

# TLOS (FETHİYE/MUĞLA) KAZILARINDA BULUNAN İSKELETLERDE MOLEKÜLER ANALİZLER

Utku Can Atılğan<sup>1</sup>

Ercan Arıcan<sup>2</sup>

## Özet

Antik DNA çalışmaları doğa ve insanlık tarihinin anlaşılmasına ciddi katkılarda bulunmaktadır. Son yıllarda gelişen yeni nesil dizileme teknikleri, mitokondriyal genomun dizilenmesinde büyük yenilik ve kolaylık getirmiştir. Veritabanlarındaki mitokondriyal DNA dizilerinin artması, insanlığın geçmişiyle ilgili bilinmeyenlerin anlaşılması için yeni veriler ortaya çıkaracaktır. Bu çalışmada, Tlos (Fethiye/Muğla) kazılarında bulunan iskeletlerde aDNA izolasyonu yapıldı. Mitokondriyal DNA'nın çoğaltılması amacıyla 58 primer çifti kullanılarak "Touchdown" PCR yöntemi kullanıldı. Çoğaltılan bölgeler yeni nesil dizileme teknolojisi ile dizilendi ve iskeletlerin elde edildiği bireylerin haplogrupları biyoenformatik araçlar yardımıyla tespit edildi. Bu çalışma, Türkiye'de yaşamış insan topluluklarının kökenleri üzerine tarihsel tartışmaların üzerine arkeolojik bilgilerle birlikte katkı verebilecektir. Disiplinler arası bu çalışma Türkiye'de yapılabilecek diğer antik DNA çalışmalarının yapılmasına etki edebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Antik DNA, Fethiye, Tlos, kazı, mitokondriyal DNA, haplogrup

## Molecular Analysis of Skeletons found in Tlos (Fethiye/Muğla) Excavations

## Abstract

Ancient DNA studies have contributed significantly to the understanding of the history of nature and humanity. With the development of next generation sequencing techniques has brought great innovation and convenience in the sequencing of the mitochondrial genome. The increase in the number of mitochondrial DNA sequences in the databases will reveal new data for understanding the unknowns of human history. In this thesis study, aDNA isolation was performed on skeletons found in Tlos (Fethiye/Mugla) excavations. In order to amplify mitochondrial DNA, 58 pairs of primers were chosen and the "Touchdown" PCR method was used. The amplified regions were sequenced with next generation sequencing technology and the haplogroups of the individuals from which the skeletons were obtained were identified using bioinformatics tools. This study will be able to contribute with archaeological information on the historical debate on the origins of human communities lived in Turkey. This interdisciplinary work can influence the other ancient DNA studies in Turkey.

**Keywords:** Ancient DNA, Fethiye, Tlos, excavation, mitochondrial DNA, haplogroup

<sup>1</sup> Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Zonguldak, Türkiye (ORCID: 0000-0003-4167-1540)

<sup>2</sup> İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0002-2676-5919)

## 1. Giriş

Günümüzden 2500 yıl önce Eski Yunan filozoflarının birçoğu, canlıların kademeli olarak değişim geçirdiklerini düşünüyorlardı. Plato ve onun öğrencisi Aristo, bu görüşe zıt fikirlere sahiplerdi. Aristo tüm canlı formlarının karmaşıklığı gittikçe artacak şekilde bir cetvel üzerinde sıralanabileceğini düşünüyordu ve bu cetveli “*scala natura*” olarak tanımlamıştı. Bu tanıma paralel olarak 1700’lü yıllarda Avrupa ve Amerika’da biyoloji çalışmalarında doğal teoloji görüşü esas alınmaktaydı. Bu görüş, canlı türlerini Tanrı’nın canlıları yaratış basamaklarını gösterecek şekilde sıralamayı ve doğadaki çeşitliliği açıklamayı hedefliyordu. Darwin’in “Doğal Seçilim Yoluyla Türlerin Ortaya Çıkması Üzerine” adlı kitabı 1859’da yayınlandıktan sonra doğa tarihini aydınlayabilecek bilimsel anlamda geçerli bir anlayış şekillenmeye başladı (Campbell & Reece, 2008). Yayınlandığı dönemde büyük ilgi gören Darwin’in doğal seçilim kuramı iki önemli noktayı açıklamakta yetersizdi: 1) Canlılarda bulunan çeşitliliğin nasıl meydana geldiği 2) Karakterlerin dölden döle nasıl geçtiği. Bu eksiği kapatacak bilgiyi Gregor Mendel 1865 yılında yayınladı ancak bu çalışma o dönemde ilgi görmedi. Ancak 1930 yılında Wright, Fischer ve Haldene’in çalışmaları Mendel’in bulguları ile birleştirildiğinde evrimsel sürecin açıklanması yolunda ilk adım atılmıştır (Griffiths, Wessler, Carroll, & Doebley, 2014). Genetik materyali taşıyan ve kalıtsal molekül olarak görev yapan nükleik asitlerin moleküler yapısının Watson ve Crick tarafından geliştirilen modelle 1953 yılında açıklanması moleküler genetiğin ortaya çıkmasını ve antik DNA çalışmalarının yapılmasını sağlayacak tekniklerin gelişmesine olanak tanıdı (Temizkan, 2014). Bu sayede araştırmacılar insanın kökeni ile ilgili önemli sorulara yanıt arayabilme kapasitesine eriştiler (Stoneking, 2008).

Biyolojik bir tür olarak insanı inceleyen antropoloji dalında DNA’nın kullanılması, modern insanın kökeninin açıklanması ve doğa tarihinin anlaşılması için yapılan çalışmaları hızlandırdı. Bu alanda geçmişte yaşamış insan toplulukları, nesli tükenmiş türler ve evcilleştirilmiş canlılar araştırma konusu olarak seçilmiştir (Park, 2013). İlk antik DNA (aDNA) çalışmaları, Higuchi ve arkadaşları (1984) tarafından nesli tükenmiş bir zebra türü olan Quagga’ya ait iskeletten DNA izolasyonu yapılarak gerçekleştirilmiş, daha sonra Pääbo (1985) yaklaşık 2400 yıllık Mısırlı bir bireye ait mumyalanmış örnekten elde edilen DNA parçasını bakteriye klonlamayı başarmıştır. Bu çalışmada DNA miktarının az ve kalitesiz olması, aDNA’yı içeren plazmitin bakteriden geri izole edilememesine yol açmıştır. Kary Mullis’in (1987), DNA’yı enzimatik olarak *in vitro* ortamda çoğaltmayı sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemini bulması ile aDNA’dan da sayısız miktarda kopya elde edilebilmesinin önü açılmıştır (Hagelberg ve diğ., 2015).

Antik DNA çalışmaları, adli tıpta, nesli tükenmiş türlerin incelenmesinde, taksonomide, insanın kökenini ve göç yollarının araştırılması, evcilleştirmenin kökenlerinin incelenmesi, salgınların olduğu dönemlerdeki patojenlerin genomlarının incelenmesi ile ilgili çalışmalarda katkı vermektedir (Pääbo ve diğ., 2004). Ökaryotik hücrelerde çok sayıda mitokondri bulunması ve mitokondri içerisinde yüksek sayıda DNA kopyası bulunması, mitokondriyal genomun (mtDNA) maternal kalıtım göstermesi, rekombinasyona uğramaması, genomdaki çeşitliliğin sadece mutasyonların birikmesine dayanması, nükleer genoma kıyasla daha yüksek evrimleşme hızına sahip olmasından dolayı aDNA çalışmalarında mitokondriyal genom yoğun olarak kullanılan önemli bir kaynaktır (Pakendorf ve Stoneking, 2005). mtDNA analizleri ile insan



kapsamında kit prosedüründe belirtilen “Bone Lysis Enhancer” solüsyonu yerine, 490 µL EDTA (0,45 M) (Sigma, Kat. No: E5134)) ve 10 µL Proteinaz K (0,25mg/ml) (Sigma Kat. No:P6556) solüsyonu kullanıldı ve toz haline getirilen diş kökü, bir gece 56 °C sıcaklıkta çalkalayıcıda inkübe edildi. DNA izolasyonunun devamı kit prosedürüne uygun olarak yapıldı (<https://www.molecular.stratec.com/files/inhalte/Manuals/InvisorbSpinForensicKit.pdf>). Her bir örnekten iki ayrı DNA izolasyonu yapıldı. DNA miktar ve saflık tayini nanodrop cihazında (Thermo Scientific Nanodrop 2000, ABD) spektrofotometri yöntemi ile saptandı.

Örneklerden izole edilen DNA’lardan mtDNA’nın tamamının çoğaltılabilmesi için 58 adet primer çifti “NCBI Primer Blast” ile tasarlandı. Primerlerin çoğalttığı bölge (amplikon) “SnapGene” programı kullanılarak belirlendi. DNA örnekleri, 58 çift primer ile ortalama 300-400 bp ürün oluşturacak şekilde, verimli olarak çoğaltılabilmesi için High Fidelity PCR Master (Roche Diagnostics, Deutschland, KN: 11732650001) kiti kullanıldı. Bu kitin yanı sıra polimerizasyon reaksiyonu aşamasında primerlerin kalıp bölgelere bağlanmasının arttırabilmek amacıyla High Fidelity PCR Master kiti ile yapılan denemeye kit prosedüründen farklı olarak H<sub>2</sub>O yerine 2.5 µl 5M betain (2-trimethylammonioacetate) eklendi. Reaksiyonların tamamı “Touchdown PCR” yöntemi ile C1000 Thermal Cycler (Biorad Laboratories Inc. ABD) cihazı kullanılarak belirtilen koşullarda (Tablo 1) yapıldı.

**Tablo 1: Kullanılan PCR programı**

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

PCR ürünleri, DONE Genetik ve Biyoinformatik Anonim Şirketi tarafından Illumina MiSeq® platformunda yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak dizilenmiştir. Elde edilen FASTA formatındaki dizi sonuçları haplogrup analizi yapılması amacıyla MITOMAP (<https://mitomap.org//MITOMAP>) platformunda bulunan MITOMASTER (<https://mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMASTER/WebHome>) uygulamasına girilmiştir. Uygulamanın verdiği haplogrup sonuçları ve varyasyonlar kaydedilmiştir. Filogenetik analizin gerçekleştirilmesi için öncelikle MEGA 7 programı sistem gereksinimini karşılayan bir bilgisayara <https://www.megasoftware.net/> sitesinden indirilmelidir. Web sitesinden Windows, macOS, Ubuntu/Debian, RedHat ve Linux işletim sistemlerine uygun versiyonlarıyla birlikte grafik ve komut satırı gibi farklı arayüz ve programın eski versiyonlarına erişilebilmektedir. Eldeki dizi sonuçlarının incelenmesi için Windows işletim sistemine uygun, grafik arayüzüne sahip MEGA 7 bilgisayara indirildi ve kuruldu. Ardından “Data” sekmesinden “Open a File/Session” komutunu verildi. Açılan pencereden FASTA formatında dizi bilgisinin olduğu “.fa” uzantılı dosya seçildi. Çıkan uyarı ekranından programa girilen verinin nükleotit dizisi olduğu ve omurgalı mitokondrisine ait DNA olduğu işaretlendi. Analiz edilecek diğer veriler “Edit” sekmesinden

“Insert sequence from a file” komutu verilerek seçildi ve eklendi. Eklenen verilerin hizalanması için “Alingment” sekmesinden “Aling by Muscle” komutu verildi ve ayarlarda değişiklik yapılmadan “Compute” komutu ile hizalama tamamlandı. Bu işlemin ardında filogenetik ağaç çizimine geçmek için hizalanmış veriler FASTA formatında tek bir dosyaya dönüştürülmeli ve kaydedilmelidir. Bu işlem “Data” sekmesinden “Export Alingment” komutu verilerek gerçekleştirildi. Filogenetik ağacı oluşturmak için “Phylogeny” sekmesinden “Construct/Test Neighbour-Joining Tree” komutu verildi ve verilerin hizalanıp kaydedildiği dosya seçildi ve filogenetik ağaç oluşturuldu. Aynı işlem belirlenen üst-haplogrup kök alınarak tekrar edildi ve filogenetik ağacın farklı formları oluşturularak kaydedildi.

### 3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

TLOS Antik Şehri kazılarında elde edilen iskeletlerden DNA izolasyonu yapıldı ve nanodrop ile miktar ve saflık tayini yapıldı (Tablo 2). Ölçüm sonuçlarına göre Touchdown PCR (TD-PCR) ile çoğaltılmak için konsantrasyonu, A260/A280 ve A260/A230 oranları uygun aralıklarda olan B2C, B30, B6T, B14, B15 ve 3B9P1 örnekleri seçildi.

**Tablo 2:** aDNA miktar ve saflık tayini

Örnek	Nükleik Asit Konsantrasyonu (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
B14	13,4	1,8	0,16
B6T	14,4	1,8	0,08
B15	22,2	1,73	0,05
3B9P1	13,3	1,78	0,08
B2C	12,4	1,84	0,13
B30	12,3	1,84	0,11
B3	5,5	2,29	0,13
B7	43,6	1,61	0,08
B17	2,8	6,31	0,07
B24	50,2	1,52	0,11
B2T	43,7	1,55	0,13
B20M1	7	2,16	0,05

B2M	19,3	1,67	0,12
B11	14,4	1,87	0,03
B21	37,5	1,62	0,06
B23	57,6	1,6	0,08
K12	56,6	1,61	0,08
B5T	51,8	1,43	0,4
K12	11,6	1,95	0,18
B1	8,8	1,98	0,09
B8	6,6	1,99	0,16
B11	3,1	4,05	0,06
B18	5,6	1,98	0,11
1B22B	6,9	2,17	0,1
2B22K	38,4	1,56	0,11
B20M2	9,9	1,9	0,18
4B9P2	37,9	1,59	0,1

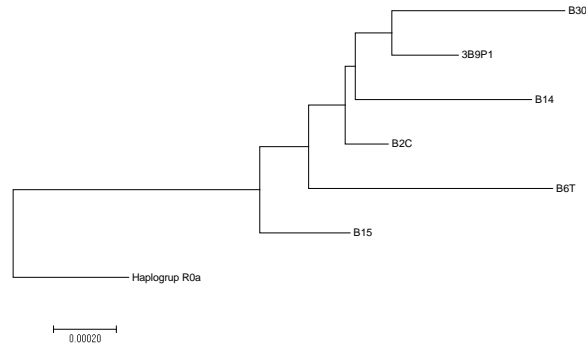
Illumina MiSeq® platformunda gerçekleştirilen dizileme sonuçları kullanılarak TLOS Antik Kenti kazılarında elde edilen örneğin haplogrupları MITOMAP platformundaki MITOMASTER program ile tespit edildi (Tablo 3).

*Tablo 3: Haplogrup ve varyasyon tespiti*

Örnek	Haplogrup	Varyasyonlar
-------	-----------	--------------

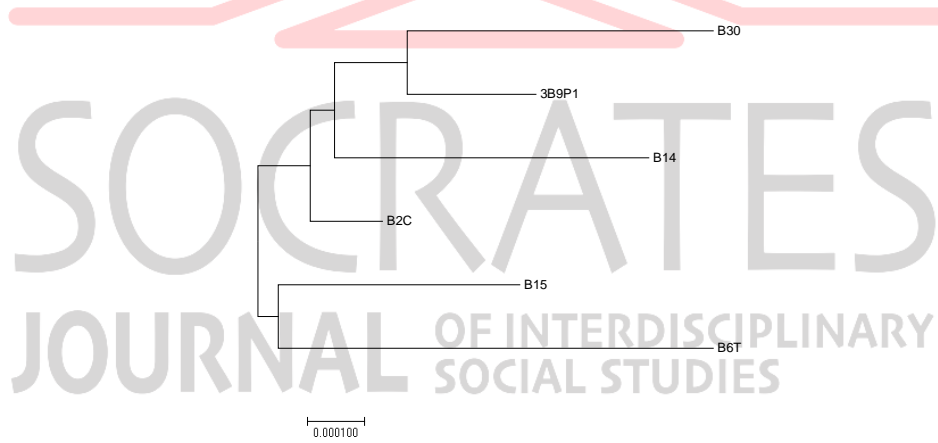
B14	HV	T89C, A93G, T146C, A263G, A750G, A1438G, C2218T, T2486C, A2706G, A4256G, G4580A, A4769G, C7028T, A7430G, C7774T, A8860G, C8910T, T10238C, A10398G, T12130C, C13206A, C14815T, A14927G, A15326G, G15928A, C16114T, A16269G
B6T	U5b	A73G, C150T, A263G, A750G, A1438G, A2706G, T3197C, G4580A, A4769G, A5656G, C7028T, A7385G, A7768G, A8860G, C8910T, G9477A, T10927C, A11467G, G11719A, G12618A, T13617C, T14182C, G15043A, A15326G, G15928A, C16270T
B15	HV0	G709A, A750G, A1438G, A2706G, A4769G, C7028T, A8860G, A14233G, G15043A, A15326G, A15607G, G15928A, T16298C
3B9P1	HV0a	A750G, A1438G, A2706G, A4769G, G6734A, A8860G, C8910T, T12130C, T14470C, T14857C, A15326G, C15904T, C16114T, A16269G
B2C	V7b	T89C, A93G, A750G, A1438G, A2706G, G4580A, A4769G, C7028T, G7444A, A8860G, C8910T, T14857C, A15326G, G15928A, A16269G
B30	V7b	A750G, A1438G, A2706G, G3591A, G4580A, A4769G, G6026A, C7028T, G7444A, A8860G, C8910T, T10034C, T10927C, T12130C, C13206A, T13260C, G13368A, T14857C, A15326G, C15904T, C16114T, A16269G

Dizileme sonuçlarına göre üst-haplogrup olarak R0a alınarak filogenetik ağaç hazırlandı ve MEGA7 programını kullanarak oluşturuldu (Şekil 2).

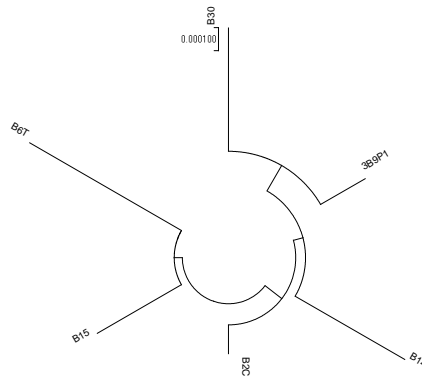


**Şekil 2:** MEGA 7'ye göre R0a haplogrubu kök alınarak çizilen filogenetik ağaç-1

Çalışma sonucunda elde edilen haplogrupların kendi aralarındaki çeşitliliğe bağlı olarak filogenetik ağaçları “neighbor-joining” yaklaşımı ile çizildi (Şekil 3 ve Şekil 4).



**Şekil 3:** “Neighbour-joining” yaklaşımı ile çizilen filogenetik ağaç-1





**Şekil 4:** “Neighbour-joining” yaklaşımı ile çizilen filogenetik ağaç-2

Bu çalışmada; TLOS Antik Kenti kazılarında elde edilen iskeletlerden DNA izolasyonu yapılması ve mtDNA'nın tamamının dizilmesi ve bu diziler üzerinde moleküler analizler yapılması hedeflenmiştir. Prof. Dr. Taner Korkut Başkanlığında yürütülen kazılardan sağlanan iskelet örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı, mtDNA'nın tamamı dizildi ve biyoenformatik araçlar kullanılarak filogenetik ağacı çizildi (Şekil 2-4) ve haplogrup tayini yapıldı (Tablo 3). Bu örneklerden B2C ve B30 bireyinin V7b, B6T bireyinin U5b, B14 bireyinin HV, B15 bireyinin HV0, 3B9P1 bireyinin HV0a haplogrubuna dahil olabileceği tespit edildi. İskeletlerden elde edilen DNA'ların spektrofotometre ile yapılan ölçümlerinde B2C, B30, B6T, B14, B15 ve 3B9P1 bireylerinin A230/280 oranına bakılarak (Tablo 2) sonuçlarının aDNA çalışmaları için uygun olduğu görüldü. Ölüm sonrasında meydana gelen DNA hasarı ve parçalanması aDNA çalışmalarında karşılaşılan en temel ve önemli sorundur (Paabo S. , 2004). Bununla beraber kontaminasyondan sakınmak ve aDNA çalışmalarının güvenilirliğini korumak için belirli kriterler oluşturulmuş ve uygulanmıştır (Cooper & Poinar, 2000) (Hofreiter, Serre, Poinar, Kuch, & Paabo, 2001). Ayrıca DNA izolasyonunun gerçekleştirildiği laboratuvarlarda hava filtreleme sistemleri, UV lambası, steril kıyafet ve pozitif hava basıncının bulunması başarı şansını arttıracaktır (Krause J. , 2010). Bu çalışmada adli bilimler ve aDNA çalışmalarında hızlı ve güvenilir sonuç vermesi nedeniyle sıklıkla tercih edilen Invisorb Spin Forensic Kiti kullanılmıştır. Bu kitin tercih edilmesinde von Wurmb, Meissner ve Wegener'in yaptıkları çalışmada (2001) gösterildiği üzere adli bilimlerde DNA izolasyonu ve sonrasındaki aşamalarda etkin sonuç vermesi önemli rol oynamıştır. Bununla beraber standart olarak uygulanan silika bazlı DNA izolasyonu protokolleri çoğunlukla 40 bp'den daha uzun molekülleri elde etmeye eğilimlidir (Rohland & Hofreiter, 2007) ancak son zamanlarda geliştirilen tekniklerle çok kısa DNA parçalarını hedefleyen izolasyon protokolleri geliştirilmiştir (Dabney, et al., 2013). Bu yöntemlerin yaygınlaşması aDNA çalışmalarında daha verimli sonuç alınmasını sağlayabilir.

Spektrofotometre ile DNA miktarı ve saflığı ölçümünde aDNA'nın yanı sıra bulunması muhtemel bakteri ya da mantar kökenli kontaminant DNA olabilir. 260 nm dalga boyunda yapılan ölçüm istenilen hassasiyete sahip olmayabilir. Pico Green gibi dsDNA'ya bağlanan ve hassasiyeti arttıran florasan boyaların kullanılması daha doğru ölçüm yapılmasını sağlayabilir (Singer, Jones, Yue, & Haugland, 1997).

Bu çalışmada, High Fidelity PCR Master Kiti kullanılarak TD-PCR yöntemi ile mtDNA'nın tamamı çoğaltıldı. TD-PCR yöntemi ile elde edilen sonuçların özgünlüğü, hassasiyeti ve ürün miktarında artış gözlenmiştir (Korbie & Mattick, 2008). Orlando ve arkadaşları (2002), mağara aylarının popülasyon genetiği üzerine yaptıkları çalışmada TD-PCR metodunda primerlerin kalıp DNA'ya bağlanma özgünlüğünün arttığını bildirmişlerdir. Henke (1997) betainin primerlerin bağlanma özgünlüğünü arttırdığını tespit etmiş ve bu çalışmada primerlerin kalıp bölgelere bağlanmasını arttırabilmek amacıyla kit prosedüründen farklı olarak H<sub>2</sub>O yerine 2.5 µl (stok 5M) betain (2-trimethylammonioacetate) eklenmiş ve TD-PCR yöntemiyle mtDNA'nın tamamının çoğaltılması sağlanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen PCR ürünleri DONE Genetik ve Biyoinformatik Anonim Şirketi tarafından Illumina MiSeq® platformunda yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak dizilenmiştir. Yeni nesil dizileme platformları kullanılarak dizilenen aDNA moleküllerindeki sitozin deaminasyonu, depürinasyonu ve parçalanma oranları hakkında doğrudan bilgi sahibi olmamızı sağlamaktadır. Örneğin ölüm sonrası hidrolitik hasarların pürin bazlarını hedef aldığı ve bu bazın eliminasyonu ve zincir kırıklarına yol açtığı tespit edilmiştir (Overballe-Petersen, Orlando, & Willerslev, 2012). Illumina platformu ile gerçekleştirilen yeni nesil dizileme uygulamaları sonunda yüksek verimle aDNA dizileri elde edildiği görülmüştür (Rizzi, Lari, Gigli, De Bellis, & Caramelli, 2012).

Yapılan çalışma sonunda Illumina platformunda yeni nesil dizileme teknolojisinin yüksek verimle ve etkili olarak uygulanmıştır. Bu çalışmada kullanılan altı örneğin birbirleri ve en yakın kök olarak alınan R0a ile olan ilişkileri MEGA7 programı kullanılarak neighbor-joining yaklaşımı ile çizildi. Neighbor-joining yaklaşımı Saitou ve Nei (1987) tarafından ortaya konulmuş ve uzun süredir mesafe temelli evrimsel ağaç çizimlerinden birisi olarak kabul görmektedir. Tlos antik kentinden elde edilen arkeolojik bulgular incelendiğinde, bu bölgede Neolitik dönemden Demir çağına kadar insan yerleşiminin izleri görüldüğü belirtilmiştir (Korkut, 2015). Çizilen evrimsel ağaçta örneklerin birbiri ile yakın ilişkide olması ve R0a haplogrubunun altından olmaları arkeolojik verileri desteklemektedir. Bu çalışmada yapılan haplogrup analizine göre B14 bireyi HV, B6T bireyi U5b, B15 bireyi HV0, 3B9P1 bireyi HV0a, B2C ve B30 bireyleri V7b haplogruplarına dahil oldukları görüldü ve Üst haplogrup olarak R0a tespit edildi (Tablo 3). R0a haplogrubu günümüzden yaklaşık olarak 28.900 ila 51,100 yıl öncesinde ortaya çıkmış ve Yakın Doğu ve Avrupa'daki insan mtDNA haplogrup çeşitliliğine köken olduğu bilinmektedir (Behar, et al., 2012). Schönberg ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2011), Avrupa'nın kolonizasyonunun yaklaşık 40.000 yıl önce gerçekleştiği ve bu dönemde Anadolu coğrafyasının önemli yollardan birisi olduğu belirtilmiştir. HV, HV0 ve HV0a haplogrupları ise günümüzden yaklaşık 20.000 yıl önce son buzul çağı öncesinde ortaya çıkmış ve günümüzde Avrupa ve Yakın Doğu'da haplogrup çeşitliliğinin yaklaşık olarak %40'ını oluşturmaktadır (Achilli & Rengo, 2004). U5b haplogrubu ve ait olduğu üst haplogrup olan U5 ise özellikle Batı Avrasya'da Mezolitik dönemde oldukça yüksek frekansta bulunduğu rapor edilmiştir (Brandt, Szecsenyi-Nagy, Roth, Alt, & Haak, 2014). Günümüzde ise bu haplogrubun mtDNA genetik havuzundaki oranı oldukça düşmüştür. Buna sebep olarak Nikitin ve arkadaşlarının (2017) raporladığı üzere Mezolitik dönemden Neolitik döneme geçiş esnasında oraya çıkan tarım temelli üretimin getirdiği çarpıcı ekonomik ve kültürel değişim gösterilebilir. Bu veriler göz önüne alındığında Mezolitik dönemdeki avcı-toplayıcı popülasyonuna özgü U5b haplogrubu ile Tlos antik kentinde karşılaşılması Likyalıların Anadolu'ya özgü bir halk olduğuna dair linguistik bulguları ve Korkut (2015) belirttiği üzere Likya halkının Hellen kökenli olduğu savının aslında Anadolu halklarını Hellenleştirmeye yönelik söylemler olduğunu desteklemektedir. V7b haplogrubu ise Sokolov ve arkadaşlarının (2016) belirttiği üzere Avrasya'da Neolitik dönemin başlarında yüksek oranda bulunan bir haplogruptur. U5b haplogrubu ile benzer sebeplerden günümüzde özellikle Doğu Avrupa'da düşük oranda bulunmaktadır. Bu çalışmada elde edilen bulgular ışığında Tlos (Fethiye/Muğla) kazılarında bulunan iskeletlerde yapılan analizlerde bulunan HV, HV0, HV0a ve V7b haplogrupları Korkut (2015)'un belirttiği arkeolojik verilere uyumlu olarak Neolitik dönemden Demir çağına kadar insan

yerleşiminin izlerini doğrular niteliktedir. U5b haplogrubunun bulunması ise henüz arkeolojik kayıtlarda olmayan Mezolitik dönem avcı-toplayıcılarının Neolitik dönemdeki tarım yapan insan popülasyonu ile kısmen kaynaştığını ve Tlos'taki insan mtDNA gen havuzuna katkıda bulduklarını göstermektedir. Bu çalışma Anadolu'ya özgü uygarlıkların geçmişlerinin ve kökenlerinin anlaşılması, arkeoloji ve antropoloji ile birlikte disiplinler arası yapılan ilk çalışmalardan biridir ve bu özelliği bakımından öncü niteliği vardır.

## Kaynakça

- Achilli, A., & Rengo, C. (2004). The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuce was a major source for the European gene pool. *American Journal of Human Genetics*, 910-918.
- Behar, D., van Oven, M., Rosset, S., Metspalu, M., Loogvali, E., Silva, N., et al. (2012). A Copernican Reassessment of the Human Mitochondrial DNA Tree from its Root. *The American Journal of Human Genetics*, 675-684.
- Brandt, G., Szecsenyi-Nagy, A., Roth, C., Alt, K., & Haak, W. (2014). Human paleogenetics of Europe-The known knowns and the known unknowns. *Journal of Human Evolution*, 1-20.
- Cooper, A., & Poinar, H. (2000). Ancient DNA: Do it right or not at all. *Science*, 289:530-531.
- Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M.-T., Weihmann, A., Nickel, B., et al. (2013). Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(39):15758-15763.
- Hagelberg, E., Hofreiter, M., & Keyser, C. (2015). Ancient DNA: The first three decades. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 370.
- Henke, W. (1997). Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acid Research*, 25:3957-3958.
- Higuchi, R. (1984). DNA Sequences from the Quagga, an Extinct Member of The Horse Family. *Nature*, 312, 282-284.
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H., Kuch, M., & Paabo, S. (2001). Ancient DNA. *Nat. Rev. Genet.*, 2:353-59.
- Korbie, D., & Mattick, J. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 1452-1456.
- Korkut, T. (2015, Kasım 20). *Tlos Kazıları*. <http://tloskazilari.com>
- Krause, J. (2010). From genes to genomes: What is new in ancient DNA? *Mitteilungen der Gesellschaft für Urgeschichte*, 11-33.
- Mullis, KB., Faloona, FA. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods of Enzymology*.
- Nikitin, A., Ivanova, S., Kiosak, D., Badgerow, J., & Pashnick, J. (2017). Subdivisions of haplogroups U and C encompass mitochondrial DNA lineages of Eneolithic-Early Bronze Age Kurgan populations of western North Pontic steppe. *Journal of Human Genetics*, 1-9.
- Orlando, L., Bonjean, D., Bocherens, H., Thenot, A., Argant, A., Otte, M., et al. (2002). Ancient DNA and the population genetics of cave bears (*Ursus spelaeus*) through space and time. *Molecular Biology and Evolution*, 1920-1933.
- Overballe-Petersen, S., Orlando, L., & Willerslev, E. (2012). Next-Generation sequencing offers new insights into DNA degradation. *Trends in Biotechnology*, 364-368.
- Paabo, S. (1985). Molecular Cloning of Ancient Egyptian Mummy DNA. *Nature*, 644-645.
- Paabo, S. (2004). Genetic Analyses from Ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.*, 38:645-79.
- Park, M. (2013). *Biological Antropology, 7th Edition*. McGraw-Hill.
- Rizzi, E., Lari, M., Gigli, E., De Bellis, G., & Caramelli, D. (2012). Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genet. Sel. Evol.*, 21-44.
- Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc.* 2, 1756-1762.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 406-425.
- Schönberg, A., Theunert, C., Li, M., Stoneking, M., & Nasidze, I. (2011). High-throughput sequencing of complete human mtDNA genomes from the Caucasus and West Asia: High diversity and demographic inferences. *European Journal of Human Genetics*, 988-994.

- Singer, V., Jones, L., Yue, S., & Haugland, R. (1997). Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Anal Biochem*, 228-238.
- Sokolov, A., Nedoluzhko, A., Boulygina, E., Tsygankova, S., Sharko, F., Gruzdeva, N., et al. (2016). Six complete mitochondrial genomes from Early Bronze Age humans in the North Caucasus. *Journal of Archaeological Science*, 138-144.
- Stoneking, M. (2008). Human Origins. *EMDB Reports*, 46-50.
- Temizkan, G. (2014). *Moleküler Genetik*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
- von Wurmb, N., Meissner, D., & Wegener, R. (2001). Influence of cyanoacrylate on the efficiency of forensic PCRs. *Forensic Sci. Int.*, 15;124(1).11-6.

