

**KİBYRA ANTİK POPÜLASYONUNDA ARKEOGENOMİK
ANALİZLERLE PALEOPATOLOJİ ETMENİNİN TESPİTİ**

**DETERMINATION OF PALEOPATHOLOGY FACTOR IN
THE ANCIENT POPULATION OF KIBYRA BY
ARCHAEOGENOMIC ANALYSIS**

SEVGİ YORULMAZ

PROF. DR HATİCE MERGEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK TEZİ olarak hazırlanmıştır.

İstasyonların en keyif ve huzur dolu olanı,

Anlaşılmaya, anlamaya doyamadığım insana ...

Burak ÇETİNKOL' a sevgilerimle



ÖZET

KİBYRA ANTİK POPÜLASYONUNDA ARKEOGENOMİK ANALİZLERLE PALEOPATOLOJİ ETMENİNİN TESPİTİ

Sevgi YORULMAZ

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice MERGEN

Nisan 2024, 61 sayfa

Son yıllarda antik DNA çalışmaları ile metagenomik çalışmaları birbirine destek sunacak ve yeni bilimsel sorulara cevap bulacak nitelikte birlikte kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında Kibyra antik kentine ait kilise etrafında bulunan mezarlardan arkeolojik kazılar sonucunda elde edilen iskeletlerin herhangi bir patojen etmeni içerip içermediği bakılmıştır.

Kullanılan metodolojik yaklaşımda optimize edilen silika membran kitler ile aDNA izolasyonu gerçekleştirilmiş. aDNA izolasyonu ardından spektrofotometrik ölçüm ile örneklerin DNA içerikleri kontrol edilmiş ve kütüphane hazırlıklarına başlanmıştır. Bu metodolojik adımlardan sonra da metagenomik analizlerin en iyi biçimde yapılmasına izin veren ve çalışmanın da amacına uygun olan 16S rRNA genine ait V3-V4 gen bölgeleri çalışılmıştır.

Örneklem grubunda 9 makrolojik taramadan sonra 7 örnekte DNA izolasyonu yapılmıştır. Seçilmiş olan bu 7 örnekten de 4 tanesini Illumina sekans platformuna göndermiş ve 4 örnekten de sekanslama verileri elde edilmiştir. Her bir örnek için metagenomik analizler ile mikroorganizma profilleri ve birbirlerine göre mikroorganizma profilleri çıkartılmıştır.

Sonuç olarak elde edilen verilerde her bir mikroorganizmanın metagenomik profil çeşitliliğinin benzer ancak mikroorganizma gruplarının dağılım oranlarında farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu farklılıklara bakıldığında da dış örneklemine ait örnekte filogenetik ağaç, alfa çeşitlilik ve beta çeşitlilik gibi analizler uygulandığında dış grup olarak

davrandığı gözlemlenmiştir. Mikroorganizma çeşitliliğine bakıldığında da örneklerle ait herhangi bir paleopatoloji etmeni olan sinyal görülmemiştir.

Yürütülen bu tez çalışmasında Kibyra antik kentinden arkeolojik kazılarla elde edilen örneklerin ölü gömme geleneklerinde görülen dönemsel farklılığına, antik DNA çalışmaları ve metagenomik çalışmaları yaklaşımı ile bakıldığında bir patolojik etmene rastlanmadığı görülmektedir. Bu çalışmaya ek olarak ileri çalışmalarında örneklem sayısının artırılması ve yine metagenomik analizlerin uygulanarak ve tür düzeyinde araştırmaları yapabilmek için de tüm genom shotgun dizileme platformlarını seçmek bizlere daha detaylı sonuçlar verebilir. Aynı zamanda da shotgun dizileme ile tüm genom profili çıkartılabilir ve çağdaşı olan diğer antik örneklerle de karşılaştırılabilir.

Anahtar Kelimeler: antik DNA, metagenomik, paleopatoloji, genetik, Kibyra antik şehri, 16S rRNA

ABSTRACT

DETERMINATION OF PALEOPATHOLOGY FACTOR IN THE ANCIENT POPULATION OF KIBYRA BY ARCHAEOGENOMIC ANALYSIS

Sevgi YORULMAZ

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hatice MERGEN

April 2024, 61 pages

In recent years, studies of ancient DNA and metagenomics have been used together to support each other and find answers to new scientific questions. In this thesis, we examined whether the skeletons obtained from the graves found around the church in the ancient city of Kibyra contained any pathogenic agents. We used optimized silica membrane kits for aDNA isolation. After aDNA isolation, we checked the DNA content of the samples with spectrophotometric measurement and started library preparations. Following these methodological steps, the V3-V4 gene regions of the 16S rRNA gene, which allow for the best possible metagenomic analysis and are also in line with the purpose of the study, were studied. After macroscopic examination of the sample group, DNA isolation was performed on 7 samples. We sent 4 of these 7 selected samples to the Illumina sequencing platform, and obtained sequencing data from 4 samples. For each sample, microbial profiles and microbial profiles relative to each other were extracted using metagenomic analyses.

As a result, the data obtained showed that the metagenomic profile diversity of each microorganism was similar, but differences were observed in the distribution rates of the microorganism groups. When looking at these differences, it was observed that the dental sample acted as an outgroup when analyzes such as phylogenetic tree, alpha diversity and

beta diversity were applied. When the microorganism diversity was examined, no paleopathological signals were seen in the samples.

In this thesis study, when the periodic differences seen in the burial traditions of the samples obtained from archaeological excavations from the ancient city of Kibyra are examined with the approach of ancient DNA studies and metagenomic studies, it is seen that no pathological factor is found. In addition to this study, increasing the number of samples in further studies and applying metagenomic analyzes and choosing whole genome shotgun sequencing platforms to conduct species-level research may give us more detailed results. At the same time, the entire genome can be profiled by shotgun sequencing and compared with other contemporary ancient samples.

Keywords: ancient DNA, metagenomics, paleopathology, genetics, ancient city of Kibyra, 16S rRNA

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca zorlu süreçleri hayatımda ilk kez deneyimlememe ve bunlarla başa çıkma yolunda değerli danışmanımın bana olan inancı ve bu süreçte bana en büyük psikolojik desteğini yaptığımız konuşmalarla değerli anlar yaşatarak esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Hatice Mergen'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Göz yaşlarımdan utanmamam gerektiğini hatırlattığınız için teşekkür ederim sevgili Hocam!

Akademik çalışmam boyunca farklı deneyimler ve farklı çalışma ortamları görmemle adaptasyonumu sağladığım ve bu süreçte tanıştığım, destekleri gördüğüm Doç. Dr. Sibel Küçükıyıldırım Çelik hocama hem yardımları hem de eşsiz müzik zevki ile kulağımıza fısıldadığı anlar için teşekkürlerimi sunarım.

Yapmış olduğum bu çalışmada temel taşı olan örneklerin bulunması ve gerekli izinlerin alınması ile en büyük destekleri ve yapılacak olan çalışmada konu seçiminde özgür davranmamı sağlayan hocalarım Prof. Dr. Yeşim Doğan'a ve Doç. Dr. Alper Yener Yavuz'a teşekkürlerimi sunarım.

Verdiğim bazı zamansal sözleri tutamasam da yapmış olduğum çalışmaya değer katan ve bana inancını hissettiren ve pes etmememde etkisi olan Prof. Dr. İ. Çağatay Karaaslan hocama teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar ortamımı her ne kadar çok verimli geçiremesem de mekânı paylaştığım her anda güler yüzlü ve sevecen davranışları ile varlığını hissettiren laboratuvar arkadaşlarım Hazal, Özgür, İlayda ve Dilara'ya teşekkürlerimi sunarım.

En zorlu sürecimde tanıştığım ve çıkmaz olan konulardan çıkışlarımda mantıksal yaklaşımları ile doğanın güzelliği kadar huzurla bana eşlik eden sevgili arkadaşım Burak Çetinkol'a teşekkürlerimi sunarım...

Akademide ilerlediğim yol boyunca bana eşlik eden ve tüm süreçlerimde destekçi olan sevgili Meltem Ulusoy ve İrem Çelebier arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu alışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından yürütülen 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında desteklenmiştir. Kuruma sağlamış olduğu katkıdan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Bu hayat yolculuğumda farklı zaman ve mekanlarda her şeye rağmen verdiğim kararlarda benimle yan yana olan ve bana hep destek olan sevgili aileme; anneme, babama, ablama ve ikizlerime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Verdiğim eziyetler/kaygılar için özür diler, gösterdiğiniz sabır için teşekkürler güzel canlar....



İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Antik DNA	3
2.1.1. Antik DNA Çalışmalarında Kullanılan Biyoarkeolojik Materyaller	3
2.2. Paleopatoloji	6
2.2.1. Enfeksiyonel Hastalıklar	7
2.2.2. Genetik ve Konjenital Hastalıklar.....	8
2.2.3. Kemik ve Eklem Hastalıkları	9
2.2.4. Travmalar	11
2.2.5. Paleopatolojik Bir Örnek Olarak Tüberküloz	11
2.3. Paleomikrobiyoloji	16
2.4. Metagenomik	17
2.4.1. Metagenomik Alanında Yapılan Çalışmalar.....	20
2.4.2. 16S rRNA Geni	22
2.4.3. Operasyonel Taksonomik Birim (OTU)	24
2.5. Kibyra Antik Kenti	24
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	27
3.1. Antik Örneklerin Toplanması	27
3.2. Örneklerin Dekontaminasyonu ve Kesimi	28
3.3. Antik DNA İzolasyonu	28
3.4. Örneklerin Spektrometrik Ölçümü	29

3.5. Antik DNA Kütüphane Oluşturma.....	29
3.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	30
3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünü Temizliği	31
3.5.3. İndeks PZR	31
3.5.4. İkinci Aşama PZR Ürün Temizliği	32
3.6. Antik DNA Sekanslama	32
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	34
4.1. Spektrometrik Ölçüm Sonuçları	34
4.2. Antik DNA Dizileme Sonuçları / 16S rRNA Dizileme sonuçları	34
5. YORUM	51
6. KAYNAKLAR.....	52
EKLER	62
EK 1- Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	62
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ

Şekil 1: 52 yaşında bir kadına ait pott hastalığı.....	12
Şekil 2: Bir yetişkine ait femur başı tüberkülozu	13
Şekil 3: Tüberkülozlu olan kemiklerin boyunda azalma söz konusudur (a, sağda) ve eklem tüberkülozun ileri derece bozunumu (b, solda)	13
Şekil 4: <i>M. tuberculosis</i> 'in olası göç yolu verilmiştir.....	16
Şekil 5: Kibyra Antik Kentinin Morfolojik Haritası ve Antik Yerleşimler.....	25
Şekil 6: Kullanılan örneklemeler.....	28
Şekil 7: Kemik ve diş örneklerinin mikroorganizma profili/çeşitliliği.....	35
Şekil 8: SY_1 numaralı örneğe ait krona grafiği.....	36
Şekil 9: SY_4 numaralı örneğe ait krona grafiği	37
Şekil 10: SY_6 numaralı örneğe ait krona grafiği	38
Şekil 11: SY_6_toprak numaralı örneğe ait krona grafiği	39
Şekil 12: Kemik ve diş örneklerinin alfa çeşitlilikleri	40
Şekil 13: Kemik ve diş örneklerinin beta çeşitliliği	41
Şekil 14: Kemik ve diş örneklerinin filogenetik ağacı.....	42
Şekil 15: SY_6 numaralı diş ve toprak örneğine ait mikroorganizma çeşitliliği ...	43
Şekil 16: Kemik ve diş örneklerinin şube çeşitliliği.....	44
Şekil 17: Kemik ve diş örneklerinin sınıf çeşitliliği.....	45
Şekil 18: Toprak örneğinin şube çeşitliliği.....	46
Tablo 1: Enfeksiyonel hastalıkların genel ifadesi	8
Tablo 2: Örneklerin spektrofotometrik ölçümleri	34

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
μ	Mikro
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar

μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
aDNA	Antik DNA
bç	Baz çifti
C	Sitozin
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfat
F	İleri primer
g	g-kuvveti
G	Guanin
M	Molar
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	Geri Primer
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
UV	Ultraviyole



1. GİRİŞ

İnsan odaklı olan antik DNA (aDNA) çalışmalarında biyolojik antropolojinin alt dalı olan moleküler genetik ve moleküler antropoloji bilim dallarının multidisipliner çalışmaları ortaklık göstermektedir [1,2]. Biyolojik antropolojinin dört alt dalından biri olan biyoarkeoloji de arkeolojik insan topluluklarının demografik yapısını, beslenme ve sağlık durumlarını araştırmaktadır [3,4]. Bunun yanı sıra, moleküler veriler ışığında ve gelişen teknoloji ile birlikte son yıllarda antik DNA çalışmalarında çeşitlilik ve ivmeli bir artış görülmektedir. Bu çeşitlilikler; eski insanlara ait organik kalıntıların (kemik ve diş gibi) biyolojik cinsiyetlerinin belirlenmesine, fenotipik özelliklerin genomik verilere dayanarak yeniden biçimlendirilmesine (facial reconstruction), beslenme modellerinin ortaya çıkartılmasına ve enfeksiyonel ve/veya metabolik hastalıkların tespitine olanak sunmaktadır [5, 6, 7, 8, 9].

İskeletler üzerinde yapılan morfolojik incelemelerin ötesinde günümüz moleküler çalışmaları ile paleopatoloji çalışmalarına yer verilmektedir. Makro incelemelerin ötesinde mikro düzeyde incelemeler ve moleküler çalışmaların yer alması ile metabolik ve enfeksiyonel hastalıkların neyden kaynaklandığının tespiti de yapılabilmektedir. Kemik doku üzerinde gözlemlenen deformasyonun metabolik bir hastalık kaynaklı mı yahut enfeksiyon kaynaklı mı olabileceği yapılan paleopatolojik incelemeler ile ayrıştırılabilmektedir. Bu çalışmalardaki en büyük önem geçmişte yaşamış toplulukların hastalık endikasyonlarını ve hastalıkların prevalansını anlamaktır. Kemik doku üzerinde oluşan deformasyonun sifilis ve frengi gibi enfeksiyonel hastalıklarda benzer olması geçmişte yorumlamamızda çok doğru sonuçlar ortaya koymamaktadır. Morfolojik deformasyondaki kaynağın sebebini ayırabilmek için paleomikrobiyoloji çalışmaları günümüzde giderek artış göstermektedir [10].

Son yıllarda artan bir ivme ile çalışmalarını sürdüren paleomikrobiyoloji alanı, eski insan topluluklarındaki organik kalıntılardan (patojen kemik ve diş, koprolit, mumya dokuları ve saç vb), mikroorganizmaların tespiti ve teşhisiyle mikroorganizmaların evrimsel süreçleri ve insan ile olan ortak yaşamlarının anlaşılmasına imkân sunar. Paleomikrobiyoloji, arkeolojik ve antropolojik olarak ortaya konan hipotezleri moleküler biyolojinin bilimsel çalışmalarıyla kanıtlı verilerle desteklemektedir. Bu kanıtları metagenomik çalışmalar ile birlikte sunmaktadır [11].

Metagenomik, mikroorganizmaca zengin olan örneklerin kültürleme tekniğinin yapılmasına ihtiyaç duymadan doğrudan örnekten alınarak içeriğindeki

mikroorganizmaların DNA'larının saflaştırılması ve yeni nesil dizileme tekniklerinin kullanılması ile genomik analizlerinin yapılmasıdır. Metagenomik analizler sonucunda elde edilen örneğin metagenomik kütüphaneleri, örneğe ait tüm mikroorganizmaların genomik içeriğini ifade etmektedir. Temsil edilen bu içerik; gen fonksiyonlarının değerlendirilmesi, korunmuş protein fonksiyonlarının belirlenmesi, spesifik mikroorganizma tespiti, gruba özgü gen fonksiyonlarının bulunması ve mikroorganizma çeşitliliğini belirlemede kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında Kibyra antik kentinden elde edilen insan iskelet ve diş kalıntılarının aDNA izolasyonu ve metagenomik analizi yapılmıştır. Bu çalışmadaki metagenomik analizler sonucunda elde edilen veriler arkeolojik kalıntıların herhangi bir enfeksiyonel hastalığa sahip olup olmadığının teşhisinde değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antik DNA (aDNA)

Antik DNA çalışmalarında eski insan popülasyonlarına ait kemik, diş, koprolit, mumya, saç ve yerleşimdeki mutfak, depo ve çöp alanlarından ele geçirilen hayvan ve bitki kalıntıları örneklemeler olarak yer almaktadır. Moleküler veriler ışığında yapılan çalışmalarda eski insan topluluklarına yapılan antik DNA çalışmaları son yıllarda hızla artış göstermekte ve çalışmaların amaçlarına göre metod ve analizlerde farklılıklar görülmektedir. Eski insan örneklerinden DNA izolasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) teknolojisinin 1983 yılında gelişim göstermesiyle önem kazanmıştır (7). İlk çalışmalar özellikle anasoylu ve babasoylu haplogrupları belirlemeye yönelik olarak mtDNA, Y kromozom ve çekirdek DNA dizi çalışmaları şeklindedir. Bu çalışmalar ile eski insan topluluklarının biyolojik uzaklıkları, akrabalık çalışmaları ve bireylerin genetik özelliklerini anlamak hedeflenmiştir [12, 13,14, 15, 16, 17, 18, 19, 20]. Görece daha yakın olan çalışma alanlarında gelişen moleküler teknikler ve dizileme teknolojisi ile metagenomik çalışmalarda da artış görülmektedir. Metagenomik alanında yapılan çalışmalar kemik, diş ve sediman örneklem grupları ile gerçekleştirilmektedir [21]. Kemik ve diş örneklerinden yapılan çalışmalar enfeksiyonel ve/veya metabolizma hastalıkları hakkında fikir sunmaktadır. İskeletler üzerinde izler bırakan bazı enfeksiyonel hastalıklar ve metabolik hastalıklar söz konusu olsa da enfeksiyonel hastalığın ve metabolik hastalığın bulunduğu evre ile ölüm zamanı arasındaki sürenin de göz ardı edilemeyecek kadar önemi vardır. Bu zamansal önem ile kemik üzerine yansıtacak olan patolojik izlerin gözle görülebilir olması ve patojen etmeninin tespit edilebilmesi açısından önem arz etmektedir [22].

2.1.1. Antik DNA Çalışmalarında Kullanılan Biyoarkeolojik Materyaller

Biyoarkeolojik materyaller olarak; kemik, diş, koprolit, korunmuş yumuşak doku (mumya, deri, kıl), diş taşı, hayvan dokuları, bitki tohum ve polenleri aDNA çalışmalarında kullanılmaktadır.

Mumya örnekleri genellikle müze materyalleri olarak korunduğu için aDNA çalışmalarında çok kullanılabilen örnekler değildir. Bunun yanı sıra koprolit örnekleri de

kazılarda çok fazla rastlanılan ve antik DNA çalışmalarına tabii tutulan bir örneklem grubu değildir. Bunların aksine hayvan kemik ve diş kalıntıları, bitki tohumları kazılarda elde edilen ve antik DNA çalışmalarında sıkça kullanılan biyoarkeolojik materyaller arasında yer almaktadır.

Biyoarkeolojik materyal olarak diş çok rastlanılan ve sayıca daha fazla olan bir materyaldir. Kontaminasyon riski kemiklere nazaran daha az düzeydedir. Buna etken olan durum dişlerin çene içerisinde gömülü olma ve kök uçlarının kapalı olması ile birlikte mine tabakasının dayanıklılığından da kaynaklanmaktadır [23, 24]. Dişler genel olarak iki temel yapıdan oluşmaktadır; taç ve kök. Bu iki temel yapıda; mine, dentin, sement, pulpa olmak üzere 4 doku tipi yer almaktadır. Bu dokulardan mine en sert doku tabakasıdır ve % 97 oranında inorganik madde ve hidroksiapatit içermektedir. Bu kadar yüksek oranda inorganik madde içermesiyle de DNA korunumunu artırmaktadır. Diş dokuları arasında ikinci sert doku ise dentin tabakasıdır ve görece mine tabakasından yumuşak, kemik dokudan daha sert bir dokudur. Dentin tabakasına bu sertliğini % 75 oranında kalsiyum fosfat ve %18 oranında kollajen sağlamaktadır. Diğer bir doku olan ve dişin kök kısmını kaplayan sement tabakası da çok ince bir tabakadır. Son olarak da pulpa (diş özü) tabakası içerisinde kan damarları ve sinirlerin bulunduğu yumuşak bir dokudur ve aDNA çalışmaları açısından en korunaklı bölge olarak çalışmalarda seçilmektedir [25, 26]. Ancak dikkat edilmesi gereken bir husus vardır, kök kanalları açık olan ve aşınan dişlerin kontaminasyona daha açık olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır ve patoloji çalışmaları yapılmadığı sürece çürük dişler tercih edilmemelidir [27].

Kemik, arkeolojik kazılarda elde edilme oranı en yüksek olan biyoarkeolojik materyaldir. Ayrıca aDNA çalışmalarında izolasyon ve amplifikasyon başarısı pozitif yönde verimlilik gösteren materyaldir [28, 29]. Yumuşak dokulara kıyasla kemik dokudan daha yüksek oranda DNA elde edildiği Tuross (1994) yaptığı çalışma ile göstermiştir/desteklemiştir [30]. Üstelik son 10 yıl içerisinde yapılan antik DNA çalışmaları da pars petrosa (timpanik kemik) gibi spesifik kemik dokularının korunaklı olması ve aDNA eldesi içeriğinden çok daha verimli olduğunu göstermiştir [31, 32].

Kompakt kemiklere oranla süngerimsi kemiklerde aDNA eldesi daha yüksek olsa da süngerimsi kemik dokunun kompakt kemik dokuya nazaran dış faktörlere daha açık olması ve degradasyonunun yüksek oranda olması yapılan çalışmalar ile açıklanmıştır [29, 33]. Kontaminasyon oranının yüksek olması sebebiyle tercih edilmese de

O'Rourke'nin 2000 yılında yaptığı çalışmada süngerimsi kemik kategorisinde olan kaburganın tercih edilmesi önerilmektedir [27]. Kaburgaların tercih edilme sebepleri arasında bireyde sayıca fazla olması, antropolojik ve müze örneklemelerinde üst düzey bir öneme sahip olmaması, morfolojik ve paleopatolojik olarak yaş ve hastalık etmenlerinin belirlenmesinde önem arz etmeleri yer almaktadır.

Kontaminasyon aDNA çalışmalarının en büyük sorunsalları arasında yer almaktadır. Bunun sebebi bulunan örneklerin toprakta geçirdiği süreç, başka organizma ve mikroorganizmalarla etkileşmenin yanı sıra çevresel faktör olan sıcaklık, pH, su ve mekanik hasarlara açık halde bulunuyor olmasından kaynaklanmaktadır. Kemik örneklerinin korunumu makroskobik düzeyde önemli olduğu kadar aDNA eldesi için de önem arz etmektedir [34]. Bir diğer çalışmada da örneklerin yaşı ve antik DNA eldesinin doğrudan bir ilişkisinin olmadığı, lakin saklama koşulları ile antik DNA eldesi arasında önemli bir ilişki olduğu gösterilmiştir [35].

Aynı ortamda saklama koşullarına sahip olan biyoarkeolojik kalıntılarda diğer önemli bir kriter de gömü içerisinde yer alan gömü hediyeleri ve gömü biçimleridir. İskeletin yanı başında bulunan çömlek ve kireç taşı gibi maddeler kemiklerde apatiti koruduğu gibi su alan mağara veya lahit içerisinde gömülü olan iskeletlerin suya olan temasları arttığında kemiklerin apatit yapısı bozulmaktadır. Bunun yanı sıra ölü gömme hediyeleri içerisinde metal içerikli malzemelerin olması bakır, çinko, kurşun vb. gibi çevresel etmen olarak mikroorganizmaların gelişmesine ve üremeleri için uygun ortam sağlamayacağından kemikler mikroorganizma degradasyonundan korunmaktadır [36].

Patolojik izler taşıyan kemik ve diş örnekleri aDNA çalışmalarında önemli bir kriter olarak değerlendirilmektedir. Bu tür patoloji içeren kemik ve diş örneklerine çok sık rastlanmamakla birlikte rastlandığı zaman arkeolojik topluluk hakkında sorulara cevaplar sunabilmektedir. Önemli parçalar olarak nitelendirilen bu örnekler moleküler çalışmalar ile aDNA verileri elde edilir. Genetik analizler yapılırken nadir olan bu parçalar için en iyi metotlar seçilmeli ve doğru değerlendirmeler için patoloji izlerinin olduğu bölgeler çalışılmalıdır.

2.2. Paleopatoloji

Patolojinin kelime anlamı, hastalık (pathos) bilgisidir (logos). Patoloji bilim dalı hastalıkları ve hastalarda bunlara eşlik ederek belirti ve semptomları meydana getiren değişikliklerin nedenlerini araştırır. Patolojiyi anlamak için iki önemli terim yer almaktadır. Bunlardan ilki etiyolojidir. Hastalığın kökenini belirleyen etiyoloji, arka plandaki sebepleri ve değişime yol açan unsurları içerir. İkinci terim ise hastalığın gelişimine yol açan süreçleri tanımlayan patogenezdır. Patogeneze, hastalığın oluşumunu etkileyen etiyolojik faktörlerin ve moleküler değişikliklerin etkilerini açıklar. Özgül işlevsel ve yapısal anormallikleri tetikleyen süreçleri ifade eder. Etiyoloji hastalığın nedenini açıklarken, patogeneze gelişim sürecini açıklar [10]. Paleopatoloji terimi ise eski Mısır mumyalarını inceleyen Ruffer tarafından ilk kez 1910 yılında kullanılmıştır [37]. Patolojinin çalışma alanı canlı bireyler üzerinde iken, paleopatolojinin çalıştığı alan arkeolojik insan kalıntılarıdır [37].

Paleopatoloji, biyoarkeolojik materyaller (kemik, mumya ve diş) üzerinde makroskobik olarak görülebilen lezyonları ve radyolojik incelemeleri olan bir bilim dalıdır. Kemikte patolojik izler bırakan hastalıklara hangi faktörlerin etki ettiği, nasıl yayılım gösterdiği (lokal yayılım, genel yayılım vb gibi) ve iskelet üzerinde ne gibi etkiler bıraktığını inceleyen paleopatolojinin çalışma alanıdır. Patolojik izler ile bireyin sağlığı ve toplumsal yapı içerisindeki genel sağlık profilleri hakkında fikirler edinilmektedir [38].

Patolojik izler makroskobik ve radyolojik olarak incelenebildiği kadar aynı zamanda farklı etmenlerin de benzer izler oluşturduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bu gibi durumlarda moleküler veriler ışığında daha derinlemesine incelemeler yapılmakta ve patojen etmeninin asıl faktörü tespit edilebilmektedir. Tüm bu çalışmalarla birlikte arkeolojik toplulukların sağlık profili, bireylerin ölüm sebepleri, ölüm sebepleri ve ölü gömme geleneklerinin nedenleri (toplu mezarlar ve kireçli mezarlar gibi), beslenme modelleri ve biçimleri, çevresel ve kültürel etkileşimleri hakkında bizlere bilgiler vermektedir.

Biyoarkeolojik kalıntılar incelenirken kemikler ve dişlerde görülen patolojiler şu şekilde sıralanabilir.

2.2.1. Enfeksiyonel Hastalıklar

Şu anda, aşılar ve antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılmasına rağmen, enfeksiyon hastalıkları küresel sağlık alanında hala büyük bir endişe kaynağıdır. ABD’de önde gelen ilk on ölüm arasında pnömoni ve sepsisemi yer almaktadır. Enfeksiyon hastalıkları yaşlılarda AIDS sendromu veya kronik hastalıkları olan yahut immünsüpresif ilaç kullananlarda özellikle önemlidir [10].

Sağlıksız yaşam koşulları ve malnütrisyon, gelişmekte olan ülkelerdeki yoğun ve her yıl >10 milyon insanı öldüren enfeksiyon yüküne katkıda bulunmaktadır. Daha da kötü olan, enfeksiyon hastalıklarından zarar görenlerin büyük bir çoğunluğu, solunum ve ishal yapan enfeksiyonları olan çocuklarda görülmektedir [10].

İnsanlarda hastalık yapan patojen sınıfları; prionlar, virüsler, bakteriler, mantarlar, protozoonlar ve helmintler şeklinde sıralanmaktadır. Mikroorganizmaların bulaşması, enfeksiyonla doğrudan veya dolaylı temasla, solunum yolundan çıkan damlacıklarla, fekal-oral yoldan, cinsel yoldan, anneden fetüse yahut yeni doğana vertikal geçiş şeklinde ya da böceklerle/eklembacaklı vektörlerle bulaşabilir [10].

Arkeolojik insan kalıntılarında görülebilen enfeksiyonel hastalıklar kronik olarak ilerleyenlerdir. Enfeksiyonel hastalığın nedenine göre spesifik yahut non spesifik olarak iki ayrı sınıfta değerlendirilmektedir. Lepa, tüberküloz, sifiliz ve frengi gibi hastalıklara bakteriler yol açtığı için spesifik enfeksiyonel hastalıklar olarak nitelendirilmektedir. Bakterilerin, virüslerin, parazitlerin ve diğer mikroorganizmaların sebebi ile dolaylı gelişen hastalıklar da non spesifik olarak nitelendirilmektedir [10, 38, 39].

Tablo 1: Enfeksiyonel hastalıkların genel ifadesi

Bakteriyel enfeksiyonlar	Mantar enfeksiyonları	Virüse bağlı enfeksiyonlar	Parazite bağlı enfeksiyonlar
Lepra	Coccidioidomycosis – vadi humması	Poliomyelitis	Toxoplasmosis
Tüberküloz	Candidiasis	Rubella	Helmint enfeksiyonları
Brusella	Maduromycosis	İnfluenza	Echinococciasis
Veba	Blastomycosis		Paragonimiasis
Pneumonia	Histoplasmosis		
Osteomyelitis	Cryptococcosis		
Periosit	Aspergillosis		
Treponematosi	Sporotrichosis		
Lyme hastalığı	Mucormycosis		
Aktinomikoz			
Ruam			
Nocardiosis			
Ainhum			

2.2.2. Genetik ve Konjenital Hastalıklar

Genetik hastalıklara bağlı olarak gelişen durumlar iskeletler üzerinde morfolojik olarak ayırt edici bir faktör olmamakla birlikte yapılan antik DNA çalışmaları ve uygun metodolojilerin kullanımı ile tespit edilebilmektedir. Burada bireyin gen haritasının çıkartılması ve uygun analizlerin yapılması ile birlikte genetik hastalıkların varlığı tespit edilebilmektedir.

Arkeolojik insan kalıntılarında morfolojik olarak kemiğe yansıyan konjenital anomaliler de görülmektedir. Bu anomaliler doğum esnasında ve/veya embriyolojik gelişimde gerçekleşen ve bireyin yaşamı boyunca varlığını sürdüren anomalilerdir. Kalıtsal oldukları kadar gelişim sürecinde etki eden faktörler sonucunda da meydana gelebilirler. Konjenital hastalıklara örnek olarak; sifiliz, toksoplazmoz, sitomegalovirüs (CMV), kızamık, kabakulak, HIV, rubella, spina bifida, sakralizasyon, sakral agenezi, myelocoele, meningocele, kafatası anormallikleri, ekstremitelerde aplazi ve hipoplazi, birleşik vertebra, ayrılmış transvers process, sternumda görülen cleft-bifid arches, üst ekstremitte bozuklukları, konjenital pelvis bozuklukları ve omurganın konjenital bozuklukları olarak verilebilir [10, 40, 39].

2.2.3. Kemik ve Eklem Hastalıkları

Kemik ve eklem hastalıkları osteokondrom ve lipom gibi lokalize, iyi huylu kemik ve yumuşak doku tümörlerinden, osteoporoz ve osteogenezis imperfakta gibi jeneralize bozukluklara dek çok sayıda hastalığı kapsar [10].

Kemiğin ve kırıkdağın konjenital hastalıkları; tek ya da grup halinde kemik anormallikleri disostozlar olarak adlandırılırlar ve kemiklerin olmamasına, sayıca fazla olmasına ya da uygun olmayan şekilde kaynamalarına neden olabilirler; bunların bazıları primitif mezenkimal hücrelerin göç ve yoğunlaşmalarını sağlayan homeobox genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanırlar. Kemik ve kırıkdağ organogenezindeki anormallikler displaziler olarak adlandırılırlar: bunlar çeşitli sinyal ileti yollarını ya da ekstrasellüler matriks bileşenlerini etkileyen mutasyonlardan kaynaklanırlar. Akondroplazi ve tanatoforik cücelik büyüme plaklarında hatalı kırıkdağ sentezine yol açan, yapısal FGFR3 aktivasyonu sonucunda oluşur. Osteogenezis imperfakta (kırılgan kemik hastalığı) tip I kollajenin normal üretimini engelleyen ve kemiklerin kolay kırılmasına neden olan fragilitateye yol açan gen mutasyonlarından kaynaklanır. Osteopetrozis osteoklast işlevini bozan mutasyonlardan kaynaklanır ve yetersiz kemik yıkılması (rezorpsiyonu) nedeniyle yoğun yapısal olarak zayıf kemiklerle seyrederek.

- Kemik ve kırıkdağın konjenital hastalıklara; osteogenezis imperfakta, akondroplazi ve tanatoforik cücelik, osteopetrozis örnek olarak verilebilir.

Kemik kitlesinin ve gelişiminin edimsel hastalıkları; beslenme yetersizlikleri kemik bütünlüğünü organik matriksinin niteliğini değiştirerek (C vitamininin kollajen çapraz bağlanmasında görev alması) ya da kemik mineralizasyonunu etkileyerek (D vitamininin kalsiyum emiliminde görevli olması) bozabilir. Osteoporoz kemik kitlesinin azalmasıyla oluşur ve kemikleri kırıklara yatkın hale getirdiğinden dolayı klinik olarak önemlidir. Osteoporoz her ne kadar birçok faktöre bağlı olarak gelişse de, en yaygın iki tipi osteoplast işlevinde yaşlanmaya bağlı azalma sonucu oluşan senil osteoporoz ve östrojenin rölatif yokluğu sonucu artmış osteoklastik aktiviteye bağlı gelişen postmenapozal osteoporozdur. Paget hastalığının sebebi genetik açıdan duyarlı bireylerde paramiksovirus enfeksiyonu olabilir ve aberran ve aşırı osteoklast aktivitesini izleyen şiddetli, fakat yapısal açıdan hatalı, osteoblastik kemik üretimine bağlıdır. Primer yahut böbrek yetmezliğine bağlı sekonder aşırı PTH yapımı (hiperparatiroidizm) kırıklar ve

şekil bozuklukları ile sonuçlanan, artmış osteoklast aktivitesine ve kemik yıkımına neden olur [10].

- Kemik edinsel hastalıkları; osteoporoz, paget hastalığı, raşitizm ve osteomalazi, hiperparatiroidizm.
- Kırıklar
- Osteonekroz,
- Osteomiyelit; piyojenik osteomiyelit, tüberküloz osteomiyelit.
- Kemik tümörleri; kemik yapan tümörler, kıkırdak yapan tümörler, fibroz ve fibroosseöz tümörler ve diğer kemik tümörleri, kemik hastalıklarına örnek verilebilir.

Kemiklerin iskelet sistemi üzerinde hareketini sağlayan nöral bağlantıların yanı sıra eklem bağlantıları da önem arz etmektedir. Eklem hastalıkları kapsamlı bir hastalık grubudur. Osteoartrit (dejeneratif eklem hastalığı) en yaygın eklem hastalığıdır; matriksin yıkımının sentezlenenden daha fazla olduğu primer dejeneratif eklem hastalığıdır. İkincil olarak da enflamasyona yol açar. İlerleyen yaş dışında, vakaların büyük çoğunluğunda bir tetikleyici olay olmadan başlamaktadır. Enflamasyon destekleyici stokinlerin yerel üretimi ve diğer mediatörler (IL-1, TNF, nitrik oksit) eklem dejenerasyonunun ilerlemesine katkıda bulunabilir. Romatoid artrit temelde eklemleri, özellikle de küçük eklemleri tutan bir kronik inflamatuvar hastalıktır, ancak birden fazla dokuya tutunum gösterebilir. Gut ve yalancı gut dolaşımında artmış olan ürik asit ya da kalsiyum pirofosfat düzeyleri eklem boşluğunda kristal birikimine yol açabilmektedir. Oluşan iltihabı hücre toplanması ve aktivasyonu kıkırdak yıkımı fibrozis ve artrite yol açar. Eklem boşluğunun doğrudan enfeksiyonuna yani süpüratif artrit ya da sistemik enfeksiyonlarla çapraz reaksiyon veren bağışıklık yanıtına bağlı olarak (bazı Lyme artrit gibi) eklem inflamasyonu ve zedelenmesi oluşabilir [10].

- Artrit; osteoartrit, romatoid artrit, juvenil romatoid artrit, seronegatif spondiloartropatiler, gut, yalancı gut, enfeksiyöz artrit, schmorl nodülleri, travmatik artrit.
- Eklem tümörleri ve tümör benzeri lezyonları; gangliyon ve sinovya kistleri, tenosinoviyal dev hücreli tümör

Eklem hastalıklarına örnek olarak verilebilir [10, 40, 39].

2.2.4. Travmalar

Kemik ve eklem hastalıklarının diğ er bir boyutu ise travmalarda gözlemlenen deformasyonlar ve kırıklar şeklinde görülmektedir. Kemiklere ve eklemlere uygulanan kuvvetin şiddetinin değişimi ile doku üzerinde hasar meydana gelmektedir ve bu hasar hücresel gelişimde kendisini yeniden düzenleyerek ve bu düzenleme ile tamir sürecinin ba ladığı bilinmektedir [37]. Kemiklerde  l m öncesi gerçekleşen travmalar kişinin yaşamı sürecinde meydana gelen ve iyileşme izlerini gösteren kırıklar şeklinde tanımlanabilmektedir. Bu tür travmalara ante- mortem travmalar olarak isimlendirilir ve iyileşmeye bağlı olarak osteojenik görülen izlere rastlanır [37]. Bu izler iyileşmenin ba ladığı ama tamamlanmadığı kırık yahut kafatası travmalarında da g r lebildiğı gibi ölüm sebeplerini anlamlandırmakta da bizlere ip uçları vermektedir. Travmalar kısaca; kırıklar, kesici -delici alet yaralanmaları, çıkıklar, ateşli silah yaralanmaları, trepanasyon, ampütasyon, dekapitasyon, scalping ve kültürel deformasyonlar olarak sıralanmaktadır.

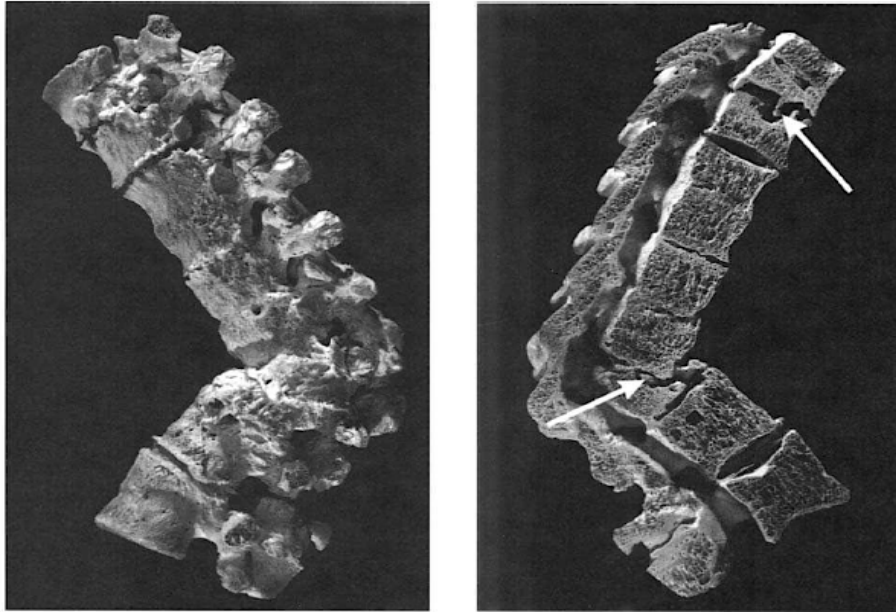
2.2.5. Paleopatolojik Bir  rnek Olarak Tüberküloz

Tüberküloz bir kronik enfeksiyon hastalığıdır. Tüberkülozun insanlık tarihi kadar eski bir geçmişi vardır. Veremin insana ilk bulaşma yolunun sığırları evcille tirmenin sonucunda sığırlarda bulunan *M. bovis* türünün süt tüketimi ile ge tiğı de ileri sürülmektedir. [41]. Santos'a (2015) da sadece süt tüketimi ile değil Neolitik Dönemde sığırlarla aynı ortamı paylaşan insanların, sığır eti ve süt tüketiminin yanı sıra solunan havadan da mikobakterilerin insana geçmiş olabileceğı hipotezini  ne sürüyor [42]. Tüberküloz gibi diğ er enfeksiyonel hastalıklar da kemikte izler bırakabilir. Hatta bu izler farklı hastalıklarda bile benzer tip deformasyonlara sebep olabildiğı gibi aynı izler de bırakabilir.

Etken olan mikroorganizmanın solunması ya da yutulması sonucunda enfekte olan bireyde akciğer tutulumlu ba layan tüberküloz ilerlediğı zaman kemikler üzerinde etkili olmaya ba lar. Tüberküloz osteomyelitinde ilk kavite hızla gelişen ve kortikal dokuyu bozan kazeöz granülomları içerir. Kemikteki tüberküloz başlangıcı hematojen yayılımla olduğu için vertebra tüberkülozu daha yaygındır. Eklem bo luklarından ayırımla gerçekleşir. Uzun kemikler ve omurga (pott hastalığı) en önemli yerleşim yerleridir. Tüberküloz osteomiyeliti omurgada ciddi hasarlara neden olur ve omur diziliminde bozukluklara bağlı olarak deformasyonlara yol açar (kifo  ve skolyoz örnektir). Şekil

1’de gösterildiği gibi toraks 7-8 ve birinci bel omurundaki bozunum 52 yaşında (1948 yılı) bir kadına aittir. Bu olguda vertebraların genel dizilimi bozulmuş ve artrit oluşarak tek bir omurdaki genel yapıda şeklini kaybetmiştir. Osteoartiküler tüberküloz primer olarak enfekte olmuş bir bölgeden hematolojik yayılımla gerçekleştiğinden eklem bölgelerine yerleşim daha fazla görülmektedir. Şekil 2’de olduğu gibi eklem bölgesine tutulum gösteren iskelet tüberkülozu örneği yer almaktadır. Sadece femur başını etkilemekle kalmamış aynı zamanda pelviste asetabulumu da etkilemiştir. Kemik tüberkülozları, kişinin yaşamında çok fazla acı vermesinin ve hareketini engellemesinin yanı sıra arkeolojik buluntular sonunda ele geçen iskeletlerin boyunu belirlemede de (özellikle de fizyolojik boy) problem oluşturmaktadır. Şekil 3’te olduğu gibi, bu problem kemiğin epifiz bölgelerindeki şekil bozulmaları ve diafiz bölgelerindeki eğilmelerden dolayı olduğu için fizyolojik ölçümlerin sonuçlarını doğru elde edemeyiz [41]. Verem dünyada ve birleşik krallıkta 2000’li yılların başında azalsa da o dönemlerde yaşlı kişilerde ve Asya göçmenlerinde görülmekteymiş [43].

Macaristan’da yapılan çalışmada 2. ve 18. yüzyıla ait çok fazla sayıda osteoarkeolojik örnek bulunmuş ve bu örneklerinde büyük çoğunluğunda verem olduğu moleküler testlerle de desteklenmiştir. Arkeolojik buluntularla geçmişte fazla olduğu bilinirken günümüzde nadir olarak rastlanılmaktadır [44]. Günümüzde nadir olarak karşılaşılmmasının sebebi olarak tedavinin çeşitlenmesi ve Sanayi Devrimi dönemindeki kadar kötü yaşam koşullarının olmaması ileri sürülebilir [45].



Şekil 1: 52 yaşında bir kadına ait pott hastalığı [41].



Şekil 2: Bir yetişkine ait femur başı tüberkülozu a) anterior görünüm, b) medial görünüm [41].



Şekil 3: Tüberkülozlu olan kemiklerin boyunda azalma söz konusudur (a, sağda) ve eklem tüberkülozun ileri derece bozunumu (b, solda) [41].

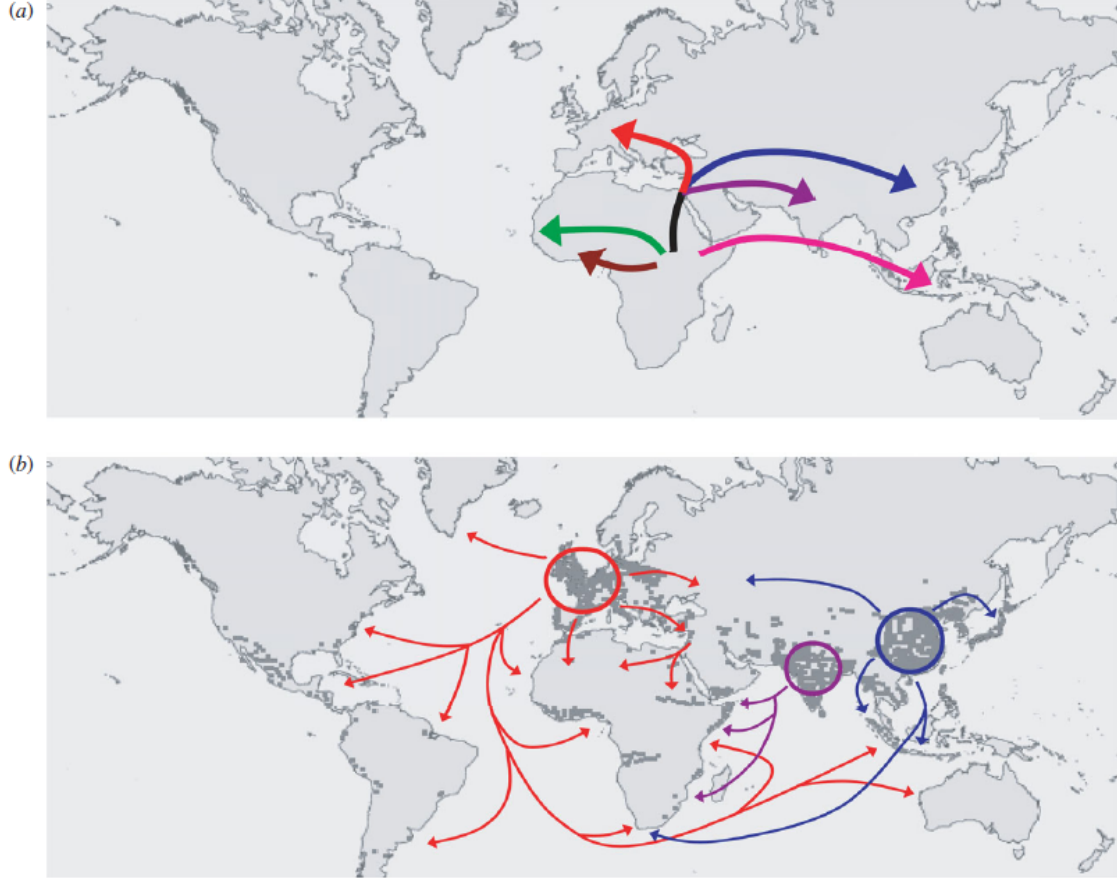
Daha önce de belirtildiği gibi kemiklerdeki bu değişimlere sadece tüberküloz etkeni yol açmaz. Diğer enfeksiyonel hastalıklarda benzer patolojik durumlara sebep olabilir. Bu nedenle patolojik bulgular üzerinde moleküler çalışmalar yapılarak patojenin asıl etkeni

bulunabilir. Colombo ve ark. (2015) yaptığı çalışmada buluntularda tüberkülozdan şüphelenilmiş ve moleküler çalışmalar ile desteklenildiğinde tüm patolojik durumlarda tüberküloz olmadığı anlaşılmıştır [46]. Moleküler çalışmalar sadece kemik üzerine yansıyan hastalıkların kaynağını bulmakla kalmıyor aynı zamanda bakterinin de evrimini çalıştığı için hastalıkların olası tarihlemesini vermektedir.

Tüberküloza dair izler, M.Ö. 4000 ile 2400 yılları arasında Eski Mısır'da Firavunlar dönemine dayanan kanıtlara sahiptir. Thebes bölgesinde bulunan 85 mumyadan ARB, PCR VE IS6110-RFLP yöntemleriyle organik materyallerden ispatlanmış ve spoligotipleme yöntemiyle de suş tespiti yapılmıştır. Köksal'ın yapmış olduğu çalışmada o döneme ait kemiklerde pott hastalığına bağlı kemik lezyonlarının olması üstelik arkeolojik kalıntılarda da hastaları tanımlayan figürlerin olması o dönemde veremin yaygın olduğu hakkında fikir vermiştir. Amerika'da prekolombian dönemde tüberkülozun sıkça görüldüğü Peru'da izotop karbon analizleri yapılmış. Analiz sonucunda 1000 yaşında olduğu düşünülen kadın mumyanın akciğer dokusundaki lezyonda IS6110 ile *M. tuberculosis* varlığı tespit edilmiş. Asya'da yüksek oranda egemen olan *M. tuberculosis* Beijing suşunun 13. yy. 'da Moğol istilasıyla yayıldığı ileri sürülmektedir. Ayrıca Kuzey Amerika'ya mikobakterilerin Bering Boğazı'ndan geçen insanlar ve hayvanlarla taşındığı fikride sunulmaktadır. Asya'daki tüberküloz suşlarının yaklaşık 100 bin yıl önce Afrika'daki 2. göç hareketi ile Asya'ya ulaşıldığı ve bakterinin evriminin de bu şekilde olduğu belirtilmektedir. Şekil 4'de Beijing suşunun populasyon ve coğrafyaya ilişkisi verilmiştir.

Donoghue ve ark. (2004) yaptığı çalışmada yine eski Mısır mumyaları çalışılmış ve mumyaların kaviteli olan akciğer dokularından alınan aDNA izolasyonu ile tüberküloz oldukları ispatlanmıştır [48]. Konakçı ve patojenin birlikte çok uzun zaman birlikte olması tüberküloz ve lepra enfeksiyonlarının ölümcül olmasına neden olmuştur [49]. Paleopatoloji, arkeolojik olgular ve PCR ile belirlenen patojenlerin aDNA'larını tanımayı sağlar. *M. tuberculosis* ve *M. leprae* türlerinin hücre duvarlarının lipid yapıları aDNA'dan daha karalıdır ve geçirgenlikleri kısıtlı olmasından dolayı bu patojenlerin aDNA'larının uzun süreli korunmasını sağlayan bir avantajdır. aDNA uygulamalarında spesifik PCR primerleri kullanılarak kısa fragmentler ve çoklu kopya bölgelerinin seçilmesi mikobakterilerin genetik bilgisinin çıkarılmasını sağlamıştır. Elde edilen bu bilgiler sonucunda lepra ve tüberküloz etkenlerinin birlikte evrildiği ancak tüberkülozun enfeksiyon etkisinin fazla olması nedeniyle leprayı baskıladığı belirtilmiştir. Tüberküloz etkeninin IS6110 bölgesinin baz çiftlerinin sayısı bazıları lepra etkeninin baz çiftlerinden

daha fazladır, bu durumda tüberküloz etkeni için avantaj sağlıyor olabileceği belirtilmese de iki türün birlikte evrimleştiğini söylüyor [48]. Genetik çalışmalar tüberküloz ve lepranın birlikte evrimleştiğini açıklamakla kalmıyor büyük bir tartışma konusu olan veremin sığırdan mı insana insane dan mı sığıra geçtiği bilmecesini çözüyor. Bu konunun açıklığa varılmasında mikobakteri türleri ve özellikle de H37Rv suşunun çok fazla tekrarlayan gen bölgeleri olan, IS6110 ve IS1532 bölgeleri çalışılmıştır [47, 51, 52]. Moleküler çalışmaların sonuçları da gösteriyor ki tuberkül basilleri ve *Mycobacterium tuberculosis* complexi (MTBC)'nin iki farklı gruptan oluştuğu ve MTBC içerisinde hem insane hem de sığır için etken olan mikobakteri türleri yer almaktadır. Ancak flogenetik sınıflamada aynı grupta olmaları ikisininde aynı tarihte evrimleştiği anlamına gelmez. Çalışmaların sonucu iki tür içinde geçerli olan iki mikobakterinin farklı zamanlarda evrimleştiğini ve hatta ilk evrimleşen türün de insan için etken olan *Mycobacterium tuberculosis* olduğu sonucunu vermektedir [49, 51, 52]. Peki bu bakterinin evrimleşmesi insan ile ilişkili midir diye bakıldığında Perrin (2015)'in çalışmasında bu soru evet yanıtını vermektedir. İnsanın evrimleşmesinin 'Out of Africa' hipotezine dayandırılması ve sadece tek bir noktadan çıkışın olmayıp birden fazla bölgeden (Avrupa, Hindistan ve Çin) çıkışın olduğu görüş tüberküloz etkeni içinde söylenmektedir. Şekil 4'te verilen haritada bu iki hipotezde gösterilmiştir ancak kabul edilen görüş birincisidir [53].



Şekil 4: *M. tuberculosis* 'in olası göç yolu verilmiştir [53].

2.3. Paleomikrobiyoloji

Paleomikrobiyoloji, arkeolojik insan kalıntılarındaki mikroorganizmaların tespiti, karakterizasyonu ve teşhisi gibi boyutlarıyla ilgilenen bir bilim dalıdır. Yapılan aDNA çalışmaları ile patojen kemik, diş, mumyalaşmış doku, amfora dipleri ve sediman örneklerinden mikroorganizmalara ait genetik materyallerin korunduğu bilinmektedir [54]. Spigelman ve Lemma'nın 1993 yılında yapmış olduğu çalışmada arkeolojik insan kalıntısından *M. tuberculosis* DNA'sı tespit edilmiştir. Bu çalışma paleopatoloji çalışmalarının başlangıcı niteliğindedir [55]. Paleopatoloji çalışmalarındaki hedefler; antik insan kalıntılardan elde edilen mikrobiyal DNA'nın tespiti ve günümüz patojen etmenleri ile arasındaki genetik ilişkiyi anlamak, mikroorganizmaların evrimsel süreçlerini takip etmek ve insan mikroorganizma arasındaki yaşamsal birlikteliği ortaya çıkarmaktır. Bir diğer önemli hedefler arasında ise geçmiş dönemde yaşayan insanların

maruz kaldığı salgın hastalıkların epidemiyolojik olarak incelenmesi ve günümüz enfeksiyonel hastalıklar ile aralarında bir korelasyon olup olmadığını anlamak ve bunlara önlem ve önleyici tedaviler sunmak yer almaktadır. Arkeolojik insan kalıntılarında rastlanılan patolojik izlere kanıt olarak paleopatoloji çalışmaları sunulmaktadır [54].

Paleomikrobiyoloji çalışmalarında uygulanan teknikler, makroskobik, mikroskobik ve immünoteksiyon gibi tekniklerin yanı sıra PZR gibi moleküler teknikler de yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda moleküler dizileme tekniklerinin artışı ve çeşitliliği ile temel metagenomik yaklaşımlarda kullanılmaya başlanmıştır. Yeni teknikler ile elde edilen moleküler veriler ışığında geçmişten günümüze yer yüzünde bulunan mikropların genomik evrim araştırmaları aydınlatılmaktadır. Benzer biyolojik ortamlarda yaşayan ve eş zamanlı aktif olan mikrobiyal ajanların incelenmesi ile birlikte patojenler arasındaki ilişkiler çözümlenmeye, mikro ekosistemlerini anlamaya ve farklı perspektif yaklaşımlarına metagenomik çalışmaları imkân sunmaktadır [56].

2.4. Metagenomik

Yer yüzünde bulunan mikroorganizmaların her biri kültürlenme için uygun değildir ve bu mikroorganizmaların büyük bir çoğunluğunu da kültürlenmeyen mikroorganizmalar oluşturmaktadır [57]. Kültürlenmeyen mikroorganizmalardaki bu denli çoğunluk, kültürlenme tekniklerinde uygulanan geleneksel yöntemlerin analizler için sınırlı kalmasından kaynaklanmaktadır [58]. Ghazanfar vd., 2010 yılında yaptığı çalışmada mikroorganizmaların büyük çoğunluğunun (%99) kolay bir şekilde kültürlenemediği gösterilmiştir [59]. Kültürlenme üzerinde olan bu başarısızlık ve baskılamının mikroorganizmaların (virüsler, arkeler, bakteriler, tek hücreliler ve mantarların) tespit ve teşhisinin kolaylıkla yapılamamasında rolü bulunmaktadır [60].

Mikroorganizmaların biyolojik ve genetik çeşitliliği çalışma alanı olarak bilimsel araştırmalarda önemli bir yer almaktadır. Kültürü yapılamayan mikroorganizmaların sayıca oranları göz önünde bulundurulduğunda bu mikroorganizmaların genomlarının çok fazla miktarda bilgi içerdiği bilinmektedir [61]. Çoğunluğu temsil eden bu mikroorganizmalar, biyoteknoloji alanında kullanılmak üzere, yeni keşfedilecek olan genlerin, kimyasal bileşiklerin ve enzimlerin geliştirilmesinde büyük bir kaynak sunmaktadır [62]. Mikrobiyal çeşitlilik araştırmalarında, metabolik yolların çeşitli biyolojik ürünlerin ve biyomoleküllerin elde edilmesinde keşfedilen yeni genler, biyolojik ve genetik olarak kapsamlı bir havuz oluşturmaktadır [109]. Son yıllarda

yapılan araştırmalar, mikroorganizmaların genomik analizlerini yapabilmek için "metagenomik" yöntemlerin geliştirildiğini göstermektedir [59].

Metagenomik, mikroorganizmaların genomlarını açığa çıkartmakta kullanılan hem tüm mikroorganizma çeşitliliğini inceleyen hem de yeni keşfedilen enzim ve biyomoleküllere karşı artan ilgi için çalışılan gelişmekte olan yeni bir araştırma alanıdır [62, 61, 63]. İlk metagenomik çalışma 1982 yılında Handelsman ve arkadaşları tarafından Wisconsin Üniversitesi Bitki Patolojisi Bölümü'nde yapılmıştır. Bu çalışmada çevreden toplanan örneklerden elde edilen genomlar incelenmiş ve bir habitata ait tüm genetik bileşenler analiz edilmiştir [64].

Metagenomik alanında çalışan araştırmacılar 5 farklı şekilde tanımlama yapmıştır. Bu tanımlamalar şu şekildedir;

1. Mikrobiyal genomların kültürlemeden bağımsız analiz edilmesidir [65, 66, 67, 68].
2. Bir organizmaya ait tüm DNA analizinin bütün mikroorganizma suşlarında kültürleme olmaksızın uygulanabildiği bir çalışma alanıdır [59].
3. Mikroorganizma suşlarına doğrudan kendi yaşam alanlarında, türlerin ayrı izolasyonlarına ve ayrı laboratuvar ekibine ihtiyaç duymaksızın modern genetik tekniklerin uygulandığı alandır [69].
4. İnsanların ve hayvanların sindirim sistemi, kemikleri, hayvan kalıntıları, toprak ve su gibi çeşitli ortamlarda bulunan mikroorganizmaların genetik çeşitliliğini, işlevlerini, iş birliklerini ve evrimsel süreçlerini anlamak için oluşturulan bir çalışma alanıdır [59].
5. Farklı ekolojik çevrelerden elde edilen mikroorganizmaların karşılaştırmalı biyolojik analizlerine imkân sunan bir çalışma alanıdır [60].

Mikroorganizmaların bu denli çeşitli alanlarda çalışılabilmesi ile etki ettiği çalışma alanlarında da büyük fırsatlar sunmaktadır; tıbbi uygulamalarda, atık politikalarının düzenlenmesinde, endüstriyel alanda hammadde kaynaklarının çözdürülmesinde, kimyasal kullanımın azaltılmasında ve gıda endüstrisinde tüketim hammaddesi olarak katkıları görülebilir [59]. Mikrobiyal fonksiyonların ve yeni biyolojik ürünlerin keşfedilmesinde metagenomik teknikler önemli bir rol oynamaktadır [71]. Habitatlarda yer alan bireylerin genetik çeşitliliği ve gen ürünlerinin araştırılmasında, biyosentetik ve degradatif yolları kodlayan operonları analiz eden bir yaklaşımdır [62].

Metagenomik yaklaşımlar başlangıçta aDNA ve mikroflora çalışmalarını hedeflemişti. Lakin ilerleyen teknoloji ile birlikte bu hedeflerde artışlar söz konusu oldu. Sedimanlarda

yer alan toprak mikroorganizmaları, derin deniz mikroflorası, hayvan ve insanların gastrointestinal (GI) sistemleri gibi birçok çalışma yer almaktadır [70, 71]. Metagenomik çalışmalar genellikle 16S rRNA gen analizine dayanmaktadır. Bu analiz ile elde edilen genomik havuzdaki sınıf, tür, cins, alem düzeyinde geniş bilgiler sunmaktadır. Elde edilen moleküler veriler, suşlar ve işlevsel rolleri hakkında bilgi vermektedir [63]. Toprak ve toprakta gömülü olan arkeolojik insan kalıntıları mikrobiyal içerik olarak daha zengin bir nişe sahiptir. Metagenomik çalışmalarda 16S rRNA bazlı çalışmalar, mikrobiyal profil çeşitlilik çalışmalarında kapsamlı bir içerik oluşturmaktadır. Topraktaki mikrobiyal çeşitlilik kaba hesaplamalar ile bir gramında 3.000-11.000 genom içerdiği ve bu genomlardan %1 kadarının kültürlenme ile elde edilebileceği yapılan çalışmalar ile bilinmekte [72, 73]. Topraktaki mikrobiyal içerikler, farklı çeşitlilikte hücre duvarı özellikleri olan ve lizis olma özelliklerine göre değişkenlik gösteren arke, protista ve bakteri karışımından oluşmaktadır [74]. Mikroorganizmalar türlerine göre tek hücreler yahut koloni halinde bulunabilirler. Ayrıca metabolizmaları ve çevresel diğer mikroorganizmaları ile olan etkileşimleri bulundukları habitatlara bağlıdır ve buna göre değişkenlik göstermektedir. Mikrobiyal büyüme koşulları ve dağılımı düşünüldüğü zaman toprak habitatı çok heterojen bir yapıdadır. Heterojen olan bu yapı, çeşitli sayıda mikrobiyal nişler ve çeşitli toprak mikroorganizmalarına ev sahipliği yapmaktadır [75]. Bu çeşitlilik toprakta fazla olması aDNA çalışmalarında farklı çalışma alanlarının doğmasına avantaj sağladığı kadar analizlerde gürültü oluşturmaya sebep olan bazı dezavantajlar da sunmaktadır. Topraktaki mikroorganizmalara metagenomik tekniklerle yapılan kültür çalışmaları, toprağın antibiyotikler, bağışıklık baskılayıcıları, anti kanser ajanları ve biyoteknolojik ürünler gibi zengin bileşenlerin kaynağı olduğunu göstermiştir [76, 77, 78, 79, 80].

Ghazanfar ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada toprak örneklerinden DNA izolasyonu, hazırlanan klon kütüphanelerinin ve kütüphanelerin taranıp analiz edilmesi ile uygulanan metagenomik metodların araştırmalarda mikrobiyal çeşitliliği daha doğru saptamayı ortaya sunmuştur [59].

Çevresel mikrobiyal örneklerin çalışmaları fonksiyonel ve dizi temelli analizler olmak üzere iki farklı şekilde çalışılır. Fonksiyonel temelli analizlerde, topraktan elde edilen DNA bir vektör aracılığı ile konak bakteriye aktarılarak; heterolog gen ekspresyonları tarafından üretilen yeni enzim ve/veya bileşikler çalışılırken; nükleotit dizi temelli analizlerde, DNA veri tabanları hedef çalışmadır, ayrıca DNA dizileri karşılaştırılarak mikroorganizmaların metabolik potansiyelleri hakkında fikir edinilir [62]. Bu çalışmanın

da dayandırıldığı dizi temelli analiz, örneklemedeki mikrobiyal çeşitliliği ve bu mikrobiyal çeşitlilikteki olası fonksiyonel ilişkilendirmeler çalışılmaktadır.

2.4.1. Metagenomik Alanında Yapılan Çalışmalar

Metagenomik alanında yapılan çalışmalar çok farklı çalışma alanlarında rol almıştır. Bu çalışma alanları; biyolojik çeşitlilik, evrimsel süreç, antik DNA, yeni türleri bulma ve patojen etmeni olan mikroorganizmaları bulma şeklindedir.

Poinar ve arkadaşlarının (2006) Sibiry'a da yapmış olduğu bir çalışmada, *Mammuthus primigenius* örneğinin DNA'sını (~28 milyon bp) metagenomik yaklaşımlarla dizilemişlerdir. Örneğin korunmuş bir halde bulunması ve emülsiyon PZR kullanılması ile örneğin %45,4 oranında (~13 milyon bp) mamut DNA'sı içerdiği bulunmuştur (81). Dizilenen veriler ile Afrika fili DNA dizisi karşılaştırılmış ve iki tür arasındaki biyolojik yakınlığın %98,55 oranında olduğu yapılan çalışma ile tespit edilmiştir [81].

Bir başka çalışmada ise kültürlenmemiş ve topraktan doğrudan alınan *Crenarchaeote* genomu metagenomik yaklaşımlarla analiz edilmiş. Çalışmanın sonucunda rRNA genlerinin sıralanmasıyla DNA'nın karakterize edildiği ve 17 protein kodlayan genin izole edildiği belirlenmiştir [82].

Bermuda yakınlarındaki Sargasso Denizi'nden toplanan deniz suyu örneklerinden teğetsel akış ve darbe filtreleri üzerinde toplu olarak toplanan mikrobiyal popülasyonlara tüm genom shotgun dizileme yapılan çalışmada 1 milyardan fazla mikrobiyal baz çifti dizilenmiştir. Bu verilerin, daha önce bilinmeyen 148 bakteriyel filotip de dahil olmak üzere, dizi ilişkisine dayalı en az 1800 genomik türden türediği tahmin edilmektedir [83]. Antik DNA çalışmalarında metagenomiğin kullanılması ile başarılı çalışmalar elde edilmiştir. Buna örnek olarak 120 milyon yıllık amber içerisinde korunmuş halde bulunan *Micrococcus luteus*'un aDNA dizisinin başarılı bir şekilde dizilenmesi verilebilir [84].

Bir başka çarpıcı antik DNA ve metagenomik ortak çalışması ise Maixner ve arkadaşlarının 2016 yılında, en yaygın insan patojeni olan mide bakterisi *Helicobacter pylori*'nin insan konakçısı üzerinde olan çalışmasıdır. Bu çalışmada Avrupa Bakır Çağı buzul mumyasından (Iceman) elde edilen 5300 yıllık bir *Helicobacter pylori* genomu, insan konakçısıyla birlikte küresel olarak dağılmış ve hem yakın hem de eski insan göçlerini yeniden yapılandırmak için kullanılabilecek farklı bir filocoğrafik modelle sonuçlanmıştır [85].

Hırvatistan'da bulunan Vindija mağarasından Neandertal metagenomik kütüphanesi çalışılmak üzere örnek toplanmıştır. DNA izolasyonu yapılan 38.000 yıllık bu örnekten yeni nesil dizileme (NGS) metodu kullanılarak 65250 bç Neandertral'e ait genom verisi elde edilmiştir. Elde edilen bu veriler ile yapılan analizler sonucunda iki farklı tür olan Neandertal ve modern insan genomunun en az %99,5 oranında benzerlik gösterdiği genetik yakınlık olarak kanıtlanmıştır [86].

Warinner ve arkadaşlarının çalışmasında, diş taşına ilk kez uygulanan shotgun dizileme metodu ile yapılan çalışmada 16S rRNA genleri dizilenmiş. Bu dizileme sonucunda toplam 2699 operasyonel taksonomik birim (OTU) çıkartılmıştır. Warinner'in çalışmasında antik örneklerdeki ağız mikrobiyotasının protein işlevsel karakterizasyonu ve taksonomisi sunulmuştur. Üstelik, 40 patojen, 43, insan proteini ve 239 bakteriyel protein tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak da arkeolojik insanlara ait olduğu tahmin edilen antibiyotiğe direnç gösteren genlerin ilk kez kanıtı ileri sürülmüştür ve periodontal patojen olan *Tannerella forsythia* türüne ait genom tespit edilmiştir [87].

Genetik dizilemelerin metagenomik analizlerde kullanılması, filogenetik ağaçların çizilmesi ve insan genomunun burada hangi dalda yer aldığına anlaşılmaması evrim sürecini kavramak açısından büyük yankı oluşturmıştır. Sanger dizilemenin 1977 yılında, PZR'nin 1983 yılında gelişim göstermesi ile insan ve büyük insansı maymunların biyolojik uzaklıklarının/yakınlıklarının anlaşılması konusunda yardımcı olmuş ve insan grupları arasında 'ırk' kavramının yanlış bir terim olarak kullanıldığına da açıklık getirmiştir [88, 89].

Yeni nesil dizileme metodunun 1990'ların sonunda gelişmesi ve insan genomunun tamamının ilk kez dizilenmiş olması ile birlikte ardından 2000'li yıllarda gelişim gösteren dizileme teknolojinin yaygınlaşmasıyla antik insanların (Neandertaller de dahil) Denizovanların, genomunun, *Homo heidelbergensis* türünün MtDNA genomunun dizilenmesini ve homo türlerine ait filogenetik ağacın yeniden çizilmesi sağlanmıştır [90, 91, 92, 93, 94]. Bu tür çalışmalar insan evriminin yeniden anlaşılması ve yeni kaynaklara ulaşılmasına yol açmıştır.

Mikrobiyal ekolojinin arkeolojik çalışmalarda yararlı olduğu kabul edilmiştir. Batı Sicilya'daki Arkaik Monte Iato'da yerli bir yapı keşfedilmiştir. Bu yapıya ilişkin toprak mikrobiyal topluluklarının ilk kez incelenmiş ve toprak örnekleri, ana odadaki bir ritüel deposundaki (yiyecek atıklarının atıldığı yer) ve ek binadaki şöminenin üzerindeki arkeolojik katmanlardan toplanmıştır. Mikrobiyal toprak karakterizasyonu bolluk (hücrel fosfolipid yağ asitleri (PLFA), canlı bakteri sayıları), aktivite (fizyolojik

profiller, canlı bakterilerin enzim aktiviteleri), çeşitlilik ve topluluk yapısını (bakteriyel ve fungal Illumina ampikon dizilimi, canlı bakterilerin tanımlanması) içermektedir. PLFA türevi mikrobiyal bolluk, şömineden alınan topraklarda depodan alınan topraklara göre daha düşüktü; kültürlenebilir bakterilerde ise tam tersi bir durum gözlenmiştir. Şömineden gelen topraklardaki mikrobiyal topluluklar karboksilik ve asetik asitleri metabolize etme konusunda daha yüksek bir yeteneğe sahipken, depozitten gelen topraklar tercihen karbonhidratları metabolize etmiştir. Alt tortu katmanı, üst tortu katmanına kıyasla daha yüksek toplam mikrobiyal ve bakteriyel bolluk ve bakteriyel zenginlik ve farklı bir karbonhidrat metabolizasyonu profili ile karakterize edilmiştir. Bu çalışmanın verileri, insan tüketim alışkanlıklarının arkeolojik kanıtlardaki mikrobiyota üzerinde izler bıraktığı kanıtlamıştır [95].

2.4.2. 16S rRNA Geni

Metagenomik analiz çalışmalarında yaygın hedef bölge olarak 16S rRNA geni seçilmiştir. Bu genin metagenomik çalışmalarda seçilme nedenleri;

- Fonksiyonel olarak korunmuş olması,
- Bütün bakterilerde bulunması,
- Çok değişken bölgeler içermesi,
- Yaklaşık olarak 1550 bp gibi uygun bir büyüklükte olması,
- Uygun polimeraz zincir reaksiyon primerlerinin oluşturulabilmesi,
- Değişkenliği yüksek olan bu bölgelerin organizmaların tür analizlerinde kullanılabilir olması,
- Gene ait veri tabanlarının bulunması

Şeklinde sıralanabilir [60, 96].

16S rRNA prokaryotik organizmaları (bakteri ve arkea) gibi küçük ribozomal alt birimlerinin bir parçası olan bir ribozomal RNA türüdür 16S rRNA gene bakteri ve arkea hücrelerinde evrimsel olarak oldukça korunmuş bölgeler içerir ve bu nedenle türler arasında genetik farklılıkları belirlemek için kullanışlıdır. Bu genellikle taksonomik sınıflandırma ve mikrobiyal çeşitliliği araştırmak için kullanılan bir moleküler markerdir. 16S rRNA gen dizisinde, gene yayılım gösteren 9 adet korunmuş (C1-C9), 9 adet de çok değişken bölge (V1-V9) vardır [97]. Çok değişken bölgeler yüksek oranda değişkenlik gösterdiğinden dolayı biyolojik sınıflandırma yapılan analizlerde önemli bir yere sahiptir.

Bakteri filogenetik analizlerde V4-V6 bölgeleri tüm gen dizisi içerisinde en sağlıklı sonucu veren bölgeler olduğundan çalışmalarda çok tercih edilmektedir. Daha az değişkenlik gösteren bölgeler ise V2-V8 bölgeleridir. V3-V4 bölgeleri, 16S rRNA dizisinin belirli bir bölgesidir ve mikrobiyal taksonomide önemli bir rol oynar. V3-V4 bölgeleri, 16S rRNA dizisindeki çeşitliliği belirlemek için yaygın olarak hedeflenen bölgelerdir çünkü bu bölgeler, mikrobiyal türler arasındaki genetik farklılıkları açıkça ayırt edebilen ve sınıflandırmak için yeterince değişken bölgelerdir [60, 96].

V3-V4 bölgelerinin önemi;

- Yüksek değişkenlik; bu bölgeler 16S rRNA dizisindeki değişkenlik açısından oldukça zengindir, bu da farklı mikrobiyal türler arasında ayrım yapmayı olası kılar.
- Taksonomik çözünürlük; bu bölgeler mikrobiyal türlerin genetik farklılıklarını belirlemek için yeterli çözünürlüğe sahiptir. Bu nedenle, mikrobiyal çeşitliliği araştırmak için genellikle tercih edilen hedef bölgelerdir.
- Ampirik olarak belirlenmiştir; bu bölgeler 16S rRNA dizisinin belirli bölgelerini hedeflemek için genellikle kullanılan standart primerlerle belirlenmiştir, bu durum da çalışmalar arasında tutarlılık sağlar.

16S rRNA dizisi üzerindeki çok değişken bölgelerin başlangıç ve bitiş nükleotitleri; V1 değişken bölgesi, 69-99 bp; V2 değişken bölgesi 137-242 bp; V3 değişken bölgesi 433-497 bp; V4 değişken bölgesi 576-682 bp; V5 değişken bölgesi 822-879 bp; V6 değişken bölgesi 986-1043 bp; V7 değişken bölgesi 1117-1173 bp; V8 değişken bölgesi 1243-1294 bp; V9 değişken bölgesi 1435-1465 bp şeklindedir [98].

16S rRNA gen dizisinin her birçok değişken bölgelerinden V4 bölgesi 690 firkete yapısındadır; bu bölgede yer alan 3 filogenetik alan içerisinde korunmuşluğu en yüksek alan olarak kalan bir halkadır. Bu korunmuşluk da metagenomik analizlerde kullanılmaya elverişli hale getirmektedir [99].

16S rRNA genindeki yüksek değişkenlik sahip (V1-V9) bölgeler, metagenomik analizlerin PZR aşamasında kullanılacak olan hedef bölgelerdir. Yapılan birçok çalışmada çoğaltılan bölgelerin dizilemesi yeni nesil dizileme teknolojisi olan Illumina sistemleri seçilerek kullanılmaktadır. Illumina dizileme sistemleri ile, örneklerdeki mikrobiyal profil çeşitliliğini tespit edebilmek için 16S rRNA geninin yüksek verimli dizileri elde edilmektedir [100]. Yeni nesil dizileme sistemlerinin seçilme sebepleri, daha düşük maliyet ile kısa sürelerde, çok daha büyük dizi verileri elde edilmesidir. Illumina

platformu MiSeq teknolojisi kullanılarak yapılan dizilemelerde ~25 milyon kadar okuma sayısına ulaşılmaktadır. Metagenomik araştırmalarda Illumina dizileme sisteminin tercih edilmesindeki diğer bir etken ise geniş kapsamlı olduğu kadar yüksek verimli, sistematik hataların ise yüksek oranda az olduğu veriler sunmasıdır [101].

2.4.3. Operasyonel Taksonomik Birim (OTU)

Metagenomik analizler sonucunda elde edilen veriler biyoinformatik analizlere tabi tutulmaktadır. En yaygın kullanılan analiz platformu ise QIIME'dir (Quantitative Insights Into Microbial Ecology-Mikrobiyal Ekolojide Kantitatif Analizler). Bu program mikrobiyal popülasyonlarının analizini yapan bir yazılımdır. Arkeolojik insan kalıntıları, bakteri, virüs ve mantar örneklerinden elde edilen nükleik asit dizileri analiz edilir ve yorumlanır. Linux sisteminde terminal penceresine yazılan yönerge komutlar ile görsel ve metinsel çıktılar sunmakta ve bu çıktılar farklı komutlar ve araçlar ile görselleştirilebilmektedir [102]. En çok tercih edilen program olması, altın standartlar üzerine kurulu olarak bahsedilmesindendir [101].

OTU'lar, genetik olarak benzer organizmaları gruplamak için kullanılan bir araçtır. Genellikle belirli bir genin DNA dizisi (örneğin, 16S ribozomal RNA geni bakterilerde sıkça kullanılır) üzerinde yapılan bir dizi analizinden elde edilirler. Bu analizler genellikle metagenomik veya metabarşot teknikleri kullanılarak gerçekleştirilir. Analiz sonucunda, genetik olarak benzer olan organizmalar aynı OTU'ya atanır. OTU'lar, genellikle %97 veya %99 benzerlik eşiği gibi belirlenmiş bir benzerlik eşiğini aşan organizmaları içerir. Yani, eğer iki organizma arasındaki genetik benzerlik %97'nin üzerindeyse, genellikle aynı OTU'ya atanırlar [103, 104].

OTU'lar, çevresel örneklerdeki mikroorganizma çeşitliliğini anlamak ve karşılaştırmak için yaygın olarak kullanılır. Örneğin, bir toprak örneğinden alınan DNA dizileri analiz edilerek, topraktaki mikrobiyal çeşitliliği anlamak için OTU'lar kullanılabilir. Bu, ekosistemlerin yapısını ve işleyişini anlamak için önemli bir araçtır [103, 104].

2.5. Kibyra Antik Kenti

Kibyra antik şehri, Gölhisar ilçesinin batısında yükselen bir tepe üzerinde bulunmaktadır. Kentin doğusunda Gölhisar düzlüğü, batısında ise Ak Dağ kümesi ve şehre su sağlayan akarsular bulunmaktadır (Şekil 5). Gölhisar ilçesi, Akdeniz, Sahil-İç Ege ve İç Anadolu

demir işçiliğinde ünlü olmasına rağmen, dört farklı dilin konuşulduğu biliniyor: Lidce, Pisidce, Solymce ve Hellence. Kibyalılar'ın Lidyalılar'ın soyundan geldiği ve bu dört dilde iletişim kurduğu belirtiliyor. Kibyra, Kabalia ve çevresindeki Pisidia'yı fethettikten sonra şehri güçlü bir şekilde tahkim etti ve yaklaşık yüz stadia çevresine genişletti. Bu sağlam şehir, etkili yasalarıyla desteklenmiş ve komşu bölgelere doğru genişlemiştir. Ayrıca şehrin etrafında Bubon, Balboursa ve Oenoanda gibi üç şehir daha kurulmuştur. Bu şehirlerin bir araya gelmesiyle oluşan konfederasyona "Tetropolis" adı verilmiştir [37].

Bergama İmparatorluğu'nun parçalanması sonrasında, Kibyra'nın liderliğinde Boubon, Balboursa ve Oenoanda şehirleri bir araya gelerek dörtlü bir şehir ittifakı oluşturdu. Üç şehir birer oy hakkına sahipken, Kibyra'nın ayrıcalıklı olarak "otuz bin piyade ve iki bin süvari ile" diğerlerinden farklı olarak iki oy hakkı bulunmaktaydı. Strabon'un aktardığına göre, bu başkent Moagetes dönemine kadar sürekli tiranlar tarafından yönetildiği bilinmektedir [37].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez çalışmasında Kibyra Antik kentinden arkeolojik kazılarla elde edilen 9 iskelet üzerinde antik DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu örneklerin seçilme sebebi nekropol alanından uzakta ve kilise etrafında yer alan toplu gömüler olmasından kaynaklanmaktadır. Bu gömülerdeki bir diğer önemli nokta ise gömülerde çocuk, kadın ve erkek bireylerin olması ve bu bireyler üzerinde kireç dökülmesi bireylerin bir enfeksiyonel hastalık sebebi ile öldüğünü düşündürmektedir.

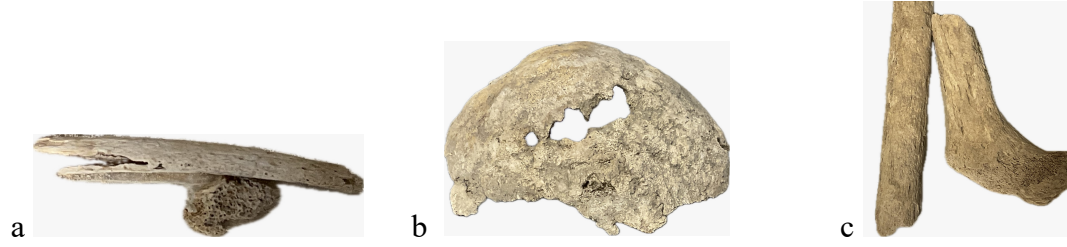
Çalışmanın hedefinde gömü alanında döneme ait ölü gömme geleneğinin görülmemesi ve kilise etrafına ilk kez çocuk bireylerin gömülmesi ile bulaşıcı hastalıklara maruz kalan bireyler olduğu yönünde düşündürmüş ve çalışmaya örneklem olarak alınmıştır. İlk ön çalışmada bu alandan elde edilen KBR'20 M45 numaralı mezardan elde edilen toprak örneği çalışılmıştır. Bu toprak örneğinden 16S rRNA gen bölgesine V3-V4 bölgelerine bakılarak toprak içerisindeki metagenomik profil çıkartılması hedeflenmiştir. Ön çalışma sonrasında 9 kemik ve diş örnekleminde elde edilen DNA izolatları ile 16S rRNA geninden V3-V4 bölgeleri çalışılmıştır. Bu örneklem grupları seçilirken patoloji izleri olan yahut patoloji izleri olmayanlarda deformasyonun olduğu bölgeler DNA izolasyonu için tercih edilmiştir. Burada amaç patojen izlerinin kanıtlarını bulmak ve deformasyona sebep olan etmenleri tespit etmek yönündedir.

Çalışmanın akışında seçilen örnekleri aDNA yöntemlerine uygun olarak; dekontaminasyonu, uygun miktarda kesimi, DNA izolasyonu ve spektrofotometrik ölçümleri şeklinde devam etmiştir. Ardından DNA konsantrasyonu uygun olan örnekler kütüophane hazırlığına alınmış ve PZR uygulamaları yapılarak Illumina platformunda sekanslanmıştır. Bu süreci biyoinformatik analizler takip etmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.1. Antik Örneklerin Toplanması

Örnekler Kibyra Antik arkeolojik kazılar ile 2020 yılı ve 2014 yıllarında çıkartılmıştır. 2020 yılına ait 6 örnek, 2014 yılına ait 3 örnek moleküler biyoloji laboratuvarına getirilmiştir. Bu örneklerle ek olarak KBR'20 M45 (SY_6) numaralı örneğe ait mezar toprağı da örnekleme dahil edilmiştir. Getirilen bu örnekler ışık almayan ortamda saklanmıştır. Örnekler moleküler çalışmaların yürütülmediği izole bir ortamda

fotoğraflanmıştır. Fotoğraflamanın ardından bu örneklerin patoloji izlerini taşıyan ve deformasyon bölgeleri tespit edilmiş, dekontaminasyona hazır hale getirilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan örnekler aşağıdaki şekil 6’da yer almaktadır.



Şekil 6: Kullanılan örnekler, a:costa, b: kafatası, c: femur

3.2. Örneklerin Dekontaminasyonu ve Kesimi

Örneklerin dekontaminasyonu moleküler çalışmaların yapılmadığı kapalı bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Örneklerin kesim alanları öncelikle %5 lik çamaşır suyu ve distile su ile peçete yardımıyla temizlenmiş ve hızlıca kurutulmaya bırakılmıştır. Hızlıca kurutulmanın ardından örneklerin belirlenen kısımlarından Dremel 3000 ile kesitleri alınmıştır. Kesitlerin alınacağı Dremal uçları da önce %20 çamaşır suyu ardından da distile su ile dekontamine edilip, 1 saat UV (260 nm) altında sterilize edilmiştir. Alınan bu kesitler kollajen içeriğinin yoğun olduğu ve aynı zamanda patoloji şüphesi ve deformasyonların olduğu bölgeler olarak tercih edilmiştir. Ardından örneklerin kesilen kısımları 30 dk UV (260 nm) altında işleme tabi tutulmuş ve izolasyona hazır hale getirilmiştir. Bu süreçte kullanılan tüm eldiven ve dremel uçları her bir örnek için ayrı ayrı kullanılmış ve örnekler arası geçişte yüzey ve Dremel çamaşır suyu ve distile su ile temizlenmiştir.

3.3. Antik DNA İzolasyonu

Örnekleri daha önceki laboratuvar tecrübeme ve sonuçlarına dayanarak kesimden hemen sonra bir bütün halde izolasyona tabi tutmaya karar kıldım. Bu nedenle örneklere tozlaştırma tekniğini uygulamadım. Kullanılan kemik miktarım ~80-90 mg dır.

İzolasyonu Quick-gDNATM Miniprep kit (Zymo Reserch) ile uyguladım. Kitin birden fazla alanda kullanıma uygunluğu vardı, bu çalışma içinde katı doku çalışmalarına uygun olan protokolünü izledim. Bu protokolden farklı olarak kullanılan başlangıç örnek miktarını kestiğim kemik miktarları kadar kullandım.

Uygulanan kitin deney yönergesi;

- ~80-90 mg kemik ve/veya diş örneği üzerine 500 µl genomik lizis solüsyonu %0,5 (v/v) 2-merkaptotanol (Bio-Rad) ile eklendi.
- Örnekler 20 sn vortekslendi.
- Örnekler oda sıcaklığında bir gece bekletildi.
- Örnekler 20 sn vortekslendi. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Ardından 10000g'de mikrosantrifüjde santrifüj edildi ve üstte kalan süpernatant kemik ve diş partiküllerine dokunulmadan toplama tüplerindeki Zymo-Spin kolonlarına aktarıldı.
- Örnekler 10000g'de santrifüj edildi ve yeni toplama tüplerine kolonlar transfer edildi.
- Spin kolonlar üzerine 200 µl DNA ön yıkama solüsyonu eklenerek 10000g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Spin kolon üzerine 500 µl g-DNA yıkama solüsyonu eklendi ve tekrar 10000 g'de 1 dk. Santrifüj edildi.
- Spin kolonlar eppendorf tüplere transfer edildi ve kolon üzerine gelecek şekilde 35 µl DNA elüsyon solüsyonu eklendi. 5 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
- Örnekler 10000 g'de 1 dk santrifüj edildi ve yeniden kolon üzerine gelecek şekilde 35 µl DNA elüsyon solüsyonu eklendi. 5 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
- İnkübasyonu tamamlanan örnekler 16.160 g'de 30 sn santrifüj edildi.
- Eppendorf tüpleri içerisindeki spin kolonlar çıkartılarak elde edilen aDNA izolatu -20°C' de saklandı.

3.4. Örneklerin Spektrometrik Ölçümü

İzolasyonu gerçekleştirilen örneklerin Q5000 UV-Vis Spectrophotometer (Quawell) Cihazı ile örneklerden 1 µl kullanılarak DNA konsantrasyonları ölçüldü. Ölçüm değerleri sonuçlar kısmında tablo 2'de yer almaktadır.

3.5. Antik DNA Kütüphane Oluşturma

Örneklerin kütüphane işlemleri ve sonrasındaki basamakları hizmet alımı karşılığında BM firması tarafından sunulan rapordaki protokollere göre uygulanmıştır. Uygulanan protokoller sırası ile aşağıda yer almaktadır.

3.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Mikroorganizmaların tür tespitinde en çok tercih edilen değişken bölge 16S rRNA genine ait V3-V4 segmentleridir. V3 ve V4 segmentlerinin artırılması amacıyla kullanılacak ileri ve geri primer dizileri aşağıda listelenmiştir. Primer ikilisi yaklaşık 460 baz çiftlik bir bölgeyi artırır. Yeni nesil dizileme okuması öncesinde, amplikon kütüphanesi hazırlığı esnasında PCR ile örnekteki 16S V3 ve V4 segmentleri artırılır. Gen spesifik 16S V3-V4 bölgesi için kullanılan primerler;

16S Amplicon PCR İleri Primer = 5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S Amplicon PCR Geri Primer = 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTA
ATCC

PZR koşulları ve kullanılacak kimyasallar aşağıdaki gibidir.

Mix	Hacim
aDNA (5 ng/μl)	2.5 μl
F Primer 1 mikro Molar	5 μl
R Primer 1 mikro Molar	5 μl
2X KAPA HotStart PCR Mix	12.5 μl
TOPLAM	25 μl

PZR koşulları:

1) 95 ° C > 3 dk

2) tekrarlı 25 döngü

95 ° C > 30 sn

55 ° C > 30 sn

72 ° C > 30 sn

3) 72 ° C > 5 dk

4) 4 ° C'de örnekler saklanır

3.5.2. PZR Ürünü Temizliği

AMPure XP (Beckman Coulter) manyetik beadler kullanılarak, PZR’de oluşan primer dimerler ve açıkta kalan serbest primerler uzaklaştırılır. Bu süreç iki basamakta gerçekleşmektedir;

- Örneklerin her birine 20 µl AMPure XP manyetik bead eklenir ve manyetik bead örnek karışımı pipetlenir. Manyetik rack içerisine yerleştirilen tüplerde manyetik beadler üzerine bağlanan PZR ürünleri tüp yüzeyine tutunur.
- Basamaklar arasındaki geçişlerde kontaminasyonu önlemek amacıyla yıkamalar yapılır. Bu yıkamalar 200 µl %80’lik etanol yapılır. Tüp içerisindeki manyetik bead ve örnek karışımı 2 kez yıkanır. Yıkamadan sonraki saf PZR ürünü, 50 µl 10 Mm pH 8.5 Tris solüsyonu içerisinde saklanır.

3.5.3. İndeks PZR

PZR ürünlerine, yeni nesil dizileme teknolojilerinin okunması aşamasında her bir örneğin farklı şekilde okunup ayırt edilebilmesi için örnekler özgün indeksler kullanılır. Her bir örneğe özgü olan bu indeksler ve PZR ürünlerinin yeni nesil dizileme platformlarına özgü olan oligo bağlanma bölgelerine bağlanmayı sağlayan Illumina platformuna özgü adaptör diziler eklenir.

İndekleme işlemlerinde Nextera XT indeks kiti kullanılır. Her bir örnek için başa ve sona olacak şekilde 2 indeks çifti kullanılır. Bu ekleme işlemi de aşağıda yer alan PZR koşullarında yapılmaktadır.

Mix	Hacim
DNA	5 µl
Nextera XT İndeks Primeri 1(N7xx)	5 µl
Nextera XT İndeks Primeri 2 (S5xx)	5 µl
2X KAPA HotStart PCR Mix	25 µl
Su	10 µl
TOPLAM	50 µl

- 1) 95 ° C’de 3 dakika
- 2) 8 tekrar döngüsü
95 ° C >30 sn
55 ° C >30 sn
72 ° C > 30 sn
- 3) 72 ° C >5 dk
- 4) 4 ° C’de örnekler saklanır

3.5.4. İkinci Aşama PZR Ürün Temizliği

Birinci temizleme basamağında olduğu gibi AMPure XP (Beckman Coulter) manyetik beadler kullanılarak, PZR’de oluşan primer dimerler ve açıkta kalan serbest primerler uzaklaştırılır. İki basamaklı gerçekleştirilen bu işlem;

- a) Örneklerin her birine 56 µl AMPure XP manyetik bead eklenir ve manyetik bead örnek karışımı pipetlenir. Manyetik rack içerisine yerleştirilen tüplerde manyetik beadler üzerine bağlanan PZR ürünleri tüp yüzeyine tutunur.
- b) Basamaklar arasındaki geçişlerde kontaminasyonu önlemek amacıyla yıkamalar yapılır. Bu yıkamalar 200 µl %80’lik etanol yapılır. Tüp içerisindeki manyetik bead ve örnek karışımı 2 kez yıkanır. Yıkamadan sonraki saf PZR ürünü, 25 µl 10 Mm pH 8.5 Tris solüsyonu içerisinde saklanır.

3.6. Antik DNA Sekanslama

Novaseq dizileme platformunda, birleştirilen kütüphaneler akış kuyucuklarına (flow cell) eklenmiştir. Akış kuyucukları içerisinde yüzeyde bağlı olan oligolar, kütüphane içerisindeki adaptör dizilerine karşılık gelen tamamlayıcı diziler içerir ve

Her DNA parçası, köprü amplifikasyonu ile ayrı kümelerde çoğaltılır ve klonlanır. Bu işlem tamamlandığında, DNA kalıbı dizilemeye hazır hale gelir.

Illumina'nın "Sequencing by Synthesis" teknolojisi kullanılarak, her baz dizilme sırasında DNA kalıbına eklenir ve aynı anda tespit edilir. Özel tersinir terminatör bağlı dNTP'ler kullanılarak, hata oranı düşürülür ve yüksek doğruluk elde edilir.

Diğer dizileme tekniklerinde olduğu gibi, homopolimer DNA dizileri gibi tekrar eden bölgeler, yanlış okumalara neden olabilir. Ancak Sequencing by Synthesis teknolojisi ve özel dNTP'ler ile bu bölgelerin okunması sorunsuz hale gelir.

Illumina Novaseq cihazı, okuma görüntülerini Novaseq Control Software programıyla işler ve Real Time Analysis v1.18 programı kullanılarak bazları belirler. Baz okumaları, bcl2fastq (v1.8.4) programı kullanılarak FASTQ formatına dönüştürülür. Bu formatta olan dosyalar “awk 'NR%4==1 {print ">\$0} NR%4==2 {print \$0}' SY_1_16S_1.fq > SY_1_16S_1.fasta” kodu kullanılarak fasta formatına dönüştürüldü.

Spesifik olmayan adaptör dizilerini çıkarmak için Scythe (v0.994 BETA) ve Sickle programları kullanılır. Ayrıca, 36 bazdan daha kısa okuma sonuçları, temiz veri analizi için filtrelendirir.

Örneklerin taksonomik olarak sınıflandırılması, referans dizilere hizalanması, operasyonel taksonomik birimlerin tespiti ve türlerin benzerliklerine göre gruplandırılması gibi işlemler biyoinformatik analizle gerçekleştirilir.

Fasta formatındaki dosyalar teker teker NCBI blast arayüzünde incelendi ve örneklerin hangi türler ile eşleşme gösterdikleri ve bu eşleşmelerin oranları belirlendi.

Bunun yanı sıra örneklerin fasta formatları SilvaNGS programında çalışılarak dizilerin genomik içerikleri profilendirildi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Spektrometrik Ölçüm Sonuçları

DNA izolasyonu yapılan 7 örneğin spektrofotometrik ölçümleri yapılmış ve elde edilen kopnsantrasyon ve saflık değerleri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Örneklerin spektrofotometrik ölçümleri.

Örnek türü	Örnek	DNA konsantrasyonu(ng/μl)	260/280
Kemik (femur)	KBR’20 M46 (SY_1)	3.80 ng/μl	2.30
Kemik (costa)	KBR’20 M43 (SY_4)	15.12 ng/μl	1.71
Diş (molar)	KBR’20 M45 (SY_6)	10.49 ng/μl	1.38
Kemik (kafatası)	KBR’14 3 nolu basit oygu mezar (SY_7)	75.22 ng/μl	1.37
Kemik (fibula)	KBR’14 kasa 8 (SY_8)	81.47 ng/μl	1.39
Kemik	KBR’14 KM-64 (SY_9)	37.19 ng/μl	1.63
Toprak	KBR’20 M45 (SY_6)	10.59 ng/μl	2.40

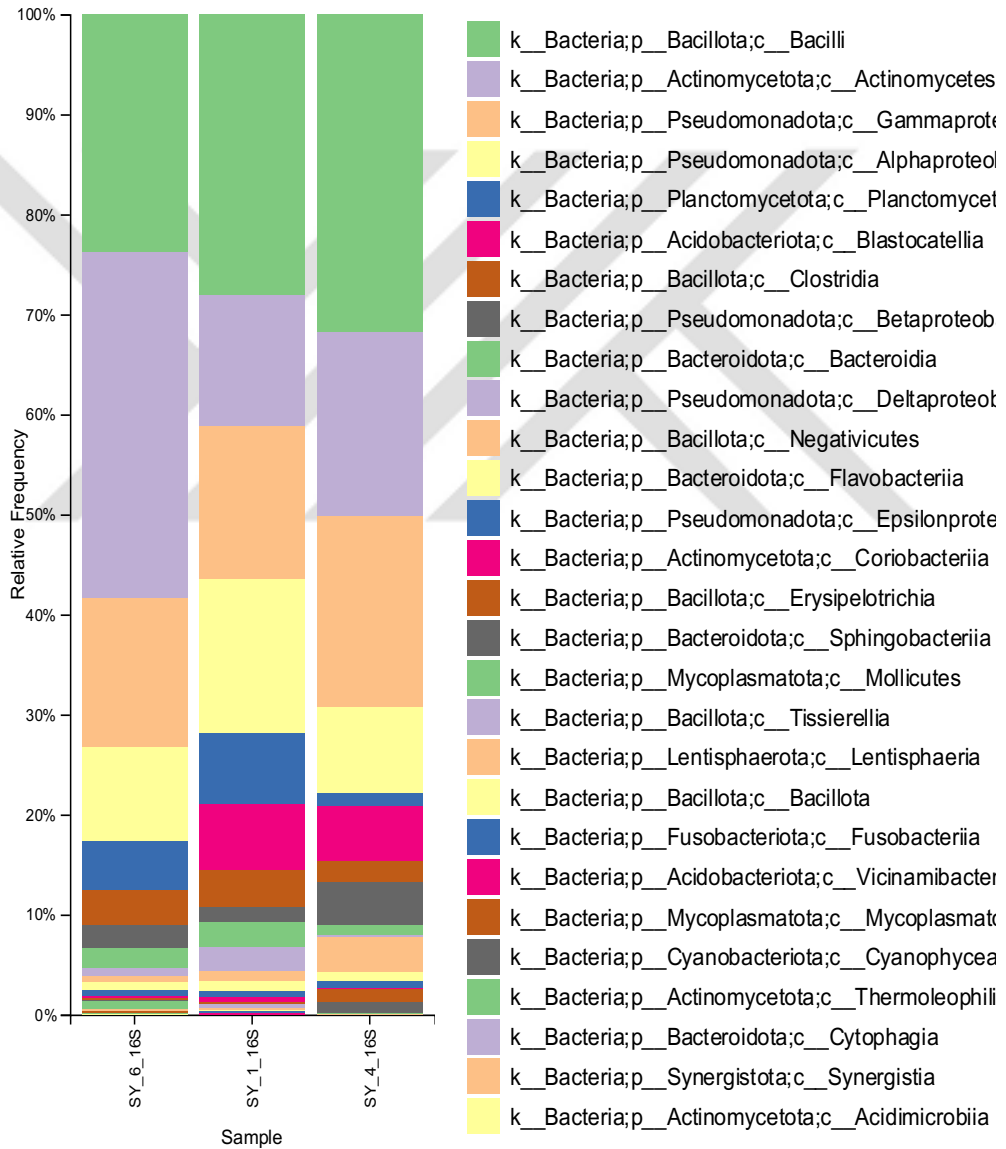
DNA izolasyonu yapılan 7 örneğin konsantrasyon ve saflık değerlendirmeleri sonucunda V3-V4 gen bölgelerinin çoğaltılabilmesi için PZR uygulanmıştır. Ardından örneklerden uygun olanlar dizilemeye tabii tutulmuştur. Dizileme de yeni nesil dizileme tekniği olan İllumina platformu kullanılmıştır.

Dizileme sonucunda elde edilen veriler “cat SY_1_16S_2.fasta | grep “^>” | wc -l” kodu ile okuma sayılarına bakılmıştır ve SY_1 örneği 677969, SY_4 örneği 291016, SY_6 diş örneği 258547 ve SY6_toprak örneği için de 54253 okuma olduğu belirlenmiştir.

4.2. Antik DNA Dizileme Sonuçları / 16S rRNA Dizileme Sonuçları

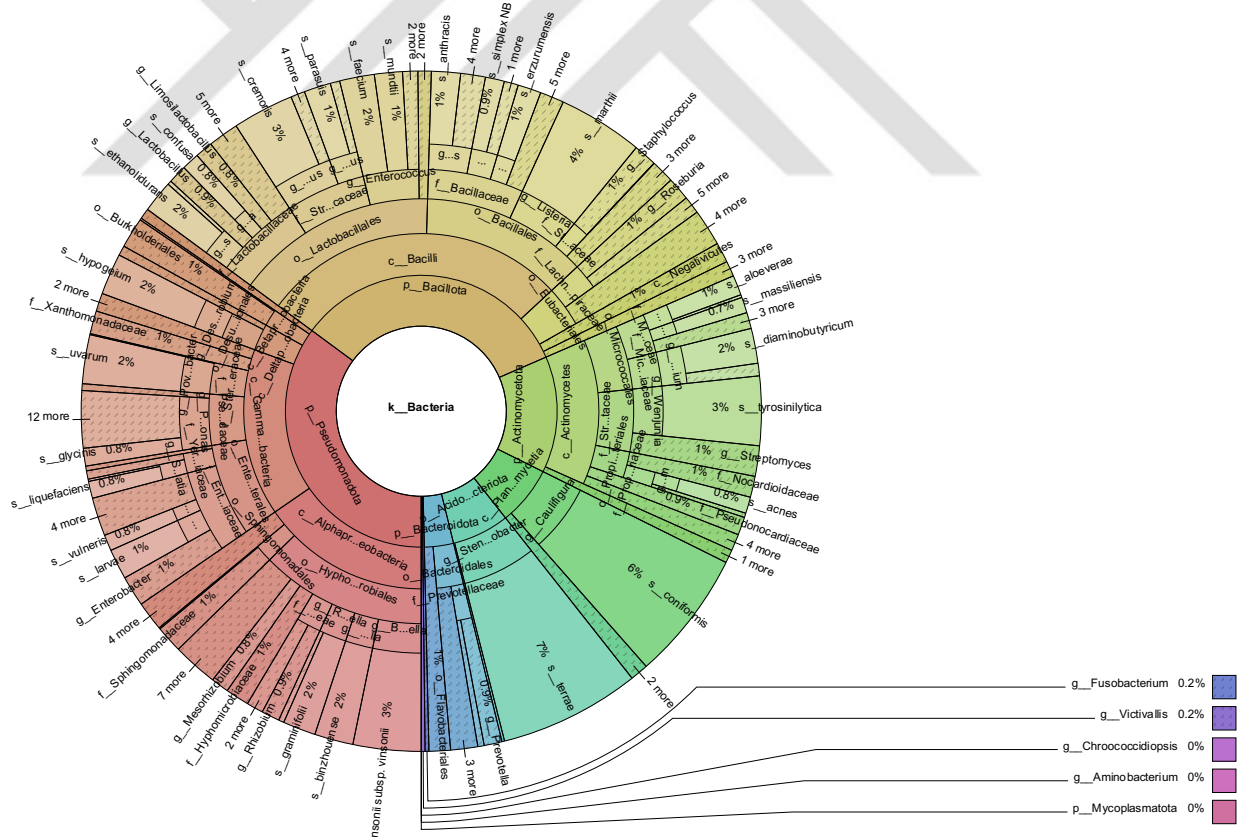
Dizileme sonuçlarından sonra elde edilen ham veriler ön işlem ve filtreleme basamaklarının ardından taksonomik tanımlama ile çeşitlilik analizlerine tabi tutulmuştur. Aşağıda çeşitlilik içeriği, Alfa çeşitlilik analizi, PcoA (beta çeşitlilik analizi) ve filogenetik ağaç sonuçları yer almaktadır.

Sekanslama sonucunda örneklerden elde edilen çeşitlilik içeriği; Şekil 7’de de görüldüğü üzere SY_6 numaralı örnekte çeşitlilik içeriği SY_1 ve SY_4 numaralı örneklerdeki çeşitlilik içeriklerine nazaran daha farklı görünmektedir. Bunun bir etmeni olarak örneklem tipinin diş ve kemik -kemik olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer yandan ise örneklem gruplarındaki çeşitlilik dağılımlarına bakıldığında örneklerin benzer toprak bakterilerini farklı oranlarda içerdiği görülmektedir. Bu farklılıkların okuma sayılarından da kaynaklanabileceğini göz önünde bulundurmamız gerekmektedir.

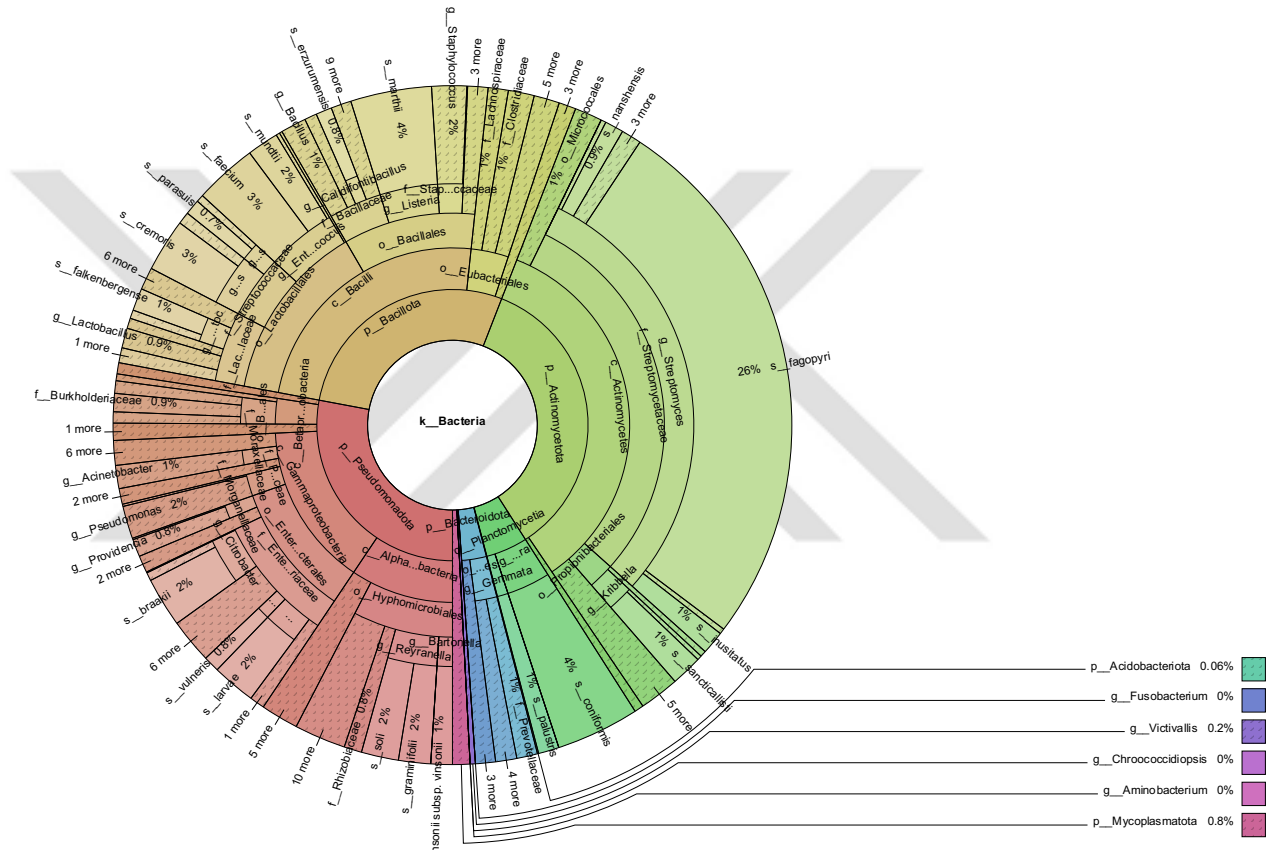


Şekil 7: Kemik ve diş örneklerinin mikroorganizma profili/çeşitliliği.

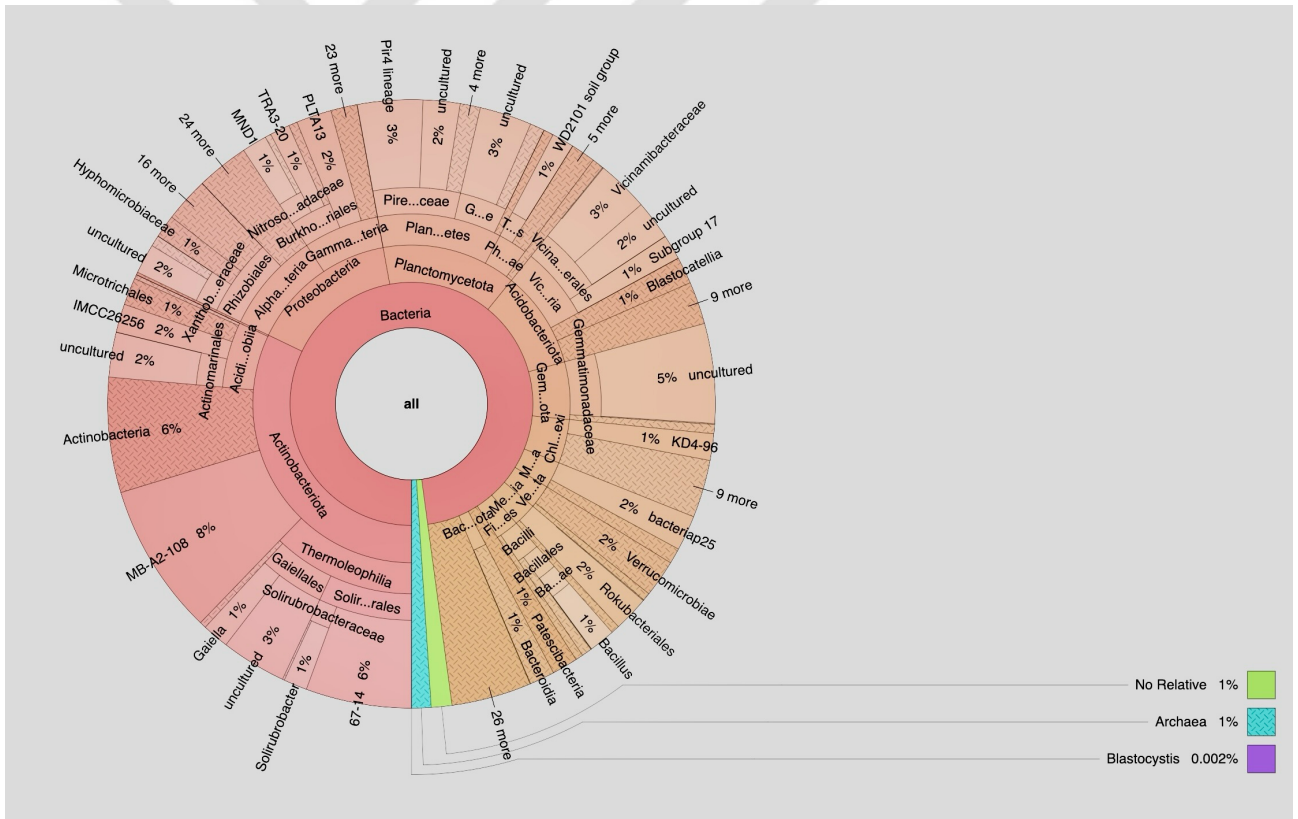
Örneklere ait krona grafikleri aşağıda yer almaktadır (Şekil 8-9-10-11). Her bir örnek için çeşitlilik dağılım grafiklerine baktığımızda örneklerin birbirinden farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu sonuçlardan da anlaşılabileceği üzere mezar konumlarının birbirine yakın olmasına rağmen örneklerin mikroorganizma çeşitliliğinde farklılıkların görüldüğü ve bunun örneklem tipi, mezar tipi gibi faktörlerin de etkisi olabileceği düşünülmektedir. Bir diğer önemli nokta ise SY_6 numaralı örneğe ait dış ve toprak örneklerindeki krona grafiklerinin içerik bakımından farklılık göstermesidir. Burada SY_6_dış örneğinde Bacillota, Actinomycetota, Bacterioidota ve Pseudomonadota ile çeşitlilikler temel içerik iken; SY_6_toprak örneğinde bu çeşitliliklerin temeli Plantctomycetota, Proteobacteria ve Actinobacteriota'dır. SY_1, SY_4 ve SY_6_dış örneklerinde krona grafikleri değerlendirildiğinde Bacillota, Actinomycetota ve Bacterioidota temelli oldukları görülmektedir.



Şekil 8: SY_1 numaralı örneğe ait krona grafiği



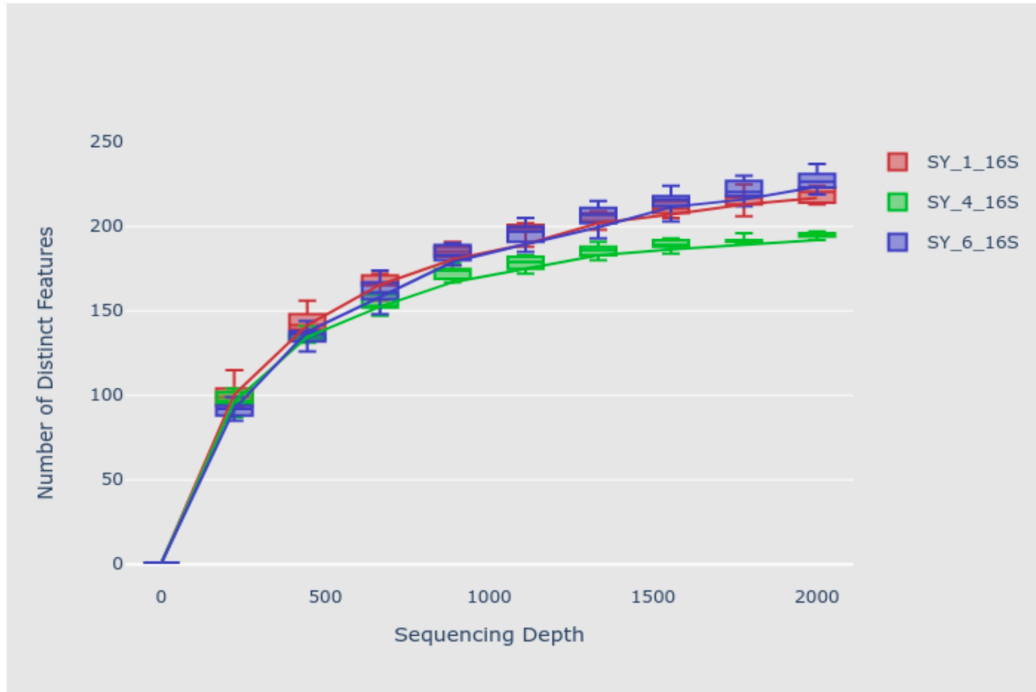
Şekil 10: SY_6_ diş numaralı örneğe ait krona grafiği



Şekil 11: SY_6_toprak numaralı örneğe ait krona grafiği

Alfa çeşitlilik, tek bir habitat veya örneklemdaki mikrobiyal çeşitliliğin ölçüsünü ifade etmektedir. Bu ifade ile, bir mikrobiyal topluluğun içindeki farklı türlerin sayısını ve bireysel türlerin baskınlığı gibi etmenleri içermektedir. Alfa çeşitlilik, topluluk içindeki türlerin sayıca çokluğu ve dengenin bir kombinasyonunu matematiksel olarak ifade etmektedir. Yüksek alfa çeşitliliği, örnek içerisindeki mikrobiyal tür çeşitliliğinin çok olduğunu gösterirken, düşük alfa çeşitliliği bu çeşitliliğin az olduğunu yahut bazı türlerin diğer türlere göre daha baskın olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada örneklerin alfa çeşitlilik analizleri Simpson matematiksel modele göre yapılmıştır [106].

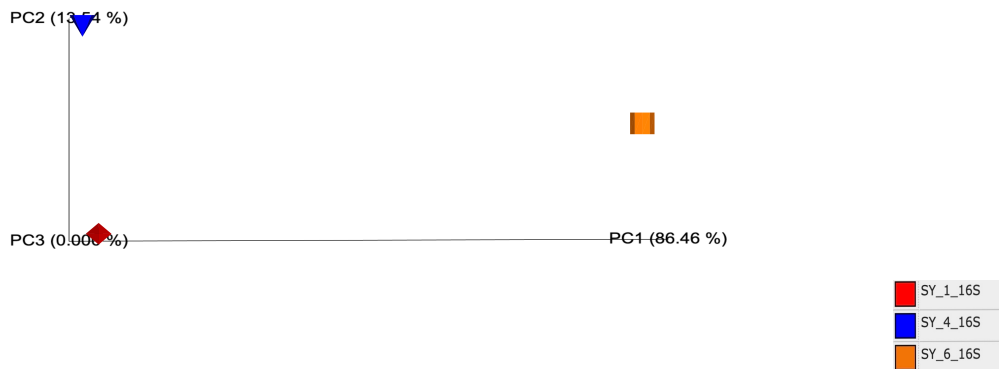
Örneklerin alfa çeşitlilik analizlerine baktığımız zaman bar plotta görülen örüntüye benzer bir sonuçla karşılaşmaktayız. Burada da SY_6 numaralı örneğin SY_1 ve SY_4 numaralı örneklerden daha farklı olduğu ve çeşitlilik içeriğinin daha yüksek olduğunu görmekteyiz. Bunu takip eden SY_1 numaralı örneğin de SY_6 numaralı örneğe yakın ancak görece ona göre daha az çeşitlilik içerdiğini ve SY_4 numaralı örneğe göre de daha yüksek oranda çeşitlilik içerdiği görülmektedir. Burada örnekleme bağlı olarak bir çeşitlilik söz konusu olabileceği düşünülse de örnekler arasında literatüre baktığımızda bu sonucu destekleyen çalışmalar görememekteyiz [107, 108].



Şekil 12: Kemik ve diş örneklerinin alfa çeşitlilikleri

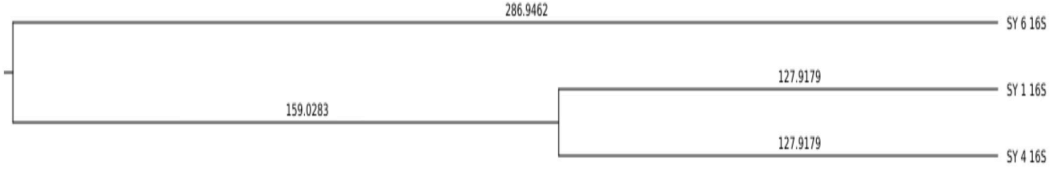
Beta çeşitlilik ise, farklı habitatlar veya örneklem noktaları arasındaki mikrobiyal toplulukların farklılıklarını ölçer. Bu ölçüm ise, bir habitatın içindeki mikrobiyal çeşitliliğin dağılımındaki değişiklikleri ve farklı habitatlar arasındaki benzersizlikleri temel bileşenler analizi üzerinde (PcoA) düzlemsel olarak yansıtmaktadır. Bu analiz, tür kompozisyonu ve yapısal farklılıkların değerlendirilmesini içermektedir. Yüksek beta çeşitliliği, farklı habitatlar arasında belirgin farklılıkların olduğunu ve her bir habitatın kendine özgün bir mikrobiyal topluluk barındırdığını ifade ederken, düşük beta çeşitliliği, habitatlar arasında daha az fark olduğunu ve mikrobiyal içeriğin birbirine benzer olduğunu ifade etmektedir [106].

Aşağıda yer alan temel bileşenler analizine baktığımızda ise beta çeşitliliğinin SY_6 numaralı örnekte çok daha yüksek olduğu ve düzlemde en sağda konumlandığını görmekteyiz. Bu sonuç ile de SY_6 numaralı örneğin hem mikrobiyal çeşitlilik hem de alfa çeşitliliğine baktığımızda aynı sonuçları içerdiğini görmekteyiz. Diğer iki örneğe baktığımızda ise SY_1 numaralı örneğin alfa çeşitlilikteki sonucu gibi yüksek mikrobiyal çeşitliliğe sahip olduğunu görebilmekteyiz. Temel bileşenler analizindeki SY_1 numaralı örneğin SY_4 numaralı örneğe göre daha dikey ve yukarıda konumlanması da bize SY_4 numaralı örnekten daha yüksek mikrobiyal çeşitliliğe sahip olduğunu gösterirken, PcoA da solda konumlanması da SY_6 numaralı örneğe göre daha az mikrobiyal çeşitliliğe sahip olduğunu göstermektedir. Bu da analizler arasındaki matematiksel hesaplamalardan bağımsız olarak sonuçların aynı olduğunu göstermektedir.



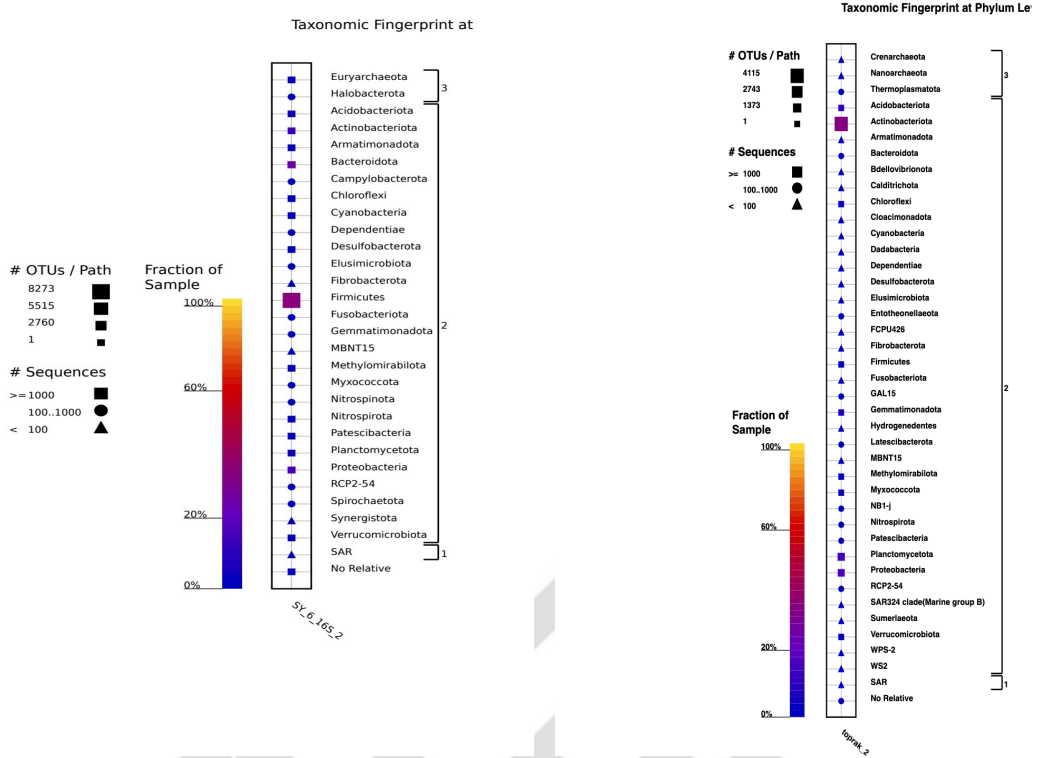
Şekil 13: Kemik ve diş örneklerinin beta çeşitliliği

Analizlerin çeşitliliğini artıran bir diğer yaklaşım ise filogenetik ağaçtır. Burada 3 örnek arasında çizilen filogenetik ağaç da alfa ve beta çeşitlilik analizleri gibi SY_6_dış numaralı örneği daha dış grup ve SY_1 ve SY_4 numaralı örnekleri ise birbirine yakın iç grup olarak göstermektedir. Aşağıda yer alan filogenetik ağaç şemasından da gördüğümüz üzere örneklemlerdeki farklılığın kemik örneklerine oranla dış örneklerinde daha kapsayıcı mikrobiyal çeşitlilik olduğunu görmekteyiz.



Şekil 14: Kemik ve dış örneklerinin filogenetik ağacı

Aynı mezardan ve gömüden ele geçirilen SY_6_dış ve bu bireye ait kafatası içerisinde elde edilen toprak örneğinde (SY_6_torak) mikrobiyal çeşitlilik analizi yapılmış ve bu analiz ile aynı mezar içerisinde görece dış etmenlere daha kapalı olan kafatası içerisindeki toprak ve bireye ait olan molar dışın mikrobiyal içerik dağılımına Silva NGS ile bakılmıştır. Bu analiz sonucunda dış örneğine ait 8273 OTU okuması, toprak örneğinde ise 4115 OTU okuması bulunmuştur. Bu OTU okumaları üzerinde taksonomik olarak inceleme yapıldığında ise birbirinden farklılık gösterdiği şekil 15'te gösterilmiştir. Dış örneğinde baskın olan *Firmicutes* iken, Toprak örneğinde baskın olan *Actinobacteriota* olduğu bulunmuştur. Bu bakteriler arasındaki ilişkiye bakıldığında ise *Actinobacteriota* ve *Firmicutes*, insan bağırsak mikrobiyomunda yaygın olarak bulunur. Özellikle *Firmicutes*'in, obezite ile ilişkili olduğu, *Actinobacteriota*'nın ise sağlıklı bir bağırsak mikrobiyomu için önemli olduğu bilinmektedir.

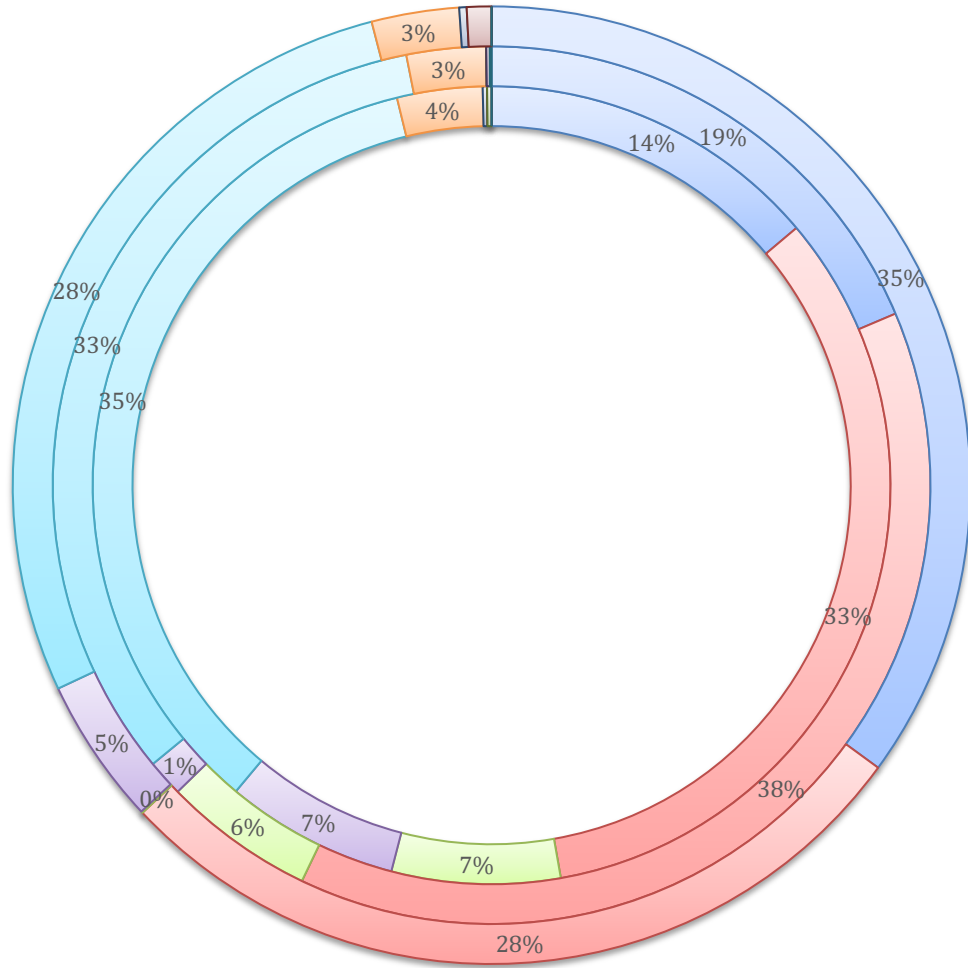


Şekil 15: SY_6 numaralı diş ve toprak örneğine ait mikroorganizma çeşitliliği

Diğer yandan kemik ve diş örneklerinin şube düzeyindeki çeşitliliğine baktığımızda ise Şekil 16’da da görüldüğü üzere, içeriden dışarıya SY_1, SY_4 ve SY_6 şeklinde sıralanan örneklerin diğer çeşitlilik analizlerinde olduğu gibi SY_1 ve SY_4 arasındaki benzerliğin SY_6 ile olan benzerlikten daha fazla olduğu görülmektedir.

Bu taksonomik değerlendirmeyi sınıf düzeyinde yaptığımızda da Şekil 17’de de görüldüğü üzere, içeriden dışarıya SY_1, SY_4 ve SY_6 şeklinde sıralanan örneklerin diğer çeşitlilik analizlerinde olduğu gibi SY_1 ve SY_4 arasındaki benzerliğin SY_6 ile olan benzerlikten daha fazla olduğu görülmektedir.

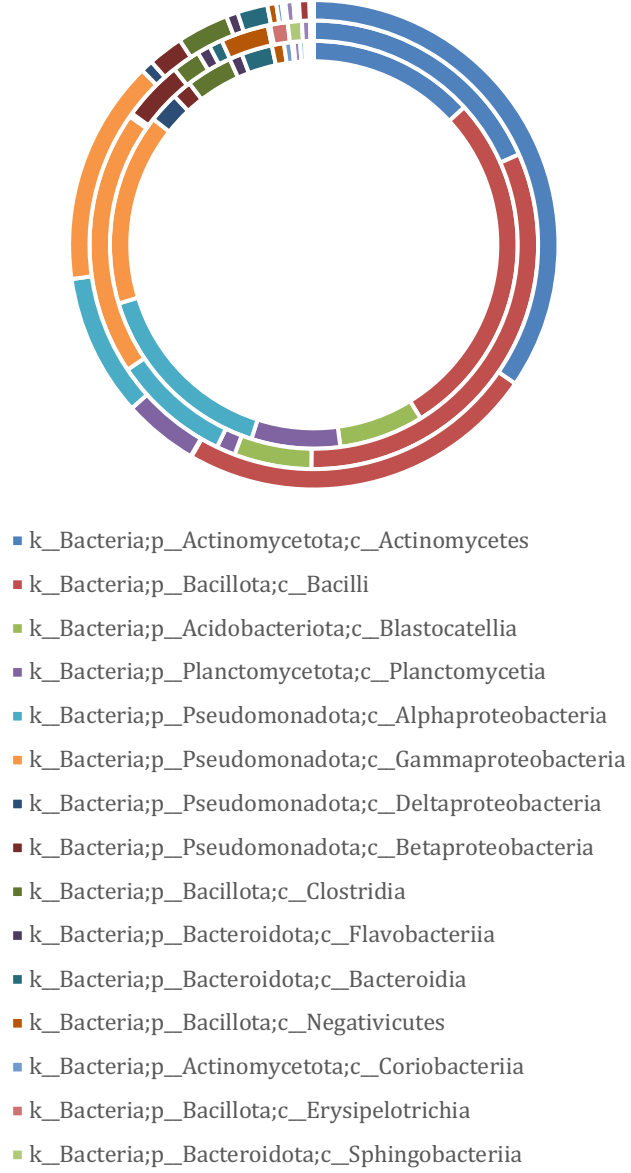
kemik ve diş örneklerinin şube çeşitliliği



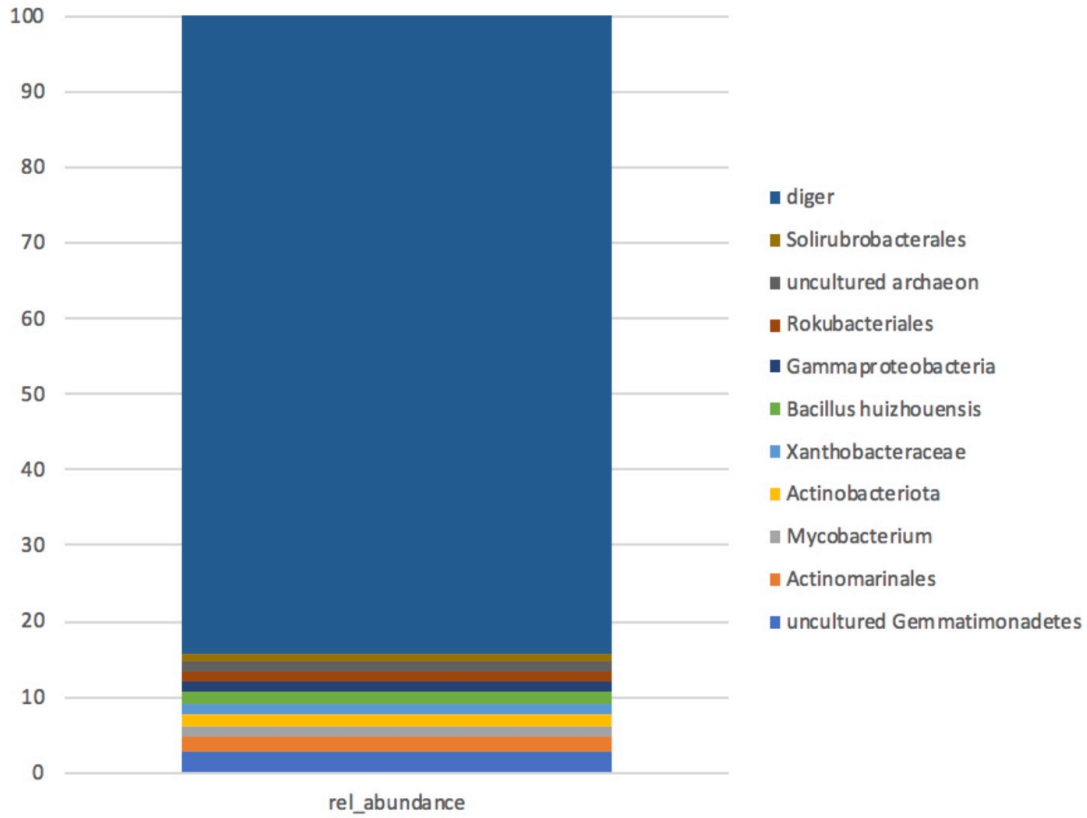
- k_Bacteria;p_Actinomycetota
- k_Bacteria;p_Bacillota
- k_Bacteria;p_Acidobacteriota
- k_Bacteria;p_Planctomycetota
- k_Bacteria;p_Pseudomonadota
- k_Bacteria;p_Bacteroidota
- k_Bacteria;p_Lentisphaerota
- k_Bacteria;p_Mycoplasmata
- k_Bacteria;p_Fusobacteriota
- k_Bacteria;p_Cyanobacteriota
- k_Bacteria;p_Synergistota

Şekil 16: Kemik ve diş örneklerinin şube çeşitliliği

kemik ve diş örneklerinin sınıf çeşitliliği



şekil 17: Kemik ve diş örneklerinin sınıf çeşitliliği



Şekil 18: Toprak örneğinin şube çeşitliliği

Şekil 18’de toprak örneğine ait taksonomik çeşitlilik görülmektedir. Burada kültürlenmeyen türlerin yanı sıra *Actinomarinales*, *Mycobacterium*, *Actinobacteriota*, *Xanthobacteraceae*, *Bacillus huizhouensis*, *Gammaproteobacteria*, *Rokubacterales* ve *Solirubrobacterales* görülmektedir. *Actinomarinales*, *Actinobacteriota* filumuna ait bir bakteriyel sıradır. Bu grup, deniz ortamlarında yaygın olarak bulunur ve deniz ekosistemlerinde önemli rol oynar. Genellikle organik maddeyi parçalayarak besin döngüsüne katkıda bulunurlar. *Mycobacterium*, *Actinobacteriota* filumuna ait bir cinstir. Bu cins, birçok önemli patojen içerir. Veba ve cüzzam etkeni olan cinstir, ancak analizlerde tür düzeyinde rastlanmamıştır. Bu bakteriler, yüksek lipid içeriği nedeniyle asidorezistan özellik gösterirler ve yavaş büyürler. *Actinobacteriota* (eski adıyla *Actinobacteria*), yüksek G+C içeriğine sahip Gram-pozitif bakterileri içeren geniş bir filumdur. Toprak, su ve insan mikrobiyomunda yaygın olarak bulunurlar. *Xanthobacteraceae*, Alphaproteobacteria sınıfına ait bir bakteri ailesidir. Genellikle azot fikse eden ve çeşitli çevresel nişlerde bulunan bakterileri içerir. Çoğu türü serbest yaşayan azot fikse edicilerdir ve organik maddeleri parçalama yeteneğine sahiptirler. *Bacillus huizhouensis*, *Bacillaceae* ailesine ait bir *Bacillus* türüdür. Gram-pozitif, spor oluşturan

ve genellikle toprakta bulunan bir bakteridir. Tür hakkında spesifik bilgi sınırlıdır, ancak genel *Bacillus* özelliklerini taşır: Spor oluşturma yeteneği ve çeşitli organik maddeleri metabolize edebilme. *Gammaproteobacteria*, *Proteobacteria* filumunun bir sınıfıdır. Bu sınıf, birçok önemli patojen ve çevresel bakteriyi içerir. Önemli cinsleri; *Escherichia*, *E. coli* gibi önemli türler içerir. *Pseudomonas*, çeşitli çevresel nişlerde bulunur ve bazı türleri patojendir. *Rokubacteriales*, yeni tanımlanmış ve az bilinen bir bakteri grubudur. Çoğunlukla toprak ve su gibi çevresel örneklerde bulunurlar. Henüz tam olarak karakterize edilmemiştir, ancak çevresel DNA analizleriyle varlıkları saptanmıştır. *Solirubrobacterales*, *Actinobacteriota* filumuna ait bir bakteriyel sıradır. Genellikle toprak bakterileridir ve organik maddeyi ayrıştırarak besin döngüsüne katkıda bulunurlar. Gram-pozitif ve yüksek G+C içeriğine sahip bakterilerden oluşur.

Tez kapsamında kullanılan örnekler Burdur ili Kibyra Antik Kenti yerleşiminde bulunan KBR'20 M46 (SY_1), KBR'20 M43 (SY_4), KBR'20 M45 (SY_6), KBR'14 3 nolu basit oygu mezar (SY_7), KBR'14 kasa 8 (SY_8) ve KBR'14 KM-64 (SY_9) mezarlarındaki iskelet ve KBR'20 M45 (SY_6) toprak örneği antik DNA çalışmaları için seçilmiş ve laboratuvarımıza gönderilmiştir. Bu örneklem gruplarının seçilmesi kemiklerdeki deformasyon izleri ve bu mezarların nekropol geleneğinden farklı bir alanda gömülmesinden kaynaklıdır.

Bu tez çalışmasında 9 örneğin DNA izolasyonu gerçekleştirildi ve spektrofotometrik ölçüm değerlerinde DNA konsantrasyonları belirlendi. Bu ölçümlerin ortalama değeri ise yaklaşık 33 ng/ul şeklindedir. Kullanılan Quick-gDNATM Miniprep kit (Zymo Reserch) ile yapılan izolasyonlarda yaklaşık 50 ng/ul olması beklenen DNA içeriğinin bu çalışmada daha düşük değerde olması, örneklerin Tunç Dönemine tarihlendirilmesi ve aynı zamanda örneklerin kireç ile kaplanmasından kaynaklı olarak DNA konsantrasyonunun bu denli düşük olmasını düşündürmektedir.

Toplamda 9 örnekten 4 örnek DNA dizilemesi için seçilmiştir. Bunlardan 3 tanesi diş ve kemik örneği olurken bir tanesi de diş örneğinin bulunduğu mezardaki bireyin kafatası içindeki toprak olarak seçilmiştir. Kemiklerin seçilmesinde morfolojik deformasyonlar öncelik göstermektedir. Bunun yanı sıra aynı mezar içinden iki örneklem grubunun (diş ve toprak) seçilme sebebi ise karşılaştırmaların yapılabilirliği açısından ve ön sonuçlar sunmasından kaynaklanmaktadır.

Bu tez çalışmasında Illumina Novaseq platformu kullanılarak örneklerin .fq.gz uzantılı verileri elde edilmiş ve bu veriler “awk 'NR%4==1 {print ">"\$0} NR%4==2 {print \$0}' SY_1_16S_1.fq > SY_1_16S_1.fasta” kodu kullanılarak fasta formatındaki ham datalar elde edilmiştir. bu elde edilen datalar SilvaNGS programı ve QIIME 1.9.1 versiyonu kullanılarak analiz edilmiştir. Metagenomik analiz sonucunda 4 örnekten 2 alem, 11 şube, 28 sınıf, 68 takım, 142 familya, 286 cins ve 499 tür tespit edilmiştir. taksonomik analiz sonucunda elde edilen mikroorganizmaların şube ve sınıfları bu tez kapsamında değerlendirildi (Şekil 16-17). Bal’ın (2019) tez çalışmasında Illumina MiSeq sistemi kullanılarak elde edilen dizileme verilerinin metagenomik analizlerini QIIME ile 8 örnek içerisinde toplam 2 alem, 37 şube, 112 sınıf, 211 takım, 336 familya, 468 cins ve 505 tür tespit edilmiş. Bir diğer çalışmada 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 familya ve 767 cins tespit edilmiş.

Tez kapsamında elde edilen taksonomik analiz sonuçlarına göre dizilenen 4 örnekte görülen en yüksek mikroorganizma yoğunluğu kemik, diş ve toprakta farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar sınıflandıkları taksonomiye göre değişkenlik göstermektedir. Diş ve toprak örneğinde Actinomycetota şubesine ait olan taksonomik içerik diğer kemiklere oranla yüksek çıkmıştır. Burada iki örneğin aynı mezar içerisinde olması bu benzerliğin bir kanıtı olmakla birlikte daha detaylı taksonomik gruba bakıldığında ise diş örneğinde firmicutes oranının yüksek, toprak örneğinde ise Actinobacteriota oranının yüksek olduğu Şekil 15’te görülmektedir. Actinomycetota, yüksek G+C içeriğine sahip Gram-pozitif bakterilerden oluşur. Toprak ve su ortamlarında yaygın olarak bulunurlar ve organik maddelerin ayrışmasında önemli rol oynarlar. Bu da karbon ve diğer elementlerin döngüsünde kritik bir rol oynamalarını sağlar. Önemli türleri ve cinsleri: Streptomyces: Bu cins, antibiyotik üretimi ile ünlüdür. Streptomyces türleri, birçok önemli antibiyotiğin (örneğin, streptomisin, tetrasiklin) doğal üreticileridir. Mycobacterium: Bu cins, tüberküloz (Mycobacterium tuberculosis) ve cüzzam (Mycobacterium leprae) gibi ciddi hastalıklara neden olan patojenleri içerir. Corynebacterium: Bu cins, difteri (Corynebacterium diphtheriae) gibi hastalıkların etkenidir. Nocardia: Toprakta bulunan ve bazen insanlarda enfeksiyonlara neden olabilen türleri içerir. Tarım ve orman ekosisteminde önemli bir yere sahip olması ve diğer bakterilerden evrimsel olarak daha erken ayrılması gibi nedenler bu bakteri

grubunun filogenetik olarak yakın olan bakterilerin tespit edilmesini zorlaştırmaktadır [110]. Diğer kemik örneklerinde ise en yaygın olan grup Bacillota'dır (Şekil 16). Bacillota önceden Firmicutes olarak bilinirdi. Bacillota, çeşitli çevresel nişlerde bulunan geniş ve heterojen bir bakteri grubudur. Çoğu Bacillota türü Gram-pozitif boyama özelliğine sahiptir, yani hücre duvarları kalın peptidoglikan katmanına sahiptir. *Bacillota*, düşük G+C içeriği ile karakterize edilir. Önemli cinsleri ve türleri; *Bacillus subtilis*, toprak bakterisi, genetik çalışmalarda model organizma olarak kullanılır. *Bacillus anthracis*, şarbon hastalığının etkeni. *Bacillus cereus*, gıda zehirlenmesine neden olabilir. *Clostridium botulinum*: Botulizme neden olur. *Clostridium difficile*, antibiyotikle ilişkili ishal ve kolit etkenidir. *Clostridium tetani*, tetanoz hastalığına neden olur. *Lactobacillus acidophilus*, sindirim sistemine faydalıdır ve probiyotik olarak kullanılır. *Streptococcus pyogenes*, boğaz enfeksiyonlarına, cilt enfeksiyonlarına ve romatizmal ateşe neden olabilir. *Streptococcus pneumoniae*: Pnömoni ve menenjitte neden olabilir. *Staphylococcus aureus*, MRSA dahil olmak üzere birçok enfeksiyonun etkenidir. *Staphylococcus epidermidis*, ciltte yaygındır, genellikle zararsızdır ancak bağışıklığı zayıf kişilerde enfeksiyona neden olabilir. Bacillota üyeleri, toprak ekosistemlerinde organik madde ayrışması ve besin döngüsünde önemli rol oynar. İnsan vücudunda, özellikle bağırsak, ağız ve cilt florasında bulunur ve sağlığı destekleyen birçok işlevi vardır. Bacillota üyeleri, peynir, yoğurt, ekmek gibi fermente gıdaların üretiminde kullanılır. Bacillota filumunda birçok patojenik tür bulunur. Bunlar, çeşitli hastalıklara neden olabilir ve bu hastalıklar bazen ciddi ve ölümcül olabilir. Örneğin, *Clostridium tetani* tetanoz, *Clostridium botulinum* botulizm ve *Bacillus anthracis* şarbona neden olur. Bacillota, genetik analizlere dayalı olarak düşük G+C içeriği ile karakterize edilen ve farklı morfolojik ve ekolojik özelliklere sahip bakterilerden oluşur. Filogenetik olarak, Bacillota üyeleri diğer Gram-pozitif bakterilerden ayrılır ve kendi içinde büyük çeşitlilik gösterir. Bacillota filumu, ekolojik çeşitliliği, biyoteknolojik uygulamaları ve bazı üyelerinin patojenik özellikleri ile dikkat çeken bir bakteri grubudur. Bu filum, insan sağlığı ve çevre açısından büyük öneme sahiptir.

Genel olarak 4 örnekte de bulunan grupların filogenetik olarak yakın oldukları ve ekolojik nişlerinin benzer olduğu ve tarım da insan sağlığında etkili organizmalar olduğunu analizler sonucunda gördük. Ancak çok daha detaylı incelemeler yapıldığında türlerin çeşitlendiği fakat patojen etmeni olan türlerden ziyade toprak bakterisi olarak literatürde yer alan bakteri türleri olduğuna rastlanıldı. Bu sonuçlara hem Greengenes 13.8 hem de NCBI Blast üzerinde verilerin çalışılması ve kontrol edilmesi ile ulaşıldı. Elde edilen

Greengenes sonuçları ile oluşturulan OTU dosyaları incelendiğinde ve bu OTU dosyalarına ait olan fasta dosyaları da hem SilvaNGS hem de NCBI Blast da incelendiğinde %97 ve %100 olarak çıkan sonuçlar çoklu sistemler ile test edildi. Sonuçlar Şekil 7-11, 15-18 de görüldüğü gibi aynı çıkmıştır.

Örneklerde patojenik bir bakteri türüne rastlanmamış olması ise kemiklerdeki deformasyonun patojen etmenleri tarafından değil de mezarların üzerine uygulanan kireçten kaynaklandığını ön görebiliriz. Bunun yanı sıra toprak pH ve mezarların su ile olan temaslarını da göz önünde bulundurmak ve çalışmanın sonucunda neden patojen etmenine rastlanmadığına açıklık getirmektedir. Toprak bakterilerinde de tarımsal alanlarda bulunan Actinomycetota ve süt yoğurt gibi besinlerde bulunan Bacillota'nın ise daha yüksek oranlarda görülme sebebi bu mezarların nekropolün daimî olarak kullanılan mezar alanı dışında, yaşam alanı içerisinde olan kilise etrafında bir yerde olması bu bakteri türlerine rastlanmayı açıklar niteliktedir. Bunun başlıca sebepleri ise bu yerleşim biriminin geç döneme tarihlendirilmesi ve bu coğrafyanın (Göller Bölgesi) tarım açısından da verimli olmasından kaynaklanabilmektedir [105].

5. YORUM

Bu tez çalışmasında arkeolojik insan kalıntıları üzerinde gömü biçimlerine dayanarak arkeolojik olarak ileri gelen şüphelerin moleküler çalışmalar ile kanıtlanması hedeflendi. Ancak genel sonuçlar değerlendirildiğinde örneklerle ait mikrobiyal çeşitliliğin patojen etmeni olan cins düzeylerinde bulunmadığı ve buna bağlı olarak da arkeolojik olarak şüphe edilen paleopatolojik etmen izlerine rastlanılmadı kanıtlanmıştır.

Bu çalışmada mikroarray çip teknolojisinin tercih edilmemesi ve mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında bir demirbaş çalışma olan metagenomiğin tercih edilmesi ileri sürülen kanıtların etkisini artırmaktadır. 16S rRNA geninin V3-V4 bölgesinin çalışılması ile tüm mikrobiyal içerik tespit edilmiş ve alem, şube, aile ve cins düzeylerinde her bir örneğe ait mikrobiyal profil çıkartılmıştır. Bu da olası patojen etmeninin gözden kaçırılmadığını ve mikrobiyal içeriklere cins düzeyinde bakıldığında toprak bakterisi olduğu ve toprakta bulunan ve toprak ekosistemlerinde önemli bir rol oynayan bakteriler olduğu tespit edilmiştir. Bu gruplar ise şu şekilde sıralanmaktadır; *Actinomycetota*, *bacillota*, *planctomycetota*, *bacteroidota* ve *fusobacteriota*.

Bu tez çalışması ile birlikte arkeolojik yerleşim alanlarında yer alan iskeletlerin mikrobiyal içerik bakımından ne denli zengin olduğu ve bu içeriklerin daha derin çalışmalarla, örneğin tüm genom çalışması gibi, devam ettirildiğinde ölü gömme gelenekleri ve mikrobiyal içerik açısından bir ilişki olup olmadığı ve bu mikrobiyal zenginliğin de mezarların benzer lokalizasyonda olmasından bağımsız olduğu görülmektedir. Son yıllarda metagenomik çalışmaların artışı ve antik DNA çalışmaları ile birlikte yapıldığı nadir çalışmalara katkı sunan bu tez çalışması ülkemizde yapılan başlıca tezler arasında yerini almaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Stanford, C., Allen, J. S., & Antón, S. C. (2011). Biological anthropology: the natural history of humankind. *Pearson Education*.
- [2] Boaz, N. T., Almquist, A. J. Biological Anthropology: A Synthetic Approach to Human Evolution (2002). *Pearson Press*.
- [3] Larsen, C. S. (2002). Bioarchaeology: the lives and lifestyles of past people. *Journal of Archaeological Research*, 10(2), 119-166.
- [4] Lewis, M. E. (2009). *The bioarchaeology of children: perspectives from biological and forensic anthropology* (Vol. 50). Cambridge University Press.
- [5] Larsen, S. A., Steiner, B. M., & Rudolph, A. H. (1995). Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clinical microbiology reviews*, 8(1), 1-21.
- [6] Stoneking, M. (2017). *An introduction to molecular anthropology*. John Wiley & Sons.
- [7] Crawford, M. H. (2007). Anthropological genetics. *The International Encyclopedia of Biological Anthropology*, 1-7.
- [8] Stoneking, M., Fontius, J. J., Clifford, S. L., Soodyall, H., Arcot, S. S., Saha, N., ... & Batzer, M. A. (1997). Aluinsertion polymorphisms and human evolution: Evidence for a larger population size in Africa. *Genome research*, 7(11), 1061-1071.
- [9] Pääbo, S. (1999). Human evolution. *Trends in Genetics*, 15(12), M13-M16.
- [10] Kumar, Abbas ve Aster, (2014). *Robbins Temel Patoloji*.
- [11] 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).
- [12] Bouwman, A. S., Chilvers, E. R., Brown, K. A., & Brown, T. A. (2006). Brief communication: identification of the authentic ancient DNA sequence in a human bone contaminated with modern DNA. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 131(3), 428-431.
- [13] Deguilloux, M. F., Pemonge, M. H., Mendisco, F., Thibon, D., Cartron, I., & Castex, D. (2014). Ancient DNA and kinship analysis of human remains deposited in Merovingian necropolis sarcophagi (Jau Dignac et Loirac, France, 7th–8th century AD). *Journal of Archaeological Science*, 41, 399-405.

- [14] Gifford, W. D., Pfaff, S. L., & Macfarlan, T. S. (2013). Transposable elements as genetic regulatory substrates in early development. *Trends in cell biology*, 23(5), 218-226.
- [15] Haak, W., Brandt, G., Jong, H. N. D., Meyer, C., Ganslmeier, R., Heyd, V., ... & Alt, K. W. (2008). Ancient DNA, Strontium isotopes, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the Later Stone Age. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47), 18226-18231.
- [16] Knipper, C., Meyer, C., Jacobi, F., Roth, C., Fecher, M., Stephan, E., ... & Maus, M. (2014). Social differentiation and land use at an Early Iron Age “princely seat”: bioarchaeological investigations at the Glauberg (Germany). *Journal of archaeological science*, 41, 818-835.
- [17] Lee, H., Deignan, J. L., Dorrani, N., Strom, S. P., Kantarci, S., Quintero-Rivera, F., ... & Fox, M. (2014). Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *Jama*, 312(18), 1880-1887.
- [18] Ricaut, F. X., Fedoseeva, A., Keyser-Tracqui, C., Crubézy, E., & Ludes, B. (2005). Ancient DNA analysis of human neolithic remains found in 133 northeastern Siberia. *American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists*, 126(4), 458-462.
- [19] Franchi, L., Muñoz-Planillo, R., & Núñez, G. (2012). Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nature immunology*, 13(4), 325-332.
- [20] Olalde, I., Schroeder, H., Sandoval-Velasco, M., Vinner, L., Lobón, I., Ramirez, O., ... & María Fullola, J. (2015). A common genetic origin for early farmers from Mediterranean Cardial and Central European LBK cultures. *Molecular biology and evolution*, 32(12), 3132-3142.
- [21] Brown, T. A., & Brown, K. (2011). *Biomolecular archaeology: an introduction*. John Wiley & Sons.
- [22] Ortner, D. J., & Aufderheide, A. C. (1991). *Human paleopathology: current syntheses and future options*.
- [23] Gilbert, M. T. P., Rudbeck, L., Willerslev, E., Hansen, A. J., Smith, C., Penkman, K. E., ... & Lynnerup, N. (2005). Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *Journal of Archaeological Science*, 32(5), 785-793.

- [24] Meyer, E., Wiese, M., Bruchhaus, H., Claussen, M., & Klein, A. (2000). Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains. *Forensic science international*, 113(1-3), 87-90.
- [25] Scott, P., Sherriff, M., DiBiase, A. T., & Cobourne, M. T. (2008). Perception of discomfort during initial orthodontic tooth alignment using a self-ligating or conventional bracket system: a randomized clinical trial. *The European Journal of Orthodontics*, 30(3), 227-232.
- [26] Schwartz, T. R., Schwartz, E. A., Mieszerski, L., McNally, L., & Kobilinsky, L. (1991). Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental conditions. *Journal of Forensic Science*, 36(4), 979-990.
- [27] O'Rourke, D. H., Hayes, M. G., & Carlyle, S. W. (2000). Ancient DNA studies in physical anthropology. *Annual Review of Anthropology*, 29(1), 217-242.
- [28] Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T. H., Dizdaroglu, M., & Paabo, S. (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic acids research*, 24(7), 1304-1307.
- [29] O'Rourke, D. H., Carlyle, S. W., & Parr, R. L. (1996). Ancient DNA: Methods, progress, and perspectives. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Association*, 8(5), 557-571.
- [30] Tuross, N. (1994). The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia*, 50, 530-535.
- [31] Pinhasi, R., Fernandes, D., Sirak, K., Novak, M., Connell, S., Alpaslan-Roodenberg, S., ... & Hofreiter, M. (2015). Optimal ancient DNA yields from the inner ear part of the human petrous bone. *PloS one*, 10(6), e0129102.
- [32] Alberti, F., Gonzalez, J., Paijmans, J. L., Basler, N., Preick, M., Henneberger, K., ... & Joger, U. (2018). Optimized DNA sampling of ancient bones using Computed Tomography scans. *Molecular ecology resources*, 18(6), 1196-1208.
- [33] Lee, H. C., Pagliaro, E. M., Berka, K. M., Folk, N. L., Anderson, D. T., Ruano, G., ... & Gaensslen, R. E. (1991). Genetic markers in human bone: I. Deoxyribonucleic acid (DNA) analysis. *Journal of Forensic Science*, 36(2), 320-330.
- [34] Hagelberg, E., & Clegg, J. B. (1991). Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 244(1309), 45-50.

- [35] Von Wurmb-Schwark, N., Harbeck, M., Wiesbrock, U., Schroeder, I., Ritz- Timme, S., & Oehmichen, M. (2003). Extraction and amplification of nuclear and mitochondrial DNA from ancient and artificially aged bones. *Legal medicine*, 5, S169-S172.
- [36] Bollongino, R., Tresset, A., & Vigne, J. D. (2008). Environment and excavation: Pre-lab impacts on ancient DNA analyses. *Comptes Rendus Palevol*, 7(2-3), 91-98.
- [37] Aladağ, B. (2020). *Kibyra Antik Kentinden 2013-2018 yılları arasında çıkarılan insan iskeletlerinin paleoantropolojik analizi*(Master's thesis, Sosyal Bilimler Enstitüsü).
- [38] Ortner, D. J. (2003). *Identification of pathological conditions in human skeletal remains*. Academic Press.
- [39] Ortner, D. J., & Aufderheide, A. C. (1991). *Human paleopathology: current syntheses and future options*.
- [40] Rodríguez-Martín, C. (2006). Identification and differential diagnosis of traumatic lesions of the skeleton. *Forensic anthropology and medicine: complementary sciences from recovery to cause of death*, 197-221.
- [41] Ortner, D.J., Aufderheide, A.C. 2003. Human Paleopathology Current Syntheses and Future Options. ss: 227-263.
- [42] Santos, A. L. (2015). Archives and skeletons: an interdisciplinary approach to the study of paleopathology of tuberculosis. *Tuberculosis*, 95, S109-S111.
- [43] Jones, B.G.2001. *Patoloji*. Ed. Horton- Szar, Daniel. Güneş Kitapevi. Ankara. ss: 56,115-117,245,283.
- [44] Evinger,S., Bernert, Zs., Fothi, E., Wolff,K., Kovari, I., Marcsik,A., Donoghue, H.D., O'G rady, J., Kiss, K.K., Hajdu, T. 2011. *New skeletal tuberculosis cases in past populations from Western Hungary (Transdanubia)*. HOMO- Journal of Comparative Human Biology 62: 165-183.
- [45] Nikiforuk, A. 2013. *Mahşerin Dördüncü Atlısı Salgın ve Bulaşıcı Hastalıkların Tarihi*, İstanbul.
- [46] Colombo, A., Saint-Pierre, C., Naji, S., Panuel, M., Coqueugniot, H., & Dutour, O. (2015). Langerhans cell histiocytosis or tuberculosis on a medieval child (Oppidum de la Granède, Millau, France–10th–11th centuries AD). *Tuberculosis*, 95, S42-S50.

- [47] Köksal, F. 2012. *Tüberküloz Basilinin Kaynağı ve Evrimi*. <https://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2012/02/982011113538-1.pdf>
- [48] Donoghue, H.D., Spigelman, M., Greenblatt, C.L., Lev-Maor, G., Bar-Gal, G. K., Matheson, C. , Vernon, K., Nerlich, A.G., Zink, A.R. 2004. *Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA*. The Lancet Infectious Diseases 4:584-592.
- [49] Gagneux, S. 2012. *Host- pathogen coevolution in human tuberculosis*. Philosophical Transactions of The Royal Society B 367: 850-859.
- [50] Donoghue, H. D., Spigelman, M., O'grady, J., Szikossy, I., Pap, I., Lee, O. Y. C., ... & Minnikin, D. E. (2015). Ancient DNA analysis—An established technique in charting the evolution of tuberculosis and leprosy. *Tuberculosis*, 95, S140-S144.
- [51] Pepperell, C.S., Granka, J.M., Alexander, D.C., Behr, M.A., Chui, L., Gordon, J. , Guthrie, J.L., Jamieson, F.B., Langlois-Klassen, D., Long, R., Nguyen, D., Wobeser, W., Feldman, M.W. 2011. Dispersal of Mycobacterium tuberculosis via the Canadian fur trade. PNAS;108(16): 6526-6531.
- [52] Müller, R., Roberts, C. A., & Brown, T. A. (2015). Complications in the study of ancient tuberculosis: non-specificity of IS6110 PCRs. *STAR: Science & Technology of Archaeological Research*, 1(1), 1-8.
- [53] Perrin, P. (2015). Human and tuberculosis co-evolution: An integrative view. *Tuberculosis*, 95, S112-S116.
- [54] Drancourt, M., Aboudharam, G., Signoli, M., Dutour, O., & Raoult, D. (1998). Detection of 400-year-old Yersinia pestis DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(21), 12637-12640.
- [55] 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.
- [56] Fornaciari, A., 2017, Environmental microbial forensics and archaeology of past pandemics, *Microbiology spectrum*, 5(1).
- [57] Vakhlu, J., Sudan, A. K. and Johri, B. N., 2008, Metagenomics: future of microbial gene mining, *Indian journal of microbiology*, 48(2), 202–215.

- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] Neelakanta, G. and Sultana, H., 2013, The use of metagenomic approaches to analyze changes in microbial communities, *Microbiology insights*, 16(6), 37-48.
- [61] Handelsman, J., 2004, Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms, *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(4), 669-85.
- [62] Schmeisser, C., Helen, S. and Wolfgang, R. S., 2007, Metagenomics, biotechnology with nonculturable microbes , *Applied microbiology and biotechnology*, 75(5), 955-962.
- [63] Streit, W.R. and Schmitz, R.A., 2004, Metagenomics, the key to the uncultured microbes, *Current opinion in microbiology*, 7(5), 492-498.
- [64] 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.
- [65] Schloss, P.D. and Handelsman, J., 2003, Biotechnological prospects from metagenomics, *Current opinion in biotechnology*, 14(3), 303-10.
- [66] 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.
- [67] Susannah, G.T. and Edward, M.R., 2005, Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples, *Nature reviews genetics*, 6(11), 805-14.
- [68] Patrick, D.S. and Handelsman, J., 2005, Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot, *Genome biology*, 6(8), 229.
- [69] Chen, K. and Pachter, L., 2005, Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities, *PLoS computational biology*, 1(2), 106-112.
- [70] 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.

- [71] 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.
- [72] Torsvik, V. and Ovreas, L., 2002, Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems, *Current opinion in microbiology*, 5(3), 240-245.
- [73] 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.
- [74] 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.
- [75] Rosello, M.R. and Amann, R., 2001, The species concept for prokaryotes, *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 39-67.
- [76] 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.
- [77] 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.
- [78] 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.
- [79] 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.
- [80] 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.
- [81] 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.
- [82] 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.
- [83] 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.
- [84] 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.
- [85] 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.
- [86] 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.
- [87] Warinner, C., Rodrigues, J.F., Vyas, R., Trachsel, C., Shved, N., Grossmann, J., Radini, A., Hancock, Y., Tito, R.Y., Fiddyment, 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.
- [88] Ruvolo, M., 1997, Molecular phylogeny of the hominoids: inferences from multiple independent DNA sequence data sets, *Molecular biology and evolution*, 14(3), 248-65.
- [89] Long, J.C. and Kittles, R.A., 2003, Human genetic diversity and the nonexistence of biological races, *Human biology*, 75(4), 449-471.
- [90] 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.

- [91] 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.
- [92] 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.
- [93] 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.
- [94] 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.
- [95] 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.
- [96] 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.
- [97] 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.
- [98] 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.
- [99] 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).
- [100] 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).
- [101] Oulas, A., Pavlouidi, 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.

[102] 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.

[103] 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).

[104] 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.

[105] Özüdoğru, Ş., (2018), Geç Antik Çağ'da Kibyra, *Cedrus VI*, s.13-64.

[106] Calle, M. L. (2019). Statistical analysis of metagenomics data. *Genomics & informatics*, 17(1).

[107] Margaryan, A., Hansen, H. B., Rasmussen, S., Sikora, M., Moiseyev, V., Khoklov, A., ... & Allentoft, M. E. (2018). Ancient pathogen DNA in human teeth and petrous bones. *Ecology and evolution*, 8(6), 3534-3542.

[108] Der Sarkissian, C., Velsko, I. M., Fotakis, A. K., Vågene, Å. J., Hübner, A., & Fellows Yates, J. A. (2021). Ancient metagenomic studies: considerations for the wider scientific community. *Msystems*, 6(6), e01315-21.

[109] Cowan, D. A., 2000, Microbial genomes-the untapped resource. *Trends in biotechnology*, 18(1), 14-16.

[110] 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.