



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN İSKELETLERİNDE MİTOKONDRIYAL GENOM
ANALİZİ VE HAPLO-GRUP TAYİNİ**

Nefize Ezgi ALTINIŞIK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Ercan ARICAN

Mart, 2015

İSTANBUL

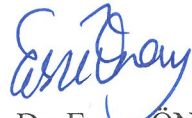
Bu çalışma 16/03/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

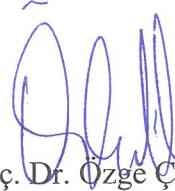
Tez Jürisi:


Doç. Dr. Ercan ARICAN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Prof. Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Doç. Dr. Ali KARAGÖZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Doç. Dr. Evren ÖNAY UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Doç. Dr. Özge ÇELİK
İstanbul Kültür Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 31068 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Akademik hayatımın en başından itibaren bıkmadan tüm sorularımı cevaplayan, akademik yaşamımı şekillendirirken sürekli beni yüreklendiren ve akademik özgürlüğümü her daim koruyan, bilimsel düşünmeyi öğreterek beni bilim insanı olmaya hazırlayan akademik danışmanım Sayın Doç. Dr. Ercan Arıcan'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda kullandığım örnekleri benimle hiç tereddüt etmeden paylaşan ve örnekleme aşamasında büyük bir misafirperverlikle kazı evinde konaklamamızı sağlayan Nif Dağı Kazıları Kazı Başkanı Sayın Prof. Dr. Elif Tül Tulunay'a, Kazı Başkan Yardımcısı Sayın Yrd. Doç. Dr. Müjde Peker'e, Sayın Doç. Dr. Daniş Baykan'a, tüm kazı ekibine ve arazi çalışanlarına da teşekkürü borç bilirim.

Çalışmamın her aşamasında yanımda olan, desteklerini hiç eksik etmeyen çalışma arkadaşlarım Burcu Yılmaz, İlkay Başak Uysal ve Utku Can Atılğan'a; çalışmanın büyük bölümünde bilimsel heyecanlarını her zaman koruyarak destek olan ve her sorunu çözen Sayın Erdi Keleş'e, Sayın Ahmet Eren Sayın'a ve tüm Done Genetik AŞ çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşamım boyunca yapabileceğime hiç kuşku duymadan hep inanan ve desteğini hep yanımda hissettiğim babama, en başından beri bana güvenen, sevgisini sürekli hatırlatan ve en zor anlarımda yanımda olan kardeşim Eylem Altınışik'a, hayatımın her alanında hiç elimi bırakmayan yol arkadaşım Onur Doğan'a sevgi ve saygılarımı sunarım.

Mart, 2015

Nefize Ezgi ALTINIŞIK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iii
TABLO LİSTESİ	vi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
3. MALZEME VE YÖNTEM	30
3.1. ÖRNEKLEME	30
3.2. DIŞ ÖRNEKLERİNİN YÜZEY STERİLİZASYONU.....	31
3.3. STERİL DIŞ ÖRNEKLERİNDEN DNA İZOLASYONU	31
3.4. MİTOKONDRİ DNA'SININ D-LOOP BÖLGESİNİN "TOUCHDOWN" POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (TOUCHDOWN PCR) İLE ÇOĞALTILMASI.....	32
3.5. D-LOOP BÖLGESİNE AİT ÇOĞALTILAN AMPLİKONLARIN DİZİLENMESİ VE BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ	34
4. BULGULAR	35
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ.....	67

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Antropolojinin alt dalları.....	4
Şekil 2.2: Anatomik pozisyondaki insan iskeletinin anterior ve lateral yönlerden görünümü. Superior: Üst; Inferior: Alt; Posterior: Arka; Anterior: Ön; Medial: Merkezi; Lateral: Yan; Proksimal: Yakın; Distal: Uzak (Adams ve Crabtree, 2008).....	6
Şekil 2.3: Maksillar (solda) ve mandibular (sağda) çene yarıları (White ve diğ., 2012).....	7
Şekil 2.4: Dişin histolojik yapısı (Hillson, 2005).....	8
Şekil 2.5: Otozomal DNA dizilerine göre biyolojik yakınlık ağacı. Vindija 33.16, Vindija 33.25, Vindija 33.26 ve Mezmaiskaya 1 örnekleri farklı Neandertal bireyelerine, San, Han, Papuan, French ve Yoruba günümüz yaşayan insanların farklı popülasyonlarına aittir. (Reich ve diğ., 2010).....	11
Şekil 2.6: DNA onarım mekanizmaları (Hoeijmakers, 2001).....	13
Şekil 2.7: Antik DNA’da meydana gelen hasar tipleri. a) Abazik bölge oluşumu ile fragmentasyon. b) Sitozin nükleotidinin Urasil’e dönüşümü (Dabney ve diğ., 2013).....	15
Şekil 2.8: Farklı kaynaklardan izole edilen DNA miktarlarının karşılaştırılması (Gamba ve diğ., 2014).....	17
Şekil 2.9: 242 bç mtDNA molekülünün yıllar içinde bozulma grafiği (Allentoft ve diğ., 2012).....	18
Şekil 2.10: İnsan mitokondriyal genomu (Pakendorf ve Stoneking, 2005).....	20
Şekil 2.11: <i>Phylo-tree</i> veritabanında bulunan mtDNA haplo-grup ağacı (van Oven, 2014).....	22
Şekil 2.12: Bir referans ve 133 tip mtDNA’ya ait soy ağacı (Cann ve diğ., 1987).....	23
Şekil 2.13: Basit haplo-grup ağacı.....	25
Şekil 2.14: Haplo-grup analizleri sonucu çıkarılan göç yolları haritası.....	26
Şekil 2.15: Nif Dağı’nda bulunan kazı alanlarının konumu (Peker,2013).....	28
Şekil 3.1: Mezar içi örnekleme fotoğrafı.....	30
Şekil 3.2: <i>D-loop</i> bölgesinin çoğaltılması için tasarlanan primerlerin SnapGene programı ile oluşturulan mitokondri genomundaki haritası.....	33
Şekil 4.1: Mezardan alınan köpek dişi fotoğrafı.....	35
Şekil 4.2: Genedirex Taq Polimeraz ile yapılan deneme reaksiyonu.....	36

Şekil 4.3: Norgen Taq Polimeraz ile yapılan deneme reaksiyonu.....	37
Şekil 4.4: ROCHE High Fidelity Taq Polimeraz ile yapılan deneme reaksiyonu.	37
Şekil 4.5: <i>D-loop</i> bölgesinin ROCHE High Fidelity Taq Polimeraz ve Betain kullanılarak sekiz amplikonunun jel görüntüleri.	38
Şekil 4.6: BM37a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 1. amplikon dizisi.....	38
Şekil 4.7: BM37a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 2. amplikon dizisi.....	39
Şekil 4.8: BM37a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 3. amplikon dizisi.....	39
Şekil 4.9: BM37a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 4. amplikon dizisi.....	39
Şekil 4.10: BM37a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 5. amplikon dizisi.....	39
Şekil 4.11: BM37a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 6. amplikon dizisi.....	40
Şekil 4.12: BM37a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 7. amplikon dizisi.....	40
Şekil 4.13: BM37a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 8. amplikon dizisi.....	40
Şekil 4.14: BM37b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 1. amplikon dizisi.....	41
Şekil 4.15: BM37b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 2. amplikon dizisi.....	41
Şekil 4.16: BM37b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 3. amplikon dizisi.....	41
Şekil 4.17: BM37b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 4. amplikon dizisi.....	42
Şekil 4.18: BM37b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 5. amplikon dizisi.....	42
Şekil 4.19: BM37b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 6. amplikon dizisi.....	42
Şekil 4.20: BM37b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 7. amplikon dizisi.....	43
Şekil 4.21: BM37b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 8. amplikon dizisi.....	43
Şekil 4.22: BOM2a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 1. amplikon dizisi.....	43
Şekil 4.23: BOM2a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 2. amplikon dizisi.....	44
Şekil 4.24: BOM2a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 3. amplikon dizisi.....	44
Şekil 4.25: BOM2a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 4. amplikon dizisi.....	44
Şekil 4.26: BOM2a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 5. amplikon dizisi.....	44
Şekil 4.27: BOM2a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 6. amplikon dizisi.....	45
Şekil 4.28: BOM2a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 7. amplikon dizisi.....	45
Şekil 4.29: BOM2a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 8. amplikon dizisi.....	45

Şekil 4.30: BOM2b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 1. amplikon dizisi.....	46
Şekil 4.31: BOM2b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 2. amplikon dizisi.....	46
Şekil 4.32: BOM2b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 3. amplikon dizisi.....	46
Şekil 4.33: BOM2b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 4. amplikon dizisi.....	46
Şekil 4.34: BOM2b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 5. amplikon dizisi.....	47
Şekil 4.35: BOM2b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 6. amplikon dizisi.....	47
Şekil 4.36: BOM2b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 7. amplikon dizisi.....	47
Şekil 4.37: BOM2b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 8. amplikon dizisi.....	48
Şekil 4.38: KM17a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 1. amplikon dizisi.....	48
Şekil 4.39: KM17a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 2. amplikon dizisi.....	48
Şekil 4.40: KM17a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 3. amplikon dizisi.....	49
Şekil 4.41: KM17a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 4. amplikon dizisi.....	49
Şekil 4.42: KM17a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 5. amplikon dizisi.....	49
Şekil 4.43: KM17a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 6. amplikon dizisi.....	49
Şekil 4.44: KM17a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 7. amplikon dizisi.....	50
Şekil 4.45: KM17a örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 8. amplikon dizisi.....	50
Şekil 4.46: KM17b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 1. amplikon dizisi.	50
Şekil 4.47: KM17b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 2. amplikon dizisi.	51
Şekil 4.48: KM17b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 3. amplikon dizisi.	51
Şekil 4.49: KM17b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 4. amplikon dizisi.	51
Şekil 4.50: KM17b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 5. amplikon dizisi.	52
Şekil 4.51: KM17b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 6. amplikon dizisi.	52
Şekil 4.52: KM17b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 7. amplikon dizisi.	52
Şekil 4.53: KM17b örneğinin <i>d-loop</i> bölgesinin 8. amplikon dizisi.	53
Şekil 4.54: Neighbour-joining metodu ile çizilen evrimsel akrabalık ağacı.....	54
Şekil 5.1: Mitokondriyal H haplo-grubunun evrimsel ağacı (Achilli ve diğ., 2004).....	59

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Sıcaklık ve fragment uzunluğuna göre DNA'nın yarı-ömrü (Allentoft ve diğ., 2012).....	18
Tablo 3.1: <i>D-loop</i> bölgesinin çoğaltılması için tasarlanan primer listesi. (PB: Primer Boyutu, Tm: Primer Bağlanma Sıcaklığı, %GC: Guanin ve Sitozin nükleotidlerinin dizideki yüzdesi, ÜB: Ürün Boyutu, bç: Baz Çifti).....	32
Tablo 3.2: <i>D-loop</i> bölgesinin çoğaltımı için kullanılan PCR koşulları.....	34
Tablo 4.1: DNA izolasyonu sonrası yapılan spektrofotometrik ölçümlerin sonuçları.....	35
Tablo 4.2: <i>D-loop</i> bölgesi dizilerine göre yapılan haplo-grup tespitleri.	55

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler

Açıklama

C₁₄	: Radyokarbon
A	: Adenin
G	: Guanin
C	: Sitozin
T	: Timin
U	: Urasil

Kısaltmalar

Açıklama

aDNA	: Antik DNA
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
NGS	: Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing)
AMİ	: Anatomik olarak Modern İnsan
GC/MS	: Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi
bç	: Baz çifti
RFLP	: Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
HVR	: Yüksek Varyasyonlu Bölge (Hypervariable Region)
RE	: Restriksiyon Enzimleri
UV	: Ultraviyole
İndel	: İnsersiyon ve delesyon
PB	: Primer Boyutu
ÜB	: Ürün Boyutu
rCRS	: Revize Edilmiş Cambridge Referans Dizisi (revised Cambridge Reference Sequence)
LGM	: Son Buzul Çağı (Last Glacier Maximum)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

İNSAN İSKELETLERİNDE MİTOKONDRIYAL GENOM ANALİZİ VE HAPLO-GRUP TAYİNİ

Nefize Ezgi ALTINIŞIK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ercan ARICAN

Moleküler antropoloji, son yıllarda ilerleyen yüksek çıktılı dizileme teknolojileri sayesinde büyük bir hızla gelişen bir alandır. Antik DNA çalışmaları ile son yıllarda insanın biyo-kültürel evrimine dair önemli veriler elde edilmiştir. Türkiye’de bu alana ilgi son beş yılda artmış olsa da halen sınırlıdır.

Bu tez çalışmasında, İzmir İli Nif Dağı Kazıları’nın üç farklı bölgesi olan Karamattepe, Balıcaoluk ve Başpınar alanlarından çıkarılan üç farklı bireye ait iskeletlerden aDNA izolasyonları yapıldı. Elde edilen aDNA’ların mitokondriyal DNA *d-loop* bölgesi sekiz primer çifti kullanılarak “touchdown PCR” yöntemi ile çoğaltıldı. Çoğaltılan bölgeler sanger yöntemiyle dizilendi ve bu üç bireyin haplo-grupları biyoinformatik araçlar yardımıyla tespit edildi.

Bu çalışma, Türkiye’de gelecekte yapılacak antik DNA çalışmalarının önünü açacak nitelikte olması açısından önem arz etmektedir. Batı Anadolu’nun arkeolojik ve tarihsel kayıtlarını destekleyen bu tez, aynı zamanda disiplinler arası çalışmalara öncülük etme potansiyeli taşımaktadır.

Mart 2015, 79 sayfa.

Anahtar kelimeler: antik DNA, mitokondriyal DNA, haplo-grup, göç örüntüleri

SUMMARY

M.Sc. THESIS

MITOCHONDRIAL GENOME ANALYSIS AND HAPLO-GROUP DETERMINATION IN HUMAN SKELETONS

Nefize Ezgi ALTINIŞIK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Ercan ARICAN

Molecular anthropology has been dramatically enhanced recently by the development of high-throughput next generation sequencing technologies. Significant findings have been obtained in respects of bio-cultural evolution of human under favour of ancient DNA researches in recent years. In Turkey, even if giving consequence to this field has been increased for five years, it is still limited.

In this study, aDNA isolations were performed from three human skeletons which uncovered from three different site -Karamattepe, Ballicaoluk and Baspınar- of Nif Mountain Excavations in İzmir, Turkey. Mitochondrial DNA *d-loop* regions of obtained aDNAs were amplified by “touchdown PCR” using eight primer pairs. Amplified regions were sequenced by Sanger sequencing method and this three individuals haplo-groups were determined by using bioinformatic tools.

This study has importance to pave the way of ancient DNA researches that is going to conduct in the future in Turkey. This thesis that bears archeological and historical records out has also a potential to lead to interdisciplinary studies.

March 2015, 79 pages.

Keywords: ancient DNA, mitochondrial DNA, haplo-group, migration patterns

1. GİRİŞ

İnsan var olduğu süre boyunca merak eden bir canlı olmuştur. Dolayısıyla bilimin tarihi de en az insanlığın tarihi kadar eskidir. İnsanlığın ilk icatlarından biri olarak kabul gören alet kullanımı aynı zamanda beynin gelişim sürecine de büyük katkılar sunmuştur. Evrimsel süreç için kısa sayılacak yaklaşık 2 milyon yılda beynin biyokültürel evrimi bugünkü uygarlıkları kuracak seviyeye ulaşmıştır (Özbek, 2007).

Son 2 milyon yılda insanın antropolojik tarihi büyük değişimleri kayıt altına almıştır. Bu değişimler çoğunlukla birbirine sıkı sıkıya bağlıdır. Bipedal (iki ayak üzerinde) yaşama geçiş, alet yapma, el-göz koordinasyonunun sağlanması, iletişim becerilerinin sistematik hale gelmesi ve beynin evrimi insanın biyokültürel evriminde köşe taşlarıdır (Morgan ve diğ., 2015).

Canlılığın kalıtsal materyali eski çağlardan beri bilimin konusu olmuştur. DNA'nın moleküler yapısı bilim tarihi içerisinde çok kısa bir süre önce tanımlanmış olsa da daha önceleri genetik materyal olarak birçok tanımlama yapılmıştır. Bu tanımlardan en ünlüsü Mendel'in bezelyelerle yaptığı deneylere dayanmaktadır, ancak en ilgi çekici tanım, Erasmus Darwin'e aittir: "Hayvanlar var olmadan çok önce, karalar ve okyanuslar muhtemelen bitki toplulukları ile dolu olduğundan ve bu hayvan soylarından çok daha önce başka hayvan soyları da yaşamış olduğuna göre, tek ve aynı tür canlı ipliğinin, tüm organik hayatın nedeni olduğunu ve olmaya devam ettiğini varsayabilir miyiz?" (Ridley, 2007)

Canlıların evrimine dair görüşler tarih boyunca birçok düşünür tarafından öne sürülmüştür. Ancak bunu ilk olarak sistematik şekilde eşzamanlı olarak ortaya koyan Charles Robert Darwin ve Alfred Russell Wallace olmuştur (Ertan, 2010). 1859'da yayınladığı *Türlerin Kökeni* adlı kitabında, Darwin, HMS Beagle gemisiyle çıktığı 5 yıl süren yolculuğa dair gözlemlerini ayrıntılı biçimde anlatmış ve türlerin evrim mekanizmalarına dair ilk çarpıcı hipotezi ortaya atmıştır (Moorehead, 2005). Ortaya attığı doğal seçilim hipotezi ortam koşullarına adapte olamayan canlıların popülasyondan elenmelerine dayanır ve bu şekilde popülasyon ortama uyum sağlar (Darwin, 1859).

Darwin'in evrim teorisinde eksik olan nokta, bu adaptasyonun nasıl bir kalıtım mekanizmasıyla sağlandığıdır. Kalıtımın mekanizması ile ilgili önemli ipuçları aslında, 1865'te Mendel tarafından ortaya konmuştur. Bezelye bitkisi üzerine yaptığı çalışmalarda Mendel, bağımsız ayrışımın kalıtım mekanizmasını ortaya koymuştur. Dominant ve resesif alleller kavramlarıyla açıkladığı kalıtım mekanizmasında, genotipin fenotipe yansımalarını ayrıntılı biçimde açıklamıştır (Mendel, 1865). Kalıtım materyalinin kimyasal yapısı ise 1953'te Rosalind Franklin'in çektiği X ışını fotoğrafı ile ortaya çıkmıştır (Franklin ve Gosling, 1953). Söz konusu fotoğrafı yorumlayan James Watson ve Francis Crick, DNA'nın sarmal yapısını ilk kez modellemişler (Watson ve Crick, 1953) ve *Nature* dergisinde yayınlanan bu çalışma ile daha sonra Nobel ödülü almışlardır.

20. yüzyılda DNA ile yapılan çalışmalar hızla ilerlemiş, birçok farklı alana yayılmıştır. Teknolojik birikim ve donanım da bu çalışmalara paralel olarak artmış, bu sayede dizileme teknolojileri gelişmiş ve canlıların tüm genom dizileri saptanmaya başlamıştır. 20. yüzyılın son çeyreğinde ise artık insan genomunun dizilenmesi konuşulmaya başlanmış, büyük bütçelerle İnsan Genom Projesi hayata geçirilmiş ve ilk taslak sonuçları 2001 yılında açıklanmıştır (Rajan, 2012). Bugün DNA teknolojisi sentetik organizma üretiminden (Pennisi, 2010) veri depolamaya (George ve diğ., 2012) kadar birçok alanda kullanılmaktadır.

Antik DNA (aDNA) çalışmaları ise bu tariheye paralel olarak ilerlemiştir. İlk olarak Higuchi ve arkadaşları (1984) tarafından soyu tükenmiş güney afrika zebrasının bir alt türüne ait olan iskeletin DNA'sı izole edilmiş, daha sonra ise Pääbo (1985) tarafından Mısırlı bir mumyaya ait DNA parçası bakteriye klonlanmıştır. Ancak az miktarda ve kalitesiz olan bu DNA, bakteriden geri izole edilememiştir. Mullis'in (1987), DNA'yı enzimatik olarak *in vitro* ortamda çoğaltmayı sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemini bulması ile aDNA'lardan da sayısız miktarda kopya elde edilebilmesinin önü açılmıştır (Hagelberg ve diğ., 2015). Antik DNA çalışmaları, taksonomide, adli tıpta, soyu tükenmiş türlerin biyolojik adresinin tespitinde, göç örüntülerinin belirlenmesinde ve sıklıkla evrim çalışmalarında bilim dünyasına önemli katkılar sunmaktadır (Pääbo ve diğ., 2004).

Ökaryotik hücrelerde bulunan mitokondri genomu, yüksek kopya sayısı, ana-yanlı kalıtım göstermesi, rekombinasyona uğramaması ve belli bölgelerinde görece yüksek

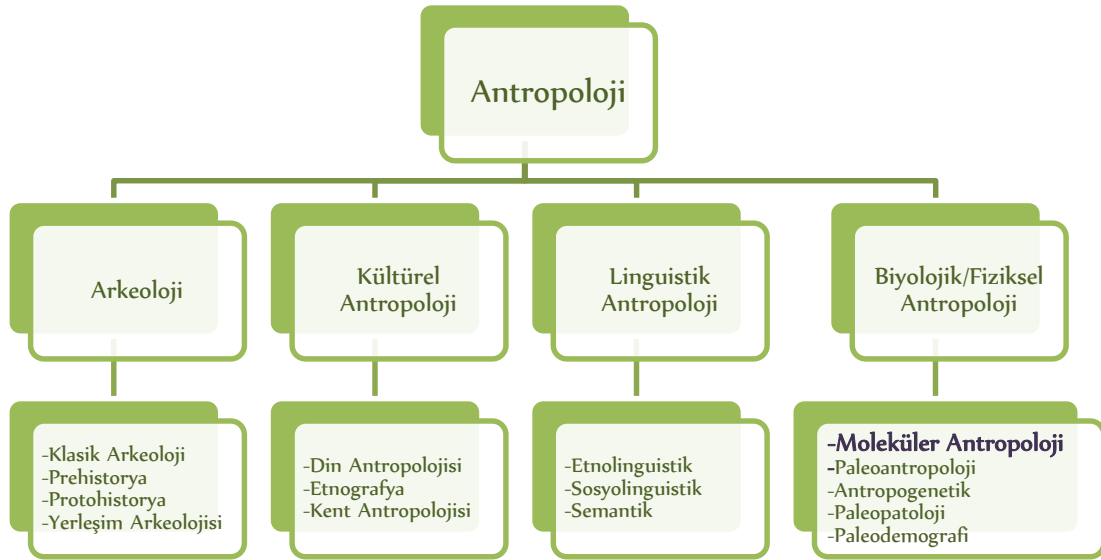
mutasyon oranı gibi nedenlerle aDNA çalışmalarında kullanılan önemli bir materyaldir (Pakendorf ve Stoneking, 2005). Özellikle paleogenomik alanındaki çalışmalarda yapılan mtDNA analizleri ile topluluğun göç yollarından popülasyonlarının büyüklüğüne kadar pek çok bilgiye erişilebilmektedir (Shapiro ve Hofreiter, 2014).

Bu tez çalışmasında, İzmir ili Nif Dağı Kazı alanından çıkarılan insan iskeletlerinden mitokondriyal genom *d-loop* bölgesi dizilenerek haplo-grup tespitinin yapılması ve bölgeye dair göç yollarının aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilecek verilerin, bölgede sürmekte olan kazı çalışmalarının çıktılarıyla birlikte bölgenin tarihsel geçmişinin aydınlatılmasına anlamlı katkılarda bulunacağı öngörülmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

Amerikan Antropoloji Birliği, antropolojiyi insanlığı geçmişten bugüne inceleyen bilim dalı olarak tanımlar¹. Antropoloji biliminin en önemli özelliği insanı biyolojik ve kültürel bir varlık olarak bütüncül bir bakış açısıyla incelemesidir. Modern Amerikan antropolojisinin kurucusu ünlü antropolog Franz Boas, antropolojiyi dört ana dala ayırmıştır (şekil 2.1) (Kottak, 2014).

- i. Arkeoloji: Maddi kalıntılar yoluyla insanın kültürel tarihini inceleyen bilim dalı.
- ii. Kültürel Antropoloji: Toplumlar arasındaki kültürel çeşitliliği kültürleri gözlemleyerek inceleyen bilim dalı.
- iii. Linguistik Antropoloji: İnsanlık tarihinde var olan dillerin yayılımını ve birbirleriyle olan evrimsel ilişkilerini inceleyen bilim dalı.
- iv. Biyolojik/Fiziksel Antropoloji: İnsanı ölçülebilen ve ölçülemeyen özelliklerine göre inceleyerek, bireyler ve toplumlar arasındaki evrimsel bağlantıları ortaya koyan bilim dalı.



şekil 2.1: Antropolojinin alt dalları.

Bu dört bilim dalı birbirleriyle derinlemesine ilişkilidir ve her biri alt dallara ayrılmıştır. İçerisinde insanı barındıran her olgu antropolojinin konusu olabilmektedir. Tüm bu

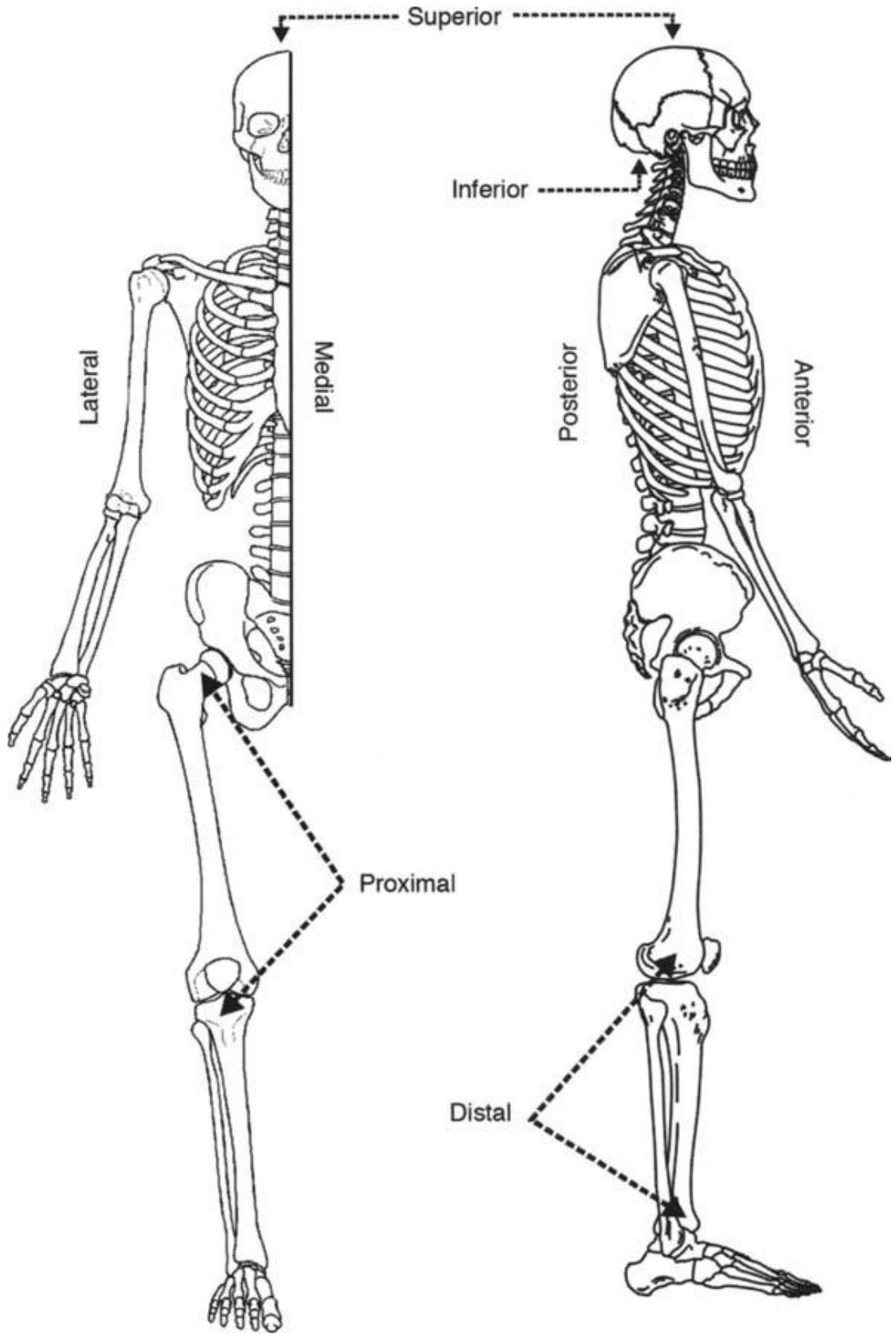
¹ <http://www.aaanet.org/about/WhatisAnthropology.cfm>

özellikleriyle antropoloji, hem doğa bilimlerine, hem yaşam bilimlerine, hem de sosyal bilimlere katkılar sunar (Eriksen ve Nielsen, 2011).

Arkeolojik kazılardan çıkarılan biyolojik materyaller sağlık, beslenme, genetik ilişkiler, mikro-evrim ve popülasyonun demografik özelliklerine (yaş, cinsiyet, vd.) dair önemli veriler sunmaktadır (Buikstra ve Ubelaker, 1994). Biyolojik antropologlar için özellikle yaşayan ve soyu tükenmiş olan insan ve insansı (hominin) iskeletlerinin incelenmesi büyük öneme sahiptir. Söz konusu iskeletlerde yapılan paleopatolojik çalışmalarda kemikte iz bırakan kanser, anemi, osteoporoz, raşitizm gibi hastalıklar ile çeşitli yaralanmalar ve kemik travmaları (kırılma, çatlama vb.) tespit edilebilmektedir (Kottak, 2014)

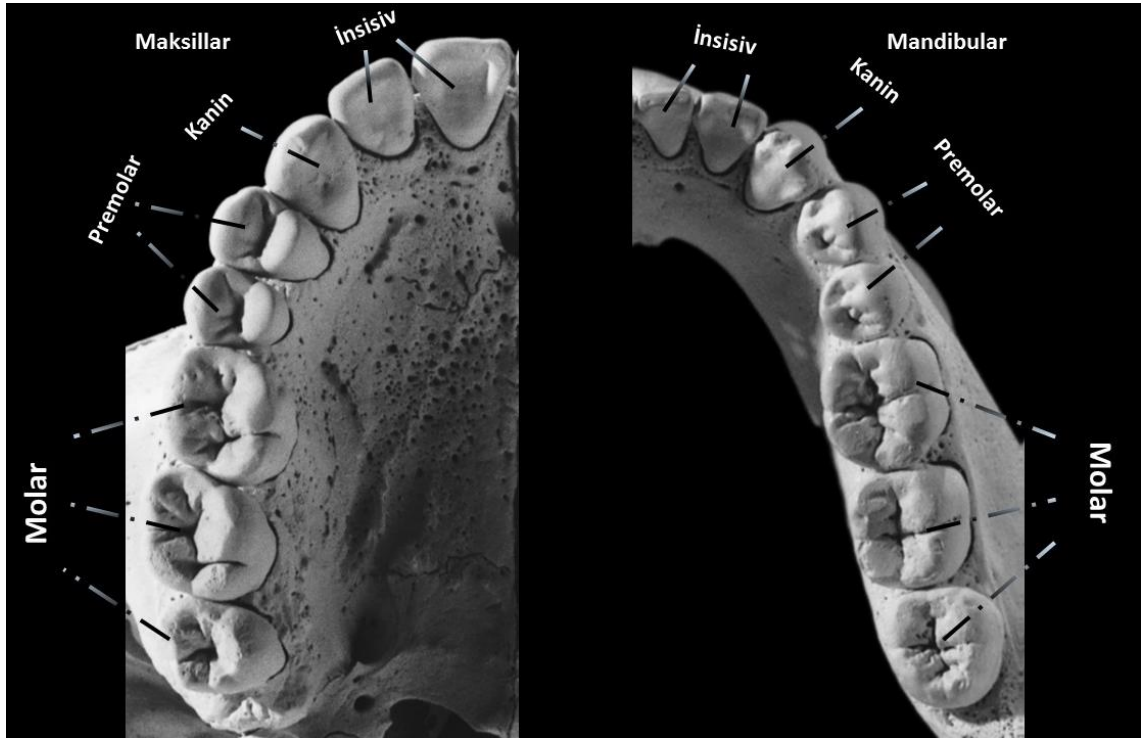
Bahsi geçen teknikler, sadece kemiğin dokusundan değil, aynı zamanda bir bütün olarak iskelet anatomisinin osteometrik özelliklerinden yararlanarak uygulanır. Osteometrik teknikler, iskeletlerde referans alınan belirli noktaların ölçülmesine dayanır. Bu ölçümler bireyin cinsiyetini, yaşını, yaşam biçimini, beslenme şekillerini, geçirdiği bazı hastalıkları ve travmaları ortaya koyar. Bunun dışında, fiziki antropologlar yumuşak dokudaki referans noktalarını kullanarak oksikolojik çalışmalar yaparlar. Antropometri adı verilen bu alan, yine adli bilimlerde maktülün ölüm şeklinin veya şüphelinin kimliğinin tespiti gibi konularda uygulama alanına sahiptir.

İnsan iskeletinde normal koşullarda 206 adet kemik bulunur. Çeşitli varyasyonlar sonucu bu sayı artabilir veya azalabilir. Kemikler, sinir sistemine bağlı aksiyal olanlar ve bunun dışındakiler apendikular olmak üzere iki grupta incelenir. Aksiyal iskelet genel olarak, kafatası (nörokranium), yüz kemikleri (splanknokranium), omurlar (vertebra) ve kaburgalardan (kosta) oluşur. Apendikular iskelet ise, alt ve üst ekstremiteler, kalça kemiği (pelvis), kürek kemiği (skapula) ve köprücük kemiğinden (klavikula) oluşur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Anatomik pozisyondaki insan iskeletinin anterior ve lateral yönlerden görünümü. Superior: Üst; Inferior: Alt; Posterior: Arka; Anterior: Ön; Medial: Merkezi; Lateral: Yan; Proksimal: Yakın; Distal: Uzak (Adams ve Crabtree, 2008).

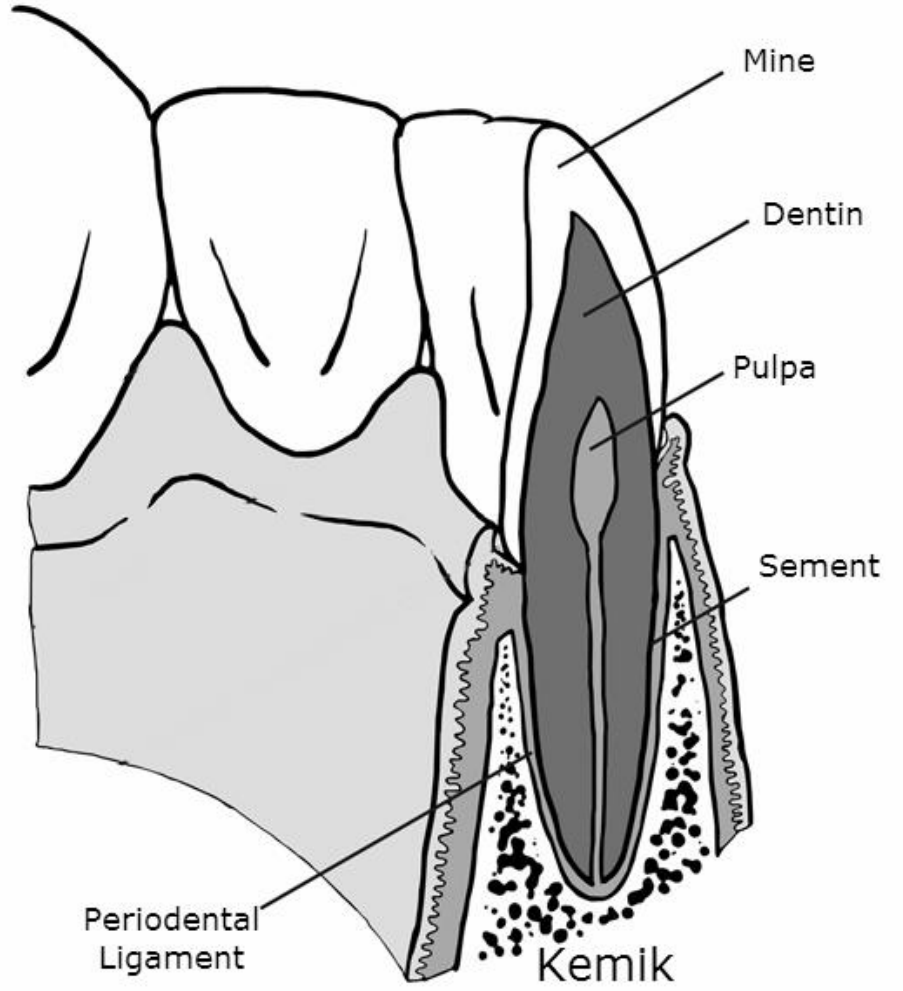
İnsan vücudunda bulunan bir diğer sert doku ise dişlerdir. Histolojik yapısı kemik dokudan farklı olduğundan ayrı sınıflandırılırlar. Normal erişkin bir bireyde, 4 adet kesici diş (insisiv), 4 adet köpek dişi (kanin), 8 adet küçük azı dişi (premolar), 12 adet büyük azı dişi (molar) olmak üzere 32 adet diş bulunur. Bu dişlerin 16 tanesi üst çenede (maksillar), 16 tanesi de alt çenede (mandibular) gömülü haldedir ve merkezden distale doğru simetrik dizilmiştirlerdir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Maksillar (solda) ve mandibular (sağda) çene yarıları (White ve diğ., 2012).

Evrimsel süreçte, 20'lik dişler olarak bilinen 3. molar (M3) dişler körelmeye başlamıştır. Bu nedenle tüm bireylerde rastlanmaz. Diş klinik olarak taç, boyun ve kök olmak üzere üç kısımdan oluşur. Taç, dişin en dışta görünen kısmı; boyun, diş etiyle kaplı bölüm; kök ise kemiğin alveolüne yerleşen, kemikle kaplı bölümdür.

Dişin histolojik yapısı ise toplamda 4 tabakadan oluşur. Bunlardan mine, dentin ve sement dişin sert tabakalarını oluştururken, pulpa diş özü denilen dişin tek yumuşak tabakasını oluşturur. Pulpa, dişte kan damarları ve sinirleri içeren tek tabakadır ve bu tabaka, dişin, hücreler dolayısıyla DNA'yı içeren tek bölümüdür.



Şekil 2.4: Dişin histolojik yapısı (Hillson, 2005).

Shapiro (2013) aDNA'yı, yüzyıldan yüzbinlerce yıla kadar korunmuş organizma kalıntılarında izole edilebilen DNA dizi verilerini kullanan, moleküler evrimsel biyoloji alanı olarak tanımlar. Antik DNA araştırmalarında kullanılan materyaller korunma oranı yüksek olduğundan, genellikle diş ve kemikler, bazen de koprofitlerdir. Ancak özellikle buzullarda bulunan canlı kalıntılarında zaman zaman yumuşak doku ve saç örneklerine de rastlanabilmektedir. Buradan yola çıkarak yapılan çalışmalarda bu örneklerden de kaliteli DNA elde edilebileceği gösterilmiştir (Ermini ve diğ., 2008; Rasmussen ve diğ., 2010).

Antik DNA alanında yapılan ilk çalışma, Allan Wilson'un Kaliforniya Üniversitesi'ndeki laboratuvarında Higuchi ve arkadaşları (1984) tarafından yapılmıştır. 1984'te Nature dergisinde yayınlanan bu çalışmada, 1883'te soyu tükenen bir güney afrika zebrasının (*Equus quagga*) 140 yıllık müze örneği kullanılmıştır. Söz konusu çalışma ölü bir dokudan elde edilen DNA ile yapılmış ilk çalışmadır (Shapiro, 2013). Bu çalışmanın en önemli çıktısı, korunmuş dokuların çoğaltılabilir DNA içerebileceğinin ortaya konmuş olmasıdır. Ayrıca bu çalışmada post-mortem (ölüm sonrası) dönemde çok az miktarda DNA'nın korunabildiği gösterilmiş ve yayınlandığı dönemde çalışma, bilim dünyasının ilgisini üzerine çekmiştir. İzole edilen DNA parçası başarılı olarak çoğaltılmasa da çalışmaya büyük önem atfedilmiştir. Bunu takiben, Svante Pääbo (1985) tarafından 2400 yıllık Mısırlı bir bireye ait mumyanın *Alu* gen ailesine ait tekrarlı iki bölgesi çoğaltılmıştır. Çalışmasında Pääbo, 23 farklı bireye ait mumya örneklerinden DNA izole etmeye çalışmış, ancak bu örneklerden sadece bir tanesinden aDNA izole edebilmiştir. Başarılı örnek üzerinde yapılan analizler, post-mortem dönemde DNA'da meydana gelebilecek değişimlere dair önemli veriler sunmuştur. 1980'lerin sonunda PCR yönteminin bulunmasıyla birlikte moleküler biyoloji alanında yeni bir dönem başlamıştır. Nükleik asitlerin enzimatik reaksiyonlarla *in vitro*'da çoğaltılması temeline dayanan bu yöntem ile az miktarda ve parçalanmış halde bulunan antik DNA'lar çok kısa sürede, oldukça fazla miktarda çoğaltılabilmektedir.

Antik DNA çalışmalarının ikinci on yılı izolasyon ve analiz yöntemlerindeki teknik gelişmelerin dönemi olmuştur. Bu dönemde koprolitler, kemikler, dişler ve polenler gibi çok sayıda farklı kaynaktan ve tembel hayvan, buz çağı ayıları, filler, moalar gibi birçok farklı canlı türlerinden örnekler kullanılmıştır. 1990'ların ikinci yarısı, aDNA'da önemli bir gelişmeye sahne olmuştur. 1997'de *Cell* dergisinde yayınlanan Pääbo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ilk kez soyu tükenmiş bir insan türü olan Neandertal (*Homo neanderthalis*) örneği kullanılarak elde edilen DNA fragmenti dizilenmiştir. Bu çalışmadan sonra çeşitli hominid kalıntılarının dizilenmesi ile eski insan popülasyonlarına dair veriler elde edilmiştir (Ovchinnikov ve diğ., 2000; Caramelli ve diğ., 2003; Haak ve diğ., 2005; Adcock ve diğ., 2011).

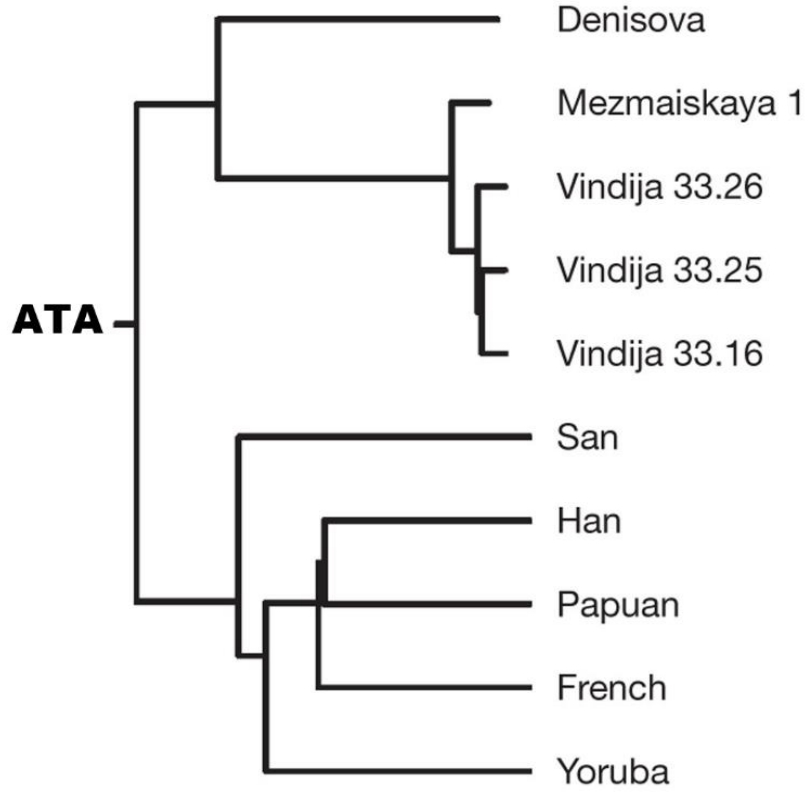
Antik DNA çalışmalarının son on yılı DNA dizileme yöntemlerindeki logaritmik hızdaki gelişmelerle paralellik göstermiştir. İlk yirmi yılda eski örneklerden hiçbir zaman tüm

genom analizi yapılamayacağı düşünülürken son on yılda antik genomik kavramı literatüre girmiştir. Yeni nesil dizileme (NGS) tekniği ilk olarak 2006 yılında mamut DNA'sına uygulanmıştır. Bu çalışmada tüm mitokondriyal genom analizi yapılmıştır. Birkaç yıl sonra, Rassmussen ve arkadaşlarının (2010) Antarktika'da Qeqertasusuk bölgesinde bulunduğu bir paleo-Eskimo bireyinin iyi korunmuş saç örneğinden izole ettiği DNA bu popülasyona dair önemli bilgiler vermiştir. Bu çalışmada, yaklaşık 4000 yaşında bir erkekte yüksek oranda korunmuş 353151 adet tek nükleotid polimorfizmi (SNP) tespit edilmiş, bu bireyin Avrupa halklarıyla akraba olmadığı ortaya çıkmıştır. Bölgeye yaklaşık 5500 yıl önce Sibiry'a'dan göç edildiği anlaşılmış ve modern yerli Amerikalılar ile Inuit halkının buradan kökenlendiği tespit edilmiştir. Bu çalışmadan birkaç ay sonra, ilk Neandertal genomunun taslağı yayınlanmış ve bu dönemden sonra farklı türlere ait bireylerin genomları kısa sürelerde dizilenmiştir. Bu çalışmalardan en önemlisi yeni bulunan bir homininin DNA analizidir. Reich ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada, Sibiry'a'nın kuzeyinde Denisova Mağarasında bulunan iki farklı bireye ait bir parmak kemiği ve sol maksillar M3 kullanılarak DNA analizi yapılmıştır. Söz konusu kalıntılar, mağarada 50 bin ile 30 bin yıl öncesine tarihlenen 11. kültür katmanında bulunmuştur. Etrafında bulunan aletler anatomik olarak modern insanla (AMİ) ilişkilendirilen "Üst Paleolitik Endrüstrisi"ne ait olmakla birlikte erken dönem Orta Paleolitik'e dair karakteristik özellikleri de taşımaktadır. Radyokarbon (C_{14}) analizlerine göre, mağaranın iki farklı dönemde homininler tarafından yerleşke olarak kullanıldığı düşünülürken, Denisova insanına ait parmak kemiği ve dişin ilk yerleşen hominin grubuna ait olduğu tahmin edilmektedir.

Antik DNA analizleri, Denisova insanının Neandertallerle AMİ'den daha çok yakınlık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, bu iki hominin popülasyonu kardeş gruplar olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.5). Biyolojik olarak ayrılmalarından sonra, Neandertaller ve Denisovalılar birbirinden farklı popülasyon tarihine sahip olmuşlardır. Araştırmacılara göre bunu gösteren birkaç kanıt vardır (Reich ve diğ., 2011):

- i. Neandertallerin değil ama Denisovalıların bugünkü Malinezyalıların atalarıyla gen alış-verişi yaptığı gösterilmiştir.
- ii. Neandertaller bugünkü Avrasyalı insanlarla benzer allel paylaşım örüntülerine sahipken, Denisovalılar tamamen farklı örüntülere sahiptir.

- iii. Neandertallerin popülasyon içi çeşitliliğinin az olması, popülasyonun bir ya da birkaç kez darboğaz etkisine maruz kaldığını göstermektedir.
- iv. Denisovalıların diş morfolojisi Neandertallerle benzerlik göstermemektedir.



Şekil 2.5: Otozomal DNA dizilerine göre biyolojik yakınlık ağacı. Vindija 33.16, Vindija 33.25, Vindija 33.26 ve Mezmaiskaya 1 örnekleri farklı Neandertal bireylerine, San, Han, Papuan, French ve Yoruba günümüz yaşayan insanların farklı popülasyonlarına aittir. (Reich ve diğ., 2010).

Sonuç olarak Denisovalılar, coğrafi olarak Avrupa'da yaşayan Neandertallerle aynı atayı paylaşan, çağdaş Asyalı bir popülasyondur. Denisova araştırmaları ayrıca Üst Pleistosen hominin evriminde, farklı gruplar arasında gen akışıyla sık sık karşılaşıldığını göstermektedir (Reich ve diğ., 2011).

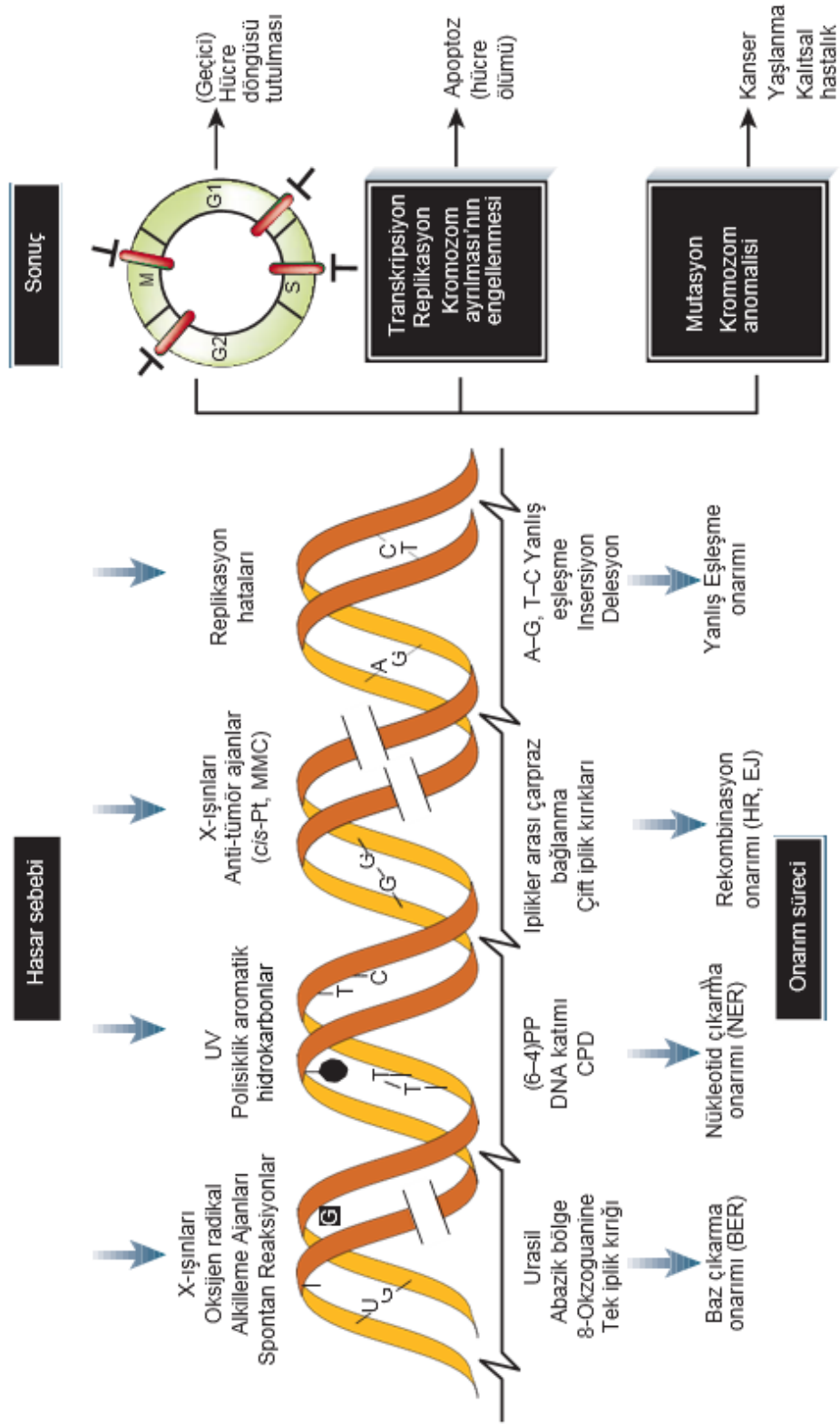
Tüm bu çalışmalar, modern insanın kökeni hakkında birçok soruyu cevaplamanın yanı sıra insanın diğer insansılarla ilişkisi, soyu tükenmiş türlerin ekolojisi gibi birçok

çalışmaya da katkıda bulunmaktadır (Shapiro ve Hofreiter, 2014). Patojenlerle yapılan çalışmalarda birlikte evrim yaklaşımı kullanılarak insanın göç örüntüleri çıkarılmış (Monot ve diğ., 2009) ve yine popülasyon genomu yöntemi ile popülasyonlar arası göçler, diğer türlerle karışmalar, bitki ve hayvanların evcilleştirilmesine dair veriler elde edilmiştir (Parks ve diğ., 2015).

Kısa bir süre öncesine kadar aDNA çalışmalarının bugün bulunduğu noktaya gelebileceği tahmin edilemezken, teknolojiye meydana gelen önemli gelişmeler sayesinde aDNA'nın gelecekte yeni bir bilimsel devrimi yaratacağı öngörülmektedir (Der Sarkissian ve diğ., 2015). Özellikle yapılan genomik çalışmaların sunduğu sonuçların birikmesiyle birlikte paleogenomik alanının, daha önce yaşamış olan farklı türlerdeki popülasyonlara dair önemli bir boşluğu dolduracağı tahmin edilmektedir. Bu popülasyonların iklim değişimine katkıları ve koruma biyolojisinde aDNA verilerinin kullanımı gibi konular şimdiden bilim dünyasının ilgisini çekmektedir (Shapiro ve Hofreiter, 2014). Biriken bu verilerin sunduğu, yüksek çözünürlüklü genomik haritaların bir sonraki aşamada popülasyonların antik epigenetik etiketlerini ve nükleozom haritalarını ortaya koyabileceği düşünülmekte ve işlevsel genomik yaklaşımıyla antik örneklerle ait genlerin yeniden canlandırılabilirliği ve paleoproteomik alanına kapı aralayabileceği öngörülmektedir (Der Sarkissian ve diğ., 2015).

Moleküler antropoloji, son 30 yılda hızla gelişmiş olsa da hala bazı sınırlamalara sahiptir. Bu sınırlamalardan en önemlileri; DNA'nın yıllar içinde bozularak parçalara ayrılması ve yüksek oranda kontaminasyon riskine sahip olmasıdır. Bu sınırlamaları ortadan kaldırmak için çalışmalar sürmekte ve son yıllarda çeşitli yaklaşımlarla bu sorunlar hızla çözülebilmektedir (Shapiro ve Hofreiter, 2012).

DNA'da meydana gelen hasarlar, replikasyon sırasında DNA polimerazlar veya sonrasında hücrede bulunan onarım enzimleri aracılığıyla düzeltilmektedir (Karp, 2009). Hücre döngüsü içerisinde DNA hasarları, hücre içi kontrol mekanizmaları aracılığıyla tespit edilerek söz konusu hasarın düzeltilemeyecek olması durumunda programlı hücre ölümü (apoptoz) süreci başlatılmaktadır. Dolayısıyla DNA'nın dinamik bir yapı olması nedeniyle hasarlar meydana gelmesi normal bir süreçtir ve canlı hücrelerde bu durum sıkı bir kontrol mekanizmasıyla denetlenmektedir (Alberts ve diğ., 2001; Hoeijmakers, 2001) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: DNA onarım mekanizmaları (Hoeijmakers, 2001).

Ancak, yaşamsal faaliyetlerini sonlandırmış olan hücrelerde DNA'da meydana gelen hasarları düzeltecek mekanizmalar işlev göremez. Bu süreçte içsel etkilerle DNA hasarları meydana gelir ve hücrenin ölümü sonrasında hücresel yapı kaybolmaya başlar. Hücre ve organel zarları hızla parçalanır, lizozom gibi proteaz benzeri enzimleri yapısında bulunduran organellerin içeriği açığa çıkarak hücrenin yapısını, dolayısıyla DNA'sını da parçalar (Pääbo, 2014).

Post-mortem dönemde DNA hasarına sebep olan dışsal etkenlerden bazıları; radyasyon, toprakta meydana gelen kimyasal tepkimeler ve mikroorganizmalardır. DNA hasarının düzeyi organizmanın yaşamsal faaliyetlerinin sonlandığı zamana göre değişebilmektedir. Bazların kimyasal yapısında meydana gelen değişimler ve iplik kırılmaları gibi büyük hasarlar DNA'dan elde edilebilecek bilgileri en aza indirmektedir.

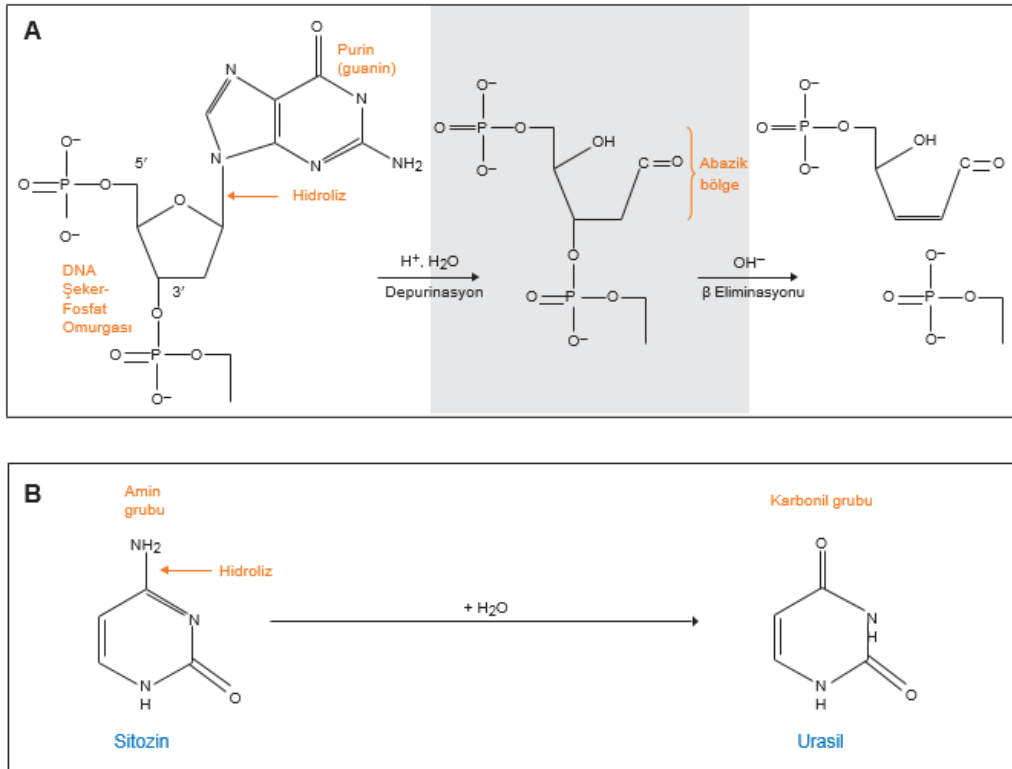
DNA'da meydana gelen hasar tiplerinden en önemlisi DNA'nın parçalara ayrılmasıdır (fragmentasyon). Yapılan çalışmalar, antik örneklerden elde edilen DNA'nın küçük fragmentler halinde bulunduğunu göstermektedir. Bu fragmentasyonun sebebi, çeşitli biyokimyasal tepkimeler sonucu fosfat-şeker omurgasını oluşturan fosfodiester bağlarında meydana gelen kopmalardır. Söz konusu kopmalar, pürin bazlarının hidrolizi sonucu şekerden ayrılması ile oluşan depürinasyon, bunu takiben β -eliminasyon tepkimeleriyle ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.7A) (Dabney ve diğ., 2013). Depürinasyon adenin (A)'den ziyade guanin (G)'de meydana gelir, bunun sebebi, G'nin N-glikozil bağını kırmak için daha düşük aktivasyon enerjisine ihtiyaç duyulmasıdır (Orlando ve diğ., 2011).

Bir diğer hasar tipi ise, pirimidinlerin peroksit, hidrojen peroksit ve hidroksil gibi serbest radikaller tarafından okside edilmesidir. Pirimidin bazlarının oksidasyonu sonucu, 5-hidroksi-5-metil hidantoin ve 5-hidroksihidantoin oluşmaktadır. Bu iki oksidasyon ürünü polimerazların, DNA'ya bağlanmasını engelleyerek ve bağlanmış polimerazın DNA üzerinde ilerlemesini durdurarak çoğalmayı imkânsız hale getirmektedirler (Dabney ve diğ., 2013).

DNA'da meydana gelen çapraz bağlar da benzer şekilde DNA polimerazı durdurarak çoğaltımını engellemektedirler. Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GC/MS) ile yapılan çalışmalara göre furanonlar, furaldehitler ve alkil-pirazinler nükleik asitler gibi

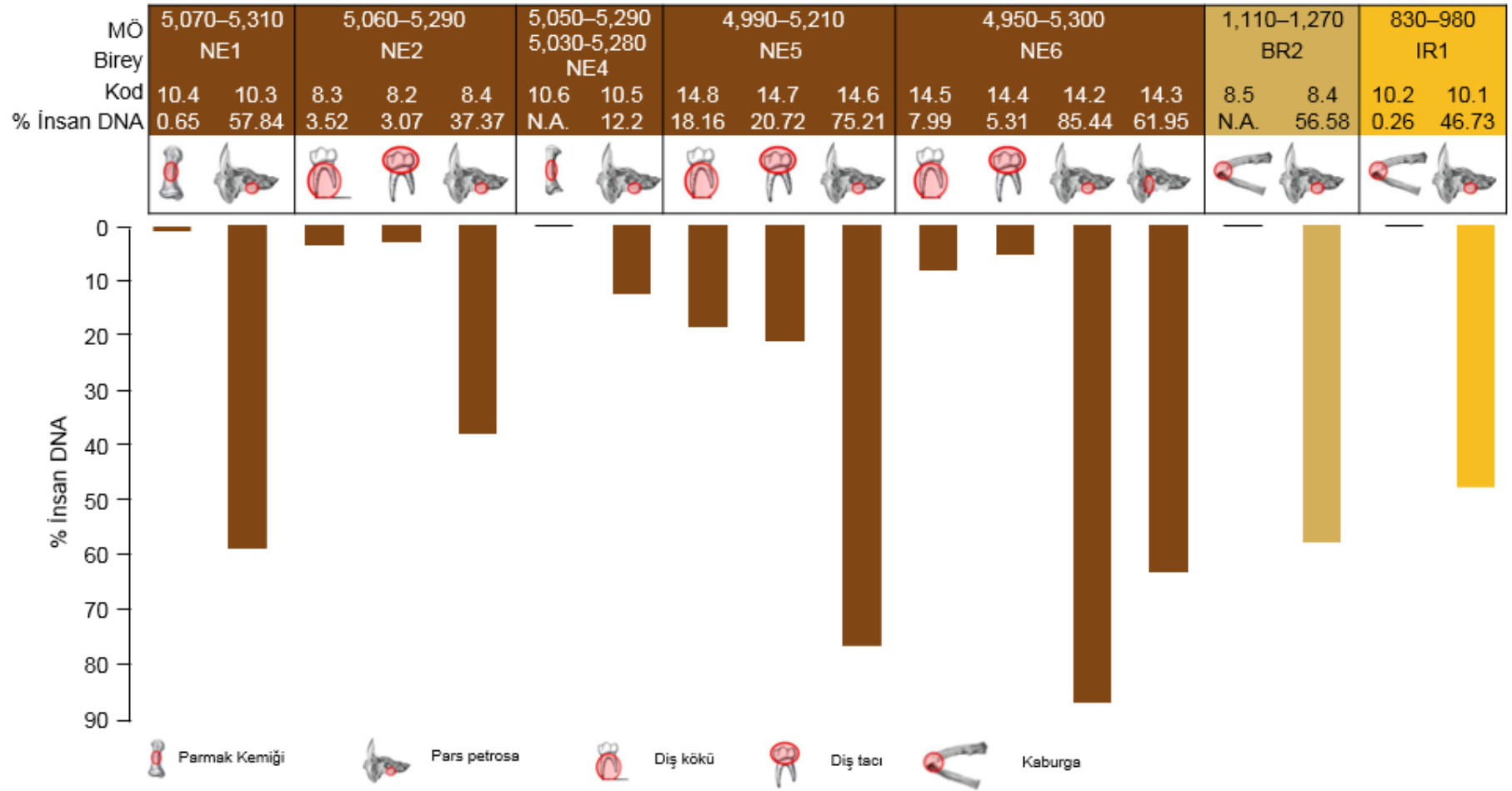
makro moleküllerde çapraz bağların oluşmasına sebep olmaktadır (Pääbo ve diğ., 2004).

Bazı hasar türleri ise DNA çoğaltımı sırasında yanlış eşleşmelere sebep olurlar. Doğru eşleşmenin önemli koşullarından biri DNA polimerazın kalıp zinciri doğru okumasıdır. Bazlarda meydana gelen modifikasyonlar polimerazın kalıp zinciri doğru okumasını engellemektedirler. Bu modifikasyonların en sık rastlanana sitozin (C) deaminasyonudur (Şekil 2.7B) (Pääbo, 2014). Bu tepkimede C’de bulunan amin grubu hidrolize uğrayarak karbonil grubunu oluşturmakta ve oluşan yeni ürün urasil (U) olmaktadır. Urasil, C’ye göre daha kararsızdır ve iplik kırılmalarına yol açarak fragmentasyona neden olmaktadır. Değişimler genellikle DNA parçalarının uçlarında görülmektedir (Dabney ve diğ, 2013). İplik kırılmalarının meydana gelmediği durumda çoğalma gerçekleşebilir. Ancak U, G yerine A ile eşleşeceğinden sonuçların yanlış yorumlanmasına sebep olur. Daha az görülmekle birlikte A’nın deaminasyon sonucu hipoksantine dönüştüğü, bunun da yanlış eşleşmelere sebep olduğu rapor edilmiştir (Briggs ve Heyn, 2012).



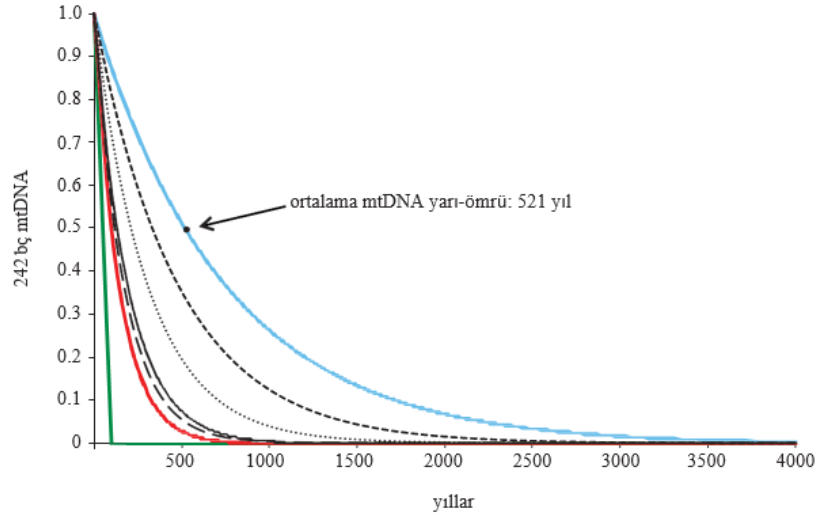
Şekil 2.7: Antik DNA'da meydana gelen hasar tipleri. a) Abazik bölge oluşumu ile fragmentasyon. b) Sitozin nükleotidinin Urasil'e dönüşümü (Dabney ve diğ., 2013).

Organizmanın bazı bölümlerinde bulunan hücrelerdeki DNA'lar yukarıda anlatılan süreçlerden bağımsız varlıklarını sürdürebilmektedirler. DNA'nın bozulması sürecinde meydana gelen tepkimelerin birçoğu için suya ihtiyaç duyulmaktadır (Şekil 2.7). Suyun olmadığı ortamlarda ise bu tepkimeler gerçekleşmediğinden, ölümden hemen sonra hızla kurumuş ya da donmuş örneklerde, DNA hasarı düşük seviyede kalabilmektedir. Örneğin, mumyalama sırasında organizmada var olan su uzaklaştırıldığından bu örneklerden az hasarlı DNA elde etme oranı yüksektir (Pääbo, 2014). Bazı durumlarda ise ortam koşulları nedeniyle organizma doğal mumyalamaya maruz kalmıştır ve bu duruma en iyi örnek Buz Adam Ötzi'dir. Vücudun bazı kısımları dış ortamdaki nispeten izole olduğundan dolayı bu örneklerde DNA hasarına çok az rastlanmaktadır (Rollo ve diğ., 2002). Örneğin, dişler histolojik yapısı gereği sert bir mine tabakasına sahip olduğundan, diş pulpasında kalan DNA'nın nispeten kaliteli olduğu bildirilmektedir. Vücudun çeşitli bölgelerinde yapılan çalışmalarda en yüksek miktarda DNA elde edilen örneklerin, diş ve kafatasını oluşturan temporal kemiğin *pars petrosa* bölümü olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.8) (Gamba ve diğ., 2014).



Şekil 2.8: Farklı kaynaklardan izole edilen DNA miktarlarının karşılaştırılması (Gamba ve diğ., 2014).

Çevresel koşullar ne kadar uygun olursa olsun, yapılan çalışmalarda DNA'nın birkaç yüz bin yıldan fazla varlığını sürdüremeyeceği düşünülmektedir. Allentoft ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışmada, 242 bç'lik mtDNA parçasının ortalama yarılanma ömrünün 521 yıl olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: 242 bç mtDNA molekülünün yıllar içinde bozulma grafiği (Allentoft ve diğ., 2012).

DNA parçasının boyutu kıaldıkça yarılanma ömrü de artmaktadır (Tablo 2.1). Örneğin, -5 °C'de saklanan 30 bç'lik bir DNA molekülünün yarılanma ömrünün 158 bin yıl olduğu hesaplanmıştır. Yapılan hesaplamalara göre teorik olarak, yaklaşık 1,6 milyon yıllık örneklerden çoğaltılabilir DNA elde edilebileceği düşünülmektedir (Allentoft ve diğ., 2012). Ancak buna rağmen şu ana kadar DNA'sı elde edilen en eski örnek yaklaşık 700 bin yıllık, atın atası olan soyu tükenmiş bir bireydir (Orlando ve diğ., 2011).

Tablo 2.1: Sıcaklık ve fragment uzunluğuna göre DNA'nın yarı-ömrü (Allentoft ve diğ., 2012).

Sıcaklık (°C)	Fragment-Yarıömür		
	25	30 bç -500 yıl	100 bç-150 yıl
15	30 bç -3000 yıl	100 bç-900 yıl	500 bç-180 yıl
5	30 bç -20000 yıl	100 bç-6000 yıl	500 bç-1200 yıl
-5	30 bç -158000 yıl	100 bç-47000 yıl	500 bç-9500 yıl

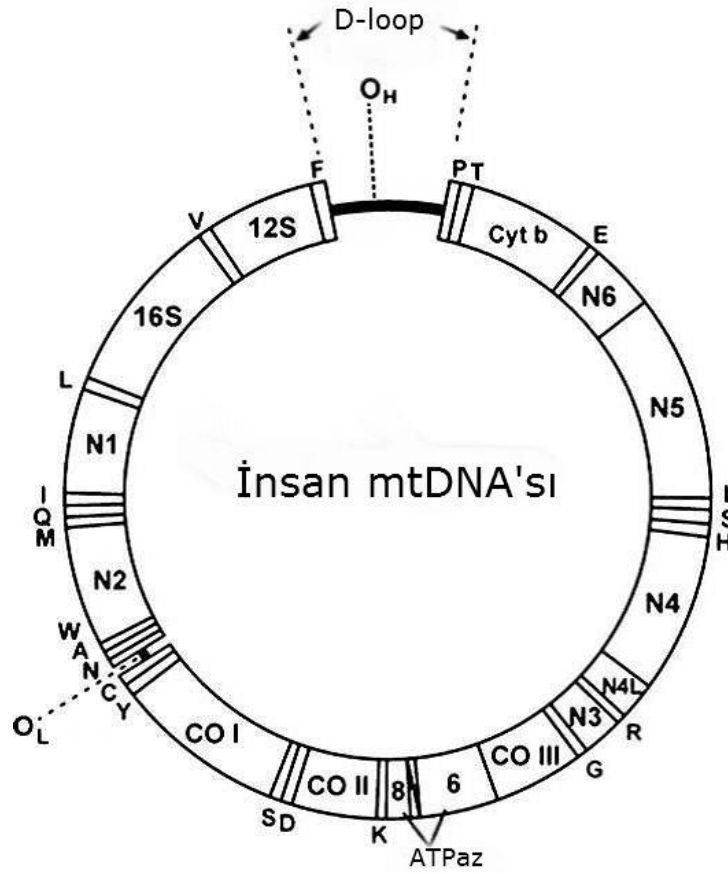
Antik DNA'da hasarların yarattığı teknik sorunları aşmak amacıyla kullanılan yöntemlerden biri çoğaltım için Touchdown PCR yönteminin kullanılmasıdır. Touchdown PCR, primerlerin yanlış bağlanmasını engellemek ve bağlanma derecesini artırmak amacıyla, her bir döngüde bağlanma sıcaklığını düşürerek yapılan PCR uygulamasıdır.

Moleküler antropolojideki sınırlamalardan bir diğeri ise kontaminasyondur. Literatürde kontaminasyondan kaçınmak için iki temel öneri sunulmaktadır. Birincisi, laboratuvar koşullarının aDNA çalışmalarına uygun olmasıdır. DNA izolasyonunun ve PCR hazırlığının yapıldığı laboratuvar, daha önce PCR sonrası çalışmaların yapılmadığı bir laboratuvar özelliği taşımalıdır (Cooper ve Poinar, 2000). Mümkünse bu laboratuvar, günümüz DNA'larıyla çalışmalar yapılan laboratuvarlardan uzakta bir yerde konumlandırılmalıdır. Çalışma alanı çamaşır suyu ile sık sık temizlenmeli, çalışma öncesi laboratuvar ortamı UV ışık ile en az 2-3 saat steril edilmelidir. Kontaminasyon riskini azaltmak için önerilen kriterler şöyle sıralanmaktadır (Pääbo ve diğ., 2004):

- i. Çoğaltım ürünlerini klonlama ve çoklu klonları dizileme.
- ii. İzole edilen DNA'nın ve PCR ürünlerinin kaynağının kontrolleri.
- iii. Aynı ve farklı parçalarda tekrarlanan çoğaltımlar.
- iv. Çoğaltılabilir DNA moleküllerinin sayısının tespiti.
- v. Çoğaltım etkinliği ve amplikon uzunlukları arasındaki ters orantı.
- vi. Makromolekülerin korunma oranının biyokimyasal tespiti.
- vii. Mitokondriyal DNA amplikonlarındaki nükleer DNA miktarının tespiti.
- viii. Deneyle farklı labaratuvarlarda tekrarlanması.

Ökaryotik hücreler, nükleer genomun dışında hem mitokondri hem de kloroplastlarında genetik materyal bulundurmaktadırlar. Endosimbiyoz teorisine göre, mitokondri yaklaşık 1,5 milyar yıl önce başka bir hücreye yerleşerek simbiyont yaşamaya başlamış olan bir prokaryotik hücredir ve yeni oluşan bu hücre ökaryotik hücrenin atasal formudur. Endosimbiyoz teorisini destekleyen en önemli kanıt ise mitokondri ve kloroplastın kendi genomlarına sahip olmasıdır. Bu genom, prokaryotlarda olduğu gibi, halkasal yapıda ve tek bir DNA molekülünden oluşmaktadır (Futuyma, 2008).

Mitokondriler genomlarında, yaklaşık 1100 bç'lik *d-loop* bölgesi hariç sadece kodlama yapabilen DNA bulundurlar. Bir insan mitokondri genomu, 16569 bç ve 37 gen den oluşmaktadır (Şekil 2.10) (Pakendorf ve Stoneking, 2005).



Şekil 2.10: İnsan mitokondriyal genomu (Pakendorf ve Stoneking, 2005).

İnsan mitogenomu (16 kb), maya mitogenomuyla (84 kb) karşılaştırıldığında çok daha küçüktür. Bunun sebebi ise insan mitogenomunda intronların atılmış olmasıdır. İnsan mitogenomunda kodlanmayan tek bölge, kontrol bölgesi olarak da adlandırılan, HVRI ve HVRII bölgelerini içeren *d-loop* bölgesidir ve bu bölge mitogenomda en çok mutasyona uğrayan bölgedir (Krebs ve diğ., 2012). Bu bölgenin genomda düzenleyici olarak işlev gördüğü bilinmektedir. *D-loop*'ta bulunan bazı "sıcak noktalar (hot spot)"da ortalamadan 10 kat daha fazla mutasyon birikimi saptanmıştır. Yapılan aDNA çalışmalarında, bu sıcak noktaların en çok hasar gören bölgeler olduğu tespit edilmiştir (van Oven ve Kayser, 2008).

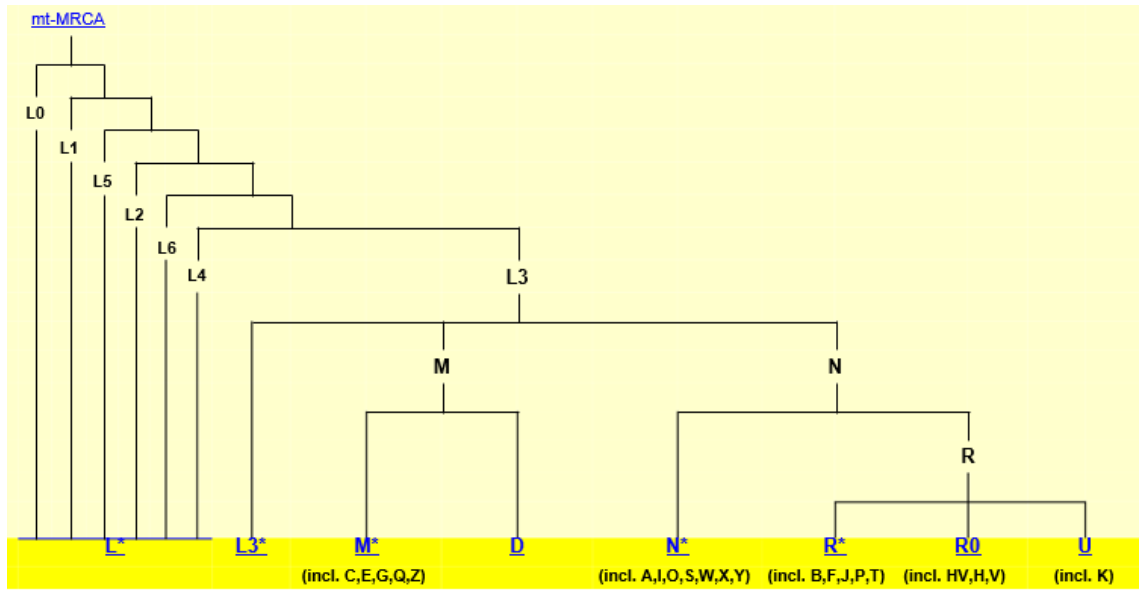
Evrimsel perspektifte kodlanabilir bölgelerde meydana gelen mutasyonlar organizmanın yaşamsal faaliyetlerini zarara uğratabileceğinden genellikle genoma sabitlenmezler. Bunun sonucu olarak en çok mutasyon *d-loop* bölgesinde birikmektedir (Alberts ve diğ., 2001).

Mitokondriyal DNA, paleogenomik yaklaşımlar açısından önemli özelliklere sahip bir araştırma objesidir (Parks ve diğ., 2015). Bu özellikler şöyle sıralanabilir:

- i. Mitokondriyal DNA maternal kalıtım gösterir, bunun sebebi, babadan gelen spermin ya hiç ya da çok az mitokondri içermesidir. Bazı çalışmalarda, spermin mitokondrilerinin oosit ile birleşme sonrası ubikitinasyon mekanizmasıyla yok edildiği gösterilmiştir (Manfredi ve diğ., 1997).
- ii. Mitokondriyal genom, hücrelerde yüksek kopya sayısına sahiptir ve heteroplazmi durumunda, popülasyon genomiği açısından sorunlar yaratsa da aDNA veya adli uygulamalarda bu özelliği sayesinde yüksek miktarda DNA elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Pakendorf ve Stoneking, 2005).
- iii. Mitogenomda tek bir halkasal DNA molekülü bulunduğundan rekombinasyonun gerçekleşmediği düşünülmektedir. Büyük veri setleriyle yapılan tüm mitogenom analizlerinde mtDNA’da rekombinasyona rastlanmamıştır (Ingman ve diğ., 2000).
- iv. Yukarıda bahsedildiği gibi mtDNA’da mutasyon oranı kodlama yapmayan *d-loop* bölgesinde oldukça yüksektir. Dolayısıyla yapılan çalışmalarda toplumlar arasındaki varyasyonları belirlemede bu bölge sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak yine de kodlanan bölgelerde genoma sabitlenebilmiş mutasyonlar, popülasyonlar arası varyasyonların tespitinde önemli rol oynamaktadır (Carelli ve diğ., 2006).

Farklı bölgelerinde mutasyona sahip mtDNA’lar gruplandırılarak sistematik hale getirilmiş ve her biri bir haplo-grup olarak isimlendirilmiştir (Carelli ve diğ., 2006). Yapılan çalışmalar, haplo-grupların coğrafi yayılıma göre örüntülere sahip olduğunu göstermektedir. Yaşamakta olan insan popülasyonlarının mtDNA haplo-grupları tespit edilerek bu coğrafi örüntüler ortaya çıkarılmıştır (Templeton ve diğ., 1995). Bazı haplo-gruplar belirlenirken sadece *d-loop* SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi) ve indelleri (insersiyon ve delesyon) tespit etmek yeterli olurken bazı haplo-gruplarda ise kodlanan bölgelerde de SNP ve indel analizi yapmak gerekli olabilmektedir (Torrioni ve diğ., 2006).

Haplo-grup isimlendirmesinin kuralları Richard ve arkadaşlarının (1998) yaptığı çalışma da sistematize edilmiştir. Şu an “O” harfi haricinde Latin Alfabesinde bulunan bütün harfler isimlendirmede kullanılmaktadır. van Oven ve Kayser’in (2008) yaptığı çalışmada tüm haplo-grupları içeren ve güncellenen *phylotree* veritabanı oluşturulmuştur (Şekil 2.11). *Phylotree* veri tabanını kullanarak mtDNA analizleri yapmak üzere Mitotool yazılımı oluşturulmuştur.



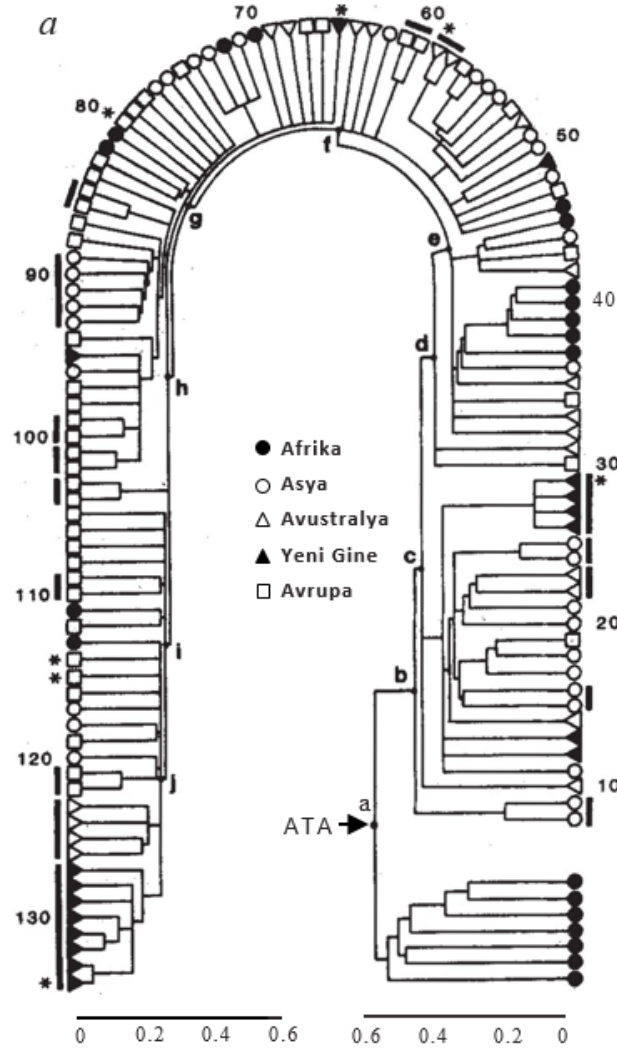
Şekil 2.11: *Phylotree* veritabanında bulunan mtDNA haplo-grup ağacı (van Oven, 2014).

Şu ana kadar bulunan bütün mtDNA varyasyonlarını içeren ve yeni çalışmalarla güncellenen diğer bir veritabanı ise MITOMAP’tir. MITOMAP, tüm insan mtDNA haplo-gruplarını ve bu haplo-grupların birbirleriyle olan evrimsel ilişkilerini güncel veriler ışığında depolayan bir veritabanıdır (Eduardo ve diğ., 2007).

Mitokondriyal DNA ile yapılan ilk popülasyon genomiği çalışmaları 1980’lerin başında Restriksiyon Endonükleazları (RE) ile kesim temeline dayanan RFLP (Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi) yöntemiyle yapılmıştır. Daha sonra PCR teknolojisinin gelişimi ile çoğaltım temeline dayanan moleküler etiket yöntemleri kullanılmaya başlamıştır (Stoneking ve Soodyall, 1996). Bu şekilde daha yüksek çözünürlükte mitogenom

haritaları oluşturulmuş ve son yıllarda ise tamamen dizileme yöntemlerine dayalı haritalamaya geçilmiştir (Torrioni ve diğ., 2006).

Mitogenomla yapılan önemli popülasyon genomiği çalışmalarından birisinde yaşayan 147 birey kullanılmıştır (Cann ve diğ., 1987). Bu çalışmada, parsinomi metodu kullanılarak 133 mtDNA tipi ile ilişkili bir ağaç oluşturulmuş ve bu ağacın kollarından biri tamamen Afrikalı haplo-grupları gösterirken, diğeri Afrika-dışındaki popülasyonları göstermiştir (Şekil 2.12).



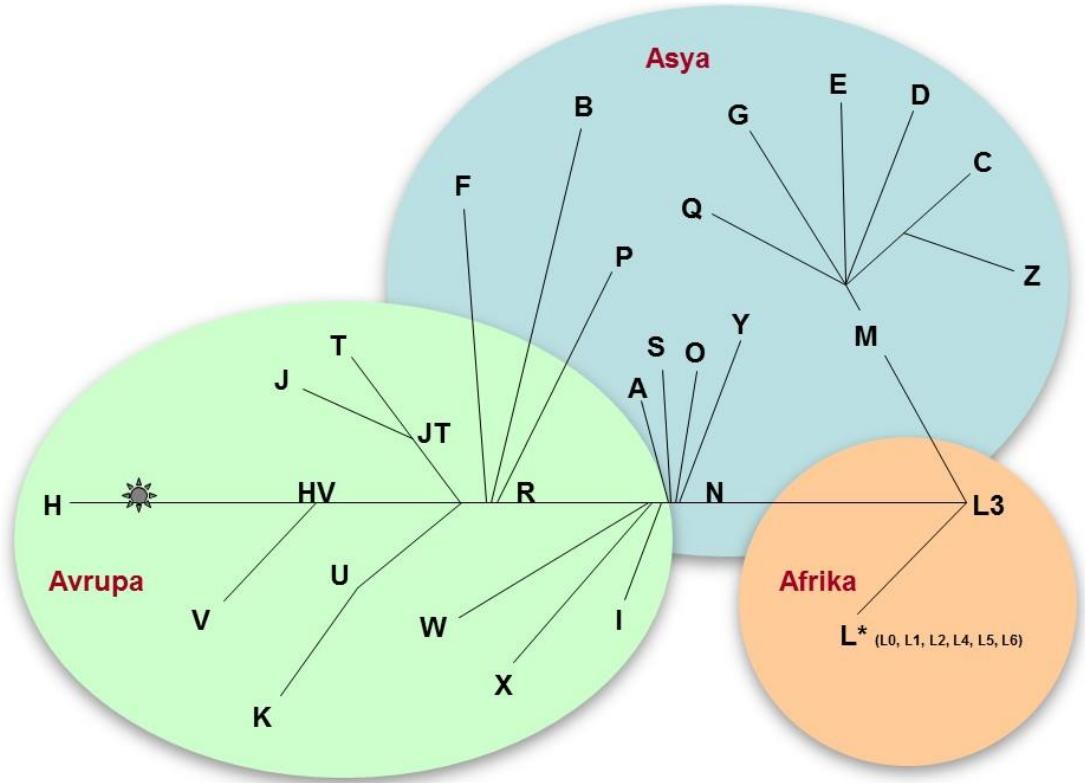
Şekil 2.12: Bir referans ve 133 tip mtDNA'ya ait soy ağacı (Cann ve diğ., 1987).

Söz konusu çalışmanın bulgularına göre, mitokondriyal gen havuzunun kaynağının Afrika olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, o yıllarda hala tartışılmakta olan “Afrika’dan Çıkış” hipotezine katkı sunmakla beraber, 30 bin yıl önce Yeni Ginelilerin, 40 bin yıl önce Avustralyalıların, 12 bin yıl önce ise Yeni Dünyalıların buldukları coğrafyada kolonize oldukları rapor edilmiştir. Günümüzde yaşayan mtDNA haplo-gruplarının en eski ortak atasının, 140 bin ile 290 bin yıl önce var olduğu düşünülmektedir (Cann ve diğ., 1987).

Sonraki yıllarda mtDNA ile yapılan çalışmalar, modern insanın dünyaya yayılışı hakkında önemli bilgiler vermiştir. Torroni ve arkadaşları tarafından (1992) Yerli Amerikalılarla yapılan ilk büyük ölçekli çalışmada, Asya’dan Amerika’ya göçlerin zamanı, popülasyonun büyüklüğü ve kökeni tespit edilmiştir. Bu çalışmanın diğer önemli bir özelliği ise evrensel olarak hala kabul gören ilk mitokondriyal genom isimlendirmesini oluşturmasıdır. Bu çalışmada ilk olarak tespit edilen mtDNA haplo-gruplarına; A, B, C, D isimleri verilmiş ve daha sonraki çalışmalarda tespit edilen haplo-grup ve alt haplo-gruplar bu hiyerarşiyi takip ederek isimlendirilmiştir (Torroni ve diğ., 2006).

Yine Torroni ve ekibi tarafından (1996) üç Avrupalı popülasyonda mtDNA’nın *d-loop* bölgesi ile yapılan çalışmada on haplo-grup tespit edilmiş ve değerlendirilmiştir. H haplo-grubunun, çalışmanın yapıldığı Fin, İsveç ve Tuskan popülasyonlarında %41’lik oranla en çok görülen haplo-grup olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, üç popülasyonda da J, K, T ve U haplo-gruplarına sıklıkla rastlandığı; I, V, W ve X haplo-gruplarının en az iki popülasyonda ortak görüldüğü tespit edilmiştir.

Sonraki yıllarda yapılan mtDNA çalışmalarıyla çok sayıda mitokondriyal haplo-grup belirlenmiş ve bu haplo-grupların birbirleriyle olan ilişkileri ortaya çıkarılmıştır. Yapılan ağ analizleri sayesinde haplo-grupların coğrafi yayılımları belirlenmiş, bu yolla insanlığın göç örüntüleri saptanmıştır (Şekil 2.13 ve Şekil 2.14).



Şekil 2.13: Basit haplo-grup ağacı².

²<http://mitomap.org/pub/MITOMAP/MitomapFigures/simple-tree-mitomap-2012.pdf>



Şekil 2.14: Haplo-grup analizleri sonucu çıkarılan göç yolları haritası³.

³<http://genographic.nationalgeographic.com/human-journey/>

İnsanlık tarihinde, toplumların üretim biçimlerindeki değişimlerden ilki “Neolitik Devrim” ile gerçekleşmiştir. Neolitik Dönemi ayırt eden önemli özellikler, tarımın başlangıcı, çanak-çömlek teknolojisi ve bu döneme özgü taş alet teknolojisidir (Özbek, 2007). Dünyada tarımın ilk olarak Yakın Doğu’da başladığı düşünülmektedir. Günümüze kadar bulunan en eski evcil buğday, Çatalhöyük’te yapılan kazı çalışmalarında ortaya çıkarılmıştır ve yaklaşık olarak günümüzden 10 bin yıl öncesine tarihlenmektedir. Bulunan bu buğday kalıntılarında yapılan aDNA çalışmaları, bu buğdayın evcil buğdaya özgü *gluD* genini taşıdığını göstermektedir (Somel, 2003).

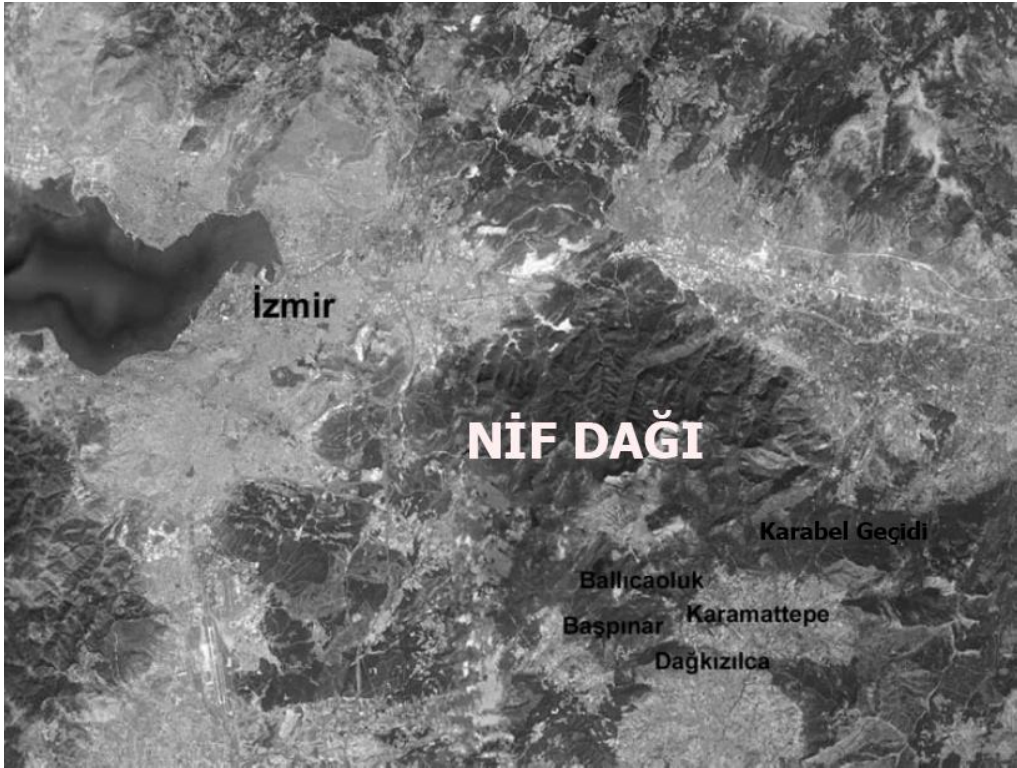
Avrupa’nın prehistorik dönemde yaşadığı ve mtDNA’ında iz bırakan olaylardan biri bahsedilen Neolitikleşme sürecidir. Prehistorik kaynaklar, Avrupa’da Neolitik dönemin yaklaşık 7500 yıl önce başladığını göstermektedir. İlk olarak Cavalli-Sforza tarafından (1994) kuramsallaştırılan demik difüzyon hipotezine göre, Avrupa’da Neolitikleşme sürecinin daha önceleri tarım toplumuna geçmiş olan Yakın Doğu’dan gelen göçlerle başladığı öne sürülmektedir. Neolitik Dönemde Avrupalı avcı-toplayıcılarla Yakın Doğulu tarım toplumlarının karışması, mtDNA’da ipuçları bırakmıştır. Yaşayan bireylerle yapılan çalışmalarda, söz konusu bu durum göz önünde bulundurulsa da bu karışmanın boyutları tespit edilememiştir. Avrupalı mtDNA’lara, Neolitikleşmenin etkileri ancak antik mtDNA’ların analiziyle mümkün olabilmektedir (Torroni ve diğ., 2006).

Toplumların Avrupa’ya yayılışı ile ilgili son yapılan çalışmalardan birinde Haak ve arkadaşları (2015), antik DNA verilerini kullanarak Avrupa’nın tarih öncesinde yaşadığı göç örüntülerini ortaya koymuştur. Çalışmaya göre tarih öncesi dönemde Avrupa’ya Yakın Doğu’dan iki kez kitlesel göç olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan ilki erken Neolitik Dönemde Akdeniz üzerinden gelen çiftçi toplumlar, diğeri geç Neolitik Dönemde Karadeniz kenarından Avrupa’ya geçen Yamna popülasyonudur. Çalışma daha önceleri ortaya atılan Kurgan Hipotezi’ni desteklemektedir. Yine önceden ortaya atılan Anadolu Hipotezi, Anadolu’ya dair antik DNA verilerinin az olması sebebiyle daha fazla çalışmaya ihtiyaç duymaktadır (Haak ve diğ., 2015).

Batı Anadolu’da bulunan Nif Dağı, İzmir Körfezi’nin doğusunda, ulaşım yollarıyla bağlantılı, verimli arazisinde madenler ve bol miktarda su kaynağı bulunduran ve bu sebeplerle yerleşim için gerekli özellikleri taşıyan bir konumdadır. Bugün, Nif Dağı,

İzmir İlinin Kemalpaşa, Torbalı ve Bornova ilçelerinin sınırları içinde bulunmaktadır (Peker, 2013).

Yapılan yüzey araştırmaları sonucunda Nif Dağı'nın Doğu kesiminde bulunan Karamattepe, Ballicaoluk, Dağkızılca ve Başınar mevkiileri öncelikli kazı alanı olarak seçilmiştir. Bu çalışmada kullanılan malzemeler Karamattepe, Ballicaoluk ve Başınar alanlarında bulunmuştur (Şekil 2.15). Karamattepe'de ortaya çıkarılan buluntular, bölgenin prehistorik dönemden itibaren yerleşim yeri ve MÖ 4. yüzyılın son çeyreğinden itibaren, 50-60 yıl kadar bir nekropolis (mezarlık) olarak kullanıldığını göstermektedir. Ballicaoluk kazı alanı ise, üzerinde kurulu aynı adı taşıyan kalenin duvar yapısının incelenmesi yoluyla yapılan tarihlendirmeye göre yine MÖ 4. yüzyıla (Helenistik Dönem) tarihlenmektedir. Başınar mevkiinde bulunan bir manastır ise MS 13. yüzyıla (Bizans Dönemi) tarihlenmiştir ve etrafında çok sayıda Bizans mezarına rastlanmıştır. Yazılı kaynaklarda, bölgede yerleşim olduğu henüz saptanmamış olsa da devam eden çalışmalar Nif Dağı sakinlerinin çok kültürlü bir yapıda olduğunu göstermektedir (Tulunay, 2012).



Şekil 2.15: Nif Dağı'nda bulunan kazı alanlarının konumu (Peker,2013).

Bu alışmada, Nif Dağı Kazılarında çıkarılan 3 bireye ait diş örnekleri kullanılmıştır. Bu örneklerden elde edilen mtDNA'ların *d-loop* bölgeleri çoğaltılıp, dizilerek biyoinformatik analizleri yapılmış, bu yöntemle mitokondriyal haplo-grupları belirlenmiştir. Haplo-grupların coğrafi yayılımına dair veriler kullanılarak, Nif Dağı'nda yaşamış olan bireylerin göç yolları tespit edilmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEKLEME

Bu çalışmada kullanılan ve 3 farklı bireye ait olan dişler, İ.Ü. Edebiyat Fakültesi, Arkeoloji Bölümü, Klasik Arkeoloji Anabilim Dalı tarafından, Temmuz – Ağustos aylarında gerçekleştirilen İzmir İli Nif Dağı Kazılarının Ballıcaoluk (BOM2), Karamattepe (KM17) ve Başpınar (BM37) alanlarında bulunan insan iskeletlerinden alındı. Mezar açıldıktan sonra, mezar civarında en az sayıda kişinin kalması sağlandı ve örnekleme mümkün olan en steril koşullarda yapıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Mezar içi örnekleme fotoğrafı.

Örnekleme, Avustralya Antik DNA Merkezi'nin (ACAD) yayınladığı örnekleme prosedürüne uygun olarak yapıldı (Cooper ve Haak , 2010). Bu protokole uygun olarak iskeletin yatış pozisyonu ve kafatasının konumu belirlendikten sonra örnekleme yapılacak dişlerin yeri belirlendi ve steril eldiven ile maskeler kullanılarak kanin dişler alındı. Örneklemede, tek köklü olması ve kolayca çıkarılması nedeniyle genellikle kanin dişler alındı, kaninlerin uygun olmaması veya bulunamaması durumunda diğer dişler tercih edildi. Alınan örnekler, laboratuvara ulaştırılana kadar +4 °C'de muhafaza edildi ve laboratuvara soğuk zincir yöntemi kullanılarak ulaştırıldı. Örnekler, laboratuvar çalışmaları başlayana kadar +4 °C'de saklandı.

3.2. DIŞ ÖRNEKLERİNİN YÜZEY STERİLİZASYONU

Çalışmaların yürütüleceği laboratuvar, çalışma öncesi 2 saat boyunca UV ışık ile sterilize edildi. Daha sonra örnekler, 5 dakika süresince, 1/3 (v/v) oranında steril destile su ile sulandırılmış sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içerisinde bekletildi ve 30 dakika boyunca UV ışığa maruz bırakıldı. Bu aşama ile birlikte diğer tüm deneyler steril kabin içinde yürütüldü.

3.3. STERİL DIŞ ÖRNEKLERİNDEN DNA İZOLASYONU

Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen dişler boyun kısmından kesici alet (SKIL Rotation tool 1415 AC) ile kesildi ve cihaza her yeni örnek kesimi işleminden sonra steril uç takıldı. Kesilen diş kökü steril havanlarda ezilerek toz haline getirildi.

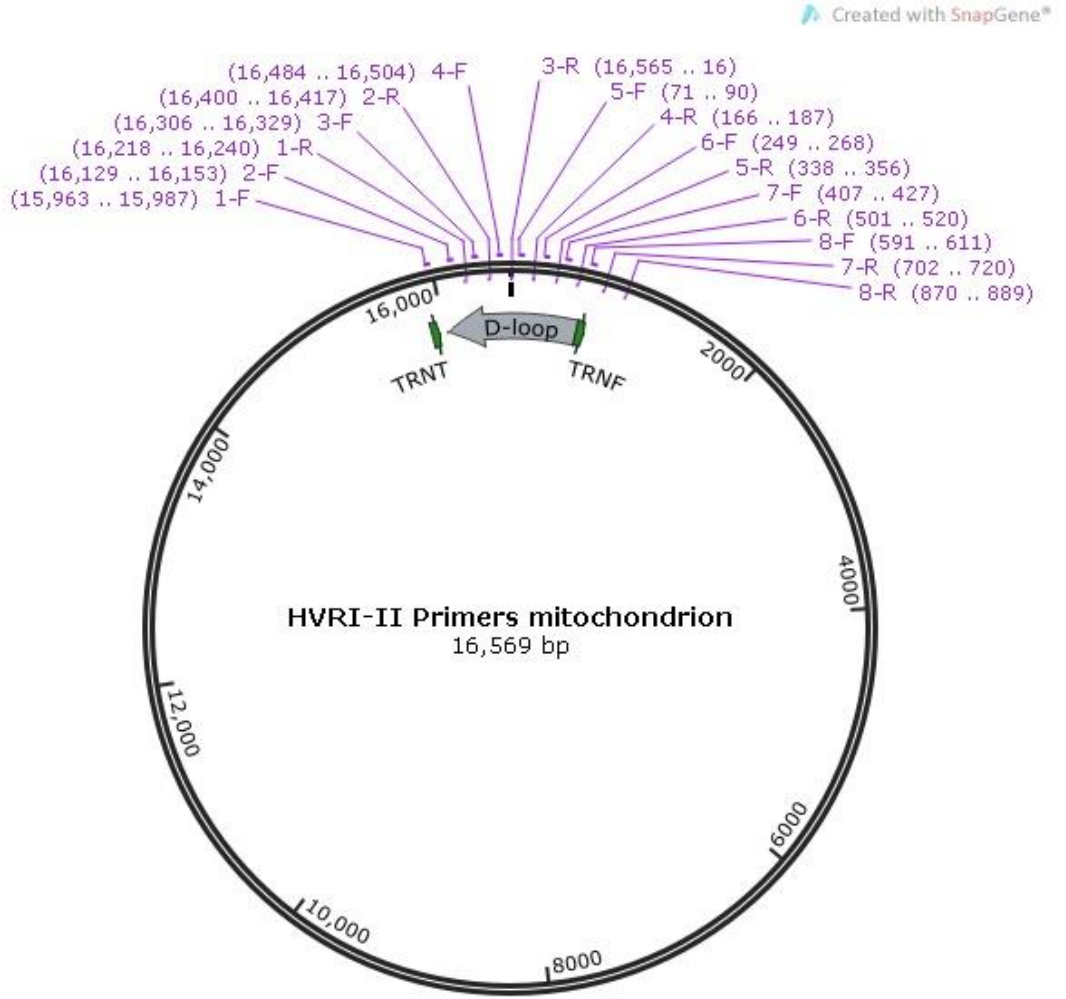
DNA izolasyonunda, ticari olarak temin edilen The Invisorb Spin Forensic Kit (STRATEC Biomedical AG, Germany, Katalog Numarası: 1034110300) kullanıldı. Öncelikle, bu kitin aDNA çalışmalarına uygun hale getirilmesine yönelik optimizasyon çalışmaları yapıldı. Kit dahilindeki Bone Lysis Enhancer solüsyonu yerine, 490 µL EDTA ve 10 µL Proteinaz K solüsyonu kullanıldı ve toz haline getirilen diş kökü, bir gece 56 °C sıcaklıkta çalkalayıcıda inkübe edildi. DNA izolasyonun devamı, kit prosedürüne uygun olarak yapıldı. Her bir örnekten iki ayrı DNA izolasyonu yapıldı ve izole edilen DNA'ların miktar ve saflık tayinleri nanodrop cihazı (Thermo Scientific Nanodrop 2000, ABD) ile saptandı.

3.4. MİTOKONDİRİ DNA'SININ D-LOOP BÖLGESİNİN "TOUCHDOWN" POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (TOUCHDOWN PCR) İLE ÇOĞALTILMASI

Örneklerden izole edilen DNA'larda mitokondri DNA'sı *d-loop* bölgesinin tamamının çoğaltılabilmesi için bu bölgeye özgün 8 adet primer "NCBI Primer Blast" çevrimiçi programı kullanılarak tasarlandı (Tablo 3.1). Primerlerin çoğalttığı bölge (amplikon) "SnapGene" programı kullanılarak belirlendi (Şekil 3.2).

Tablo 3.1: *D-loop* bölgesinin çoğaltılması için tasarlanan primer listesi. (PB: Primer Boyutu, Tm: Primer Bağlanma Sıcaklığı, %GC: Guanin ve Sitozin nükleotidlerinin dizideki yüzdesi, ÜB: Ürün Boyutu, bç: Baz Çifti)

Adı	Dizisi (5' → 3')	PB (bç)	Tm (°C)	%GC	ÜB (bç)
HVR_1-F	AAAAGTCTTTAACTCCACCATTAGC	25	57,78	36	278
HVR_1-R	TGATGTGTGATAGTTGAGGGTTG	23	58,42	43,48	
HVR_2-F	GGTACCATAAATACTTGACCACCTG	25	59,18	44	289
HVR_2-R	TTTCACGGAGGATGGTGG	18	56,54	55,56	
HVR_3-F	CATAGTACATAAAGCCATTTACCG	24	55,75	37,5	280
HVR_3-R	TGATAGACCTGTGATCCATCG	21	56,71	47,62	
HVR_4-F	TGAACTGTATCCGACATCTGG	21	57,2	47,62	273
HVR_4-R	CGCCTGTAATATTGAACGTAGG	22	57,03	45,45	
HVR_5-F	GTATGCACGCGATAGCATTG	20	57,78	50	286
HVR_5-R	GGGGTTTGGCAGAGATGTG	19	58,43	57,89	
HVR_6-F	ATGTCTGCACAGCCACTTTC	20	58,76	50	272
HVR_6-R	GTGTGTGCTGGGTAGGATGG	20	60,39	60	
HVR_7-F	TTGGCGGTATGCACTTTTAAAC	21	57,44	42,86	314
HVR_7-R	ACTCACTGGAACGGGGATG	19	59,02	57,89	
HVR_8-F	CCTCCTCAAAGCAATACACTG	21	56,61	47,62	299
HVR_8-R	CACGAAATTGACCAACCCTG	20	57,3	50	



Şekil 3.2: *D-loop* bölgesinin çoğaltılması için tasarlanan primerlerin SnapGene programı ile oluşturulan mitokondri genomundaki haritası.

Amplikonların verimli olarak çoğaltılabilmesi için üç farklı ticari PCR kiti prosedürlerine uygun olarak denendi. Bu kitler sırasıyla; GeneDirex Taq Polimeraz (KN: MB101-0500), Norgen Taq Polimeraz (KN: 28095) ve High Fidelity PCR Master (Roche Diagnostics, Deutschland, KN: 11732650001) kitleri olarak belirlendi. Buna ek olarak, polimerizasyon reaksiyonu aşamasında primerlerin kalıp bölgelere bağlanmasını artırabilmek amacıyla High Fidelity PCR Master kiti ile yapılan denemeye kit prosedüründen farklı olarak H₂O yerine 2.5 µL (stok 5M) betain (2-trimethylammonioacetate) eklendi. Reaksiyonların tamamı “Touchdown PCR” yöntemi ile C1000 Thermal Cycler (Biorad Laboratories, Inc., ABD) cihazı kullanılarak Tablo 3.2’de belirtilen koşullarda yapıldı.

Tablo 3.2: *D-loop* bölgesinin çoğaltımı için kullanılan PCR koşulları.

Reaksiyon	Döngü	Süre	Sıcaklık
Başlangıç Denatürasyonu	1	2 dk	95 °C
Denatürasyon	45	30 sn	95 °C
Bağlanma		30 sn	60 °C'den 52 °C'ye kadar
Uzama		30 sn	72 °C
Son Uzama	1	5 dk	72 °C

3.5. D-LOOP BÖLGESİNE AİT ÇOĞALTILAN AMPLİKONLARIN DİZİLENMESİ VE BİYOİNFORMATİK ANALİZLERİ

PCR ile çoğaltılan *d-loop* bölgesine ait amplikonların Sanger dizilemeleri, DONE Genetik ve Biyoinformatik Anonim Şirketi tarafından ABI 3730 XL (Applied Biosystems, ABD) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Dizileme işleminden sonra, ham dizi verileri düzenlenerek FASTA formatına dönüştürüldü ve tüm amplikon dizileri birleştirildi. Birleştirilen dizilerin ilk olarak CLUSTALW yazılımıyla, revize edilmiş Cambridge Referans Dizisi'ne (rCRS) göre hizalamaları yapıldı ve MEGA4 yazılımıyla neighbour-joining yaklaşımli filogenetik ağaç oluşturuldu. Haplo-grup tespitleri, MITOMAP platformu ile yapıldı.

4. BULGULAR

Örnekleme çalışmaları, İzmir İli Nif Dağı'nın Karamattepe, Ballicaoluk ve Başpınar mevkilerinde sürmekte olan kazı çalışmalarında bulunan mezarlarda yapıldı (Şekil 4.1).



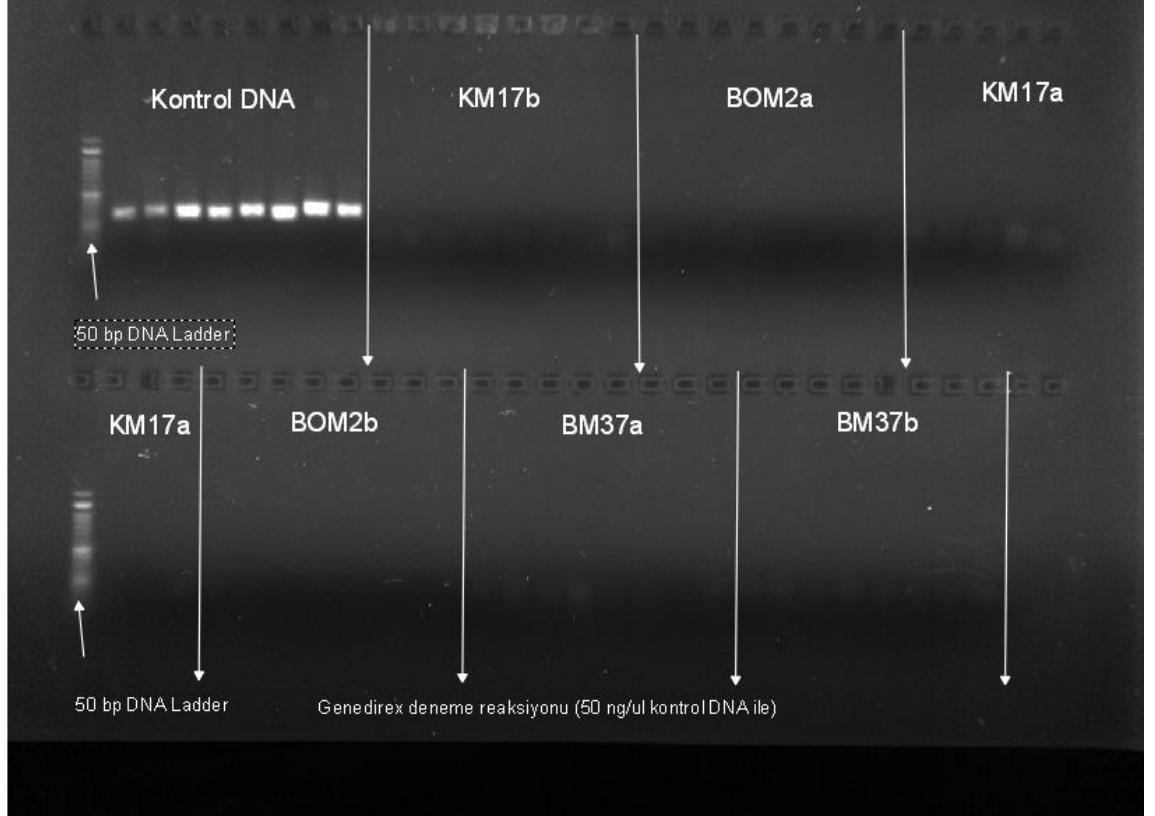
Şekil 4.1: Mezardan alınan köpek dişi fotoğrafı.

İzmir İli Nif Dağı, Karamattepe, Ballicaoluk ve Başpınar kazı alanlarından çıkarılan üç örnekten iki set halinde DNA izolasyonları yapıldı ve nanodrop cihazı ile spektrofotometrik ölçümleri alındı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: DNA izolasyonu sonrası yapılan spektrofotometrik ölçümlerin sonuçları.

Örnek No.	Konsantrasyon (ng/ μ L)	A260/A280	A260/A230	Kazı Alanı
KM17a	3,8	2,06	0,17	Karamattepe
KM17b	7,4	1,85	0,11	
BOM2a	19,5	1,56	0,22	Ballicaoluk
BOM2b	24,7	1,53	0,21	
BM37a	3	2,33	0,09	Başpınar
BM37b	9,7	1,68	0,08	

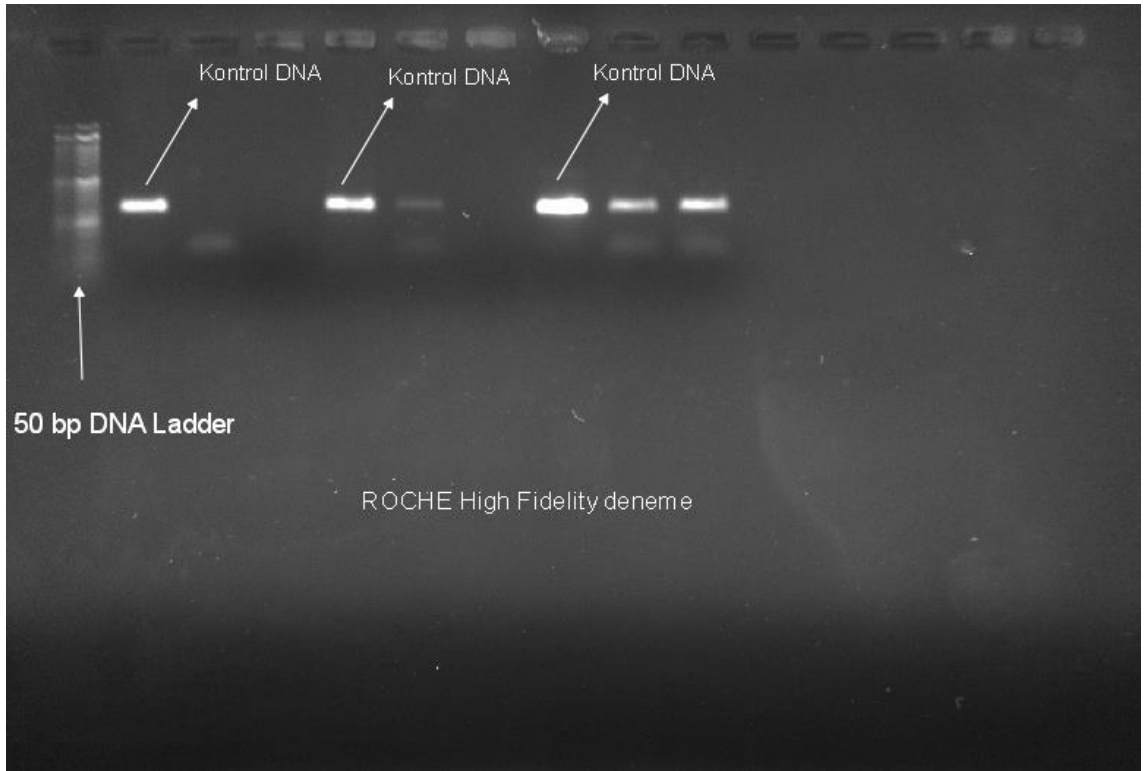
Üç bireyden iki set halinde yapılan toplam altı örnekten PCR ile çoğaltım yapmak amacıyla üç farklı taq polimeraz denendi. Deneme yapılan polimeraz enzimlerinden GeneDirex Taq Polimeraz ve Norgen Taq Polimeraz kitlerinden sonuç alınmazken High Fidelity PCR Master kitiyle yapılan deneme reaksiyonunda bantlar saptandı (Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Bu nedenle sonraki aşamalarda High Fidelity PCR Master kitinin etkinliğini artırmaya yönelik denemeler yapıldı.



Şekil 4.2: Genedirex Taq Polimeraz ile yapılan deneme reaksiyonu.

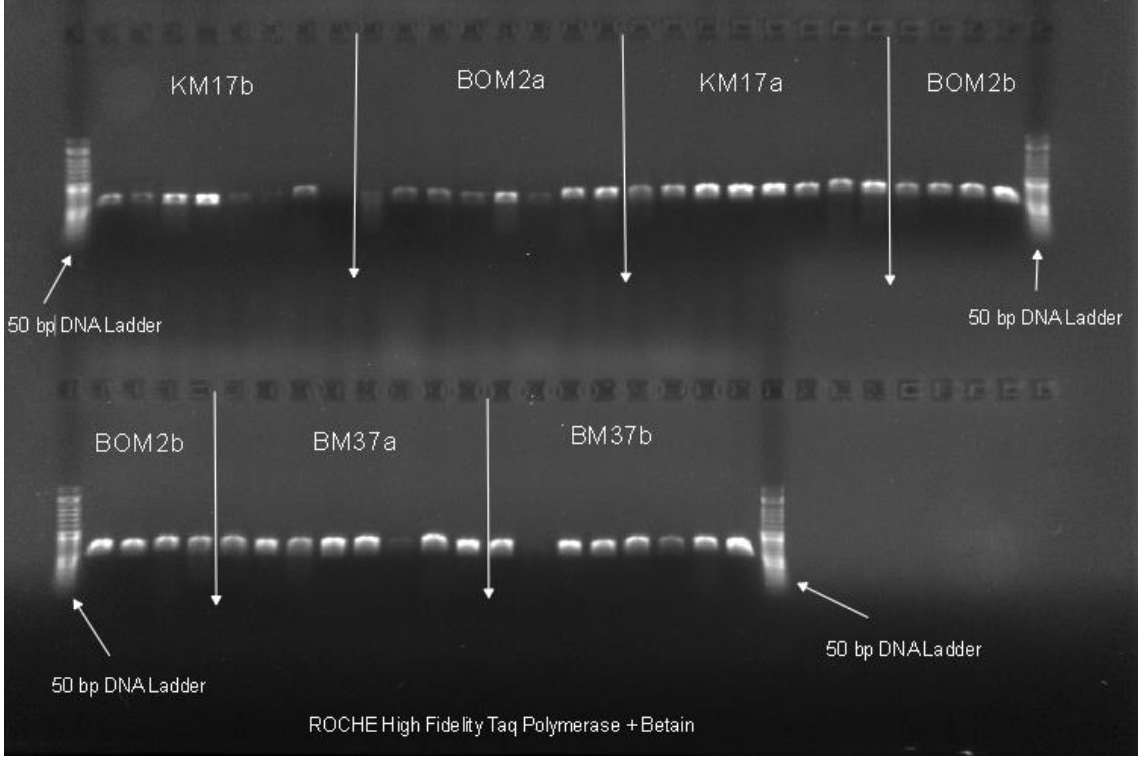


Şekil 4.3: Norgen Taq Polimeraz ile yapılan deneme reaksiyonu.



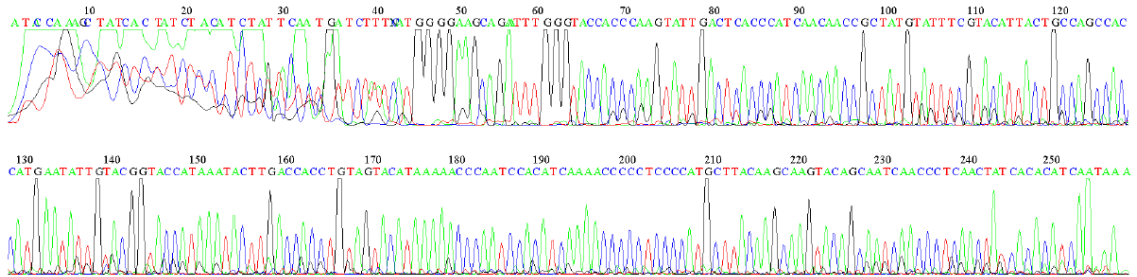
Şekil 4.4: ROCHE High Fidelity Taq Polimeraz ile yapılan deneme reaksiyonu.

Bu denemeler sonucunda ROCHE High Fidelity Taq Polimeraz kullanılmasına karar verildi, primerlerin bağlanmasını arttırarak çoğaltımı daha kaliteli hale getirmek için reaksiyona H₂O yerine betain eklendi ve daha yoğun bantlar gözlemlendi. Buna bağlı olarak tüm örneklerden 8 primer ile çoğaltım yapıldı ve her örnek için tüm ampliconlar çoğaltılabildi (Şekil 4.5).

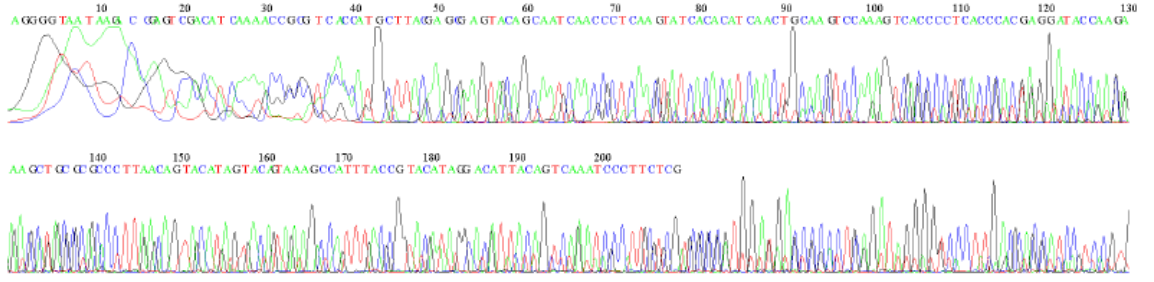


Şekil 4.5: *D-loop* bölgesinin ROCHE High Fidelity Taq Polimeraz ve Betain kullanılarak sekiz ampliconunun jel görüntüleri.

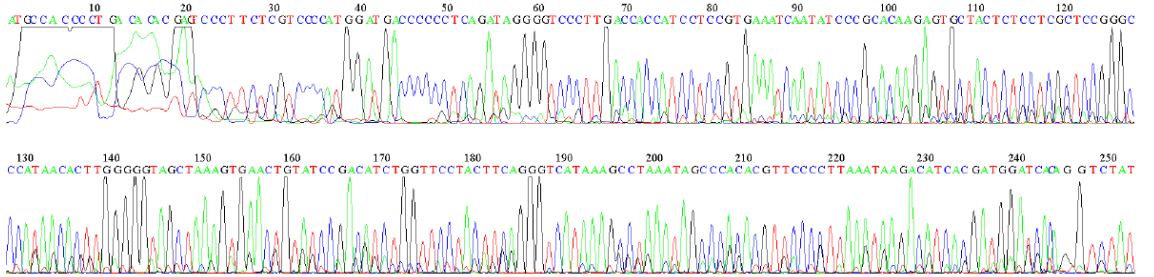
ABI 3730 XL yeni nesil dizileme cihazı kullanılarak yapılan dizileme sonuçlarına dair kromatogramlar Şekil 4.6 ile Şekil 4.53 arasında gösterilmektedir.



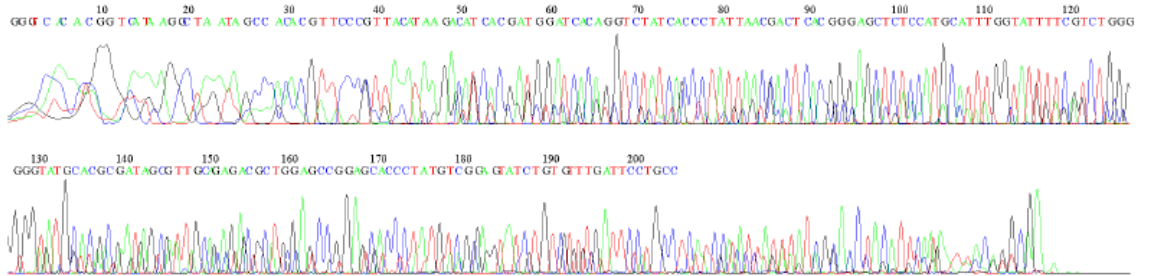
Şekil 4.6: BM37a örneğinin *d-loop* bölgesinin 1. amplicon dizisi.



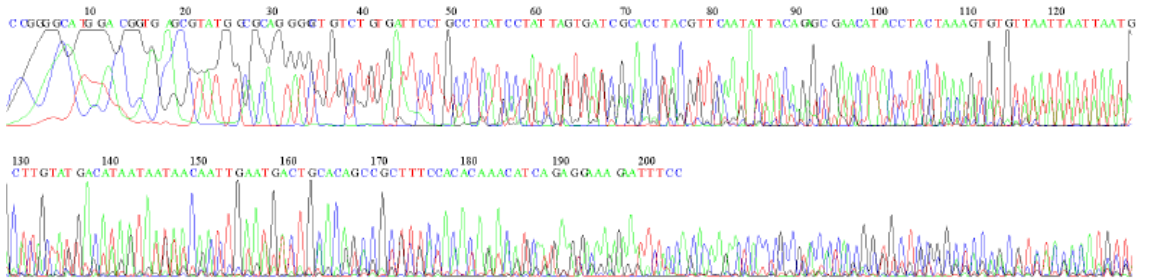
Şekil 4.7: BM37a örneğinin *d-loop* bölgesinin 2. ampikon dizisi.



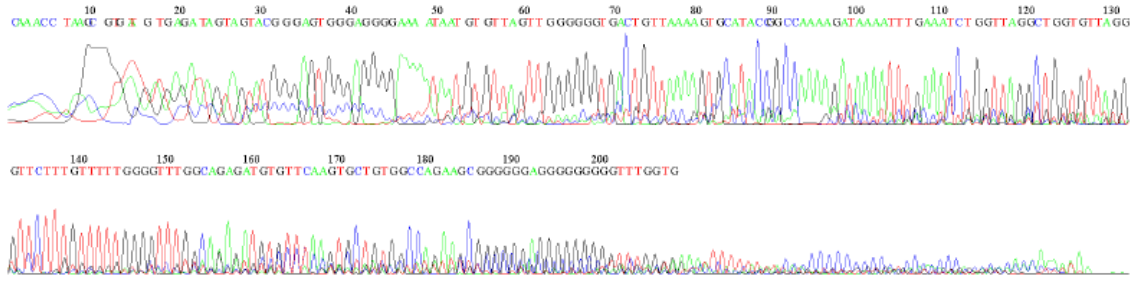
Şekil 4.8: BM37a örneğinin *d-loop* bölgesinin 3. ampikon dizisi.



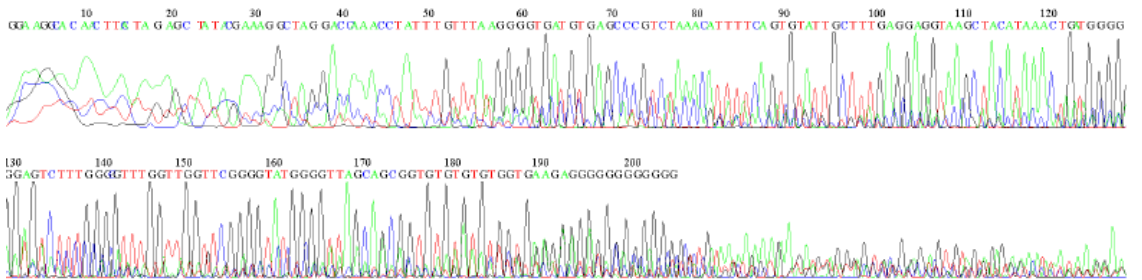
Şekil 4.9: BM37a örneğinin *d-loop* bölgesinin 4. ampikon dizisi.



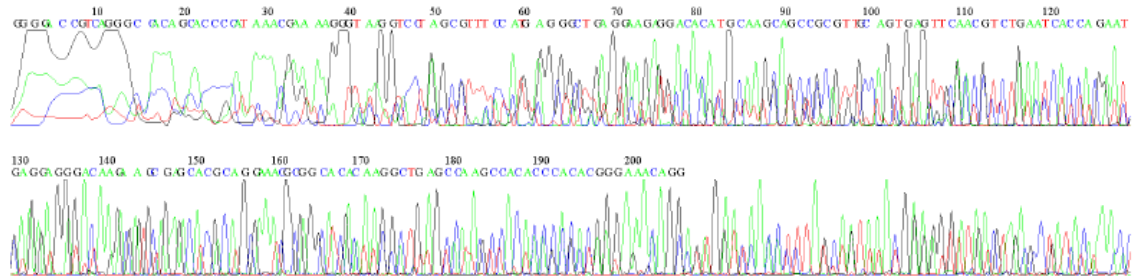
Şekil 4.10: BM37a örneğinin *d-loop* bölgesinin 5. ampikon dizisi.



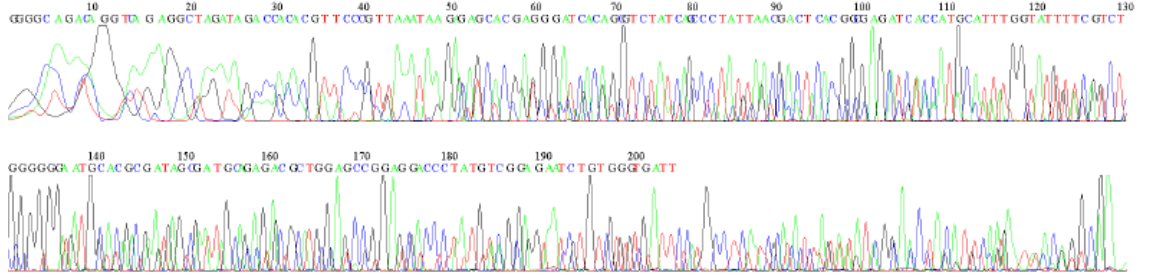
Şekil 4.11: BM37a örneğinin *d-loop* bölgesinin 6. amplicon dizisi.



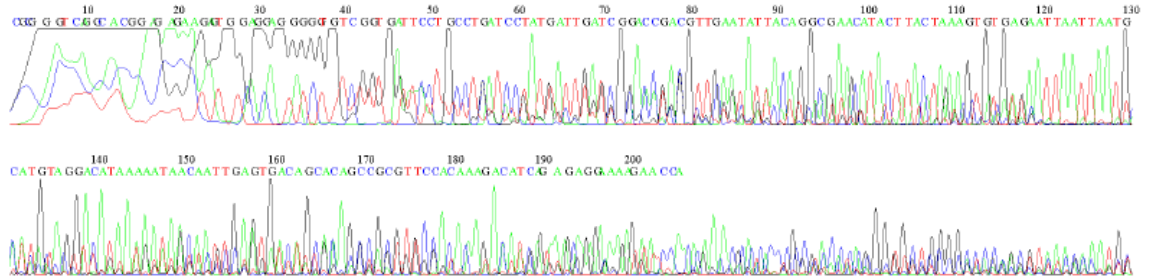
Şekil 4.12: BM37a örneğinin *d-loop* bölgesinin 7. amplicon dizisi.



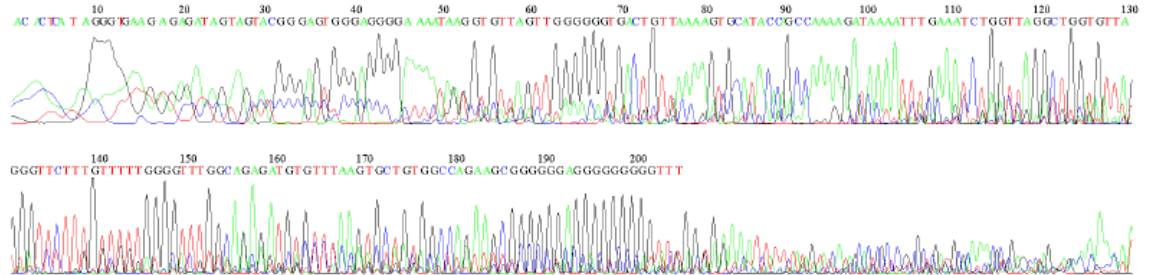
Şekil 4.13: BM37a örneğinin *d-loop* bölgesinin 8. amplicon dizisi.



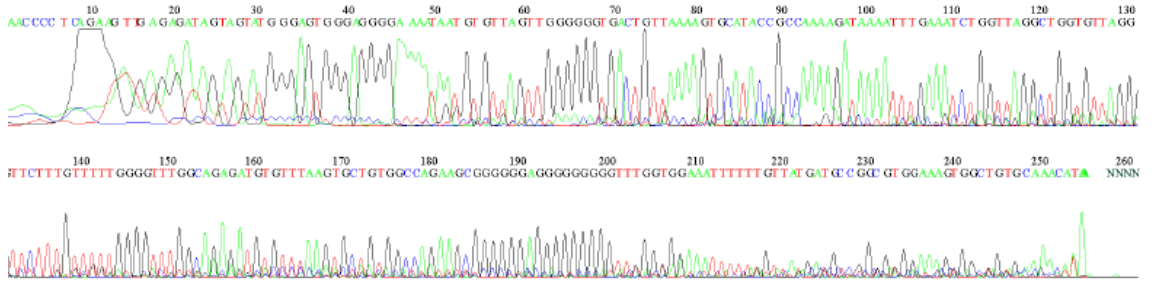
Şekil 4.17: BM37b örneğinin *d-loop* bölgesinin 4. amplicon dizisi.



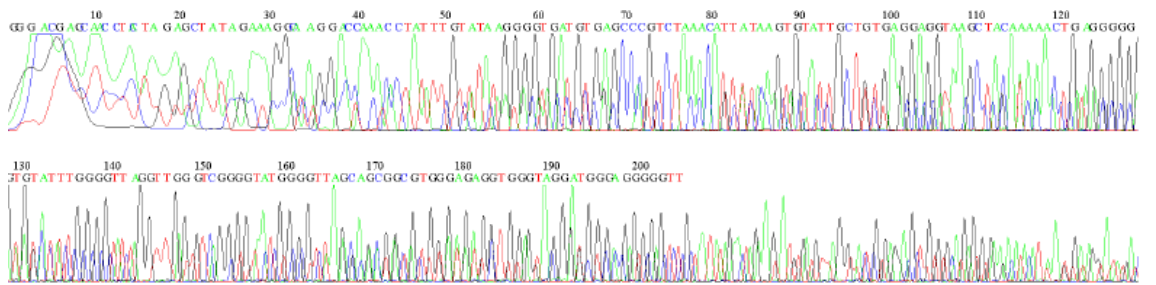
Şekil 4.18: BM37b örneğinin *d-loop* bölgesinin 5. amplicon dizisi.



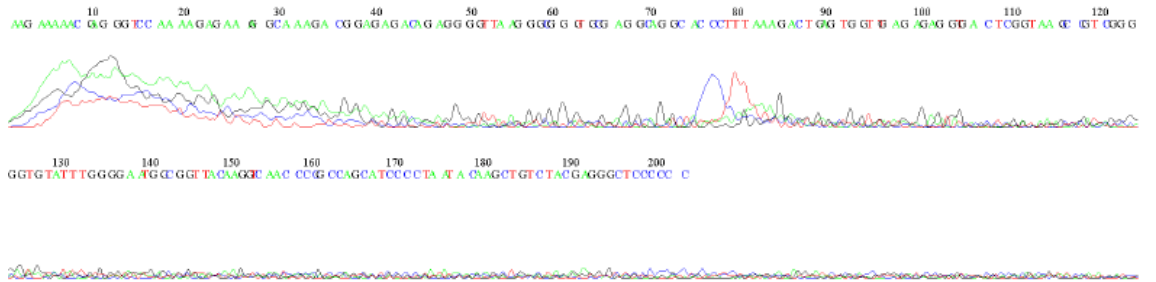
Şekil 4.19: BM37b örneğinin *d-loop* bölgesinin 6. amplicon dizisi.



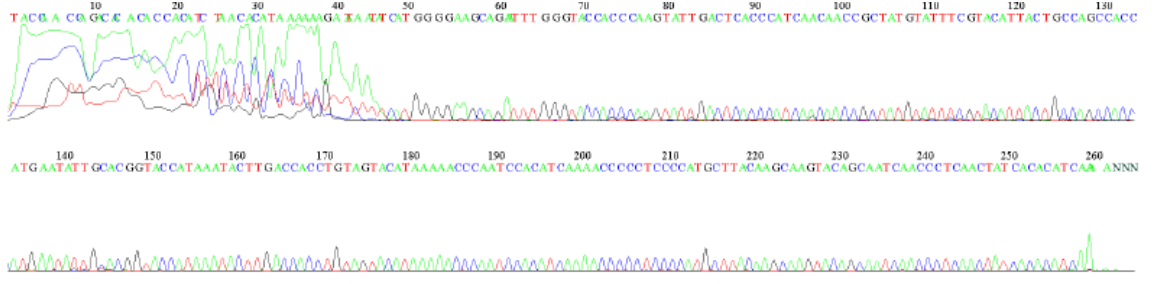
Şekil 4.27: BOM2a örneğinin *d-loop* bölgesinin 6. amplicon dizisi.



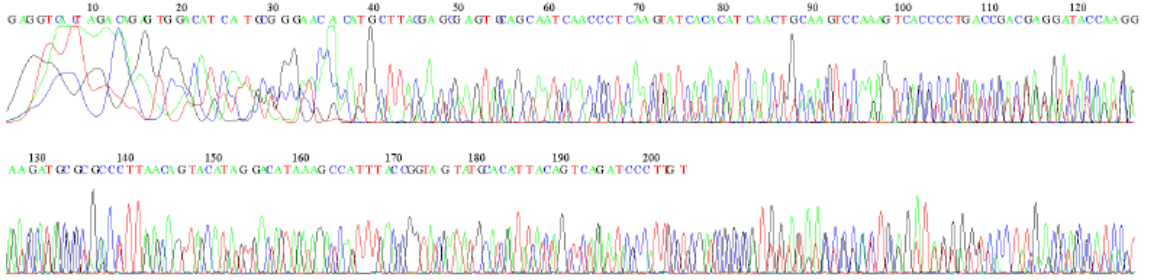
Şekil 4.28: BOM2a örneğinin *d-loop* bölgesinin 7. amplicon dizisi.



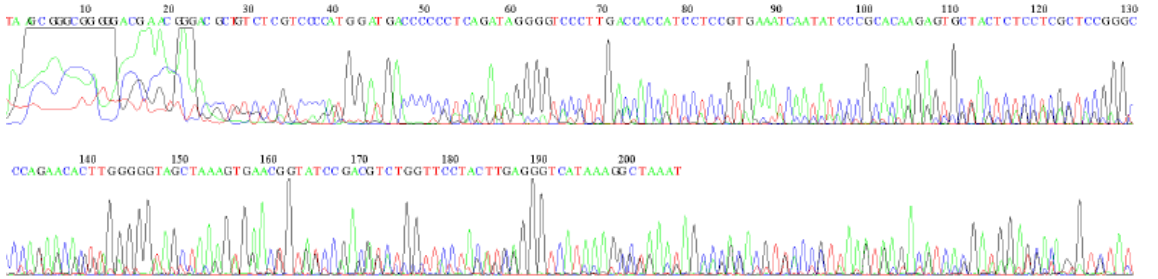
Şekil 4.29: BOM2a örneğinin *d-loop* bölgesinin 8. amplicon dizisi.



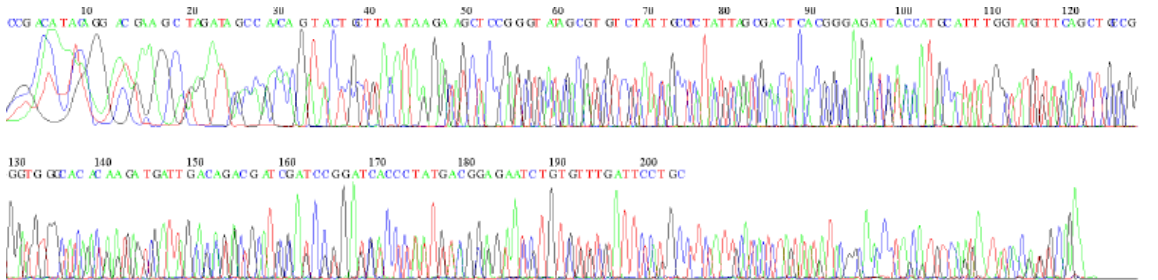
Şekil 4.30: BOM2b örneğinin *d-loop* bölgesinin 1. amplicon dizisi.



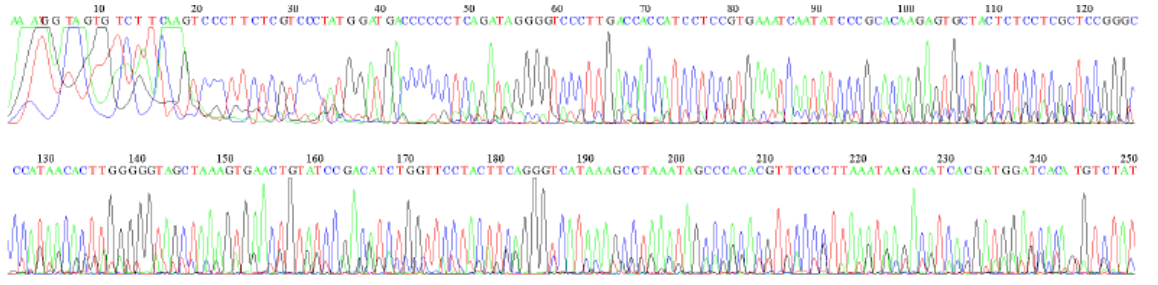
Şekil 4.31: BOM2b örneğinin *d-loop* bölgesinin 2. amplicon dizisi.



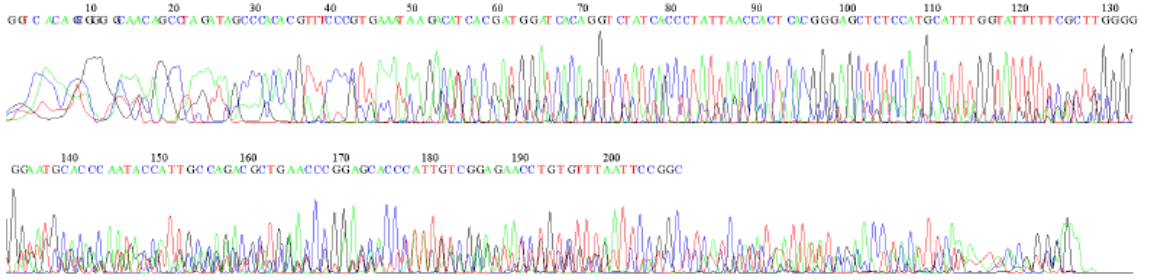
Şekil 4.32: BOM2b örneğinin *d-loop* bölgesinin 3. amplicon dizisi.



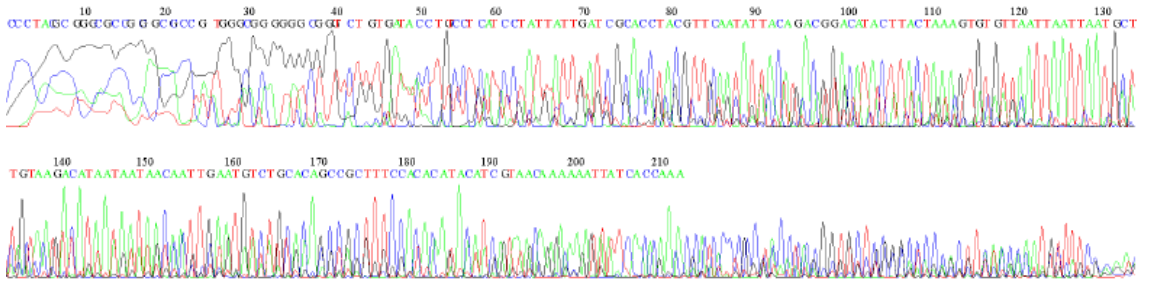
Şekil 4.33: BOM2b örneğinin *d-loop* bölgesinin 4. amplicon dizisi.



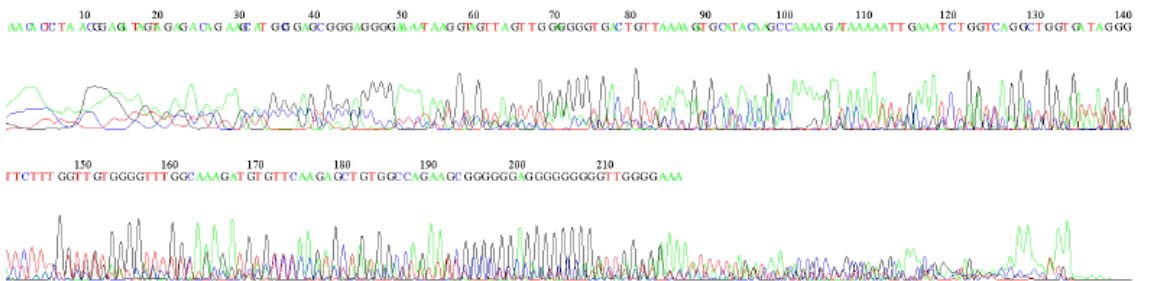
Şekil 4.40: KM17a örneğinin *d-loop* bölgesinin 3. amplicon dizisi.



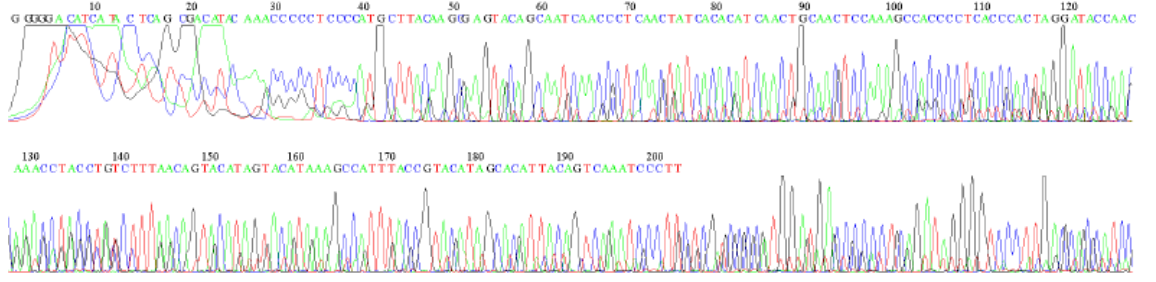
Şekil 4.41: KM17a örneğinin *d-loop* bölgesinin 4. amplicon dizisi.



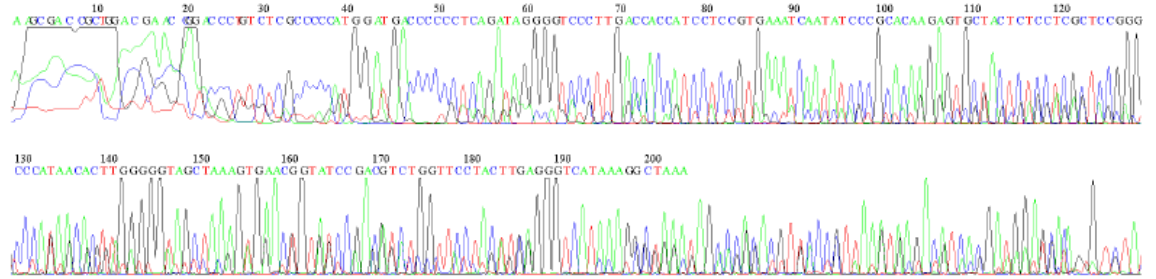
Şekil 4.42: KM17a örneğinin *d-loop* bölgesinin 5. amplicon dizisi.



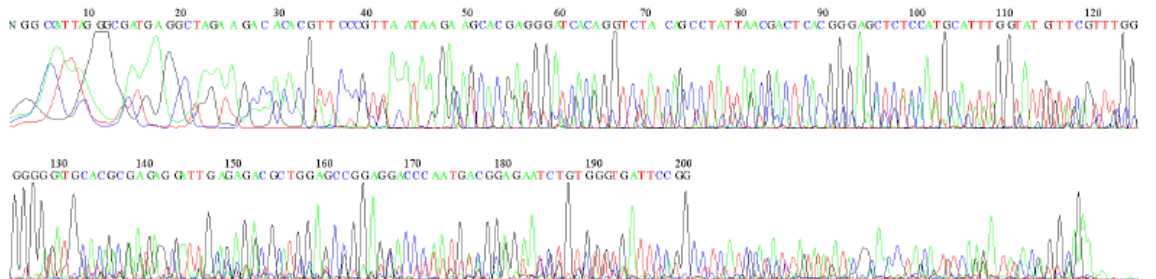
Şekil 4.43: KM17a örneğinin *d-loop* bölgesinin 6. amplicon dizisi.



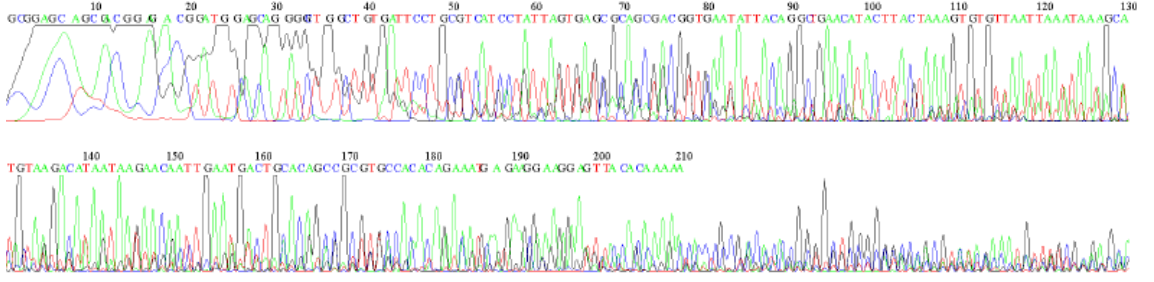
Şekil 4.47: KM17b örneğinin d-loop bölgesinin 2. amplikon dizisi.



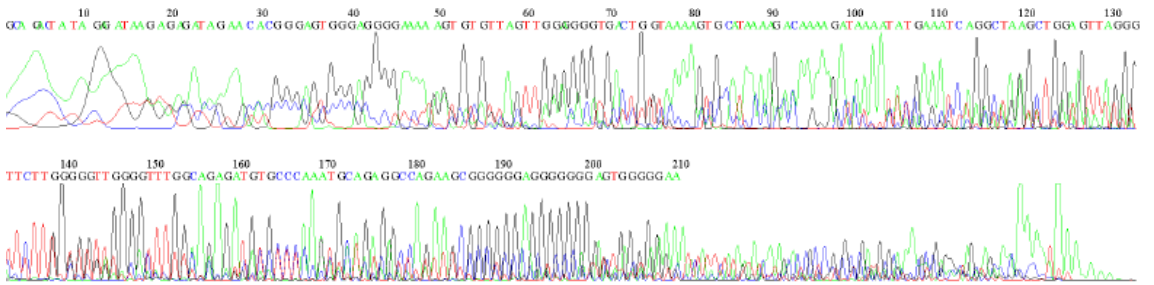
Şekil 4.48: KM17b örneğinin d-loop bölgesinin 3. amplikon dizisi.



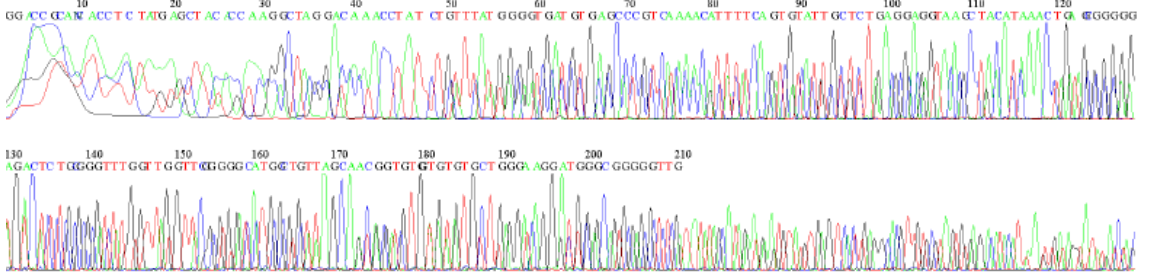
Şekil 4.49: KM17b örneğinin d-loop bölgesinin 4. amplikon dizisi.



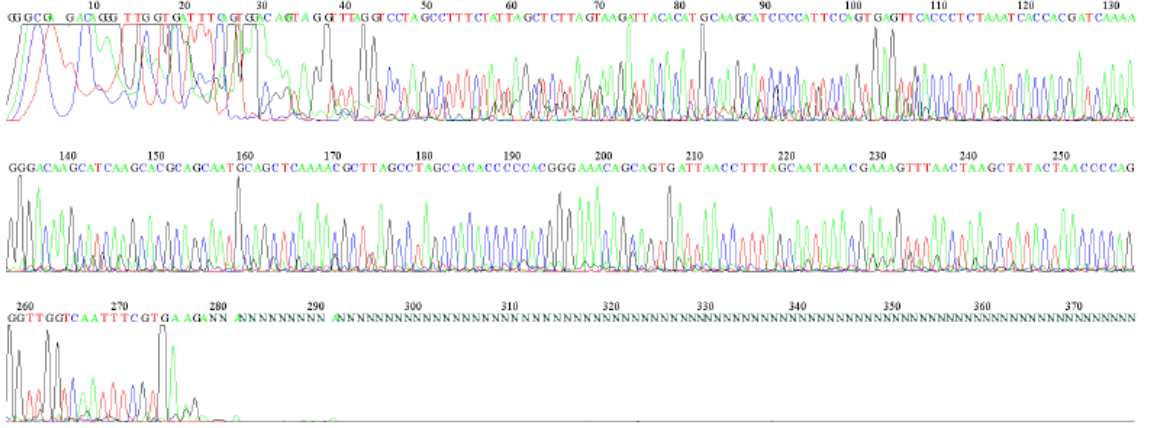
Şekil 4.50: KM17b örneğinin *d-loop* bölgesinin 5. amplicon dizisi.



Şekil 4.51: KM17b örneğinin *d-loop* bölgesinin 6. amplicon dizisi.

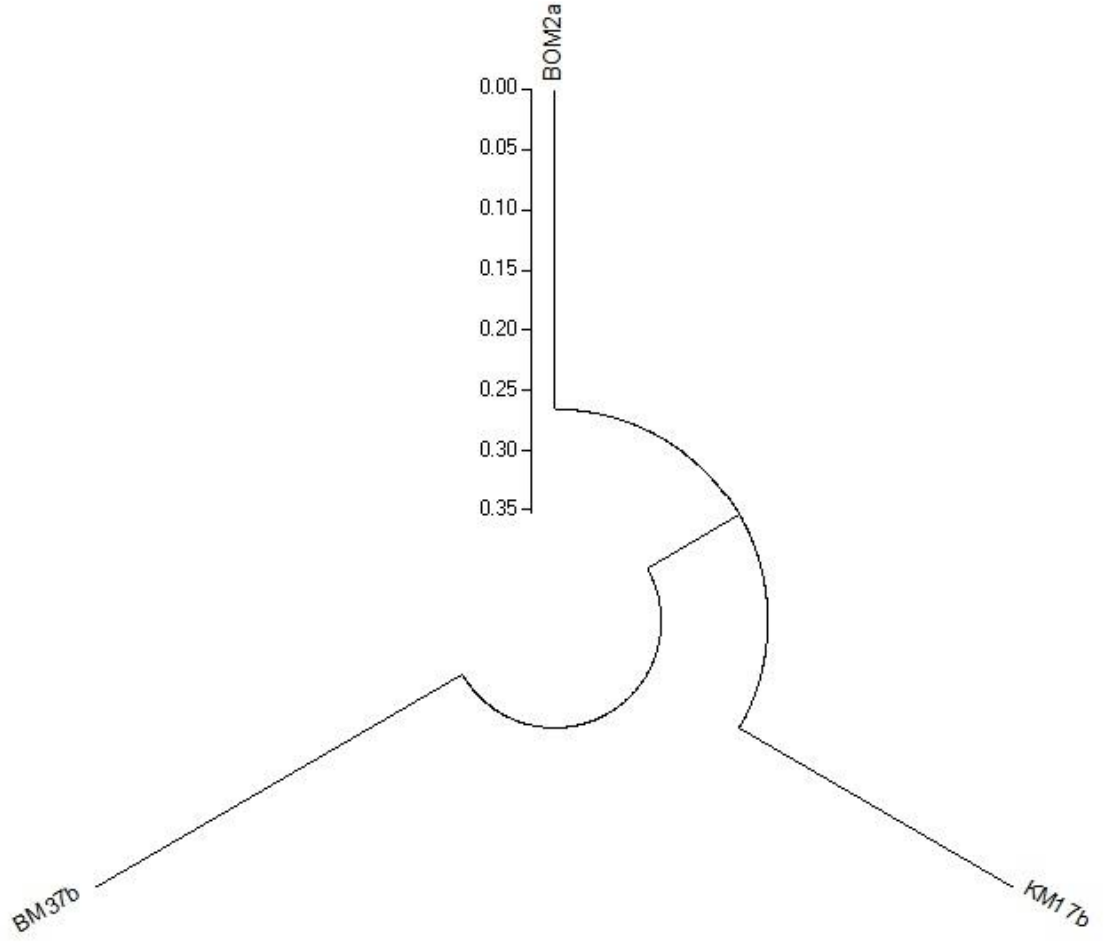


Şekil 4.52: KM17b örneğinin *d-loop* bölgesinin 7. amplicon dizisi.



Şekil 4.53: KM17b örneğinin *d-loop* bölgesinin 8. amplicon dizisi.

Dizileme sonuçları değerlendirildiğinde, dizileme kalitesinin, aDNA'nın hasarlı yapısı ve kontaminasyondan dolayı düşük olduğu gözlemlendi. İlk olarak tüm örnekler rCRS'ye göre hizalandı ve hatalı örnekler tespit edildi. Yüksek oranda hatalı olduğu tespit edilen BM37a, BOM2b ve KM17a olmak üzere üç örnek analiz sonuçlarına katılmadı. Daha sonra bireylerin birbirleriyle olan ilişkilerini göstermek amacıyla MEGA4 yazılımı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu. Evrimsel akrabalık ağacına bakıldığında, BOM2 örneği ile KM17 örneğinin birbirlerine BM37 örneğinden daha yakın olduğu saptandı (Şekil 4.54).



Şekil 4.54: Neighbour-joining metodu ile çizilen evrimsel akrabalık ağacı.

Çalışmada kullanılan üç örneğin, MITOMAP yazılımı ile haplo-grupları tespit edildi. Dizilemeleri yapılan üç bireye ait haplo-grup tespitleri ve genomda saptanan varyasyonlar Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2: *D-loop* bölgesi dizilerine göre yapılan haplo-grup tespitleri.

Birey	Haplo-grup	Varyasyonlar
BM37	H1e	C27G, T42A, C122G, A123G, T155G, T158A, T159G, C164G, C164G, C166A, C166A, T168G, G171A, C174G, T177d, T180A, A183G, T208A, T223A, T226C, T236A, T252A, A257G, C261G, A263G, T265G, C273A, A297C, A300C, C309CCCT, T310C, A335G, A448C, T455TT, A470G, C527T, A647G, G709A, A750G, T789G, A819C, T825C, G834T, A846G, AT16007d, A16011T, T16015G, T16027TA, T16028G, C16056G, C16072G, T16094G, C16099G, C16107G, T16131A, C16151G, T16154G, C16186A, T16462G, C16549G, A16554G
BOM2	H3c	C27G, C122G, A123G, C166A, G171A, A175C, T177d, A181T, T195C, C198T, T223C, A227C, G229d, G247C, C253T, A259C, G260C, A263C, A263G, A270C, A272C, A274C, A286C, A297C, A300C, C309CCCT, T310C, T455TT, A472C, A479d, G513C, A515T, A517T, A519C, G564T, A581T, G611T, A16206G, A16210AG, C16222CG, C16248CG, T16372TA
KM17	H7	C27G, T60TT, C64T, C110G, T115A, C122G, A123G, T125A, C132G, T134G, T142G, T157G, T159G, T161G, C162G, T168G, G171A, T172G, C174G, T177G, G228A, A259G, A263G, T265G, A281G, T282G, A284G, C285G, A291T, A291d, A297C, C299A, A301C, A302C, C315CC, A326T, A328T, C332T, A335G, A336G, A337G, C345T, G347T, A359C, A360C, A385G, A388T, A390G, A396T, G409T, G410T, G412T, G413T, T416d, A446G, T449C, T450C, A451d, A470G, T471G, T474C, C483T, A484T, C527T, A565T, A599G, C628G, A648G, T655A, T656G, G709A, A750G, G16129A, T16231G, C16292T, C16294T, C16296T, T16362C, C16408G, C16549G

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada İzmir İli Nif Dağı Kazılarının Karamattepe, Ballıcaoluk ve Başpınar olmak üzere üç farklı araştırma alanından çıkarılan iskeletlerin mitokondriyal haplo-gruplarının ve birbirleriyle olan akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu hedefe yönelik olarak, üç bireyin dış örneklerinden DNA izolasyonları yapıldı ve mtDNA *d-loop* bölgeleri dizilendi ve biyoinformatik yöntemler kullanılarak haplo-grup tespitleri yapıldı. Haplo-grup verilerine bakıldığında, KM17 bireyinin H7, BM37 bireyinin H1e, BOM2 bireyinin ise H3c haplo-grubuna dâhil olabileceği saptandı.

Bireylerden izole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre, DNA miktarı ve saflık değerinin aDNA çalışmaları açısından başarılı olduğu belirlendi (Tablo 4.1). Uzun yıllar toprak altında kalmış olması nedeniyle DNA miktarı ve kalitesinin düşük olması aDNA çalışmalarının ortak sorunudur. Rohland ve Hofreiter, yaptıkları çalışmada (2007), üç farklı klasik yöntem ile üç farklı ticari kiti denemişler ve aDNA izolasyon sonuçlarını karşılaştırmışlardır. İzole edilen aDNA'ları kantitatif PCR (qPCR) ile çoğaltılarak her bir gramdaki kopya sayısını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmaya göre, klasik yöntemlerden silika temelli izolasyon metodunun ve ticari kitlerden DNA IQ System (Promega) kitinin en başarılı sonuçları verdiği saptanmıştır. Aynı çalışmada silika temelli klasik izolasyon metodu optimize edilmiş ve aDNA çalışmalarında daha başarılı sonuçlar elde edilmesi sağlanmıştır. Yaptığımız çalışmada, hızlı ve güvenilir olması nedeniyle ticari olarak satın alınan The Invisorb Spin Forensic Kit kullanılmıştır. Bu kitin tercih edilmesinin en önemli sebebi, aDNA'da olduğu gibi genellikle parçalanmış ve az miktardaki DNA örnekleriyle çalışmalar yapan adli genetik alanına özgü üretilmiş olmasıdır (Wurmb ve diğ., 2001). Kitin prosedürü aDNA'nın biyokimyasal özellikleri göz önünde bulundurularak modifiye edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, örneklerden izole edilen mtDNA'ların *d-loop* bölgelerinin başarılı bir şekilde çoğaltılabilmesi amacıyla farklı PCR protokolleri denendi. En başarılı sonucun betain (2-trimethylammonioacetate) eklenerek High Fidelity PCR Master Kiti ile yapılan Touch-down PCR yönteminden alındığı saptandı (Şekil 4.5). Bu yöntem ile tüm örneklerle ait mtDNA *d-loop* bölgeleri çoğaltılabildi ve daha sonra dizileme işlemi gerçekleştirildi. Matheson ve arkadaşları (2014), primerlerin kalıp DNA'ya bağlanma sıcaklığını her bir döngüde azaltarak gerçekleştirdikleri Touch-down PCR metodunda, bağlanma

etkinliğinin arttığını bildirmişlerdir. Henke ve arkadaşları (1997) yaptıkları çalışmada ise betainin kimyasal yapısından dolayı, kullanılan primerlerin DNA'ya bağlanma özgünlüğünü artırdığını rapor etmişlerdir.

Çalışmada Touch-down PCR tekniği kullanılarak çoğaltılan *d-loop* bölgelerinin dizileme kromatogramlarına bakıldığında (Şekil 4.6 – 4.53), arka planda yoğun miktarda istenmeyen dalgalanmalar (gürültü) bulunduğu tespit edildi. Bu nedenle, bu çalışmada yer alan BM37a, BOM2b ve KM17a bireylerine ait örnekler yanlış sonuçlara sebep olabileceğinden dolayı analizlerden çıkartıldı.

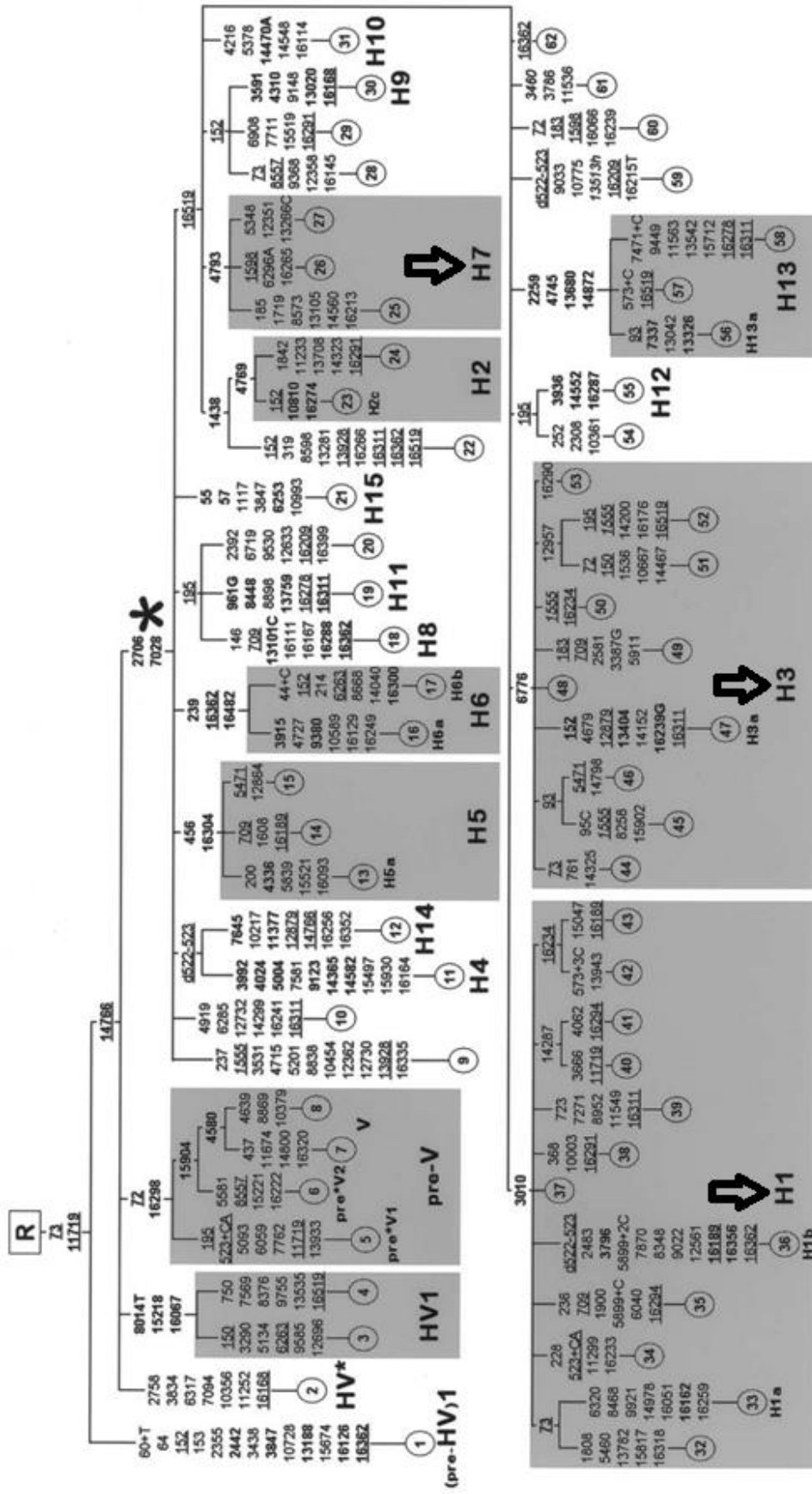
Çalışmada örnek alınan üç bireyin birbirleriyle olan ilişkileri, çizilen neighbour-joining evrimsel ağacında gösterildi (Şekil 4.54). Neighbour-joining algoritması, mesafe temelli evrimsel ağaç çizim yöntemlerindedir (Allmer, 2012). Evrimsel ağaçta birbiriyle yakın ilişkide oldukları saptanan, BOM2 (Balıcaoluk) ile KM17 (Karamattepe) bireylerinin yaşadıkları bölgeler, coğrafik olarak yakın konumlarda buldukları gibi, aynı zamanda bu bireylerin tarihsel olarak da birbirlerine yakın dönemde yaşamış olabilecekleri arkeologlar tarafından rapor edilmiştir (Tulunay, 2012). BM37 kodlu Başpınar mevkiinde, Bizans Döneminde yaşamış olduğu rapor edilen bireyin ise evrimsel ağaçta, diğerlerinden evrimsel akrabalık açısından daha uzakta konumlandığı saptandı. Dolayısıyla bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, arkeolojik araştırmalarda elde edilen tarihsel verileri destekler niteliktedir.

Bu araştırmada saptanan haplo-grup verilerine bakıldığında, KM17 bireyinin H7, BM37 bireyinin H1e, BOM2 bireyinin ise H3c haplo-grubuna dâhil olabileceği saptandı (Tablo 4.2). H üst haplo-grubu, günümüz Avrupa popülasyonunun yaklaşık olarak %41'inin dâhil olduğu haplo-gruptur. H haplo-grubu, Son Buzul Maksimum'dan (Last Glacial Maximum-LGM) hemen önce (günümüzden yaklaşık 20 bin yıl önce) Asya'da HV haplo-grubundan kökenlenmiş ve Avrupa'ya yayılarak LGM'nin sonunda yüksek miktarda çeşitlilik kazanmıştır (Şekil 5.1). H1 ve H3 haplo-grupları bu dönemde ortaya çıkan haplo-gruplar olmakla birlikte, günümüzde Avrupa popülasyonunun büyük kısmında görülmektedir. H1e ve H3c alt haplo-grupları ise günümüzde Bask toplumuyla ilişkilidir. H7 haplo-grubu ise Yakın Doğu popülasyonlarında temsil edilmektedir (Achilli ve diğ., 2004).

Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre, mtDNA'nın *d-loop* bölgesindeki varyasyonlara göre H haplo-grubuna dâhil olduğu tespit edilen Karamattepe, Ballıcoluk ve Başpınar bireylerinin, Batı Avrupa ve Yakın Doğu toplumlarıyla ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Hem Nif Dağı'na hem de Batı Anadolu'ya dair tüm göç örüntülerinin ortaya çıkarılabilmesi için, farklı kazı alanlarından çıkarılan daha fazla bireyin aDNA verileri ile yapılan popülasyon genomik çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Anadolu coğrafyası tarih öncesi dönemlerden itibaren birçok uygarlığın uğrak noktası olmuştur. Konumu nedeniyle tarih öncesi dönemlerde önemli bir göç yolu olmuş, verimli toprakları sayesinde tarım sonrası dönemlerde birçok uygarlığa ev sahipliği yapmıştır. Ayrıca yine "Baharat Yolu", "İpek Yolu" gibi Asya'yı Avrupa'ya bağlayan ticaret yollarını barındırması ve "Bereketli hilal"e yakınlığı Anadolu topraklarının her dönem dünya tarihinde önemli bir yere sahip olmasını sağlamıştır. Şu ana kadar yapılan arkeolojik, antropolojik ve tarihsel çalışmalar Anadolu tarihinin ortaya çıkarılmasında önemli bir yere sahiptir.

Sonuç olarak bu tez projesi Türkiye'de, Anadolu'nun göç rotasının belirlenmesi amacıyla yapılan ilk aDNA çalışmasıdır. Türkiye'de sosyal bilimler ile doğa bilimleri arasında yapılan az sayıda disiplinler arası çalışmaya örnek teşkil etmesi bakımından öncü bir çalışma niteliğindedir.



Şekil 5.1: Mitokondriyal H haplo-grubunun evrimsel ağacı (Achilli ve diğ., 2004).

KAYNAKLAR

- Achilli, A., Rengo, C., Magri, C., Battaglia, V., Olivieri, A., Scozzari, R., Cruciani, F., Zeviani, M., Briem, E., Carelli, V., Moral, P., Dugoujon, J., Roostalu, U., Loogväli, E., Kivisild, T., Bandelt, H., Richards, M., Villems, R., Santachiara-Benerecetti, A. S., Semino, O., Torroni, A., 2004. The Molecular Dissection of mtDNA Haplogroup H Confirms That the Franco-Cantabrian Glacial Refuge Was a Major Source for the European Gene Pool. *American journal of human genetics*. 75, s. 910-918.
- Adams, B. J. ve Crabtree, P. J., 2008. *Comparative skeletal anatomy*. New York: Humana Press.
- Adcock, G. J., Dennis, E.S., Eastal S., Huttley G.A., Jermin L.S., Peacock W.J., Thorne A., 2011. Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: implications for modern human origins. *Proceedings of the national academy of sciences*, 98(2), s. 537-542.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M. Roberts, K. Walter, P., 2001. *The molecular biology of the cell*. 4 b. New York: Garland Science.
- Allentoft, M. E., Collins, M., Harker, D., Haile, J., Oskam, C. L., Hale, M. L., Campos, P. F., Samaniego, J. A., Gilbert, M. T. P., Willerslev, E., Zhang, G., Scofield, R. P., Holdaway, R. N., Bunce, M., 2012. The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proceedings of the royal society B*, 279(1748), s. 4724-33.
- Allmer, J., 2012. *Biyoenformatik I dizi kıyaslamaları*, İstanbul: Nobel Yayıncılık.
- Briggs, A. W. ve Heyn, P., 2012. Preparation of Next-Generation Sequencing Libraries from Damaged DNA., B. Shapiro ve M. Hofreiter, *Ancient DNA methods and protocols içinde*. Springer, s. 143-154.
- Buikstra, J. E. ve Ubelaker, D. H., 1994. *Standarts for data collection from Human Skeletal Remains*. Arkansas: Arkansas University Press.
- Cann, R. L., Stoneking, M. ve Wilson, A. C., 1987. Mitochondrial DNA ve Human Evolution. *Nature*, 325, s. 31-36.
- Caramelli, D., Lalueza-Fox, C., Vernesi, C., Lari, M., Casoli, A., Mallegni, F., Chiarelli, B., Dupanloup, I., Bertranpetit, J., Barbujani, G., Bertorelle, G., 2003. Evidence for a genetic discontinuity between Neanderthals and 24000-year-old anatomically modern Europeans. *Proceedings of the national academy of sciences*, 100(11), s. 6593-6597.
- Carelli, V., Achilli, A., Valentino, M. L., Rengo, C., Semino, O., Pala, M., Olivieri, A., Mattiazzi, M., Pallotti, F., Carrara, F., Zeviani, M., Leuzzi, V., Carducci, C., Valle, G., Simionati, B., Mendieta, L., Salomao, S., Belfort, R., Sadun, A. A., Torroni, A., 2006. Haplogroup Effects and Recombination of Mitochondrial DNA: Novel Clues from the Analysis of Leber Hereditary Optic Neuropathy Pedigrees. *The American journal of human genetics*, 78, s. 564-574.

- Cavalli-Sforza, L. L., 1994. *The history and geography of human genes*. Princeton: Princeton University Press.
- Cooper, A. ve Haak, W., 2010. *Sampling guide*. [Çevrimiçi]<http://www.adelaide.edu.au/> [11.02.2015 tarihinde erişildi].
- Cooper, A. ve Poinar, H. N., 2000. Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science*, 289(5482), s. 1139.
- Dabney, J., Meyer, M. ve Pääbo, S., 2013. Ancient DNA Damage. *Cold spring harbor perspective biology*, s. 1-7.
- Darwin, C. R., 1859. *Türlerin kökeni*. (Öner Ünalın, Çev.) 4 b. (2013) İstanbul: Evrensel Basım Yayın.
- Der Sarkissian, C., Allentoft, M. E., Avila-Arcos, M. C., Barnett, R., Campos, P. F., Cappellini, E., Ermini, L., Fernandez, R., da Fonseca, R., Ginolhac, A., Hansen, A., Jonsson, H., Korneliusson, T., Margaryan, A., Martin, M. D., Moreno-Mayar, J. V., Raghavan, M., Rasmussen, M., Velasco, M. S., Schroeder, H., Schubert, M., Seguin-Orlando, A., Wales, N., Gilbert, M. T. P., Willerslev E., Orlando, L., 2015. Ancient genomics. *Philosophical transactions of the royal society B*, 370(20130387).
- Eriksen, T. H. ve Nielsen, F. S., 2011. *Antropoloji tarihi*. 1 b. İstanbul: İletişim Yayınları.
- Ermini, L., Olivieri, C., Rizzi, E., Corti, G., Bonnal, R., Soares, P., Luciani, S., Marota, I., De Bellis, G., Richards, M. B., Rollo, F., 2008. Complete mitochondrial genome sequence of the Tyrolean Iceman. *Current biology*, 18(21), s. 1687-1693
- Ertan, H., 2010. *Biyolojik evrim kuramının arkasındaki yaşam Charles Robert Darwin*. 1 b. İstanbul: İş Bankası Kültür Yayınları.
- Franklin, R. E. ve Gosling, R. G., 1953. Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature*, 171(4356), s. 740-741.
- Futuyma, D., 2008. *Evrin*. Ankara: Palme Yayıncılık.
- Gamba, C., Jones, E. R., Teasdale, M. D., McLaughlin, R. L., Gonzalez-Fortes, G., Mattiangeli, V., Domboroczki, L., Kovari, I., Pap, I., Anders, A., Whittle, A., Dani, J., Raczky, P., Higham, T. F. G., Hofreiter, M., Bradley, D. G., Pinhasi, R., 2014. Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nature communications*, 5(5257), s. 1-9.
- George, C. M., Gao, Y. ve Kosuri, S., 2012. Next-Generation Digital Information Storage in DNA, *Science*, 337(6102), s. 1628.
- Haak, W., Forster, P., Bramanti, B., Matsumura, S., Brandt, G., Tanzer, M., Vilems, R., Renfrew, C., Gronenborn, D., Alt, K. W., Burger, J., 2005. Ancient DNA from the First European Farmers in 7500-Year-Old Neolithic Sites. *Science*, 310, s. 1016-1018.

- Haak, W., Lazaridis, I., Patterson, N., Rohland, N., Mallick, S., Llamas, B., Brandt, G., Nordenfelt, S., Harney, E., Stewardson, K., Fu, Q., Mittnik, A., Bánffy, E., Economou, C., Francken, M., Friederich, S., Pena, R. G., Hallgren, F., Khartanovich, V., Khokhlov, A., Kunst, M., Kuznetsov, P., Meller, H., Mochalov, O., Moiseyev, V., 2015. Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe. *Nature*, doi: 10.1038/nature14317
- Hagelberg, E., Hofreiter, M. ve Keyser, C., 2015. Ancient DNA: The first three decades. *Philosophical transactions of the royal society B*, 370(20130371), s. 1-4.
- Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D., Loening, S. A., 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic acids research*, 25(19), s. 3957-3958.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. A., Wilson, A. C., 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312, s. 282-284.
- Hillson, S., 2005. *Teeth*. 2 b. Cambridge: Cambridge University Press.
- Hoeijmakers, J. H. J., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, s. 366-374.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S. ve Gyllensten, U., 2000. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature*, 408, s. 708-713.
- Karp, G., 2009. *Cell and molecular biology: Concepts and experiments*. 6 b. s.l.:Wiley.
- Kottak, C. P., 2014. *Antropoloji insan çeşitliliğinin önemi*. Ankara: De Ki Yayınları.
- Krebs, J. E., Goldstein, E. S. ve Kilpatrick, S. T., 2012. *Lewin's genes XI*. 11 b. s.l.: Jones ve Bartlett Learning.
- Krings, M., Stone, A. C., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., Stoneking, M., Pääbo, S., 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, 90(1), 19-30.
- Malyarchuk, B., Derenko, M., Grzybowski, T., Perkova, M., Rogalla, U., Vanecek, T., Tsybovsky, I., 2010. The Peopling of Europe from the Mitochondrial Haplogroup U5 Perspective. *Public library of science one*, 5(4), s. e10285.
- Manfredi, G., Thyagarajan, D., Papadopoulou, L. C., Pallotti, F., Schon, E. A., 1997. The Fate of Human Sperm-Derived mtDNA in Somatic Cells. *American journal of human genetics*, 61, s. 953 -960.
- Matheson, C. D., David, R., Spigelman, M. ve Donoghue, H. D., 2014. Molecular Confirmation of and Family Relationship in two Ancient Egyptian Mummies. *Yearbook of mummy studies*, 2, s. 39-47.
- Mendel, G., 1865. Versuche uber Pflanzenhybriden. *Vorgelegt in den Sitzungen*, 8, s. 4-46.

- Monot, M., Honore, N., Garnier, T., Zidane, N., Sherafi, D., Paniz-Mondolfi, A., Matsuoka, M., Taylor, G. M., Donoghue, H. D., Bouwman, A., Mays, S., Watson, C., Lockwood, D., Khamesipour, A., Dowlati, Y., Jianping, S., Rea, T. H., Vera-Cabrera, L., Stefani, M. M., Banu, S., Macdonald, M., Sapkota, B. R., Spencer, J. S., Thomas, J., Harshman, K., Singh, P., Busso, P., Gattiker, A., Rougemont, J., Brennan, P. J., Cole, S. T., 2009. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nature genetics*, 41, s. 1282 - 1289.
- Moorehead, A., 2005. *Darwin ve beagle serüveni*. 4 b. Ankara: Tübitak Yayınları.
- Morgan, T. J., Uomini, N. T., Rendell, L. E., Chouinard-Thuly, L., Street, S. E., Lewis, H. M., Cross, C. P., Evans, C., Kearney, R., de la Torre, I., Whiten, A., Laland, K. N., 2015. Experimental evidence for the co-evolution of hominin tool-making teaching and language. *Nature communications*, 6(6029).
- Mullis, K. B., 1987. *Process for amplifying nucleic acid sequences*. US California, Patent No. 4,683,202.
- Orlando, L., Ginolhac, A., Raghavan, M., Vilstrup, J., Rasmussen, M., Magnussen, K., Steinmann, K. E., Kapranov, P., hompson, J. F., Zazula, G., Froese, D., Moltke, I., Shapiro, B., Hofreiter, M., Al-Rasheid, K. A. S., Gilbert, M. T. P., Willerslev, E., 2011. True single-molecule DNA sequencing of a pleistocene horse bone. *Genome research*, 21, s. 1705–1719.
- Ovchinnikov, I. V., Götherström, A., Romanova, G. P., Kharitonov, V. M., Lidén, K. Goodwin, W., 2000. Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature*, 404, s. 490-493.
- Özbek, M., 2007. *Dünden bugüne insan*. 2 b. Ankara: İmge Yayınevi.
- Pääbo, S., 1985. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, 314, s. 644-645.
- Pääbo, S., 2014. *Neanderthal man: In search of lost genomes*. 1 b. New York: Basic Books.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L., Hofreiter, M., 2004. Genetic analysis from ancient DNA. *Annual review of genetics*, 38, s. 645-679.
- Pakendorf, B. ve Stoneking, M., 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annual reviews of genomics and human genetics*, 6, s. 165–83.
- Pala, M., Olivieri, A., Achilli, A., Accetturo, M., Metspalu, E., Reidla, M., Tamm, E., Karmin, M., Reisberg, T., Kashani, B. H., Perego, U. A., Carossa, V., Gandini, F., Pereira, J. B., Soares, P., Angerhofer, N., Rychkov, S., Al-Zahery, N., Carelli, V., Sanati, M. H., Houshmand, M., Hatina, J., MacAulay, V., Pereira, L., Woodward, S. R., Davies, W., Gamble, C., Baird, D., Semino, O., Villems, R., Torroni, A., Richards, M. B., 2012. Mitochondrial DNA Signals of Late Glacial Recolonization of Europe from Near Eastern Refugia. *The American journal of human genetics*, 90, s. 915–924.

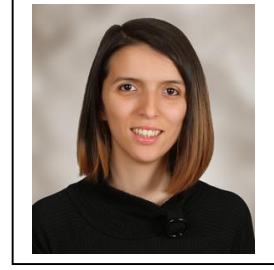
- Parks, M., Subramanian, S., Baroni, C., Salvatore, M. C., Zhang, G., Millar, C. D., Lambert, D. M., 2015. Ancient population genomics and the study of evolution. *Philosophical transactions of the royal society B*, 370(20130381).
- Peker, M., 2013. A double bone comb from Karamattepe, the Nif Mountain excavation. *Oxford journal of archeology*, 32(2), s. 147-161.
- Pennisi, E., 2010. Synthetic Genome Brings New Life to Bacterium. *Science*, 21 05, s. 958-959.
- Rajan, K. S., 2012. *Biyokapital genom-sonrası hayatın kuruluşu*. 1 b. İstanbul: Metis Yayıncılık.
- Rasmussen, M., Li, Y., Lindgreen, S., Pedersen, J. S., Albrechtsen, A., Moltke, I., Metspalu, M., Metspalu, E., Kivisild, T., Gupta, R., Bertalan, M., Nielsen, K., Gilbert, M. T. P., Wang, Y., Raghavan, M., Campos, P. F., Kamp, H. M., Wilson, A. S., Gledhill, A., Tridico, S., Bunce, M., Lorenzen, E. D., Binladen, J., Guo, X., Zhao, J., Zhang, X., Zhang, H., Li, Z., Chen, M., Orlando, L., Kristiansen, K., Bak, M., Tommerup, N., Bendixen, C., Pierre, T. L., Grønnow, B., Meldgaard, M., Andreasen, C., Fedorova, S. A., Osipova, L. P., Higham, T. F., Ramsey, C. B., Hansen, T. V., Nielsen, F. C., Crawford, M. H., Brunak, S., Sicheritz-Pontén, T., Villems, R., Nielsen, R., Krogh, A., Wang, J., Willerslev, E., 2010. Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature*, 463, s. 757-762.
- Reich, D., Green, R. E., Kircher, M., Krause, J., Patterson, N., Durand, E. Y., Viola, B., Briggs, A. W., Stenzel, U., Johnson, P. L. F., Maricic, T., Good, J. M., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Fu, Q., Mallick, S., Li, H., Meyer, M., Eichler, E. E., Stoneking, M., Richards, M., Talamo, S., Shunkov, M. V., Derevianko, A. P., Hublin, J. J., Kelso, J., Slatkin, M., Pääbo, S., 2010. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature*, 468, s. 1053-1060.
- Reich, D., Patterson, N., Kircher, M., Delfin, F., Nandineni, M. R., Pugach, I., Ko, A. M. S., Ko, Y. C., Jinam, T. A., Phipps, M. E., Saitou, N., Wollstein, A., Kayser, M., Pääbo, S., Stoneking, M., 2011. Denisova admixture and the first modern human dispersals into Southeast Asia and Oceania. *The American journal of human genetics*, 89, s. 516-528.
- Richards, M. B., Macaulay, V. A., Bandelt, H. J. ve Sykes, B. C., 1998. Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Annals of human genetics*, 62(3), s. 241-260.
- Ridley, M., 2007. *Genom: Bir türün yirmi üç bölümlük otobiyografisi*. 1 b. İstanbul: Boğaziçi Üniversitesi Yayınları.
- Rohland, N. ve Hofreiter, M., 2007. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques*, 42, s. 343-352.
- Rollo, F., Ubaldi, M., Ermini, L., Marota, I., 2002. Ötzi's last meals: DNA analysis of the intestinal content of the Neolithic glacier mummy from the Alps. *Proceedings of the national academy of sciences*, 99(20), s. 12594-12599.

- Ruiz-Pesini, E., Lott, M. T., Procaccio, V., Poole, J. C., Brandon, M. C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P., Wallace, D. C., 2007. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic acids research*, 35, s. 823-828.
- Shapiro, B., 2013. Ancient DNA. In: J. B. Losos, b. *The Princeton guide to evolution*. Princeton University Press, s. 475-481.
- Shapiro, B. ve Hofreiter, M., 2012. *Ancient DNA methods and protocols*. Londra: Springer.
- Shapiro, B. ve Hofreiter, M., 2014. A Paleogenomic Perspective on Evolution and Gene Function: New Insights from Ancient DNA. *Science*, 343.
- Somel, M., 2003. *Anadolu kökenli arkeolojik buğday (Triticum l.) tohumlarından elde edilen DNA'nın karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi: ODTÜ.
- Stoneking, M. ve Soodyall, H., 1996. Human Evolution and the Mitochondrial Genome. *Current opinion in genetics and devolopment*, 6, s. 731-736.
- Templeton, A. R., Routman, E. ve Phillips, C. A., 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140(2), s. 767-782.
- Torroni, A., Huoponen, K., Francalacci, P., Petrozzi, M., Morelli, L., Scozzari, R., Obinu, D., Savontaus, M. L., Wallace, D. C., 1996. Classification of European mtDNAs From an Analysis of Three European Populations. *Genetics*, 144, s. 1835-1850.
- Torroni, A., Schurr, T. G. ve Yang, C.-C., 1992. Native American Mitochondrial DNA Analysis Indicates That the Amerind and The Nadene Populations were Founded by Two Independent Migrations. *Genetics*, s. 153-162.
- Torroni, A., Achilli, A., Macaulay, V., Richards, M., Bandelt, H. J., 2006. Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends in genetics*, 22(6), s. 339-345.
- Tulunay, E. T., 2012. Smyrna (İzmir) Yakınlarında birçok kültürü barındıran dağ: Nif (Olympos). *Colloquium anaticum*, XI, s. 81-99.
- van Holst Pellekaan, S. M., Ingman, M., Roberts-Thomson, J., Harding, R. M., 2006. Mitochondrial genomics identifies major haplogroups in Aboriginal Australians. *American journal of physical anthropology*, 131(2), s. 282-294.
- van Oven, M., 2014. *PhyloTree*. [Çevrimiçi] <http://www.phyloTree.org/tree/main.htm> [12.02.2015 tarihinde erişildi].
- van Oven, M. ve Kayser, M., 2008. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human mutation*, 29(1039), s. 386-394.
- Watson, J. D. ve Crick, F. H. C., 1953. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171, s. 737-738.

White, T. D., Black, M. T. ve Folkens, P. A., 2012. *Human osteology*. 3. b. San Diego: Academic Press.

Wurmb, N., Meissner, D. ve Wegener, R., 2001. Influence of cyanoacrylate on the efficiency of forensic PCRs. *Forensic science international*, 124, s. 11-16.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Nefize Ezgi ALTINIŞIK
Uyruğu	TC
Doğum tarihi, Yeri	16.12.1989 – Bursa
Telefon	05075376576
E-mail	ezgialtinisik@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Lisans	İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2011
Lise	Bursa Cumhuriyet Lisesi (YDA)	2007