin bölgeleri ile birlikte hem X hem de Y kromozomlarında bulunan alfoid tekrarları kullanılarak cinsiyet tayini gerçekleştirilmektedir. Y kromozomunda cinsiyet tayinini sağlayan bir bölge (*Sex-determining Region of Y chromosome*, SRY) yer almaktadır. Bazı araştırmacılar tarafından SRY bölgeleri için primer dizaynları önerilmiştir ve günümüzde de yenileri yapılmaya devam etmektedir (Drobic, 2006). Bu bölgelerde yapılan çalışmalar biyolojik cinsiyetin tespitinin yanı sıra gonozomal STR ve SNP bölgelerine de sahip oldukları için bireylerin kimliklendirilmesine ve babasoylu göç yollarının da belirlenmesine katkı sağlamaktadırlar (Butler, 2005). Y kromozomu sadece babadan kalıtılırken, mtDNA sadece anneden aktarılmaktadır. Bu iki bölgede bir önceki kuşağın genetik özelliklerini taşır ve mutasyon noktalarını biriktirerek sonraki kuşaklara aktarır. Bu bölgelerde yapılan analizler genotip düzeyinde değil haplotip düzeyinde gerçekleşir. Bireyler tek alel içermektedir (Butler, 2005). Bireyin DNA dizisinde yer alan polimorfizmler '*Haplotipler*', polimorfizmlerin ilişkili olduğu (haplotiplerin) gruplar da '*Haplogruplar*' olarak isimlendirilmektedir. Haplogruplar genetik popülasyonları tanımlamak için kullanılır (Klug-Cummings, 1990; Jones, 2007). Mitokondriyal DNA ve Y kromozomlarında bulunan bu özellikler kuşaklar boyunca değişime uğramadan aktarılmaktadır (mutasyonlar hariç). Bu özellik sayesinde insan hareketliliği üzerine çalışmalarında toplulukların anasoylu ve babasoylu hareketlerini takip etmek ve evrimsel süreçte insanların dünyaya yayılımlarının hangi rotalar üzerinde olduğunu belirlemek mümkündür (Cavalli-Sforza ve Feldman, 2003). Bu bölgelerde birey bazındaki değişimleri de saptamak mümkündür. mtDNA için SNP'ler, Y kromozomu için de Y-STR ve Y-SNP' ler analiz edilebilmektedir (Butler, 2005).

Y kromozomları aynı soydan gelen tüm erkek bireylerde aynı genetik yapıya sahiptir. Y kromozomunda bireylerin kimliklendirilmesi gereken çalışmalar yapılırken Y-STR ve Y-SNP bölgeleri önem kazanmaktadır. Bu bölgeler bireyler arasındaki farklılıkları verdiği için kimlik tespitinde kullanılmaktadır. Arkeolojik insan kalıntılarında babalık olgularının

çözümlemesinde Y kromozomu çalışılmaktadır. Evrimsel süreçte göç yolları araştırılırken Y-SNP'ler haplogruplar arasındaki farklılıkları tanımlamada daha uygun bir analiz yöntemi olarak kullanılırken Y-STR'ler de haplogruplar içerisindeki yakın ilişkili verilerin analizinde kullanılmaktadır (Underhill vd., 1997; Cinnioglu vd., 2004). İnsan evrimi çalışmalarında ve modern insanın göç yollarını belirlemede yürütülen çalışmalar tek nükleotit polimorfizmi çalışmaları ile de yapılmaktadır.

1.4. ANTİK DNA'DA KULLANILAN BİYOARKEOLOJİK MATERYALLER

Antik DNA çalışmasında kullanılan biyoarkeolojik materyaller arasında; diş, kemik, korunmuş yumuşak dokular (deri, kıl), koprolit, polenler, bitki tohumları ve hayvanlara ait çeşitli dokular sayılabilir.

Arkeolojik diş örnekleri kemiğe göre daha az kontamine olmaktadır (Gilbert vd., 2005). Diş örneklerinden nükleer DNA eldesi daha yüksek düzeydedir. Daha başarılı amplifikasyonlar elde edilebilir (Ricaud vd., 2005; Meyer vd., 2000). Nelson ve Melton (2007), 116 iskelet üzerinde yapmış olduğu çalışmada diş örneklerinin femur örneklerine göre daha yüksek oranda (%90) DNA sağladığını göstermiştir.

Diş temel olarak taç ve kök olmak üzere iki temel yapıdan oluşmakla birlikte, mine, dentin, pulpa ve sement olarak adlandırılan doku tiplerini de içermektedir. Mine dokusu tacın görünen kısmını kaplamaktadır. Dişin en sert dokusunu mine tabakası oluşturmaktadır. Bu da diş etkenlere karşı dişi koruduğu anlamına gelmektedir. Mine tabakasının %97'si inorganik maddelerden oluşmaktadır ve hidroksiapatit içerir. Bu inorganik yapı sayesinde de DNA daha iyi bir şekilde korunabilmektedir. Mine tabakasının altında bulunan bir diğer sert doku ise dentindir. Dentin, mineye nazaran daha yumuşak olsa da kemik dokularından daha fazla kalsiyum fosfat (%75) ve daha az kolajen (%18) içerdiği için daha sert yapıdadır. Sement tabakası ise dişin kök yüzeyini örten çok ince bir yapıdır. Diş özü olarak isimlendirilen pulpa içerisinde kan damarları ve sinirlerden oluşan yumuşak bir doku yer almaktadır (Scott, 2008). Bu yapı moleküler antropoloji çalışmalarındaki en önemli kısımdır. Pulpa içerisinde genetik materyal bolca bulunduğu gibi dişin konumunda da en saklı bölgede olması kontaminasyonu en düşük seviyede tutmaktadır. Dişin bir diğer avantajı ise çevresel faktörlerin optimize olmadığı durumunda (sıcaklığın 4°C-37°C, nemin %20-%98, pH'nın 3,0-10,0 farklı olduğu) dahi

dişten elde edilecek DNA miktarında çok fazla bir değişiklik olmamasıdır (Schwartz vd., 1991).

Diş örneği çalışılırken toz haline getirme, kesme, diş kanalı yoluyla pulpaya girme yöntemleri kullanılmaktadır (O'Rourke vd., 2000). Bu yöntemlerden en iyi DNA eldesini sağlayan toz haline getirme yöntemidir. Ancak kontaminasyona da en açık yöntem olduğu için dikkatli çalışılmalı ve uygun materyaller kullanılmalıdır. Diş tozunu elde ettiğimizde farklı renkler gözlemlenmektedir. Bu renk farklılıkları amplifikasyonun başarısının kıyaslanabildiği bir kriter olarak değerlendirilmemektedir (Drancourt vd., 1998). Diş genetik materyal açısından kullanımı her ne kadar iyi bir örnek olsa da dişte bulunan patolojik olgular kontaminasyona sebebiyet vermektedir. Dolayısıyla sağlam dişler seçilmeli ve kök kanalları kapalı olan dişler tercih edilmelidir (O'Rourke vd., 2000).

Kemik antik DNA çalışmalarında bir diğer biyoarkeolojik örnek olarak kullanılmaktadır. Hem kazılarda elde edilme oranı hem de aDNA çalışmalarında olumlu izolasyon ve amplifikasyon sonuçlarını vermesi kullanılabilir bir materyal olmasını sağlamıştır (Höss vd., 1996; O'Rourke vd., 1996). Tuross (1994) yaptığı çalışmada yumuşak dokulara kıyasla kemik örneklerinden daha fazla miktarda DNA elde edildiğini desteklemiştir. Nitekim son dönemde yapılan çalışmalarda bazı kemiklerin (*Pars petrosa*) belli noktalarının antik DNA elde edilebilirliği açısından çok daha verimli olduğu gösterilmiştir (Pinhasi vd., 2018; Alberti vd., 2018).

Süngerimsi kemikte aDNA eldesi kompakt kemiklerden daha fazla oranda gerçekleşede kontaminasyona daha açık olduğu yapılan çalışmalar ile desteklenmiştir. Bu nedenle süngerimsi kemikler çalışmalarda tercih edilmemektedir (O'Rourke vd., 1996; Lee vd., 1991). Fakat O'Rourke vd. (2000) çalışmasında her ne kadar kontaminasyona daha çok açık olsa da süngerimsi kemik olan kaburgaların tercih edilmesini önermektedir. Bu tercihin sebepleri arasında her birey için fazla sayıda bulunuyor olması, müze ve arkeolojik koleksiyonlarda tercih edilmemeleri ile en az morfolojik ve paleopatolojik öneme sahip olmaları yer almaktadır. Kontaminasyonun için bir diğer önemli kriter ise örneklerin saklanma durumudur. Hagelberg vd. (1991) yaptığı çalışmada kemik örneklerinin korunumunun mikroskobik düzeyde önemli olduğunu ve aDNA eldesi için bu kriterin önemli olduğunu vurgulamıştır. Aynı çalışmada

biyoarkeolojik örneklerin yaşı ile aDNA eldesinin doğrudan bir ilişkisi olmadığı ve örneğin saklanma koşullarının etkili olduğu ifade edilmiştir (von Wurm-Schwark vd., 2003).

Biyoarkeolojik materyallerin aDNA çalışmasında kullanımı için önemli olan bir diğer kriter ise patolojik öneme sahip olan kemiklerdir. Bunlar çok sık rastlanmayan ve rastlandığı zamanda topluluk hakkında birçok fikir vereceği için genellikle nadir parçalar olarak tanımlanır ve büyük bir özen ile korunurlar. Bu tür örnekler genetik analizlere tabi tutulurken çalışmanın amacına dikkat edilmelidir. Eğer patolojiye sebep olan bakterinin veya diğer mikroorganizmaların evrimi çalışılmayacak ise patoloji içeren örnekler seçilmemelidir. Aksi durum çalışmanın sonucunu olumsuz yönde etkileyebilir.

Kontaminasyona sebep olarak örneklerin korunumu da değerlendirilebilir. Kemik ve çevre şartlarına bakıldığında kemik degradasyonu iki biçimde gerçekleşmektedir. Bunlardan biri çevredeki mikroorganizmalar tarafından hızlı bir biçimde gerçekleşir. Bir diğeri ise kimyasal olarak gerçekleşir ve yavaştır (Smith vd., 2003). Diyagenez parametreleri 4 maddede ele alınabilir. Bunlar örneğin porozitesi (su alabilme kapasitesi), kristalliğin artması, histolojik bütünlük ve kolajen içeriğidir. İlk iki madde kimyasal dayegeneze yol açarken diğer ikisi biyolojik dayegenezin oluşmasına yol açar (Hummel, 2003).

Kemik yapısında bulunan kolajen ve hidroksiapatit (HYA) arkeolojik kemik örneklerinde önemli olan iki moleküldür. DNA hidroksiapatite bağlanarak stabil bir şekilde korunur. Bu nedenle de moleküler çalışmada bu özellik önemli bir kriter olarak değerlendirilmektedir (Götherström vd., 2002). Hidroksiapatitteki kristalleşme DNA varlığı ile ters orantılıdır. Kristalleşme arttıkça DNA miktarında azalma görülmektedir. Kemik %70'ini hidroksiapatit oluşturur (hidroksiapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), %39,8 Ca (kalsiyum) ve %18,5 P'dir (fosfor) (Burton, 2008). Kalsiyumun kemikteki kaybı fosfordaki artış ile dengelenir. Ca dış ortama verilirken P dış ortamdaki başka bir element ile yer değiştirir. Bu kimyasal bozulma yetişkin-altı bireylere ait iskeletlerde yetişkin bireylere göre daha fazla gerçekleşmektedir. pH'ın düşük olduğu ortamlarda mikrobiyal aktiviteler sonucunda hidroksiapatit sulu asidik kalsiyum fosfat minerallerine dönüşür. Bu nedenle kazıdan toprak örneği alınarak pH değeri belirlenir ve hasarın etkeninin toprak olup olmadığı değerlendirilir. Hidroksiapatitin en kararlı hali pH 7,8'de dir. pH 6-7 arasında hidroksiapatit oktakalsiyum fosfata dönüşür (Jackes vd., 2001). Çevrede bulunan su,

hidroksiapatitin parçalanmasında en büyük etkidir. Asidik topraklarda kemiğin yapısında bulunan kalsiyum fosfat çözülerek hidroksiapatit parçalanır. Kireç taşı ve çömlek gibi alkali yapılar kemikte bulunan hidroksiapatit, asitin degradatif etkilerine karşı korur.

Arkeolojik buluntular aynı ortamda farklı korunma durumlarına sahip olabilirler. Kemik yanında bulunan ölü gömme hediyesi olarak bir çömlek veya kireç taşının bulunması kemiklerdeki apatiti koruyabilir. Bunun yanı sıra su alan mağara kenarlarında gömülü olan ya da lahit gömülerde lahit için su ile dolması kemiklerdeki apatiti bozabilir. Ayrıca bakır gibi metal içeren objeler mikroorganizmaların gelişmesine ve yaşam koşullarına uygun ortam sağlamadığı için bu objelerin bulunduğu bölgedeki kemiklerde iyi korunma özellikleri görülmektedir (Bollongino vd., 2008).

Kemik yapısında etkili olan bir diğer yapıyı ise organik proteinler oluşturmaktadır. Kolajen tip 1 kemiğin ana yapısını oluşturan organik yapıdır. Kolajen tip 1 kanda çözünmüş şekilde bulunur. Hidroksiapatit minerali organik matrikste sentezlenir ve katlanan kolajen molekülleri arasındaki boşluklara yerleşir. Bu nedenle kolajen korunması, hidroksiapatit korunması ile ilintilidir (Götherström vd., 2002; Schweitzer vd., 2008). Arkeolojik kemiklerde DNA varlığı ile kolajen miktarı arasında ilişki bulunmaktadır (Götherstrom vd., 2002). Yüksek miktardaki kolajen kaybı, mikroorganizmalardan kaynaklıdır. Bu kayba yol açan mikroorganizma ise genellikle *Clostridium histolyticum* olarak bilinmektedir. Bu mikroorganizma kollajeni parçalayan kolajenaz enzimini üretir ve kemikteki kolajenin histolojik yapısını bozar (Hedges vd., 2002; Jackes vd., 2001). Ek olarak, çok sıcak hava koşullarında da kolajen kaybı gözlenmektedir (Hedges vd., 2002). Yapısal olarak iyi korunmuş arkeolojik kemik örneklerinde de kolajen kaybı farklı nedenlere bağlı olarak görülmektedir. Bunlar %20 ağırlık kaybı ve %50 porozite artışının görüldüğü örneklerdir (Smith vd., 2002; Hedges vd., 2002). Canlı kemik dokusundan farklı olarak, porozitenin artışı ile yoğunlukta azalma görülmektedir. Böylelikle poroziteye uğrayan kemiğin dış yüzeyinde kalsiyum karbonat birikimi artmaktadır (Jackes vd., 2001; Nielsen-Marsh ve Hedges, 1999; Gilbert vd., 2005).

Kolajen tip 1'in yanı sıra kemik dokuda önemli olan diğer protein ise osteokalsindir. Osteokalsin kemik dokudaki mineralleri bağladığı için antik DNA çalışmalarında analiz edilen moleküller arasında yer almaktadır (Nielsen-Marsh vd., 2005; Buckley vd., 2008).

Bollongino (2008) çalışmasında Yakın Doğu (Kıbrıs, İsrail, Suriye, Türkiye ve Gürcistan) bölgesinde elde edilen örneklerin Avrupa'dan elde edilen kemik örneklerine göre daha fazla porozite sahip olduğu ve daha yumuşak yapıda bulunduklarını tespit etmiştir. Ayrıca araştırmacılar bu örneklerden DNA eldesinin zor olduğunu rapor etmiştir. Avrupa örneklerinde ise toprak yapısı ile amplifikasyonun arasında bir ilişki olduğu; kireçli topraklardaki amplifikasyonun başarılı, asidik topraklarda ise amplifikasyonun başarısız olduğu belirtilmiştir (Bollongino vd., 2008).

1.5. TOPLULUK DÜZEYİNDE ANTİK DNA ÇALIŞMALARI

İlk antik DNA çalışması Higuchi vd. (1984) tarafından nesli tükenmiş olan *Equus quagga* ait müze örneğinden yapılmıştır. Araştırma sonucunda modern zebra türleri ile filogenetik bir yakınlık olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmanın ardından da Pääbo (1985), Mısır Uygarlığına ait 2400 yıllık bir çocuk mumyasından aDNA dizisini başarı ile elde etmiştir. Pääbo'nun yapmış olduğu bu son çalışma ile yaklaşık 3 kb DNA parçasının dizilenebildiğini göstermiştir. Diğer taraftan herbaryum ve müzelerde bulunan mamut örneklerinden antik DNA çalışmaları başarıyla gerçekleştirilmiştir (Johnson vd., 1985; Rogers ve Bendich, 1985). İlk yıllarda yapılan bu çalışmalarda antik DNA'nın elde ediminde öncelikle bir vektöre gereksinim duyulması, vektöre kopyalanan klonların da dizilenmesi gerektiğinden fazla miktarda antik DNA izole edilmesine ihtiyaç duyulmuştur. PZR'nin keşfi ile birlikte bu problem aşılmıştır.

PZR sonrasında yapılan ilk antik DNA çalışması Hagelberg vd., (1989) tarafından gerçekleştirilmiştir. Hagelberg vd., (1989) arkeolojik yerleşimden ele geçen kemik örneklerinden aDNA'yı başarılı bir şekilde izole ederek çoğaltmıştır. Bu başarılı çalışmanın ardından dünyanın birçok farklı bölgesinden arkeolojik örnekler çalışmaya başlanmıştır. Arkeolojik yerleşimlerden elde edilen insan iskelet kalıntılarından yapılan analizlerle bireylerin cinsiyet tayinleri, idendifikasyonları ve genetik özellikleri belirlenmiştir. Elde edilen bilgilerden yola çıkarak eski toplumların göç yolları çalışılarak topluluklar arasında biyolojik yakınlık-akrabalık çalışmaları yürütülmüştür (O'Rourke vd., 2000).

Birey düzeyinde yapılan antik DNA çalışmaları, bireylerin cinsiyetlerini belirleme ve kimliklendirme analizlerini içerir. Antik DNA'da kullanılan idendifikasyon yöntemi adli bilimlerde kullanılan metotlarla benzerlik göstermektedir. Bu uygulama ile bireyler tespit

edilir ve farklı gömü alanlarındaki kemik parçaları aynı bireye ait ise belirlenebilir. Morfolojik olarak tespit edilen patolojiler de kimliklendirmede kullanılabilir. Ayrıca antik DNA çalışmalarıyla bu patolojilerin kaynakları da belirlenebilmektedir (Donoghue vd., 2004, 2015; Kaestle ve Horsburgh, 2002; Köksal, 2012; Pepperell vd., 2011; Müller vd., 2014; Perrin, 2015).

Morfolojik olarak tanımlamanın yetersiz kaldığı ve kişiye özgü patoloji gibi belirteçlerin de bulunmadığı durumlarda, eksik ve/veya yetersiz olan insan kemik kalıntılarının söz konusu olduğu durumlarda yürütülecek olan DNA analizleri ile doğru sonuçlara ulaşmak mümkündür (Hummel, 2003). Örneğin, iki grup şeklinde gömülmüş olan Hirohata ve Hanaura kazı alanlarında (Japonya) VNTR bölgeleri kullanılarak bireylerin kimliklendirilmesi yapılmıştır. Ancak o dönemki olanaklar çerçevesinde allel frekansı hakkında yeterli bilgiye sahip olunmadığı için akrabalıkları hakkında net bir sonuç elde edilememiştir (Kurosaki vd., 1993). Harz Dağında yer alan Lichtenstein Mağarasında Geç Tunç Çağına tarihlendirilmiş olan gömüler 1972'de ele geçmiştir (Schweitzer vd., 2008). Gömüler insan ve hayvan kalıntıları içermektedir. Stabil düşük ısı da, alçı taşı, kireç ve silisli tortu tabakaları ile kaplı olarak ele geçirilen kalıntıların korunma durumu çok iyi olarak rapor edilmiştir. Femur, tibia ve iki bireye ait pelvis kemiklerinden mtDNA, Y kromozomu ve STR analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda femur ve tibialar ile bir adet pelvis kemiği aynı bireye ait olduğu belirlenmiş ve diğer pelvis kemiği de başka bireyi göstermiştir.

Antik DNA çalışmalarında biyolojik cinsiyeti belirlemek için X ve Y kromozomları üzerindeki belirli noktalar kullanılır. Biyolojik cinsiyetin belirlenmesi antropolojik analizler ile belirlenen cinsiyet tayinlerini doğruladığı gibi antropolojik yöntemler ile belirlenemeyen bireylerin (bebek ve çocuklar, tam olmayan iskelet kalıntıları) cinsiyetini tespit etmek de önemli bir yere sahiptir (Stone vd., 1996; Kaestle ve Horsburgh, 2002; Imaizumi vd., 2005). Pompei arkeolojik alanında yapılan bir araştırmada incelenen eski insan kalıntılarının cinsiyetleri moleküler analizler ile belirlenmiş ve antropolojik yöntemlerle belirlenen 13 bireyin üçünün cinsiyetinde hata olduğu belirlenmiştir (Cipollaro vd., 1998). Çayönü arkeolojik yerleşim alanında, on bireye ait kafatası kemikleri kullanılarak moleküler cinsiyet tayini uygulanmış ve on bireyden dokuzunda antropolojik cinsiyet tayini biyolojik cinsiyet ile doğrulanmıştır (Matheson ve Toy, 2001). Mekel-Bobrov ve

Lahn'ın (2004) yaptığı çalışmada ise Tell Kurdu (Kalkolitik Dönem) arkeolojik yerleşim alanında elde edilen insan kalıntılarında biyolojik cinsiyet tayini yapılmış ve %64 doğru sonuçlar elde edilmiştir. Francesco Petrarca'nın 2003 yılında açılan mezarından alınan farklı kemiklerde biyolojik cinsiyet ve antropolojik analiz yöntemleri farklı sonuçlar vermiştir. Kaburga kemiklerinin erkek bireye ait olduğu ve diş örneklerinin de dişi bir bireye ait olduğu tespit edilmiştir (Caramelli vd., 2007; Pilli vd., 2008).

Antropoloji alanında soy ağaçları önemli bir yere sahiptir ve moleküler antropoloji ile de bu alandaki bilgiler hızla genişlemektedir. Antik DNA çalışmaları ile birlikte bireyler sadece aile içindeki genetik kompozisyonu ile değil yaşadığı topluluk ve çevre toplulukları arasındaki genetik kompozisyonu dahilinde de değerlendirilmektedir. Akrabalık ilişkilerini belirlemek için birey identifikasyonunda kullanılan mtDNA ve Y kromozomuna ait belirteçler kullanılmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkarak da anasal ve babasal soy ağaçları belirlenmektedir. Birey identifikasyonunda kullanılan DNA bölgelerinin incelenmesi sonucunda, aynı coğrafyadan ve aynı polimorfizimleri barındıran bireylerin akraba olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu polimorfizimlerin ebeveyn tespitinde kullanılması güvenli bir yol değildir. Bu bireylerdeki annelik ve babalığı kesin sonuçlarla söyleyebilmek için otozomal düzeyde çok fazla yüksek değişkenlik gösteren bölgelere bakmak gerekmektedir (Kaestle ve Horsburgh, 2002).

Arkeolojik insan kalıntılarında akrabalık düzeyini belirlerken ölü gömme uygulamaları ve sosyal yapı üzerine çıkarımlar yapılsa da toplumsal olarak kan bağı olmayan kişilerde de akrabalık uygulamalarının olabileceğinden dolayı net sonuçlar elde edilemez. Bu nedenle genetik verilerden elde edilen bilgiler ile daha güvenilir bilgilere ulaşılabilir (Kaestle ve Horsburgh, 2002; Keyser-Tracqui vd., 2003; Hummel, 2003). Clisson vd. (2002) çalışmasında Kazakistan'ın doğusunda bulunan bir yerleşimde korunmuş vaziyette iki iskeletten kas, kemik ve beyin dokularından DNA elde edilmiş ve mtDNA ile STR analizleri yapılmıştır. Yumuşak dokularında PZR inhibisyonunun yüksek olması nedeni ile sonuçları verimli olmamakla birlikte kemik dokusundan başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmada yer alan bireylerin farklı cinsiyette olması ve aynı tümölüs içerisinde gömülü olması akla akrabalık ilişkilerinin olup olmadığı sorusunu getirmiş. Bunun üzerine çalışmanın ilk aşamasında her bir lokusta ortak alelin bulunmasından dolayı birincil akrabalık ilişkilerinin; anne-oğul, baba-kız veya erkek kardeş-kız kardeş

olabileceğini göstermiştir. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında lokus sayısı artırılarak paylaşılan ortak aleller incelenmiş ve birincil ihtimalde kuvvetli olan anne-oğul ile baba-kız olasılığı doğrulanmamıştır. mtDNA analizleri sonucunda görülen üç mutasyondan, bireylerin anasal soydan akraba (yani erkek kardeş- kız kardeş) olma olasılıkları da değerlendirme dışı bırakılmıştır. mtDNA ve STR analizlerinde uygulanan yöntemlerin sonucunda bireylerin akrabalık dereceleri üzerine yapılan yorumlar bireylerin evli çift olabileceği olasılığını daha güvenilir hale getirmiştir.

Akrabalık ilişkilerini çözümüleme de mtDNA ve STR analizlerinin yanı sıra mikrosatellitler de kullanılmaktadır. Çözünürlüğü her ne kadar düşük olsa da bireylerin akrabalıklarını belirlemede kullanılmaktadır. Üstelik günümüzde de babalık testlerinde uygulanan yöntemler arasında yer almaktadır. Moğolistan'da bulunan nekropolden kazı çalışmaları sonucunda açığa çıkarılan 56 iskelette mikrosatellit çalışılmış ve %84'ünde başarılı sonuçlar elde edilerek akrabalıkları belirlenmiştir (Keyser-Tracqui vd., 2003). Adachi vd. (2003) tarafından Japonya'da Hokkaido yapılan çalışmada, arkeolojik yerleşim alanından elde edilen iki bireyin anasal soydan akrabalıklarının olduğu tespit edilmiştir. STR çalışmaları ile de aile düzeyinde akrabalıklar belirlenmeye çalışılmıştır. Bu yöntemle örnek olarak Hindistan'nın köy ve şehirlerindeki mezarlıklarda yapılan çalışmalar verilebilir. Şehir ve köy mezarlarında farklılıkların olduğu, köydeki mezarlıklarda genetik yakınlığın şehirdeki mezarlıklara göre daha az olduğu yapılan çalışma sonucunda gösterilmiş (Sivilich, 2005). Bir başka örnekte İspanya 'da arkeolojik alandan ele geçirilen 39 diş ve kemik örneğine mtDNA analizleri uygulanmış ve bireylerin birbirlerine benzerlikleri yüksek çıkmıştır. Bu örneklerin haplogrup dağılımı da Avrupa örüntüsüne benzemektedir. Bu çalışmadan yola çıkarak aynı mtDNA haplogruplarını taşımak her ne kadar anasal soyu gösterse de aynı ataya sahip olmaları gerektiğini doğrulamayacağından Fernandez vd., (2006) tarafından ileri analizler yapılması önerilmiştir. Lajia (Çin) bölgesinde doğal afet sonucu ele geçirilen 16 bireyden elde edilen diş örnekleri ile mtDNA analizleri yapılmış ve antropolojik analizler ile karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda ise 14 bireyin birbiri ile kardeş, anne-oğul ilişkisi olduğu belirlenmiştir (Gao vd., 2007). Miken Uygarlığına ait mezarlıkta yapılan araştırmada DNA analizlerinin yapıldığı bireylerden ikisinin kardeş olduğu saptanmıştır (Bouwman vd., 2008).

Toplum düzeyinde antik DNA çalışmaları da alanda önemli bir yere sahiptir. Yapılan araştırmalar sonucunda yeni popülasyonların son 10 bin yıl içerisinde Avrupa'ya göç ettikleri ve beraberinde tarımı götürdükleri düşünülmektedir (Brown, 2006). Orta Doğulu Erken Neolitik topluluklarının arpa ve buğday ekerek avcılıktan tarıma geçişleri 10-12 bin yıl önce gerçekleşmiştir. Evcilleştirilen bitkilerin kalıntıları incelenerek Avrupa'ya tarımın iki rota üzerinden geldiği ileri sürülmüştür. Bunlardan ilki Akdeniz sahilinden İspanya'ya ve sonrasında İngiltere'ye ikincisi ise Ren ve Tuna vadilerinden Kuzey Avrupa'ya doğru olduğu bilinmektedir.

Günümüz Avrupalıları arasında mtDNA haplogruplarının on bir kadar farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bilinen en eski haplogrup 50 bin yıl önce Avrupa popülasyonlarında görülmüştür. Tarıma geçiş ile yeni haplogrupların da (T1 ve J) olduğu düşünülmüştür ve modern Avrupa popülasyonlarında bu haplogrupların ifade edilme oranlarının %8,3 olduğu bilinmektedir (Brown, 2006).

Popülasyon genetiği çalışmaları çerçevesinde popülasyonda yer alan genlerin dağılımı ve bu genlerin ve genotiplerin frekanslarının nasıl değiştiği ve korunduğu araştırılmaktadır. Bunun yanı sıra farklı popülasyonların birbiri ile olan ilişkilerini de anlamak için popülasyon genetiği çalışmaları yapılmaktadır. Orta Çağ mezarlığı olan Almanya'nın güneyindeki bir arkeolojik alanda 38 iskelet kalıntısından genetik analizler yapılarak popülasyonlar arasındaki yakınlık belirlenmiştir (Scholz vd., 2001). Yakutlardan elde edilen arkeolojik iskelet buluntuların STR ve mtDNA analizleri sonucunda modern Saka popülasyonları ile eski Yakut popülasyonları arasında ilişkilerinin olduğu popülasyon genetiği analizleri ile belirlenmiştir (Ricaud vd., 2004, 2006). İspanya'nın doğusundan elde edilen 21 kemik, 15 diş örneklerine (farklı 36 bireye ait) mtDNA analizleri yapılmış ve bu popülasyonun İber Yarımadasındaki tarih öncesi Afrika popülasyonlarına genetik olarak benzedikleri sonucuna varılmıştır (Gamba vd., 2008).

Popülasyon genetiği çalışmalarında elde edilecek olan bir başka bilgi ise popülasyonun ana yerli mi yoksa baba yerli mi olduğudur. Bu tür çalışmalara örnek olarak Lajia arkeolojik alanında (Çin'in Pompeii'si olarak da ifade edilmektedir) yapılmış olan popülasyon genetiği analizleridir. Elde edilen bilgiler ışığında popülasyonun genetik yapısı anasal soylu değil babasal soylu olduğu ve birden çok ailenin de birleşerek Lajia topluluğunu oluşturduğu bilinmektedir (Gao vd., 2007; Zhang vd., 2004).

Yerleşim içerisinde arkeolojik materyaller ile bulunan kalıntılara dair bazı yorumlar yapmak kolay olsa da doğal olarak mumyalaşmış ve etrafında çok fazla ipucu olmayan kalıntılarda bir kurgu yaratmak daha zordur. Bu gibi durumlarda ise elimizde olan bilgiler arkeolojik analizlerin/incelemlerin yanı sıra genetik verilerinin olmasıdır. 1991 yılında Avusturya-İtalya Alplerinde bulunan 5300 yıllık bir mumya birçok araştırmacı için konu olmuştur. Adına Tyrolean Buz adamı-Ötzi denilmekte olan ve Neolitik dönemde yaşamış olan bu mumyanın nasıl öldüğü, ölmeden önceki öğününde neler tükettiği, vücudunda yer alan dövme izlerinin ne amaç ile yapıldığı, elde edilen genetik veriler ışığında morfolojisinin ne olduğuna dair bilgiler ile yüzünün yeniden şekillendirilmesi çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca hala çalışmaların sürdüğü ve bu çalışmalarda da ilk ele alınan sorular günümüz o bölge insanları ile olan genetik benzerliğinin ne olduğu yönündedir (Colson vd., 1997; Handt vd., 1994; Rollo vd., 1994).

Kuzey Avrupa'da yapılan çalışmalarda mitokondriyal DNA haplogruplarına bakılmış ve 7 bireyden elde edilen sonuçların büyük mtDNA haplogruplarına ait olduğu bulunmuştur. Ayrıca Amerika'nın Batı İllionis arkeolojik alanında kalıntılardan elde edilen DNA verilerinden mtDNA haplogruplarının A, B, C, D haplogruplarına ait olduğu bulunmuştur. Utah'ın kuzey bölgesinde elde edilen 43 ve Güneybatısında elde edilen 40 örnekte mtDNA çeşitlilikleri araştırılmış ve her iki coğrafi bölgedeki haplogrup profillerinin benzer oldukları ve modern güney batı topluluklarıyla da mtDNA profillerinin benzerlikleri olduğu tespit edilmiştir (Colson vd., 1997; Stone ve Stoneking, 1993, 1999; O'Rourke vd., 1996, 2000; Parr vd., 1996; Carlyle vd., 2000).

Çinde genetik çeşitliliğin sistematik araştırmalarını yapmak için Oota vd., (1995,1999) Shandong bölgesindeki Yixi arkeolojik alanından çıkarılan 58 diş ve kemik örneklerinin (örnekler 2000 yıllık) mtDNA HVRI-II bölgelerine ait veriler elde etmişlerdir. Çalışma sonucunda elde edilen antik DNA bilgileri modern popülasyonlar ile karşılaştırılmış ve Tayvan popülasyonu ile Yixi popülasyonlarının genetik olarak benzerlikleri saptanmıştır. Jomon popülasyonuna ait örneklerin de Yixi popülasyonundaki örneklere benzerlikleri Okyanusya ve Güneydoğu Asya popülasyonlarının mtDNA verilerine oranla daha çoktur (Oota vd., 1999; Horai vd., 1989, 1991).

Arkeogenomik çalışmaların bir diğer amacı da geçmiş dönemde yaşamış olan popülasyonların genetik verilerini belirlemenin yanı sıra, o dönemki çevre koşullarının da

ne olduğunu anlamaya çalışmaktır. Ekosistem içinde yer alan faunal ve floral türler hakkında bilgilere ulaşılabilmektedir. Bunlardan hangilerini beslenme amaçlı tükettiklerini hangilerini evcilleştirdiklerine dair araştırmalar da yapılmaktadır. Tüm çalışmalara ek olarak da popülasyonun kültürel adaptasyonunun ne olabileceğini çıkarsamamıza yardımcı olacak ipuçlarına ulaşılabilir. Çalışılabilecek olan örnekler ise; tohumlar, koprolitler, sondaj örnekleri, parşömenler, boyalar ve toprak analizleridir. Tüm örneklerden paleoekolojik çalışmalar yapılabildiği gibi canlıların da tür tespitleri yapılabilmektedir.

Populasyon genetiği çalışmaları yapılırken örneklemdaki birey sayısının önemi vardır. Yapılacak istatistiksel analizlerin doğru ve anlamlı sonuçlar verebilmesi için de örnek sayılarının 25 ve üzeri olması gerekmektedir (Kaestle ve Horsburgh, 2002; Stone, 2008). Sonuç olarak popülasyon genetiği çalışmaları; evrimsel sürecin takibini, aynı topluluk içerisindeki varyasyonların frekansını ve genetik hastalıkları belirlemeyi, popülasyonların hareketlerini takip etmeyi amaçlamaktadır.

2. BÖLÜM

KONU, SORUN, AMAÇ

2.1. KONU

Bu tez çalışmasının konusunu Çine-Tepecik arkeolojik yerleşmesini iskan etmiş insanların genetik analizleri oluşturmaktadır. Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de birçok arkeolojik kazı yapılmaktadır. Söz konusu kazılarda eski insan toplumlarının yaşam biçimleri arkeoloji, biyoloji ve antropoloji gibi bilimlerden gün yüzüne çıkarılmaya çalışılmaktadır. Elde edilen buluntular, Anadolu'nun coğrafi konumunun göç yolları üzerinde bulunması nedeniyle çok çeşitlilik göstermektedir. Nitekim arkeolojik ve tarihsel kaynaklar hemen hemen her dönemde Anadolu'da yerleşik insanların farklı coğrafyalara göç ettiğini, farklı coğrafyalardan da Anadolu'ya göçler olduğunu, prehistorik dönemlerden itibaren Anadolu coğrafyasının birçok farklı kültüre ev sahipliği yaptığı çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (Sagona ve Zimansky, 2009).

Anadolu coğrafyasında yaşamış eski insan topluluklarının kültürel anlamda birbirleriyle kurduğu ilişkiler özellikle Cumhuriyet Döneminden itibaren günümüze değin sürdürülen arkeolojik kazılarda incelenmiş olmakla birlikte bu eski dönem topluluklarının birbirleriyle olan biyolojik yakınlıkları üzerine çalışmaların çok fazla olduğu söylenememektedir. Yukarıdaki bölümlerde de ifade edildiği gibi her ne kadar iskeletler üzerindeki morfolojik incelemeler yoluyla biyolojik yakınlıklar tespit edilmeye çalışılsa da eski Anadolu coğrafyasında gözlenen biyolojik çeşitliliğin anlaşılması için kullanılan morfolojik veya osteolojik analiz yöntemlerinin kesin sonuçlar ortaya çıkarmayacağı söylenebilir. Bu noktada moleküler antropolojik bir teknik olarak antik DNA'nın kullanılmasıyla kültürel ilişkilerin yanı sıra biyolojik ilişkilerin de incelenmesi konunun daha iyi anlaşılmasında önemli bilgiler ortaya çıkmasını sağlayacaktır. Bununla beraber, geçmiş dönemlerdeki bu topluluklar hakkındaki genetik çalışmaların yeterli düzeyde olmadığı görülmektedir. Eski insan popülasyon genetiği incelemesi açısından da bunun önemli bir eksiklik olduğu göze çarpmaktadır. Bu tez çalışmasında Güneybatı Anadolu'da bulunan Çine-Tepecik arkeolojik yerleşmesinde yaşamış insan topluluğu ele alınmakta ve bireylere ait genetik kompozisyonun belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çine-Tepecik arkeolojik yerleşmesi Aydın İli Çine İlçesinde Karakollar Köyünün sınırları içerisinde Çine Çayı'nın (Marsyas) 1 km doğusunda bulunmaktadır (Şekil 3) (Günel, 2006). 2004 yılından beri sürmekte olan kazılarda Geç Neolitik/Kalkolitik dönemden itibaren Tunç Çağına kadar kesintisiz olmak üzere, Klasik döneme kadar zaman aralığını kapsayan kültür tabakaları tespit edilmiştir (Şekil 4) (Günel, 2014).



Şekil 3: Çine-Tepecik Höyüğü konumu (Günel, 2014).

I	1	Helenistik / Roma	
	2	Karya - Geometrik	
II	1	a	Geç Tunç Çağı
		b	
II	2	a	Orta Tunç Çağı
		b	
III		Erken Tunç Çağı	
IV		Geç Neolitik / Kalkolitik	

Şekil 4: Çine-Tepecik Höyüğü'nün Stratigrafik Gelişimi (Günel, 2014).

Çine-Tepecik yerleşmesinin şimdiye kadar ortaya çıkarılmış en erken kültürel katmanlarında Orta ve Erken Kalkolitik döneme ait buluntular, bölgedeki Neolitik döneme paralel bir gelişime işaret etmektedir (Günel 2010a, 2011). Kalkolitik dönemin erken zamanlarına uzanan çeşitli buluntular (yontmataş ve kemik aletler, seramikler gibi) Çine-Tepecik'in Ege Dünyasıyla da olan ilişkilerinin çok erken bir zamana dayandığını işaret etmektedir (Günel 2011). Bu ilişkilerin ortaya çıkışında yerleşmenin bulunduğu konumun, tüm coğrafi yönleri doğru doğal yol ve güzergahların bulunuşunun, özellikle Ege kıyı şeridinde açılan vadilerin önemli rol aldığı belirtilmektedir (Günel 2011, 2014). Yerleşmenin daha geniş bir alanında ortaya çıkarılmış 2. binyıl kalıntılarının ise Çine-Tepecik'in bu merkezi konumunun daha iyi anlaşılmasına olanak sağladığı söylenebilir. Milattan önce 2. bin yılın ikinci yarısında yerleşmenin güçlü bir savunma sistemine (sur yapısı) sahip olduğu gösterilmiştir (Günel, 2006, 2010b, 2012). Batı Anadolu'nun Ege Dünyası ile olan ilişkileri bağlamında yerleşmeden ele geçen Miken boya bezeli seramiğinin Ege'deki etkin ticaret ağlarının mevcut olduğu döneme (Geç Hellas III B-C) işaret ettiği belirtilmelidir (Günel, 2012). Diğer yandan ele geçen mühür baskıları Çine-Tepecik'in sadece Ege dünyası ile değil aynı zamanda Hititlerle olan siyasi ve ekonomik bağlantıları da gündeme getirmiştir (Günel, 2012). Geç Tunç Çağına ait kültür tabakasından elde edilen bulgular yerleşmenin bir yangınla tahrip olduğunu göstermiştir (Günel, 2012). Diğer yandan şimdiye kadarki kazılarda höyüğün kuzeybatısında ortaya çıkarılan çatı kiremidi tipindeki mezarlar, yerleşmenin üst evresinde Hellenistik/Roma dönemlerinde alanın mezarlık için kullanıldığını göstermektedir (Günel, 2006, 2008, 2012a, 2012b).

2.2. SORUN

Çine-Tepecik arkeolojik yerleşmesi stratigrafisi dikkate alındığında Geç Neolitik/Kalkolitik dönemde Tunç Çağı sonuna kadar yerleşimin kesintisiz iskan edildiği görülmektedir. Devamında ise özellikle Helenistik/Roma dönemlerine ait mezarlık alanı kullanımının söz konusu olduğu anlaşılmaktadır. Birbirini takip eden ve kültürel olarak da birbirinden tamamen bağımsız olmayan Çine-Tepecik insanların genetik yakınlık sergileyip sergilemediği bilinmemektedir.

Bir sonraki kültürel oluşumun, bir önceki ile benzerlik göstermesi hatta devamı niteliğinde olması, yerleşimin benzer kültürel ve/veya genetik kompozisyona sahip insanlarca iskan edilmiş olabileceğini düşündürmektedir. Eski insan topluluklarının kalıntıları olarak ifade edebileceğimiz mezarlar, hem topluluk içi sosyal ve biyolojik ilişkilerinin hem de topluluklar arası bağların incelenmesinde önemli bir etkidir. Mezar eşyaları ve insan iskelet kalıntıları antropolojik ve arkeolojik incelemelerin önemli bileşenlerini oluşturur (Martin vd, 2013). Yazılı kayıtların olmadığı erken dönemlerde ölü gömme uygulamaları ve mezar eşyaları ile elde edilen bilgi toplulukların birbiri ile ilintilendirilmesinde yardımcı olmaktadır.

Bunun dışında, Çine-Tepecik topluluğuna ait genetik kompozisyonun (örneğin mtDNA haplogrup çeşitliliği) kendi çağdaşı yerleşmelerle aynı veya çok benzer bir genetik yapıya sahip olup olmadığı da bilinmemektedir. İnsan toplumlarında ticari ilişkiler veya mübadele çoğu zaman bir ekonomik kazancın yanı sıra toplumlar arası ilişkilerin sürdürülebilir kılınmasında bir aracı olarak işlev görmüştür. Çine-Tepecik yerleşiminde Miken kültürü etkisinin yaygın olması ve dışarıdan ithal edilen malzemelerin bulunması topluluğun dışarıya açık olduğunu kanıtlar. Diğer yandan Hitit mühür baskılarının mevcudiyeti yerleşimin Doğu ile olan ilişkisi olarak değerlendirilebilir. Bu durum nedeniyle de topluluk başka topluluklar ile sosyo-kültürel etkileşim yanında biyolojik bir ilişki içerisinde olabilir. Olası göç hareketlerinin mutasyon, rekombinasyon ve genetik sürüklenmenin aksine popülasyonlar arasındaki değişime değil, popülasyon içi allel sıklıklarının değişimine yol açmaktadır (Matisoo-Smith, 2015). Dolayısıyla Güneybatı Anadolu eski insan topluluklarından biri olan Çine-Tepecik insanlarındaki bu olası değişimlerin antik DNA yoluyla çözümlenmesi arkeolojik ve antropolojik birçok önemli bilginin ortaya çıkmasını sağlayacağı düşünülmüştür.

Çalışmanın kısıtları: İncelenen bireylere ait tarihlendirme göreceli tarihlendirme yöntemi ile belirlenmiştir. Kesin tarihlendirme sonuçları bu çalışma kapsamında ortaya konulamadığından elde edilen sonuçların daha iyi bir şekilde değerlendirilmesi için radyokarbon izotop analiz yöntemi ile elde edilecek kesin tarihlere gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmada en azından bir örnekte C14 tarihlendirme yöntemi kullanılarak bu kısıt giderilmeye çalışılmıştır. Fakat tarihlendirme sonucuna bu tez çalışması esnasında ulaşılamamıştır.

Bilindiği gibi aDNA çalışmalarında otantik DNA eldesi her zaman kolay olmamaktadır. Çoğu zaman sınırlı düzeyde antik DNA üzerinde çalışılması söz konusu olabilmektedir. Bu çalışmada da, her ne kadar son dönem yöntemleri kullanılmış olsa da çoğu birey için kıyaslamaya uygun düzeyde aDNA eldesiyle ilgili çeşitli sorunlarla karşılaşmıştır.

2.3. AMAÇ

Yukarıdaki açıklamalar doğrultusunda bu tez çalışmasının amaçları aşağıdaki gibidir:

1. Çine-Tepecik insan iskelet kalıntılarından antik DNA elde edilmesi,
2. Çine-Tepecik örneğini oluşturan aDNA eldesi mümkün olan bireylere ait mtDNA haplogrup tayini yapılması, sonuçların aynı yerleşmede genetik süreklilik açısından değerlendirilmesi,
3. Elde edilen genom düzeyindeki sonuçların çağdaş/dönemdaş topluluklar ile kıyaslanması ile geçmiş dönem insan hareketliliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

3. BÖLÜM

MATERYAL METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1. Çine-Tepecik İnsan Örnekleri

Çine-Tepecik Höyük'ünden 2004-2013 yılları arasında elde edilen ve Hacettepe Üniversitesi Antropoloji Bölümü Biyolojik Antropoloji Laboratuvarında koruma altına alınmış insan iskelet kalıntıları arasından 10 bireye ait diş örnekleri ve bu bireyler arasından 5 bireye ait *Pars petrosa* örneği çalışmanın materyalini oluşturmaktadır (Tablo 1). Örneklerin seçilmesinde fiziki korunmuşluk durumu iyi olması ve patolojik bulgu içermemeleri göz önünde bulundurulmuştur. Çine-Tepecik'te farklı dönemlerde yaşamış insan grupları arasındaki biyolojik sürekliliğin takibi için farklı dönemlere tarihlendirilen tabakalardan örnekler seçilmiştir.

Örneklerin toplanması tek bir kişi tarafından eldiven, maske, başlık ve temiz oda önlüğü giyilerek ve sodyum hipoklorit ile (NaClO, çamaşır suyuyla) temizlenmiş araç ve gereçler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler hiçbir temizlik yöntemi uygulanmadan her biri ayrı ayrı steril tek kullanımlık örnek kutularına koyulup ağızları sıkıca kapatılarak koruma altına alınmıştır.

Toplanan örneklerin içinde bulunduğu örnek kutuları karışıklık yaratmayacak şekilde etiketlenmiştir. Laboratuvardan toplanan ve numaralandırılan örneklerin DNA laboratuvarına alımından hemen önce örnek kutuları yeni steril tek kullanımlık poşetler ile değiştirilmiş ve deneyler sırasında kullanılmak üzere laboratuvarda +4°C'de saklanmıştır.

Tablo 1: Çalışmada kullanılan Çine-Tepecik insan örnekleri.

Birey Numarası	Mezar Numarası	Örnek Türü	Yıl	Plankare	Dönem	Yaş Grubu	Antropolojik Cinsiyet
1	G1	Diş	2004	I/12	Hellenistik/Roma	Erişkin	Erkek
2	G4	Diş	2006	I/11	Hellenistik/Roma	Erişkin	Kadın
3	G5	Diş	2007	I/11	Hellenistik/Roma	Erişkin	Kadın
4	G11	Diş	2010	K/11	Erken Tunç Çağı/ETÇ	Çocuk	Çocuk
5	G15	Diş	2011	K/11	Hellenistik/Roma	Erişkin	Kadın
6	G19	Diş	2012	L/11	Geç Kalkolitik/ETÇ	Erişkin	Kadın
7	G21	Diş	2012	L/12	Erken Dönem	Erişkin	Kadın
8	G24	Diş	2012	M12	Erken Dönem	Erişkin	Kadın
9	G 25	Diş	2012	L/12	Erken Dönem	Erişkin	Kadın
10	G 28	Diş	2013	L/13	II. Bin	Erişkin	Kadın
11	G1	<i>Pars petrosa</i>	2004	I/12	Hellenistik/Roma	Erişkin	Erkek
12	G11	<i>Pars petrosa</i>	2010	K/11	Erken Tunç Çağı/ETÇ	Çocuk	Çocuk
13	G15	<i>Pars petrosa</i>	2011	K/11	Hellenistik/Roma	Erişkin	Kadın
14	G21	<i>Pars petrosa</i>	2012	L/12	Erken Dönem	Erişkin	Kadın
15	G25	<i>Pars petrosa</i>	2012	L/12	Erken Dönem	Erişkin	Kadın

3.1.2. Çalışma Grubunun Modern Örnekleri

Çalışmada modern kontaminasyonun test edilebilmesi adına; örneklerin toplanmasında ve seçilmesinde yardımcı olan araştırmacı 1 ve laboratuvar çalışmalarını yürüten araştırmacı 2'den yanak içi sürüntüleri alınmıştır. Buna ek olarak çalışmalarda yer alan araştırmacı 3'e ait yanak içi sürüntüsünden alınan mtDNA HVRI-II dizi bilgileri daha önce Yaka (2015) tarafından yürütülen çalışma esnasında analiz edildiğinden tekrarlanmamıştır.

3.2. METOT

3.2.1. mtDNA Çalışmaları

Mitokondriyal DNA çalışmalarında elde edilmiş olan örneklerin DNA'ları Dabney'in (2013) çalışması referans alınarak izole edilmiştir. mtDNA'nın Kontrol Bölgesi'nin yaklaşık 900 bp uzunluğundaki Hypervariable I (HVRI) ve Hypervariable II (HVRII) bölgeleri uç kısımları birbiriyle çakışan farklı 7 fragman olarak çoğaltılmıştır (Ottoni vd., 2011).

3.2.1.1. mtDNA Deneysel Çalışmaları

3.2.1.1.1. Örneklerin Hazırlanması

İzolasyonu yapılacak olan diş ve kemik örneklerin hazırlık aşamaları; örneğin kesimi, UV'lenmesi, öğütülmesi, tartılması şeklinde sırası ile gerçekleştirilmiştir.

Biyogüvenlik sınıf II olan kabinlerde her bir örnek sırası ile çalışılırken, 3 kat alüminyum folyo üzerine örnek yerleştirilmiş ve diş örnekleri önce %5'lik sodyum hipoklorit (NaClO) ve/veya nükleotit içermeyen su (HPLC Su) ile silinmiş, ardından steril diskler ile diş üzerindeki tabakalar (varsa diş taşı, kireç vb) uzaklaştırılmıştır. Kemik örneklerinde %5'lik sodyum hipoklorit (NaClO) ve/veya nükleotid içermeyen su (HPLC Su) kullanılmıştır. Bunun yerine kirli kemik örneklerinde bistüri kullanılarak yüzeydeki kalıntılar uzaklaştırılmıştır. Ön temizlik aşamasından sonra da diş örneklerinde olduğu gibi steril ve tek kullanımlık olan diskler ile kemiğin kirli yüzeyi kazınarak en kompakt kısımdan parça çıkartılmıştır (Pinhasi vd., 2015). Kemik ve diş örneklerinden istenilen bölgeler çıkarıldıktan sonra ayrı ayrı petri kaplarına alınıp her bir yüzeyi 30 dakika olmak

üzere her iki yüzeyi de ultraviyole ışığına (UV, 254 nanometre dalga boyunda, 12 Volt ve örneklerin ultraviyole ışıktan uzaklığı 5 cm olacak şekilde) maruz bırakılmıştır. UV'lenmiş olan örnekler kabin içerisine alınmıştır.

3.2.1.1.2. Öğütme

Öğütme işlemi soğutmalı öğütücü (Spex 6750 Freezer Mill) kullanılarak yapılmıştır. Öğütücüye yerleştirilen her bir örnek ayrı tüplere yerleştirilmiş ve her bir örnekten diğerine geçişte yüzey DNase AWAY (Thermo Fisher, 7010, MBP DNA Away®) solüsyonları ile temizlenmiştir. Elde edilen kemik tozunu tartma işlemlerine başlamadan önce ortam sterilliğini test etmek için Hidroksiapatit (HYA) adı verilen Kalsiyum (Ca) tuzu negatif kontrol amaçlı 150 mg olarak tartılmıştır. Ardından her bir örnek ortalama 150-200 mg olacak şekilde hassas terazide tartılmış ve vidalı kapaklı 2 ml'lik tüplere aktararak üzerleri etiketlenmiştir. Son örnek tartımından sonra da çapraz kontaminasyonu test etmek için ikinci negatif kontrol olarak yine HYA tartılmıştır. Tartım sonucunda elde edilen örneklerin toz miktarları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2 : Tüm örneklerden elde edilen toz miktarları (gr).

Örnek Numarası	Tartılan Miktarı (gr)	Diş Örnek Numarası	Tartılan <i>Pars petrosa</i> miktarı (gr)
HYA1	0,1516	HYA1	0,1215
G1	0,1526	G1	0,1513
G4	0,1498	G11	0,1426
G5	0,1326	G15	0,1475
G11	0,1449	G21	0,1374
G15	0,1311	HYA2	0,1096
G19	0,1494		
G21	0,1502		
G24	0,1425		
G25	0,1443		
G28	0,1555		
HYA2	0,1530		

3.2.1.1.3. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için Dabney vd. (2013) çalışmasındaki yöntem kullanılmıştır. DNA izolasyonu için kullanılan kimyasal ve solüsyonlardaki kontaminasyonun kontrolü için de 2 negatif kontrol daha izolasyon sırasında eklenmiştir. Toz haline getirilmiş ve tartılmış örnekler, HYA kontrollerine ve boş iki tane kontrol tüplerine (extraction/izolasyon kontrolleri başta ve sonda olmak üzere) 1 ml izolasyon solüsyonu (*Extraction buffer*) eklenmiştir. Örnekler, 37°C'de, izolasyon solüsyonu içerisinde en az 18 saat veya tamamen çözünene kadar çalkalayıcı da inkübe edilmiştir. Tüpler maksimum hızda (16,100X g) 2 dakika santrifüj edilmiş ve oluşan üst faz tüpün dibinde toplanan pelete değmeden pipetlenmiş ve 50 ml'lik falkon tüplere bağlanmış olan rezervuar ve kolonlara (Qiagen-Minelute filtreli) aktarılmıştır. Üst faza 13 ml bağlanma solüsyonu (binding buffer) eklenmiştir. Falkon tüpler 4 dakika 1500X g'de santrifüj edilmiştir. Falkon tüpler 90°C döndürülerek 2 dakika 1500X g'de tekrar santrifüj edilmiştir. Minelute filtreli kolon, rezervuardan ayrılmıştır ve 2 ml'lik eppendorf tüpe yerleştirilmiştir. Bir dakika süreyle 3300X g'de santrifüj edilmiştir. Kolona Qiagen Minelute kiti PE solüsyonundan 750 mikrolitre (µl) aktarılmış ve 3300X g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme sonunda tüpün dibinde biriken atık solüsyon tüpten uzaklaştırılmıştır. Tekrar 750 µl PE solüsyonu kolona aktarılmış ve yine aynı şartlarda santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme sonunda tüpün dibinde biriken atık solüsyon tüpten uzaklaştırılmıştır. Tüpler bir kez daha 16100X g'de 1 dakika kuru olarak santrifüjlenmiştir. Qiagen kolonlar 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Filtrenin tam üzerine gelecek şekilde kolonlara 52 µl ayrıştırma solüsyonu (TET) eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tüpler 16100X g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Kolonun üzerine tekrar 52 µl ayrıştırma solüsyonu eklenmiş ve aynı işlem tekrarlanmıştır. Elde edilen DNA bir sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C' de saklanmıştır.

3.2.1.1.4. Amplifikasyon

mtDNA Kontrol Bölgesi HVRI ve HVRII fragmanları Yaka (2015) ve Yaka vd., (2018)'deki yöntem takip edilerek PZR yöntemi ile yükseltgenmiştir. PZR hazırlama işlemi antik DNA laboratuvarında temiz odada ve özel PZR kabininde yapılmıştır. PZR

kimyasallarının kontaminasyonunu test etmek için negatif kontrol kullanılmıştır. PZR karışımı hazırlanmadan önce kullanılacak olan nükleer free su (*molecular grade water*), 10X tango buffer, MgCl₂, BSA (Bovin Serum Albumin), örnek sayısı kadar PZR strep tüpleri 30 dk UV'lenmiştir. PZR için kullanılan kimyasalların oranları Tablo 3'de verilmiştir. Daha sonra Tablo 4'deki döngü ve sıcaklık koşulları kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3: PZR karışımı oranları, bir örnek için.

PZR Karışımı X 1 örnek için	Hacim (µl)
dH ₂ O	32,0
10X Tango Buffer	5,0
MgCl ₂ (25 m/M)	5,0
dNTP (25 m/M)	1,0
Primer (10µM)	1,0
BSA (10 mg/ml)	0,5
Taq Polimeraz (5U/µl)	0,5
DNA	5,0
TOPLAM	50

Tablo 4: PZR programı, döngü ve sıcaklık değerleri.

1. basamak		2. basamak X 60 kez			3. basamak	
37°C	94°C	94°C	54°C	72°C	72°C	4°C
15 dk	10 dk	45 sn	1:15 sn	1 dk	5 dk	sabit

Tablo 5: PZR de çoğaltmak istediğimiz bölgeler (primerler) ve uzunlukları.

Fragmanın Adı	D-Loop Bölgesi	bp	Fragman Dış İleri Primer	Fragman İç Geri Primer
A Fragmanı	HVR I Bölgesi	140 bp	5'- CCCAAAGCTAAGATTCTAAT -3'	5'- GTACAATATTCATGGTGGCT -3'
B Fragmanı	HVR I Bölgesi	139 bp	5'- CCGCTATGTATTTCGTAC -3'	5'- TTGATTGCTGTACTTGCTTG -3'
C Fragmanı	HVR I Bölgesi	109 bp	5'- ATACTTGACCACCT -3'	5'- TTGCAGTTGATGTGTGATAG -3'
D Fragmanı	HVR I Bölgesi	133 bp	5'- CCCCATGCTTACAAGCAAGT -3'	5'- GTAAATGGCTTTATGTGCTATG -3'
E Fragmanı	HVR I Bölgesi	118 bp	5'- CCCACTAGGATACCAACAAA -3'	5'- TGAGGGGGGTCATCCATG -3'
F Fragmanı	HVR II Bölgesi	147 bp	5'- CTCACGGGAGCTCTCCATGC -3'	5'- TGAACGTAGGTGCGATAAATA -3'
G Fragmanı	HVR II Bölgesi	166 bp	5'- CGCAGTATCTGTCTTTGATTCC -3'	5'- GTTATGATGTCTGTGTGGAA -3'

3.2.1.1.5. Örneklerin Agaroz Jel Elektrofrezinde Değerlendirilmesi

PZR sonrasında elde edilen ürünler %2 agaroz jel (2 gr agaroz, 100 ml %0,05 lik TBE (54,5 gr Tris, 27,8 gr Borik Asit, 2,9 gr EDTA) ve 10 µl EtBr üzerinde yürütülmüştür. Beş µl DNA örneği, 5 µl yükleme boyası (*Qiagen- Gel pilot DNA Molecular Weight Markers*) ile birleştirilerek agaroz jele yüklenmiştir. Yüklenen örneklerin hangi baz çifti aralığında çoğaltıldığını belirlemek amacıyla 50 bç merdiven (*GeneRuler 50 bp DNA Ladders*) kullanılmıştır. Agaroz jele yüklenen PZR ürünlerine ve merdivene 110 V elektrik akımı uygulanmış 1 saat süreyle yürütüldükten sonra Vilber Lourmat CN-3000WL jel görüntüleme cihazında UV ışığı altında jelin fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.1.1.6. Sanger Sekanslama

Jel elektroforez sonucunda başarılı olan örneklerin PZR ürünleri pürifikasyon yapılmadan Sentegen firmasına gönderilmiştir. Sadece G28 nolu örneğin 1. izolasyon 2. PZR C, D, E ve F fragmanları ODTÜ Biyolojik Bilimler Laboratuvar 147’de pürifikasyonu yapılmıştır. Pürifikasyonda QIAquick PCR Purification Kit (250) kullanılmıştır. PZR ürünü kitte bulunan silika filtreli kolonlara alınmıştır. PZR ürünün 5 katı olacak şekilde kitte bulunan PB tamponu eklenmiş ve 1 dk santrifüj yapılmıştır. Kolondan geçen solüsyon atılmış ve kolon üzerine 750 µl PE tamponu eklenip 1 dk santrifüj edilmiştir. Kolondan geçen solüsyon atılıp ve tekrar 750 µl PE tamponu eklenmiştir. Bir dk santrifüj edilip, solüsyon atılmış ve sonrasında kolon kuru santrifüj edilmiştir. Ardından yeni 1,5 ml tüpe aktarılan kolona kit içerisinde bulunan EB tamponu eklenip 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiş 1dk santrifüj edilmiştir. Sonrasında bu basamak bir kez daha tekrarlanmıştır. Kolondaki DNA molekülleri yeni tüpte toplanmış ve kolon atılmıştır. Pürifikasyonu yapılmış ve yapılmamış olan PZR ürünleri Sentegen firmasına gönderilmiştir. Sentegen firmasından gelen sonuçlar daha sonra analize alınmıştır.

3.2.2. mt DNA Hesaplamalı Çalışmalar

3.2.2.1. Hizalama

Dizileme sonucunda elde edilen ham veriler, Bioedit programında (BioEdit 5.0.9 software <http://mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) Cambridge Reference Sequence (CRS) referans dizisine hizalanarak polimorfizm noktaları belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda her bir örneğin 7 fragmanı da referans dizi kullanılarak değerlendirilmiş sonrasında HVRI (A, B, C, D ve E fragmanları) ve HVRII (F ve G fragmanları) bölgeleri tek bir dizi haline getirilmiştir. Bu dizilerin insana ait olup olmadığı GenBank’ın BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) algoritması kullanılarak test edilmiştir.

3.2.2.2. Haplogrup Tayini

Elde edilmiş ve insan DNA’sına ait olduğu belirlenmiş diziler CRS referansı ile birlikte değerlendirilmiş ve farklılık gösteren nükleotitler belirlenmiştir. Farklılık gösteren nükleotitler haplogrupların belirlenmesinde kullanılmıştır. Değerlendirmelerde en güncel mtDNA ağacı kullanılmış ve haplogruplar belirlenmiştir (van Oven ve Kayser, 2009).

3.2.2.3. Diğer Popölasyonların mtDNA Verileri ile Çine-Tepecik mtDNA Verilerinin Karşılaştırılması

Haplogrupları belirlenen ve tek bir dizi halinde olan veriler fasta formatında GenAlex (6.502) programına yüklenmiş ve Temel Koordinat Analizi (PCoA) yapılmıştır. NCBI'da yer alan yayınlanmış 22 tane popölasyona ait (Tablo 6) diğer HVRI verileri (Brandt vd., 2013; Belledi vd., 2000; Comas vd., 2004; Szecsenyi-Nagy vd., 2015; Achilli vd., 2004) indirilerek karşılaştırmalı analizler yapılmıştır. Popölasyonlar arasındaki genetik farklılaşma F_{ST} (popölasyonların benzerlik derecesini oluşturan bir istatistik değeri) değeri hesaplanarak bulunmuştur. Bu F_{ST} değeri ile bir matrix oluşturulmuştur. Matriks de yer alan değeri kullanarak popölasyonların uzaklık mesafesi iki boyutlu (2D) koordinat düzleminde görselleştirilmiştir.

Tablo 6: Temel Bileşenler Analizinde (PCoA) kullanılan HVRI verilerinin ait olduğu popülasyonlar.

Antik Popülasyonlar		Modern Popülasyonlar	
Hcg	Orta Avrupa Avcı-Toplayıcı	Syra	Suriye
Sta	Erken Neolitik Starcevo Kültürü	Cypr	Kıbrıs
Barçın	Barçın Höyük-Neolitik Dönem	Agl's	Ağlasun
Lbk	Linear Pottery Kültürü	Arme	Ermenistan
Lbkt	Transdanubia'da Linearbandkeramik Kültürü	Türk	Türkiye
Crba	Yunanistan Bronz Çağı (Minoan)	Grec	Yunanistan
Cemialo	Çemialo Sırtı Höyük- Neolitik Dönem	Geor	Gürcistan
Neo	İran Neolitik Dönem	Iran	İran
Rcs	Referans Örnek		
Sagr	Sagolassos Roma		
Saga	Sagalossos Bizans		
Ibere	İberia Erken Neolitik		
Hge	Doğu Avrupa Avcı Toplayıcı		
Bols	Bolshoy		

3.2.3. Tüm Genom Çalışmaları

mtDNA çalışmalarında DNA eldesi için kullanılan ve yukarı bölümde (3.2.1.1.3. bölümünde) detayları verilen protokoller tüm genom çalışmaları için de uygulanmıştır. İzolasyon sonrasında elde edilmiş olan DNA izolatları kullanılarak tüm genom

kütüphaneleri Meyer ve Kircher'in (2010) yöntemi takip edilerek hazırlanmıştır. Bu yöntemin basamaklarının detayları aşağıda anlatılmıştır.

3.2.3.1. Tüm Genom Kütüphanesi Hazırlığı

3.2.3.1.1. DNA Moleküllerinin Kırık Uçlarını Kütleştirme

Elde edilen DNA moleküllerinin kırık uçlarını kütleştirmek için Tablo 7'de gösterilen reaksiyon hazırlanmıştır. Her bir DNA izolatından 20 µl pipetlenmiş ve ayrı bir tüp içerisinde 20 µl kütleştirme reaksiyonu ile birleştirilmiştir. Sonrasında numuneler 25°C'de 15 dk, 12°C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında ise Qiagen Minelute PCR Purification kiti kullanılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bir önceki basamaktan elde edilen 40 µl'lik karışımın üzerine 200 µl PB Buffer eklenmiştir. Sonrasında 13000X rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Filtreden geçen solüsyonlar atılmış ve kolon üzerine 700 µl PE buffer eklenmiştir. Takibinde numunelere 13000X rpm'de 1 dk santrifüj uygulanmıştır. Bu basamak bir kez daha tekrarlanmıştır. Ardından 13000X rpm'de 1 dk kuru santrifüj gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrasında numuneler 1,5 ml'lik yeni tüplere kolonlar yerleştirilmiştir. Yeni tüp üzerine 22 µl EB buffer eklenmiş ve sonrasında 37°C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonu takiben numuneler 1 dk 13000X rpm'de santrifüj edilmiştir. Tüm işlemlerden sonra saflaştırılmış DNA molekülleri tüpün dip kısmında birikmiştir.

Tablo 7: Kütleştirme reaksiyonu karışımı.

Kütleştirme Reaksiyon Karışımı	Hacim (µl)
Tango tamponu	4
dNTP (25 mM)	0,16
ATP (100 mM)	0,4
T4 PNK (10 U/µl)	2
T4 DNA polimeraz (5U/µl)	0,8
H ₂ O-HPLC	12,64
DNA	20
Toplam	40

3.2.3.1.2. Adaptör Yapıştırma

Bu basamakta önceden uçları kütleştirilmiş olan DNA moleküllerine Tablo 8'deki karışım eklenerek adaptör olarak isimlendirilen oligonükleotitler yapıştırılmıştır.

T4 DNA ligaz tamponu (10X) önceden 37°C'de ısıtılmıştır. Adaptör karışımı olarak P5 ve P7 oligonükleotitleri her birinin karışımındaki son konsantrasyonu 2,5 µM olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu ön hazırlıklar tamamlandıktan sonra 40 µl'lik karışım elde edilmiştir.

Tablo 8: Adaptör yapıştırma karışımı.

Adaptör Yapıştırma Karışımı	Hacim (µl)
H ₂ O	10
T4 DNA ligaz tamponu (10X)	4
PEG 4000 (%50)	4
Adaptör karışımı (P5+P7)(100 µM)	1
T4 DNA Ligaz (5U/µl)	1
DNA	20
Toplam	40

Hazırlanan bu karışım (Tablo 8) 22°C'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun sonunda bir önceki basamakta (Bölüm 3.2.1.1.6. Sanger Sekanslama) anlatılan yıkama işlemleri Qiagen Minelute PCR Purification Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Böylece adaptör eklenmiş olan DNA molekülleri saflaştırılmıştır.

3.2.3.1.3. Adaptör Doldurma

Bu basamakta, daha önce eklenmiş olan adaptörlerin eşit uzunlukta olmayan uçları Tablo 9'daki karışım eklenerek doldurulmuştur.

Tablo 9: Adaptör doldurma karışımı.

Adaptör doldurma Karışımı	Hacim (µl)
H ₂ O	14,1
Thermopol Tampon (10X)	4,0
dNTPs (25 Mm)	0,4
BST Polymerase, LF (8U/µl)	1,5
DNA	20
Toplam	40

Karışım (Tablo 9) hazırlandıktan sonra 37°C'de 20 dakika, 80°C'de 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Kırk dakikanın sonunda örnekler eğer hemen devam edilmeyecek ise bir sonraki aşamaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilmiş olan bu karışım, kütüphane DNA'sı olarak isimlendirilmiştir.

3.2.3.1.4. QPZR Karışımı

Bu basamakta, hazırlanan antik DNA kütüphanelerinin PZR ile çoğaltılması öncesi kütüphane konsantrasyonlarının belirlenmek ve her bir örnekten yaklaşık olarak eşit miktarda çoğaltabilmek amacıyla LightCycler® 480 SYBR Green I Master kit kullanılarak kantitatif PZR (QPZR) yapılmış ve kütüphanelerin gözlemlenebilir ortalama döngü sayıları tespit edilmiştir.

Tablo 10: Kantitatif PZR (QPZR) karışımı.

QPZR Karışımı	Hacim (µl)
Sybr green (2X)	12,5
IS7 (10 µM)	0,5
IS8 (10 µM)	0,5
H ₂ O	10,5
Kütüphane DNA'sı	1
Toplam	25

Hazırlanan karışım, 96'lık plate/plakaya her bir örnek için 2 tekrarı olacak şekilde dağıtılmıştır. Öncelikle 24 µl karışım (Tablo 10) dağıtılmış sonra sırası ile numunelerden alınan 1 µl'lik aDNA eklenmiştir. Plate şeffaf film ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılmıştır. Ardından Roche Lightcycler 480 QPZR cihazına yerleştirilmiştir.

3.2.3.1.5. Kütüphane PZR Hazırlığı

QPZR sonucunda döngüleri belirlenmiş olan kütüphaneleri zenginleştirmek amacıyla Tablo11'de özetlenen PZR karışımı hazırlanmıştır. Burada her bir örnek için 6 adet PZR gerçekleştirilmiştir. Örneklerin her biri ayrı bir indeks (birbirlerinden 7 baz farklılık gösteren kısa sentetik nükleotit dizileri) ile işaretlenmiş ve çoğaltılmıştır.

Tablo 11: Kütüphane PZR karışımı.

Kütüphane PZR Karışımı	Hacim (µl)
dH ₂ O	15,25
Taq Buffer (10X)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2,5
dNTPs (25 mM)	0,25
IS4- short ampl (10 mM)	0,5
İndeks (10 mM)	0,5
Amplitaq Gold (5U/µl)	0,5
Kütüphane DNA'sı	3
Toplam	25

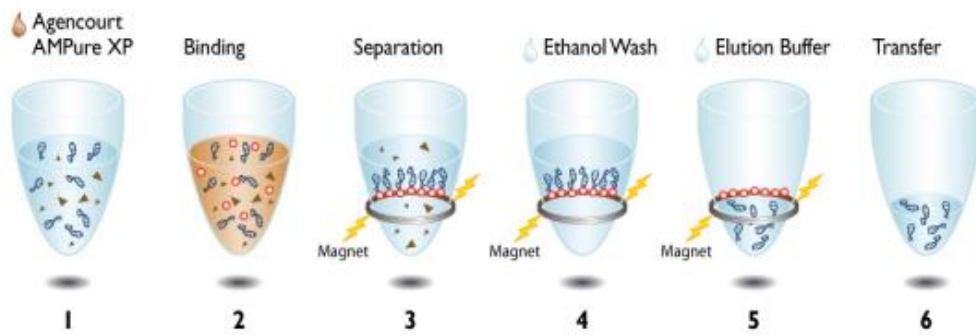
Hazırlanan karışımdan 21,5 µl her bir tüpe dağıtılıp ve her bir örnek için önceden belirlenen indekslerden 0,5 µl eklenmiş ve en son olarak da 3 µl aDNA ilave edilmiş ve PZR hazırlanmıştır. Hazırlanan kütüphane PZR'ları döngü numaralarına göre Tablo 12'de verilen koşullarda çoğaltılmıştır.

Tablo 12: PZR programı.

PZR Basamakları	Sıcaklık	Süre
İlk çift zincir ayrılması	94°C	12 dk
Çift zincir ayrılması	94°C	30 sn
Yeniden birleşme	60°C	30 sn
Uzama	72°C	45 sn
Son ekstansiyon/uzama	72°C	10 dk
Tutunma	4°C	sabit

3.2.3.1.6. Zenginleştirilmiş Kütüphanelerin AMPure Boncukları ile Saflaştırılması

PZR ile çoğaltılmış olan örnekler tek bir tüpte toplanmış ve boyutlarına göre aDNA molekülleri Agencourt AMPure XP (Katalog numarası: A6388) manyetik boncukları kullanılarak temizlenmiştir. Uygulanan basamaklar Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 5: PCR ürünlerinin AmPure Beads ile temizlenmesi
(https://research.fhcrc.org/content/dam/stripe/hahn/methods/mol_biol/Agencourt%20AMPure%20XP.pdf)

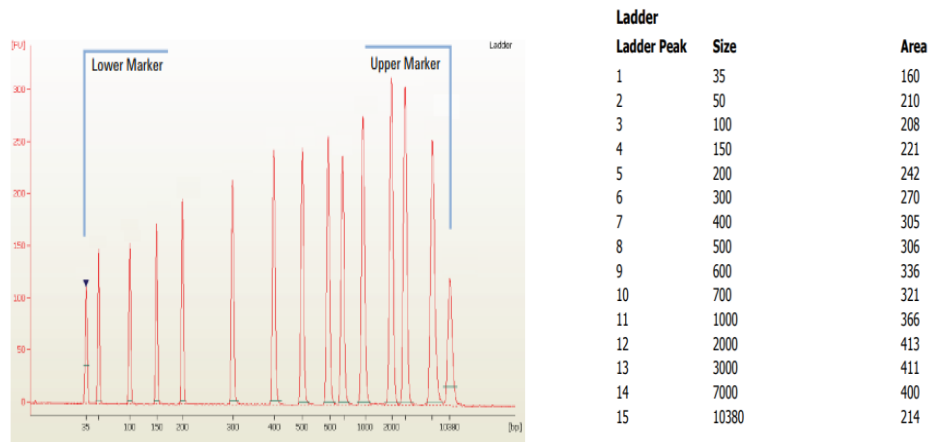
Her bir örnek için 3 set tüp hazırlanmış ve tüpler 30 dk UV'lenmiştir. Ampure beads oda sıcaklığında en az 30 dk bekletilmiştir. Deneyde yıkama esnasında kullanılacak olan %70'lik etanol ise deneye başlamadan hemen önce hazırlanmıştır.

Toplam 6 adet olan her bir PZR örneği tek tüpte birleştirilmiş (25 µLx6) ve tüpler santrifüj edilmiştir. Tüplerin üzerine 75 µl AmPure beads ilave edilmiş, vortekslenmiş ve takiben kısa bir santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında numuneler 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir (Şekil5, 1. aşama). İnkübasyon sonrasında manyetik tüplük üzerine numuneler alınıp 1 dk bekletilmiştir. Manyetik tüplük üzerinde, manyetik boncuklar tüpün duvarına toplanmış ve supernatant temiz bir şekilde tüpte kalmıştır (Şekil 5, 3. aşama). Ardından yeni bir tüpe supernatantlar dikkatlice aktarılmıştır. Tüpte kalan manyetik boncukların üzerine 20 µl TE Buffer eklenmiş ve -20°C'de saklanmıştır. Yeni tüpe aktarılmış ve kısa aDNA fragmanlarını içeren supernatant üzerine 270 µl AmPure Beads eklenmiş, vortekslenmiş takibinde kısa santrifüj yapılmış ve 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tüpler manyetik tüplüğe yerleştirilmiş ve 3 dakika bekletilmiştir. Bekleme sonrasında kenara toplanmış olan manyetik boncuklara

dokunulmadan supernatantlar atılmış ve yıkamanın ilk basamağına geçilip boncuklar üzerine %70'lik etanolden 200 µl eklenmiş ve akabinde vortekslenmiş ve kısa santrifüj yapılmıştır. Santrifüjün ardından numuneler manyetik tüplüğe taşınmıştır (Şekil 5, 4. aşama). Gözle görülecek düzeyde durulmuş olan solüsyondan supernatant uzaklaştırılmıştır. Yıkama basamağı aynı şekilde 3 kez tekrarlanmıştır. Son basamakta supernatant uzaklaştırılmış ve tüplerin kapakları aynı anda açılmış tüp duvarında kalan etanolün buharlaşması beklenmiştir. Alkol kalmamasına önem gösterilmiştir. Tüplerin içerisinde alkol olmadığından emin olduktan sonra sırası ile tüplere 36 µl TET Buffer (Qiagen PCR purification kit, TE Buffer + %0,05 Tween 20) eklenmiştir (Şekil 5, 5. aşama). Tüpler 20 saniye vortekslenmiş ve kısa bir santrifüje tabi tutulmuş ardından 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Manyetik tüplüğe taşınan tüpler 5 dk bekletilmiş ve sonra supernatantlar yeni tüpe aktarılmıştır (Şekil 5, 6. aşama).

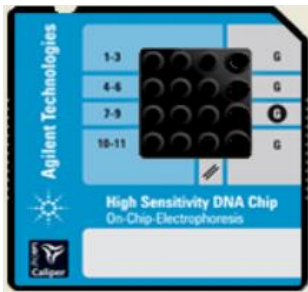
3.2.3.1.7. Kütüphane Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Bu basamakta, örneklerdeki aDNA miktarlarının konsantrasyonu Agilent 2100 Biyoanalizör cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Bu analizde Agilent Technologies High Sensitivity DNA Kiti'nde (Katalog Numarası: 5067-4626) yer alan bir moleküler merdiven (Şekil 6) referans olarak kullanılmıştır. Bu merdiven, konsantrasyonları bilinen 15 farklı uzunluktaki referans fragmandan oluşmaktadır. Biyoanalizör cihazı bu referans fragmanlara göre örneklerin konsantrasyonlarını ve uzunluklarını değerlendirir ve kütüphanelerin içindeki DNA miktarını ölçer.



Şekil 6: Merdiven olarak 15 farklı okuma, örneklerin uzunluklarını (bp) belirlemede önemlidir.

Antik DNA çalışmaları grafiklerde beklenen değer genellikle 150-180 bp aralığındadır. Bu analizi yapılırken Agilent 2100 Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kiti kullanılmıştır. Kit içerisinde 4 farklı tüp yer almaktadır. Analiz için gerekli olan jeli hazırlamak için bu tüplerden kırmızı (*High Sensitivity DNA Gel Matrix*) olanına mavi (*High Sensitivity DNA Dye Concentrate*) olan tüpten 15 µl eklenmiş ve vortekslenmiş, tüp içerisindeki spin filtre atılmıştır. Sonrasında 2240X g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Jel hazırlandıktan sonra Şekil 7'de görülen çip üretici firmanın talimatları takip edilerek yüklenmiştir. Kısaca; 9 µl jel 'G' olarak belirtilen kuyucuğa yüklenmiş ve 1 ml'lik şırınga ile hava basıncı uygulanmış, 1 dk beklenmiş ve şırınga attırılmıştır. Sonra diğer 3 G kuyucuğuna da 9 µl jel yüklenmiştir. Sırası ile tüm kuyucuklara 5 µl High Sensitivity DNA Markers 35/10380 bp yüklenmiştir. Bu kuyucuklardan L ile adlandırılmış olana 1 µl High Sensitivity DNA ladder yüklenmiştir. Diğer 11 kuyucuğa da örnekler 1 µl olacak şekilde yüklenmiş ve 1 dk boyunca vortekslenmiştir. Sonrasında çip Agilent 2100 Bioanalyzer cihazına yerleştirilmiş ve yürütülmüştür. Bu analiz sonucunda çipe yüklenmiş olan her bir kütüphanenin konsantrasyonu (nmol/L) elde edilmiştir.



Şekil 7: Biyoanalizör için kullanılan mikroçip. 11 kuyucuk örnek-1 kuyucuk da marker için kullanılmaktadır (https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90321_SensitivityDNA_KG_EN.pdf).

3.2.3.1.8. Kütüphanelerin Ön Tarama Dizilemesi İçin Birleştirilmesi

Ön taramada dizilenecek olan örneklerin bir araya getirilmesi için örneklerin her birinin konsantrasyonlarının 10 µM olması gerekmektedir. Bu hesabı yaparken biyoanalizör sonuçlarından elde edilen DNA konsantrasyonları (Molarite, pmol/l) dikkate alınmıştır. Tüpteki son hacmin 1000 µl olması hedeflenmiştir. Son hacim belirlendikten sonra

örnekler dizilemenin yapılacağı firmaya (SciLife Lab, Stockholm) gönderilmiştir. Firma örneklerin yürütülmesinde Illumina HiSeq 2500 platformunu kullandığını bildirmiştir.

3.2.4. Tüm Genom Hesaplamalı Çalışmalar

Tüm örnekler Illumina HiSeq platformundaki (SciLife Lab, Stockholm) bir şeritte düşük kapsama shotgun dizilimi kullanılarak taranmıştır. Veriler insan genomuna hizalanmış, insan okumalarının oranı belirlenmiş ve orijinalliğini değerlendirmek için okuma büyüklüğü dağılımı ve sitozin (C) deaminasyonu ile ilgili uyumsuzluk kalıpları çalışılmıştır. Daha sonra %1 otantik insan DNA'sı veren örnekler seçilmiştir (5 'ucunda >%25 C → T mutasyonları) (Schubert vd., 2012; Skoglund vd., 2014). Tüm biyoenformatik analizlerde Compevo ekibi'nin data seti kullanılmıştır.

3.2.4.1. Hiseq Sekans Veri İşleme

Her bir kütüphaneden okunan çift uç, ham FASTQ dosyalarında kalan adaptör sekansının çiftler arasında en az 11 bç örtüşme ile Adaptör Kaldırma (REF) kullanılarak çıkarıldıktan sonra birleştirilmiştir. Birleştirilen okumalar, BWA aln/samse (REF) versiyon 0.7.15 parametreleri kullanılarak insan mitokondriyal dizisinin (REF) verilerini de içeren insan referans genomuna (versiyon hs37d5, GRCh37 ve Revize Cambridge Referans Dizisine (rCRS) ait verileri içerir) "-n 0.01, -o 2 and -1 16500" parametrelerini kullanarak (REF) hizalanmıştır.

G25 numaralı bireyin çoklu kütüphaneleri birleştirilerek ve aynı başlangıç ve bitiş koordinatlarına sahip PZR kopyaları (duplikeleri) FilterUniqueSAMCons.py (REF) kullanılarak kaldırılmıştır. Ayrıca insan referans genomuna >%10 uyumsuzluk gösteren, uzunluğu <35 baz çifti ve eşleme kalitesi <30 olan okumalar da trim BAM kullanılarak kaldırılmıştır (Jun et al. 2015).

G25 numaralı bireyin dizisinin referans diziye hizalanmasından sonra da diğer antik popülasyonlar ile karşılaştırılmaların yapılabilmesi için TNP'lerinin belirlenmesi gerekmektedir. TNP'ler, *samtools* ve *pileupCaller* (<https://github.com/stschiff/sequenceTools>) araçları kullanılarak belirlendi (Altmann vd., 2012; Li vd., 2008; https://www.illumina.com/Documents/products/technotes/technote_snp_caller_sequencing.pdf).

Belirlenen TNP'ler listelendi ve diğer antik popülasyonların yanı sıra modern örnekler ile de değerlendirilmiştir. Modern örneklerin kalitesinin yüksek olması dolayısıyla rastgele seçilmiş olan heterozigot alleller python platformu üzerinde haploidize edilerek değerlendirilmeye alınmıştır (Alioğlu, 2018).

3.2.4.2. Biyolojik Cinsiyet Tayini

Tüm örneklerin moleküler cinsiyetini belirlemek için minimum taban ve haritalama kalitesinde 30 okumadan sonra, hem Ry yöntemi (Skoglund vd., 2013) hem de Rx yöntemleri (Mittnik vd., 2016) kullanılmıştır.

3.2.4.3. Anasoylu Haplogrup Tahmini

mtDNA haplogrupları, PhyloTree'nin 17. versiyonuna dayanan HapleGrep2 (REF) kullanılarak elde edilmiştir (<http://www.phylotree.org/>).

3.2.4.4. Temel Bileşenler Analizi (TBA-PCA)

TBA, matematiksel olarak verilerin boyutunu indirgeme yöntemidir. Büyük bir veri集中的indeki değişkenleri, bilgilerini koruyacak biçimde küçük ve anlaşılır yeni değişkenlere indirgemek için kullanılan bir platformdur. PC1 (Principal Component 1) olarak isimlendirilen birinci temel bileşen yeni vektörleri oluşturur. Bu yöntem, birçok örnek arasındaki varyasyonu özetleyip görselleştirerek, çok boyutlu veri üretilen birçok biyolojik çalışmada veri kalite kontrolü ve örnekler arasındaki çeşitliliği anlamak amacı ile kullanılır. TBA, verilerin orijinal çeşitliliğini koruyarak verileri en yüksek veri çeşitliliğine sahip olan ilişkisiz, ortogonal boyutlara (bileşenlere) sıkıştırmanın bir yoludur. Pozisyon ve TNP bilgilerini kullanarak, ikişer ikişer bireyler arasında verilen birey sayısı kadar boyutta *eigen* vektörleri oluşturulur ve daha sonra iki farklı boyut (genelde PC1 ve PC2) kullanılarak bir grafik çizilir. Popülasyonların birlikte kümelenmesi esas alınarak, genetik yakınlıklarına dair yorum yapılabilir (Alioğlu, 2018). Human Origins SNP Array veri setinden günümüz Batı Avrasya popülasyonunun bileşenleri inşa edilmiştir. Antik bireyler ise ilk iki ana bileşen üzerine proje edilmiştir. Sonuçlar R platformu (<https://www.r-project.org/>) kullanılarak antik ve modern Batı Avrasya örnekleri ile çizilmiştir (Alioğlu,

2018). TBA kullanılan popülasyon verileri; Human Origins'den alınmıştır (Lazaridis vd., 2014, Lazaridis vd., 2016).

Tablo 13: TBA ve f4 testlerinde kullanılan popülasyonlar ve referansları. *HO: Human Origins dataseti.

Popülasyonlar	Referans
Villabruna	HO*, Lazaridis vd., 2014, 2016, 2017
ElMiron	HO, Lazaridis vd., 2017, Fu vd., 2016
Natufian	HO, Lazaridis vd., 2014, 2016, 2017
Levant-N	HO, Lazaridis vd., 2016, 2017
Levant-Chl	HO
Levant-BA	HO, Lazaridis vd., 2016, 2017
Iran-Hotulllb	HO, Lazaridis vd., 2017
Iran-N	HO, Lazaridis vd., 2016
Iran- Chl	HO
Iran-IA	HO, Lazaridis vd., 2017
Iran-Med	HO
CHG	HO, Lazaridis vd., 2016,2017
Armenia-Chl	HO, Lazaridis vd., 2016, 2017
Armenia-BA	HO, Lazaridis vd., 2017
Greece-N	HO, Lazaridis vd., 2017

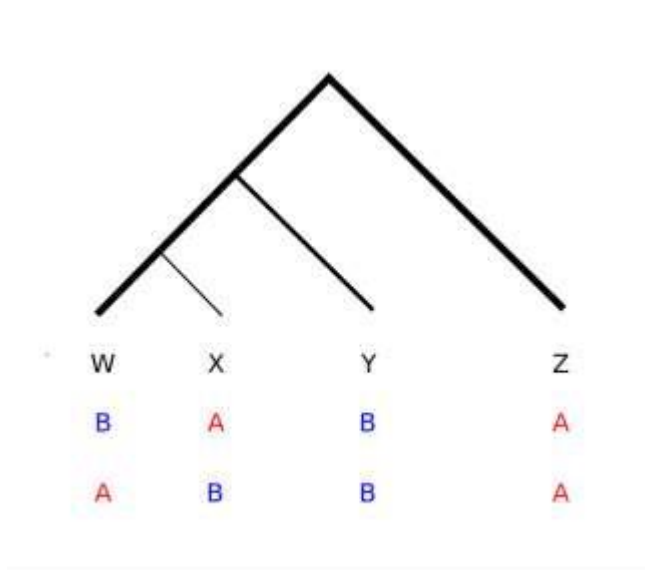
Minoan	HO, Lazaridis vd., 2017
Mycenaeae	HO, Lazaridis vd., 2017
Pınarbaşı	HO
Tepecik-Çiftlik	HO, Lazaridis vd., 2017
Barçın	HO
Barçın-Chl	HO
Kumtepe	Lazaridis vd., 2017
Ovaören-EBAll	HO
Kalehöyük-OldHittite	HO
Harmanören-BA	Lazaridis vd., 2017
Kalehöyük-Ottoman	HO
Kalehöyük-AssyrianIIIc	HO
Kelehöyük-Hellenistic	HO
Turkish-Present day	HO

3.2.4.5. f4 İstatistiği Testi

D-istatistiği Şekil 8’de de gösterildiği gibi ağaç olarak görselleştirilmiştir. Bu ağaçta her bir popülasyon bir harf ($D(Z,Y,X;W)$) ile ifade edilir ve formül olarak $\Sigma(P(BABA - ABBA)/P(BABA + ABBA))$ kullanılır. Ağaçta yer alan Z harfi dış grubu temsil eder. Şekil 8’de gösterildiği gibi “BABA” durumu, Z ve Y popülasyonlarının allellerinin aynı olmadığı fakat diğer taraftan Z ve X ile W ve Y popülasyonlarının allellerinin aynı olduğu durumu açıklar. “ABBA” ise Z ve Y popülasyonlarının allellerinin aynı olmayıp, X ve Y ile Z ve W

popülasyonlarının allellerinin aynı olduğu durumu betimler. D skoru (Z skoru) değeri kullanılarak, test edilen örneğin diğer iki popülasyondan/bireyden hangisi ile daha fazla gen akışı olduğunu belirlenir. D-istatistiği sonuçlarının nasıl yorumlandığı aşağıda bir örnekle açıklanmıştır. Yapılan hesaplama sonucunda elde edilen değer pozitif (örneğin 0,3) ise W popülasyonu X'e göre Y popülasyonu ile daha fazla alel paylaşır. Buna karşın eğer elde edilen değer negatif (örneğin -0,3) ise X popülasyonu, W'ye göre Y popülasyonu ile daha fazla alel paylaştığı söylenebilir. Sonuçları yorumlarken elde edilen değer in istatistiki açıdan önemli olup olmadığı Z-skoru değeri ile anlaşılır (Durand vd., 2011; Alioğlu, 2018; Schaefer vd., 2016).





Şekil 8: D-istatistiği ağacı (Alioğlu, 2018).

Bu tez çalışmasında D-istatistiği hesaplamak için “*AdmixTools*” programının “*qpDstat*” opsiyonu kullanılmıştır (Patterson vd., 2012). Program içerisinde D skoru için standart hata (*weighted block jackknife*) (Busing vd., 1999) olarak adlandırılan yöntemle ile hesaplanmıştır. *Jackknife*, kısıtlayıcı dağıtım varsayımları yapmadan önce yanlılık ve tahminlerin varyansının hesaplanmasını amaçlayan yeniden örnekleme yöntemidir. Standart hataların sayısı, normal dağılıma sahip Z-skorumu oluşturur. Z-skoru eğer 2’den büyük veya eşitse hesaplanan D istatistiği sonucu anlamlıdır (Alioğlu, 2018; Schaefer vd., 2016).

3.2.4.6. Tüm Genom Verisinde Kontaminasyon ve Kalite Kontrol Testleri

Elde edilen tüm genom verisinin otantikliğini değerlendirmek için üç yaklaşım kullanılmıştır; (1) tüm örneklerde sitozin deaminasyonunun neden olduğu antik DNA spesifik hasar paternlerinin incelenmesi, (2) erkeklerde X kromozomu bazlı kirlenme tahmini, (3) mtDNA temelli kirlenme tahmini.

Otantik DNA’yı gösteren hasar paternlerine sahip tüm veriler aşağı akış analizleri için kullanılmıştır.

3.2.5. Kontaminasyonu Engelleyici Önlemler ve Otantiklik

Kontaminasyonu elimine etmek için alınan önlem deneylerin daha önceden hiç modern insan DNA örneğinin izole edilmediği ve sadece antik DNA çalışmalarının yapıldığı ayrı bir antik DNA laboratuvarında yapılmıştır. Bunun yanı sıra Ottoni vd. (2011) çalışmasında uygulanan kriterler uygulanmıştır. Tek kullanımlık malzemeler, yüz maskeleri, eldivenler, tüm vücut laboratuvar giysisi (tulum ve botlar gibi) ve filtreli pipet uçları kullanılmıştır. Örnekler arasında oluşabilecek kontaminasyonu önlemek amacıyla deneysel sarf malzemeler sık sık değiştirilmiştir. Bunun yanı sıra plastik malzemeler ve tezgahların üzeri %5'lik sodyum hipokloritle silinmiş ve metal malzemeler ve/veya kullanılan teçhizatlar DNase AWAY (Thermo Fisher, 7010, MBP DNA Away®) solüsyonu ile temizlenmiştir. Deneylerin bitiminde sonra temiz oda UV ışınlarıyla (254 nm) sterili edilmiştir.

Deney aşamasında DNA izolasyonu ve PZR basamaklarında herhangi olası kontaminasyonu saptamak amacıyla her deney seti için negatif kontrol kullanılmıştır. Yukarıda bahsedilen kontaminasyon önlemlerinin alınması dışında çalışan örneklerin otantiklik durumlarına da bakılmıştır. Antik DNA çalışmasında otantiklik, nükleotitlerin dönüşümleri ile belirlendiğinden mtDNA ve tüm genom analizlerinde ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

mtDNA çalışmalarında otantiklik değerlendirmesi 3 izolasyon ve her bir izolasyondan elde edilen farklı PZR dizilerinin değerlendirilmesi ile yapılmıştır. Aynı örneğe ait olan en az 3 dizide değişim gösteren nükleotitler not edilmiştir. Bu aşamada dönüşüm sağlayan bazların $\frac{2}{3}$ oranında olanları otantiklik kriteri olarak dikkate alınmıştır. Diğer yöntem olarak kullanılan tüm genom çalışmasında da otantiklik kriterlerine bakılmıştır. Tüm genom çalışmasında elde edilen sekansların bazı fragmanlarının ters yüz tekrarlarında ya da PZR tekrarlarında ölüm sonrası nükleotit değişimleri (bknz. Şekil 20-24) görülmüştür. aDNA'nın 3' ve 5' uçlarında gözlemlenen ölüm sonrası nükleotit hasarlarının sıklığının hesaplanması olarak da ifade edilen PMD Green vd., (2010) çalışmasında aDNA'nın degrade olması ile 5' ve 3' uçlarında C->T ve G->A transisyonlarının (transition) (bknz. Tablo 20-21) oluştuğunu göstermiş ve bunu bir otantiklik testi olarak kullanılması önerilmiştir. Bu transisyonların genellikle C'den T'ye

dönüşüm biçiminde olduğu yapılan çalışmalardan bilinmektedir (Hofreiter vd., 2001; 2012). Bu yöntem ile mutasyonların polimorfizm veya dizileme hatası olup olmayacağı da test edilmektedir. Ölüm sonrası nükleotit değişimlerin de genel bir kabul olan mutasyon oranının %20'den büyük olması antik örnekten elde edilen DNA'nın otantik olduğunu göstermektedir. Bu amaçla, deaminasyon kaynaklı hasarların sıklığını hesaplamak için "PMDtools" kullanılmıştır (Skoglund vd., 2014). Her bir antik örnek için, referans genomda G ve C olması beklenen pozisyonlardaki mutasyonlar belirlenmiş ve sonuçlar R kullanılarak çizilmiştir.

3.2.5.1. Otantiklik İçin Beklenen Kriterler

mtDNA için kullanılan otantiklik kriterleri (Hofreiter vd., 2001; Pääbo vd., 2004; Yang vd., 2003; Yaka, 2015 ve Green vd., 2010);

- Örneklerin PZR kontrollerinin yapılması.
- Aynı ve/veya farklı örneklerden tekrarlanan amplifikasyonların uygulanması.
- MtDNA'ya çekirdek kalıntılarının girdilerinden arındırmak.

Tüm genom için kullanılan otantiklik kriterler (Green vd., 2010; Krause vd., 2010);

- Amplifikasyonu yapılmış olan DNA moleküllerinin sayılması veya ölçülmesi.
- Amplifikasyon sonucu elde edilecek olan uzunluğun kontrolü.
- DNA moleküllerinin uç kısımlarındaki nükleotitlerin dönüşümü.
- mtDNA heterozigotluk kontrollerinin yapılması.

3.2.6. Çalışma Grubunun Modern DNA Çalışmaları

3.2.6.1. Çalışma Ekibinden Kaynaklı Olası Kontaminasyonun Test Edilmesi

Antik DNA çalışmalarındaki hedeflerden biri kontaminasyonu önlemek ve olası bulaşmaları da minimum düzeye indirmektir. Antik örnekler için kullanılan laboratuvar çalışma alanı özel koşullara sahip olsa da örneklerin alandan toplanması ve moleküler çalışmalar için örneklerin seçilme aşamasına kadar modern DNA bulaşma olasılığı

vardır. Böyle bir durumun gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için moleküler çalışmaları ve antropolojik çalışmaları yürüten kişilerin mtDNA HVRI ve HVRII bölgeleri de çalışılmıştır.

3.2.6.2. Yanak İçi Sürüntüsü

Modern örneklerin moleküler çalışmaları kişilerin (Antropoloji çalışmalarını yürüten, Araştırmacı 1, Moleküler çalışmaları yürüten, Araştırmacı 2 ve Araştırmacı 3) yanak içinden alınan epitel doku sürüntülerinden yapılmıştır. Yanak epitel dokusu, tek kullanımlık DNA buccal swap fırçaları ile alınmıştır. Örnek içeren fırça 1,5 ml eppendorf tüp içerisine alınmıştır ve üzerine 300 µl Lysis Buffer eklenmiştir (*Qiagen 5 Prime Archive Pure DNA Tissue Extraction Kit*).

3.2.6.3. Yanak İçi Sürüntü Örneklerinin DNA İzolasyonu

Lysis Buffer eklenmiş olan modern örnekler 56°C de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tüp içerisindeki fırça uzaklaştırılmış ve kit içerisindeki izolasyon protokolü uygulanmıştır. Protokolün takibinde elde edilen modern DNA'yı çoğaltmak için PZR uygulanmıştır.

3.2.6.4. Yanak İçi Sürüntü Örneklerinin Amplifikasyonu

Modern DNA izolatları, antik örnekler ile karşılaştırılacağından bu örneklerde kullanılan primerler ile mtDNA'nın HVRI ve HVRII bölgeleri çoğaltılmıştır. Modern örneklerde de HVRI bölgesi için A primerinin forwardı ve E primerinin reverse kullanılmış, HVRII bölgesi için de F primerinin forwardı ile G primerinin reverse seçilmiştir. Kullanılan primerlerin uzunlukları ve uygulanan yöntem Ottoni vd., (2011) çalışmalarına göre uygulanmıştır. Primerlerin detaylı bilgileri Tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 14: Yanak içi sürüntü örneklerinde kullanılan primerler (HVRI için F16008- R16366, HVRII için F48-R285, Ottoni vd., 2011).

mtDNA Bölgesi	Primer	Primer Dizisi	Uzunluğu (bp)	Fragman
HVRI	F16008	5'- CCCAAAGCTAAGATTCTAAT -3'	359	A
HVRI	R16366	5'- TGAGGGGGGTCATCCATG -3'	359	E
HVRII	F48	5'- CTCACGGGAGCTCTCCATGC -3'	217	F
HVRII	R285	5'- GTTATGATGTCTGTGTGGAA -3'	217	G

Elde edilen DNA izolatlarını çoğaltmak için modern örneklerde uygulanan PZR karışımları yapılmıştır. Bu PZR karışımlarının bilgileri Tablo 15'de gösterilmiştir. PZR sonrasında uygulanan sıcaklıklar modern doku oldukları için antik örneklerde kullanılan dereceler ve süreler farklı uygulanmıştır. İkinci basamakta 60 kez tekrarlanan antik örnekler burada 30 kez tekrarlanmıştır. PZR sıcaklıkları ile ilgili detaylı bilgiler Tablo 16'de verilmiştir.

Tablo 15: Modern örneklerin (yanak içi sürüntü örneklerinin) PZR karışımı.

PZR Karışımı	Hacim (µL)
Nuclease free H ₂ O	32,0
Buffer (10X,UV)	5,0
MgCl ₂ (25 mM, UV)	5,0
dNTPs mix (10 mM/each)	1,0
Primers (FWD+REV) (10 µM)	1,0
BSA (UV) (50 mg/mL)	0,5
Taq polymerase (5 U/µL)	0,5
DNA	5,0

Tablo 16: PZR Programı.

1. basamak	2.basamak X30 kez	3. basamak			
94°C	94°C	56°C	72°C	72°C	4°C
45 sn	45 sn	1 dk	1 dk	5 dk	∞

3.2.6.5. Yanak İçi Sürüntü Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi

PZR yöntemi ile çoğaltılan modern örneklerin jel elektroforezi de antik örneklerle aynı şekilde değerlendirilmiştir. Kısaca bahsetmek gerekirse, %2'lik agaroz jelle 10 µl EtBr eklenerek jel hazırlanmış ve 5 µl 1XLD (boya) ve 5 µl DNA kullanılarak toplamda 10 µl'lik karışım jeldeki kuyucuklara sırasıyla yüklenmiştir. 5 µl 50 bp Ladder (merdiven-marker) da yürütülen örneklerin boyunu belirlemek amacıyla ilgili kuyucuğa yüklenmiş ve 110 V akım ile yaklaşık 45 dakika yürütülmüştür. Jel tanktan çıkartılmış ve UV ışığı altında görüntülenmiş, örneklerin çalışma durumu değerlendirilmiştir.

3.2.6.6. Yanak İçi Sürüntü Örneklerinin Hizalanması

Elde edilen görüntülerden istenilen aralıkta olan örnekler seçilerek Sentegen Firmasına dizilenmeye gönderilmiştir. Firmadan gelen ham veriler, Bioedit programında (BioEdit 5.0.9 software <http://mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) CRS referans dizisi kullanılarak analiz edilmiştir. BLAST'lanan bu dizilerin insan DNA dizileri olduğundan emin olduktan sonra haplogrup tayini için antik örneklerle uygulanan tek bir dizi haline getirme prosedürleri uygulanmış ve polimorfizm noktaları belirlenmiştir.

3.2.6.7. Yanak İçi Sürüntü Örneklerinin Haplogruplarının Belirlenmesi

Tek bir dizi haline getirilen modern örnekler phylotree de (<http://www.phylotree.org/tree/index.htm>) yer alan polimorfizm noktaları ile eşleştirilmiş ve tüm değişimleri yansıtan haplogrup ve haplotipler belirlenmiştir. Belirlenen bu haplogruplar antik örneklerle karşılaştırılmıştır. Aynı olan haplogruplar da tek tek polimorfizm noktalarına bakılarak antik ve modern örnekler arasında herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığı değerlendirilmiştir.

4. BÖLÜM

BULGULAR

Bu bölümde tezde yer alan örneklerin deneysel ve hesaplamalı analizlerinin sonuçlarından bahsedilmiştir.

4.1. mtDNA BULGULARI

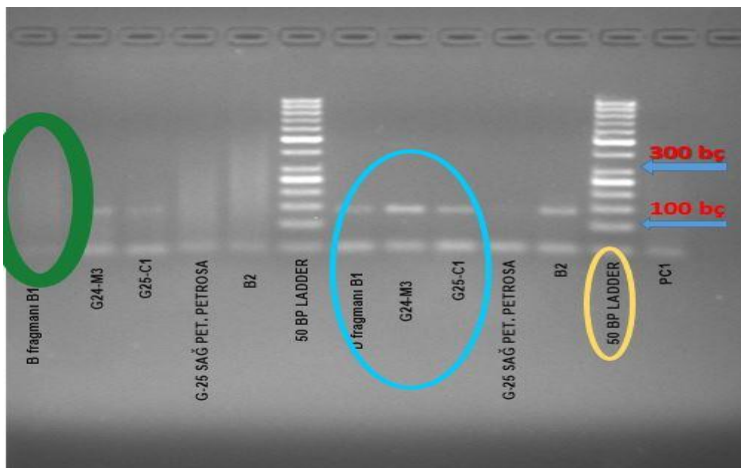
Çalışmada yer alan 10 bireyin dış ve bu 10 birey içinde 5'inin ek olarak *Pars petrosa* örneklerinden 3 kez izolasyon gerçekleştirilmiştir ve mtDNA kontrol bölgesi 7 fragman halinde çoğaltılmıştır (Tablo 17). Birinci ve 3. izolasyonlarda başarı gözlenirken 2. izolasyonda başarı gözlenmemiştir. Tablo 17'de de görüldüğü gibi A ve B fragmanlarında başarı oranı en yüksek iken C ve E fragmanlarında başarı oranı A ve B fragmanlarına göre daha azdır.

Tablo 17: Örneklerin izolasyon ve sekanslamada başarılı olan fragman sayıları.

Örnek Numarası	İzolasyon Sayısı	A Fragmanı	B Fragmanı	C Fragmanı	D Fragmanı	E Fragmanı	F Fragmanı	G Fragmanı
G1	3	3	3	1	0	0	1	1
G4	3	2	2	1	2	0	0	0
G5	3	2	0	1	1	1	0	0
G11	3	2	1	1	0	0	1	1
G15	3	1	2	0	0	0	0	1
G19	3	1	1	1	1	1	1	1
G21	3	2	2	1	1	1	1	1
G24	3	1	1	1	1	1	0	1
G25	3	3	1	0	1	0	2	1
G28	3	3	0	0	0	0	2	1
Toplam	30	20	13	7	7	4	8	8

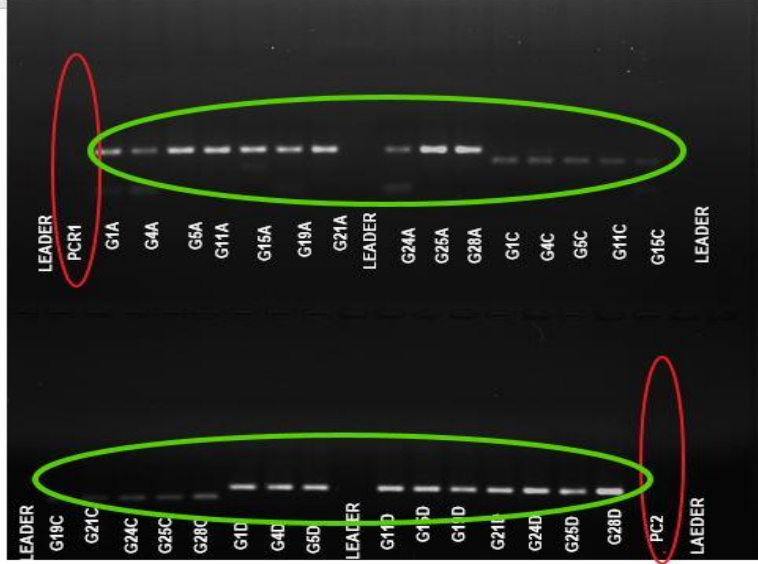
4.1.1. Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleri

PZR sonucunda diş örneklerinin ve *Pars petrosa* kemik örneklerinin tamamında başarı elde edilmiştir. Birinci izolasyonun B fragmanının negatif kontrollerinde bant görülmemiştir. G24 numaralı örnekte bantlaşma beklenen aralıkta (bkz. Tablo 5) görülmüştür (Şekil9).



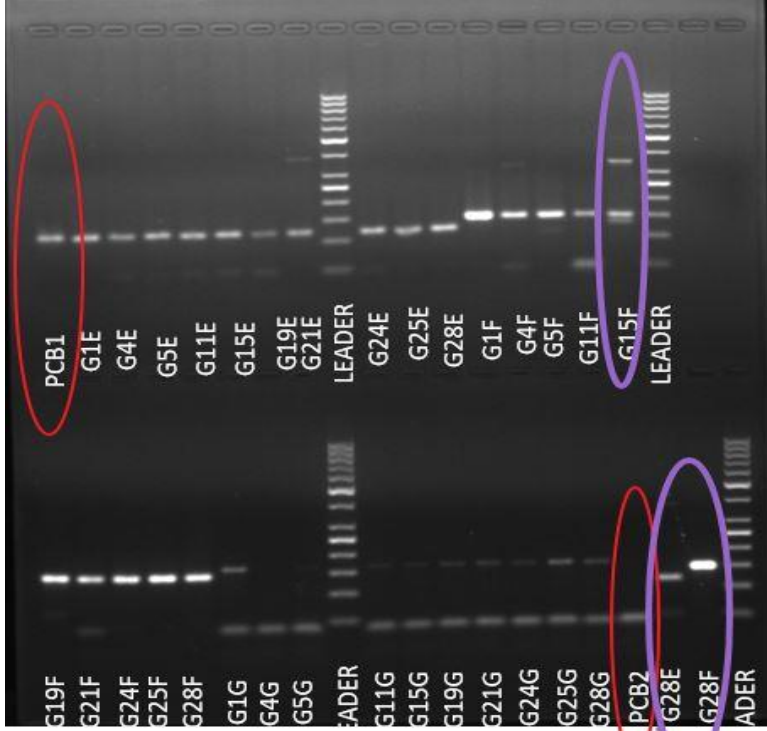
Şekil 9: Diş örneklerinin HVRI bölgesinin B fragmanının 1. izolasyonunun PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü. Sarı ile işaretli olan moleküler merdivene göre bantlaşmaların bp uzunlukları belirlenmiştir. Yeşil ile işaretlenmiş olan B fragmanının kontrol örneğidir ve başarılı olmuştur. Mavi ile işaretli olan G24 numaralı ve G25 numaralı örneklerde de başarılı olarak bantlaşma görülmüştür.

G1, G4, G5, G11, G15, G19, G21, G24, G25 ve G28 numaralı diş örneklerinin jel görüntüsünde görüldüğü üzere beklenen (bkz. Tablo 5) uzunlukta bantlar elde edilmiştir (Şekil10).



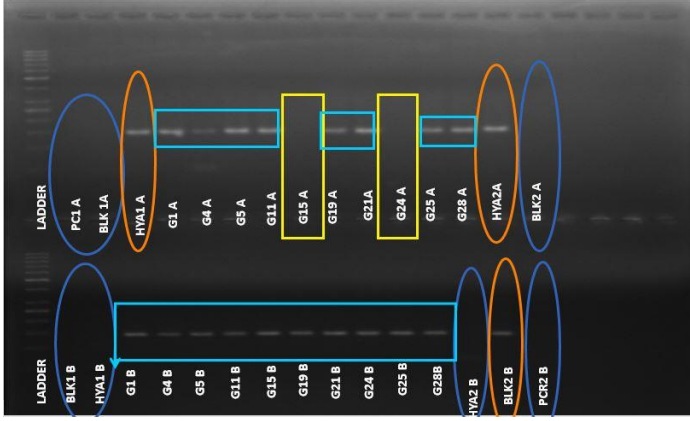
Şekil 10: Diş örneklerinin HVR-I bölgesinin A, C ve D fragmanlarının 1. izolasyonun 2. PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü. Kırmızı ile gösterilen PZR kontrolleri negatif çıkmıştır ve kontaminasyon olmadığını açıklamaktadır. Yeşil ile gösterilenler ise bize örneklerin istenilen aralıkta çalıştığını göstermektedir.

Birinci izolasyonunun E, F ve G fragmanlarındaki jel görüntüleri Şekil 11'de yer almaktadır. G1, G4, G5, G11, G15, G21, G24 ve G25 numaralı bireylerin A, C ve D fragmanlarında istenilen aralıktan farklı bantlaşmalar görülmüştür.



Şekil 11: Diş örneklerinin 1. izolasyonunun HVRI bölgesinin E fragmanı ile HVRII bölgesinin F ve G fragmanlarının 3. PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü. Kırmızı ile işaretlenmiş olan PZR negatif kontrollerinde başarılı olmadığını açıklayan bantlaşmalar görülmüştür. Mor ile işaretlenmiş olan örneklerde ise beklenildiğinden daha fazla bç uzunluğunda bantlaşma ve sinyaller görülmüştür.

Şekil 12'de izlenebileceği gibi diş örneklerinin 1. izolasyonunun 4. PZR'sinin A fragmanının Blank 1, Blank 2 ve HYA 1 ile B fragmanının Blank 1, Blank 2 ve HYA 1 negatif kontrolleri başarılı olmuştur. Ancak A fragmanının HYA 2 ve B fragmanının HYA 2 negatif kontrollerin de başarısızlık gözlenmiştir. Bu nedenle 1. izolasyonun 4. PZR'sinin tüm negatif kontrollerinde jel elektroforez uygulanmıştır. Yapılan kontrollerin sonuçları negatif çıkmıştır (Şekil 13).

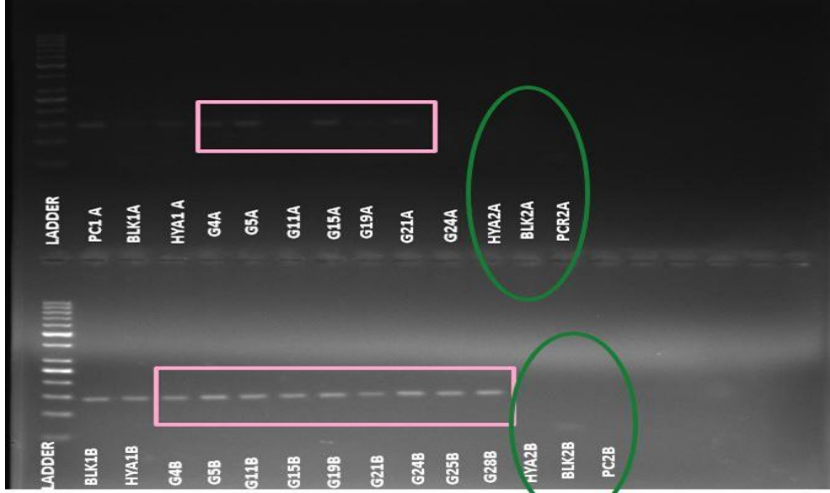


Şekil 12: Diş örneklerinin 1. izolasyonunun HVRI bölgesinin A ve B fragmanlarının 4. PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü. Lacivert ile işaretlenmiş olan negatif kontroller başarılı bir şekilde görülmektedir. Turuncu ile işaretli olan negatif kontrollerde ise primer dimer olduğu düşünülen bantlaşmalar yer almaktadır. Mavi ile gösterilen örneklerin tamamında ise başarılı olarak bantlaşmalar görülmektedir. Sarı ile işaretli olan G15 ve G24 numaralı örneklerin A fragmanının çalışmadığı görülmektedir.

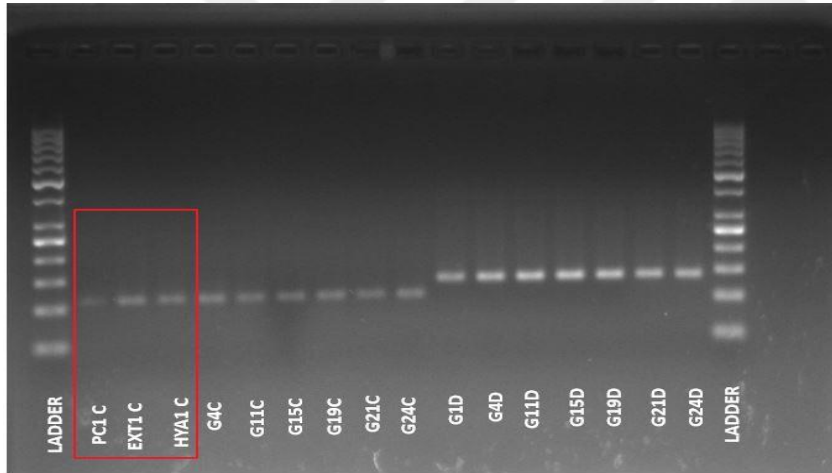


Şekil 13: Diş örneklerinin negatif kontrollerinin 1. izolasyonunun HVRI bölgesinin A ve B fragmanlarının 5. PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü. Kontrol amaçlı yapılan PZR1, EXT1, HYA1, HYA2, EXT2 ve PZR2 negatif kontrollerinde bantlaşma görülmemiştir.

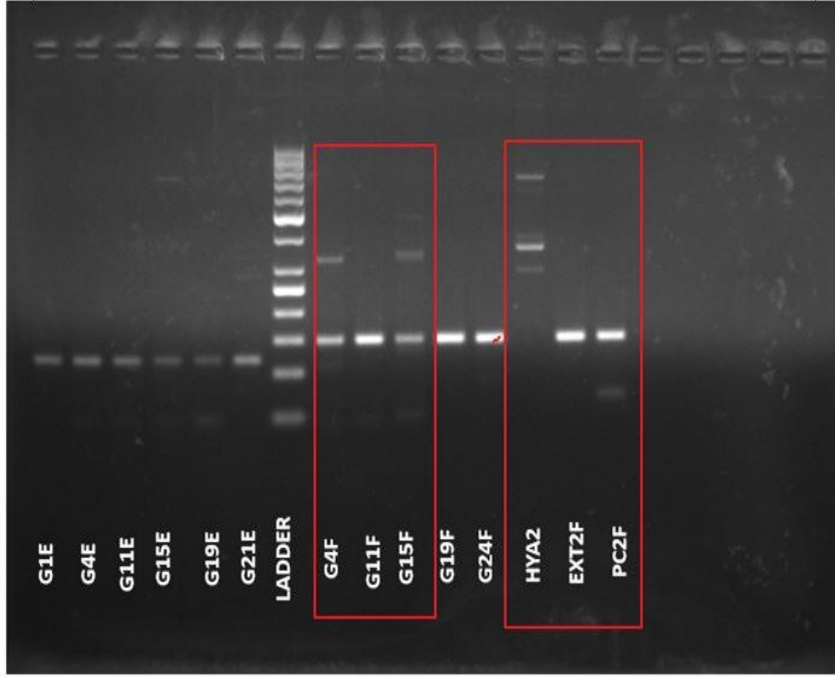
Şekil 14, 15 ve 16'da görülebileceği gibi diş örneklerinden elde edilen 2. izolasyonundan HVRI ve HVRII bölgelerinin A, B, C, D, E ve F fragmanlarına ait PZR jel görüntüleri yer almaktadır. A, B, D ve E fragmanlarında başarılı bantlaşmalar gözlenmiş ancak C ve F fragmanlarında başarılı bantlaşmalar görülmemiştir.



Şekil 14: Diş örneklerinin 2. izolasyonunun HVRI bölgesinin A ve B fragmanlarının 1. PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü. Pembe olarak işaretlenmiş örneklerde başarılı olarak bantlaşma görülmüştür. Yeşil olarak işaretlenmiş negatif kontrollerde bantlaşma görülmemiş ve sonuç başarılı olmuştur.

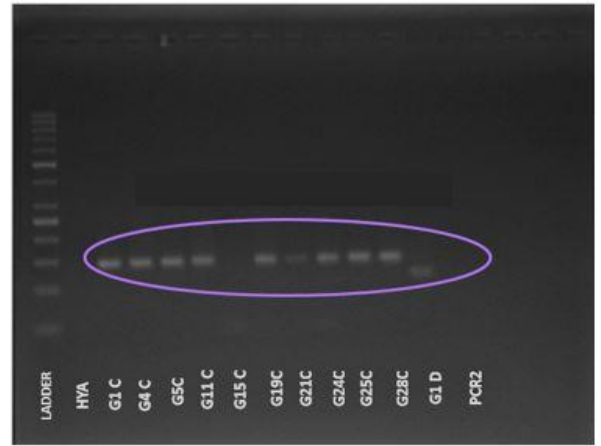
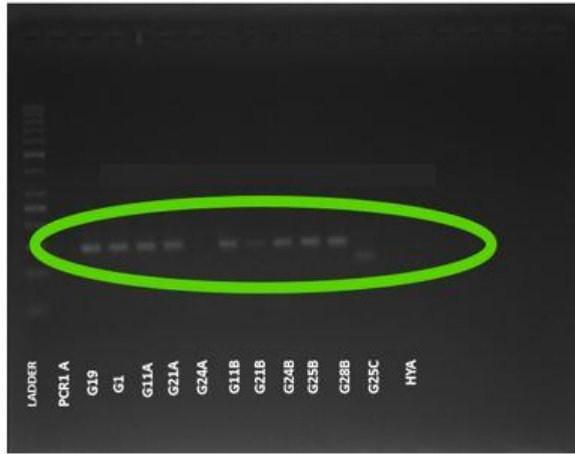


Şekil 15: Diş örneklerinin 2. izolasyonunun HVRI bölgesinin C ve D fragmanlarının 1. PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü (C fragmanlarında olumsuz bantlaşma) .



Şekil 16: Diş örneklerinin 2. izolasyonunun HVRI bölgesinin E fragmanı ile HVRII bölgesinin F fragmanının 1. PZR'sinden elde edilen jel görüntüsü (F fragmanında olumsuz bantlaşma).

Şekil 17'de görüldüğü gibi 1. ve 2. izolasyonların ardından 3. izolasyon yapılmıştır ve örneklerin tamamında istenilen bç aralığında bantlaşma görülmüştür.



Şekil 17: Diş örneklerinin 3. izolasyonunun HVRI bölgesinin A ve B (yeşil ile işaretli olan örnekler) ile C ve D fragmanlarının (mor ile işaretli olan örnekler) 1. PZR'sinden elde edilen agaroz jel elektroforez görüntüsü. Hem yeşil hem de mor ile işaretlenmiş olan örnekler de başarılı olarak bantlaşma görülmüştür.

Şekil 18’de görüldüğü gibi modern örneklerin yanak içi sürüntülerinin mtDNA HVRI (A-E fragmanı) ve HVRII bölgelerinin (F-G) jel görüntüleri yer almaktadır.

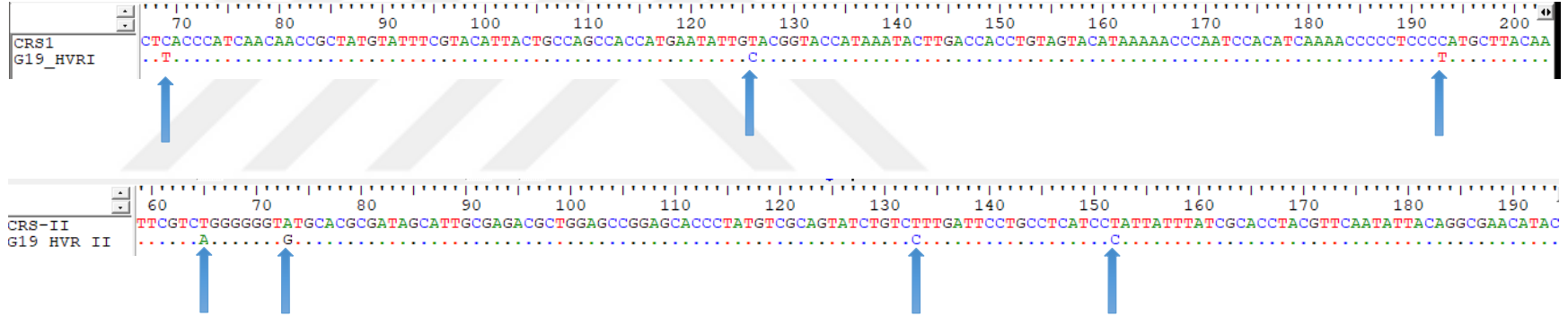


Şekil 18: Modern örneklerin HVRI ve HVRII jel görüntüsü.

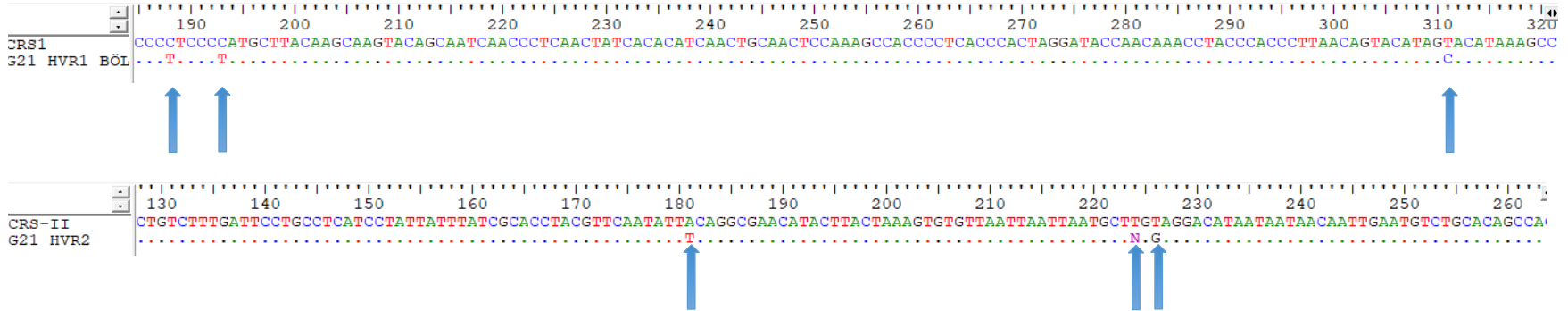
4.1.2. Bioedit Sonuçları

Şekil 19, 20 ve 21’de görüldüğü üzere G19, G21 ve G24 numaralı diş örneklerinin HVRI bölgesinin A, B, C, D ve E fragmanları ile HVRII bölgelesinin F ve G fragmanları uç uca eklenerek CRS referansına göre değişim gösteren nükleotitler işaretlenmiştir. Değişim gösteren bu nükleotitler Şekil 2’de bahsedilen pylotree’de yerleri bulunarak haplogrupları J1d, H2 ve R olarak belirlenmiştir.

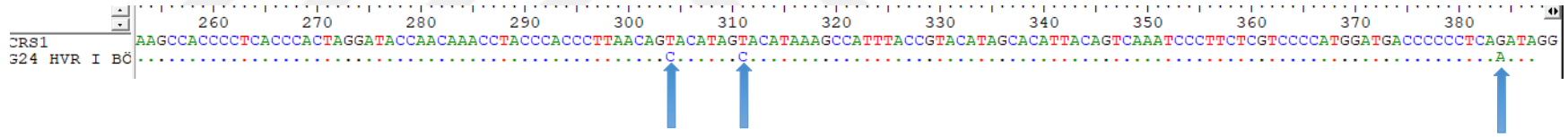




Şekil 19: G19 numaralı dış örneğinin HVRI ve HVR II bölgelerinin tüm fragmanlarının CRS'ye göre Bioedit ile düzenlenmesi. Yukarıda mavi ok ile gösterilmiş olan HVRI bölgesindeki 16069. pozisyonda C>T, 16126. pozisyonda T>C ve 16193. pozisyonda C>T görülmektedir. HVR II bölgesinde ise 65. pozisyonda T>A, 73. pozisyonda A>G, 133. pozisyonda T>C ve 152. pozisyonda T>C değişimleri görülmektedir.



Şekil 20: G21 numaralı dış örneğinin HVRI ve HVR II bölgelerinin tüm fragmanlarının CRS'ye göre Bioedit ile düzenlenmesi. Yukarıda mavi ok ile gösterilmiş olan HVRI bölgesindeki 16188. pozisyonda C>T, 16193. pozisyonda C>T ve 16311. pozisyonda T>C görülmektedir. HVR II bölgesinde ise 181. pozisyonda A>T, 224. pozisyonda okunamayan baz ve 226. pozisyonda T>G değişimleri görülmektedir.



Şekil 21: G24 numaralı diş örneğinin HVRI bölgelerinin tüm fragmanları CRS'ye göre Bioedit ile düzenlenmesi. Yukarıda mavi ok ile gösterilmiş olan HVRI bölgesindeki 16304. pozisyonda T>C, 16311. pozisyonda T>C ve 16384. pozisyonda G>A görülmektedir.

4.1.3. Haplogrupların Belirlenmesi

G19 ve G21 numaralı diş örneklerinin HVRI ve HVRII bölgelerine ait tüm fragmanlar ile G24 numaralı diş örneğinin HVRI bölgesininin tüm fragmanlarından elde edilen haplogruplar Tablo 18’de gösterilmiştir. G19 numaralı bireyin J1d, G21 numaralı bireyin H2 ve G24 numaralı bireyin R haplogruplarına ait olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 18: G19-G21 ve G24 nolu bireylerinin HVRI ve HVRII nükleotit değişimleri ve mtDNA haplogrupları.

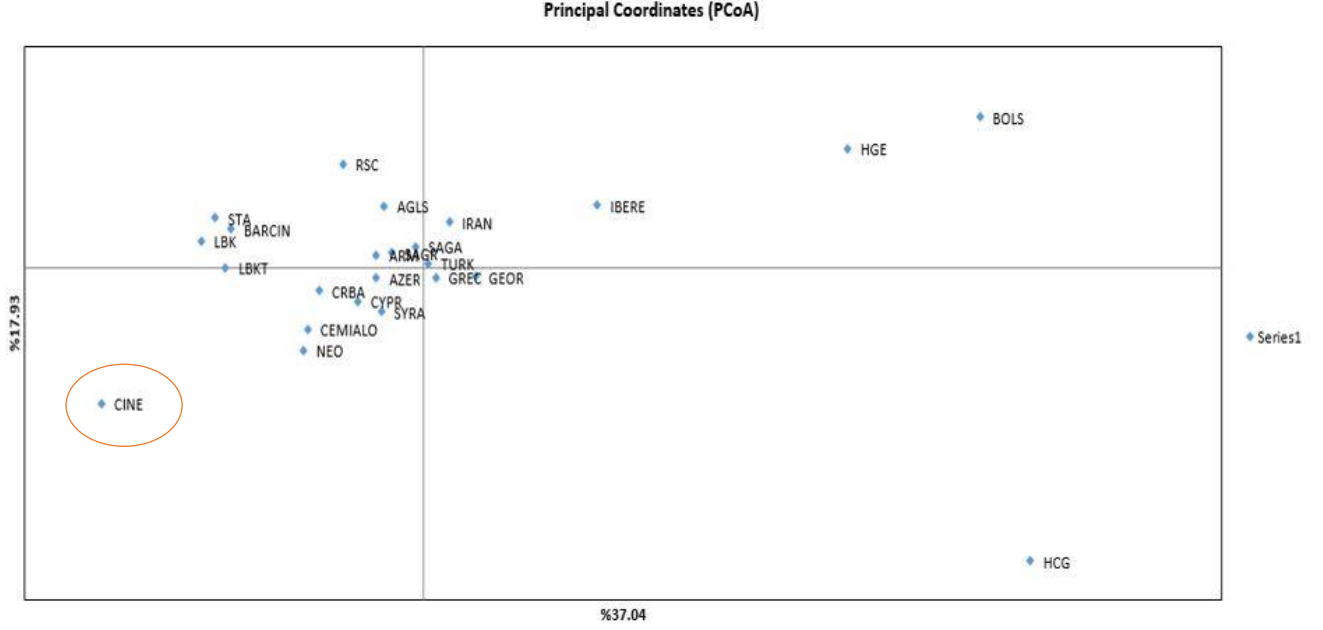
Örnek No	Haplogrup	HVRI Varyasyonu	HVRII Varyasyonu
G19	J1d	C16069T	T65A
		T16126C	A73G
		C16193T	T152C
		C16261T	A263G
G21	H2	C16188T	T224d
		C16193T	T226G
		T16311C	
G24	R	T16304C	
		T16311C	
		G16384A	

Örneklerle temasta bulunmuş olan araştırmacıların haplogrup analizleri yapıldığında ise Tablo 19’da yer alan nükleotit varyasyonları görülmüştür.

Tablo 19: Örneklerle temasta bulunan araştırmacıların HVRI ve HVRII varyasyonlarına göre ait oldukları haplogruplar.

Örnek Numarası	HVRI Varyasyonları	HVRII Varyasyonları	Haplogrup
Araştırmacı 1	C16069T	A73G	J1b
	T16126C	T152C	
	G16153A	A263G	
	C16193T		
Araştırmacı 3	C16354T	A263G	H2a1
Araştırmacı 2	A16343G	A73G	U3
	G16361A	C150T	
		T195C	
		A263G	

Şekil 22’de Çine-Tepecik topluluğunun G19, G21 ve G24 numaralı bireylerinden elde edilen sekans çıktıları, yayınlanmış arkeolojik ve Modern Anadolu insan topluluklarının verileri ile karşılaştırılarak yapılan PoCA analiz sonuçları gösterilmiştir. Yapılan analiz sonucunda Çine-Tepecik diğer topluluklardan görece uzakta sol alt köşede (3. parselde) kümelenmiştir.



Şekil 22: G19, G21 ve G24 numaralı örneklerin HVRI sekans verileri ile arkeolojik ve modern Anadolu topluluklarının (22 popülasyon) HVRI sonuçlarının PCoA ile 2D gösterimi (Çine-Tepecik yuvarlak içerisinde gösterilmiştir).

4.2. TÜM GENOM BULGULARI

Tüm genom çalışmaları öncelikle 10 bireyin diş örneğinden gerçekleştirilmiştir. Ancak gelen ön dizileme sonuçlarında biyoinformatik analizlerin yapılabileceği düzeyde başarı elde edilememiştir. Sonraki aşamada G1, G11, G15, G21 ve G25 numaralı bireylerin *Pars petrosa* örneklerinden tüm genom kütüphaneleri hazırlanmıştır. Ön dizileme sonuçlarında 5 bireyden bir tanesinde (G25 numaralı birey) analiz edilebilir düzeyde içsel DNA ve genom kapsamı olduğu görülmüş ve popülasyon genetiği analizleri için 11,000 TNP elde edilmiştir.

4.2.1. QPZR Sonuçları

On bireyin diş örneklerinden ve negatif kontrollerinden (HYA1-2, EXT1-2 ve ÇTLB) yapılan qPZR döngü sayıları Tablo 20'de verilmiştir. Diş örneklerinde DNA varlığı beklenen döngü sayısında (6-16 arasında) gözlenmiştir. Aynı şekilde negatif kontrol tüplerinde de DNA içeriğinin olmadığı yine beklenen döngü sayılarına göre belirlenmiştir.

Tablo 20: Çine-Tepecik dış örneklerinin ve negatif kontrollerin qPZR döngü sayıları.

Örnek No	Döngü No 1	Döngü No 2
ÇTLB	23,28	23,22
EXT1	21,59	22,05
HYA1	22,69	22,75
G1	11,26	11,59
G4	9,33	9,47
G5	12,13	12,11
G11	14,58	14,80
G15	10,81	10,55
G19	9,98	10,40
G21	10,02	11,23
G24	10,94	10,77
G25	11,69	12,89
G28	9,48	9,49
HYA2	22,90	24,52
EXT2	22,53	22,63

Tablo 21’da yer alan G1, G11, G15, G21 ve G25 numaralı *Pars petrosa* örneklerinin ve negatif kontrollerin (ÇTLB, EXT1, HYA1, HYA2 ve EXT2) qPZR döngü sayıları yer almaktadır. *Pars petrosa* örneklerinde DNA varlığı beklenen döngü sayısında (6-16 arasında) gözlenmiştir. Aynı şekilde negatif kontrol tüplerinde de DNA kontaminasyonu olmadığı qPZR sonucunda elde edilen yüksek döngü sayıları ile de onaylanmıştır.

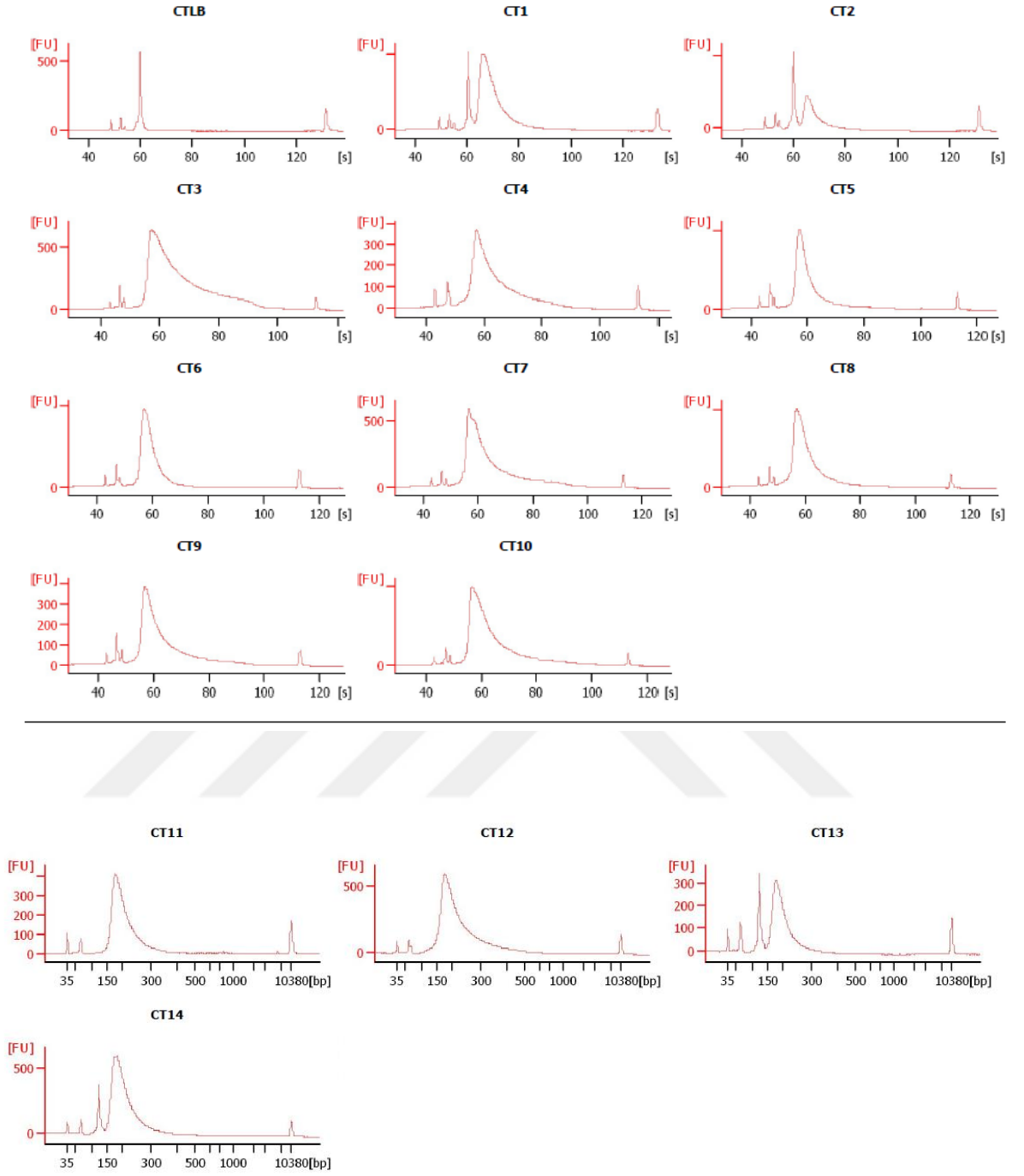
Tablo 21: *Pars petrosa* örneklerinde ve negatif kontrollerde qPZR döngü sayıları.

Örnek No	Döngü No 1	Döngü No 2
ÇTLB	23	23
EXT1	21	22
HYA1	22	22
G1	8	8
G11	8	8
G15	9	9
G21	9	9
G25	11	11
HYA2	22	24
EXT2	22	23

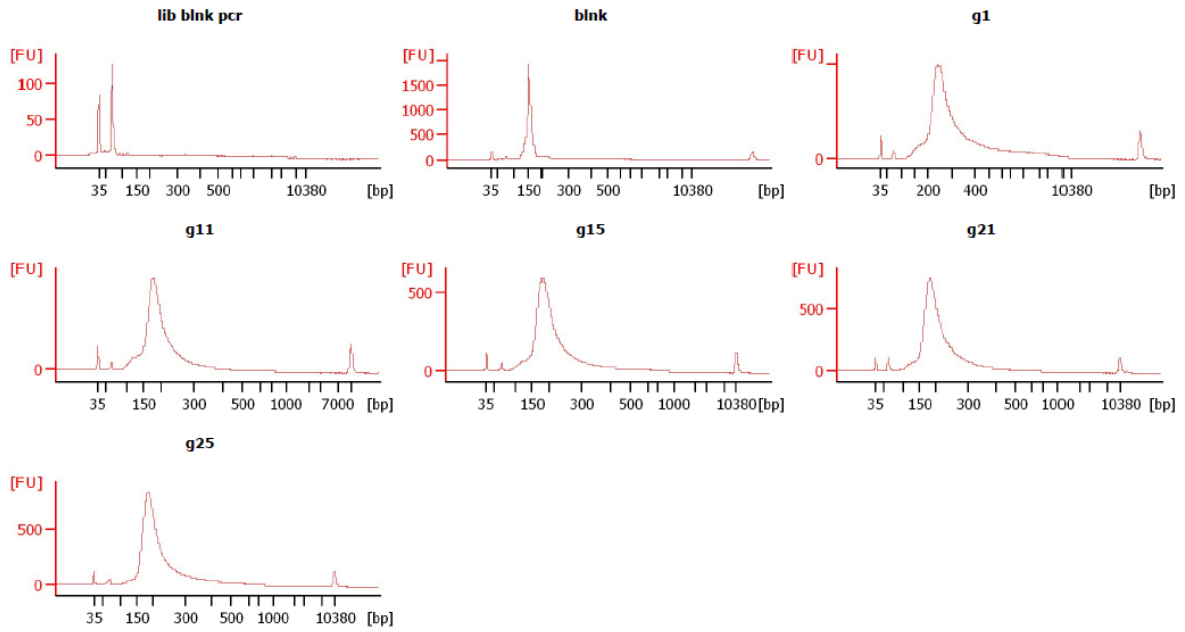
4.2.2. Biyoanalizör Sonuçları

Diş örneklerinden yapılan biyoanalizör sonuçları Şekil 23'de verilmiştir. Negatif kontrol olan ÇTLB ve CT5-12 numaralı diş örneğinde beklenen pik (Şekil 6) gözlenmiştir. Ancak CT 1-2-3-4-13-14 numaralı örneklerde pikler beklenen yükseklik ve fragman aralığında gözlemlenmemiştir.

Şekil 24'de görüldüğü gibi Çine-Tepecik G1, G11, G15, G21 ve G25 numaralı pars petrosa örneklerinin ve negatif kontrollerinin biyoanalizör sonuçları yer almaktadır. Burada negatif kontrollerde ve örneklerin tamamında beklenildiği aralıkta (bknz. Şekil 6) pikler görülmektedir.



Şekil 23: Çine-Tepecik dış örneklerinin ve negatif kontrollerin biyoanalizör sonuçları.



Şekil 24: Çine-Tepecik G1, G11, G15, G21 ve G25 numaralı pars petrosa örneklerinin ve negatif kontrollerinin biyoanalizör sonuçları.

4.2.3. Ön Dizileme Sonuçları

On bireyin diş genom çalışmalarının ön dizileme sonuçları Tablo 22’de sunulurken G1, G11, G15, G21 ve G25 numaralı bireylerin *Pars petrosa* genom verilerinin ön dizileme sonuçları 21’de yer almaktadır. Tablo 22’de görüldüğü üzere elde edilen insan genom içeriğinin oranı %10’dan düşük olduğu için biyoinformatik analizler yapılamamıştır. Antropolojik olarak cinsiyeti kadın olarak belirlenen G25 numaralı bireyin, biyolojik cinsiyeti de dişi (XX) olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra antropolojik cinsiyeti erkek olarak belirlenen G1 numaralı bireyin biyolojik cinsiyeti net olarak belirlenemese de XY ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Antropolojik cinsiyeti kadın olarak belirlenen G5, G19, G21, G24 ve G28 numaralı bireylerde biyolojik cinsiyet tayini XX ile uyumlu olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Tablo 22: Çine-Tepecik dış örneklerinin ön dizileme sonucu.

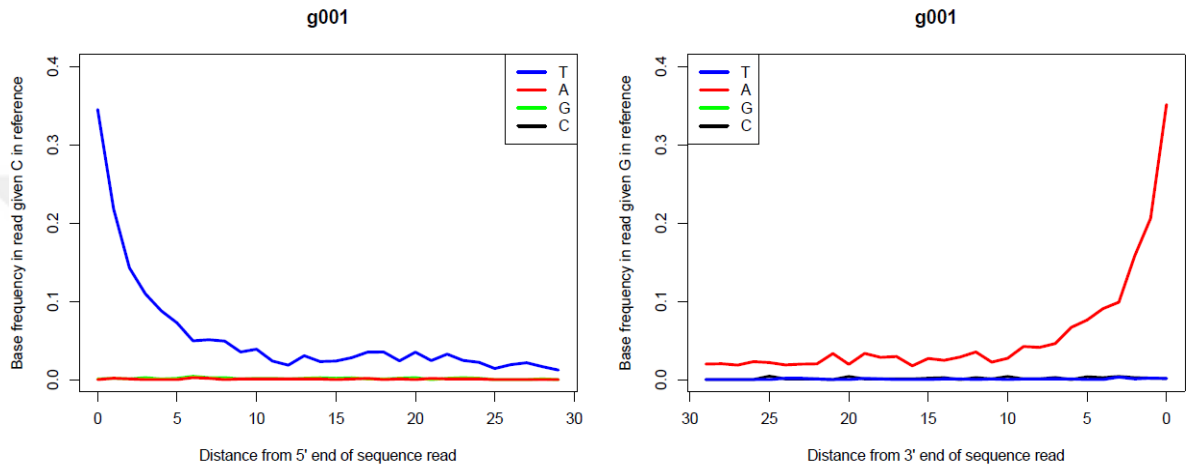
Örnek No	Birleşen Sekans	İnsan Sekansı	İnsan DNA Oranı	Ortalama Okuma uzunluğu	Klonalite	Kısa Okuma	Genom Kapsamı	Mt_seq	X_seq	Y_seq	Biyolojik Cinsiyet	5' Hasar	3' Hasar
G1	18085346	155938	0,008044911	745,188	926,079,934	5,127,323,963	0,00295826	240	4283	1338	XY ile uyumlu	0,289538	0,286399
G4	13918126	868	0,000371386	635,481	7,719,094,602	8,183,401,045	1.09E+00	7	44	2	?	0,448276	0,336066
G5	19644295	6689	0,001013628	609,604	8,934,310,968	6,936,018,481	8.40E+00	218	210	51	XY ile uyumlu	0,365128	0,378458
G11	21699463	929	0,001053805	670,263	1,010,626,667	8,723,050,684	1.30E+00	2	41	3	XX ile uyumlu	0,308271	0,296296
G15	23334240	1247	0,000956706	667,338	7,440,422,863	8,993,459,953	1.25E+00	47	43	7	?	0,358779	0,375
G19	18836256	546	0,000977052	695,318	8,063,464,464	902,303,847	6.95E-01	2	29	0	XX ile uyumlu	0,304348	0,256757
G21	15469299	6220	0,000947942	553,043	8,899,345,336	6,097,926,896	7.79E+00	7	326	8	XX ile uyumlu	0,481737	0,506211
G24	19814643	876	0,000464959	667,625	7,967,003,148	8,595,462,933	1.19E+00	8	32	2	XX ile uyumlu	0,333333	0,365079
G25	21464853	11789	0,001051253	584,825	104,232,218	5,109,239,973	0,000161854	45	572	21	XX	0,408444	0,353337
G28	16861788	2037	0,000435956	658,608	7,998,911,713	7,147,326,894	3.17E+00	0	106	7	XX ile uyumlu	0,358108	0,423313

Tablo 23’de yer alan G1, G11, G15, G21 ve G25 numaralı bireylerin *Pars petrosa* örneklerinden elde edilmiş olan genom verilerinin ön dizileme sonuçları yer almaktadır. G25 numaralı bireyin insan genom oranının %26 olduğu belirlenmiştir. G1, G15 ve G21 numaralı *Pars petrosa* örneklerinin insan genom içeriği dış örneklerine oranla daha yüksek çıkmıştır. Bir çocuğa ait G11 numaralı örneğin hem dış hem de *Pars petrosa* genom verileri yüksek çıkmamıştır. G25 numaralı bireyden elde edilen genom verisi biyoinformatik analizlerin yapılmasına olanaklar sağlanmıştır. G15 numaralı bireyin dış örneğinden biyolojik cinsiyeti tespit edilememesine rağmen *Pars petrosa* verisi biyolojik cinsiyetinin XY olduğunu ortaya çıkarmıştır.

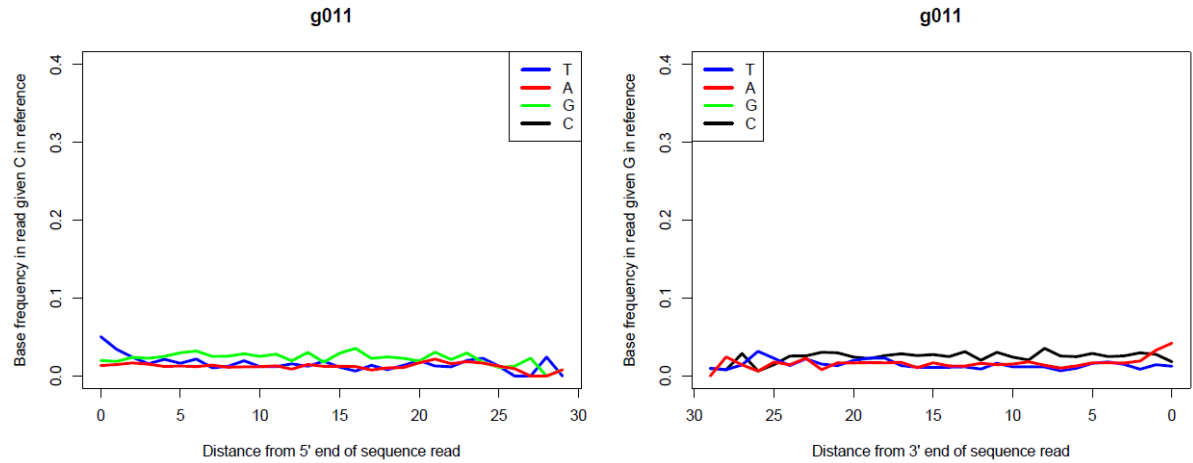
Tablo 23: *Pars petrosa* örneklerinin ön dizileme sonucu.

Örnek No	Birleşen Sekans	İnsan Sekansı	İnsan Oranı	DNA	Ortalama Okuma uzunluğu	Klonalite	Kısa Okuma	Genom Kapsamı	Mt_seq	X_seq	Y_seq	Biyolojik Cinsiyet	5' Hasar	3' Hasar
G1	398581	5831	0,01397		673,676	1,558,908	3,843,391	9,63E-05	0,002837	165	55	-	0,34518	0,3516
G11	6815673	645	0,000818		654,509	1,291,712	8,031,934	7,86E-06	0,006579	29	3	-	0,05056	0,0423
G15	6311428	280659	0,041427		669,678	1,565,263	2,114,249	0,004589	0,302312	7593	2306	XY	0,3515	0,35145
G21	3603517	46442	0,012287		568,995	1,543,691	9,302,798	0,000604	0,019555	2331	63	-	0,46152	0,46521
G25	4946106	1427196	0,261667		621,611	1,577,739	1,965,413	0,02109	0,895528	71200	1713	XX	0,44091	0,44192

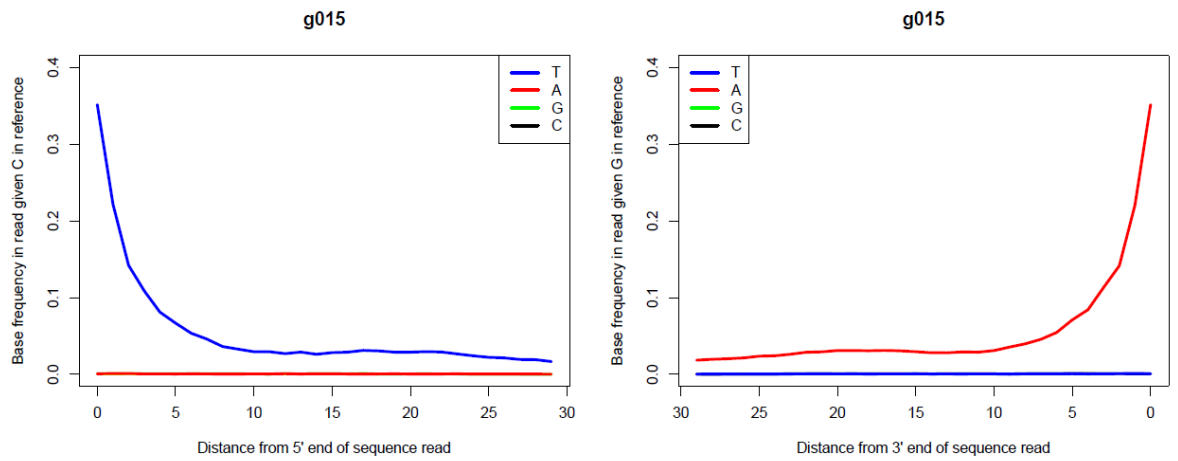
Tablo 23'ün işaret ettiği diğer bir sonuç ise ölüm sonrası nükleotit hasarının frekansına dair verilerdir. G1, G15, G21 ve G25 *Pars petrosa* örneklerinde gözlemlenen ölüm sonrası C'den $\rightarrow$ T'ye/ G'den $\rightarrow$ A'ya dönüşümlerim oranı sırası ile %35, %35, %45, %45 olarak hesaplanmıştır (Şekil 25, 27, 28 ve 29). G11 *Pars petrosa* örneğinin otantiklik düzeyi ise %0,01 olarak tespit edilmiştir ve bu çok düşük bir otantiklik sinyali olduğu için bu örnek ileri analizlere dahil edilmemiştir (Şekil26).



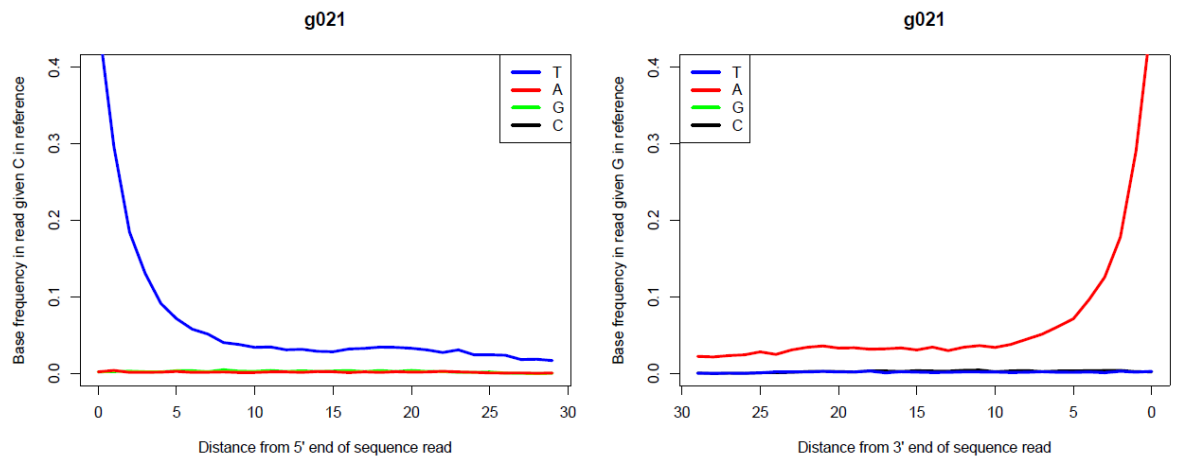
Şekil 25: G1 *Pars petrosa* örneğinin PMD grafiği.



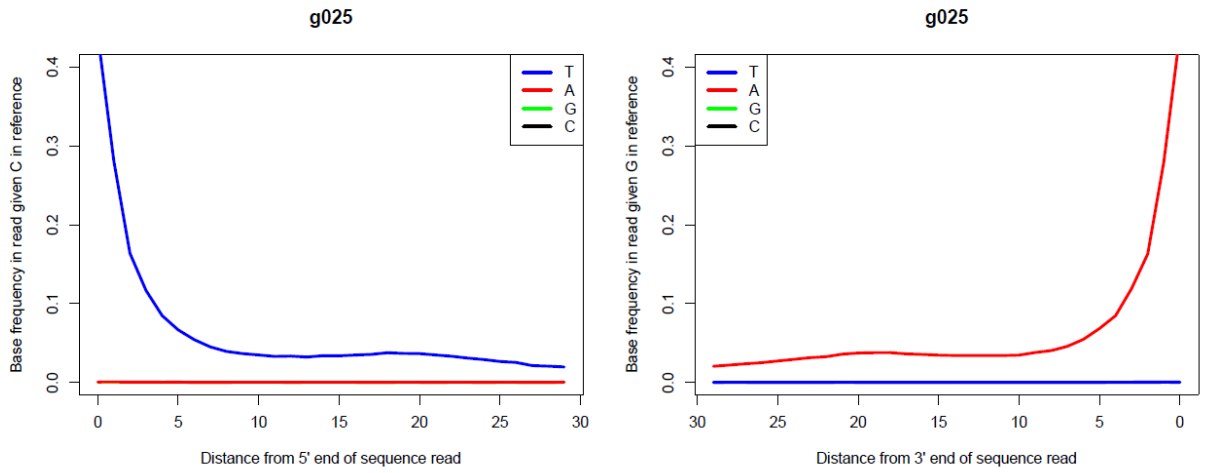
Şekil 26: G11 *Pars petrosa* örneğinin PMD grafiği.



Şekil 27: G15 *Pars petrosa* örneğinin PMD grafiği.



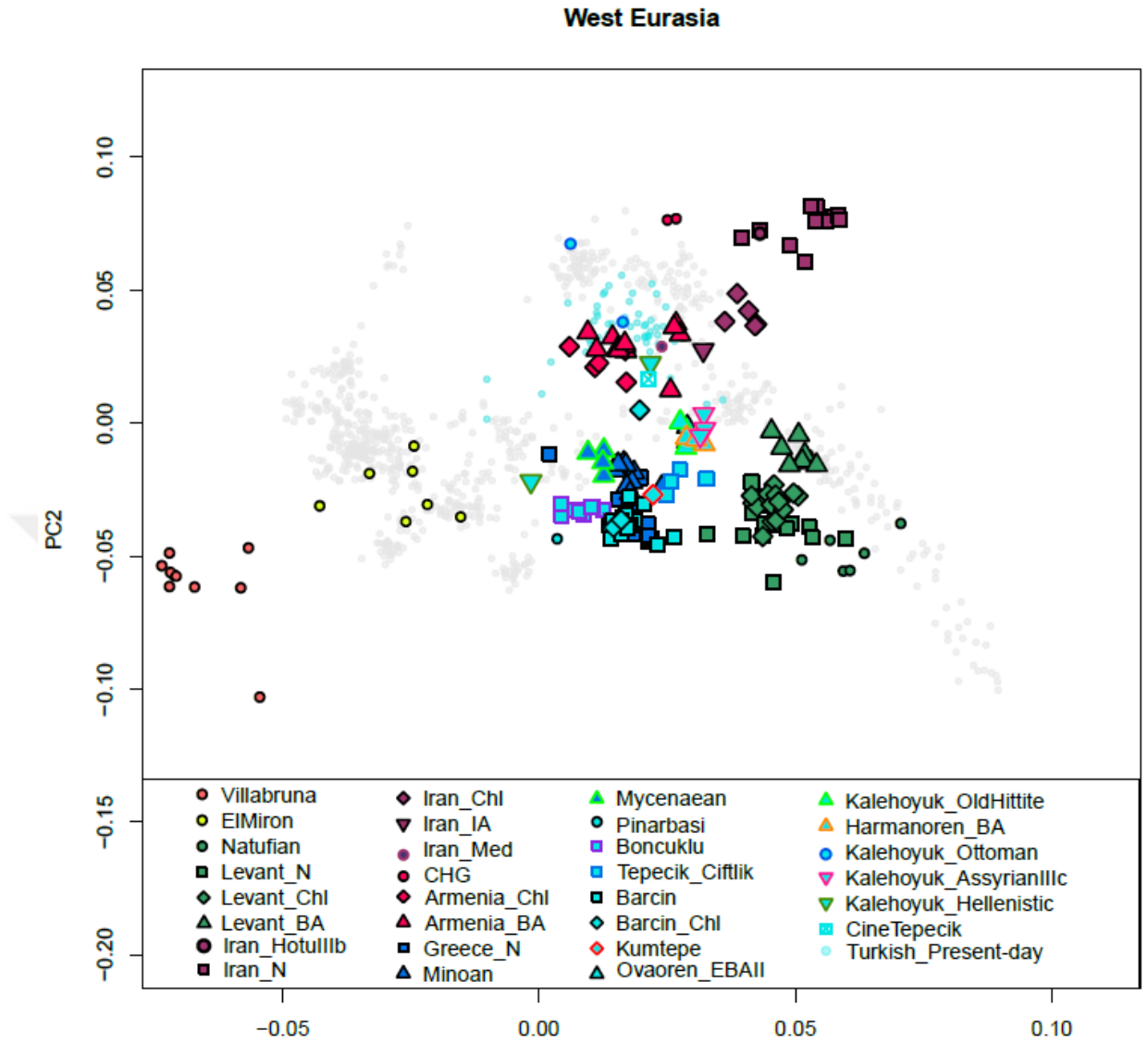
Şekil 28: G21 *Pars petrosa* örneğinin PMD grafiği.



Şekil 29: G25 *Pars petrosa* örneğinin PMD grafiği.

4.2.4. Temel Bileşenler Analizi (PCA)

Şekil 30'da yer alan PCA grafiğine göre Çine-Tepecik popülasyonu (G25 bireyi ile temsil edilmektedir) Kalehöyük-Helenistik örnekleri ile üst üste çakışmaktadır. Çine-Tepecik popülasyonunun yakın olduğu diğer popülasyonlar; Ermenistan Kalkolitik ve Bronz Çağ ile İran Demir Çağı örnekleridir (Human Origins dataset). Çine-Tepecik, beklenenin tersine Kıta Yunanistan, Miken ve Minos örneklerine uzak konumlanmıştır. Bununla birlikte üçü arasında Miken popülasyonuna daha yakın konumlandığı görülmektedir.

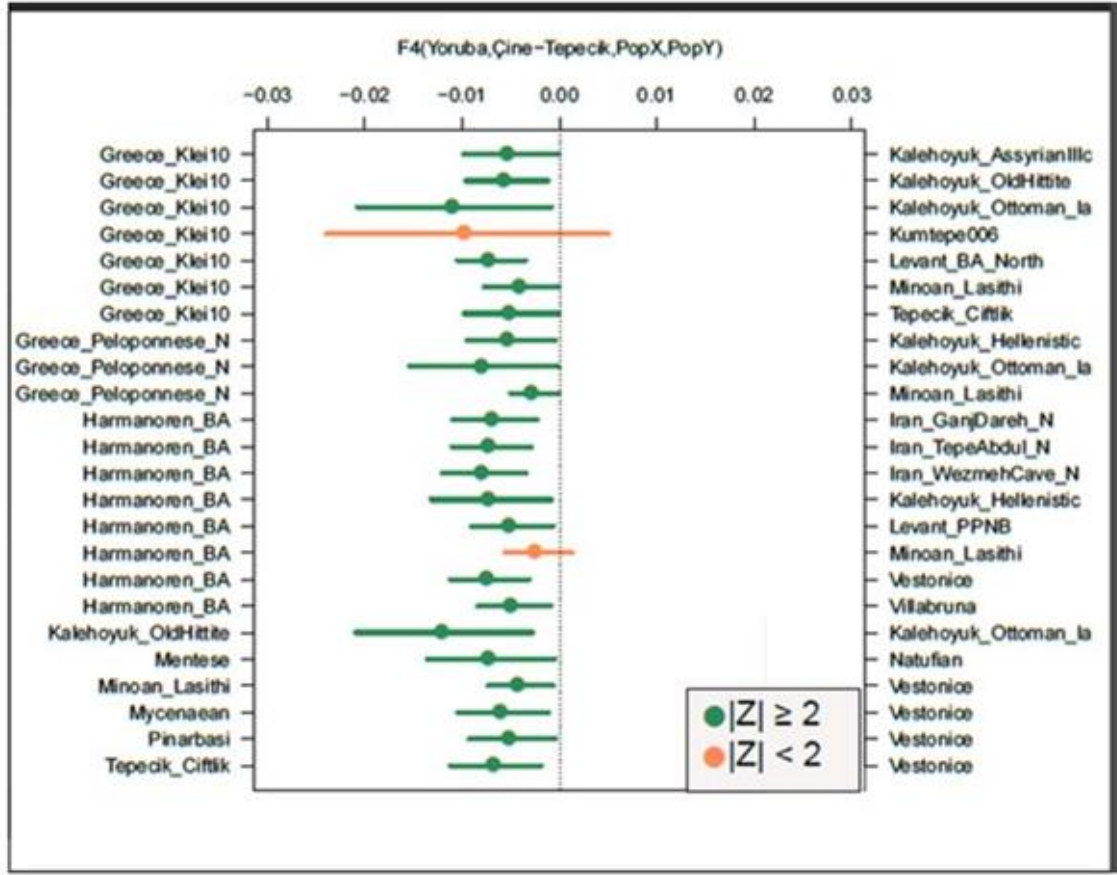


Şekil 30: Çine-Tepecik popülasyonunun PCA grafiği.

4.2.5. f4 Testi

f4 istatistiği ile test edilen, popülasyonların birbirine olan genetik yakınlıkları Şekil 31'deki grafik ile gösterilmiştir. G25 numaralı örneğin 2 ve 2'den büyük olan Z skoru değerleri (grafikte yeşil ile gösterilen plot) göz önüne alınarak yapılan değerlendirmeye göre Kalehöyük, Levant, İran Neolitik, Vestonice ve Natufian toplulukları yerine Yunanistan, Miken, Minos, Harmanören, Pınarbaşı ve Tepecik-Çiftlik topluluklarını seçmiştir. Z skorunun 2'den küçük olduğu değerler (grafikte

turuncu ile gösterilen plot) G25 numaralı bireyin Kumtepe, Yunanistan, Minoan ve Harmanören toplulukları arasında seçim yapmadığını göstermektedir.



Şekil 31: f4 (Yoruba, Çine-Tepecik;PopX, PopY) testi sonucunda elde edilen f4 istatistiklerinin grafiksel gösterimi.Yoruba; Dış grup, PopX ve PopY Tablo13'de (mat metoda koyman gereken) de listelenen popülasyonlardır. $Z < 2$ olan karşılaştırmalar turuncu, $Z \geq 2$ olan karşılaştırmalar ise yeşil renkle gösterilmiştir.

4.2.6. mtDNA Otantikliği ve Haplogrup Değerlendirmesi

4.2.6.1.Haplogrup Değerlendirmesi

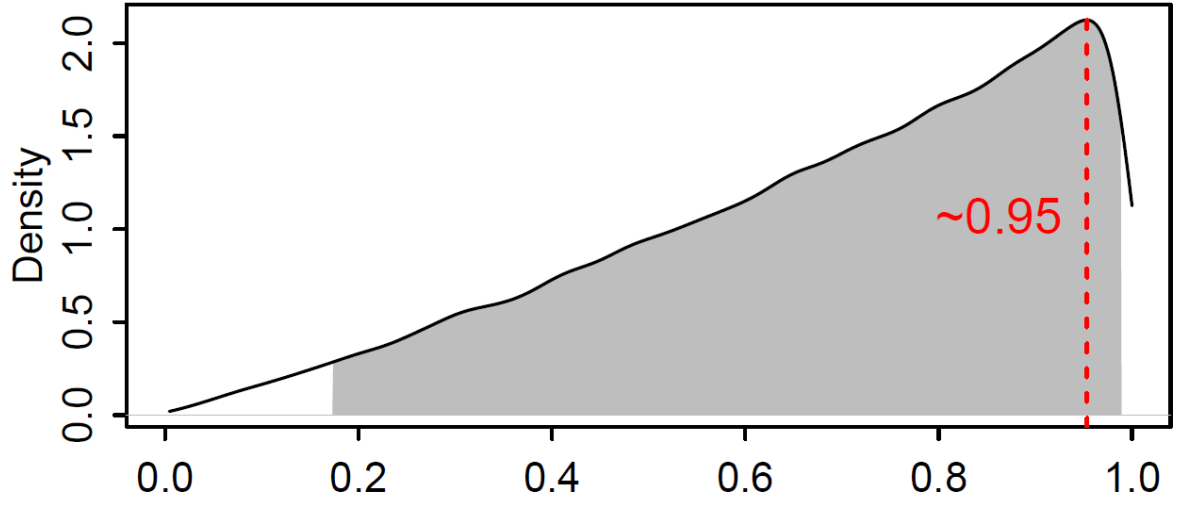
Tablo 24'de yer alan ön dizileme sonucuna göre G25 numaralı bireyin mtDNA haplogrubu H2a2a1 olarak belirlenmiştir.

Tablo 24: G25 numaralı bireyin tüm genom verisinden elde edilen mtDNA haplogrup sonucu.

mt aralığı	Haplogroup	Kalite	Polimorfizm bulunma olasılığı	Polimorfizm Noktaları
MT				
1-16569	H2a2a1	1	0,5000	
MT				
1-16569	H2a2a1a	2	0,0000	15314A
MT				
1-16569	H2a2a1b	3	0,0000	9299G
MT				
1-16569	H2a2a1c	4	0,0000	6632C 16051G
MT				
1-16569	H2a2a1d	5	0,0000	16172C

4.2.6.2. mtDNA Otantikliği

Schmutzi (Renaud vd., 2015) yazılımı ile yapılan analiz sonucunda G25 numaralı bireyin tüm genom mitokondri kontaminasyonu %0 olarak hesaplanmıştır. Diğer taraftan contamMix (Fu vd., 2013) yazılımı ile yapılan analiz sonucunda kontaminasyon %5 olarak bulunmuş ve %95 oranında istatistiksel olarak anlamlı sonuca ulaşılmıştır (Şekil 32).



Şekil 32: G25 tüm genom mtDNA kontaminasyon grafiği (%95 oranında anlamlı çıkmıştır).

5. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. ANTİK DNA ELDESİ, KONTAMİNASYON VE VERİMLİLİK

Moleküler antropoloji çalışmalarında genellikle kazı alanlarından ve müzelerden elde edilen antik örnekler kullanılmaktadır (örn., Hummel, 2003; Brown ve Brown, 2011). Örneklerin elde edilmeden önceki süreçte bulunduğu coğrafyanın iklimi, toprak kimyasal içeriği, örneğin yaşı ve su ile olan temasından dolayı DNA'da hasarlar oluşmaktadır (örn., Hummel, 2003; Brown ve Brown, 2011). Bunun yanı sıra kazı alanlarından elde edilen örneklerin çıkarılması esnasında güneşte kalması veya nemli bir yerde saklanması da DNA eldesindeki verimliliği etkilemektedir (örn., Hummel, 2003; Brown ve Brown, 2011). Örneklerin elde edilmesinden genetik laboratuvarına gelme süresi boyunca uygun saklama koşulları ve toplama tekniklerinin yerine getirilmemesi sebebiyle de DNA eldesindeki verimlilik azalmaktadır.

Çine-Tepecik örneklerinde örneklerin çoğaltılabilir DNA izolasyonlarında %100 (10 kişiden 10'u) başarı elde edilmiş, ancak mtDNA amplifikasyonundaki başarı oranının %30 olduğu (10 kişiden 3'ünde) tüm genom amplifikasyonundaki başarı da %20 olarak tespit edilmiştir. Biyoarkeolojik örneklerden DNA elde edimi gerçekleşse dahi PZR aşamasında ve ön dizileme sürecinde olumlu sonuçlar elde edilmesi her zaman mümkün olmamaktadır. Çine-Tepecik örneğinde gözlemlendiği gibi antik örneklerden DNA elde edimi (izolasyonu) birçok arkeolojik toplulukta farklı başarı oranlarında görülmektedir. Nitekim Güneybatı Anadolu'dan Sagalassos insan nüfusu için antik DNA amplifikasyon başarı oranı (Ottoni vd., 2011) %62 iken, Suriye'deki Yakın Doğu Neolitik popülasyonu (yaklaşık M.Ö. 8000) için %23'tür (Fernandez vd., 2014). Doğu Anadolu bölgesi için de Çemialo-

Sırtı yerleşiminde %66 (Yaka, 2015), Kuzeybatı Anadolu'dan Kumtepe'de %50 (Omtrak vd., 2015), günümüz Anadolu örneklerinde (İstanbul-Ankara) %95 amplifikasyon başarısı görülürken (Comas vd., 1996) İberyalılarda da %100 (Sampietro vd., 2005) olarak görülmüştür.

Antik DNA amplifikasyon başarısı çalışmada yer alan örneklem sayısı ile ilintili olmamakla birlikte iskeletlerin biyolojik yaşının, mikro düzeydeki korunma durumunun (Campos vd., 2011; Götherstorm vd., 2002) zaman açısından eskiliğinin ve arkeolojik alanın bulunduğu coğrafi karakterlerin (enlemin, sahadaki mikro çevresel koşulların) birlikte DNA elde etme oranını etkilediği tahmin edilebilir.

Her antik bireyin biyolojik yaşı ve her bir örneğin boyutu, DNA elde edim oranlarını ve aDNA'nın başarılı olarak elde edilmesini etkileyen diğer faktörlerden bazılarıdır (Campos vd., 2011; Ottoni vd., 2011; Rohland ve Hofreiter, 2007). Örneğin, Çine-Tepecik G11 numaralı bireyin çocuk olması nedeni ile verimli aDNA elde edilemediği düşünülmektedir. G11 numaralı bireye ait olan PZR sonuçlarında da D ve E fragmanlarına ait amplifikasyon hiç gerçekleşmemiştir. Öte yandan, örneğin biyolojik yaşı tek ve geçerli bir kısıt olarak görülmeyebilir, nitekim mtDNA amplikasyonu gerçekleşmeyen veya ancak sınırlı amplikasyonları yapılabilen örneklerin çoğu erişkin bireylere aittir (bkz. Tablo 17). Dolayısıyla iklim ve çevre koşulları gibi diğer faktörlerin etkisi ile iskelet ve DNA korunumunun farklılaştığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Tez çalışmasında mtDNA HVRI ve HVRII bölgelerinin tekrarlanan amplifikasyonlarda erişkin olan G19 ve G21 numaralı bireylerde tüm fragmanlar elde edilirken, yine erişkin olan G24 numaralı bireyden sadece HVRI bölgesine ait fragmanlar elde edilmiştir. Ek olarak erişkin olan G1, G4, G5, G15, G25 ve G28 numaralı bireylerde HVRI ve HVRII bölgelerine ait amplifikasyon gerçekleştirilememiştir. Genel olarak bu durumun antik DNA çalışmalarındaki bir diğer sorunla (DNA'nın çok fazla kırık parça içermesi gibi, Paabo vd., 2004) ilişkili olarak HVRI ve HVRII bölgesinde yer alan fragmanların yakalanmasındaki zorlukla bağlantılı olduğu söylenebilir. Nitekim bu zorluklar Montiel vd. (2001), Macaulay ve Richards (2006), Stoneking (2017) gibi çalışmalarda da rapor edilmiştir.

mtDNA haplogrup tayininde verimli sonuç elde edilmesi için sırasıyla A, B, C, D, E, F ve G fragmanlarının tek bir dizi olarak elde edilmesi ve birbiri ile örtüşmesi gerekir (Ottoni vd., 2011). Bu noktada fragmanların boyu ve dizisi de HVRI ve HVRII bölgelerinin tek bir dizi olarak elde edilmesinde etkili olmaktadır. A ve B fragmanlarının C ve E fragmanlarından görece uzun olmasından (bkz. Tablo 5) dolayı çoğunlukla daha fazla sayıda veri oluşur (bkz. Tablo 17), C ve E fragmanlarının kısa olması da sekanslama aşamasında okunma başarısını düşürür. Bu nedenle örneklerin HVRI ve HVRII bölgelerinin dizisinin bütünsel olarak elde edimini güçleştirir.

Antik DNA sonuçlarının güvenilirliği için adanmış bir aDNA laboratuvarı gereklidir. Bu gereklilik çoğunlukla modern bulaşma nedeniyledir ve kontaminasyonları kontrol etmek için gerekli önlemler bu özel laboratuvarlarda alınabilir. Çalışmanın yürütüldüğü ODTÜ, Modsimmer Binasında bulunan aDNA laboratuvarı 2012 yılında inşa edilmiş ve kontaminasyon önlenmesi amacıyla tüm önlemler (deneylerden önce UV ışınlama, laboratuvara erişim sınırlılığı, tüm tezgahları çamaşır suyu ile temizleme, laminar akış kabini kullanımı, DNA'sız laboratuvar ekipmanları ve kimyasalları) alınmıştır. Bunlara ek olarak, kemik ve diş örneklerinin öğütülmesi, aDNA izolasyonları ve PZR hazırlıkları, aDNA laboratuvarının iki ayrı odasında üç farklı kabinde gerçekleştirilmiştir. Dizileme için gönderilen setlerde negatif kontrollerin tümü (öğütme, ekstraksiyon ve PZR aşamaları) gerçekleştirilmiştir. İnsan aDNA (mtDNA) çalışmalarındaki bir diğer önemli adım, eski insan örneklerinin, özellikle de temel Sanger dizileme yöntemi uygulanmasının kullanılmasıdır (Green vd., 2009; Paabo vd., 2004).

Örneklerde kontaminasyonun varlığına sekanslama öncesinde uygulanan agaroz jel elektroforez görüntüleri aracılığıyla saptanabilmektedir. Kontrol tüpleri olarak kullanılan örneklerde görülen bantlaşmalar kontaminasyona işaret etmektedir. Öncelikle kontrol edilmesi gereken durum bantlaşmanın görüldüğü bç aralığıdır. Eğer bantlaşma antik örnekler için kullanılan primerlerin bç aralığında ise çapraz kontaminasyon olabileceği akla gelmektedir. Bu aşamada aynı izolasyondan yeni bir PZR hazırlayarak tekrar kontroller sağlanmalıdır.

Bu tez kapsamında elde edilen agaroz jel görüntülerinin (Şekil 13) aynı izolasyonuna ait olan farklı PZR'lerinin negatif kontrollerinde bantlaşmalar görülmüştür. Bu durumun izolasyon kaynaklı çapraz kontaminasyon mu yoksa kullanılan sarf malzeme ve kimyasal kaynaklı mı olduğunu anlamak için negatif kontrollerden tekrar PZR hazırlanmıştır (bkz. Şekil 14). Yeni yapılan PZR'de protokoller gereği deneylerden bir gün önce laboratuvarda UV lambaları açılmış ve ertesi gün deneye başlanmıştır. PZR aşamasında kullanılan kimyasallar ve tüplerde UV altında bekletildikten sonra kullanılmıştır. Yapılan yeni PZR sonucunda ise negatif kontroller de bantlaşma görülmemiştir. Bu sonuçla birlikte izolasyonda kullanılan sarf malzemelerinden ve kimyasallarından kaynaklı bir sorun olmadığı tespit edilmiştir. Geriye kalan ihtimal ise deney aşamasında örnek tüplerinden negatif tüplerine çapraz kontaminasyonun olmasıdır. Fakat yapılan yeni PZR çapraz kontaminasyonun olmadığını desteklemiştir.

Şekil 16'da PC1, Ext1 ve HYA1 numaralı örneklerin C fragmanı ile Şekil 17'de görüldüğü gibi G4, G11, G15, HYA2, Ext2 ve PC2 örneklerinin F fragmanın da negatif kontrolleri ile örneklerin beklenilmeyen bç aralıklarında bantlaşmalar görülmüştür. İkinci izolasyon için de hazırlanan yeni PZR'de bantların görülmesi deneyde çapraz kontaminasyonun olmadığı fikrini desteklemiştir. Ayrıca bu durumun laboratuvar kaynaklı olup olmadığı test edilmiştir. Laboratuvar kaynaklı problemlerin olmadığı kanaatine varıldıktan sonra geriye kontaminasyonun kaynağının UV'lenmeden kullanılan GuHCl (Guanidine Hydrochloride) olabileceği düşünülmüştür. Yeni bir kutu GuHCl kullanılarak yapılan PZR sonuçlarında istenilmeyen bç aralığında bantlaşmaların görülmesi kontaminasyonun olası nedeninin deney aşamasındaki modern kontaminasyonun olabileceği fikrini düşündürmüştür. Sağlıklı sonuçlar vermediğinden dolayı da 2. izolasyondan yeni PZR çalışmaları yapılmaya devam edilmemiş ve gerekli fragmanların tamamlanabilmesi için 3. izolasyona gerek duyulmuştur.

Böylelikle HVRI ve HVRII için eksik olan fragmanlar tamamlanmıştır. Sekanslama için diziler tamamlandığında BioEdit üzerinde işlenmiştir. Fragmanların birbiri ile çakışması gereken uç bölgelerinde bazın okunamaması ve/veya doğru bazı okunamaması nedeni ile örneklerin izolasyonlarının farklı PZR sekanslarından elde

edilen diziler kullanılmıştır. Haplogrup değerlendirilmesi yapılırken, örneğin farklı dizilerinden elde edilen nükleotit varyasyonlarına bakılarak Phylotree’de haplogrupları belirlenmiştir. Yayınlanan mtDNA çalışmalarında da olduğu gibi okunamayan bazlar N olarak ifade edilmektedir (Brandt vd., 2013). Dizilerde okunamayan bu bazların delesyon sonucunda mı yoksa antik örnek olması nedeniyle mi okunmadığı bilinmediğinden, örneklerin belirlenmiş olan varyasyon noktalarında eksiklikler olabilir. Bu gibi belirsizlikleri çözümlmek için de örneklerin birden fazla izolasyonu ve birden fazla PZR’si kullanılarak sekanslamalar yapılmıştır. Böylelikle mtDNA haplogrupları güvenilir bir şekilde belirlenmiştir. Bununla birlikte mitokondriyal DNA haplogruplarının güvenilirliğini etkileyecek bir diğer faktör de modern DNA kaynaklı kontaminasyondur.

Çine-Tepecik kalıntıları ile ilgili çalışmada yer alan araştırmacıların ve aDNA laboratuvarına erişimi olan araştırmacıların modern mtDNA HVRI ve HVRII bölgeleri, eski örneklerle olası modern bulaşmaların mevcudiyetinin sorgulanması için incelenmiştir (Tablo 19). İncelenen modern DNA’lardan elde edilen sonuca göre araştırmacıların mtDNA haplogrupları J1b, H2a1 ve U3, antik örneklerde ise tespit edilen mtDNA haplogrupları ise J1d, H2, R ve H2a2a1’dir. Dolayısıyla genel anlamda modern DNA kontaminasyonunun olmadığı söylenebilmektedir. Bununla beraber antik örneklerin otantikliğinin netleştirilmesi ileri analizleri etkilediğinden, daha önce yukarıda verilmiş olan otantiklik kriterleri göz önünde bulundurularak inceleme gerçekleştirilmiş ve bulgular kısmında belirtildiği üzere Çine-Tepecik antik örneklerinin otantik olduğunu söylemek mümkündür.

Kaliteli sonuçlar elde edebilmenin bir diğer önemi de uygun örneklerin seçilmesidir. Her ne kadar kemik ve diş örneklerinin olmadığı çalışmalarda da yumuşak dokular tercih edilse de bu tür yumuşak doku örneklerinin müzelerden geliyor olması kontaminasyon sorununu beraberinde getirmektedir (Zink vd., 2002, 2003). Genellikle antik örnekler seçilirken sert dokular içeren, DNA’nın korunduğunu bildiğimiz örnekler tercih edilmektedir. Sert dokular seçilirken de diş ve kemik olmasına dikkat edilmekle birlikte seçilen kemik örneğinin de hangi bölgesi olduğu önemlidir. Örneğin kemikler içinde sert kemik doku (kompakt kısmı) açısından yoğun bölgeler içeren uzun kemikler (Alberti vd., 2018) bu açıdan daha

verimli sonuçlar üretme potansiyeline sahiptir. Diğer taraftan şimdiye kadar yapılmış çalışmaların önemli bir kısmında dişlerin de materyal olarak yoğun bir şekilde kullanılmış olduğu görülmektedir (Adler vd., 2011; Hofreiter vd., 2001; Pääbo vd., 2004). Daha yakın zamanlı literatür ise iskeletin belli bölgelerinin aDNA çalışması açısından önemli bir potansiyel içerdiğini göstermiştir (Adler vd., 2011; Pinhasi vd., 2015; Sirak vd., 2017). Kafatasının iç kısmında yer alan, temporal kemiğin de bir parçasını oluşturan, duyma ve denge işlevinin yürütüldüğü bölgelere sahip olan *Pars petrosa* kemiği bunlardan biridir ve son yıllardaki çalışmalarda daha da sıklıkla kullanılmış ve analizler için önerilmiştir (Hansen vd., 2017; Pinhasi vd., 2015; Sirak vd., 2017).

Bu tez çalışmasında örnek verimliliğinin artırılması amacıyla örneklemi oluşturan bireylerden uygun olanlarından *Pars petrosa* kısımları elde edilmiş ve benzer yöntem ile çalışma yürütülmüştür. Eldeki sonuçlar *Pars petrosa* örneklerinin diş örneklerinden daha iyi çalıştığı göstermiştir (Tablo 25). Tablo 25'ten de takip edilebileceği gibi elde edilen antik genomlar açısından G11 hariç diğer bireylerde *Pars petrosada* verimlilik daha fazladır. G11 numaralı bireyinin diğerlerinden farklı olarak yetişkin yaş altı bir bireye ait olması genom verimliliğinin düşük olmasında etkili olmuş olabilir. Bununla beraber diğer 4 örneklemin %80'inde *Pars petrosa* verimliliği daha fazla bulgulanmıştır.

Tablo 25: Örneklemelere göre başarı oranı.

Örnek Numarası	Örnek Türü	İnsan Genom Oranı
G1	Diş	0,008044911
G1	<i>Pars petrosa</i>	0,01397
G11	Diş	0,001053805
G11	<i>Pars petrosa</i>	0,000818
G15	Diş	0,000956706
G15	<i>Pars petrosa</i>	0,041427
G21	Diş	0,000947942
G21	<i>Pars petrosa</i>	0,012287
G25	Diş	0,001051253
G25	<i>Pars petrosa</i>	0,261667

Verimlilik ile ilgili eldeki sonuçların literatür ile de uyumlu olduğu görülmektedir. Nitekim güncel çalışmalar da benzer bir bulgu ortaya çıkarmış ve çevre DNA oranının *Pars petrosa* örneklerinde dişlere nazaran daha düşük olması ve dış ortam kontaminasyonlarına kapalı olması gibi nedenlerle ilgili olarak *Pars petrosa* kemiğinin aDNA çalışmalarında daha verimli sonuçlar elde etme potansiyeline işaret etmiştir (Hansen vd., 2017; Sirak vd., 2019). Diğer bir çalışmada da (Adler vd., 2011) *Pars petrosa* kemiklerinin çift taraflı bulunması ve çalışma için korunmuş kompakt yapıyı içeriyor olması da diş ve diğer uzun kemikler yerine tercih edilmesinde önemli faktörlerdendir. Esasında verimlilik açısından değerlendirilen konular sadece belli kemikler ile ilgili de değildir. Yine yakın zamanlı bir başka çalışmada (Pinhasi vd., 2015) bahsedildiği üzere *Pars petrosa* örneklerinde de DNA eldesi için seçilen bölgenin kemik üzerindeki yeri de önemlidir. İç kulak yapısının olduğu ve en kompakt kısım olarak bilinen en sert yapı alınmalıdır. Şimdiki çalışmada da, son dönem yayınlarda işaret edilen ve daha yüksek verimliliğin elde edildiği *Pars petrosa* kemiğinin sert bölgeleri örneklemeye için tercih edilmiştir. Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında *Pars petrosa* kemiğinden elde edilen yüksek verimlilik, diğer çalışmaların (örn., Pinhasi vd., 2015; Hansen vd., 2017; Sirak vd., 2019) *Pars petrosa* kemiğinin araştırmalar için diğer materyallere nazaran daha elverişli olduğu yönündeki tavsiyelerini desteklemiştir.

5.2. CİNSİYETLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İskeletlerin antropolojik analiz yöntemlerinde yer alan bir parametre de bireyin cinsiyetini tahmin etmektir. Bireyin cinsiyet tayininin yapılabilmesi için kafatası, pelvis ve bazı uzun kemiklerinin bulunması gerekmektedir (Buikstra ve Ubelaker, 1994). Ancak bazen çıkarılan iskeletlerin tüm parçalarına ulaşmak mümkün olmadığından bireyin cinsiyeti belirlenememektedir. İskeletin tüm parçaları elde edildiği durumlarda da iskelet bütünlüğünün mevcut olmaması ve/veya cinsiyeti belirleyecek noktalardaki patolojik bulgular, postmortem kemik bozunmaları (kırılma, kalsit tabakalarının kaplanması vb.) gibi nedenlerden dolayı bireyin cinsiyet tayini yapılamayabilir. Tüm bunlar dışında bireyin beslenmesinde kemik gelişimine etki eden diyet içeriği gibi durumlarda da cinsiyet tespiti morfolojiye bakılarak

yapılacağından dolayı biyolojik cinsiyetin doğru tahmin edilmesinde yanılma payı oluşur.

Biyoarkeolojik yöntemlerin uygulanmasında karşılaşılabilecek bu tür dezavantajlı durumlara karşın genetik veriler ile biyolojik cinsiyet verisine ulaşılabildiği için bireyin cinsiyeti hakkında kesin bilgi elde edilir. Cinsiyetin kesin olarak belirlenebilmesinin önemi arkeolojik topluluk içindeki demografik yapı belirlenirken cinsiyetin de en az yaş kadar önemli olmasından kaynaklanır. Cinsiyete bağlı olarak gömü biçimi, mezar yapısı ve mezar hediyelerinde ne gibi farklılıkların olduğu önemli bir konudur. Dolayısıyla çoğu zaman antropolojik analizler ile elde edilen bilginin genetik bilgi ile desteklenip desteklenmediğini görmek gerekir. Tüm bilgilere ulaşıldıktan sonra cinsiyete bağlı olan tüm sorular cevaplanırken daha doğru sonuçlar ve yorumlar elde edilir.

Bu tez çalışmasında, genetik açıdan biyolojik cinsiyet verisine tüm bireylerde ulaşılamamakla birlikte, 3 birey (G1, G5, G15) XY olarak, 6 birey de (G11, G19, G21, G24, G25 ve G28) XX olarak belirlenmiştir (Tablo 26).

Tablo 26: Örneklerin antropolojik ve biyolojik cinsiyetler.

Örnek Numarası	Örneklem Türü	Biyolojik Cinsiyet	Antropolojik Cinsiyet
G1	Diş	XY ile uyumlu	Erkek
G4	Diş	?	Kadın
G5	Diş	XY ile uyumlu	Kadın
G11	Diş	XX ile uyumlu	Çocuk
G15	Diş	?	Kadın
G19	Diş	XX ile uyumlu	Kadın
G21	Diş	XX ile uyumlu	Kadın
G24	Diş	XX ile uyumlu	Kadın
G25	Diş	XX	Kadın
G28	Diş	XX ile uyumlu	Kadın
G1	<i>Pars petrosa</i>	XY ile uyumlu	Erkek
G11	<i>Pars petrosa</i>	XX ile uyumlu	Çocuk
G15	<i>Pars petrosa</i>	XY	Kadın
G21	<i>Pars petrosa</i>	XX ile uyumlu	Kadın
G25	<i>Pars petrosa</i>	XX	Kadın

Tablo 26'dan da görülebileceği gibi genetik çalışma öncesi yapılmış cinsiyet tahminlerinin önemli bir kısmı (6/8 oranında) doğrulanmıştır. Bunlar dışında G5 ve G15 numaralı bireylerin cinsiyet tahminlerinin kadın olmasına karşın biyolojik cinsiyetlerinin erkek olduğunu genetik çalışma göstermiştir. Biyolojik cinsiyetin doğru tahmin edilememesi çeşitli nedenlerden kaynaklanmış olabilir. Bilindiği gibi insan iskeletindeki kemik ve kemik gruplarından hareketle cinsiyet tahmini yapılırken her bir ilgili kemiğin üzerindeki belli noktalar dikkate alınmaktadır (Buikstra ve Ubelaker, 1994; WEA, 1980). Konuyla ilgili yapılan araştırmalarda biyolojik cinsiyeti bilinen örneklerde morfolojik yöntemler kullanımıyla belirli noktalar üzerinden yapılan tahminlerin bazılarında tahminlerin doğruluk oranını %62-80 arasında olabildiği de gözlemlenmiştir (WEA, 1980, s. 520). Biyoarkeolojik açıdan cinsiyet tahmini yapılırken karşılaşılan sınırlamalardan bir diğeri de incelenen noktaların esasında erkek veya kadın cinsiyetine yönelik olmaktan ziyade erkeksi

ve kadınsı (maskülen ve feminen) karakterler olmalarıdır. Ancak her bir kemikteki her bir nokta bir tek bireyde o kişinin biyolojik cinsiyetine göre şekillenmemiş olabilir ve hatta ontogenik gelişim sırasında yapılan aktivitelerden de etkilenme potansiyeline sahiptir. Genelde bir çok kemikteki birçok noktanın birlikte değerlendirilmesi sonucunda bir bireyin biyolojik cinsiyeti morfolojik olarak tahmin edildiğinden, bu tahmin gerçeğe yakın olsa da kesin olmamaktadır. Bunlara ek olarak özellikle Çine-Tepecik iskeletlerinin iyi bir korunma durumuna sahip olmadığını da burada belirtmek gerekir. Bu durum da cinsiyet tahmini yapılırken tüm karakterlerin incelenmesinde bir engel olarak ortaya çıkmaktadır.

5.3. mtDNA HAPLOGRUPLARI

Çine-Tepecik'te mtDNA haplogrupları belirlenebilmiş bireylerin gün ışığına çıkarıldığı arkeolojik konteksler bireylerden birinin pithos tipi bir mezarda gömüldüğünü diğer üçünün ise basit toprak mezarda gömülmüş olduğunu göstermiştir (Günel, 2014 KST). Kazının L 11 ve L 12 açmalarındaki çeşitli plankarelerden elde edilmiş bu mezarların bulunduğu derinlik, gömü biçimi ve ek olarak ele geçen mezar eşyaları gibi durumlar bireylerin Erken Tunç Çağına tarihlendirilmelerine dayanak oluşturmuştur (Günel, 2014 KST). Dolayısıyla, her ne kadar görelî tarihlendirme yöntemi kullanılsa da, elde edilen haplogrupların M.Ö. 3. binde yaşamış bireylere ait olduğunu söylenebilir.

Sanger dizileme ile çalışılan 3 bireyin HVRI bölgelerine ait olan 5 fragmanın dizileme sonuçları, bu bireylerden biri için de ek olarak HVRII bölgesinin dizisi elde edilmiştir. Yayınlanan bir çok veride HVRI sonuçları yer aldığından bu çalışmada da HVRI verileri ile karşılaştırma yapılmıştır. Çine-Tepecik popülasyonuna ait olan bu 3 bireyde (G19, G21 ve G24) mtDNA çalışmaları sonucunda 3 farklı haplogrup (G19 için J1 (*J1d*), G21 için H (*H2*), G24 için R) bulunmuştur. Tüm genom çalışmaları sonucunda ise bir başka bireyde (G25 numaralı birey) H (*H2a2a1*) haplogrubu tespit edilmiştir.

Çine-Tepecik'e ait bu veriler birçok açıdan değerlendirilebilir. Örneğin mtDNA haplogrubu sonuçlarının topluluk açısından bir çeşitlilik sunduğu söylenebilir. Özellikle anasoyu bakımından, evlilik sonrası süreçlerde benzer ve yoğun olarak

aynı haplogrupların tespit edilmesi topluluğun bu anlamda kapalı bir yapıya sahip olduğu şeklinde yorumlamak mümkün olabilir. Buna karşın Çine-Tepecik bireylerine ait sonuçlar en azından anasoyu açısından bir çeşitliliğe işaret etmektedir. Yine de örnek sayısının az olması ve bireylere ait radyokarbon yaş tayinine dayanan bir kesin tarihlendirmenin olmaması nedeniyle bu tip yorumlar için ileri düzey çalışmalara ihtiyaç duyulduğu açıktır.

Eldeki bulgulara antik Anadolu populasyonları açısından bakıldığında Çine-Tepecik'te tespit edilen R mtDNA haplogrubu hariç 3 haplogrup da Neolitik dönemde Anadolu popülasyonlarında görüldüğünden eldeki sonuçların şaşırtıcı olmadığı söylenebilir (Tablo 27).

Tablo 27: Anadolu'da bulunan haplogruplar (Şimdiki çalışma; Lazaridis vd., 2016, 2017; Omrak vd., 2015; Kılınç vd., 2017; Mathieson vd., 2015; Yaka vd., 2016; Ottoni vd., 2018).

Haplogrup	Neolitik Dönem (n/N)	Tunç (n/N)	Çağı	Geç Çağı (n/N)	Demir	Roma/Orta (n/N)	Bizans
H	5/58		3/7		5/12		19/75
HV	0		0		2/12		0
J1	4/58		1/7		0		6/75
K1a	10/58		1/7		0		0
K1b	2/58		0		0		0
M	0		0		1/12		0
N	13/58		0		1/12		6/75
R	0		1/7		2/12		0
T	4/58		1/7		0		9/75
U1	0		0		0		3/75

U2	0	0	1/12	0
U3	5/58	0	0	3/75
U4	0	0	0	1/75
U5	0	0	0	2/75
U6	0	0	0	2/75
U7	0	0	0	1/75
U8	2/58	0	0	13/75
W	2/58	0	0	5/75
X	2/58	0	0	5/75

Neolitik Dönemden başlamak üzere Roma/Orta Bizans dönemlerine kadar olan süreçte yaşamış ve mtDNA haplogrupları belirlenmiş bireyler arasında tespit edilen bu haplogruplarını değerlendirmek de önem taşımaktadır. Bu noktada dikkati çeken durumlardan ilki Neolitik dönem açısından temsiliyeti görece anlamda çok fazla olmasa da H haplogrubunun değerlendirilen Tunç Çağı örneklerinde (bunlardan dördü bu çalışmaya aittir, diğer üçü ise yine Batı Anadolu'daki bir yerleşme olan Harmanören'e aittir) neredeyse %50 oranında bir temsiliyete sahip olmasıdır (Tablo 27). Neolitik döneme ait bireyler Batı Anadolu'da yer alan Kumtepe, Barcın ve Menteşe topluluklarından gelmektedir (Omrak vd., 2016; Lazaridis vd., 2016; Mathieson vd., 2015). Bu haplogrubun Demir Çağındaki temsiliyeti yine %50'ye yakındır. Roma/Orta Bizans dönemlerinde ise haplogrup çeşitliliğinin artmış olduğu gözlenmekle birlikte H haplogrubunun temsiliyette birinci sırada (toplam içinde yaklaşık %25 oranında) geliyor olması önemlidir. Bu gözleme J1 ve T haplogrupları eklendiğinde Tunç Çağındaki, Çine-Tepecik ve Harmanörende tespit edilmiş haplogrupların Roma/Orta Bizans dönemlerindeki temsiliyetinin %45,3 olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum ise çok genel olarak

söylemek gerekirse anasoyu anlamında Neolitik dönemden Orta Bizans dönemi sonuna kadar bir devamlılık olarak yorumlanabilir.

Araştırma sonuçlarını daha büyük bir coğrafya içinde değerlendirmek de anlamlı olabilir. Şimdiye kadar çeşitli ülkelerdeki antik örneklerden elde edilmiş ve Tunç Çağına tarihlendirilen tüm bireylere ait haplogruplar (N=89) içindeki dağılım fazladan az olana göre şöyledir; **H** (37/89), **U5** (7/89), **T2** (7/89), **U4** (5/39), **J** (4/89), **V** (4/89), **X2** (3/89), **T1** (3/89), **K1a** (3/89), **F** (2/89), **N1a** (2/89), **J1** (2/89), **I** (2/89), **U2** (1/89), **Z** (1/89), **K2b** (1/89), **T** (1/89), **K** (1/89), **HV** (1/89), **U3** (1/89), **J2** (1/89) (Allentoft vd., 2015; Lazaridis vd., 2017; Caramelli vd., 2007; Keyser vd., 2009; Sampietro vd., 2005). Bu sıramada da görülebiliği üzere H haplogrubu Tunç Çağına ait örnekler içinde en çok temsil edilen haplogrubu oluşturmaktadır ve Çine-Tepecik içindeki %50'lik temsiliyeti de bu durumla uyum sergilemektedir.

mtDNA haplogrupları açısından değerlendirilebilecek diğer konu ise bölgesel anlamda Çine-Tepecik arkeolojik yerleşmesine yakın olan çağdaşı yerleşmelerle olan biyolojik ilişkilerdir. Tunç Çağına ait haplogrupların sayısal dağılımı/dağılım oranları verilmiş antik bireylerin coğrafi lokasyonlarına göre dağılımı Tablo 26'da gösterilmiştir.



İsveç	J1 (1/3)	T1(1/3)	T2(1/3)	Allentoft vd., 2015
Minoan- Lasithi	H (4/5)	U5 (1/5)		Lazaridis vd., 2017
Miken	X2 (2/3)	H (1/3)		Lazaridis vd., 2017
Almanya	J1(1/1)			Allentoft vd., 2015
Karadağ	U5 (1/1)			Allentoft vd., 2015
Litvanya	H (1/1)			Allentoft vd., 2015
Girit- Armenoi	U5 (1/1)			Lazaridis vd., 2017
Hollanda	T2 (1/1)			Allentoft vd., 2015

Coğrafi yakınlık ve kültürel bir takım benzerlikler nedeniyle arkeolojik araştırma sonuçlarından doğan beklenti, Miken, Minos ve Anadolu örneği olan Harmanören bireyleri ile Çine-Tepecik bireyleri arasındaki olası genetik yakınlık ilişkisidir. Tabi ki bu beklenti oluşturulurken mtDNA gibi sınırlı bir veri sunan ve tek cinsiyet üzerinden kalıtılan bir parametre üzerinden çalışıldığının unutulmaması gerekir. Batı Anadolu, Miken ve Minos örneklerinin yer aldığı çalışmada (Lazaridis vd., 2017) Çine-Tepecik bireylerinde görülmüş olan haplogrupların da bulunduğu görülmektedir ancak sayısal anlamda az olarak Lazaridis vd. (2017) çalışmasında Ege Bölgesi Tunç Çağı topluluklarına ait mtDNA haplogruplarına bakıldığında Minos kültüründe M.Ö. 2900-1900 yıllarına tarihlenen 5 bireyin J2b1a1, I5, H+163, U3b3 ve K1a2; M.Ö. 2000-1700 yıllarına tarihlenen 5 bireyin U5a1, H13a1, H, H5, H; Miken kültürü ile ilişkilendirilen ve M.Ö. 1700-1200 yıllarına tarihlenen 4 bireyin X2d, X2, H ve X2 mtDNA haplogruplarına sahip oldukları görülmektedir. Aynı yayında bilgisi verilen Harmanören ETÇ topluluğuna ait ve M.Ö. 2800-1800 yıllarına tarihlenen 3 bireyin ise H, K1a2 ve T2b mtDNA haplogruplarına sahip olduğu görülmektedir (Lazaridis vd., 2017).

Eldeki bulgulara bakıldığında kronolojik olarak Çine-Tepecik örnekleri Harmanören ve Minos kültürünün erken örnekleriyle karşılaştırılabilir. Bu noktada her üç ETÇ topluluğunun H haplogrubunu, J haplogrubunun Çine-Tepecik ve Minos kültürü tarafından, K1a2 haplogrubunun ise Harmanören ve Minos kültürü tarafından paylaşıldığı görülmektedir. Veri gruplarından elde edilen haplogrupların aynı arkeolojik evre ve birbirine yakın coğrafyalar arasında bulunmasına karşın benzerliğin yanı sıra özgüllüklerinin de olması (veri setlerinin sınırlılığını da unutmamak kaydıyla) anasoyu anlamında bölge içi bir çeşitlilik olduğu ve bunun erken dönemdeki hareketlilikle (Neolitik dönem?) ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir. Nitekim Kıta Yunanistan'a ait daha geç dönem örneklerinde (gelişimin Avrupa'nın Neolitik dönem erken çiftçileriyle ilişkili olduğu düşünülebilir) X2 mtDNA haplogrubunun yoğun biçimde gözlenmesi, insan hareketliliğinden kaynaklanan ve daha erken dönemlerde gerçekleşen süreçlerin önemine dikkat çekmektedir. Diğer yandan, Çine-Tepecik erken dönemine ait incelenen bu bireylerin mtDNA sonuçlarının, en

azından anasoyu açısından, her ne kadar coğrafi yakınlık ve kültürel bir takım benzerlikler olsa da biyolojik açıdan doğrudan ve güçlü bir yakınlığın olmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Bu konuyla ilgili son tartışma Çine-Tepecik mtDNA haplogrup bulgularının (özellikle de H ve J haplogruplarının) antik Batı Avrasya toplulukları arasındaki yerini kapsamaktadır. Tespit edilen mtDNA haplogrup verileri, diğer Avrupa örnekleri ve Kıta Yunanistan (Lazaridis vd., 2017) örnekleri ile ortaklık göstermektedir. Achilli vd., (2004) çalışmasında, Avrupa gen havuzunun H ve H'nin alt haplogruplarınca daha çok temsil edildiğini göstermiştir. Ek olarak Batı Avrasya haplogruplarının da neredeyse Avrupa gen havuzunun yarısı kadar H haplogrubu içerdiği rapor edilmiştir (Loogvali vd., 2004). G21 numaralı örneğin H2 haplogrubuyla, diğer taraftan G25 örneğinde ise H2a2a1 haplogrubu ile temsil edilmesi bize bu örneklerle ilgili beklenilmeyen bir durum olmadığını göstermektedir. G19 numaralı örnek ise J haplogrubunun J1d alt haplogrubunu içermektedir. J haplogrubu her ne kadar H haplogrubu gibi Batı Avrasya topluluklarında yaygınlık göstermese de Tunç Çağı popülasyonlarında görülme sıklığı açısından dördüncü sırada yer almaktadır. Buna ek olarak J haplogrubu Minos topluluklarında ilk sırada yer almaktadır. G19 numaralı bireyin J1d haplogrubuna sahip olması beklenen bir durum olarak değerlendirilmiştir. Dolayısı ile Çine-Tepecik topluluğunun haplogrup sonuçlarına göre Anadolu ve Kıta Yunanistan popülasyonlarına yakınlık gösterdiğini söylemek mümkündür.

5.4. GENOM ANALİZİ: POPULASYONLAR ARASINDA ÇİNE-TEPECİK'İN YERİ

Çine-Tepecik Tunç Çağı bireyleri üzerine elde edilen mtDNA sonuçlarından hareketle yapılan değerlendirmelerin çeşitli nedenlerden dolayı bazı kısıtları olduğundan bir önceki bölümde bahsedilmişti. Antik DNA izolasyonu yapılan ve genomik analiz için kütüphanesi hazırlanan bireyler içinde ise sadece bir örneğin (G25) istatistiki analiz için kısmen de olsa yeterli düzeyde veri sağladığı belirtilmiş ve ilgili analiz sonuçları grafiklerle gösterilmiştir (Şekil 30 ve 31). Bu noktada Erken Tunç Çağı gibi geniş bir zaman aralığına (yaklaşık bin yıl) sahip

bir arkeolojik evrede bir populasyonun tek bir birey ile temsil edilmesinin güçlüğü ön plana çıkmaktadır. Bununla birlikte 11 bin SNP ile temsil edilen bu bireye ait sonuçların tüm genomu ait olduğu hesaba katıldığında verinin mtDNA sonuçlarından daha aydınlatıcı veriler olarak değerlendirilebileceği tahmin edilebilir.

Çine-Tepecik Erken Tunç Çağı insanlarını temsilen G25 numaralı bireyin diğer antik bireylerle yanı sıra güncel Türkiye populasyonundan bireyeye ait genom verisi içinde yer aldığı PCA grafiğine bakıldığında (Şekil 30) esasen genel anlamda Batı Avrasya Tunç Çağına ait genetik değişimin (Haak vd., 2015) Anadolu Yarımadası'nda da yaşanmaya başladığı izlenimi oluşmaktadır. Bilindiği gibi özellikle Tunç Çağında Asyatik toplumların Batı'ya göçü Avrupa gen havuzunda çok dramatik değişimler olmasına yol açmış, Hint-Avrupa dilleri kökeninin bu döneme atfedildiği görülmüştür (Allentoft vd., 2015; Haak vd., 2015). Bu açıdan bakıldığında, nedeni şu ana kadarki antik DNA çalışmalarıyla ortaya çıkarılmamış olmakla birlikte, Anadolu Neolitik Dönem topluluklarına bireylerin bir arada kümelenirken, Kalkolitik ve Tunç Çağlarını takip eden dönemlerde de Anadolu gen havuzunda değişimin gözlenmesi, günümüze daha yakın antik örneklerin yine günümüz yaşayan Türkiye toplumuna doğru kümelenmesi dikkat çekicidir. G25 numaralı bireyin de böyle bir eğilimi temsil ettiği ve önceki arkeolojik dönemlere göre günümüz Türkiye örneğine yakın bir yerde durduğu görülmektedir.

Öte yandan PCA grafiğine bakıldığında, G25 numaralı bireyin kendine coğrafi açıdan yakın ve dönem açısından benzer olan Harmanören, Miken ve Minos bireylerine yakın olmakla birlikte Barcın (Kalkolitik), Ermenistan (Kalkolitik ve Tunç Çağı) ve İran Demir Çağı bireylerine daha yakın konumlandığı dikkati çekmektedir. Bu durum da yine bir önceki bölümde ifade edilen Güneybatı Anadolu ile Ege bölgesi Tunç Çağı topluluklarının genetik açıdan da diğer coğrafyalardaki çağdaş topluluklara nazaran birbirleriyle daha yakın bir biyolojik ilişkileri olma beklentisiyle uyuşmamaktadır.

Diğer yandan PCA grafiğinde böyle bir görünümün ortaya çıkışı birkaç nedenle ilişkili olabilir. Bunlardan ilki örneğe ait değerlendirilen verinin kendine ait özgün

sınırlılığı ile ilgilidir. Bununla ilgili kısıtlılık daha ileriki çalışmalar ile (derin dizileme gibi) aşılabılır olmakla birlikte bu çalışmada değerlendirmenin önünde engel oluşturmaktadır. PCA grafiğinde bu görünümün ortaya çıkışıyla ilgili diğer bir neden ise (derin dizileme sonucunda elde edilecek verinin de bu yönde bu sonuç çıkarması varsayımıyla hareket edilirse) Güneybatı Anadolu Tunç Çağındaki olası bir Doğu etkisidir, daha açık bir şekilde Kafkas etkisi. Nitekim şimdiye kadar olan çalışmaların bir kısmında Kalkolitik Dönemden başlamak üzere Erken Tunç Çağı boyunca gerçekleşen bu kafkas etkisinin izlerinin Doğu'dan batıya genişlediği, Doğu Akdeniz'e ulaşmış olduğu, Anadolu Yarımadası açısından ise Doğu Anadolu'da belirginleştiği, Orta Anadolu'nun içlerine doğru da uzanmış olduğu arkeolojik bulgularla desteklenerek gösterilmiştir (Batiuk, 2013). Bununla birlikte, her ne kadar PCA topluluğun (Çine-Tepecik için G25 numaralı bireyin) antik örnekler içindeki yerine genetik kompozisyon açısından işaret ediyor kabul edilebilse de, hem örneğe ait derin dizileme sonrasında yeni analizler yapılması gerekliliği hem de olası bir Doğu etkisinin (Kafkas etkisi) değerlendirilebilmesi için PCA'den daha güçlü istatistiki analizlere ihtiyaç olduğu açıktır.

Yukarıda değinilen sınırlılıkları aşmamakla birlikte farklı bir istatistik de G25 numaralı bireyin diğer antik popülasyonlarla ilişkisi bağlamında yapılmıştır (Şekil 31). Popülasyonların birbirlerine olan yakınlığını farklı bir popülasyonla karşılaştırılarak test eden f4 istatistiği sonuçları arkeolojik bulgular ve önceki antik DNA sonuçları ile uyumlu bir şekilde (Günel, 2014; Kılınç vd., 2016) Çine-Tepecik G25 numaralı örneğinin Tunç Çağı öncesi Levant ve İran antik topluluklarından ziyade Neolitik Anadolu ile Batı Anadolu ve Ege Tunç Çağı örneklerine genetik kompozisyon açısından daha yakın olduğunu işaret etmiştir. Bu istatistikte de ne yazık ki Kafkas örnekleri ile karşılaştırma yapılamamıştır dolayısıyla yukarıda değinilen Doğu etkisine dair bir analiz sonucu elde edilememiştir.

İstatistik sonuçlarına biraz daha yakından bakıldığında, G25 numaralı örneğin Minos Tunç Çağı örneği (Minoan-Lasithi) yerine Kıta Yunanistan Neolitik Dönem örneklerini (Greece-Klei 10 ve Grece-Peleponnese) tercih ettiği, bir başka

deyişle Kıta Yunanistan örnekleri ile Çine-Tepecik örneğinin Girit Adası örneğine göre daha fazla ortak aler paylaştığı anlaşılmaktadır. Şimdiye kadarki arkeolojik araştırma verilerinden hareketle Neolitik ve Kalkolitik Dönemlerden itibaren olan süreçte Çine-Tepecik'te maddi buluntularda gelişmenin süreklilik sergilediği, maddi kültür kalıntıları Batı Anadolu'yla olduğu kadar Ege Dünyası ile de birçok paralellik olduğu ifade edilmiştir (Günel, 2011b; 2014b). Bununla beraber, her ne kadar Çine-Tepecik arkeolojik yerleşmesinden elde edilen Erken Tunç Çağı buluntuları Kıta Yunanistan Erken Tunç Çağı maddi kalıntıları ile karşılaştırılabilir çok sayıda veri sunmamış olsa da, Çine-Tepecik'te Orta ve Geç Tunç Çağı tabakalarına ait buluntularda Miken (Kıta Yunanistan) ilişkisinin olduğu ifade edilmektedir (Günel, 2010b, 2016b). Nitekim Erken Tunç Çağının alt evreleri boyunca arkeolojik yerleşmelerde arkeolojik buluntular bağlamında Anadolu Yarımadası içinde bir ilişki olduğu, Erken Tunç Çağının sonlarına doğru Ege Dünyası etkisinin Batı Anadolu'da gözlemlenmeye başladığına dair farklı araştırmalar da bulunmaktadır (Fidan vd, 2015). Bu nedenle G 25 numaralı örnekle temsil edilen Çine-Tepecik topluluğunun sonraki dönemlerdeki (Orta ve Geç Tunç Çağları) kültürel ilişkilerinin biyolojik bir yakınlık ile de ilişkili olma ihtimali bulunduğu söylenebilir.

SONUÇ

Bu tez çalışmasında Güneybatı Anadolu'da yer alan Çine-Tepecik arkeolojik yerleşmesinde gün ışığına çıkarılmış insan iskelet kalıntılarından antik DNA izolasyonu yapılması amaçlanmış ve hedeflenen bireylerde izolasyonlar başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu haliyle Çine-Tepecik insan iskelet materyalinin de eklenmesiyle bölgeden ikinci kez aDNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonları başarıyla yapılmış olmakla birlikte verimli bir şekilde kullanılabilecek amplifikasyonlarının tüm bireyler için yeterli düzeyde olmadığı tespit edilmiştir. Bu anlamda verimin düşük olmasında örneklerin biyolojik yaşı, aDNA'nın kötü korunma durumu, istenilen tüm fragmanların elde edilememesi gibi durumların etkili olduğu görülmüştür. Çalışmada aDNA elde edimi için seçilen kaynak tipi de değerlendirilmiştir. Eldeki sonuçlar dışlardan ziyade *Pars petrosalar*ın DNA elde ediminde daha verimli olduğunu göstermiştir.

Çine-Tepecik örnekleri üzerinde sürdürülen genetik incelemede elde edilen sonuçlar eldeki verinin otantik olup olmaması hususunda birçok farklı analiz yöntemi kullanılarak denetlenmiştir. Örneklerle teması bulunan araştırmacıların DNA verileri de ayrı bir çalışma ile elde edilmiş ve olası bir kontaminasyon ihtimali değerlendirilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda farklı veriler modern kontaminasyon ihtimal dışı bırakılmış, antik örneklerle ait verilerin otantikliği başarılı şekilde doğrulanmıştır.

Çine-Tepecik insan kalıntılarının biyoarkeolojik değerlendirmesi içinde yer alan cinsiyet tahminleri genetik analiz sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. 10 bireyden 9'unda genetik cinsiyet belirlenmiş, genetik analiz sonuçları 3 bireyin erkek (XY) 6 bireyin de kadın (XX) olduğunu göstermiştir. Bu bireylerden birinin cinsiyeti bireyin çocuk olması nedeniyle osteolojik yöntemlerle cinsiyet belirlenememişti. Karşılaştırm yapılabilen 8 bireyin 6'sında osteolojik yöntem ile belirlenen cinsiyetin tespit edilen genetik cinsiyet ile uyum gösterdiği anlaşılmıştır. Buradan hareketle antik örneklerde genetik cinsiyet tayininin yapılmasının biyoarkeolojik analize destek olacağı düşüncesi güçlenmiştir.

Antik DNA izolasyonları gerçekleştirilen bireylerden üçüne ait diziler Sanger dizileme yöntemi yardımıyla tespit edilmiş gerekli analitik işlemlerden sonra mtDNA haplogrupları belirlenmiştir. Mitokondriyal DNA haplogrupları belirlenmiş bireylerin tarihlendirmesi göreceli tarihlendirme yöntemi kullanılarak tespit edildiği anlaşılmış, bu bireylerin olasılıkla Erken Tunç Çağında yaşamış bireyler olduğu anlaşılmıştır. Bireylere ait mtDNA haplogrupları G19 bireyi için J1 (*J1d*), G21 bireyi için H (*H2*), G24 bireyi için R haplogrubu şeklindedir. Bunlara ek olarak tüm genom analizi için kütüphaneleri hazırlanmış ve çalışılmış bireylerden biri (G25 numaralı birey) için de mtDNA haplogrubu belirlenmiştir (H (*H2a2a1*)). G25 numaralı bireyin de göreceli tarihlendirmesi bu bireyin de Erken Tunç Çağına tarihlendiğine işaret etmiştir.

Çalışmanın amaçlarından biri aynı yerde fakat farklı zamanlarda yaşamış olan Çine-Tepecik insanların biyolojik anlamdaki sürekliliğini test etmektir. Bununla beraber incelenen tüm bireylere ait DNA izolasyonları başarıyla yapılabildiyse de bu izolasyonlardan elde edilen DNA'lardan tüm bireylere ait mtDNA haplogrupları belirlenememiştir. Bilindiği gibi aDNA çalışmalarında otantik DNA eldesi her zaman kolay olmamakta, çoğu zaman sınırlı düzeyde antik DNA üzerinde çalışılması söz konusu olabilmektedir. Bu çalışmada da, her ne kadar son dönem yöntemleri kullanılmış olsa da çoğu birey için kıyaslamaya uygun düzeyde aDNA eldesi mümkün olmamıştır. Dolayısıyla çalışma örneklemini oluşturan ve Helenistik/Roma dönemlerine ait olduğu bilinen bireylere ait mtDNA haplogruplarının belirlenememesinden dolayı yerleşim içindeki farklı dönemlere ait genetik süreklilik test edilememiştir.

Çine-Tepecik Erken Tunç Çağı örneklerinde göreceli olarak farklı mtDNA haplogrupları tespit edildiği söylenebilir. Bu durum topluluğun anasoyu bakımından heterojen olduğu yönünde değerlendirilmiştir. Diğer yandan dört örnekten 2'sinde tespit edilen H haplogrubunun gerek Neolitik dönem gerekse diğer takip eden dönemlerde Anadolu için yaygın bir mtDNA haplogrubu olduğu gözlemi yapılmıştır. Erken Tunç Çağı Anadolu topluluklarından Harmanören insanların tespit edilen haplogruplar da dahil edilerek iki grup ile birlikte

yapılan değerlendirme sonucunda Roma/Orta Bizans döneminde bu erken toplumlara ait haplogrup frekanslarının sürüyor olmasına dikkat çekilmiştir.

Diğer bir konu Çine-Tepecik ETÇ toplumunun Minos ve Miken kültürel alanında kalan Girit ve Kıta Yunanistan çağdaşlarıyla genetik ilişkisiydi. mtDNA haplogrubu açısından Minos Erken Tunç Çağı bireyleri ile H haplogrubunun paylaşıldığı buna rağmen Miken Orta ve Geç Tunç Çağına tarihlendirilen dört bireyden yalnızca biri ile H haplogrubunun paylaşıldığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle anasoyu açısından Minos ve Miken topluluklarıyla doğrudan ve güçlü bir yakınlığın olmadığı ifade edilmiştir.

Çine-Tepecik Erken Tunç Çağı bireylerinden birine ait tüm genom analizi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Antik Genom analizi yapılan G25 numaralı bireyin diğer antik genomlar arasındaki konumu üzerine gerçekleştirilen analiz sonuçları bu bireyin Anadolu'daki daha erken dönem popülasyonlarına yakınlık gösterdiği saptanmıştır. Bununla beraber eldeki veri ve daha önceki veriler birlikte değerlendirildiğinde, Anadolu'nun Neolitik Dönem gen havuzunun Kalkolitik Dönem ve Tunç Çağı içinde değişime uğradığı bulgulanmış ve genetik açıdan Anadolu Yarımadası'na olabilecek diğer olası katkılar değerlendirilmiştir.

Gelecek Çalışmalar

Çine-Tepecik eski insan kalıntıları üzerinde yapılan genetik çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiş (Pr.No: 14528) ve desteklenmeye de devam etmektedir (Pr.No: 16769). Bu aşamadan sonra Çine-Tepecik'ten daha fazla bireye ait genom verisi elde edilmeye çalışılacaktır. Bu haliyle hem bu tez kapsamında ortaya konulan görüşler test edilecek hem de ortaya konulan yeni sorunsallar çözümlenmeye çalışılacaktır.

KAYNAKÇA

- Achilli, A., Rengo, C., Magri, C., Battaglia, V., Olivieri, A., Scozzari, R., ... & Moral, P. (2004). The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *The American Journal of Human Genetics*, 75(5), 910-918.
- Adachi, N., Umetsu, K., Takigawa, W., & Sakaue, K. (2004). Phylogenetic analysis of the human ancient mitochondrial DNA. *Journal of Archaeological Science*, 31(10), 1339-1348.
- Adler, C. J., Haak, W., Donlon, D., Cooper, A., & Genographic Consortium. (2011). Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *Journal of Archaeological Science*, 38(5), 956-964.
- Alberti, F., Gonzalez, J., Paijmans, J. L., Basler, N., Preick, M., Henneberger, K., ... & Joger, U. (2018). Optimized DNA sampling of ancient bones using Computed Tomography scans. *Molecular ecology resources*, 18(6), 1196-1208.
- Alioğlu, N. D. (2018). Kuzey İskandinavyalı İnsan Örneklerinde Hesaplamalı Antik Dna Çalışmaları (*Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü*).
- Allentoft, M. E., Sikora, M., Sjögren, K. G., Rasmussen, S., Rasmussen, M., Stenderup, J., ... & Malaspinas, A. S. (2015). Population genomics of bronze age Eurasia. *Nature*, 522(7555), 167.
- Altmann, A., Weber, P., Bader, D., Preuß, M., Binder, E. B., & Müller-Myhsok, B. (2012). A beginners guide to SNP calling from high-throughput DNA-sequencing data. *Human genetics*, 131(10), 1541-1554.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., ... & Schreier, P. H. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457.
- Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M., & Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature genetics*, 23(2), 147.

- Arias, L., Barbieri, C., Barreto, G., Stoneking, M., & Pakendorf, B. (2018). High-resolution mitochondrial DNA analysis sheds light on human diversity, cultural interactions, and population mobility in Northwestern Amazonia. *American Journal of Physical Anthropology*, 165(2), 238–255. <https://doi.org/10.1002/ajpa.23345>
- Asamura, H., Fujimori, S., Ota, M., & Fukushima, H. (2007a). MiniSTR multiplex systems based on non-CODIS loci for analysis of degraded DNA samples. *Forensic science international*, 173(1), 7-15.
- Asamura, H., Sakai, H., Ota, M., & Fukushima, H. (2007b). MiniY-STR quadruplex systems with short amplicon lengths for analysis of degraded DNA samples. *Forensic Science International: Genetics*, 1(1), 56-61.
- Baird, D. (2012). The Late Epipaleolithic, Neolithic, and Chalcolithic of the Anatolian Plateau, 13,000–4000 BC. *A companion to the archaeology of the Ancient Near East*, 1, 431-465.
- Batiuk, S. D. (2013). The fruits of migration: Understanding the 'longue duree' and the socio-economic relations of the Early Transcaucasian Culture. *Journal of Anthropological Archaeology*, 32(4), 449-477.
- Belledi, M., Poloni, E. S., Casalotti, R., Conterio, F., Mikerezi, I., Tagliavini, J., & Excoffier, L. (2000). Maternal and paternal lineages in Albania and the genetic structure of Indo-European populations. *European Journal of Human Genetics*, 8(7), 480.
- Bini, C., & Pappalardo, G. (2005). mtDNA HVI length heteroplasmic profile in different tissues of maternally related members. *Forensic science international*, 152(1), 35-38.
- Boaz, N. T., Almquist, A. J. *Biological Anthropology: A Synthetic Approach to Human Evolution* (2002) . *Pearson Press*.
- Bollongino, R., Tresset, A., & Vigne, J. D. (2008). Environment and excavation: Pre-lab impacts on ancient DNA analyses. *Comptes Rendus Palevol*, 7(2-3), 91-98.
-

- Bouwman, J., Spijker, S., Schut, D., Wächter, B., Ylstra, B., Smit, A. B., & Verhage, M. (2006). Reduced expression of neuropeptide genes in a genome-wide screen of a secretion-deficient mouse. *Journal of neurochemistry*, 99(1), 84-96.
- Brandt, G., Haak, W., Adler, C. J., Roth, C., Szécsényi-Nagy, A., Karimnia, S., ... & Dresely, V. (2013). Ancient DNA reveals key stages in the formation of central European mitochondrial genetic diversity. *Science (New York, NY)*, 342(6155), 257.
- Brown, T. A., & Brown, K. (2011). *Biomolecular archaeology: an introduction*. John Wiley & Sons.
- Brown, T. A., Cappellini, E., Kistler, L., Lister, D. L., Oliveira, H. R., Wales, N., & Schlumbaum, A. (2015). Recent advances in ancient DNA research and their implications for archaeobotany. *Vegetation History and Archaeobotany*, 24(1), 207-214.
- Bouwman, A. S., Chilvers, E. R., Brown, K. A., & Brown, T. A. (2006). Brief communication: identification of the authentic ancient DNA sequence in a human bone contaminated with modern DNA. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 131(3), 428-431.
- Buckley, M., Fraser, S., Herman, J., Melton, N. D., Mulville, J., & Pálsdóttir, A. H. (2014). Species identification of archaeological marine mammals using collagen fingerprinting. *Journal of Archaeological Science*, 41, 631-641.
- Budowle, B., Allard, M. W., Wilson, M. R., & Chakraborty, R. (2003). Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annual review of genomics and human genetics*, 4(1), 119-141.
-
- Buikstra, J. E., & Ubelaker, D. (1994). Standards for data collection from human skeletal remains. Research series no. 44. Fayetteville, Arkansas: *Arkansas archeological survey research series no 44*.
- Burton, J. (2008). Bone chemistry and trace element analysis. *Biological anthropology of the human skeleton*, 443-460.

- Busing, F. M., Meijer, E., & Van Der Leeden, R. (1999). Delete-m jackknife for unequal m. *Statistics and Computing*, 9(1), 3-8.
- Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Elsevier.
- Butler, J. M., Shen, Y., & McCord, B. R. (2003). The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *Journal of forensic sciences*, 48(5), 1054-1064.
- Byers, S. N. (2016). *Introduction to forensic anthropology*. Taylor & Francis.
- Campos, P. F., Craig, O. E., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E., & Gilbert, M. T. P. (2012). DNA in ancient bone—where is it located and how should we extract it?. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 194(1), 7-16.
- Caramelli, D., Vernesi, C., Sanna, S., Sampietro, L., Lari, M., Castri, L., ... & Casoli, A. (2007). Genetic variation in prehistoric Sardinia. *Human genetics*, 122(3-4), 327-336.
- Cavalli-Sforza, L. L., & Feldman, M. W. (2003). The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. *Nature genetics*, 33(3s), 266.
- Cavalli-Sforza, L. L., & Minch, E. (1997). Paleolithic and Neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *The American Journal of Human Genetics*, 61(1), 247-251.
- Cinniöglu, C., King, R., Kivisild, T., Kalfoğlu, E., Atasoy, S., Cavalleri, G. L., ... & Oefner, P. J. (2004). Excavating Y-chromosome haplotype strata in Anatolia. *Human genetics*, 114(2), 127-148.
- Cipollaro, M., Di Bernardo, G., Galano, G., Galderisi, U., Guarino, F., Angelini, F., & Cascino, A. (1998). Ancient DNA in human bone remains from Pompeii archaeological site. *Biochemical and biophysical research communications*, 247(3), 901-904.
- Clisson, I., Keyser, C., Francfort, H. P., Crubezy, E., Samashev, Z., & Ludes, B. (2002). Genetic analysis of human remains from a double inhumation in a frozen kurgan in Kazakhstan (Berel site, Early 3rd Century BC). *International journal of legal medicine*, 116(5), 304-308.
- Coble, M. D., Hill, C. R., Vallone, P. M., & Butler, J. M. (2006, April). Characterization and performance of new MiniSTR loci for typing

degraded samples. In *International congress series* (Vol. 1288, pp. 504-506). Elsevier.

Colson, I. B., Richards, M. B., Bailey, J. F., Sykes, B. C., & Hedges, R. E. M. (1997). DNA analysis of seven human skeletons excavated from the Terp of Wijnaldum. *Journal of Archaeological Science*, 24(10), 911-917.

Comas, D., Calafell, F., Mateu, E., Pérez-Lezaun, A., & Bertranpetit, J. (1996). Geographic variation in human mitochondrial DNA control region sequence: the population history of Turkey and its relationship to the European populations. *Molecular biology and evolution*, 13(8), 1067-1077.

Comas, D., Plaza, S., Salas, A., Calafell, F., Corte-Real, F., Bertranpetit, J. & Carracedo, Á. (2004). Insights into the western Bantu dispersal: mtDNA lineage analysis in Angola. *Human genetics*, 115(5), 439-447.

Crawford, M. H. (2007). Anthropological genetics. *The International Encyclopedia of Biological Anthropology*, 1-7.

Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M.-T., Weihmann, A., Nickel, B., ... Meyer, M. (2013). Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(39), 15758–15763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314445110>

Daskalaki, E. (2014). Archaeological Genetics - Approaching Human History through DNA Analysis. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology*; 1101. Retrieved from <http://www.dart-europe.eu/full.php?id=868324>

Deguilloux, M. F., Pemonge, M. H., Mendisco, F., Thibon, D., Cartron, I., & Castex, D. (2014). Ancient DNA and kinship analysis of human remains deposited in Merovingian necropolis sarcophagi (Jau Dignac et Loirac, France, 7th-8th century AD). *Journal of Archaeological Science*, 41, 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2013.09.006>

Dissing, J., Binladen, J., Hansen, A., Sejrsen, B., Willerslev, E., & Lynnerup, N. (2007). The last Viking King: A royal maternity case solved by ancient DNA analysis. *Forensic science international*, 166(1), 21-27.

Dixon, L. A., Dobbins, A. E., Pulker, H. K., Butler, J. M., Vallone, P. M., Coble,

- M. D., ... & Morling, N. (2006). Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs—results of a collaborative European (EDNAP) exercise. *Forensic science international*, 164(1), 33-44.
- Donoghue, H. D., Spigelman, M., Greenblatt, C. L., Lev-Maor, G., Bar-Gal, G. K., Matheson, C., ... & Zink, A. R. (2004). Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *The Lancet infectious diseases*, 4(9), 584-592.
- Donoghue, H. D., Spigelman, M., O'grady, J., Szikossy, I., Pap, I., Lee, O. Y. C., ... & Minnikin, D. E. (2015). Ancient DNA analysis—An established technique in charting the evolution of tuberculosis and leprosy. *Tuberculosis*, 95, S140-S144.
- Drancourt, M., Aboudharam, G., Signoli, M., Dutour, O., & Raoult, D. (1998). Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(21), 12637-12640.
- Drobnič, K. (2006, April). A new primer set in a SRY gene for sex identification. In *International Congress Series* (Vol. 1288, pp. 268-270). Elsevier.
- Durand, E. Y., Patterson, N., Reich, D., & Slatkin, M. (2011). Testing for ancient admixture between closely related populations. *Molecular biology and evolution*, 28(8), 2239-2252.
- Erdal, Y. S., & Eroğlu, S. (2004). Torus Palatinus anomalisinin Kovuklukaya/Sinop insan iskeletlerindeki sıklığı ve olası nedenleri. *Hacettepe Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Dergisi*, 21(1).
- Eroglu, S. (2011). Comparison of Cranial Metric and Non-metric Traits in the Determining of Biological distance: an example of anatolia. *Tuba-Ar-Turkish academy of sciences journal of archaeology*, 14, 231-244.
- Eroğlu, S. ve Erdal, Y.S. (2007). Torus palatinus bir cinsiyet özelliği midir? *MKÜ Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi* , 4(8), 63-75
- Eroğlu, S., & Erdal, Y. S. (2008). Why did the frequency of palatine torus

increase in the ancient Anatolian populations?. *Homo*, 59(5), 365-382.

Fernández, E., Oliver, A., Turbón, D., & Arroyo-Pardo, E. (2006). MtDNA analysis of ancient samples from Castellón (Spain): Diachronic variation and genetic relationships. In *International Congress Series* (Vol. 1288, pp. 127-129). Elsevier.

Fernández, E., Pérez-Pérez, A., Gamba, C., Prats, E., Cuesta, P., Anfruns, J., ... & Turbón, D. (2014). Ancient DNA analysis of 8000 BC near eastern farmers supports an early neolithic pioneer maritime colonization of Mainland Europe through Cyprus and the Aegean Islands. *PLoS genetics*, 10(6), e1004401.

Fidan, E., Sarı, D., & Türkteki, M. (2015). An Overview of the Western Anatolian Early Bronze Age. *European Journal of Archaeology*, 18(1), 60-89.

Fondevila, M., Phillips, C., Naverán, N., Cerezo, M., Rodríguez, A., Calvo, R., ... & Lareu, M. V. (2008). Challenging DNA: assessment of a range of genotyping approaches for highly degraded forensic samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), 26-28.

Fu, Q., Mitnik, A., Johnson, P. L., Bos, K., Lari, M., Bollongino, R., ... & Ronchitelli, A. M. (2013). A revised timescale for human evolution based on ancient mitochondrial genomes. *Current biology*, 23(7), 553-559.

Gamba, C., Fernández, E., Oliver, A., Tirado, M., Baeza, C., López-Parra, A. M., & Arroyo-Pardo, E. (2008). Population genetics and DNA preservation in ancient human remains from Eastern Spain. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), 462-464.

Gao, S. Z., Yang, Y. D., Xu, Y., Zhang, Q. C., Zhu, H., & Zhou, H. (2007). Tracing the genetic history of the Chinese people: mitochondrial DNA analysis of aneolithic population from the Lajia site. *American journal of physical anthropology*, 133(4), 1128-1136.

Gifford, W. D., Pfaff, S. L., & Macfarlan, T. S. (2013). Transposable elements as genetic regulatory substrates in early development. *Trends in cell*

biology, 23(5), 218-226.

- Gill, P., Ivanov, P. L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., ... & Sullivan, K. (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature genetics*, 6(2), 130.
- Gilbert, M. T. P., Rudbeck, L., Willerslev, E., Hansen, A. J., Smith, C., Penkman, K. E., ... & Lynnerup, N. (2005). Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *Journal of Archaeological Science*, 32(5), 785-793.
- Green, R. E., Briggs, A. W., Krause, J., Prüfer, K., Burbano, H. A., Siebauer, M., ... & Pääbo, S. (2009). The Neandertal genome and ancient DNA authenticity. *The EMBO journal*, 28(17), 2494-2502.
- Green, R. E., Krause, J., Briggs, A. W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., ... & Hansen, N. F. (2010). A draft sequence of the Neandertal genome. *Science*, 328(5979), 710-722.
- Griffiths, A. J., Wessler, S. R., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M., Suzuki, D. T., & Miller, J. H. (2005). *An introduction to genetic analysis*. Macmillan.
- Gustafson, E. (2007). Teeth and DNA: The Mining of Mesolithic and Neolithic Teeth in a Non-destructive Manner (*Doctoral dissertation, University of Alberta*).
- Gómez-Robles, A. (2019). Dental evolutionary rates and its implications for the Neanderthal–modern human divergence. *Science advances*, 5(5), eaaw1268
- Götherström, A., Collins, M. J., Angerbjörn, A., & Lidén, K. (2002). Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry*, 44(3), 395-404.
- Günel, S. (2006). Çine-Tepecik Höyüğü 2004 Yılı Kazıları. 27. Kazı Sonuçları Toplantısı 1, *Kültür ve Turizm Bakanlığı Yayını*, Ankara, 19-28.

- Günel, S. (2010). 2008 Yılı Çine-Tepecik Kazıları. 31. Kazı Sonuçları Toplantısı 1, *Kültür ve Turizm Bakanlığı Yayını*, Ankara, 459-473.
- Günel, S. (2010b). Mycenaean cultural impact on the Çine (Marsyas) plain, southwest Anatolia: the evidence from Çine-Tepecik, *Anatolian Studies*, 60, 25-49.
- Günel, S. (2011). Çine-Tepecik 2009 Yılı Kazıları. 32. Kazı Sonuçları Toplantısı 1, *Kültür ve Turizm Bakanlığı Yayını*, Ankara, 9-80.
- Günel, S. (2011b). Çine-Tepecik Kazıları Işığında Bölgenin Tarihöncesi Kùltürleri Üzerine Bir İnceleme, *Karadeniz'den Fırat'a Bilgi Üretimi. Önder Bilgi'ye Armağan Yazılar*, ed. A. Öztan – Ş. Dönmez, Bilgin Kùltür Sanat Yayınları, İstanbul, 217-232.
- Günel, S. (2012a). Çine-Tepecik 2010 Yılı Kazıları. 33. Kazı Sonuçları Toplantısı, *Kùltür ve Turizm Bakanlığı Yayını*, Ankara, 19-37.
- Günel, S. 2012b. Menderes Bölgesinde MÖ. 2. Binyıl Kenti: Çine-Tepecik, *Colloquium Anatolicum XI*, 55-80.
- Günel, S. (2014). Çine-Tepecik 2012 Yılı Kazıları. 35. Kazı Sonuçları Toplantısı, *Kùltür ve Turizm Bakanlığı Yayını*, Ankara, 111-123.
- Günel, S. (2014b), New Contributions regarding Prehistoric Cultures in Meander Region: Çine-Tepecik, B. Horejs - M. Mehofer (ed.), *Western Anatolia before Troy. Proto-Urbanisation in the 4th millennium BC?*, Wien, 83-103.
- Günel, S. (2016). Çine-Tepecik 2014 Yılı Kazıları. 37. Kazı Sonuçları Toplantısı 1, 11-15 Mayıs 2015, Erzurum, *Kùltür ve Turizm Bakanlığı Yayınları*, Ankara: 201-214.
- Günel, S. (2016b), Batı Anadolu Tarihi Coğrafyasında Çine-Tepecik Merkezi', ANTAHŞUM sar "ÇİĞDEM", S. Erkut - Ö. Sir Gavaz (ed.), *Eski Anadolu Araştırmalarına ve Hititlere Adanmış Bir Hayat, Studies in Honour of*

Ahmet Ünal Armağanı, Arkeoloji ve Sanat Yayınları, İstanbul, 281-292

- Haak, W., Balanovsky, O., Sanchez, J. J., Koshel, S., Zaporozhchenko, V., Adler, C. J., ... & Dresely, V. (2010). Ancient DNA from European early neolithic farmers reveals their near eastern affinities. *PLoS biology*, 8(11), e1000536.
- Haak, W., Brandt, G., Jong, H. N. d., Meyer, C., Ganslmeier, R., Heyd, V., ... Alt, K. W. (2008). Ancient DNA, Strontium isotopes, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the Later Stone Age. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47), 18226–18231. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807592105>
- Haak, Wolfgang, Lazaridis, I., Patterson, N., Rohland, N., Mallick, S., Llamas, B., ... Reich, D. (2015). Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe. *Nature*, 522(7555), 207–211. <https://doi.org/10.1038/nature14317>
- Hagelberg, E., & Clegg, J. B. (1991). Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 244(1309), 45-50.
- Hagelberg, E., Sykes, B., & Hedges, R. (1989). Ancient bone DNA amplified. *Nature*, 342(6249), 485-485.
- Handt, O., Richards, M., Trommsdorff, M., Kilger, C., Simanainen, J., Georgiev, O., ... & Schaffner, W. (1994). Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science*, 264(5166), 1775-1778.
- Hansen, H. B., Damgaard, P. B., Margaryan, A., Stenderup, J., Lynnerup, N., Willerslev, E., & Allentoft, M. E. (2017). Comparing ancient DNA preservation in petrous bone and tooth cementum. *PloS one*, 12(1), e0170940.
- Hedges, R. E. (2002). Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry*, 44(3), 319-328.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiburger, M., Ryder, O. A., & Wilson, A. C. (1984).

- DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312(5991), 282.
- Hillman, G. (1996). Late Pleistocene changes in wild plant-foods available to hunter-gatherers of the northern Fertile Crescent: possible preludes to cereal cultivation. *The origins and spread of agriculture and pastoralism in Eurasia*, 159-203.
- Hofmanová, Z., Kreutzer, S., Hellenthal, G., Sell, C., Diekmann, Y., Díez-del-Molino, D., ... & Kirsanow, K. (2016). Early farmers from across Europe directly descended from Neolithic Aegeans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(25), 6886-6891.
- Hofreiter, M. (2012). Nondestructive DNA extraction from museum specimens. In *Ancient DNA* (pp. 93-100). Humana Press.
- Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., von Haeseler, A., & Pääbo, S. (2001). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research*, 29(23), 4793–4799. <https://doi.org/10.1093/nar/29.23.4793>
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M., & Pääbo, S. (2001). Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics*, 2(5), 353.
- Hoptay, K. (2013). Analyzing Ancient Mitochondrial DNA from Fontabelle Emergency Excavation Site Remains.
- Horai, S., Hayasaka, K., Murayama, K., Wate, N., Koike, H., & Nakai, N. (1989). DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis. *Proceedings of the Japan Academy, series B*, 65(10), 229-233.
- Horai, S., Kondo, R., Murayama, K., Hayashi, S., Koike, H., & Nakai, N. (1991). Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 333(1268), 409-417.
- Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T. H., Dizdaroğlu, M., & Paabo, S. (1996). DNA

- damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic acids research*, 24(7), 1304-1307.
- Hummel, S. (2003). *Ancient DNA typing: methods, strategies and applications*. Springer Science & Business Media.
- Hummel, S., & Herrmann, B. (1991). Y-chromosome-specific DNA amplified in ancient human bone. *Naturwissenschaften*, 78(6), 266-267.
- Hummel, S., & Herrmann, B. (1994). General aspects of sample preparation. In *Ancient DNA* (pp. 59-68). Springer, New York, NY.
- Ivanov, P. L., Wadhams, M. J., Roby, R. K., Holland, M. M., Weedn, V. W., & Parsons, T. J. (1996). Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nature genetics*, 12(4), 417.
- Jackes, M., Sherburne, R., Lubell, D., Barker, C., & Wayman, M. (2001). Destruction of microstructure in archaeological bone: a case study from Portugal. *International Journal of Osteoarchaeology*, 11(6), 415-432.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316(6023), 76.
- Johnson, P. H., Olson, C. B., & Goodman, M. (1985). Isolation and characterization of deoxyribonucleic acid from tissue of the woolly mammoth, *Mammuthus primigenius*. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 81(4), 1045-1051.
- Jones, M. M., Manwaring, N., Wang, J. J., Rohtchina, E., Mitchell, P., & Sue, C. M. (2007). Mitochondrial DNA haplogroups and age-related maculopathy. *Archives of Ophthalmology*, 125(9), 1235-1240.
- Jun, G., Wing, M. K., Abecasis, G. R., & Kang, H. M. (2015). An efficient and scalable analysis framework for variant extraction and refinement from population-scale DNA sequence data. *Genome Research*, 25(6), 918-925.
- Kaestle, F. A., & Horsburgh, K. A. (2002). Ancient DNA in anthropology:

methods, applications, and ethics. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 119(S35), 92-130.

Keyser, C., Bouakaze, C., Crubézy, E., Nikolaev, V. G., Montagnon, D., Reis, T., & Ludes, B. (2009). Ancient DNA provides new insights into the history of south Siberian Kurgan people. *Human genetics*, 126(3), 395-410.

Keyser-Tracqui, C., Crubezy, E., & Ludes, B. (2003). Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *The American Journal of Human Genetics*, 73(2), 247-260.

Keyser-Tracqui, C., & Ludes, B. (2005). Methods for the study of ancient DNA. In *Forensic DNA typing protocols* (pp. 253-264). Humana Press.

Kılınç, G. M., Koptekin, D., Atakuman, Ç., Sümer, A. P., Dönertaş, H. M., Yaka, R., ... Somel, M. (2017). Archaeogenomic analysis of the first steps of Neolithization in Anatolia and the Aegean. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1867), 20172064. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2064>

Kılınç, G. M., Omrak, A., Özer, F., Günther, T., Büyükkarakaya, A. M., Bıçakçı, E., ... Götherström, A. (2016). The Demographic Development of the First Farmers in Anatolia. *Current Biology*, 26(19), 2659–2666. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.057>

Klug, W. S., & Cummings, M. R. (2006). *Concepts of genetics*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Education,.

Knipper, C., Meyer, C., Jacobi, F., Roth, C., Fecher, M., Stephan, E., ... & Maus, M. (2014). Social differentiation and land use at an Early Iron Age “princely seat”: bioarchaeological investigations at the Glauberg (Germany). *Journal of archaeological science*, 41, 818-835.

Krause, J., Briggs, A. W., Kircher, M., Maricic, T., Zwyns, N., Derevianko, A., & Pääbo, S. (2010). A complete mtDNA genome of an early modern human from Kostenki, Russia. *Current Biology*, 20(3), 231-236.

- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., Stoneking, M., & Pääbo, S. (1997). Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *cell*, 90(1), 19-30.
- Kurosaki, K., Matsushita, T., & Ueda, S. (1993). Individual DNA identification from ancient human remains. *American journal of human genetics*, 53(3), 638.
- Larcombe, L., Rempel, J. D., Dembinski, I., Tinckam, K., Rigatto, C., & Nickerson, P. (2005). Differential cytokine genotype frequencies among Canadian Aboriginal and Caucasian populations. *Genes and immunity*, 6(2), 140.
- Larsen, C. S. (2002). Bioarchaeology: the lives and lifestyles of past people. *Journal of Archaeological Research*, 10(2), 119-166.
- Larsen, S. A., Steiner, B. M., & Rudolph, A. H. (1995). Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clinical microbiology reviews*, 8(1), 1-21.
- Lazaridis, I., Mitnik, A., Patterson, N., Mallick, S., Rohland, N., Pfrengle, S., ... & McGeorge, P. J. P. (2017). Genetic origins of the Minoans and Mycenaeans. *Nature*, 548(7666), 214.
- Lazaridis, I., Nadel, D., Rollefson, G., Merrett, D. C., Rohland, N., Mallick, S., ... & Connell, S. (2016). Genomic insights into the origin of farming in the ancient Near East. *Nature*, 536(7617), 419.
- Lazaridis, I., Patterson, N., Mitnik, A., Renaud, G., Mallick, S., Kirsanow, K., ... & Berger, B. (2014). Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans. *Nature*, 513(7518), 409.
- Lee, H. C., Pagliaro, E. M., Berka, K. M., Folk, N. L., Anderson, D. T., Ruano, G., ... & Gaensslen, R. E. (1991). Genetic markers in human bone: I. Deoxyribonucleic acid (DNA) analysis. *Journal of Forensic Science*, 36(2), 320-330.
- Lee, H., Deignan, J. L., Dorrani, N., Strom, S. P., Kantarci, S., Quintero-Rivera, F., ... & Fox, M. (2014). Clinical exome sequencing for genetic

identification of rare Mendelian disorders. *Jama*, 312(18), 1880-1887.

Lewis, M. E. (2009). *The bioarchaeology of children: perspectives from biological and forensic anthropology* (Vol. 50). Cambridge University Press.

Li, H., Ruan, J., & Durbin, R. (2008). Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome research*, 18(11), 1851-1858.

Loogväli, E. L., Roostalu, U., Malyarchuk, B. A., Derenko, M. V., Kivisild, T., Metspalu, E., ... & Pennarun, E. (2004). Disuniting uniformity: a pied cladistic canvas of mtDNA haplogroup H in Eurasia. *Molecular biology and evolution*, 21(11), 2012-2021.

Lutz-Bonengel, S., Sängel, T., Pollak, S., & Szibor, R. (2004). Different methods to determine length heteroplasmy within the mitochondrial control region. *International journal of legal medicine*, 118(5), 274-281.

Macaulay, V., & Richards, D. M. (2006). *Human mitochondrial DNA and the evolution of Homo sapiens*. Springer.

Malaspinas, A. S., Westaway, M. C., Muller, C., Sousa, V. C., Lao, O., Alves, I., ... Willerslev, E. (2016). A genomic history of Aboriginal Australia. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature18299>

Malmström, H., Gilbert, M. T. P., Thomas, M. G., Brandström, M., Storå, J., Molnar, P., ... & Willerslev, E. (2009). Ancient DNA reveals lack of continuity between neolithic hunter-gatherers and contemporary Scandinavians. *Current Biology*, 19(20), 1758-1762.

Martinez, M. S. (2015). Ancient Dna: a Multifunctional Tool for Resolving *Anthropological Questions*, 53, 160. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Mathieson, I., Lazaridis, I., Rohland, N., Mallick, S., Patterson, N., Roodenberg, S. A., ... & Sirak, K. (2015). Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians. *Nature*, 528(7583), 499.

- Matisoo-Smith, E. (2015). Ancient DNA and the human settlement of the Pacific: A review. *Journal of Human Evolution*, 79, 93-104.
- Mekel-Bobrov, N., & Lahn, B. T. (2004). Ancient DNA analysis of human remains from Tell Kurdu. *Anatolica*, 30, 72-73.
- Meyer, M., & Kircher, M. (2010). Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols*, 5(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5448>
- Meyer, E., Wiese, M., Bruchhaus, H., Claussen, M., & Klein, A. (2000). Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains. *Forensic science international*, 113(1-3), 87-90.
- Mittnik, A., Wang, C. C., Svoboda, J., & Krause, J. (2016). A molecular approach to the sexing of the triple burial at the Upper Paleolithic Site of Dolní Věstonice. *PloS one*, 11(10), e0163019.
- Montiel, R., Malgosa, A., & Francalacci, P. (2001). Authenticating ancient human mitochondrial DNA. *Human Biology*, 73(5), 689-713.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Methods Enzymol. 155,335-350. *Mullis335155Methods Enzymol.*
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H. (1986, January). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 51, pp. 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Müller, R., Roberts, C. A., & Brown, T. A. (2015). Complications in the study of ancient tuberculosis: non-specificity of IS6110 PCRs. *STAR: Science & Technology of Archaeological Research*, 1(1), 1-8.
- Nelson, K., & Melton, T. (2007). Forensic mitochondrial DNA analysis of 116 casework skeletal samples. *Journal of forensic sciences*, 52(3), 557-561.
- Nielsen-Marsh, C. M., & Hedges, R. E. M. (1999). Bone porosity and the use of mercury intrusion porosimetry in bone diagenesis

- studies. *Archaeometry*, 41(1), 165-174.
- Novembre, J., & Stephens, M. (2008). Interpreting principal component analyses of spatial population genetic variation. *Nature genetics*, 40(5), 646.
- Olalde, I., Schroeder, H., Sandoval-Velasco, M., Vinner, L., Lobón, I., Ramirez, O., ... & María Fullola, J. (2015). A common genetic origin for early farmers from Mediterranean Cardial and Central European LBK cultures. *Molecular biology and evolution*, 32(12), 3132-3142.
- Omrak, A., Günther, T., Valdiosera, C., Svensson, E. M., Malmström, H., Kiesewetter, H., ... & Götherström, A. (2016). Genomic evidence establishes Anatolia as the source of the European Neolithic gene pool. *Current Biology*, 26(2), 270-275.
- Oota, H., Kurosaki, K., Pookajorn, S., Ishida, T., & Ueda, S. (2001). Genetic study of the Paleolithic and Neolithic Southeast Asians. *Human Biology*, 73(2), 225-231.
- Oota, H., Saitou, N., Matsushita, T., & Ueda, S. (1995). A genetic study of 2,000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences. *American Journal of Physical Anthropology*, 98(2), 133-145.
- Opel, K. L., Chung, D. T., Drábek, J., Tatarek, N. E., Jantz, L. M., & McCord, B. R. (2006). The application of miniplex primer sets in the analysis of degraded DNA from human skeletal remains. *Journal of forensic sciences*, 51(2), 351-356.
- Ortner, D. J. (2003). *Identification of pathological conditions in human skeletal remains*. Academic Press.
- Ottoni, C., Rasteiro, R., Willet, R., Claeys, J., Talloen, P., Van de Vijver, K., ... Decorte, R. (2016). Comparing maternal genetic variation across two millennia reveals the demographic history of an ancient human population in southwest Turkey. *Royal Society Open Science*, 3(2), 150250. <https://doi.org/10.1098/rsos.150250>

- Ottoni, C., Ricaut, F. X., Vanderheyden, N., Brucato, N., Waelkens, M., & Decorte, R. (2011). Mitochondrial analysis of a Byzantine population reveals the differential impact of multiple historical events in South Anatolia. *European Journal of Human Genetics*, 19(5), 571–576. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.230>
- Özdoğan, M. (2011). Archaeological evidence on the westward expansion of farming communities from eastern Anatolia to the Aegean and the Balkans. *Current Anthropology*, 52(S4), S415-S430.
- O'Rourke, D. H., Carlyle, S. W., & Parr, R. L. (1996). Ancient DNA: Methods, progress, and perspectives. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Association*, 8(5), 557-571.
- O'Rourke, D. H., Hayes, M. G., & Carlyle, S. W. (2000). Ancient DNA studies in physical anthropology. *Annual Review of Anthropology*, 29(1), 217-242.
- Pääbo, S. (1999). Human evolution. *Trends in Genetics*, 15(12), M13-M16.
- Pääbo, S. (1985). Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *nature*, 314(6012), 644.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Després, V., Hebler, J., Rohland, N., ... & Hofreiter, M. (2004). Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 645-679.
- Parr, R. L., Carlyle, S. W., & O'rourke, D. H. (1996). Ancient DNA analysis of Fremont Amerindians of the Great Salt Lake Wetlands. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 99(4), 507-518.
- Patterson, N., Moorjani, P., Luo, Y., Mallick, S., Rohland, N., Zhan, Y., ... & Reich, D. (2012). Ancient admixture in human history. *Genetics*, 192(3), 1065-1093.
- Pepperell, C. S., Granka, J. M., Alexander, D. C., Behr, M. A., Chui, L., Gordon, J., ... & Nguyen, D. (2011). Dispersal of Mycobacterium tuberculosis via the Canadian fur trade. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences, 108(16), 6526-6531.

- Perrin, P. (2015). Human and tuberculosis co-evolution: An integrative view. *Tuberculosis*, 95, S112-S116.
- Pilloud, M. A., & Larsen, C. S. (2011). "Official" and "practical" kin: Inferring social and community structure from dental phenotype at Neolithic Çatalhöyük, Turkey. *American Journal of Physical Anthropology*, 145(4), 519-530.
- Pilli, E., Modi, A., Serpico, C., Achilli, A., Lancioni, H., Lippi, B., ... & Caramelli, D. (2013). Monitoring DNA contamination in handled vs. directly excavated ancient human skeletal remains. *PLoS One*, 8(1), e52524.
- Pinhasi, R., Fernandes, D., Sirak, K., Novak, M., Connell, S., Alpaslan-Roodenberg, S., ... Hofreiter, M. (2015). Optimal ancient DNA yields from the inner ear part of the human petrous bone. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129102>
- Pizzamiglio, M., Marino, A., Coli, A., Floris, T., & Garofano, L. (2006, April). The use of mini-STRs on degraded DNA samples. In *International Congress Series* (Vol. 1288, pp. 498-500). Elsevier.
- Ramos, M. A., Jamilena, M., Lozano, R., Cárdenas, S., Rejón, C. R., & Rejón, M. R. (1995). Phylogenetic Relationships of the Sparidae Family (Pisces, Perciformes) Inferred from Satellite-DNA. *Hereditas*, 122(1), 1-6.
- Reich, D., Green, R. E., Kircher, M., Krause, J., Patterson, N., Durand, E. Y., ... & Maricic, T. (2010). Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature*, 468(7327), 1053.
- Renaud, G., Slon, V., Duggan, A. T., & Kelso, J. (2015). Schmutzi: estimation of contamination and endogenous mitochondrial consensus calling for ancient DNA. *Genome biology*, 16(1), 224.
- Ricaut, F. X., Fedoseeva, A., Keyser-Tracqui, C., Crubézy, E., & Ludes, B. (2005). Ancient DNA analysis of human neolithic remains found in

northeastern Siberia. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 126(4), 458-462.

Ricaut, F. X., Keyser-Tracqui, C., Cammaert, L., Crubézy, E., & Ludes, B. (2004). Genetic analysis and ethnic affinities from two Scytho-Siberian skeletons. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 123(4), 351-360.

Ricaut, F. X., Thomas, T., Arganini, C., Staughton, J., Leavesley, M., Bellatti, M., ... & Mirazon Lahr, M. (2008). Mitochondrial DNA variation in Karkar islanders. *Annals of human genetics*, 72(3), 349-367.

Richards, M., Oppenheimer, S., & Sykes, B. (1998). mtDNA suggests Polynesian origins in Eastern Indonesia. *American journal of human genetics*, 63(4), 1234.

Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature protocols*, 2(7), 1756.

Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant molecular biology*, 5(2), 69-76.

Rollo, F., Sassaroli, S., & Ubaldi, M. (1995). Molecular phylogeny of the fungi of the Iceman's grass clothing. *Current genetics*, 28(3), 289-297.

Rudin, N., & Inman, K. (2002). Biological evidence as trace evidence: the forensic science of DNA typing. *CAC News*, 4, 19-21.

Saferstein, R. (2004). *What Every Law Enforcement Officer Should Know about DNA Evidence: Beginning Level Module*. Prentice Hall.

Sagona, A., & Zimansky, P. (2009). *Ancient Turkey*. Routledge.

Salas, A., Lareu, M. V., & Carracedo, A. (2001). Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case

- report. *International journal of legal medicine*, 114(3), 186-190.
- Sampietro, M. L., Caramelli, D., Lao, O., Calafell, F., Comas, D., Lari, M., ... & Lalueza-Fox, C. (2005). The genetics of the pre-Roman Iberian Peninsula: A mtDNA study of ancient Iberians. *Annals of human genetics*, 69(5), 535-548.
- Schaefer, N. K., Shapiro, B., & Green, R. E. (2016). Detecting hybridization using ancient DNA. *Molecular ecology*, 25(11), 2398-2412.
- Schneider, P. M., Bender, K., Mayr, W. R., Parson, W., Hoste, B., Decorte, R., ... & Carlotti, C. M. P. (2004). STR analysis of artificially degraded DNA—results of a collaborative European exercise. *Forensic science international*, 139(2-3), 123-134.
- Scholz, M., Hengst, S., Broghammer, M., & Pusch, C. M. (2001). Intrapopulational relationships in ancient societies: A multidisciplinary study. *Zeitschrift für Morphologie und Anthropologie*, 5-21.
- Schubert, M., Ginolhac, A., Lindgreen, S., Thompson, J. F., Al-Rasheid, K. A., Willerslev, E., ... & Orlando, L. (2012). Improving ancient DNA read mapping against modern reference genomes. *BMC genomics*, 13(1), 178.
- Schwartz, T. R., Schwartz, E. A., Mieszerski, L., McNally, L., & Kobilinsky, L. (1991). Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *Journal of Forensic Science*, 36(4), 979-990.
- Scott, P., Sherriff, M., DiBiase, A. T., & Cobourne, M. T. (2008). Perception of discomfort during initial orthodontic tooth alignment using a self-ligating or conventional bracket system: a randomized clinical trial. *The European Journal of Orthodontics*, 30(3), 227-232.
- Scott, G. R., & Turner, C. G. (1997). Anthropology of modern human teeth (pp. 382-p). *Cambridge: Cambridge University Press*.
- Shapiro, B., & Hofreiter, M. (2014). A paleogenomic perspective on evolution and gene function: New insights from ancient DNA. *Science*, 343(6169).

<https://doi.org/10.1126/science.1236573>

- Sirak, K. A., Fernandes, D. M., Cheronet, O., Harney, E., Mah, M., Mallick, S., ... & Candilio, F. (2019). Human Auditory Ossicles as an Alternative Optimal Source of Ancient DNA. *bioRxiv*, 654749.
- Sirak, K. A., Fernandes, D. M., Cheronet, O., Novak, M., Gamarra, B., Balassa, T., ... & Kocsis-Buruzs, G. (2017). A minimally-invasive method for sampling human petrous bones from the cranial base for ancient DNA analysis. *BioTechniques*, 62(6), 283-289.
- Sivilich, D. (2005). Evolution of Macro-Archaeology of the battle of Monmouth–1778 American Revolutionary War. *Battlefields Annual Review*, 72-85.
- Skoglund, P., Storå, J., Götherström, A., & Jakobsson, M. (2013). Accurate sex identification of ancient human remains using DNA shotgun sequencing. *Journal of Archaeological Science*, 40(12), 4477-4482.
- Skoglund, P., Malmström, H., Omrak, A., Raghavan, M., Valdiosera, C., Günther, T., ... & Apel, J. (2014). Genomic diversity and admixture differs for Stone-Age Scandinavian foragers and farmers. *Science*, 344(6185), 747-750.
- Skoglund, P., & Mathieson, I. (2018). Ancient genomics of modern humans: the first decade. *Annual review of genomics and human genetics*, 19, 381-404.
- Skoglund, P., Northoff, B. H., Shunkov, M. V., Derevianko, A. P., Pääbo, S., Krause, J., & Jakobsson, M. (2014). Separating endogenous ancient DNA from modern day contamination in a Siberian Neandertal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(6). <https://doi.org/10.1073/pnas.1318934111>
- Smith, C. I., Chamberlain, A. T., Riley, M. S., Stringer, C., & Collins, M. J. (2003). The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *Journal of human evolution*, 45(3), 203-217.

- Stanford, C., Allen, J. S., & Antón, S. C. (2011). *Biological anthropology: the natural history of humankind*. Pearson Education.
- Stone, A. C., Milner, G. R., Pääbo, S., & Stoneking, M. (1996). Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 99(2), 231-238.
- Stone, A. C., & Stoneking, M. (1993). Ancient DNA from a pre-Columbian Amerindian population. *American Journal of Physical Anthropology*, 92(4), 463-471.
- Stone, A. C., & Stoneking, M. (1999). Analysis of ancient DNA from a prehistoric Amerindian cemetery. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 354(1379), 153-159.
- Stoneking, M. (2000). Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. *The American Journal of Human Genetics*, 67(4), 1029-1032.
- Stoneking, M. (2017). *An introduction to molecular anthropology*. John Wiley & Sons.
- Stoneking, M., Fontius, J. J., Clifford, S. L., Soodyall, H., Arcot, S. S., Saha, N., ... & Batzer, M. A. (1997). Aluinsertion polymorphisms and human evolution: Evidence for a larger population size in Africa. *Genome research*, 7(11), 1061-1071.
- Szécsényi-Nagy, A., Brandt, G., Haak, W., Keerl, V., Jakucs, J., Möller-Rieker, S., ... & Osztás, A. (2015). Tracing the genetic origin of Europe's first farmers reveals insights into their social organization. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1805), 20150339.
- Torroni, A., Lott, M. T., Cabell, M. F., Chen, Y. S., Lavergne, L., & Wallace, D. C. (1994). mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent

somatic duplication in the D-loop region. *American journal of human genetics*, 55(4), 760.

Torroni, A., & Wallace, D. C. (1994). Mitochondrial DNA variation in human populations and implications for detection of mitochondrial DNA mutations of pathological significance. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 26(3), 261-271.

Torroni, A., Schurr, T. G., Cabell, M. F., Brown, M. D., Neel, J. V., Larsen, M., Smith, D. G., Vullo, C. M., and Wallace, D. C. (1993). "Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mitochondrial DNAs", *Am. J. Hum. Genet.* 53, 563-590.

Ubelaker, D. H., & Grant, L. G. (1989). Human skeletal remains: Preservation or reburial?. *American journal of physical anthropology*, 32(S10), 249-287.

Underhill, P. A., Jin, L., Lin, A. A., Mehdi, S. Q., Jenkins, T., Vollrath, D., ... & Oefner, P. J. (1997). Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome research*, 7(10), 996-1005.

Van Oven, M., & Kayser, M. (2009). Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human mutation*, 30(2), E386-E394.

Von Wurmb-Schwark, N. & Schwark, T., Bachmann, C. (2004). STR typing of ductal adenocarcinomas of the pancreas and healthy control tissue in 18 individuals. *Legal Medicine*, 6(3), 170-173.

Von Wurmb-Schwark, N., Harbeck, M., Wiesbrock, U., Schroeder, I., Ritz-Timme, S., & Oehmichen, M. (2003). Extraction and amplification of nuclear and mitochondrial DNA from ancient and artificially aged bones. *Legal medicine*, 5, S169-S172.

- Wallace, D. C. (1994). Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(19), 8739-8746.
- WEA (Workshop of European Anthropologists). (1980). Recommendations for Age and Sex Diagnoses of Skeletons. *Journal of Human Evolution*, 9, 517-549.
- Weissensteiner, H., Pacher, D., Kloss-Brandstätter, A., Forer, L., Specht, G., Bandelt, H. J., ... & Schönherr, S. (2016). HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic acids research*, 44(W1), W58-W63.
- Yaka, R. (2015). Ancient DNA Isolation and Mitochondrial DNA Analysis of Human Samples from Çemialo Sırtı, Batman in Southeast Anatolia (*Doctoral dissertation, MIDDLE EAST TECHNICAL UNIVERSITY*).
- Yaka, R., Birand, A., Yılmaz, Y., Caner, C., Açıkan, S. C., Gündüzalp, S., ... & Somel, M. (2018). Archaeogenetics of Late Iron Age Çemialo Sırtı, Batman: Investigating maternal genetic continuity in North Mesopotamia since the Neolithic. *American journal of physical anthropology*, 166(1), 196-207.
- Yang, D. (2003). Contamination controls and detection in ancient DNA studies. *Acta Anthropologica Sinica*, 22(2), 163-173.
- Zeder, M. A. (2008). Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 105(33), 11597-11604.
- Zink, A., & Nerlich, A. G. (2003). Molecular analyses of the “Pharaos:” feasibility of molecular studies in ancient Egyptian material. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 121(2), 109-111.

Zink, A. R., Reischl, U., Wolf, H., & Nerlich, A. G. (2002). Molecular analysis of ancient microbial infections. *FEMS Microbiology Letters*, 213(2), 141-147.



EK1

 HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA
Tarih: 13/09/2019
Tez Başlığı : <u>Gine-Tanesik İnsan İskelet Kalıntılarının</u> <u>Arkeogenomik Analizi</u>
Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler ve d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 158 sayfalık kısmına ilişkin, 13/09/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda işaretlenmiş filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4'tür.
Uygulanan filtrelemeler: 1- ☒ Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç 2- ☒ Kaynakça hariç 3- ☐ Alıntılar hariç 4- ☒ Alıntılar dâhil 5- ☐ 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç
Hacettepe Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.
Gereğini saygılarımla arz ederim.
13.09.2019 Tarih ve İmza
Adı Soyadı: <u>Sevgi Yorulmaz</u> Öğrenci No: <u>N14123648</u> Anabilim Dalı: <u>Antropoloji Anabilim Dalı</u> Programı: <u>Antropoloji</u>
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR.  <u>Dr. Ali Mehdi Başkarakaya</u> (Unvan, Ad Soyad, İmza)

EK 2

	HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜ TEZ ÇALIŞMASI ETİK KOMİSYON MUAFİYETİ FORMU	
	HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ SOSYAL BİLİMLER ENSTİTÜSÜ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA Tarih: 13/09.2019	
Tez Başlığı: <u>Gine-Tepesi İnsan İskelet Kalıntılarının</u> <u>Arkeogenetik Analizi</u>		
Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmam: 1. İnsan ve hayvan üzerinde deney niteliği taşımamaktadır, 2. Biyolojik materyal (kan, idrar vb. biyolojik sıvılar ve numuneler) kullanılmaması gerektirmektedir. 3. Beden bütünlüğüne müdahale içermemektedir. 4. Gözlemsel ve betimsel araştırma (anket, mülakat, ölçek/skala çalışmaları, dosya taramaları, veri kaynakları taraması, sistem-model geliştirme çalışmaları) niteliğinde değildir.		
Hacettepe Üniversitesi Etik Kurullar ve Komisyonlarının Yönergelerini inceledim ve bunlara göre tez çalışmamın yürütülebilmesi için herhangi bir Etik Kurul/Komisyon'dan izin alınmasına gerek olmadığını; aksi durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.		
Gereğini saygılarımla arz ederim.		13.09.2019  Tarih ve İmza
Adı Soyadı: <u>Sergü Yorsulmaz</u> Öğrenci No: <u>114123648</u> Anabilim Dalı: <u>Antropoloji: Anabilim Dalı</u> Programı: <u>Antropoloji</u> Statüsü: ☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Doktora		
DANIŞMAN GÖRÜŞÜ VE ONAYI  <u>Dr. Ali Mehmet Başyerkar</u> (Unvan, Ad Soyad, İmza)		
Detaylı Bilgi: http://www.sosyalbilimler.hacettepe.edu.tr Telefon: 0-312-2976860 Faks: 0-3122992147 E-posta: sosyalbilimler@hacettepe.edu.tr		