



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BALIKESİR/ANTANDROS ANTİK KENTİ KAZISI TOPRAK
ÖRNEKLERİNİN METAGENOMİK ANALİZİ**

Dilan BAL

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ercan ARICAN**

Haziran, 2019

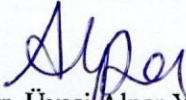
İSTANBUL

Bu çalışma, 18.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

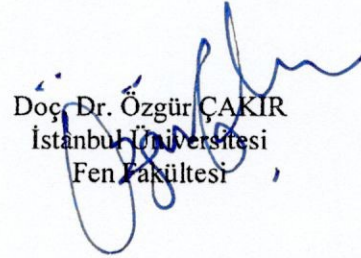
Tez Jürisi



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



Dr. Öğr. Üyesi Alper YILMAZ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Kimya-Metalurji Fakültesi



Doç. Dr. Özgür ÇAKIR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 22680 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca benden desteklerini esirgemeyen, tez sürecimde bana fikirleriyle yol gösteren danışmanım **Prof. Dr. Ercan ARICAN**'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasında kullanılan toprak örneklerinin toplandığı Antandros Antik Kenti kazısının Başkanı **Prof. Dr. Gürkan POLAT**'a ve tüm Antandros kazı ekibine yardımlarından, katkılarından ve desteklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Tezimin biyoinformatik analiz basamağında kıymetli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan **Dr. Öğr. Üyesi Alper YILMAZ**'a katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim ve tez sürecim boyunca yanımda olan arkadaşım **Bereste BALCI**'ya, değerli arkadaşlarım **Olca ŞAHİN**, **Nagihan TOMBUL**, **Tuğçe BEYAZAY**'a, kazı süresi boyunca ve sonrasında yardımlarını esirgemeyen **Ecem BAYSU**'ya ve tezimin biyoinformatik analiz basamağındaki yardımlarından dolayı **Muzaffer ARIKAN**'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu süreçte ellerindeki tüm imkanı ve desteği sunan değerli annem ve babam **Fidan BAL** ve **Süleyman BAL**'a ve manevi desteğini sürekli hissettiğim yol arkadaşım **Uğur ÖZKAYA**'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2019

Dilan BAL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. BALIKESİR/ANTANDROS ANTİK KENTİ.....	3
2.2. PALEOMİKROBİYOLOJİ.....	10
2.3. METAGENOMİK	11
2.3.1. Metagenomik Alanında Yapılan Çalışmalar	16
2.3.2. 16S rRNA Geni	18
2.3.3. İşlevsel Taksonomik Birimler (OTU'lar).....	21
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	24
3.1. BALIKESİR/ANTANDROS ANTİK KENTİ TOPRAK ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI	24
3.2. TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN DNA İZOLASYONU	26
3.3. PZR YÖNTEMİ İLE 16S RRNA GENİ V3-V4 BÖLGESİNİN ÇOĞALTILMASI.....	27
3.4. 16S RRNA GENİ V3-V4 BÖLGESİ ÇOĞALTILAN ÖRNEKLERİN ILLUMINA YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ İLE DİZİLENMESİ.....	29
3.5. DİZİLEME VERİLERİNİN METAGENOMİK ANALİZİ	30
3.5.1. Çoklu Okuma Sonuçlarını Biyolojik Örneklere Atama	30
3.5.2. İşlevsel Taksonomik Birimlerin (OTU'ların) Belirlenmesi.....	31
3.5.3. Her Bir OTU'yu Temsil Eden Dizin Belirlenmesi.....	32
3.5.4. Her Bir Temsilci Dizin Taksonomik Ataması.....	32
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59

KAYNAKLAR.....	64
EKLER	71
EK 1. Kuva-yi Milliye Müzesi Müdürlüğü Komisyon Raporu.....	71
EK 2. Kuva-yi Milliye Müzesi Müdürlüğü Komisyon Raporu (devamı).	72
EK 3. Müze Müdürü İzin Belgesi.....	73
EK 4. Kazı Başkanı İzin Belgesi.	74
ÖZGEÇMİŞ	75



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Antik Troas bölgesi.....	3
Şekil 2.2: Antandros Antik Kenti konumu.....	4
Şekil 2.3: 417 Numaralı mezar amphora (Antandros Kazı Arşivi).....	6
Şekil 2.4: 384, 388 ve 389 Numaralı mezar basit toprak gömü, 385 numaralı mezar amphora, 387 numaralı mezar pithos (Antandros Kazı Arşivi).	6
Şekil 2.5: 347 Numaralı mezar çatı kiremiti (Antandros Kazı Arşivi).	7
Şekil 2.6: 502 Numaralı mezar lahit(Antandros Kazı Arşivi).....	7
Şekil 2.7: 460 Numaralı mezar pithos (Antandros Kazı Arşivi).....	8
Şekil 2.8: 414 Numaralı mezar urne (Antandros Kazı Arşivi).....	8
Şekil 2.9: 213 Numaralı mezar, sunakla çevrili mezar örneği (Antandros Kazı Arşivi).	9
Şekil 2.10: Etrafı blok taşlarla çevrili (podyumlu) mezar örneği (Antandros Kazı Arşivi).....	9
Şekil 2.11: Metagenomik analiz basamakları (Schmeisser ve diğ., 2007).....	15
Şekil 2.12: 16S rRNA genindeki korunmuş ve çok değişken bölgelerin gösterimi. (Petrosino ve diğ, 2009).	18
Şekil 2.13: 16S rRNA geninin 2 boyutlu ve 3 boyutlu gösterimi (Yang ve diğ., 2016).	20
Şekil 2.14: 16S rRNA primer haritası (Yang ve diğ., 2016).....	20
Şekil 2.15: OTU ve %97 benzerlik eşiği ile kümeleme (Hiltemann ve Batut, 2017).	22
Şekil 2.16: İşlevsel taksonomik birim (OTU) kladogramı (Danzeisen ve diğ., 2013).....	23
Şekil 3.1: 2016 yılı nekropol genel plan kare (Antandros Kazı Arşivi).	25
Şekil 4.1: V3-V4 bölgesi PZR yöntemiyle çoğaltılan örneklerin elektroforez jel görüntüsü.	34
Şekil 4.2: 453 No'lu urne mezar, 453 No'lu mezar hediyesi HTJ 3 (Antandros Kazı Arşivi).....	34
Şekil 4.3: Kuzeydoğu Genişleme V, depolama amaçlı kullanıldığı düşünülen pithos (Antandros Kazı Arşivi).	35

Şekil 4.4: 490 No'lu çatı kiremiti mezar (Antandros Kazı Arşivi).....	36
Şekil 4.5: 493 No'lu pithos mezar (Antandros Kazı Arşivi).....	36
Şekil 4.6: 480 No'lu pithos mezar (Antandros Kazı Arşivi).....	37
Şekil 4.7: 486 No'lu çatı kiremiti mezar (Antandros Kazı Arşivi).....	38
Şekil 4.8: 487 No'lu pithos mezar (Antandros Kazı Arşivi).....	38
Şekil 4.9: 486 No'lu mezar hediyesi HUI 5 (Antandros Kazı Arşivi).....	39
Şekil 4.10: 1A-453 No'lu Mezar Hediyesi HTJ 3 örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	44
Şekil 4.11: 2A-Kuzeydoğu Genişleme V, depolama amaçlı pithos örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.	46
Şekil 4.12: 3Y-490 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	48
Şekil 4.13: 4A-493 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	50
Şekil 4.14: 5A-480 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	52
Şekil 4.15: 6A-486 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	54
Şekil 4.16: 7A-487 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	56
Şekil 4.17: 8A-486 No'lu mezar hediyesi HUI 5 örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.....	58

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: V1-V9 bölgelerinin 16S rRNA gen dizisi üzerinde başlangıç ve bitiş nükleotitleri (Chakravorty ve diğ., 2007).	19
Tablo 3.1: PZR için gerekli bileşenler.	28
Tablo 3.2: PZR koşulları.	28
Tablo 3.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.	29
Tablo 3.4: Örneklerle ait spesifik barkod dizileri.	31
Tablo 4.1: DNA izolasyonu yapılan örneklerin spektrofotometrik ölçüm değerleri.	33
Tablo 4.2: Her bir örnek için elde edilen barkod okuma sayısı.	42
Tablo 4.3: 1A-453 No'lu Mezar Hediyesi HTJ 3 örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.	43
Tablo 4.4: 2A-Kuzeydoğu Genişleme V, depolama amaçlı pithos örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.	45
Tablo 4.5: 3Y-490 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.	47
Tablo 4.6: 4A-493 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.	49
Tablo 4.7: 5A-480 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.	51
Tablo 4.8: 6A-486 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.	53
Tablo 4.9: 7A-487 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.	55
Tablo 4.10: 8A-486 No'lu mezar hediyesi HUI 5 örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.	57

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
∞	: Sonsuz
>	: Büyüktür
~	: Yaklaşık

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

bç	: Baz Çifti
C	: Sitozin
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EtBr	: Etidyum Bromür
G	: Guanin
kb	: Kilo Baz
km	: Kilometre
m	: Metre
M.Ö.	: Milattan Önce
M.S.	: Milattan Sonra
Mb	: Mega Baz
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
OTU	: İşlevsel Taksonomik Birim
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QIIME	: Quantitative Insights Into Microbial Ecology
rDNA	: Ribozomal DNA

rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
UV	: Ultraviyole
yy	: Yüzyıl
µl	: Mikrolitre
pH	: Potansiyel Hidrojen



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BALIKESİR/ANTANDROS ANTİK KENTİ KAZISI TOPRAK ÖRNEKLERİNİN METAGENOMİK ANALİZİ

Dilan BAL

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ercan ARICAN

Mikroorganizmalar, biyosferde varlığını sürdüren canlıların büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Kültürleme koşullarının kısıtlı olmasından dolayı biyosferdeki mikroorganizmaların tespiti ve teşhisi kolaylıkla yapılamamaktadır. Bugüne kadar, biyosferde bulunan mikroorganizmaların çok azı kültürleme metoduyla tespit ya da teşhis edilebilmiştir. Kültürlenmemiş ya da kültürlenemeyen mikroorganizmalar ise, mikrobiyal çeşitliliğin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Metagenomik analiz, kültürleme yapılmaksızın, çevreden direkt alınan örneklerin DNA izolasyonu sonrasında elde edilen mikroorganizmaların tür tayininin yapılmasına, genetik çeşitliliğinin, popülasyon yapısının ve bu mikroorganizmaların insan yaşantısını da etkileyen ekolojik rollerinin anlaşılmasına olanak vermektedir.

Metagenomik; ilaç, biyoyakıt, biyoteknoloji, tarım, ekoloji gibi birçok farklı çalışma alanında yardımcı disiplin olarak önemli rol oynamaktadır. Paleomikrobiyoloji çalışmalarında da son yıllarda sıkça kullanılmaya başlanan metagenomik, insanlık tarihindeki mikrobiyal evrim araştırmalarına katkı sunar ve bize geçmiş zamanların mikro ekosistemini anlama perspektifi verir.

Bu tez çalışmasında, Balıkesir/Antandros Antik Kenti nekropolünden kültürleme yapılmaksızın direkt alınan toprak örneklerindeki mikroorganizmaların DNA izolasyonu yapıldı ve sonrasında 16S rRNA genlerinin V3-V4 bölgeleri PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Çoğaltılan bölgeler Illumina

MiSeq sistemi ile dizilendi. Elde edilen dizilerin metagenomik analizi QIIME 1.9.1 kullanılarak yapıldı ve mikrobiyal çeşitlilik belirlendi.

Bu çalışma, Antandros Antik Kenti kazılarında elde edilen arkeolojik bulguların, metagenomik verilerle desteklenebileceğini, yapılan arkeolojik çalışmalara multidisipliner bakış açısıyla katkı sunulabileceğini, elde edilen verilerle geçmiş döneme dair tahmin ve yorumların yapılabileceğini gösterdi. Bu tez çalışması, Türkiye’de antik kentlerde yapılan ilk metagenomik çalışma olması sebebiyle önem arz etmektedir ve bu çalışmanın bu alanda yapılacak olan yeni çalışmalara katkı sunması beklenmektedir.

Haziran 2019, 90 sayfa.

Anahtar kelimeler: 16S rRNA, metagenomik, mikroorganizma, toprak



SUMMARY

M.Sc. THESIS

METAGENOMIC ANALYSIS of SOIL SAMPLES of BALIKESİR/ANTANDROS ANCIENT CITY EXCAVATION

Dilan BAL

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Ercan ARICAN

Microorganisms comprise the majority of living organisms in the biosphere. Due to limited culturing conditions, detection and diagnosis of microorganisms in biosphere can not be made readily. Until now, very few of these organisms have been detected and defined via cultivation methods. Microorganisms which, can not be cultured or haven't been cultured, make up of significant part of microbial diversity. Metagenomic analysis provides information about genetic diversity, population structure and ecological roles that affect human life of these microorganisms after DNA isolation of environmental samples without culturing.

Metagenomics plays a significant role discipline auxiliary to various different fields such as medicine, biofuels, biotechnology, agriculture, ecology. Metagenomics, which is started to be widely used in paleomicrobiology studies as well, contributes to microbial evolution studies in human history and gives us a perspective to understand ancient micro ecosystem.

In this thesis, DNA isolation of microorganisms in culture-independent soil samples taken directly from Balıkesir/Antandros Ancient City Necropolis was performed and afterwards V3-V4 regions of 16S rRNA were multiplied by using PCR method. Replicated regions were sequenced using Illumina MiSeq system. Metagenomic analysis of these sequences was performed using QIIME 1.9.1 and microbial diversity was detected.

This study showed that the archaeological findings obtained during the excavations in Antandros Ancient City could be supported by metagenomic data, contribution to archaeological studies can be made with a multidisciplinary perspective and the data obtained can be used to predict and interpret the past. This thesis is important since it is the first study on the metagenomic study in ancient cities in Turkey and it is expected to contribute to new studies in this area.

June 2019, 90 pages.

Keywords: 16S rRNA, metagenomics, microorganism, soil



1. GİRİŞ

Günümüzde Balıkesir ili, Edremit ilçesi, Altınoluk beldesi sınırları içerisinde yer alan Antandros Antik Kenti'nde yapılan kazı çalışmaları Prof. Dr. Gürcan Polat'ın başkanlığında 2001 yılından beri devam etmektedir (Polat, 2002). Kazı çalışmalarının yürütüldüğü dört sektörden biri olan nekropolün, 700 yıl kesintisiz olarak kullanıldığı belirlenmiştir. Nekropolün, konumlandığı tepenin yamacında yer alması ve kullanılan alanların sürekli erozyon sonucu toprak altında kalması, mezarların üst üste olmasını ve yapıların mezarların üstüne inşa edilmiş olmasını açıklamaktadır. Antandros Antik Kenti nekropolü uzun yıllar boyunca kullanmış olması dolayısıyla farklı kültür ve dönemlere ait mezar, gömü çeşitleri ve yapılara ev sahipliği yapmaktadır (Yağız, 2009).

Antik kalıntılardaki mikroorganizmanın tespiti ve teşhisi ile mikroorganizmaların evriminin ve insan popülasyonu ile simbiyotik ilişkisinin anlaşılmasına olanak veren paleomikrobiyoloji, tarihsel ve arkeolojik kaynaklarda ortaya konan hipotezlerin, bilimsel olarak kanıtlı verilerle desteklenmesini sağlamaktadır. Metagenomik çalışmaların son yıllarda gelişmesiyle birlikte paleomikrobiyoloji çalışmaları da hız kazanmıştır (Rivera-Perez ve diğ., 2016).

Metagenomik, mikroorganizma topluluklarını içeren örneklerin kültür edilmesine gerek duyulmaksızın direkt olarak doğal ortamlarından alınıp, içindeki mikroorganizmaların DNA'larının izole edilmesi ve bu DNA'ların yeni nesil dizileme teknikleri kullanılarak analiz edilmesidir. DNA izolasyonu ve klonlama metodlarına bağlı olarak yapılan metagenomik analizlerin sonucunda oluşturulan metagenomik kütüphaneler, tek bir habitatın tüm genetik bileşenlerini temsil etmektedir. Bir metagenomik kütüphanede saklı olan bu bilgiler; mikrobiyal çeşitliliğin tespitinde, spesifik bir mikroorganizmanın teşhisinde, bir habitatın gen fonksiyonunun değerlendirilmesinde, korunmuş proteinlerin fonksiyonlarının belirlenmesinde ve gruba özgü gen modellerinin bulunmasında kullanılabilmektedir (Alves ve diğ., 2018).

Metagenomik alanında yapılan ilk çalışmalar, yaklaşık olarak 1.5 kb'lık 16S rRNA genlerini hedef alan Sanger dizileme yöntemini baz almıştır (Kolbert ve Persing, 1999). Bu 1.5 kb'lık kodlama yapan dizi, gene dağılmış halde bulunan 9 tane korunmuş (C1-C9) bölge, 9 tane çok değişken (V1-V9) bölge içermektedir (Petrosino ve diğ., 2009). Daha güncel çalışmalara bakıldığında metagenomik çalışmalarda dizileme için hedef bölge olarak bu çok değişken

(V1-V9) bölgelerin, dizileme yöntemi olarak ise yeni nesil dizileme yöntemlerinden biri olan Illumina'nın tercih edildiği görülmektedir. Yeni nesil dizileme yöntemleri daha düşük maliyetle günde 5000 Mb'luk DNA dizileyebiliyorken, Sanger dizileme yöntemi daha yüksek maliyetle, günde yaklaşık 6 Mb'luk DNA dizileyebilmektedir (Alves ve diğ., 2018). Metagenomik çalışmalarda dizilenmek üzere hedeflenen DNA dizisinin boyutunun, çevresel örneklerden elde edilen mikroorganizmaların çeşitlerinin ve mikroorganizmalara ait DNA miktarlarının fazla olması sebebiyle Illumina dizileme yöntemi tercih edilmektedir (Culligan ve diğ., 2014).

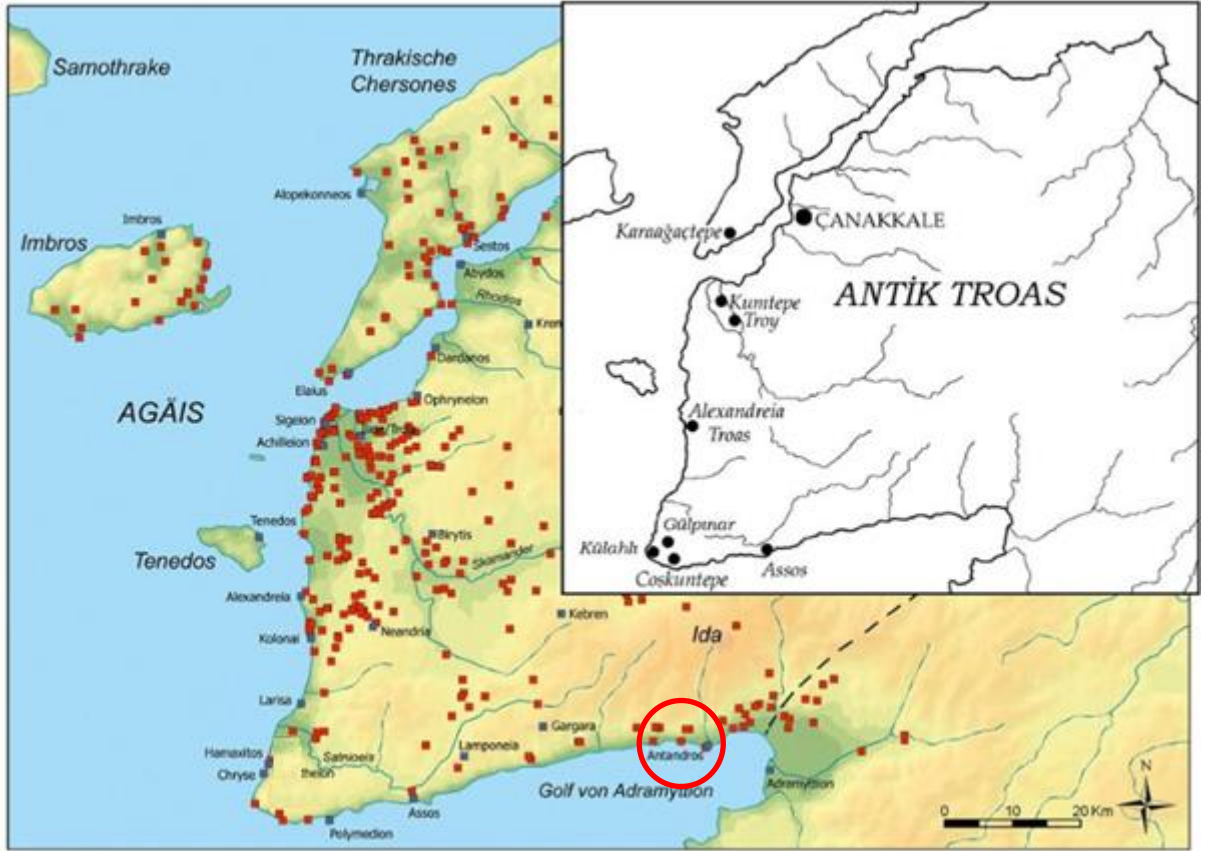
Yapılan metagenomik çalışmalarda, 16S rRNA geninin çok değişken bölgelerini hedef alan dizileme yöntemi ile elde edilen verilerin metagenomik analizinde kullanılmak üzere genellikle QIIME programının tercih edildiği görülmektedir (Oulas ve diğ., 2015). QIIME ile DNA dizileri kalite kontrolden geçirildikten sonra, dizilere ait işlevsel taksonomik birimler (OTU'lar) belirlenebilir ve belirlenen OTU'lara taksonomik atamalar yapıp mikrobiyal çeşitlilik belirlenebilir (Kuczynski ve diğ., 2011).

Bu çalışmada Balıkesir/Antandros Antik Kenti nekropolünün farklı konumlarından alınan toprak örneklerindeki mikroorganizmaların kültürleme yönteminden bağımsız DNA izolasyonu işlemi sonrasında, 16S rRNA genlerinin çok değişken V3-V4 bölgesinin çoğaltılması, çoğaltılan bölgelerin Illumina dizileme yöntemiyle dizilenmesi, dizileme verilerinin sonucunda uygulanacak olan metagenomik analiz basamaklarında QIIME programı kullanılarak OTU'ların belirlenmesi, buna bağlı olarak taksonomik analizin yapılması ve örnek alınan bölgelerin mikroorganizma çeşitliliğinin ortaya konması amaçlanmıştır. Elde edilen verilerle arkeolojik bulguların bilimsel olarak desteklenmesi beklenmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BALIKESİR/ANTANDROS ANTİK KENTİ

Günümüzde Biga Yarımadası olarak bilinen (Körpe, 2008) Antik Troas bölgesinin sınırları; batıda Ege Denizi, kuzeyde Marmara Denizi, güneyde ise Edremit Körfezi'dir. Antik Troas bölgesi, birçok antik kenti sınırları içerisinde (Şekil 2.1) bulundurmaktadır.



Şekil 2.1: Antik Troas bölgesi¹.

Troas sınırları içerisinde bulunan önemli yerleşim noktalarından biri olan Antandros ise günümüzde Çanakkale il sınırları dışında kalan tek Troas bölgesi antik kentidir. Antandros Antik Kenti, Balıkesir ili, Edremit ilçesi, Altınoluk beldesi sınırları içerisinde, Edremit Körfezi'nin kuzeyinde yer almaktadır (Körpe, 2008). İda (Kaz) Dağı'nın güney eteklerinde Altınoluk beldesinin 2,5 km doğusunda bulunur ve denize dik inen 215 metre rakımlı Kaletaşı

¹ <http://troasdergisi.blogspot.com>

Tepesi'nin zirve ve batı yamaçlarına konumlanmıştır (Polat, 2002). Çanakkale-Edremit karayolu, Antandros Antik Kenti'nin üzerinden geçmektedir.

Antandros'ta ilk kazı çalışmaları 2001 yılında Prof. Dr. Gürcan Polat'ın bilimsel başkanlığında, Balıkesir Kuva-yi Milliye Müzesi Müdürlüğü önderliğinde başlatılmıştır (Polat, 2002). Kazı çalışmaları 2001 yılından beri Yamaç Ev, Kent Suru, Roma Evi ve nekropol olmak üzere dört sektörde yürütülmektedir. Yürütülen sistematik kazı çalışmalarının ilk yıllarında bahsi geçen dört ana sektör haricinde Çanakkale-Balıkesir karayolunun hemen kuzeyinde yer alan Yol Üstü Açması, Yol Altı Açması ve Dere Boyu Açmalarında da kazı çalışmaları yürütülmüştür. Bu açmalarda bulunan seramikler kentin tabakalarının tarihlendirilmesine katkı sağlamıştır. Çalışmamızın konusu olan nekropol (nekropolis), Kaletaşı tepesinin yaklaşık 500 m batısında, deniz ile ona paralel uzanan tepe arasındaki yaklaşık 50 m genişliğindeki alana (Şekil 2.2) konumlanmıştır (Candar, 2017).



Şekil 2.2: Antandros Antik Kenti konumu².

² <http://www.antandros.org>

2001 yılından önce Bursa Müzesi tarafından gerçekleştirilen kazılarda nekropolün M.Ö. 7. yüzyıldan M.Ö. 2. yüzyıla kadar yaklaşık 500 yıl aralıksız kullanıldığı belirlenmiştir. Son dönem kazılarında elde edilen sonuçlarla nekropolün M.Ö. erken 7. yüzyıldan Hellenistik dönemin sonuna kadar, yani yaklaşık 700 yıl gibi uzun bir süre kesintisiz kullanıldığı anlaşılmıştır. Nekropolün, konumlandığı tepenin yamacında yer alması, bu kadar uzun süre kullanılabilmesine olanak sağlamıştır. Gömü alanlarının gömüden kısa süre sonra erozyon sonucu toprak altında kalması yeni gömüler için olanak sağlamıştır. Bu durum özellikle üst tabakalarda yeni gömülerin yapılması sırasında önceki gömülerin tahribatına ve aynı mezarların birden fazla kez kullanılmasına neden olmuştur (Yağız, 2009).

Nekropolün uzun yıllar boyu aralıksız kullanılması dolayısıyla burada farklı kültür ve dönemlere ait gömü çeşitleri, mezar tipleri ve yapılar görülmektedir. Nekropoldeki üst katmanı Geç Roma dönemine ait yapılar oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarla bu alanın M.S. 5. yüzyıldan itibaren nekropol olarak değil yerleşim alanı olarak kullanıldığı anlaşılmıştır. Bu alanın nekropol olarak kullanıldığı dönemlere bakıldığında ise iki temel gömü biçimi olan inhumasyon ve kremasyon gömü örnekleri görülmektedir (Polat ve Polat, 2007).

İnhumasyon: Toprakta açılan bir çukura veya mezara ölü bedeninin yakılmadan gömülme biçimidir (Uhri, 2006).

Kremasyon: Ölü bedeninin yakılarak direkt toprağa ya da herhangi bir mezar çeşidine gömülme biçimidir (Ünlütürk, 2015).

- Birincil Kremasyon: Bireyin gömüldüğü yerde yakıldığı gömü çeşididir (Yağız, 2009).
- İkincil Kremasyon: Bireye ait yanmış kemiklerin bir urne kabı içerisine konularak yapılan gömü çeşididir (Yağız, 2009).

Bu iki ana başlık halinde incelediğimiz gömü çeşitleri farklı mezar tiplerinde karşımıza çıkabilmektedir. Antandros Antik Kenti nekropolünde yapılan kazı çalışmalarında rastlanan mezar tipleri Şekil 2.3-Şekil 2.10' da görülmektedir.



Şekil 2.3: 417 Numaralı mezar amphora (Antandros Kazı Arşivi).



Şekil 2.4: 384, 388 ve 389 Numaralı mezar basit toprak gömü, 385 numaralı mezar amphora, 387 numaralı mezar pithos (Antandros Kazı Arşivi).



Şekil 2.5: 347 Numaralı mezar çatı kiremiti (Antandros Kazı Arşivi).



Şekil 2.6: 502 Numaralı mezar lahit (Antandros Kazı Arşivi).



Şekil 2.7: 460 Numaralı mezar pithos (Antandros Kazı Arşivi).



Şekil 2.8: 414 Numaralı mezar urne (Antandros Kazı Arşivi).



Şekil 2.9: 213 Numaralı mezar, sunakla çevrili mezar örneği (Antandros Kazı Arşivi).



Şekil 2.10: Etrafı blok taşlarla çevrili (podyumlu) mezar örneği (Antandros Kazı Arşivi).

Şekillerde gösterilen mezar tipleri mezar formu gözlemlenerek tanımlandıktan sonra, gömü çeşitleri de göz önünde bulundurularak, bireyin yakılmadan direkt gömülmesi, gömüldüğü yerde yakılması ya da yakıldıktan sonra yanmış kemiklerin urne içerisine konulması işlemlerine göre birincil kremasyon, ikincil kremasyon ya da inhumasyon olarak nitelendirilebilir. Örneğin lahit mezarlarda, basit toprak gömüde, çatı kiremiti mezarlarda hem birincil kremasyon hem de

inhumasyon örnekleri görülebilmektedir. Pithos ve amphora örneklerinde yalnızca inhumasyon örnekleri görüldüğü gibi yalnızca urne mezar da ikincil kremasyon olarak bilinmektedir.

2.2. PALEOMİKROBİYOLOJİ

Paleomikrobiyoloji, antik kalıntılardaki mikroorganizmaların tespiti, teşhisi ve karakterizasyonu ile ilgilenen ve gelişmekte olan bir bilim dalıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda elde edilen veriler, mumyalanmış dokularda, dışkı kalıntılarında, donmuş toprak örneklerinde, kemikte ve diş pulpasında mikrobiyal DNA'nın uzun yıllar boyu korunarak kaldığını göstermiştir (Drancourt ve Raoult, 2005).

Paleomikrobiyoloji çalışmaları, 1993 yılında antik insan iskeletinde *Mycobacterium tuberculosis* DNA'sının tespiti ile başlamıştır (Spigelman ve Lemma, 1993). Antik kalıntılardaki mikrobiyal DNA'nın tespiti ile geçmiş dönemdeki patojenlerin günümüz patojenleri ile arasındaki ilişkinin ortaya konması, mikroorganizmaların evriminin aydınlatılması, mikroorganizmaların insan popülasyonu ile simbiyotik ilişkisinin anlaşılması mümkün olabilmektedir. Ek olarak, antik patojenlerin moleküler tiplendirmesi, geçmişteki salgın hastalıkların epidemiyolojisinin incelenmesini sağlamakla birlikte günümüzde yaygınlaşan enfeksiyonların modellerinin anlaşılmasına ve uygun önleyici tedbirlerin geliştirilmesine katkı sunabilmektedir. Elde edilecek verilerle araştırılan döneme dair tarihsel ve arkeolojik kaynaklarda ortaya konan varsayımsal hipotezler, bilimsel olarak kanıtlı verilerle desteklenebilmektedir. Bu yönüyle paleomikrobiyoloji sosyal bilimlere de katkı sunabilmektedir (Drancourt ve Raoult, 2005).

Paleomikrobiyoloji çalışmalarında mikroskopi ve immünodeteksiyon gibi yöntemlerin yanı sıra PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) temelli moleküler teknikler daha yoğun olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda ise yeni nesil dizileme teknolojisine gelişmesiyle temel metagenomik yaklaşımlar kullanılmaya başlamıştır (Fornaciari, 2017).

Paleomikrobiyolojinin metagenomik gibi yeni moleküler tekniklerle geliştirilmesi, insanlık tarihindeki mikrobiyal evrim araştırmalarına çok büyük katkılar sunmuştur. Aynı biyolojik ortamda aynı anda aktif olan mikrobiyal ajanların incelenmesi, farklı patojenler arasındaki karmaşık ilişkilerin anlaşılmasını mümkün kılar ve bize geçmiş zamanların mikro ekosistemini anlama perspektifi verir (Fornaciari, 2017).

2.3. METAGENOMİK

Mikroorganizmalar, biyosferde varlığını sürdüren canlıların büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Bugüne kadar biyosferde bulunan mikroorganizmaların çok azı kültürleme metoduyla tespit ya da teşhis edilebilmiştir. Kültürlenmemiş ya da kültürlenemeyen mikroorganizmalar ise, mikrobiyal çeşitliliğin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır (Vakhlu ve diğ., 2008). Kullanılan geleneksel kültürleme tekniği mikroorganizmaların analizini sınırlamaktadır (Hugenholtz ve diğ., 1998). Mikroorganizmaların yaklaşık % 99'unun kolayca kültürlenemediği yaygın olarak kabul edilmektedir (Ghazanfar ve diğ., 2010). Kültürleme koşullarının kısıtlı olmasından dolayı mikroorganizmaların (virüsler, bakteriler, arkeler, mantarlar ve tek hücrelilerin) tespiti, ölçümü ve teşhisi kolaylıkla yapılamamaktadır (Neelakanta ve Sultana, 2013).

Çeşitli çalışmalar, deniz suyundaki toplam mikroorganizmaların sadece % 0.001-0.1'inin, tatlı sudaki mikroorganizmaların % 0.25'inin, tortulların (sediment) % 0.25'inin ve toprak mikroorganizmalarının yalnızca % 0.3'ünün *in vitro* olarak kültürlenebildiğini ortaya koymuştur (Amann ve diğ., 1995; Singh ve diğ., 2008).

Biyosfer; tıp, mühendislik ve tarım gibi birçok alanda büyük öneme sahip olan mikroorganizmaların egemenliği altındadır (Sloan ve diğ., 2006). Mikroorganizmaların genetik ve biyolojik çeşitliliği bilimsel araştırmaların önemli bir çalışma alanıdır. Kültürlenemeyen mikroorganizmaların genomlarında bu çalışmaları ilgilendiren çok miktarda bilgi bulunmaktadır (Handelsman, 2004). Bu kültürlenemeyen mikroorganizmalar, biyoteknolojide kullanılmak üzere yeni genlerin, enzimlerin ve kimyasal bileşiklerin geliştirilmesi için geniş, sınırsız ve ilgi çekici bir kaynağı temsil etmektedir (Schmeisser ve diğ., 2007). Mikrobiyal çeşitlilik araştırmacılara; yeni genlerin, metabolik yollar için biyomoleküllerin ve çeşitli biyolojik ürünlerin elde edilmesi için kullanılabilecek genetik ve biyolojik bir havuz sunmaktadır (Cowan, 2000).

Mikroorganizmaların öneminin bilinmesine rağmen, biyosferde kaç tür mikroorganizmanın bulunduğu ve bu türlerin ekolojik işlevlerinin neler olduğu hakkında bilinenler çok azdır (Singh ve diğ., 2008). Yakın zamana kadar, bu soruları cevaplamak için uygun teknikler mevcut değildi. Bu nedenle, mikroorganizmaların çoğu biyoteknoloji için henüz tanımlanmamış ve değerlendirilmemiş kabul edilir (Ghazanfar ve diğ., 2010).

Kültürleme teknikleriyle ilgili zorlukların ve sınırlamaların üstesinden gelebilmek, mikrobiyal tür ve toplulukları karakterize etmek için çeşitli DNA temelli moleküler yöntemler geliştirilmiştir ve bunlar ekolojik ve mikrobiyal çeşitliliğe bakışımızı önemli ölçüde etkilemiştir. Son yirmi yılda, bu mevcut sorunlara çözüm olabilmesi ve mikroorganizmaların herhangi bir kısıtlama olmadan genomik analizinin yapılabilmesi için “metagenomik” yaklaşımlar geliştirilmiştir (Ghazanfar ve diğ., 2010).

Metagenomik, kültürlenemeyen mikroorganizmaların genomlarını açığa çıkartmak için kullanılan, bir yandan biyosferdeki mikrobiyal çeşitliliğin sahip olduğu bilgi potansiyeline ulaşmayı, bunu incelemeyi ve bu potansiyelin daha iyi anlaşılmasını hedefleyen anahtar teknolojilerden biridir, diğer yandan yeni enzimler ve biyomoleküllere artan talepler için yürütülen ve son 20 yıldır gelişmekte olan yeni bir araştırma alanıdır (Schmeisser ve diğ., 2007; Handelsman, 2004; Streit ve Schmitz, 2004).

İlk defa 1982 yılında Wisconsin Üniversitesi Bitki Patolojisi Bölümü'nde Handelsman ve diğ. tarafından tanımlanan metagenomik, çevresel örneklerden elde edilen genomların incelenmesini sağlayan bir çalışma alanıdır ve bir habitatın bütün genetik bileşenlerinin analizi ile ilgilidir (Handelsman ve diğ., 1998).

Metagenomik için çeşitli tanımlar yapılmıştır. Bu tanımlara göre metagenomik;

- Bir mikrobiyal genom karışımının kültürden bağımsız analizidir (Schloss ve Handelsman, 2003; Riesenfeld ve diğ., 2004; Susannah ve Edward, 2005; Patrick ve Handelsman, 2005),
- Genomik analiz (bir organizmadaki tüm DNA'nın analizi) gücünün tüm mikroorganizma topluluklarına kültürleme yapılmaksızın uygulanabildiği çalışma alanıdır (Ghazanfar ve diğ., 2010),
- Mikrobiyal organizma topluluklarına doğrudan kendi doğal ortamlarında, türlerin ayrı ayrı izolasyonuna ve laboratuvar ekimine ihtiyaç duyulmadan modern genomik tekniklerin uygulanmasıdır (Chen ve Pachter, 2005),
- Toprak, su, hayvan kalıntıları, hayvanların ve insanların sindirim sistemi gibi ortamlardaki mikroorganizmaların gerçek çeşitliliğini, işlevlerini, işbirliğini ve evrimini anlamak için kültürlenmemiş organizmaları incelemeyi amaçlayan ve hızla büyüyen bir araştırma alanıdır (Ghazanfar ve diğ., 2010),

- Direkt doğadan alınan örneklerle farklı ekosistemlerdeki -bu ekosistemler, okyanuslardan insan mikrobiyomuna kadar geniş bir yelpazeye sahiptir- mikrobiyal toplulukların karşılaştırmalı analizine olanak sağlamaktadır (Neelakanta ve Sultana, 2013).

Birçok mikroorganizma, atık ürünleri çözebilir, tıbbi uygulamalar için yeni ilaçlar yapabilir, çevre dostu plastikler üretebilir ve hatta yediğimiz yiyeceklerin bir kısmını bile üretebilir. DNA'nın bu organizmalardan izole edilmesi, bu işlemlerin uygulanabilmesi ve bunların toplum tarafından kullanılabilmesi için bizlere fırsat sunar (Ghazanfar ve diğ., 2010).

Biyoteknoloji, mikrobiyal toplulukların genetik ve biyolojik çeşitliliği çalışmalarında önemli bir bilgi bilimi haline gelmiştir. Biyoteknoloji yeni genler, enzimler ve bileşikler için sürekli bir talep oluşturmaktadır. Farklı çalışmalar, doğal çeşitliliğin bu talep edilen yeni moleküller için en iyi kaynak olduğunu göstermiştir (Ghazanfar ve diğ., 2010).

Metagenomik metodoloji, yeni biyolojik ürünlerin ve mikrobiyal fonksiyonların keşfedilmesinde etkili bir araç olarak geliştirilmiştir (He ve diğ., 2007). Habitattaki bireylerin genlerinin ve gen ürünlerinin geniş çeşitliliğinin araştırılmasının yanı sıra biyosentetik ya da degradatif yolları kodlayan tüm operonları analiz etmeyi sağlayan bir yaklaşımdır (Schmeisser ve diğ., 2007).

Başlangıçta, kültürlenmemiş mikroflora ve antik DNA incelemeleri metagenomik çalışmaların ana hedefleriydi. Bununla birlikte, günümüzde bu teknoloji, derin denizlerde yaşayan su mikroflorası, toprak mikroorganizmaları, insan ve hayvanların gastrointestinal ekosistemleri gibi bir dizi mikrobiyal çeşitlilik çalışmasında da uygulanmaktadır (Shanks ve diğ., 2006; Lu ve diğ., 2007).

Genel olarak, 16S rRNA gen analizine dayanan bu yaklaşımlar, bir ortamdaki mevcut sınıflar ve türler hakkında geniş bilgi sağlar. Bu yaklaşımlarla elde edilen veriler farklı mikroorganizmaların bir topluluktaki işlevsel rolleri ve mikrobiyal nişteki genetik bilgileri hakkında katkı sunmaktadır (Streit ve Schmitz, 2004).

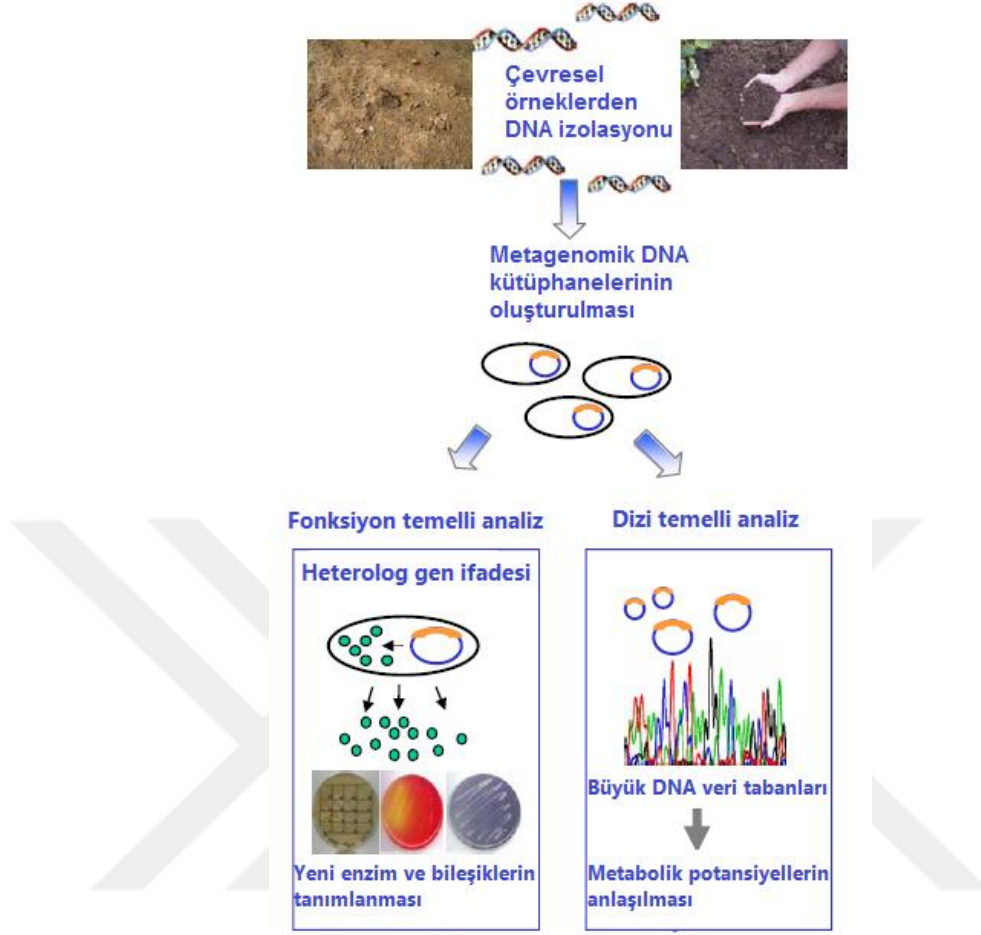
Toprak diğer mikrobiyal nişlere göre daha geniş mikrobiyal zenginliğe sahiptir. 16S rRNA temelli çalışmalar mikrobiyal çeşitlilik ile ilgili bilinenleri kapsamlı bir şekilde yeniden tanımlamış ve genişletmiştir. Toprak mikrobiyal çeşitliliğinin basit hesaplamaları, toprakta

gram başına 3.000 ila 11.000 aralığında genom bulunduğunu göstermektedir ve bu genomların sadece %1'inden daha azına kültürleme yöntemiyle ulaşılabilir. (Torsvik ve Ovreas, 2002; Curtis ve Sloan, 2004).

Toprak mikrobiyal toplulukları, çeşitli hücre duvarı özellikleri sergileyen ve lizise yatkınlıklarına göre değişen bir arke, bakteri ve protist karışımından oluşur (Kauffmann ve diğ., 2004). Mikroorganizmalar, tek hücreler veya mikro koloniler halinde bulunabilir. Metabolizmaları ve diğer organizmalar ve toprak parçacıkları ile etkileşimleri, çok küçük mesafelerde farklılıklar gösteren mikro habitat koşullarına bağlıdır. Toprak, mikrobiyal büyüme koşulları ve dağılımı için çok heterojen olarak kabul edilebilir. Bu heterojenite, çok çeşitli mikrobiyal nişler ve çok çeşitli toprak mikroorganizmaları ile sonuçlanır. Topraklardaki mikrobiyal çeşitlilik, ökaryotik organizma çeşitliliğinden ve diğer ortamlardaki mikrobiyal çeşitlilikten çok daha fazladır. Bir gram toprak, tahminen binlerce farklı türden 10 milyar mikroorganizma içeriyor olabilir (Rosello ve Amann, 2001).

Toprak mikroorganizmalarının kültür analizi, toprağın antibiyotikler (Raaijmakers ve diğ., 1997), antikanser ajanları (Shen ve diğ., 2001), bağışıklık baskılayıcılar (Skoko ve diğ., 2005) ve birçok çeşitli biyoteknolojik değerli ürünler (Ullrich ve diğ., 2004; Inoue ve diğ., 2005) gibi zengin bileşiklerin kaynağı olduğunu ortaya koymuştur.

Topraktan DNA izolasyonu, klon kütüphanelerinin oluşturulması ve bu kütüphanenin taranıp incelenmesi adımlarını içeren toprak metagenomik metotları (Şekil 2.11), araştırmacıların toprak mikrobiyal topluluklarını daha eksiksiz anlamalarını sağlar (Ghazanfar ve diğ., 2010).



Şekil 2.11: Metagenomik analiz basamakları (Schmeisser ve diğ., 2007).

Çevresel örneklerden yeni genlerin ve DNA dizilerinin tanımlanması üç aşamada gerçekleştirilir. Son aşama fonksiyon temelli analiz ve dizi temelli analiz olarak ikiye ayrılabilir. DNA doğrudan topraktan izole edilir, uygun bir vektöre klonlanır ve sonrasında vektör konak bakteriye aktarılır. Fonksiyon temelli analiz çoğunlukla farklı konak suşlarda heterolog gen ekspresyonu tarafından üretilen yeni enzimlere ve bileşiklere odaklanırken, dizi temelli analiz, DNA veri tabanlarını analiz ederek ve dizileri karşılaştırarak çevresel bir mikrobiyal topluluğun metabolik potansiyeli hakkında bir fikir verir. Dizi temelli analiz, bilim insanlarının toprak örneklerindeki spesifik mikroorganizmalarla potansiyel fonksiyonlarını ilişkilendirmelerini sağlayarak temel ekolojik soruları cevaplamayı mümkün kılar (Schmeisser ve diğ., 2007).

2.3.1. Metagenomik Alanında Yapılan Çalışmalar

Metagenomik günümüze kadar birçok çalışmada kullanılmıştır. Quaiser ve diğ. (2002) topraktan alınmış, kültürlenmemiş *Crenarchaeote* genomunu analiz etmiştir. Bu çalışmada metagenomik analiz, DNA'yı karakterize eden rRNA genleri dizilenerek yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda protein kodladığı düşünülen 17 tane gen izole edilmiştir. Venter ve diğ. 2004 yılında yaptığı çalışmayla tüm genom Shotgun dizileme metodu ve geleneksel Sanger dizileme metodu kullanılarak Sargasso Denizi'nden alınan örnekten 1 milyardan fazla baz çifti dizilenmiştir. Poinar ve diğ. 2006 yılında yaptıkları çalışmada, Sibiry'a'dan aldıkları yünlü mamut (*Mammuthus primigenius*) örneği DNA'sının 28 milyon baz çiftini metagenomik yaklaşımlar kullanarak dizilemiştir. İstisnai şekilde örneğin korunmuş olarak kalması ve gelişmiş emülsiyon polimeraz zincir reaksiyonunun kullanılmış olması sonucunda 13 milyon baz çifti (dizilenenin %45.4'ü) mamut DNA'sı olarak tanımlanmıştır. Dizileme verileriyle African fili (*Loxodonta africana*) DNA dizisi benzerliği %98.55 olarak tespit edilmiştir. Bu verilerle, paleontolojik olarak 5-6 milyon yıl önce bu türlerin birbirinden ayrıldığı bilgisi örtüşmektedir.

Son on yılda yapılan çeşitli çalışmalarda metagenomik yaklaşımların kullanılması, insan örneklerindeki yeni virüslerin teşhisine de önemli miktarda katkı sağlamıştır. Bu virüslerin tespiti ve teşhisi sonucunda halk sağlığı alanında düzenlemeler yapılmıştır. Bu çalışmaların, çok kısa bir zamanda, bilinmeyen ve insanlar için bulaşıcı ajan olma niteliğindeki virüslerin teşhisinde kullanılmak üzere, veri tabanı oluşturulması için gelecekte uygulanacak olan metagenomik perspektiflere ışık tutması beklenmektedir. (Svraka ve diğ., 2010).

Metagenomik antik DNA çalışmalarında kullanılmasıyla da başarılı sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Greenbelt ve diğ. (2004) metagenomik yöntemlerle, 120 milyon yaşındaki amberin içinde korunmuş olarak bulunan *Micrococcus luteus*' un DNA'sını dizisini dizilemeyi başarmışlardır. Bir diğer göz kamaştırıcı örnek ise, Neolitik Tyrolean Iceman (ÖTZİ)'in midesindeki bakterilerin tespitidir. Yaklaşık 5300 yıllık *Helicobacter pylori*'nin genomunun tamamı dizilenmiştir. Günümüzde dünya nüfusunun yaklaşık yarısında bulunan bu bakteri insandan insana salya ile, yemek ve suda dışkı kontaminasyonu ve yetersiz hijyen nedeniyle bulaşabilmektedir. Bu patojenin insanlarla birlikte uzun süre yaşadığı düşünülmektedir. İnsanların göçü esnasında evrilen farklı tür bakterilerin genetik analizi, dünya üzerindeki insan göçlerinin bir göstergesi olarak kullanılabilmektedir (Maixner ve diğ., 2016).

Noonan ve diğ. 2006 yılında yaptığı çalışmada, Neandertal metagenomik kütüphaneyi oluşturmak için, Hırvatistan'daki Vindija mağarasından kültürlenme yapmaksızın örnek alınmıştır. Alınan 38000 yıllık örnekten DNA ekstrakte edilmiştir. Yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak 65250 baz çiftlik Neandertal genom dizisi elde edilmiştir. Yeni perspektiflerle nesli tükenmiş hominidlerin karakterizasyonunu yapabilmek için, dizileme ve analizler yapılmıştır, Neandertal metagenomik kütüphane geliştirilmiştir. Elde edilen veriler ise Hominid DNA dizisinin 65250 baz çiftinin Neandertal kökenli olduğunu işaret etmektedir. Bu çalışmada elde edilen verilerden biri de, Neandertal ve insan genomunun en az %99.5 benzer olduğudur.

Shotgun dizileme yönteminin ilk defa diş taşına uygulanmasıyla 16s rRNA genleri dizilenmiş ve toplam 2699 işlevsel taksonomik birim (OTU) tanımlanmıştır. Bu çalışmada antik oral mikrobiyomunun protein fonksiyonel karakterizasyonu ve taksonomisi rapor edilmiştir. Yapılan çalışmayla ağız boşluğunun bir depo gibi, hem dokuya özgü hem de tüm sistemi ilgilendiren hastalıklarla ilişkili olan bakterilerin korunmuş olarak kalmasını sağladığı ispat edilmiştir. Hastalık durumundaki antik oral mikrobiyomu karakterize edilmiştir. Ayrıca; 40 patojen, 239 bakteriyel protein, 43 insan proteini karakterize edilmiş; antik insana ait olduğu düşünülen antibiyotik direnç genlerinin ilk kanıtı ortaya konmuş, periodontal patojen *Tannerella forsythia* türünün genomu elde edilmiştir. (Warinner ve diğ., 2014).

Metagenomik analizde de kullanılan genetik dizileme yöntemleri, filogenetik ağacın oluşturulması ve insan türünün buradaki konumunun anlaşılması konusunda devrim yaratmıştır. 1977'de Sanger dizileme metodunun, 1983'te ise DNA'nın çoğaltılmasında kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonunun gelişmesiyle insan ve büyük insansı maymun filogenetiğinin anlaşılmasını (Ruvolo, 1997) sağlayan, insanlardaki günümüz 'ırk' kavramını anlamsız kılan (Long ve Kittles, 2003), dünyadaki uluslaşmayı yeniden düzenleyebilecek nitelikteki (Oppenheimer, 2012) genetik verilerde kısa sürede çok büyük artış görülmüştür.

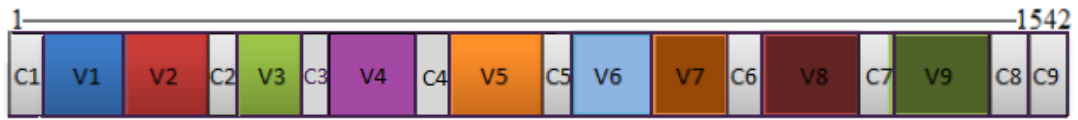
1990'ların sonunda yeni nesil dizileme (NGS) metodunun gelişmesi, insan genomunun tamamının ilk kez dizilenmesini (Venter ve diğ., 2001), sonra 2000'lerde bu teknolojinin adının duyulmasıyla Neandertalleri de içeren antik insanların (Green ve diğ., 2010; Prüfer ve diğ., 2014), Denisovanların (Krause ve diğ., 2010; Reich ve diğ., 2010) genomunun, antik insansı *Homo heidelbergensis* türünün mitokondriyal genomunun (Meyer ve diğ., 2014) dizilenmesini ve bilinen insan filogenetik ağacının güncellenmesini sağlamıştır. Bu çalışmalar insan evriminin anlaşılması için önemli bakış açıları sunmuştur.

Margesin ve diğ. 2017 yılında yaptığı çalışmada, Batı Sicilya'da keşfedilen Arkaik Monte Iato'daki yerli bir yapıdan toprak örnekleri alarak bu yapıdaki mikrobiyal toplulukları incelemiştir. Gıda atıklarının yok edildiği birikintilerden ve şömine üstünden toprak örnekleri toplanmıştır. Bu yapıdan alınan toprak örneklerindeki mikrobiyal çeşitliliğin araştırılmasını hedefleyen bu çalışmada, zemin karakterizasyonu da yapılarak elde edilen verilerle insan tüketim alışkanlıklarının arkeolojik bulgulara mikrobiyotada iz bıraktığı hipotezleri doğrulanmıştır.

2.3.2. 16S rRNA Geni

Birçok metagenomik analiz çalışmasında 16S rRNA geni yaygın bir hedef olarak seçilmiştir. 16S rRNA geninin bütün bakterilerde bulunması, fonksiyonel olarak korunmuş olması, uygun büyüklükte olması (~1550 bp), çok değişken bölgeler içermesi sayesinde uygun PZR primerlerinin oluşturulabilmesi ve bu çok değişken bölgelerin tür analizinde belirleyici olması, bu genin dizilerinin mevcut veri tabanlarında ulaşılabilir ve kıyaslanabilir olması bu genin metagenomik analizlerde tercih edilme nedenleridir (Turan ve diğ., 2018; Neelakanta ve Sultana, 2013).

Şekil 2.12'de görüldüğü üzere 16S rRNA dizisi, gene dağılmış halde bulunan 9 tane korunmuş (C1-C9), 9 tane de çok değişken bölge (V1-V9) içermektedir (Petrosino ve diğ., 2009). Bu çok değişken bölgeler yüksek oranda değişkenlik gösterdiği için biyolojik sınıflandırmada ciddi bir öneme sahiptir. V4-V6 bölgeleri tüm 16S rRNA dizisini temsil ettiği için bakteri filogenetik analizinde en sağlıklı sonucu veren, çalışmalarda en çok tercih edilen bölgedir; V2-V8 bölgeleri ise daha az değişken bölgelerdir. 16S rRNA geninde bulunan çok değişken bölgeler, PZR'de bu bölgelere bağlanacak primerlerin tasarlanması için uygun koşullara sahiptir (Turan ve diğ., 2018; Neelakanta ve Sultana, 2013).



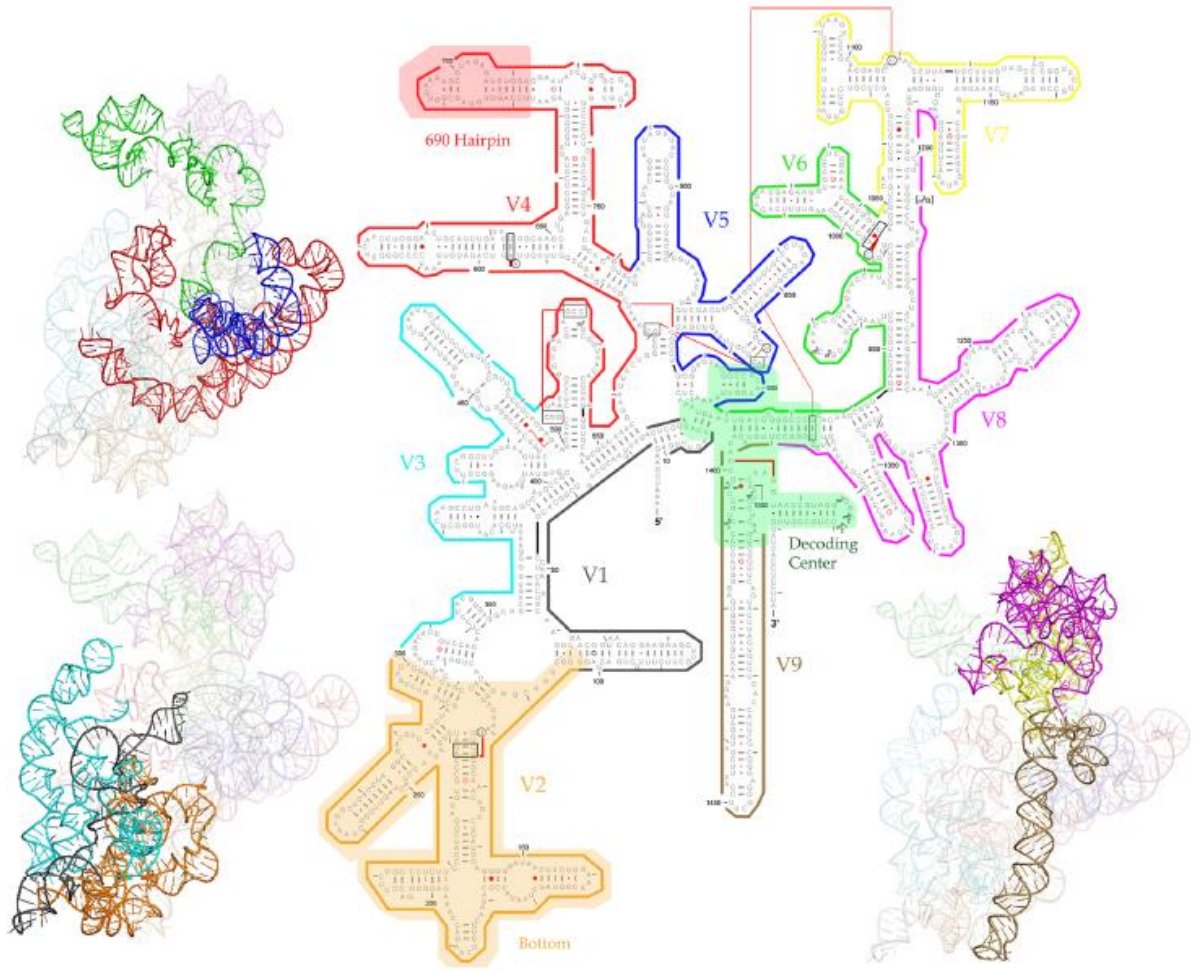
Şekil 2.12: 16S rRNA genindeki korunmuş ve çok değişken bölgelerin gösterimi. (Petrosino ve diğ., 2009).

Çok değişken bölgelerin (V) 16S rRNA dizisi üzerindeki başlangıç ve bitiş nükleotitleri Tablo 2.1’de belirtilmiştir.

Tablo 2.1: V1-V9 bölgelerinin 16S rRNA gen dizisi üzerinde başlangıç ve bitiş nükleotitleri (Chakravorty ve diğ., 2007).

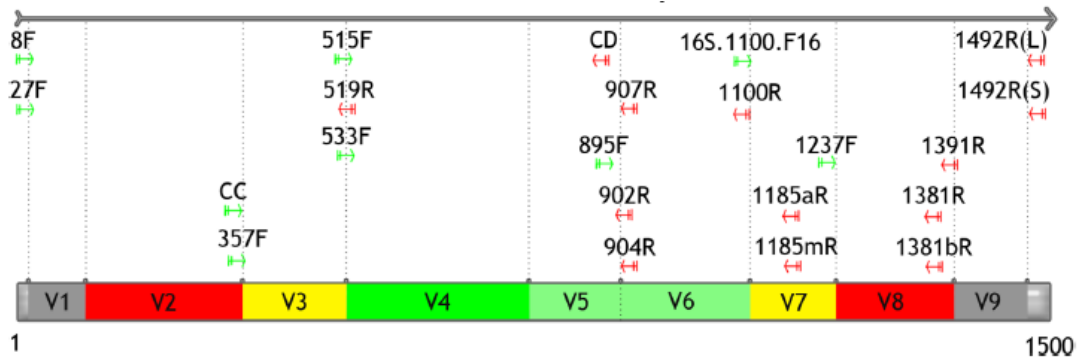
Çok Değişken Bölge	Başlangıç ve Bitiş Nükleotitleri
V1 Bölgesi	69-99
V2 Bölgesi	137-242
V3 Bölgesi	433-497
V4 Bölgesi	576-682
V5 Bölgesi	822-879
V6 Bölgesi	986-1043
V7 Bölgesi	1117-1173
V8 Bölgesi	1243-1294
V9 Bölgesi	1435-1465

Şekil 2.13’te 16S rRNA geninin çok değişken bölgelerinin her biri farklı renklerle gösterilmiştir. Bazı önemli yapılar içi dolu şekilde renklendirilmiştir. Bu yapılardan bir tanesi 690 firkete yapısıdır; bu yapı 16S rRNA’nın V4 bölgesinde yer alan üç filogenetik alan içinde yüksek oranda korunmuş olarak kalan bir halkadır (Yang ve diğ., 2016).



Şekil 2.13: 16S rRNA geninin 2 boyutlu ve 3 boyutlu gösterimi (Yang ve diğ., 2016).

16S rRNA geninin çok değişken bölgelerinin PZR yöntemi ile çoğaltılmasında kullanılabilecek primerlerin bağlanma noktaları Şekil 2.14’te görülmektedir.



Şekil 2.14: 16S rRNA primer haritası (Yang ve diğ., 2016).

Şekil 2.14'te kırmızı ile gösterilen bölgeler (V2 ve V8) düşük filogenetik özgünlüğe sahiptir. Yeşil ile gösterilen V4, V5 ve V6 bölgeleri ise filogenetik analiz için en uygun ve yüksek değişkenlik gösteren bölgelerdir (Yang ve diğ., 2016).

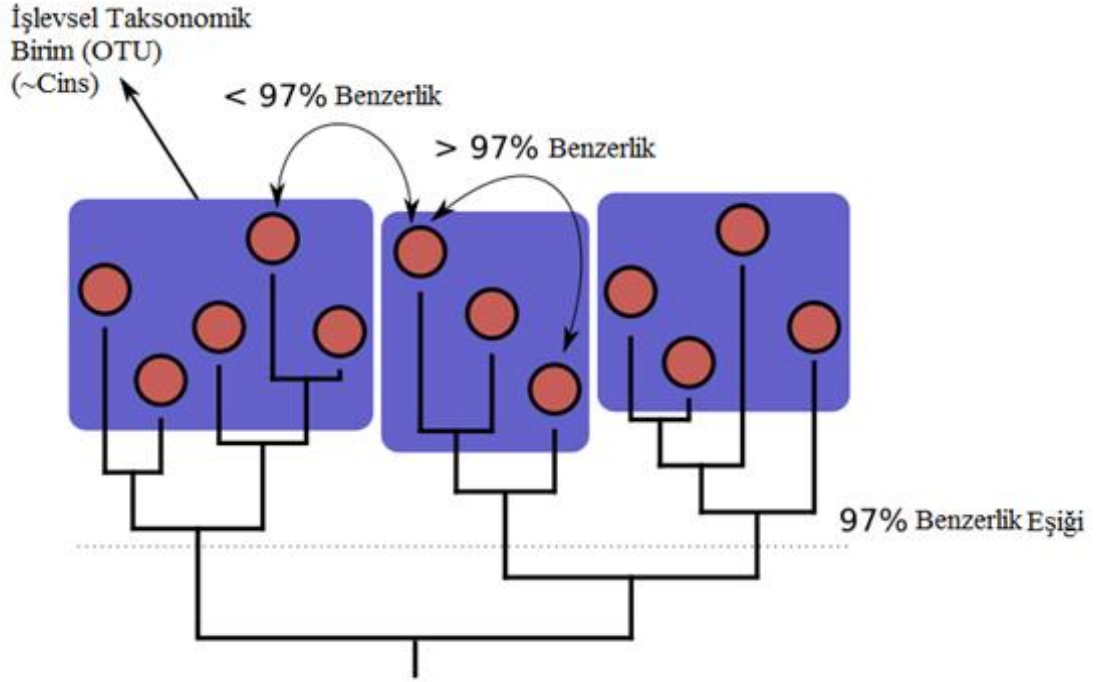
16S rRNA geninde yüksek değişkenlik gösteren bölgeler, metagenomik analizin PZR basamağında çoğaltılmak üzere hedeflenen bölgelerdir. Yapılan çalışmalarda, ilgili bölgesi PZR ile çoğaltılan örneklerin dizilenmesi için yeni nesil dizileme yöntemlerinden biri olan Illumina sisteminin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Illumina dizileme yöntemiyle, çevresel örneklerdeki mikrobiyal çeşitliliği değerlendirebilmek için 16S rRNA geninin yüksek verimli dizileri elde edilmektedir (Pichler ve diğ., 2018). Yeni nesil dizileme teknolojileri ile, daha düşük maliyetle, daha kısa sürede, daha büyük dizileme verileri elde edilebilmektedir. Illumina MiSeq sistemi kullanılarak yapılan dizilemede 25 milyon okuma sayısına erişilebilmektedir. Illumina geniş kapsamlı, yüksek verimli, sistematik hataların önemli ölçüde az olduğu veriler sunması sebebiyle, metagenomik araştırmalarda tercih edilmektedir (Oulas ve diğ., 2015).

Elde edilen yüksek verimli dizilerin biyoinformatik analizi için ise QIIME programının yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. QIIME, mikrobiyal toplulukların analizini yapan yazılımdır. 'Mikrobiyal Ekolojide Kantitatif Analizler (Quantitative Insights Into Microbial Ecology)'in kısaltmasıdır. Mantar, virüs, bakteri ve arkeolojik topluluklardan elde edilen nükleik asit dizilerini analiz etmek ve yorumlamak için kullanılmaktadır. Mikrobiyal topluluklardan gelen verileri analiz etmek için kullanılan QIIME, terminal penceresine yazılan bir dizi komut ile grafiksel çıktıların ve metin çıktılarının oluşturulmasını ve görüntülenmesini mümkün kılmaktadır (Kuczynski, 2011). Metagenomik analiz için kullanılan programlar arasında bulunan QIIME en çok tercih edilen yazılımdır. Çeşitli çalışmalarda QIIME'nin "altın standartlar" üzerine kurulu olduğu ifade edilmektedir (Oulas ve diğ., 2015).

2.3.3. İşlevsel Taksonomik Birimler (OTU'lar)

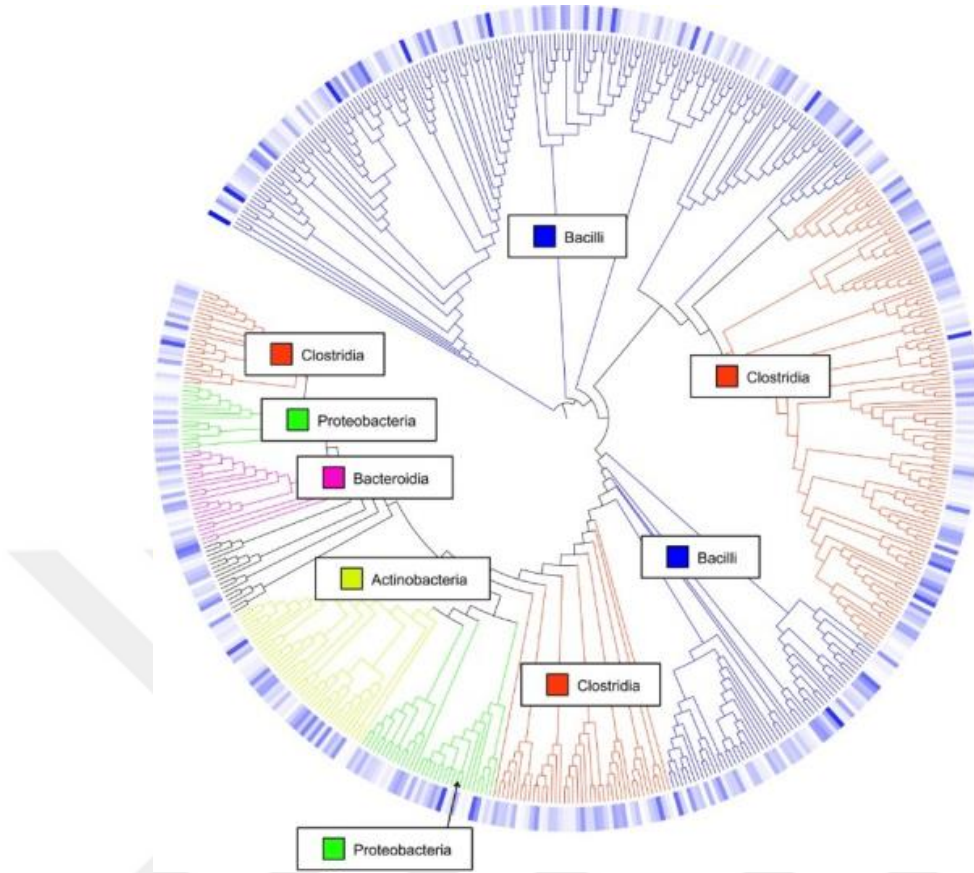
16S metagenomik yaklaşımlarında işlevsel taksonomik birimler (OTU'lar), 16S rDNA markır gen dizisine benzer 16S rRNA geni dizilerinin varyantlarının kümeleridir. Diziler benzerlik oranına göre işlevsel taksonomik birimler olarak kümelendirilirler. OTU kümeleri, cins basamağında 16S gen dizisi varyantlarının % 97 benzerlik oranı ile oluşturulurlar (Şekil 2.15). Türlerin ayrılması için ise % 98 veya % 99 benzerlik oranı önerilmektedir. Bu kümelerin her

birinin, dizi benzerliği eşiğine bağlı olarak bakteri türlerinin veya cinsinin taksonomik bir birimi temsil etmesi amaçlanmıştır (Franzén ve diğ., 2015; Nguyen ve diğ., 2016).



Şekil 2.15: OTU ve %97 benzerlik eşiği ile kümeleme (Hiltemann ve Batut, 2017).

Dizi benzerliği eşine bağlı olarak yapılan taksonomik sınıflandırma sonucunda, alınan çevresel örneklerin OTU kladogramı oluşturulabilmektedir (Şekil 2.16).



Şekil 2.16: İşlevsel taksonomik birim (OTU) kladogramı (Danzeisen ve diğ., 2013).

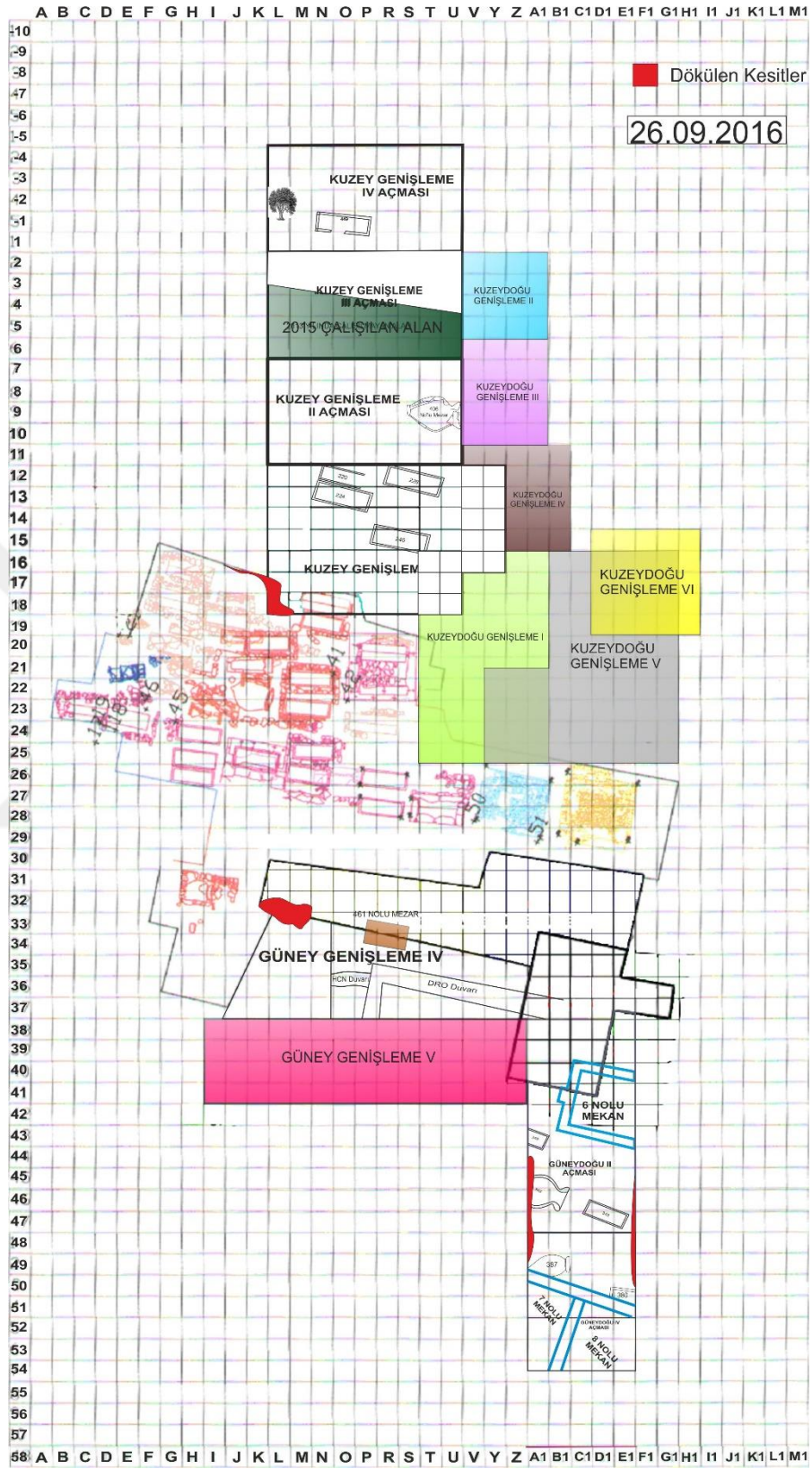
3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BALIKESİR/ANTANDROS ANTİK KENTİ TOPRAK ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Tez kapsamında kullanılan Balıkesir/Antandros Antik Kenti kazısı toprak örnekleri, arkeologlar gözetiminde açılan mezarlardan, çıkarılan mezar hediyelerinden, nekropolde bulunan ve depolama amaçlı kullanıldığı düşünülen pithoslardan alındı. Açılan mezarlardan örnek alınırken - bağırsaklardaki bakteriler göz önünde bulundurularak - örnek konumu olarak iskelet seviyesi karın bölgesi tercih edildi. Açılan mezarlardan çıkarılan mezar hediyelerinin (örneğin; koku kabı olarak kullanıldığı tahmin edilen buluntular) içerisinde de toprak örnekleri alındı. Balıkesir/Antandros Antik Kenti nekropolü, farklı dönemlerde yerleşim alanı olarak da kullanıldığından, büyük depolama kaplarına (pithos) da rastlandı. Bu pithosların içerisinde de toprak örnekleri alındı.

Toprak örnekleri alınırken kontaminasyon riskine önlem olarak, örnek alınacak noktadaki kişi sayısının olabildiğince az olmasına dikkat edildi. Mezarların açılması ve toprak örneği alınması işlemleri arkeologlarla işbirliği içerisinde steril koşullarda gerçekleşti. Örneğin alınacağı konuma yakın kişilerin maske, bone ve eldiven takmasına özen gösterildi. Toprak örnekleri, belirtilen konumlardan, tek kullanımlık steril eldiven ile alındı. Alınan örnekler kilitli poşetlerin içerisinde ayrı ayrı saklandı.

Şekil 3.1’de Balıkesir/Antandros Antik Kenti nekropolünün 2016 yılı genel plan karesi görülmektedir. 2016 yılı kazı sezonunda toplam 7 mezardan (mezar kodları; 453, 480, 486, 487, 488, 490, 493), Kuzeydoğu Genişleme V açması içerisinde bulunan depolama amaçlı kullanıldığı düşünülen pithostan, açılan mezarlarda bulunan 5 adet mezar hediyesinden toplam 12 adet toprak örneği kilitli poşet içerisinde alındı. Örneklerin alındığı mezarlar çoğunlukla Kuzeydoğu Genişleme III ve Kuzeydoğu Genişleme IV açmalarında yer almaktadır. Alınan sadece bir örnek Kuzey Genişleme III açmasında yer almaktadır. Alınan örnekler T.C. Balıkesir Valiliği İl Kültür ve Turizm Müdürlüğü Kuva-yi Milliye Müzesi Müdürlüğü komisyonun (EK 1.), müze müdürünün (EK 2.) ve kazı başkanının (EK 3.) bilgisi ve izni dahilinde İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Antik DNA Laboratuvarı’nda çalışılmak üzere İstanbul’a getirildi.



Şekil 3.1: 2016 yılı nekropol genel plan kare (Antandros Kazı Arşivi).

3.2. TOPRAK ÖRNEKLERİNDEN DNA İZOLASYONU

Balıkesir/Antandros Antik Kenti nekropolünden alınan toprak örneklerinin DNA izolasyon işlemi, steril kabin içerisinde yapıldı. İzolasyon öncesinde kabin 20 dk boyunca UV ışık ile sterilize edildi. İzolasyonu yapılacak toprak örneği, içerisindeki taşların fiziksel parçalanmasını hızlandırmak amaçlı otoklavlanmış havan içerisinde dövülüp toz haline getirildi. DNA izolasyon prosedürü, NORGEN firmasının, sadece topraktan DNA izolasyonu için tasarladığı Soil DNA Isolation Kit (Norgen Biotek, Ontario, Kanada, Katalog no: 26500) prosedürünün bazı solüsyon miktarları optimize edilerek uygulandı. Steril havanda toz haline getirilen toprak örneğinin 300 mg'ı hassas terazide tartılarak alındı ve kit içerisinde bulunan boncuklu tüpe (Bead Tube) aktarıldı. Tüpün içerisindeki toprak örneğinin üzerine 750 µl Lysis Buffer G solüsyonu eklendikten sonra, tüpün kapağı kapatılarak kısa bir süre vortekslendi. Tüpün içerisine 100 µl Lysis Additive A solüsyonu eklendi ve yeniden tüpün kapağı kapatılarak kısa bir süre vortekslendi. Tüpün içerisindeki toprak örneğinin hücre parçalanması aşamasında dismembratör kullanıldı. Dismembratör 3000 rpm hızda 2 dk boyunca çalıştırıldı. Dismembratör kullanımıyla, tüpün içerisindeki boncuklarla ve kullanılan solüsyonlarla hücre parçalanması etkili bir şekilde gerçekleşti. 14000 rpm'de 2 dk boyunca santrifüj edildi. 500 µl süpernatant 1.5 ml'lik kapaklı tüpe alındı. Süpernatantın üzerine 50 µl Binding Buffer I solüsyonu eklendikten sonra 5 dk buzda bekletildi. Bekleme süresinin ardından 14000 rpm'de 2 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökme gözlemlendi, pellet tüp içinde bırakılarak mikropipet yardımıyla 450 µl süpernatant, beyaz filtreli humik asit uzaklaştırma kolonuna (Humic Acid Removal Column) aktarıldı. Humik asit uzaklaştırma kolonu, 2 µl'lik kapaksız tüpün içine yerleştirildi. 8000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Alttaki tüpe geçen sıvı ile devam edildi, filtre atıldı. Santrifüj sonrası alttaki tüpe geçen sıvının üzerine 230 µl %96'lık etanol eklendi. Tüpün içerisindeki sıvı, yaklaşık 630 µl, gri filtreli DNA bağlama kolonuna (Spin Column) aktarıldı. DNA bağlama kolonu, kapaksız 2 µl'lik tüpün içine yerleştirildi. 8000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüjün ardından altta kalan sıvı atıldı. Çünkü bu aşamada DNA filtreye bağlandı. Bu aşamadan sonraki adımlarda kolon yıkama işlemleri gerçekleştirildi.

DNA izolasyon işlemi her örnek için üçer kez tekrar edildi. İzolasyon sonucunda, örneklerin DNA konsantrasyonları ve saflık değerleri Thermo Scientific NanoDrop 2000 spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. Bu cihaz ile DNA miktar tayininde, 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbands

değerlerine göre ölçüm yapıldı. Öncelikle DNA, kitin içerisinde bulunan Elution Buffer içerisinde çözülmesi için, 1 µl Elution Buffer cihaza yüklenerek “blank” ölçüm alındı. Daha sonra örneklerden 1 µl cihaza yüklenerek DNA konsantrasyonları ölçüldü. Saflık kontrolü için ise DNA’nın 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorpsiyon değerlerinin oranı (A260/A280) kullanıldı. Bu oran 1.8-2.0 değer aralığında ise izolasyonu yapılan DNA’nın saf olduğu, değer aralığının dışında ise DNA’nın saf olmadığı kabul edildi (Matlock, 2015).

3.3. PZR YÖNTEMİ İLE 16S rRNA GENİ V3-V4 BÖLGESİNİN ÇOĞALTILMASI

İzolasyonu yapılan toprak örneklerinin 16S rRNA geni V3-V4 bölgeleri PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Bu PZR çalışmasıyla, izolasyonu yapılan örneklerin çalışıp çalışmadığının kontrolü yapıldı. Bu protokole kullanılan primer çiftleri (S-D-Bact-0341-b-S-17, S-D-Bact-0785-a-A-21), 16S rRNA geni, V3 ve V4 bölgesini hedeflemektedir. Klindworth ve diğ.’nin 2013 yılında yayımlanan çalışması, bu dizilerin seçilmesinde referans olmuştur.

S-D-Bact-0341-b-S-17 ➔ CCTACGGGNGGCWGCAG

S-D-Bact-0785-a-A-21 ➔ GACTACHVGGGTATCTAATCC

16S Amplikon PZR İleri (Forward) Primer = 5’

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S Amplikon PZR Geri (Reverse) Primer = 5’

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAAT
CC

Koyu yazılan diziler; 16S rRNA geni V3-V4 bölgelerine özgü primer dizileridir. Normal yazılan diziler ise, Illumina evrensel adaptör dizileridir³. V3-V4 bölgelerine özgü primerler dizilerinde N harfi A,T,G ya da C; W harfi A ya da T; H harfi A, C ya da T; V harfi de A, C ya da G nükleotitlerini temsil etmektedir. PZR işleminde, N, W, H ve V’nin yerine gelebilecek nükleotitlerin bütün kombinasyonları ile tasarlanan primerleri eşit miktarda içeren karışım kullanıldı.

³ <https://support.illumina.com>

PZR öncesinde Tablo 3.1’de miktarları belirtilen bileşenler hazırlandı.

Tablo 3.1: PZR için gerekli bileşenler.

Bileşen Adı	Hacim
Mikrobiyal DNA (5ng/μl)	2.5 μl
16S Amplikon PZR İleri (Forward) Primer = 5’	5 μl
16S Amplikon PZR Geri (Reverse) Primer = 5’	5 μl
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems, KK2601)	12.5 μl
Toplam	25 μl

PZR işlemi, Tablo 3.1’de hazırlanan bileşenlerle C1000 Thermal Cycler (Biorad Laboratories, Inc., ABD) cihazı kullanılarak, Tablo 3.2’de belirtilen koşullar uygulanarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.2: PZR koşulları.

Döngüler	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	3 dk	1
-Denatürasyon	95	30 sn	} 25
-Bağlanma	55	30 sn	
-Uzama	72	30 sn	
Son Uzama	75	5 dk	1
Bekleme	4	∞	

PZR sonrası, çoğaltılan amplikonların primer, primer dimer ve diğer PZR bileşenlerinden temizlenmesi için PZR pürifikasyon basamağı uygulandı. Temizlenen amplikonlara, ait oldukları örneklerle özgü, Illumina index dizileri eklendi ve amplikonlar tekrar pürifiye edildi³.

PZR işlemi her bir örnek için üçer kez tekrar edildi. PZR sonucunda yaklaşık 460 bp uzunluğunda amplikonlar çoğaltıldı. PZR çalışması ile çoğaltılan örnekler jel elektroforezinde görüntülendi. İzolasyonu yapılan ve V3-V4 bölgeleri çoğaltılan örneklerin DNA’larının kalitatif analizi, çözelti miktarları Tablo 3.3’te belirtilen % 1,2’lik agaroz jel elektroforezi ile yapıldı.

Tablo 3.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.

Çözeltilerin Adı	İçeriği
50X TAE Tamponu	2 M Tris bazı (Sigma, T8524), %0.0571 Glasiyal asetik asit (Sigma, A9967), 50 mM EDTA (pH 8.0)
10 mg/ml EtBr	10 mg EtBr, 1 ml distile su
6X Yükleme Tamponu	100 mM EDTA (pH 8.0), %1 SDS, %60 Gliserol, %0.03 Bromofenol mavisi, %0.03 Ksilen siyanol FF

Uygulanan agaroz jel elektroforezinde 1 kb ladder (NEB) kullanıldı. DNA'nın agaroz jelde yürütülmesi için 1X Tris-asetat-EDTA (TAE) tampon sistemi kullanıldı. %1,2'lik jel elektroforezi için 0.48 g agaroz (Sigma, A5073) tartıldı. Üzerine stok 50X TAE tamponunun sulandırılmasıyla hazırlanan, 40 ml 1X TAE tamponu eklenerek mikrodalga fırında 2 dakika süre ile çözdürüldü. Oda sıcaklığında yaklaşık 40 °C'ye kadar soğutulan jelle 3.2 µl EtBr eklenip karıştırıldı. Jel, tarağın yerleşmiş olduğu yatay elektroforez kasedine (BioRad, 1704416EDU) dökülerek 30 dakika boyunca polimerize olması için bekletildi. Katılaşan agaroz jel, 1X TAE tamponu içeren yatay elektroforez tankının içine yerleştirildi. 5 µl DNA örneği, 1µl 6X DNA Yükleme boyası (Thermo Scientific, R0611) ile karıştırıldıktan sonra taraklarla oluşturulan kuyulara yüklenerek 85 V sabit akımda, 50 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra DNA'lar UV transillüminatör (Vilber Lourmat, ECX-F26.M) ile görüntülendi.

3.4. 16S RRNA GENİ V3-V4 BÖLGESİ ÇOĞALTILAN ÖRNEKLERİN ILLUMINA YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ İLE DİZİLENMESİ

İzolasyon sonucunda PZR yöntemi ile 16S rRNA genlerinin V3-V4 bölgesi çoğaltılan örneklerden 8 tanesi, PZR sonucunda jel görüntüsüne de bakılarak dizilemeye gönderilmek üzere seçildi. Seçilen örnek isimleri aşağıdaki gibidir:

- ✓ 480 No'lu mezar iskelet seviyesi
- ✓ 486 No'lu mezar iskelet seviyesi
- ✓ 487 No'lu mezar iskelet seviyesi
- ✓ 490 No'lu mezar iskelet seviyesi
- ✓ Kuzeydoğu Genişleme V depolama amaçlı kullanıldığı düşünülen pithos
- ✓ 453 No'lu mezar hediyesi HTJ 3
- ✓ 493 No'lu mezar iskelet seviyesi
- ✓ 486 No'lu mezar hediyesi HUI 5

Örneklerin DNA dizileme işlemi için Piya Biyoteknoloji şirketinden profesyonel hizmet alımı yapıldı. Örneklerin DNA dizilemesi Illumina MiSeq sistemi kullanılarak yapıldı. Örneklerin DNA dizileri fasta ve qual formatında elde edildi.

3.5. DİZİLEME VERİLERİNİN METAGENOMİK ANALİZİ

Dizileme verilerinin metagenomik analizi için QIIME 1.9.1 versiyonu kullanıldı ve analiz protokolü Kuczynski ve diğ. tarafından 2011 yılında yayımlanan makale referans alınarak uygulandı.

Bu protokolün ilk basamağını gerçekleştirmek için 3 dosyaya ihtiyaç vardır:

Dizi Dosyası (.fna): Illumina dizileme sonrasında elde edilen DNA dizilerini içeren fasta dosyasıdır.

Kalite Skoru Dosyası (.qual): Yine dizileme sonrasında elde edilen kalite skoru dosyası, fasta dosyasına kalite değerlerinin eklenmesiyle oluşturulur.

Haritalama Dosyası (.txt): Haritalama dosyası kullanıcı tarafından oluşturulur. Bu dosya, veri analizini gerçekleştirmek için örneklerle ilgili gerekli olan tüm bilgileri içerir. En azından, eşleşme dosyasında her numunenin adı, her bir numune için kullanılan barkod dizisi, numunenin çoğaltılması için kullanılan bağlayıcı primer dizisi ve açıklama sütunu bulunmalıdır.

3.5.1. Çoklu Okuma Sonuçlarını Biyolojik Örneklerle Atama

Bu aşama, çoklu okuma sayılarını, örneklerin barkod dizilerine göre atamayı amaçlar. Bu aşama için dizi, kalite skoru ve haritalama dosyaları gereklidir. Ayrıca bu adım, her bir dizinin kalite filtrelemesini de yapar; düşük kaliteli veya belirsiz okumaları kaldırır. Bu aşamada yeni nesil dizileme sonucunda elde edilen ham dizilerin uçları kalite skor değerleri dikkate alınarak kısaltıldı. (Kalite skoru >25) Belirtilen işlemler için *split_libraries.py* komut dizisi uygulandı. Uygulanan komut dizisi aşağıdaki gibidir:

```
split_libraries.py -m barkod-dosyaadı.txt -f dizileme-
dosyaadı.raw.fasta.gz -q dizileme-dosyaadı.raw.qual.gz -o
```

Bu komut dizisi sonucunda aşağıdaki iki dosya elde edildi:

split_library_log.txt: Bu dosya, her örnek için tespit edilen okuma sayısını ve kalite skorları nedeniyle kaldırılan okumaların kısa bir özetini içerir.

seqs.fna: Bu dosya, dizilerin geldiği örneğe göre yeniden adlandırıldığı fasta dosyasıdır. Başlık satırında ayrıca, girilmiş fasta dosyasından okunan isim bilgileri ve düzeltilen tüm barkod hataları hakkında bilgi bulunur.

Bu aşamada kalite kontrolden geçmiş bütün diziler içerdikleri barkodlara göre yeniden isimlendirilerek (Tablo 3.4) hangi örneğe ait oldukları belirlendi. (Yeni nesil dizileme işlemi sırasında her örneğe spesifik 8 nükleotid uzunluğunda barkod dizileri eklendi. Bu sayede her bir örnekten gelen DNA dizilerinin ayrıştırılabilmesi amaçlandı.)

Tablo 3.4: Örneklere ait spesifik barkod dizileri.

Örnek Kodu	Örnek Adı	Barkod Dizisi	Bağlayıcı Primer Dizisi
1A	453 mezar hediyesi HTJ 3	CAGTTCAT	CCTACGGGNGGCWGCAG
2A	Kuzeydoğu Genişleme V	CAGTTGCA	CCTACGGGNGGCWGCAG
3Y	490 iskelet seviyesi	CATGCGCA	CCTACGGGNGGCWGCAG
4A	493 iskelet seviyesi	CATAACAA	CCTACGGGNGGCWGCAG
5A	480 iskelet seviyesi	CATAATAG	CCTACGGGNGGCWGCAG
6A	486 iskelet seviyesi	CATATTCT	CCTACGGGNGGCWGCAG
7A	487 iskelet seviyesi	CATCAACA	CCTACGGGNGGCWGCAG
8A	486 mezar hediyesi HUI 5	CATCACCG	CCTACGGGNGGCWGCAG

3.5.2. İşlevsel Taksonomik Birimlerin (OTU'ların) Belirlenmesi

OTU belirleme aşamasında, benzerlik eşiğine (%97) bağlı kalınarak benzer diziler, kümeleme yöntemiyle işlevsel taksonomik birimlere (OTU'lara) atanır. Bu basamağın gerçekleşmesi için bir önceki aşamanın sonucunda oluşan fasta formatlı (.fna uzantılı) dizi dosyası gerekmektedir. Basamağı uygulamadan önce ise OTU eşik değeri (varsayılan değer; 0.97) ve dizileri OTU'lara kümelemek için uygulanacak olan yöntem belirlenmelidir.

Bu aşamada *pick_otus.py* komut dizisi uygulandı. Uygulanan komut aşağıdaki gibidir:

```
pick_otus.py -i split_Library_output_8bp/seqs.fna -o picked_otus_default
```

Bu aşama, QIIME üzerinden varsayılan (default) Uclust parametreleri kullanılarak tamamlandı. Bu aşamanın sonucunda örneklere ait dizilerin kalite kontrolleri yapıldı, kimerik diziler filtrelendi ve kümelemeler gerçekleştirildi.

3.5.3. Her Bir OTU'yu Temsil Eden Dizin Belirlenmesi

OTU'ların belirlenmesinden sonra, diğer aşamalardaki analizlerde kullanılmak üzere her bir OTU'dan temsili bir dizi seçilmesi gerekmektedir. Bu aşamanın gerçekleşmesi için bir önceki basamak sonucunda oluşan seqs_otus.txt dosyası ve iki basamak önce elde edilen fasta formatlı (.fna uzantılı) dizi dosyası gerekmektedir.

Bu aşamada *pick_rep_set.py* komut dizisi uygulandı. Uygulanan komut aşağıdaki gibidir:

```
pick_rep_set.py -i picked_otus_default/seqs_otus.txt -f split_Library_output_8bp/seqs.fna
-o rep_set1.fna
```

3.5.4. Her Bir Temsilci Dizin Taksonomik Ataması

Bu aşamada, bir önceki basamakta belirlenen her bir OTU'nun temsili dizilerine taksonomik atamalar yapıldı. Dizilerin taksonomik atamaları varsayılan (default) Uclust parametreleri ve Greengenes veri tabanı (versiyon 13.8) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu aşamanın gerçekleşmesi için bir önceki adımın çıktısı olan rep_set1.fna dosyası gerekmektedir.

Bu aşamada *assign_taxonomy.py* komut dizisi uygulandı. Uygulanan komut aşağıdaki gibidir:

```
assign_taxonomy.py -i rep_set1.fna
```

Elde edilen sonuçlar farklı taksonomik basamaklara ayrılarak, örneklerdeki mikrobiyal çeşitlilik belirlendi.

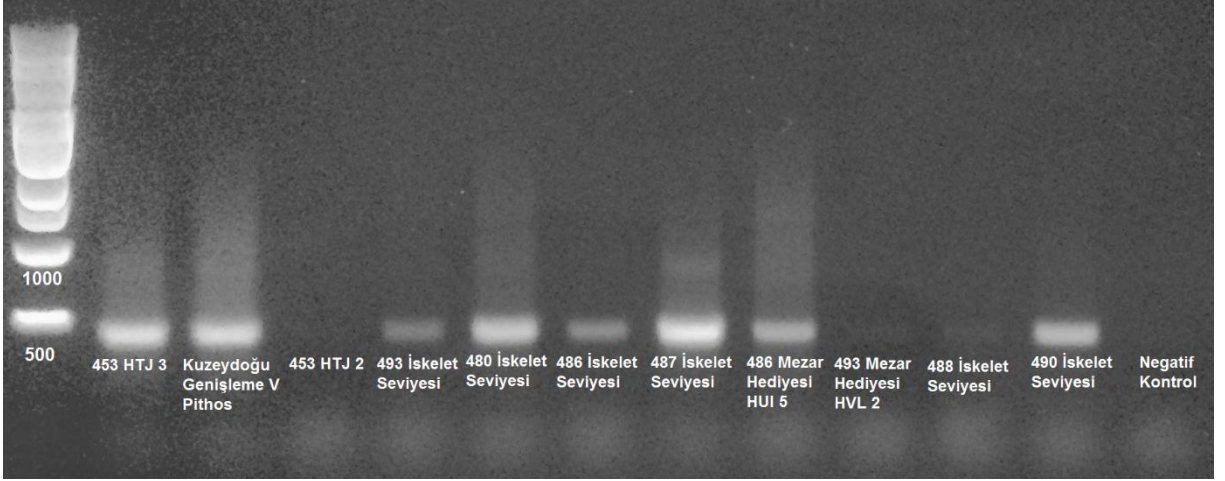
4. BULGULAR

Alınan toprak örneklerinin DNA izolasyonu sonrasında spektrofotometrik ölçüm ile elde edilen konsantrasyon ve saflık değerleri Tablo 4.1’de belirtilmiştir.

Tablo 4.1: DNA izolasyonu yapılan örneklerin spektrofotometrik ölçüm değerleri.

Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/μl)	Absorbsiyon 260/280	Absorbsiyon 260/230
1 480 No’lu mezar iskelet seviyesi	8.4	1.59	0.08
2 486 No’lu mezar iskelet seviyesi	8	1.72	0.05
3 487 No’lu mezar iskelet seviyesi	10.7	3.02	0.02
4 488 No’lu mezar iskelet seviyesi	12.2	2.34	0.02
5 490 No’lu mezar iskelet seviyesi	9.2	1.7	0.03
6 493 No’lu mezar hediyesi HVL 2	9.9	1.67	0.06
7 Kuzeydoğu Genişleme-V Pithos	19.1	1.51	0.04
8 453 No’lu mezar hediyesi HTJ 2	10.3	1.65	0.03
9 453 No’lu mezar hediyesi HTJ 3	8.4	1.95	0.01
10 493 No’lu mezar iskelet seviyesi	6.7	1.84	0.04
11 480 No’lu mezar hediyesi HUP 8	5.8	2.14	0.02
12 486 No’lu mezar hediyesi HUI 5	5.1	2.09	0.03

DNA izolasyonu yapılan 12 örneğin V3-V4 bölgesinin çoğaltılabilmesi için PZR yöntemi uygulandı. Daha sonra PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kalitatif analiz yapıldı ve agaroz jel üzerinde oluşan bantlar görüntülendi (Şekil 4.1). Bunun sonucunda 8 örneğin V3-V4 bölgesinin başarıyla çoğaltılabildiği görüldü.



Şekil 4.1: V3-V4 bölgesi PZR yöntemiyle çoğaltılan örneklerin elektroforez jel görüntüsü.

Başarılı bir şekilde V3-V4 bölgesi çoğaltılan 8 örneğin yeni nesil dizileme yöntemi ile dizilenmesine karar verildi. Şekil 4.2-4.9’da görülen mezarlar, mezar hediyeleri ve depolama kapları dizilenecek örneklerin alındığı konumlardır.



Şekil 4.2: 453 No’lu urne mezar, 453 No’lu mezar hedyesi HTJ 3 (Antandros Kazı Arşivi).

453 No’lu mezardaki buluntular göz önünde bulundurularak tarihlendirme, kazı ekibi tarafından M.Ö. 2. yy olarak yapılmıştır. Birincil kremasyonun küllerinin urne kabının içerisine konulduğu gözlemlenmiştir. Bu, Antandros nekropolünde nadir görülen bir uygulamadır. Mezar hedyesi olarak gelen kapların bazı parçalarının kırılıp yanmış olmasından ötürü büyük renk değişimlerinin olduğu, restorasyon çalışmaları sırasında görülmüştür. Yüksek olasılıkla

birey yakıldıktan sonra seremonisi yapılmış ve hediyeleri yerleştirilmiş, sonrasında bir çukur açılıp, kemikler süpürüldükten sonra urne içerisine yerleştirilmiştir. Urne kabının istinat taşlarının güneyinden tam korunmuş olarak ele geçen mezar hediyesi HTJ 3 khytridion formundadır. Mezar hediyesi HTJ 3 içerisinden toprak örneği alındı. HTJ 3 kodlu mezar hediyesinin Şekil 3.1’de görülen plan karedeki konumu 2-3/S-T’dir.



Şekil 4.3: Kuzeydoğu Genişleme V, depolama amaçlı kullanıldığı düşünülen pithos (Antandros Kazı Arşivi).

İçerisinden toprak örneği alınan depolama amaçlı kullanıldığı düşünülen bu pithosun Kuzeydoğu Genişleme V açmasında yer alması, aynı açmada bulunan amphoralarla birlikte düşünüldüğünde bu alanın bir depolama alanı olarak kullanılmış olma düşüncesini güçlendirmektedir.



Şekil 4.4: 490 No’lu çatı kiremiti mezar (Antandros Kazı Arşivi).

490 No’lu mezarın tarihlendirmesi kazı ekibi tarafından Hellenistik dönem (M.Ö. 330-30) olarak yapılmıştır. Kiremitlerin üst bölümleri alt bölümlerine oranla daha fazla tahrip olmuş durumdadır. Batı bitişiğinde yere yatay bir şekilde yer alan bir başka kiremitin bu mezarı kapama amaçlı kullanıldığını veya mezarın tabanı olduğunu düşündürmektedir. Mezarın sadece doğu kiremitleri korunabilmiştir. Doğudaki kiremit alındıktan sonra bireyin ayaklarının doğuda korunmamış şekilde, baş kısmının ise batıda olduğu anlaşılmıştır. 490 No’lu mezarın iskelet seviyesinin tahmini karın bölgesinden toprak örneği alındı. 490 No’lu mezarın Şekil 3.1’de görülen plan karedeki konumu 12-13/Y’dir.



Şekil 4.5: 493 No’lu pithos mezar (Antandros Kazı Arşivi).

493 No'lu mezardaki buluntular göz önünde bulundurularak tarihlendirme, kazı ekibi tarafından M.Ö. 6. yy olarak yapılmıştır. Pithos dip kısmı korunmamış, çok kırıklı olarak ele geçmiştir. 493 No'lu mezarın iskelet seviyesinin tahmini karın bölgesinden toprak örneği alındı. 493 No'lu mezarın Şekil 3.1'de görülen plan karedeki konumu 13/Z-A1'dir.



Şekil 4.6: 480 No'lu pithos mezar (Antandros Kazı Arşivi).

480 No'lu mezardaki buluntular göz önünde bulundurularak tarihlendirme, kazı ekibi tarafından M.Ö. 4. yy olarak yapılmıştır. Pithosun ağzı ve gövdesinin üzerindeki toprağın baskısı ve üst yapısı nedeniyle pithosta çökmeler ve kırılmalar meydana gelmiş. Çok parçalı olarak açığa çıkarılmıştır. 480 No'lu mezarın iskelet seviyesinin tahmini karın bölgesinden toprak örneği alındı. 480 No'lu mezarın Şekil 3.1'de görülen plan karedeki konumu 11/A1-B1'dir.



Şekil 4.7: 486 No'lu çatı kiremiti mezar (Antandros Kazı Arşivi).

486 No'lu mezardaki buluntular göz önünde bulundurularak tarihlendirme, kazı ekibi tarafından M.Ö. 2. yy sonu olarak yapılmıştır. Bu mezar, birincil kremasyon çatı kiremiti mezardır. 486 No'lu mezarın iskelet seviyesinin tahmini karın bölgesinden toprak örneği alındı. 486 No'lu mezarın Şekil 3.1'de görülen plan karedeki konumu 13-14/ V-Z'dir.



Şekil 4.8: 487 No'lu pithos mezar (Antandros Kazı Arşivi).

487 No'lu mezardaki buluntular göz önünde bulundurularak tarihlendirme, kazı ekibi tarafından M.Ö. 5. yy olarak yapılmıştır. Pithos içerisinden yetişkin bir bireye ait kemikler nemli, kumlu toprak yapısı ve pithosun içerisindeki ortamdan dolayı kemiklerin tahrip olduğu görülmüştür. 487 No'lu mezarın iskelet seviyesinin tahmini karın bölgesinden toprak örneği alındı. 487 No'lu mezarın Şekil 3.1'de görülen plan karedeki konumu 12/Y-Z'dir.



Şekil 4.9: 486 No’lu mezar hediyesi HUI 5 (Antandros Kazı Arşivi).

486 No’lu çatı kremeti mezarda bireyin kafatası kemiklerinin üst seviyesinden ele geçirilen mezar hediyesi HUI 5, khytridion formundadır. Tarihlendirmesi kazı ekibi tarafından 2. yy sonu -1. yy başı olarak yapılmıştır. Birincil kremasyon 486 No’lu mezar hediyesi olan HUI 5’in içerisinde toprak örneği alındı. HUI 5 kodlu mezar hediyesinin Şekil 3.1’de görülen plan karedeki konumu 13/Y’dir.

Belirtilen konumlardan alınan 8 örnek, DNA izolasyonu ve PZR işlemi sonucunda, yeni nesil dizileme yöntemi ile Illumina MiSeq sistemi kullanılarak Piya Biyoteknoloji şirketi tarafından dizilenmiştir. Dizileme sonuçları fasta ve qual formatında elde edildi. Dizileme dosyasının

boyutu göz önünde bulundurularak, her bir örneğin içerisinde çok sayıda bulunan ~460 bp büyüklüğündeki DNA dizilerinden yalnızca birer örnek BULGULAR başlığı altında verildi. Koyu renkle yazılan diziler o örneğe ait barkod dizilerini göstermektedir.

- 1A-453 No'lu mezar hediyesi HTJ 3 örneğine ait DNA dizisi;

CAGTTCATCCTACGGGGGGCAGCAGCGAGGAATCTTGGGCAATGGGCGCAAGC
CTGACCCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAACCTCTTT
TGTGAGGGAAGAAGTTCTGACGGTACCTCACGAATAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGC
GTAAAGGGCTTGTAGGCGGTTTCGTTAAGTCCGGTGTGAAATCTCCCGGCTCAAC
TGGGAGGAGCCATCGGAAACTGGCGAGCTAGAGGTGGGCAGAGGAAAGCGGA
ATTCGCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGGCTTTCTGGGCCTATCCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACCGGATTAGATACCCAGTAGTC

- 2A-Kuzeydoğu Genişleme V, Pithos örneğine ait DNA dizisi;

CAGTTGCACCTACGGGGGGCTGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGC
CTGACGCAGCAACGCCGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTT
CAGTGGGGACGAAACCAGACGGTACCCACAGAAGAAGCCCCGGCCAACCTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATCATTGGGC
GTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTCAGTAAGTCGGGTGTGAAACCCTCAGGCTCAA
CCTGGGGACGCCACTCGATACTGCTGTGGCTAGAGTCCAGTAGAGGAGTGTGG
AATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCGGGAGGAACACCAACGGCG
AAGGCAGCACTCTGGGCTGGAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCA
AACAGGAT

- 3Y-490 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğine ait DNA dizisi;

CATGCGCACCTACGGGAGGCTGCAGTGGGGAATTTTGCAGCAATGGGCGAAAGC
CTGACGCAGTAACGCCGCGTGAGGATGAAGGCATTCGGGTTGTAACTCCTGT
CAGGGGGAACGACGGGGAAAGGGTGATAAATCCTTTCTTCCAGACGGTACCTC
CAAAGGAAGCCCCGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAAGGGG
CAAGCGTTGTTTCGGAATCATTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGTGGTTCTGTATGT
CTACCGTGAAAGCGTACGGCTCAACCGTGCAATTGTCGGTAGAACTGCAGGACT
TGAGGCTGGGAGGGGCTGGTGGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATGGGGGAGAACACTCGTGGCGAAGGCGGCCAGCTAGACCAGTTCTGACACTG
AGGCGCGACAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT

- 4A-493 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğine ait DNA dizisi;

CATAACAACCTACGGGGGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGC
CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTGT
TATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTATGCACGTCTTGACGGTACCTAAT
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCT
GATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGAAAATT
GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGA
TATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAT
GTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCGTGTAGTC

- 5A-480 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğine ait DNA dizisi;

CATAATAGCCTACGGGGGGCAGCAGTCGGAATTTTGCCCAATGGACGAAAGT
CTGAGGCAGCAACTCCGCGTGAGGGACCAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTT
TCTCAGGGAAGATCCAAGACGGTACCTGAGGAATAAGCCACGGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGC
GTAAAGAGCGCGCAGGCGGCTGGGTAAGTCCGATGTGAAAGCTTCCGGCTTAA
CTGGAAAACGGCATCGGAACTGCTCGGCTTGAAGGTGGGAGAGGGTAGTGGA
ATTCCCGGTGTAGTGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGGCGGCTACCTGGCCCATCTTGACGCTGAGGCGCGAAAGCTAGGGGAGCGA
ACGGGAT

- 6A-486 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğine ait DNA dizisi;

CATATTCTCCTACGGGTGGCAGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGC
CTGACGCAGCAACGCCGCGTGCGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTT
CAGTAGGGACGAACACAGACGGTACCTACAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGT
GCCGGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATCATTGGGC
GTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTAGTAAGTCGGGTGTGAAAACCCAGGCTCAA
CCTGGGGACGCCACCCGATACTGCTATAGCTAGAGTCCAGTAGGGGAGTGTGG
AATCCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATTGGGAGGAACACCAGCGGCG
AAGGCGGCACTCTGGGCTGGAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGTAGCG
AACAGGATTAGATACCCCTGTAGTC

- 7A-487 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğine ait DNA dizisi;

CATCAACACCTACGGGGGGCTGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGCCGCAAGG
CTGACGCAGCGACGCCGCGTGTTGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCACTGT
CGGGAGGAACGAATACTCGGCCTCGAATAGGGGACCGAGGGTGACGGTACCTC
CAAAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTG
CGAGCGTTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCCCGTTAAG
TGGCTGGTGAAATCCCGGGGCTCAACTCCGGGGCTGCCAGTCAGACTGGCGAG
CTAGAGCACGGTAGGGGCAGATGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAG
AGATCGGGAAGAATACCAGTGGCGAAGGCGTTCTGCTGGGCCGTTGCTGACGC
TGAGGCGCGACAGCGTGGGGAG

- 8A-486 No'lu mezar hediyesi HUI 5 örneğine ait DNA dizisi;

CATCACCGCCTACGGGAGGCAGCAGTCGGGAATTTTGCCCAATGGACGAAAGT
CTGAGGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTT
TCTCAGGGACGATGATGACGGTACCTGAGGAATAAGCCACGGCTTACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTACTGGGCGT
AAAGAGCGCGCAGGCGGTTCGTTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCCGGCTCAACT
GGGGGGCGTCATTCGATACTGATCGACTTGAAGGCAGGAGAGGGAAGCGGAAT
TCCCCGGTGTAGTGGTCAAATGCGTAGATATCGGGAGGAACACCAAGTGGCGAAG
GCGGCTTCCTGGCCTGTTCTTGACGCTGAGGCGCGAAAGCCAGGGGAGCAAAC
GGGATTAGATAACCCCGGTAGTC

Dizilemesi yapılan bu örneklerin metagenomik analizi yapıldı. Metagenomik analizin ilk aşaması olan çoklu okuma sonuçlarının biyolojik örneklerle atanması basamağında elde edilen, dizilenen her bir örneğe ait barkod okuma sayısı Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Her bir örnek için elde edilen barkod okuma sayısı.

Örnek Kodu	Örnek Adı	Okuma Sayısı
1A	453 HTJ 3	191864
2A	Kuzeydoğu Genişleme V	98511
3Y	490 iskelet seviyesi	51500
4A	493 iskelet seviyesi	53471
5A	480 iskelet seviyesi	84957
6A	486 iskelet seviyesi	42453
7A	487 iskelet seviyesi	123523
8A	486 mezar hediyesi	48965

Örneklerin DNA dizilerinin metagenomik analizi basamaklarında OTU’lar belirlendi, her bir OTU’yu temsil eden diziler belirlendi ve sonuç olarak her bir temsilci dizinin taksonomik ataması yapıldı. Elde edilen sonuçlar farklı taksonomik basamaklara göre ayrılarak, örneklerdeki mikroorganizma çeşitliliği belirlendi.

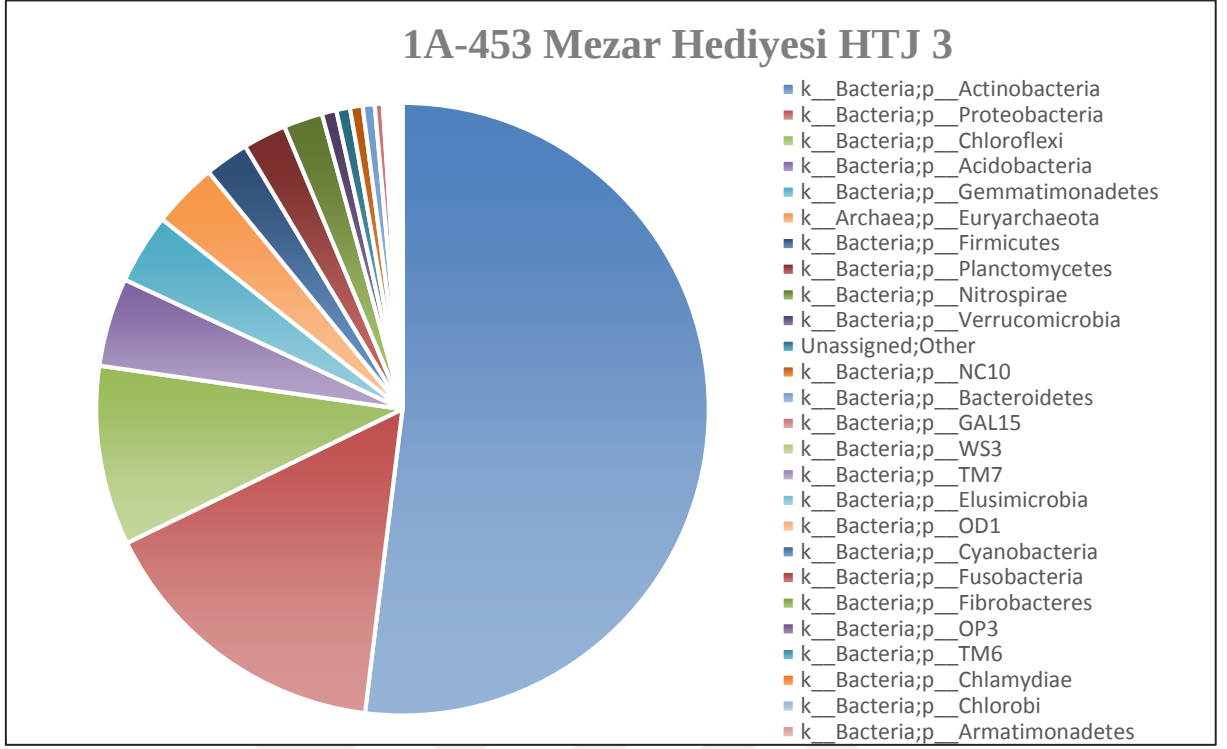
Taksonomik analizde 8 örnek içerisinde toplam 2 alem, 37 şube, 112 sınıf, 211 takım, 336 familya, 468 cins ve 505 tür tespit edildi. Greengenes veri tabanı (versiyon 13.8) kullanılarak yapılan karşılaştırmada herhangi bir taksonomik eşleşmenin yapılamadığı (unassigned) mikroorganizmaların yüzdesi ise her örnek için farklı değerlerdedir.

Taksonomik analiz sonuçları bir tablo yapılarak, her bir örnekte görülen mikroorganizmaların taksonomik bilgileri ve o örnekteki görülme yüzdesi yazıldı. Yapılan taksonomik analiz

sonucunda elde edilen mikroorganizma şube bilgileri kullanılarak her bir örnek için tablo (Tablo 4.3-4.10) ve grafikler (Şekil 4.10-4.17) çizildi.

Tablo 4.3: 1A-453 No'lu Mezar Hediyesi HTJ 3 örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

Alem-Şube Adı	Mikroorganizma Oranı (%)
k__Bacteria;p__Actinobacteria	51,932
k__Bacteria;p__Proteobacteria	15,841
k__Bacteria;p__Chloroflexi	9,464
k__Bacteria;p__Acidobacteria	4,673
k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes	3,695
k__Archaea;p__Euryarchaeota	3,449
k__Bacteria;p__Firmicutes	2,322
k__Bacteria;p__Planctomycetes	2,286
k__Bacteria;p__Nitrospirae	2,057
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia	0,769
Unassigned;Other	0,721
k__Bacteria;p__NC10	0,665
k__Bacteria;p__Bacteroidetes	0,632
k__Bacteria;p__GAL15	0,430
k__Bacteria;p__WS3	0,205
k__Bacteria;p__TM7	0,150
k__Bacteria;p__Elusimicrobia	0,148
k__Bacteria;p__OD1	0,121
k__Bacteria;p__Cyanobacteria	0,096
k__Bacteria;p__Fusobacteria	0,079
k__Bacteria;p__Fibrobacteres	0,061
k__Bacteria;p__OP3	0,060
k__Bacteria;p__TM6	0,033
k__Bacteria;p__Chlamydiae	0,028
k__Bacteria;p__Chlorobi	0,021
k__Bacteria;p__Armatimonadetes	0,019

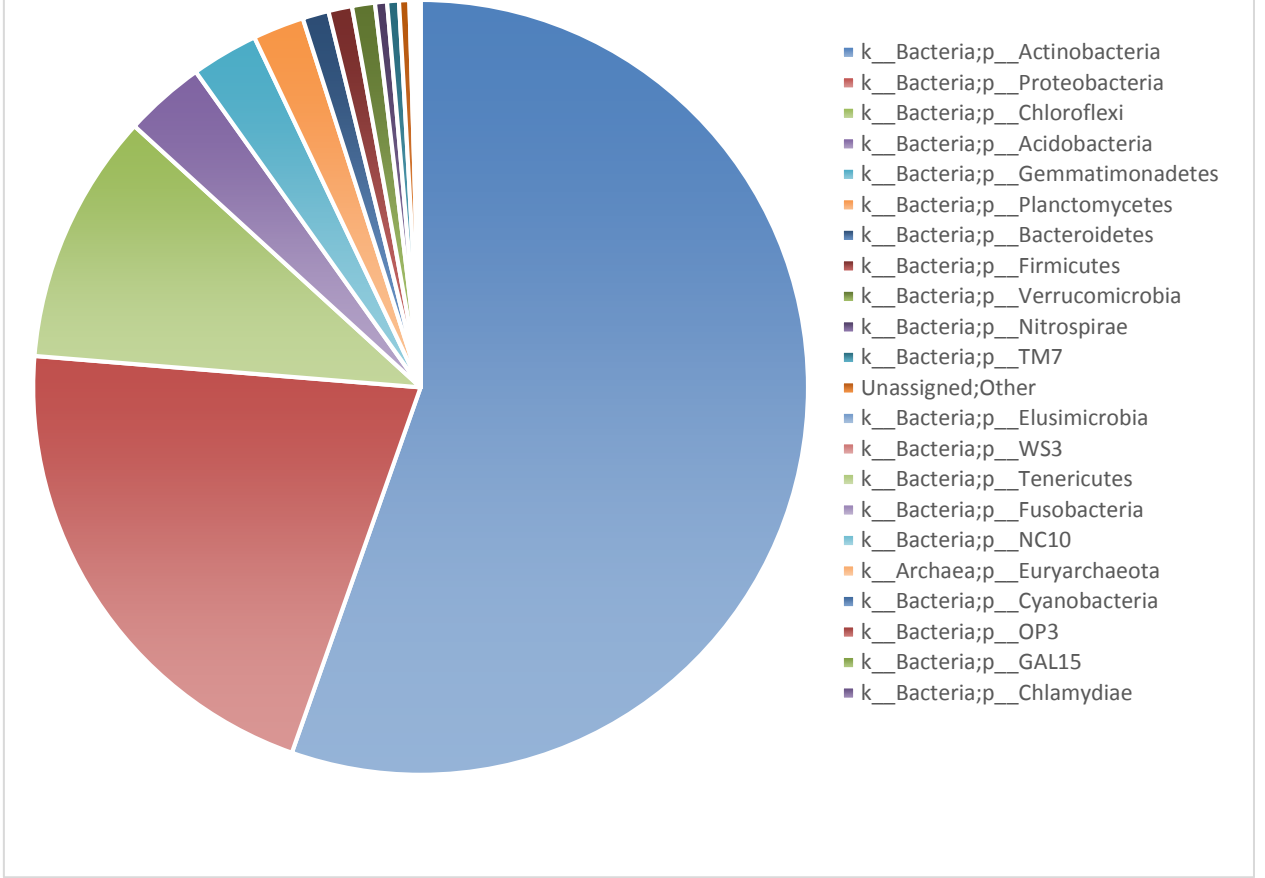


Şekil 4.10: 1A-453 No'lu Mezar Hediyesi HTJ 3 örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.

Tablo 4.4: 2A-Kuzeydoğu Genişleme V, depolama amaçlı pithos örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

Alem-Şube	Mikroorganizma Oranı (%)
k__Bacteria;p__Actinobacteria	55,383
k__Bacteria;p__Proteobacteria	20,898
k__Bacteria;p__Chloroflexi	10,482
k__Bacteria;p__Acidobacteria	3,370
k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes	2,793
k__Bacteria;p__Planctomycetes	2,139
k__Bacteria;p__Bacteroidetes	1,093
k__Bacteria;p__Firmicutes	0,986
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia	0,956
k__Bacteria;p__Nitrospirae	0,500
k__Bacteria;p__TM7	0,491
Unassigned;Other	0,429
k__Bacteria;p__Elusimicrobia	0,088
k__Bacteria;p__WS3	0,072
k__Bacteria;p__Tenericutes	0,063
k__Bacteria;p__Fusobacteria	0,057
k__Bacteria;p__NC10	0,043
k__Archaea;p__Euryarchaeota	0,033
k__Bacteria;p__Cyanobacteria	0,033
k__Bacteria;p__OP3	0,028
k__Bacteria;p__GAL15	0,024
k__Bacteria;p__Chlamydiae	0,022

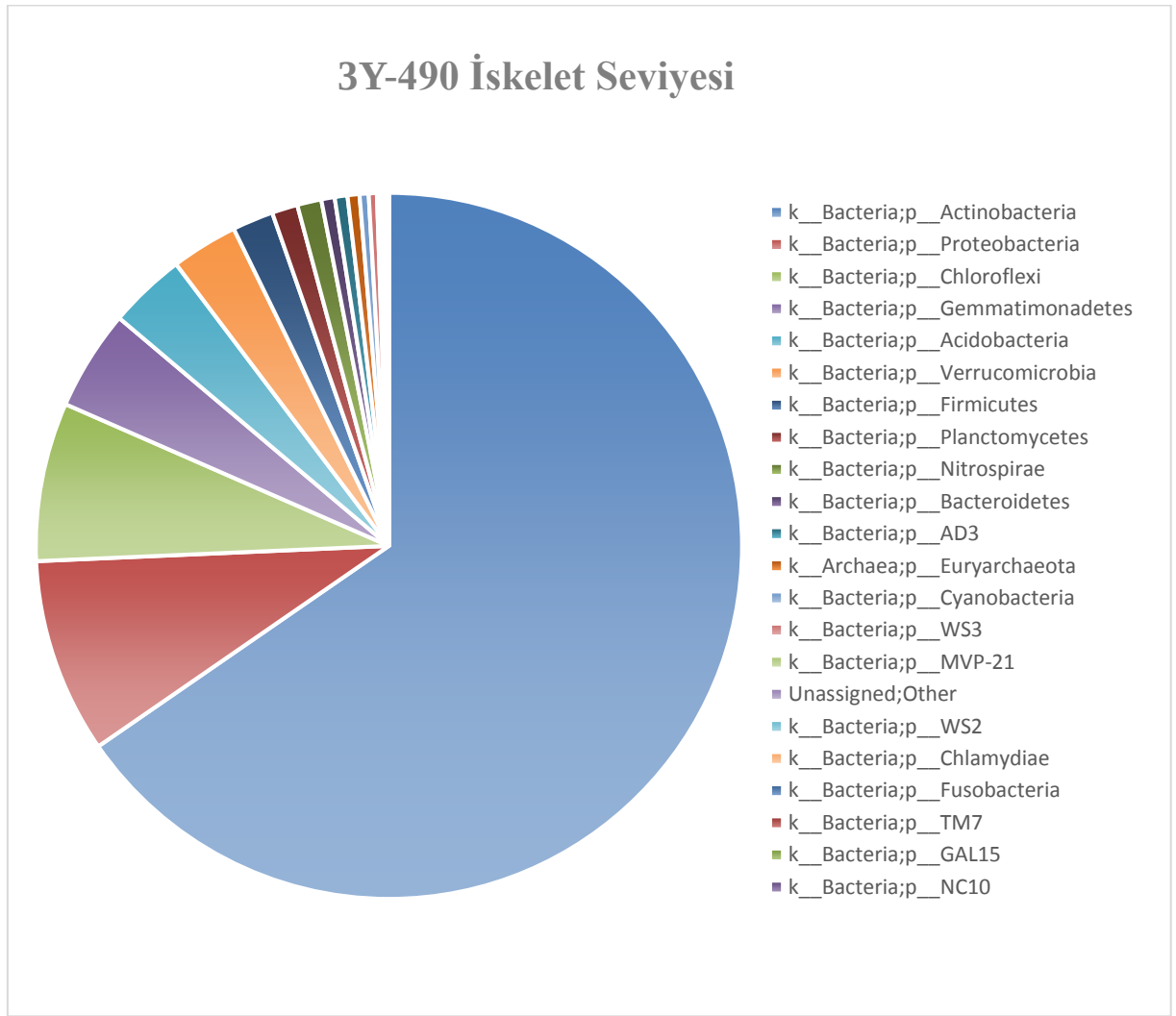
2A- Kuzeydoğu Genişleme V, Pithos



Şekil 4.11: 2A-Kuzeydoğu Genişleme V, depolama amaçlı pithos örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.

Tablo 4.5: 3Y-490 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

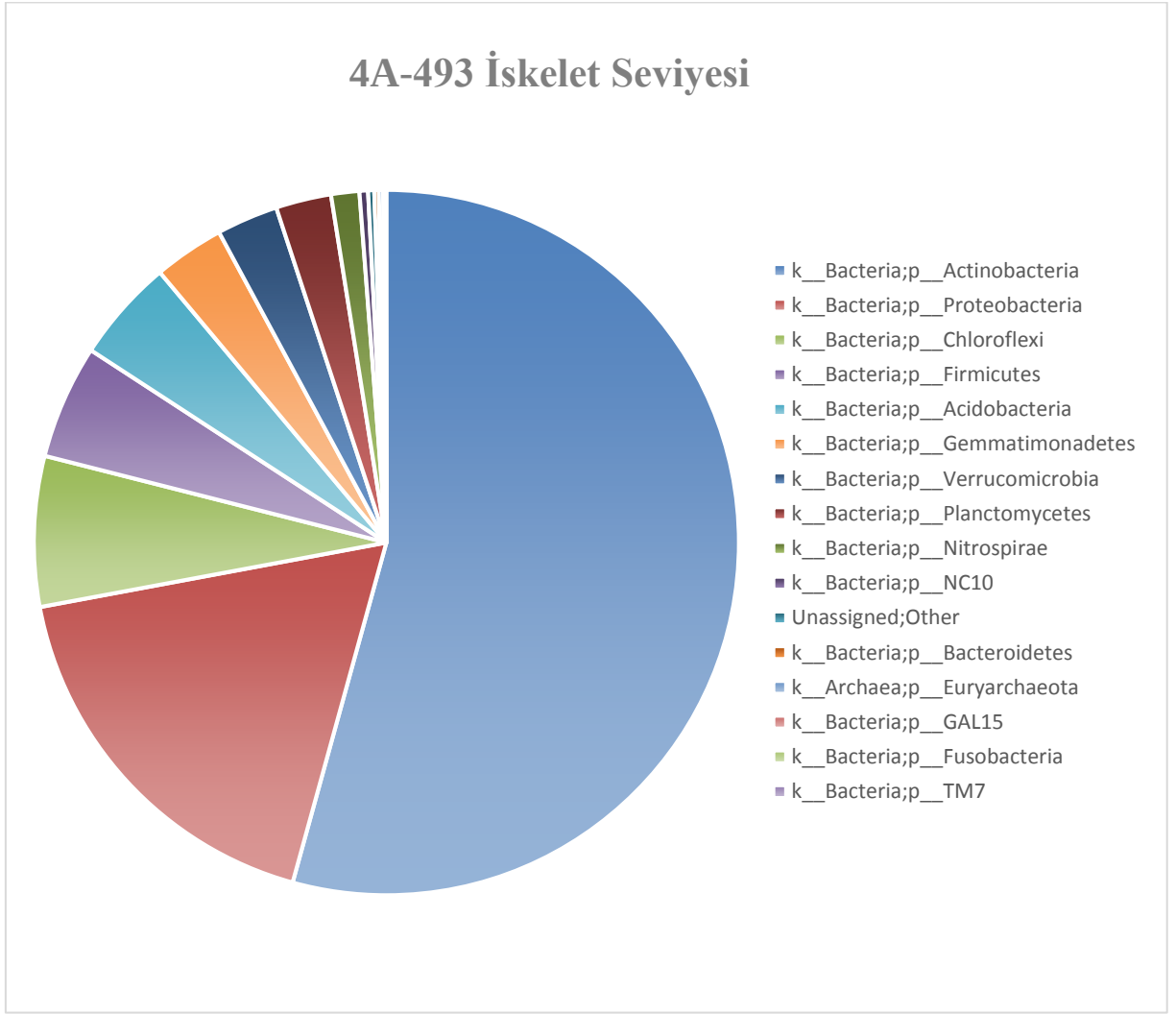
Alem-Şube	Mikroorganizma Oranı (%)
k__Bacteria;p__Actinobacteria	65,377
k__Bacteria;p__Proteobacteria	8,923
k__Bacteria;p__Chloroflexi	7,264
k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes	4,591
k__Bacteria;p__Acidobacteria	3,539
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia	3,051
k__Bacteria;p__Firmicutes	1,880
k__Bacteria;p__Planctomycetes	1,182
k__Bacteria;p__Nitrospirae	1,108
k__Bacteria;p__Bacteroidetes	0,611
k__Bacteria;p__AD3	0,584
k__Archaea;p__Euryarchaeota	0,546
k__Bacteria;p__Cyanobacteria	0,414
k__Bacteria;p__WS3	0,372
k__Bacteria;p__MVP-21	0,148
Unassigned;Other	0,139
k__Bacteria;p__WS2	0,087
k__Bacteria;p__Chlamydiae	0,047
k__Bacteria;p__Fusobacteria	0,045
k__Bacteria;p__TM7	0,043
k__Bacteria;p__GAL15	0,025
k__Bacteria;p__NC10	0,011



Şekil 4.12: 3Y-490 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.

Tablo 4.6: 4A-493 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

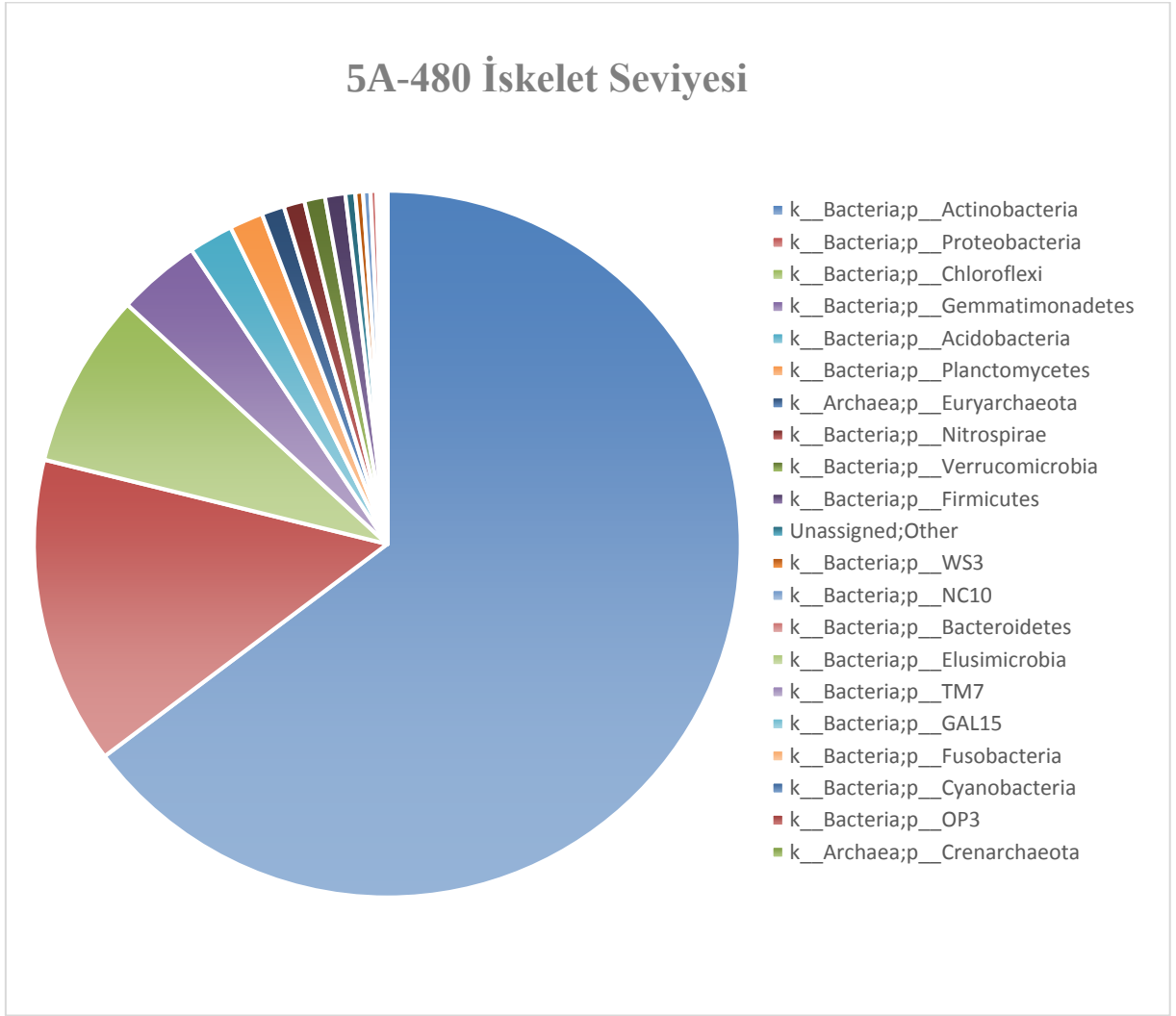
Alem-Şube	Mikroorganizma Oranı (%)
k__Bacteria;p__Actinobacteria	54,273
k__Bacteria;p__Proteobacteria	17,783
k__Bacteria;p__Chloroflexi	6,885
k__Bacteria;p__Firmicutes	5,226
k__Bacteria;p__Acidobacteria	4,710
k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes	3,232
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia	2,816
k__Bacteria;p__Planctomycetes	2,541
k__Bacteria;p__Nitrospirae	1,293
k__Bacteria;p__NC10	0,393
Unassigned;Other	0,281
k__Bacteria;p__Bacteroidetes	0,206
k__Archaea;p__Euryarchaeota	0,197
k__Bacteria;p__GAL15	0,057
k__Bacteria;p__Fusobacteria	0,055
k__Bacteria;p__TM7	0,034



Şekil 4.13: 4A-493 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.

Tablo 4.7: 5A-480 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

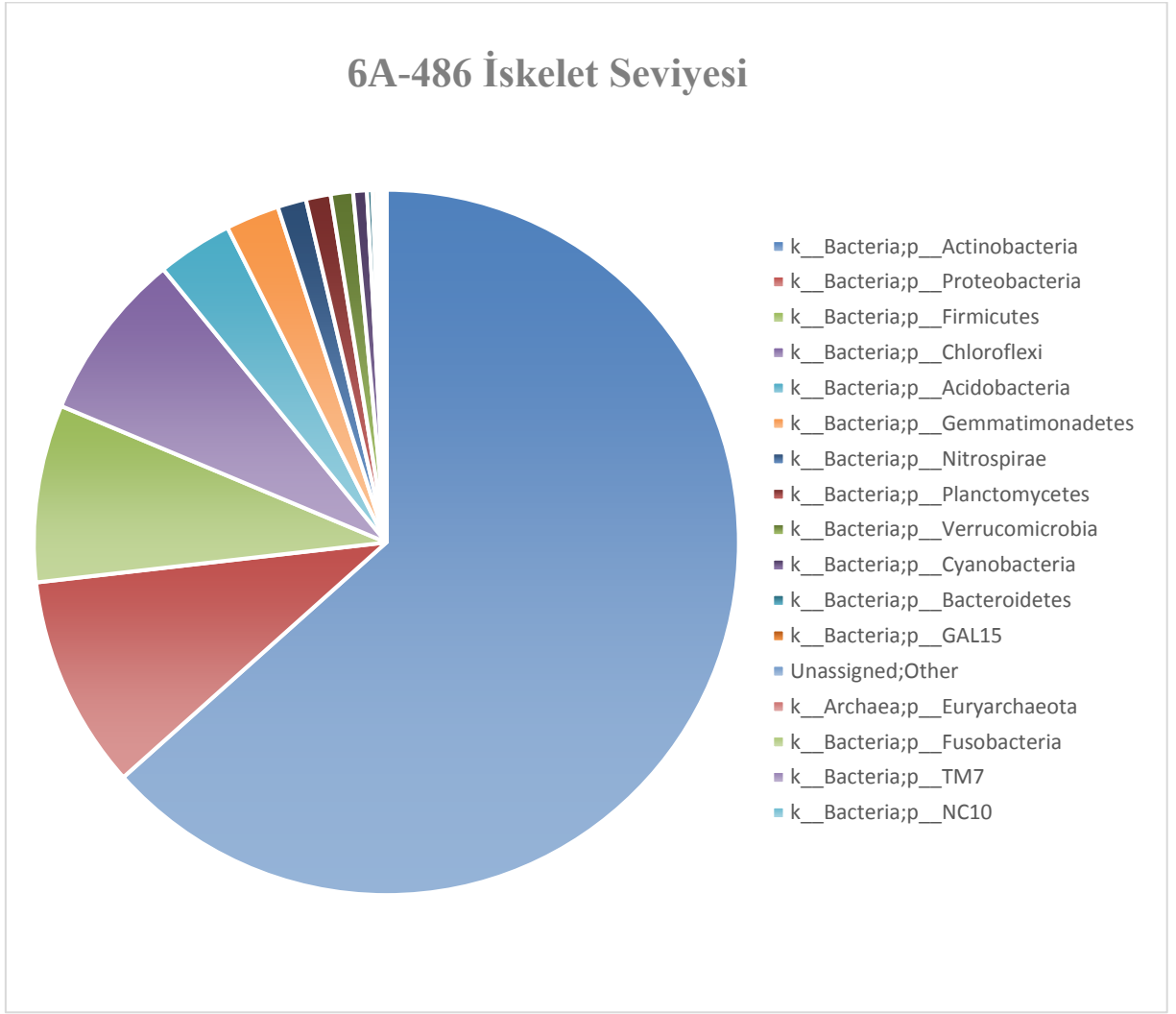
Alem-Şube	Mikroorganizma Oranı (%)
k__Bacteria;p__Actinobacteria	64,742
k__Bacteria;p__Proteobacteria	14,089
k__Bacteria;p__Chloroflexi	8,007
k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes	3,807
k__Bacteria;p__Acidobacteria	2,030
k__Bacteria;p__Planctomycetes	1,541
k__Archaea;p__Euryarchaeota	1,039
k__Bacteria;p__Nitrospirae	0,957
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia	0,948
k__Bacteria;p__Firmicutes	0,928
Unassigned;Other	0,449
k__Bacteria;p__WS3	0,352
k__Bacteria;p__NC10	0,336
k__Bacteria;p__Bacteroidetes	0,278
k__Bacteria;p__Elusimicrobia	0,144
k__Bacteria;p__TM7	0,133
k__Bacteria;p__GAL15	0,084
k__Bacteria;p__Fusobacteria	0,072
k__Bacteria;p__Cyanobacteria	0,028
k__Bacteria;p__OP3	0,017
k__Archaea;p__Crenarchaeota	0,010



Şekil 4.14: 5A-480 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.

Tablo 4.8: 6A-486 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

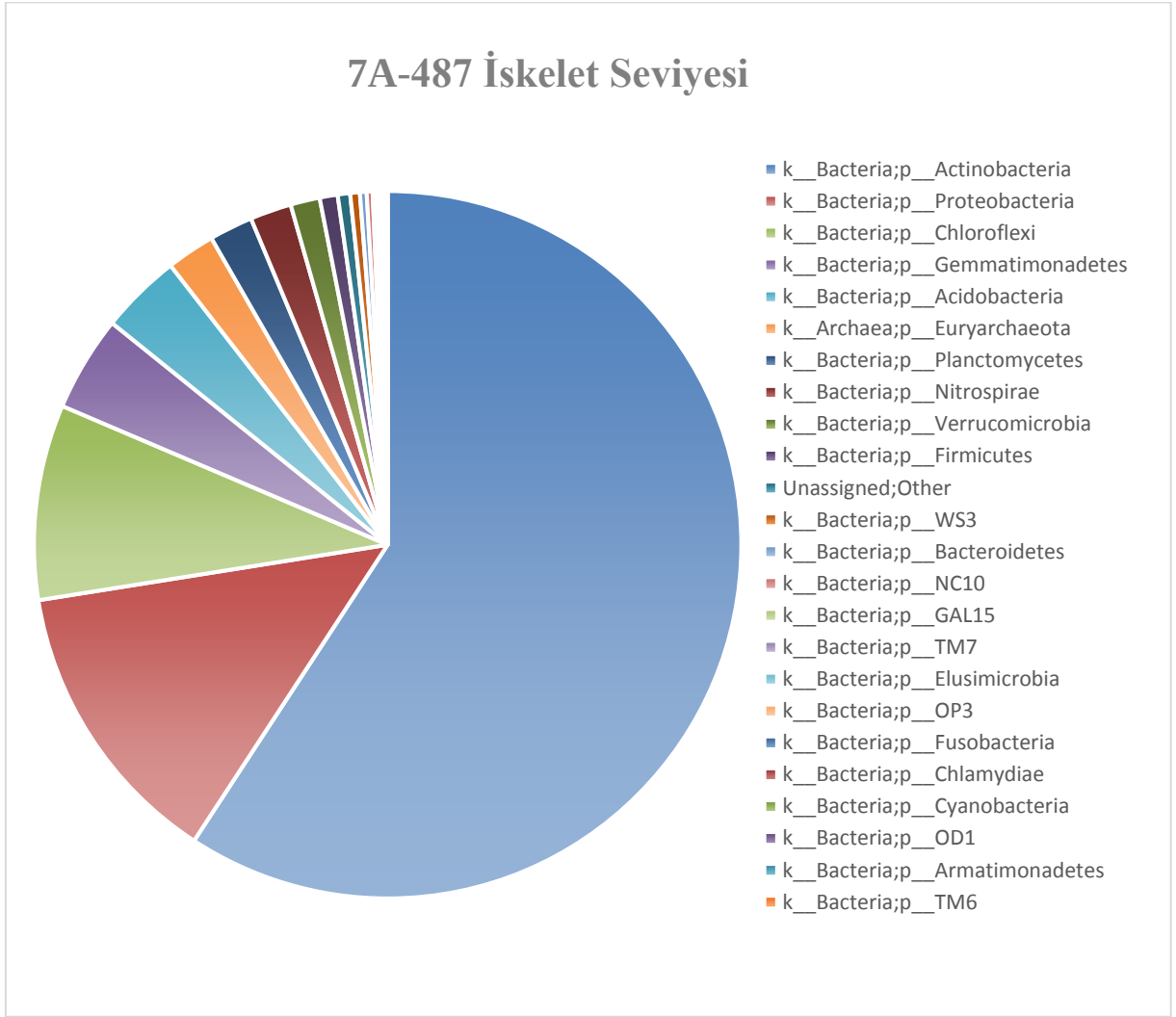
Alem-Şube	Mikroorganizma Oranı (%)
k__Bacteria;p__Actinobacteria	63,392
k__Bacteria;p__Proteobacteria	9,788
k__Bacteria;p__Firmicutes	8,130
k__Bacteria;p__Chloroflexi	7,774
k__Bacteria;p__Acidobacteria	3,464
k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes	2,458
k__Bacteria;p__Nitrospirae	1,312
k__Bacteria;p__Planctomycetes	1,137
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia	1,023
k__Bacteria;p__Cyanobacteria	0,630
k__Bacteria;p__Bacteroidetes	0,244
k__Bacteria;p__GAL15	0,189
Unassigned;Other	0,151
k__Archaea;p__Euryarchaeota	0,141
k__Bacteria;p__Fusobacteria	0,093
k__Bacteria;p__TM7	0,050
k__Bacteria;p__NC10	0,011



Şekil 4.15: 6A-486 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.

Tablo 4.9: 7A-487 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

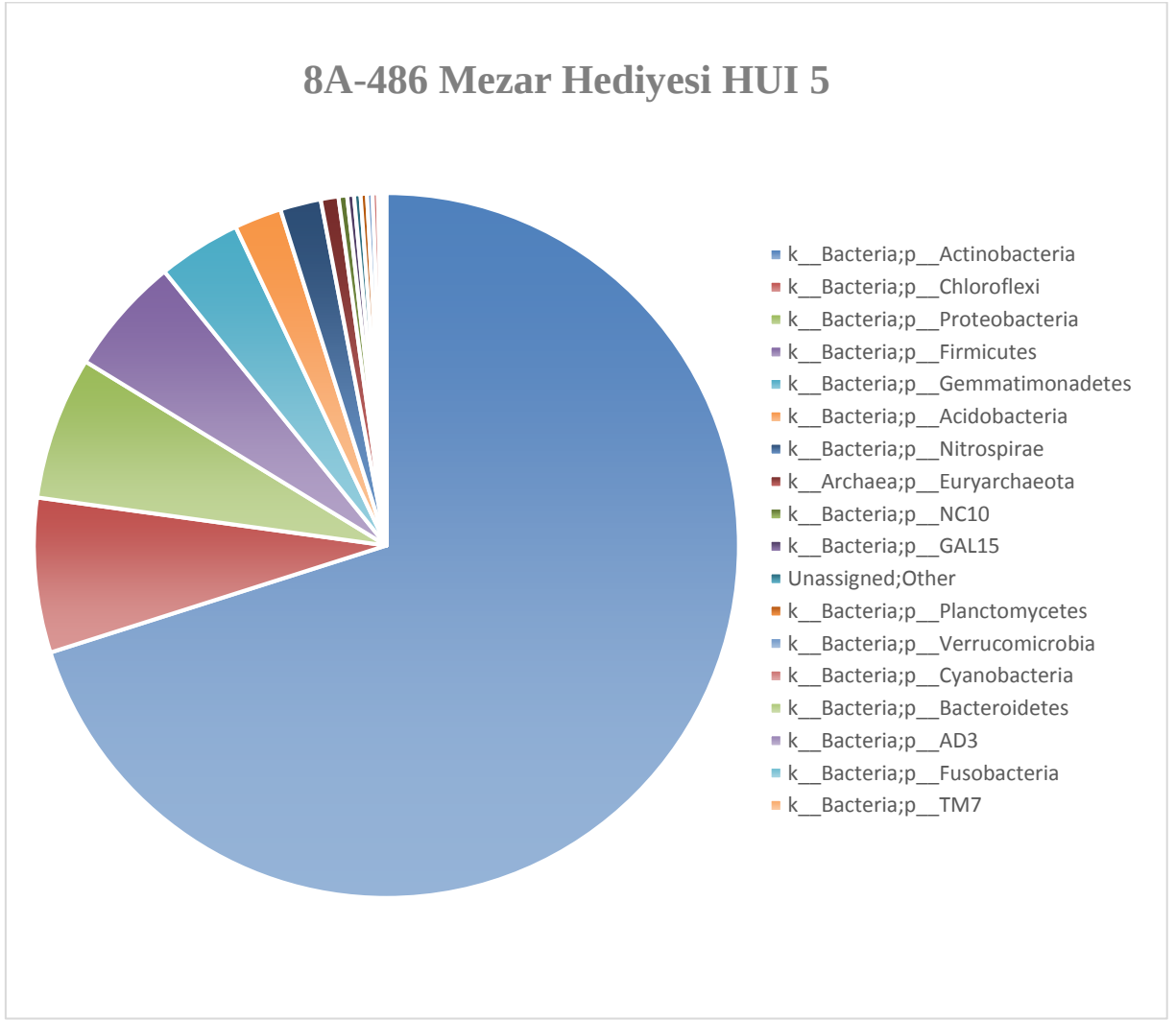
Alem-Şube	Mikroorganizma Oranı (%)
k__Bacteria;p__Actinobacteria	59,193
k__Bacteria;p__Proteobacteria	13,268
k__Bacteria;p__Chloroflexi	8,918
k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes	4,366
k__Bacteria;p__Acidobacteria	3,698
k__Archaea;p__Euryarchaeota	2,215
k__Bacteria;p__Planctomycetes	1,988
k__Bacteria;p__Nitrospirae	1,890
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia	1,341
k__Bacteria;p__Firmicutes	0,820
Unassigned;Other	0,566
k__Bacteria;p__WS3	0,441
k__Bacteria;p__Bacteroidetes	0,305
k__Bacteria;p__NC10	0,271
k__Bacteria;p__GAL15	0,178
k__Bacteria;p__TM7	0,124
k__Bacteria;p__Elusimicrobia	0,108
k__Bacteria;p__OP3	0,066
k__Bacteria;p__Fusobacteria	0,049
k__Bacteria;p__Chlamydiae	0,038
k__Bacteria;p__Cyanobacteria	0,038
k__Bacteria;p__OD1	0,033
k__Bacteria;p__Armatimonadetes	0,029
k__Bacteria;p__TM6	0,015



Şekil 4.16: 7A-487 No'lu mezar iskelet seviyesi örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.

Tablo 4.10: 8A-486 No'lu mezar hediyesi HUI 5 örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları.

Alem-Şube	Mikroorganizma Oranı (%)
k__Bacteria;p__Actinobacteria	70,081
k__Bacteria;p__Chloroflexi	7,088
k__Bacteria;p__Proteobacteria	6,560
k__Bacteria;p__Firmicutes	5,426
k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes	3,804
k__Bacteria;p__Acidobacteria	2,172
k__Bacteria;p__Nitrospirae	1,873
k__Archaea;p__Euryarchaeota	0,811
k__Bacteria;p__NC10	0,395
k__Bacteria;p__GAL15	0,311
Unassigned;Other	0,297
k__Bacteria;p__Planctomycetes	0,292
k__Bacteria;p__Verrucomicrobia	0,252
k__Bacteria;p__Cyanobacteria	0,245
k__Bacteria;p__Bacteroidetes	0,157
k__Bacteria;p__AD3	0,126
k__Bacteria;p__Fusobacteria	0,065
k__Bacteria;p__TM7	0,033



Şekil 4.17: 8A-486 No'lu mezar hediyesi HUI 5 örneğinin şube bazında mikroorganizma oranları grafiği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez kapsamında kullanılan örnekler, Balıkesir/Antandros Antik Kenti nekropolünde bulunan 480, 486, 487, 488, 490, 493 No'lu mezarların iskelet seviyelerinden, 453 No'lu mezar hediyeleri HTJ 2 ve HTJ 3'ten, 480 No'lu mezar hediyesi HUP 8'ten, 486 No'lu mezar hediyesi HUI 5'ten, 493 No'lu mezar hediyesi HVL 2'den ve Kuzeydoğu Genişleme V açması içerisinde yer alan depolama amaçlı kullanıldığı düşünülen pithosun içerisinde steril bir şekilde alındı. Mikroorganizmaların yoğun olarak bulunabileceği seviyelerden örnek alındı. Bağırsaklardaki mikroorganizma yoğunluğu göz önünde bulundurularak mezarların iskelet seviyesi örneklerinin, iskeletin karın bölgesinden alınmasına dikkat edildi.

Bu tez çalışması için alınan toplam 12 farklı örneğin DNA izolasyonu, toprak örneklerinden DNA izolasyonu için tasarlan Soil DNA Isolation Kit (Norgen Biotek, Ontario, Kanada, Katalog no: 26500) kullanılarak yapıldı ve izole edilen DNA miktarları spektrofotometrik ölçüm yapılarak tespit edildi. Elde edilen DNA konsantrasyonları ortalama 10 ng/μl'dir (Tablo 4.1). Bu kit ile yapılan toprak izolasyonlarında DNA konsantrasyon değerlerinin yaklaşık olarak 20-25 ng/μl aralığında görülmesi beklenmektedir⁴. Örneklerden izole edilen DNA konsantrasyon değerleri, beklenen değerlerden düşük çıkmıştır. Bu durumun, örneklerin yaklaşık 2000-2500 yıllık mezarlardan alınmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda elde edilen 260/280 ve 260/230 absorpsiyon oranları (Tablo 4.1) DNA'nın beklenen oranlarda saf olarak izole edilemediğini göstermektedir. Özellikle 260/230 absorpsiyon oranının beklenen değer aralığının⁵ (2.0-2.2) altında olduğu tespit edildi. DNA, RNA ve proteinlerin izolasyonunda kullanılan ve asit fenol içerdiği bilinen kimyasal çözeltiler, 230 nm'de pik vermektedir ve bu sebeple DNA izolasyonu sonrası spektrofotometrik ölçümlerde 260/230 absorpsiyon oranları beklenenden düşük çıkmaktadır (Desjardins ve Conklin, 2010). Bu tez kapsamında DNA izolasyonu için kullanılan Soil DNA Isolation Kit (Norgen Biotek, Ontario, Kanada, Katalog no: 26500) ticari bir ürün olmasından dolayı kit solüsyonlarının içerikleri firma tarafından verilmemektedir. DNA izolasyonu yapılan örneklerin 260/230 absorpsiyon oranlarının düşük olması nedeniyle, bu kit solüsyonlarının içerisinde de asit fenol içeren çözeltilerin olduğu düşünülmektedir.

⁴ <https://norgenbiotech.com>

⁵ <http://tools.thermofisher.com>

Tez çalışması kapsamında DNA izolasyonu yapılan örneklerin 16S rRNA genlerinin V3-V4 bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltıldı. PZR sonucunda ~460 bp'lik DNA dizileri elde edildi. Benzer yöntemle mikrobiyotadaki farklılığın tespit edildiği Cho ve diğ.'nin (2019) yaptığı çalışmada, Hepatosellüler Karsinom ve Siroz hastalarından alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'ların 16S rRNA genlerinin V3-V4 bölgesi çoğaltılmıştır ve bu hastaların kanlarındaki mikrobiyal çeşitlilik tespit edilmiştir. Hepatosellüler Karsinom hastalarının mikrobiyal çeşitliliğinin, siroz hastalarına ve kontrol grubuna göre önemli ölçüde farklılık gösterdiği ve Hepatosellüler Karsinom hastalarında bulunan bazı mikroorganizmaların potansiyel biyobelirteçler olabileceği belirtilmiştir.

PZR sonucunun kalitatif analizi yapıldı ve 12 örnekten 8 tanesinin V3-V4 bölgelerinin başarıyla çoğaltılabildiği tespit edildi (Şekil 4.1). Antik kalıntılardan elde edilen, radyasyon, indirgeyici moleküller vb. zorlu koşullara maruz kalan DNA'larda parçalanmalar olabilmektedir ve parçalanmış DNA dizileri PZR'de hedeflenen boyutta çoğaltılamamaktadır (Fuks ve diğ., 2018). Örneklerin antik kent nekropolünden alınmış olması nedeniyle, V3-V4 bölgesi çoğaltılamayan 4 örnekte DNA'ların parçalanmış olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, 16S rRNA genlerinin V3-V4 bölgeleri başarıyla çoğaltılan örnekler Illumina MiSeq sistemi ile dizilendi ve ~460 bp uzunluğunda diziler elde edildi. Batı Sicilya'da keşfedilen Arkaik Monte Iato'daki bir yapıdan alınan toprak örneklerinin dizilemesi de Illumina MiSeq sistemi kullanılarak yapılmıştır. Yemek atığı imha edilen alandan ve şömineden alınan toprak örneklerindeki mikroorganizma çeşitliliği kıyaslanmıştır. Şömineden alınan toprak örneklerindeki mikroorganizmaların karboksilik ve asetik asitleri metabolize ettiği, yemek atığı imha edilen alandan alınan toprak örneklerindeki mikroorganizmaların ise karbonhidratları metabolize ettiği tespit edilmiştir (Margesin ve diğ., 2017).

Bu çalışmada, Illumina MiSeq sistemi kullanılarak fasta ve qual formatında elde edilen dizilerin metagenomik analizi QIIME 1.9.1 versiyonu kullanılarak yapıldı. Metagenomik analiz sonucunda 8 örnek içerisinde toplam 2 alem, 37 şube, 112 sınıf, 211 takım, 336 familya, 468 cins ve 505 tür tespit edildi. Taksonomik analiz sonucunda tespit edilen mikroorganizma şubeleri bu tez kapsamında değerlendirildi (Tablo 4.3-4.10, Şekil 4.10-4.17). Kim ve diğ.'nin (2018) Çin lahanası üzerindeki patojen mikroorganizmaları tespit etmeyi amaçladığı çalışmada, Illumina MiSeq sistemi kullanılarak elde edilen dizileme verilerinin metagenomik analizlerini

QIIME ile yapılmıştır ve sonucunda bütün örneklerden toplam 29 şube, 169 takım, 322 aileye ve 767 cins tespit edilmiştir.

Tez kapsamında elde edilen taksonomik analiz sonuçlarına göre, dizilenen 8 örnekte görülen en yüksek mikroorganizma yoğunluğu Actinobacteria şubesinde tespit edildi. Toprak ve su ekosistemlerinde farklı türleri bulunan Actinobacteria, toprakta daha çok mantar gibi davranarak organik maddelerin bitkiler tarafından kullanılabilmesi için parçalanmasını sağlar. Bu nedenle tarım ve orman ekosisteminde oldukça önemli bir yere sahiptir. Actinobacteria'nın diğer bakterilerden evrimsel olarak ayrışması daha eskiye dayanmaktadır. Bu da filogenetik olarak yakın olan bakterilerin tespit edilmesini imkansız kılmaktadır (Ventura ve diğ., 2007). Antandros Antik kenti nekropolü hem mezarlık olarak hem de yerleşim alanı olarak yaklaşık 700 yıl aralıksız kullanılmıştır (Yağız, 2009). Elde edilen bulgular sonucunda yerleşim alanı olarak kullanıldığı dönemde, bu alanın tarım alanı olarak da kullanılmış olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda nekropolün bulunduğu konumun çevresinin günümüzde zeytin ağaçları ile kaplı olması bu bakteri şubesinin yoğun görülme nedenini açıklar niteliktedir. Actinobacteria'nın uzun yıllar önce evrimleşmiş olduğu göz önünde bulundurulduğunda ise, Antandros Antik kenti nekropolünün mezarlık ya da yerleşim alanı olarak kullanılmadan önce de bu alanın zeytin ağaçlarıyla kaplı ormanlık bir alan olabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen taksonomik verilerde Actinobacteria'dan sonra en yoğun görülen şube Proteobacteria'dır. Proteobacteria, birçok insan patojen türü içerdiği bilinen büyük bakteriyel şubelerden biridir. Sadece bağırsakta değil, ekstraintestinal hastalıklarda da rol oynadığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Daha güncel çalışmalar astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi akciğer hastalıklarında da rol oynadığını göstermektedir (Rizzatti ve diğ., 2017). Bu patojen türlerini içeren Proteobacteria şubesi, bu bölgede bu patojenlerden kaynaklı hastalıkların geçmiş dönemde yaşanmış olma ihtimalini düşündürmektedir. Bununla birlikte, nekropolün tepenin yamacına konumlanmış olması dolayısıyla, yağmur suları ve erozyonla birlikte nekropoldeki toprak katmanlarının zamanla birbirine karışmış olduğu düşünülmektedir (Yağız, 2009). İnsan patojenleri ile ilişkilendirilen bu bakteri şubesinin sadece iskelet seviyesi örneklerinde değil, bütün örneklerde yüksek miktarda tespit edilmesinin sebebinin yağmur suları ve erozyon olabileceği düşünülmektedir.

Alınan toprak örneklerinden izole edilen mikroorganizma oranlarının yüksek oranda görüldüğü Chloroflexi, Acidobacteria, Gemmatimonades, Firmicutes şubeleri ise, reaksiyon bazlı

fototropi ile ilişkilendirilen şubelerdir. Hatta patojen olmayan bazı Proteobacteria türleri de bu gruba dahildir (Ward ve diğ., 2018). Fotosentezin evrimsel sürecine bakıldığında bu şubelere ait türlerin ışık duyarlılığıyla karbon döngüsü yapabildiği görülmüştür⁶. Buna reaksiyona bağlı fototropi denilmektedir. Bu nedenle bu şubeler fotosentez mekanizması ile ilişkilendirilmektedir (Ward ve diğ., 2018). Bu fotosentez mekanizmasının evrimi ile ilişkilendirilen bakteri şubeleri, yine tarım alanları ve ormanların çeşitli dönemlerde nekropol alanında bulunmuş olabileceğini düşündürmektedir.

Bütün örneklerde belirli miktarlarda tespit edilmiş olan Planctomycetes ve Nitrospirae şubeleri ise, deniz sularında bulunan mikroorganizmalardır. Her iki şube de azot döngüsünde önemli rol oynarlar ve deniz sularındaki önemli nitrik oksitleyicilerdendir (Garrity ve Holt, 2001; Fuerst ve Sagulenko, 2011). Bu iki şubenin, ele alınan diğer mikroorganizmalardan daha az oranda tespit edilmesi ve nekropolün deniz seviyesine çok yakın bir konumda bulunması, nekropolün yerleşim alanı ya da mezarlık olarak kullanılmadan önce sular altında olabileceğini ve zamanla bu deniz suyunun çekilip nekropolün günümüzdeki halini almış olabileceğini düşündürmektedir.

Elde edilen taksonomik verilerin en çarpıcı olanı ise, her örnekte farklı yoğunlukta tespit edilen arke şubesi Euryarchaeota'dır. Dizilemesi yapılan örnekler içerisinde en yüksek Euryarchaeota oranı 1A-453 No'lu mezar hediyesi HTJ 3'te görüldü (Tablo 4.3). Euryarchaeota, yüksek sıcaklık değerlerinde, tuz oranı yüksek ortamlarda ya da pH değeri çok düşük ortamlarda görülebilmektedir. Bu nedenle bu şubede, termofilik ve asidofilik türler bulundurmaktadır⁷. Arkeolojik bulgulara bakıldığında ise bu mezarın bir kremasyon mezar olduğu görülmektedir. Euryarchaeota şubesinin termofilik olması ve mezarın gömü çeşidinin kremasyon olması, iki farklı disiplinden elde edilen bulguların birbirini desteklediğini gösterir niteliktedir. Diğer bir kremasyon mezar olan 486 No'lu mezara ait mezar hediyesi HUI 5'te tespit edilen Euryarchaeota, o örnek içerisinde yüksek oranda görülen şubeler arasındadır (Tablo 4.10). Bununla birlikte aynı kremasyon mezar ait olan 486 iskelet seviyesi örneğinin Euryarchaeota oranı diğer kremasyon örnekleri göre düşük çıkmıştır (Tablo 4.8). Bunun sebebi, örnek toplama, DNA izolasyonu ya da PZR basamaklarında meydana gelmiş insan kaynaklı hatalar olabilir. Kremasyon olmayan 5A-480 No'lu (Tablo 4.7) ve 7A-487 No'lu (Tablo 4.9)

⁶ <https://evrimagaci.org>

⁷ <http://www.bilimteknik.tubitak.gov.tr>

mezarların iskelet seviyesi örneklerinde de, diğer örneklere kıyasla yüksek oranda Euryarchaeota tespit edildi. Bu bulgu ise, bu iki mezarın üst seviyesinde ya da yakınlarında kremasyon mezar olabileceği ya da çıkabileceği ihtimalini düşündürmektedir.

Elde edilen taksonomik sonuçlarda alem basamağında tespit edilen mikroorganizmaların, 1-A 453 HTJ 3 örneğinde %0.72'sinin, 2A-Kuzeydoğu Genişleme V Pithos örneğinde %0.43'ünün, 3Y-490 iskelet seviyesi örneğinde %0.14'ünün, 4A-493 iskelet seviyesi örneğinde %0.28'inin, 5A-480 iskelet seviyesi örneğinde %0.45'inin, 6A-486 iskelet seviyesi örneğinde %0.15'inin, 7A-487 iskelet seviyesi örneğinde %0.56'sının, 8A-486 HUI 5 örneğinde %0.3'ünün kullanılan veri tabanında (Greengenes 13.8) kayıtlı mikroorganizmalardan herhangi biriyle eşleşmediği görüldü (Tablo 4.3-Tablo 4.10). Metagenomik çalışmalarla elde edilen verilerin, mevcut veri tabanlarına katkı sunması, yeni keşfedilecek mikroorganizmalarla bu veri tabanlarında tanımlanamayan mikroorganizmaların oranlarını azaltması beklenmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, Balıkesir/Antandros Antik Kenti nekropolünün mikrobiyal çeşitliliği tespit edildi. Tez kapsamında elde edilen bulgular, arkeolojik bulguları destekler niteliktedir. Antandros Antik Kenti nekropolünün mikrobiyal çeşitliliğinin daha geniş bir perspektifle anlaşılması için, bu alanda yeni metagenomik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu alanda yapılacak olan metagenomik çalışmalar sayesinde, elde edilecek yeni verilerle bölgenin geçmişine dair daha kapsamlı çıkarımların yapılması mümkün olacaktır. Bununla birlikte, mevcut veritabanlarında tanımlanamayan yeni mikroorganizmaların keşfine olanak sağlayacaktır. Bu tez çalışması, Türkiye'deki antik kentlerde yapılacak olan metagenomik çalışmalara öncü olacak ilk çalışma niteliğindedir.

KAYNAKLAR

- Alves, L.F., Westmann, C.A., Lovate, G.L., Siqueira, G.M.V., Borelli, T.C. and Guazzaroni, M.E., 2018, Metagenomic approaches for understanding new concepts in microbial science, *International journal of genomics*, 1-15.
- Amann, R.L., Ludwig, W. and Schleifer, K. H., 1995, Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiological reviews*, 59(1), 143-69.
- Candar, U., 2017, *Antandros nekropolisi amphora mezarları*, Yüksek Lisans tezi, T.C. Ege Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N. and Alland, D., 2007, A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria, *Journal of microbiological methods*, 69(2), 330–339.
- Chen, K. and Pachter, L., 2005, Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities, *PLoS computational biology*, 1(2), 106-112.
- Cho, E.J., Leem, S., Kim, S.A., Yang, J., Lee, Y.B., Kim, S.S., Cheong, J.Y., Cho, S.W., Kim, J.W., Kim, S.M., Yoon, J.H. and Park, T., 2019, Circulating microbiota-based metagenomic signature for detection of hepatocellular carcinoma, *Scientific reports*, 9(1).
- Cowan, D. A., 2000, Microbial genomes-the untapped resource. *Trends in biotechnology*, 18(1), 14-16.
- Culligan, E.P., Sleator, R.D., Marchesi, J.R. and Hill, C., 2014, Metagenomics and novel gene discovery, *Virulence*, 5(3), 399–412.
- Curtis, T.P. and Sloan, W.T., 2004, Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology, *Current opinion in microbiology*, 7(3), 221-226.
- Danzeisen, J.L., Calvert, A.J., Noll, S.L., McComb, B., Sherwood, J.S., Logue, C.M. and Johnson, T.J., 2013, Succession of the turkey gastrointestinal bacterial microbiome related to weight gain, *PeerJ*, 23(1).
- Desjardins, P. and Conklin, D., 2010, Nanodrop microvolume quantitation of nucleic acids, *The journal of visualized experiments*, 45.
- Drancourt, M. and Raoult, D., 2005, Palaeomicrobiology: current issues and perspectives, *Nature reviews microbiology*, 3(1), 23-35.
- Fornaciari, A., 2017, Environmental microbial forensics and archaeology of past pandemics, *Microbiology spectrum*, 5(1).

- Franzén, O., Hu, J., Bao, X., Itzkowitz, S.H., Peter, I. and Bashir, A., 2015, Improved OTU-picking using long-read 16S rRNA gene amplicon sequencing and generic hierarchical clustering, *Microbiome*, 3(43).
- Fuerst, J.A. and Sagulenko, E., 2011, Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function, *Nature reviews microbiology*, 9, 403–413.
- Fuks, G., Elgart, M., Amir, A., Zeisel, A., Turnbaugh, P. J., Soen, Y. and Shental, N., 2018, Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling, *Microbiome*, 6(17).
- Garrity, G. M. and Holt, J. G., 2001, *Phylum BVIII. Nitrospirae phy. nov.*, Bergey's manual® of systematic bacteriology, In: Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M. (eds.), Chapter 25, Springer Science+Business Media, New York, 451-464.
- Ghazanfar, S., Azim, A., Ghazanfar, M. A., Anjum, M. I. and Begum, I., 2010, Metagenomics and its application in soil microbial community studies: biotechnological prospects, *Journal of animal & plant sciences*, 6(2), 611- 622.
- Green, R.E., Krause, J., Briggs, A.W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M. et al., 2010, A draft sequence of the Neandertal genome, *Science*, 328(5979), 710-722.
- Greenblatt, C.L., Baum, J., Klein, B.Y., Nachshon, S., Koltunov, V. and Cano, R.J., 2004, *Micrococcus luteus* -- survival in amber, *Microbial ecology*, 48(1), 120-127.
- Handelsman, J., 2004, Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms, *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(4), 669-85.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J. and Goodman, R.M., 1998, Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products, *Chemistry & biology*, 5(10), R245-249.
- He, J.Z., Zhu, Y.G., Zheng, Y.M., Zhang, L.M. and Shen, J.P., 2007, Methodology and application of soil metagenomics, *Chinese academy of science (article in Chinese)*, 18(1), 212-218.
- Hiltemann, S. and Batut, B., 2017, *Analyses of metagenomics data - the global picture*, <https://galaxyproject.github.io/training-material/topics/metagenomics/tutorials/general-tutorial/tutorial.html>, [Ziyaret tarihi: 23 Mart 2019].
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M. and Pace, N.R., 1998, Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity, *Journal of bacteriology*, 180(18), 4765-4774.
- Inoue, K., Makino, Y. and Itoh, N., 2005, Purification and characterization of a novel alcohol dehydrogenase from *Leifsonia* sp. Strain S749: a promising biocatalyst for an asymmetric hydrogen transfer bioreduction, *Applied and environmental microbiology*, 71(7), 3633-3641.

- Kauffmann, I.M., Schmitt, J. and Schmid, R.D., 2004, DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts, *Applied microbiology and biotechnology*, 64(5), 665-670.
- Kim, D., Hong, S., Kim, Y.T., Ryu, S., Kim, H.B. and Lee, J.H., 2018, Metagenomic approach to identifying foodborne pathogens on chinese cabbage, *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(2), 227-235.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. and Glöckner, F.O., 2013, Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, *Nucleic acids research*, 41(1).
- Kolbert, C. and Persing, D., 1999, Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens, *Current opinion in microbiology*, 2, 299-305.
- Körpe, R., 2008, *Troas bölgesi antik kentleri*, Çanakkale savaşları tarihi, In: Demir, M. (ed.), Değişim Yayınları, İstanbul, ISBN: 978-605-0042-01-6, 349-411.
- Krause, J., Fu, Q., Good, J.M., Viola, B., Shunkov, M.V., Derevianko, A.P. and Pääbo, S., 2010, The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia, *Nature*, 464(7290), 894-897.
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W.A., González, A., Caporaso, G. J. and Knight, R., 2011, Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities, *Current protocols in bioinformatics*, Unit 10.7.
- Long, J.C. and Kittles, R.A., 2003, Human genetic diversity and the nonexistence of biological races, *Human biology*, 75(4), 449-471.
- Lu, J., Domingo, J.S. and Shanks, O.C., 2007, Identification of chicken-specific fecal microbial sequences using a metagenomic approach, *Water research*, 41(16), 3561-3574.
- Maixner, F., Krause-Kyora, B., Turaev, D., Herbig, A., Hoopmann, M.R., Hallows, J.L., Kusebauch, U., Vigl, E.E., Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Sullivan, N., Cipollini, G., Coia, V., Samadelli, M., Engstrand, L., Linz, B., Moritz, R.L., Grimm, R., Krause, J., Nebel, A., Moodley, Y., Rattei, T. and Zink, A., 2016, The 5300-year-old *Helicobacter pylori* genome of the Iceman, *Science*, 351(6269), 162-165.
- Margesin, R., Siles, J.A., Cajthaml, T., Öhlinger, B. and Kistler, E., 2017, Microbiology meets archaeology: soil microbial communities reveal different human activities at archaic Monte Iato (Sixth century BC), *Microbial ecology*, 73(4), 925-938.
- Matlock, B., 2015, *Assessment of nucleic acid purity*, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>, [Ziyaret tarihi : 2 Nisan 2019].
- Meyer, M., Fu, Q., Aximu-Petri, A., Glocke, I., Nickel, B., Arsuaga, J.L., Martínez, I., Gracia, A., de Castro, J.M., Carbonell, E. and Pääbo, S., 2014, A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos, *Nature*, 505(7483), 403-6.

- Neelakanta, G. and Sultana, H., 2013, The use of metagenomic approaches to analyze changes in microbial communities, *Microbiology insights*, 16(6), 37-48.
- Nguyen, N.P., Warnow, T., Pop, M. and White, B., 2016, A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity, *npj Biofilms and microbiomes*, 2, 16004.
- Noonan, J.P., Coop, G., Kudaravalli, S., Smith, D., Krause, J., Alessi, J., Chen, F., Platt, D., Pääbo, S., Pritchard, J.K. and Rubin, E.M., 2006, Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA, *Science*, 314(5802), 1113-1118.
- Oppenheimer, S., 2012, Out-of-Africa, the peopling of continents and islands: tracing uniparental gene trees across the map, *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*, 367(1590), 770–784.
- Oulas, A., Pavludi, C., Polymenakou, P., Pavlopoulos, G.A., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., Arvanitidis, C. and Iliopoulos, I., 2015, Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies, *Libertas academica*, 9, 75–88.
- Patrick, D.S. and Handelsman, J., 2005, Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot, *Genome biology*, 6(8), 229.
- Petrosino, J.F., Highlander, S., Luna, R.A., Gibbs, R.A. and Versalovic, J., 2009, Metagenomic pyrosequencing and microbial identification, *Clinical chemistry*, 55(5), 856-66.
- Pichler, M., Coskun, Ö.K., Ortega-Arbulú, A.S., Conci, N., Wörheide, G., Vargas, S. and Orsi, W.D., 2018, A 16S rRNA gene sequencing and analysis protocol for the Illumina MiniSeq platform, *MicrobiologyOpen*, 7(6).
- Poinar, H.N., Schwarz, C., Qi, J., Shapiro, B., Macphee, R.D., Buigues, B., Tikhonov, A., Huson, D.H., Tomsho, L.P., Auch, A., Rampp, M., Miller, W. and Schuster, S.C., 2006, Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA, *Science*, 311(5759), 392-394.
- Polat, G. ve Polat, Y., 2007, Antandros nekropolü 2001-2006 yılları ön raporu, *Arkeoloji dergisi*, 9(1), 1-20.
- Polat, G., 2002, Antandros 2001 kazıları, 24. *Kazı sonuçları toplantısı*, 27-31 Mayıs 2002 Ankara, Ankara, T.C. Kültür Bakanlığı Yayınları, ISBN: 975-17-3087-2 (2. Cilt), 21-30.
- Prüfer, K., Racimo, F., Patterson, N., Jay, F., Sankararaman, S. et al., 2014, The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains, *Nature*, 505(7481), 43-49.
- Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Klenk, H.P., Kletzin, A., Treusch, A.H., Meurer, G., Eck, J., Sensen, C.W. and Schleper, C., 2002, First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeote from soil, *Environmental microbiology*, 4(10), 603-611.

- Raaijmakers, J.M., Weller, D.M. and Thomashow, L.S., 1997, Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments, *Applied and environmental microbiology*, 63(3), 881-887.
- Reich, D., Green, R.E., Kircher, M., Krause, J., Patterson, N. et al., 2010, Genetic history of an archaic hominin group from Denisova cave in Siberia, *Nature*, 468, 1053-1060.
- Riesenfeld, C.S., Goodman, R.M. and Handelsman, J., 2004, Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes, *Environmental microbiology*, 6(9), 981-989.
- Rivera-Perez, J.I., Santiago-Rodriguez, T.M. and Toranzos, G.A., 2016, Paleomicrobiology: a snapshot of ancient microbes and approaches to forensic microbiology, *Microbiology spectrum*, 4(4).
- Rizzatti, G., Lopetuso, L.R., Gibiino, G., Binda, C. and Gasbarrini, A., 2017, Proteobacteria: a common factor in human diseases, *BioMed research international*, 9, 1-7.
- Rosello, M.R. and Amann, R., 2001, The species concept for prokaryotes, *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 39-67.
- Ruvolo, M., 1997, Molecular phylogeny of the hominoids: inferences from multiple independent DNA sequence data sets, *Molecular biology and evolution*, 14(3), 248-65.
- Schloss, P.D. and Handelsman, J., 2003, Biotechnological prospects from metagenomics, *Current opinion in biotechnology*, 14(3), 303-10.
- Schmeisser, C., Helen, S. and Wolfgang, R. S., 2007, Metagenomics, biotechnology with nonculturable microbes , *Applied microbiology and biotechnology*, 75(5), 955-962.
- Shanks, O.C., Domingo, J.W.S., Lamendella, R., Kelty, C.A. and Graham J.E., 2006, Competitive metagenomic DNA hybridization identifies hosts specific microbial genetic markers in cow fecal samples, *Applied and environmental microbiology*, 72(6), 4054-4060.
- Shen, B., Du, L., Sanchez, C., Edwards, D.J., Chen, M. and Murrell, J.M., 2001, The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide-polyketide natural product biosynthesis, *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 27(6), 378-385.
- Singh, B., Gautam, S. K., Verma V., Kumar M. and Singh B., 2008, Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: potential biotechnological prospects, *Anaerobe*, 14(3), 138-144.
- Skoko, N., Vujovic, J., Savic, M., Papic, N., Vasiljevic, B. and Ljubijankic, G., 2005, Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strain FAV20 useful in detection of immunosuppressants produced by soil actinomycetes, *Journal of microbiological methods*, 61(1), 137-140.

- Sloan, W. T., Lunn, M., Woodcock, S., Head, I. M., Nee, S. and Curtis T. P., 2006, Quantifying the role of immigration and chance in shaping prokaryote community structure, *Environmental microbiology*, 8(4), 732 – 40.
- Spigelman, M. and Lemma, E., 1993, The use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeletons, *International journal of osteoarchaeology*, 3(2), 137-143.
- Streit, W.R. and Schmitz, R.A., 2004, Metagenomics, the key to the uncultured microbes, *Current opinion in microbiology*, 7(5), 492-498.
- Susannah, G.T. and Edward, M.R., 2005, Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples, *Nature reviews genetics*, 6(11), 805-14.
- Svraka, S., Rosario, K., Duizer, E., van der Avoort, H., Breitbart, M. and Koopmans, M., 2010, Metagenomic sequencing for virus identification in a public-health setting, *Journal of general virology*, 91(Pt 11), 2846-2856.
- Torsvik, V. and Ovreas, L., 2002, Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems, *Current opinion in microbiology*, 5(3), 240-245.
- Turan, M.K., Günay, Ö.C., Kayış, S.A. ve Çörtük, M., 2018, Mikrobiyotada 16S rRNA ve basit biyoinformatik analizler, *Journal of biotechnology and strategic health research*, 2(1), 23-34.
- Uhri, A., 2006, *Batı Anadolu erken tunç çağı ölü gömme gelenekleri*, Doktora tezi, T.C. Ege Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü.
- Ullrich, R., Nuske, J., Scheibner, K., Spantzel, J. and Hofrichter, M., 2004, Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes, *Applied and environmental microbiology*, 70(8), 4575-4581.
- Ünlütürk, Ö., 2015, Olay yerine adli arkeolojik yaklaşım ve gömü tipinin önemi, *Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Antropoloji dergisi*, 30, 61-74.
- Vakhlu, J., Sudan, A. K. and Johri, B. N., 2008, Metagenomics: future of microbial gene mining, *Indian journal of microbiology*, 48(2), 202–215.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., et al., 2001, The sequence of the human genome, *Science*, 291(5507), 1304-1351.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.H. and Smith, H.O., 2004, Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea, *Science*, 304(5667), 66-74.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F. and van Sinderen, D., 2007, Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum, *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(3), 495–548.

- Ward, L. M., Hemp, J., Shih, P. M., McGlynn, S. E. and Fischer, W. W., 2018, Evolution of phototrophy in the chloroflexi phylum driven by horizontal gene transfer, *Frontiers in microbiology*, 9, 260.
- Warinner, C., Rodrigues, J.F., Vyas, R., Trachsel, C., Shved. N., Grossmann, J., Radini, A., Hancock, Y., Tito, R.Y., Fiddymment, S., Speller, C., Hendy, J., Charlton, S., Luder, H.U., Salazar-García, D.C., Eppler, E., Seiler, R., Hansen, L.H., Castruita, J.A., Barkow-Oesterreicher, S., Teoh, K.Y., Kelstrup, C.D., Olsen, J.V., Nanni, P., Kawai, T., Willerslev, E., von Mering, C., Lewis, C.M., Collins, M.J., Gilbert, M.T., Rühli, F. and Cappellini, E., 2014, Pathogens and host immunity in the ancient human oral cavity, *Nature genetics*, 46(4), 336-44.
- Yağız, K., 2009, Antandros nekropolisi hellenistik dönem mezar tipleri, *Adıyaman Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü dergisi*, 2(2), 136-144.
- Yang B., Wang, Y. and Qian, P.E., 2016, Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis, *BMC Bioinformatics*, 17(135).

EKLER

EK 1. Kuva-yi Milliye Müzesi Müdürlüğü Komisyon Raporu.

KOMİSYON RAPORU

İlgi: Prof. Dr. Gürcan POLAT'ın 01.11.2016 tarihli başvurusu.

Prof. Dr. Gürcan POLAT başkanlığındaki bir ekip tarafından İlimiz Edremit İlçesi'ndeki Antandros Antik Kenti Kazısı 2016 yılı kazı sezonunda bulunan ve ekli listede belirtilen;

Toplam **162 poşet, 37 kasa etütlük ve amorf eser** restorasyon, temizlik ve bilimsel çalışma ve değerlendirme yapılmak üzere Ege Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Arkeoloji Bölümü Laboratuvarına,

Antandros Antik Kenti nekropolünden steril koşullarda alınan ve ekte listesi bulunan toplam **30 kalem toprak ve 34 adet dış örneği** metagenomik ve antik DNA konulu yüksek lisans tez çalışmalarında kullanılmak üzere İstanbul Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünün antik DNA Laboratuvarına götürülmesi komisyonumuzca uygun bulunmuştur.

Bilgilerinize arz ederiz.07.12.2016


Komisyon Başkanı
Fatih İŞLEYEN
Arkeolog


Üye
Aytekin YILMAZ
Arkeolog


Üye
Bilge GENÇ
Uzman

EK 2. Kuva-yi Milliye Müzesi Müdürlüğü Komisyon Raporu (devamı).

MÜZE KOMİSYON RAPORU FORMU			
Kazı/Araştırma Adı	Antandros Antik Kenti Kazısı		
Kazı/Araştırma Başkanı	Prof. Dr. Gürcan POLAT		
Kazı/Araştırma Başkan Vekili-Yardımcısı			
Kazı/Araştırma İli/İlçesi/Köyü/Mahallesi	Balıkesir İli Edremit İlçesi Altınoluk Mahallesi		
Rapor Tarihi	07.12.2016		
İlgili Müze Müdürlüğü	Balıkesir Kuva-yi Milliye Müzesi Müdürlüğü		
Örneklerin Götürüleceği Yer (Üniversite/Laboratuvar vb.)	İstanbul Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarı		
Cinsi	Toprak ve Diş	Miktarı	30 kalem ve 34adet
İade Edileceği Tarih			
Müze Komisyon Üyesi	Görev Yeri	Unvanı	İmzası
Fatih İŞLEYEN	Balıkesir Kuva-yi Milliye Müzesi	Arkeolog	
Aytekın YILMAZ	Balıkesir Kuva-yi Milliye Müzesi	Arkeolog	
Bilge GENÇ	Balıkesir Kuva-yi Milliye Müzesi	Uzman	

EK 3. Müze Müdürü İzin Belgesi.

Fotoğraf



SAYI : 35164542 -160.02/1737
KONU: Antandros Antik Kenti Kazısı

08/12/2016

Sn. Prof. Dr. Gürcan POLAT
Ege Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Arkeoloji Bölümü

İlgi: 01.11.2016 tarihli dilekçeleriniz.

İlgi dilekçeler ile; 2016 yılı Antandros Antik Kenti Kazısında bulunan etütlük ve amorf eserler Ege Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Arkeoloji Bölümü Laboratuvarına; nekropol alanından alınan toprak ve diş örnekleri İstanbul Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünün Antik DNA Laboratuvarına götürülmek istenen eserler Müdürlüğümüzce oluşturulan komisyon tarafından incelenmiş olup, konuya ilişkin hazırlanan raporlar yazımız ekinde iletilmektedir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.


Funda ÜNAL
Müze Müdürü

EK:
-Komisyon Raporu (2 adet)



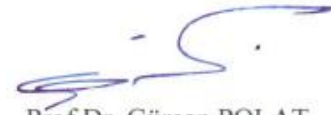
EK 4. Kazı Başkanı İzin Belgesi.

Prof.Dr. Gürcan POLAT
Ege Üniversitesi
Edebiyat Fakültesi
Arkeoloji Bölümü
Bornova/İZMİR
Tel: 0232 3113949
GSM: 0537 3855930
E-posta: gurcan.polat@ege.edu.tr

Sayın İlgiliye,

Başkanlığım altında 2007 yılından beri yürütülmekte olan Antandros kazısındaki mezarlardan steril ortamda alınan 30 birim toprak ve 34 adet diş Doç. Dr. Ercan ARICAN yürütücülüğünde İstanbul Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde incelenmek ve çalışılmak üzere izin verilmiştir.

Bilgilerinize saygı ile arz olur. 07.02.2017



Prof.Dr. Gürcan POLAT
Antandros Kazı Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Dilan BAL
Doğum Yeri	Beyoğlu/İSTANBUL
Doğum Tarihi	29.06.1992
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	05383799491
E-Posta Adresi	diilanbal@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Yıldız Teknik Üniversitesi
Fakülte	Kimya-Metalurji Fakültesi
Bölümü	Biyomühendislik
Mezuniyet Yılı	09.07.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı