

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/338146914>

Antik DNA (aDNA) Çalışmalarından Elde Edilen Bilgiler

Article · January 2017

CITATION

1

READS

3,258

1 author:



[Ali Akbaba](#)

Muş Alparslan University

9 PUBLICATIONS 67 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Antik DNA (aDNA) Çalışmalarından Elde Edilen Bilgiler

Information Obtained from Ancient DNA (aDNA) Studies

Ali AKBABA^a

^aAntropoloji Bölümü,
Paleoantropoloji AD,
Ankara Üniversitesi
Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi,
Ankara

Geliş Tarihi/Received: 27.03.2017
Kabul Tarihi/Accepted: 15.06.2017

Yazışma Adresi/Correspondence:
Ali AKBABA
Ankara Üniversitesi
Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi,
Antropoloji Bölümü,
Paleoantropoloji AD,
Ankara, TÜRKİYE
akbaba2016@gmail.com

ÖZET İnsanları birbirinden ayırt etmek için moleküler düzeyde kullanılan ilk biyolojik belirteç 20. yüzyılın başlarında Karl Landsteiner tarafından keşfedilen A, B, AB ve O kan gruplarıdır. Yüzyılın ortalarında, canlıların yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi için gerekli tüm genetik kodu içeren deoksiribonükleik asit (DNA) molekülünün çift sarmallı yapısının James Watson ve Francis Crick tarafından keşfi ve aynı yüzyılın son çeyreğinde iz miktardaki DNA parçasının istenilen oranda çoğaltılmasına olanak sağlayan polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) Kary B. Mullis tarafından keşfi, moleküler biyoloji ve genetik bilim dallarında çok önemli sıçramalar yaratarak yeni teknolojilerin ve yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Geliştirilen bu yeni teknoloji ve yöntemler, moleküler biyoloji ve genetik bilim dalları ile paralel bir gelişim gösteren ve çok disiplinli olan moleküler antropoloji, adli antropoloji ve adli bilimlerinde lokomotifini oluşturarak bu alanlara çok önemli katkılar sağlamıştır. Antik DNA (aDNA)'da hem bu alanlarda geliştirilen yöntem ve teknolojileri kullanarak hem de kendi çalışma alanına özgü yeni teknik ve yöntemler yaratarak canlıların moleküler geçmişlerine ışık tutmaktadır. Başta kontaminasyon olmak üzere aDNA çalışmaları kısıtlayan birtakım zorlukları bulunmakla birlikte bu alandaki çalışmalar başta günümüz modern insanı (*Homo sapiens*) olmak üzere birçok canlı türünün moleküler geçmişine ışık tutarak bu türlerin zaman içindeki evrimsel değişimlerini anlamamızı kolaylaştırmaktadır. Evrim ve filogenetik ilişkiler, kimliklendirme, soy ve akrabalık ilişkileri, cinsiyet tayinleri, hastalıkların kökeni ve yayılımı, soyu tükenmiş canlıların biyolojik özellikleri ve canlıların göç yollarının belirlenmesi aDNA'nın başlıca çalışma konularıdır.

Anahtar Kelimeler: Antik DNA; kontaminasyon; kimliklendirme; göç ve akrabalık; evrim

ABSTRACT The first biomarker used at the molecular level to distinguish humans from each other is the A, B, AB and O blood groups discovered by Karl Landsteiner in the early 20th century. The discoveries of the double-stranded structure of deoxyribonucleic acid (DNA) molecule, which contains all the necessary genetic code for survival of living things, by James Watson and Francis Crick in mid-century, and the polymerase chain reaction (PCR), which allowed the desired part of DNA to be amplified, by Kary B. Mullis in the last quarter of the same century, facilitated the development of new technologies and methods by creating very important leaps in molecular biology and genetics. These newly developed technologies and methods have made, by creating a locomotive force, very important contributions to molecular anthropology, forensic anthropology and forensic sciences, that have been developing in parallel with the fields of molecular biology and genetics. Ancient DNA sheds light on the molecular histories of living things, by using the methods and techniques developed in these fields and also by conceiving new techniques and methods specific to its specific field of study. Although there are some inherent difficulties in aDNA studies, contamination being the most emphasized, these studies make it easier to understand the evolution changes in many species, especially modern humans (*Homo sapiens*), over time by enlightening their molecular history. Evolution and phylogenetic relationships, identification, kinship analysis, gender determinations, the origins and spread of diseases, biological characteristics of extinct life forms and determination of migratory pathways of some species are the main topics of aDNA studies.

Keywords: Ancient DNA (aDNA); contamination; identification; migration and kinship; evolution

aDNA ÇALIŞMALARI VE KARŞILAŞILAN PROBLEMLER

aDNA terimi, genellikle 100 nükleotit çiftinden daha kısa uzunluklara parçalanmış ve ölüm sonrası çeşitli kimyasal reaksiyonlar nedeni ile kendine özgü değişimler (sitozin bazının timine dönüşmesi gibi) biriktirmiş; ölü bir organizmaya ait yumuşak dokulardan, iskelet kalıntılardan ya da fosillerden elde edilen DNA anlamına gelir. aDNA çalışmaları, 1984 yılında Russell Higuchi ve ark.nın guagga olarak bilinen soyu tükenmiş bir zebra türüne (*Equus quagga quagga*) ait müze örneğinden aDNA izole etmeleri ile başlamıştır. Moleküler çalışmalarda yeni bir süreç başlatan bu gelişmeden yaklaşık bir yıl sonra Svante Pääbo bir insan mumyasından DNA izole ettiğini bilim dünyasına duyurmuştur. Bu gelişmelere PZR teknolojisinin de eklenmesi ile aDNA çalışmaları, arkeolog ve antropologların canlıların geçmişini aydınlatmak amacı ile yaptıkları çalışmalara yepyeni bir yöntem sağlayarak moleküler çalışmalar içerisinde kendine önemli bir alan yaratmıştır.¹⁻⁵

aDNA alanında özellikle son yıllarda etki faktörü yüksek çalışmaların sayısında ciddi bir artış olmakla birlikte bu alandaki araştırmaları kısıtlayan bir takım problemlerde mevcuttur. Bu problemleri genel olarak iki temel başlık altında toplamak mümkündür. Bunlardan birincisi, zamanın yıkıcı etkisi ve kötü çevresel koşullardan kaynaklanan DNA molekülündeki parçalanma ve bozulmalar, ikincisi de kontaminasyon nedeni ile aDNA'nın özgünlüğünün bozulmasıdır.^{4,6,7}

ADNA'NIN PARÇALANMASI VE BOZULMASI

Canlıların ölümünden sonra dokularda meydana gelen kimyasal bozulmalara bağlı olarak DNA'nın yapısında da değişimler olur. Ölümünden saatler ya da haftalar sonra endonükleazların ürettiği otolizler tarafından başlatılan bu bozulmalar oksidatif ve hidrolitik etkilerle devam eder. Bu faktörlerin birikerek artması ve özellikle de serbest dolaşımli mikro organizmaların devreye girmesi DNA'nın yoğunluğunun ve özgünlüğünün zamanla azalmasına neden olur. aDNA'nın korunma durumu antik kalıntının yaşına ve içinde bulunduğu çevresel koşullara bağlıdır. Nemin az olduğu, sıcaklığın düşük olduğu, nötr ya da hafif bazik pH'lı ortamlar aDNA'nın korunması için en ideal koşulları sağlar. Bu ideal koşullar altında aDNA'nın en fazla ne kadar süre korunacağına dair farklı görüşler bulunmakla birlikte şimdiye kadar elde edilmiş en eski aDNA, Kanada'da 700 bin yıl öncesine tarihlendirilmiş donmuş toprak içerisinde çıkartılan at kemikle-

rinden, insana ait izole edilmiş en eski aDNA da İspanya'da yaklaşık 400 bin yıl öncesine tarihlendirilmiş "Kemik Çukuru" olarak adlandırılan mağara sisteminde bulunmuş kemiklerden elde edilmiştir.⁸⁻¹²

KONTAMİNASYON PROBLEMİ

Yüksek teknolojik donanımların ve multidisipliner bilgi birikiminin gerekli olduğu aDNA çalışmaları genel olarak üç safhadan oluşmaktadır. Bunlar:

1. Antik kalıntıların topraktan çıkarıldığı kazı safhası
2. Antik kalıntıdan aDNA'nın izole edildiği ve çoğaltıldığı PZR safhası
3. aDNA'yı dizileme ve elde edilen verileri değerlendirilme safhası.

aDNA çalışmalarının her bir safhasının kendine özgü zorlukları bulunmakla birlikte, sürecin tamamını etkileyen ve ilk iki safhada ortaya çıkan en büyük sorun dilimize kirlenme olarak çevirebileceğimiz kontaminasyondur. En genel anlamı ile aynı ya da yakın türlere ait güncel DNA'nın aDNA'ya bulaşması olarak tanımlayabileceğimiz kontaminasyon, aDNA çalışmalarının başladığı yıllardan beri özellikle de insanı konu alan çalışmalarda ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla da kontaminasyonun ortadan kaldırılması bu alandaki çalışmalar için öncelikle dikkate alınması gereken bir sorun niteliği taşımaktadır.¹³

aDNA çalışmalarının, insan, bitki, hayvan ve bakteri aDNA'sı olmak üzere odaklandığı farklı canlı grupları bulunmaktadır. Kontaminasyonun kaynağı da büyük ölçüde çalışmanın konusunu oluşturan bu türlere ve çalışmanın amacına bağlı olarak değişmektedir. İnsanı konu alan çalışmalarda, antik örneklerin toplandığı alandan laboratuvar içine kadar çalışmanın yapıldığı bütün mekanlar, kullanılan araç ve gereçler kontaminasyon kaynağıdır. Bitki ve hayvan aDNA'ları çalışırken kontaminasyona genellikle kalıntının morfolojik tanımlanması sürecinde karşılaştırma yapmak için kullanılan aynı türün güncel örnekleri neden olmaktadır. Bakteri aDNA'sı çalışmalarında ise antik örneğin içerisinde bulunduğu toprak ve yakın çevresi aynı zamanda da aynı türün güncel örnekleri kontaminasyon kaynağıdır. Binlerce yıllık örneklerin iz miktarda DNA içermeleri nedeni ile kendi içlerinde kontamine olma olasılıkları oldukça düşüktür. PZR sürecinde antik DNA'nın çoğaltılması için türe özgü primerler kullanıldığından farklı türler arasında gerçekleşebilecek kontaminasyon bu süreçte nispeten önlenmektedir. Ancak insan aD-

NA'sını konu alan çalışmalarda, hem kullanılan örneğin insana ait olması hem de çalışanın insan olması nedeni ile kontaminasyon riski diğerlerinden çok daha fazladır.^{14,15}

aDNA çalışmalarında kontaminasyonun önlenmesi ve ortadan kaldırılması ile ilgili en etkili yöntemler, önem sıralamaları değişmekle birlikte bu alanda yapılan farklı birçok çalışmada maddeler halinde sıralanmaktadır. Bu çalışmalara göre kontaminasyonun engellenmesi için alınan önlemleri iki başlık altında toplamak mümkündür. Bunlardan birincisi antik kalıntıların toplandığı kazı safhasında alınması gereken kontaminasyon önlemleri ve ikincisi aDNA'nın izole edilerek çoğaltıldığı laboratuvar içi kontaminasyon önlemleridir.^{11,13-20}

I. Kazı Alanında Antik Malzemenin Toplanması Sürecinde

Alınacak Kontaminasyon Önlemleri;

1. Mümkün olduğunca az personelle çalışılmalıdır; çünkü antik kalıntıya ne kadar çok temas olursa kontaminasyon riski de o derece artmaktadır.

2. aDNA'nın daha sonradan özgünlüğünün test edilebilmesi için kazı alanında bulunan bütün personelin referans DNA'ları alınmalıdır.

3. Hedef aDNA'yı kontamine DNA'dan ayırmak için kazı alanında bulunan diğer hayvan ve bitki türlerine ait örneklerde toplanmalıdır.

4. aDNA'nın korunma durumunun belirlenmesi için kazı alanının çevresel şartları, iklimi ve toprak yapısı bilinmelidir.

5. Antik örnekler, içinde gerekli malzemelerin bulunduğu "aDNA Numune Toplama Kiti" yardımı ile toplanmalıdır. Bir aDNA numune toplama kitinde olması gereken malzemeler; koruyucu kıyafet, tek kullanımlık eldivenler, saç filesi, maske, temiz kâğıt torbalar, alüminyum folyo, kapanabilir plastik torba, çamaşır suyu çözeltisi, temiz kazı araç ve gereçleridir.

6. Antik numuneler topraktan çıkartılırken;

■ aDNA çalışmaları için seçilen kemikler alüminyum folyo içine sarılmalı ve doğal kurutma için temiz bir kâğıt torbaya konulmalıdır.

■ Bir numuneden diğerine geçerken kullanılan araç ve gereçler değiştirilmelidir.

■ Oksidatif ve hidrolitik hasarlara neden olmamak için aDNA analizi için belirlenen numuneler su ya da herhangi bir kimyasal ile temizlenmemelidir.

■ Antik numunelere herhangi bir koruyucu kimyasal madde eklemekten kaçınılmalıdır.

7. Antik DNA'nın elde edileceği kalıntılar; serin ve kuru ortamlarda, güncel numunelerden ayrı olarak, tamamen kuruduklarından emin olunduktan sonra ayrı ayrı plastik kaplarda ya da tüplerde saklanmalıdır.

8. Çalışmalarda kullanılan antik kalıntılar iki şekilde elde edilmektedir. Bunlardan birincisi kalıntının topraktan çıkarıldığı anda toplanması, ikincisi ise önceki kazılardan elde edilmiş, müze ve üniversitelerde depolanan antik kalıntıların kullanılmasıdır. Önceden çıkarılmış ve depolanmış örneklerle çalışılması durumunda dikkat edilmesi gereken hususlara bakıldığında;

■ Öncelikle numuneler üzerinde yapılan çalışmaların kısa bir tarihçesine ulaşılmalıdır.

■ Kontaminasyon önlemleri en başından alınmıyorsa bu alandaki arkeolog ve antropologların sonradan bu önlemleri almasına gerek yoktur ve hatta sonradan müdahale ayrıca bir kontaminasyon kaynağıdır.

II. Laboratuvar İçi Kontaminasyon Önlemleri

1. aDNA çalışmaları iki ayrı laboratuvar da gerçekleştirilmelidir. Bunlardan ilki DNA izolasyonu ve PZR hazırlık süreçlerinin tümünü kapsayan aDNA laboratuvarı (pre-PCR), ikincisi PZR işleminin ve sonraki işlemlerin gerçekleştirildiği standart bir moleküler genetik laboratuvarıdır (post-PCR). Laboratuvarlar arasındaki zorunlu mekânsal ayrım özellikle iki mekân arasında kontaminasyona neden olabilecek modern DNA'nın taşınmasını engellemek için çok önemlidir. Bununla birlikte aDNA laboratuvarı aDNA çalışmalarının yapılabilmesi için özel ekipman ve araçlarla donatılmalı ve sadece antik DNA çalışmaları için kullanılmalıdır.

2. Çalışma mümkün olduğunca kısa bir sürede ve az personelle yapılmalıdır.

3. Kontaminasyona neden olmamak için laboratuvar teknisyenleri özel koruyucu kıyafetler giyinmelidir.

4. Tezgâh, araç ve gereçler %1 çamaşır suyu ile silinmelidir.

5. Oluşabilecek kontamine DNA'ların yok edilmesi için ortam ultraviyole ışınlarla filtrelenmelidir.

6. aDNA analizi için seçilen örneklerin kazı alanında, taşınırken veya toprak altında kontaminasyona maruz kalabileceği göz önünde bulundurulmalı ve çalışılacak bu materyallerin kirlenmiş yüzeyleri temizlenmelidir.

7. Antik kalıntıların kesilmesi esnasında oluşacak hasar minimize edilmelidir.

Yukarıda belirtilen kontaminasyon önlemleri bu alanda çalışan birçok araştırmacı tarafından kabul görmekle birlikte uygulamada ortaya çıkan farklılıklar çalışmaların sonuçlarını doğrudan etkilemektedir. Bundan dolayı da aDNA'nın özgünlüğünün sınanması için ikinci bir laboratuvar da analizlerin tekrarlanması önerilmektedir. Aynı zamanda biyoinformatik alanında geliştirilen yöntemlerle de kontaminasyonun varlığı ve oranı belirlenebilmektedir.²¹

aDNA KAYNAĞI OLARAK KULLANILAN DOKULAR

aDNA'yı her türlü örnek ve dokudan izole etmek mümkün olmakla birlikte aDNA için en olası kaynaklar kemikler, dişler, kurumuş hayvan ve bitki dokuları, yumuşak dokular ve mumyalaşmış dokulardır. Bu dokular, aDNA'nın korunması ve verimliliği bakımından tercihe göre sıralandığında önceliği son yıllarda yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılan iç kulaktaki petrous (timpanik) kemiği almaktadır. Petrous kemiğini dişler, diğer kemik parçaları ve yumuşak dokular takip etmektedir. Aynı zamanda dışkı gibi daha az belirgin kaynaklarda diğerleriyle eşit oranda önemli bir aDNA kaynağı olabilir. Sonuç açısından başarı oranları değişmekle birlikte biyolojik kökenli herhangi bir madde aDNA elde etmek için potansiyel bir kaynaktır.^{9,21,22}

Kemik, diş ve diş minesi dokusunun inorganik yapısını oluşturan ve bu dokular içerisindeki DNA'nın bozulmasını yavaşlatan kalsiyum fosfat esaslı hidroksiapatit bileşenin varlığı bu dokuların aDNA çalışmalarında tercih edilmelerini sağlamaktadır. Deneysel sonuçlar kemikten elde edilen aDNA verimliliğinin yumuşak dokudan elde edilenden daha fazla olduğunu desteklemektedir. Küçük kemiklerden parçacıklar ya da uzun kemiklerden sondaj veya kesitler alınarak elde edilen 100-200 mg'lık kemik tozu aDNA çalışması için genellikle yeterlidir. Kemik dokular kullanılırken bunlardan lezyonsuz olanlar seçilmelidir; çünkü lezyonlar kontaminasyon için ciddi bir kaynak oluştururlar.^{15,17,21,23-25}

aDNA izole etmek için kaynak olarak yumuşak dokuların kullanılması durumunda, öncelikle yüzeyle teması olmayan ve kurumuş haldeki yumuşak doku örnekleri seçilmelidir. Kurumuş haldeki yumuşak dokuda sıvı oranının düşük olması dokuyu ve dolayısıyla da DNA'yı suyun ya da nemin neden olduğu hidrolitik zararlardan koruyabilir.¹⁶

Koruyucu mine tabakasından dolayı iskeletin en sert kısmını oluşturan dişler, canlıların geçmişine dair biyolojik bilgileri en korunaklı şekilde saklamaları ve sa-

yıca fazla olmaları nedeni ile paleontoloji, antropoloji, moleküler antropoloji, arkeoloji ve adli bilimler için son derece önemli bir veri kaynağıdır. Yüksek ısı, nem, mantar ve bakteriyel faaliyetler gibi kötü çevresel koşullara diğer iskelet dokularından daha fazla dayanıklı olmaları dişleri aDNA için önemli bir kaynak haline getirmektedir. Dişlerin bu korunma durumu sadece toprak altında değil aynı zamanda laboratuvar gibi farklı ortamlarda da güncel DNA'nın antik DNA'ya bulaşmasını engelleyerek kontaminasyon riskini azaltır. Dişin mine tabakası hariç, pulpa odacığı, dentin, ve sement kısımları farklı miktarlarda DNA barındırmaktadır. aDNA çalışmasında kullanılacak olan dişin çürüksüz ve kök kısmının sağlam olması DNA'nın korunması ve özellikle de kontaminasyonun önlenmesi açısından çok önemlidir. Bundan dolayı da henüz tam olarak büyümesini tamamlamamış bir dişin kullanılması tercih nedenidir. Dişten aDNA elde edebilmek için yaygın olarak üç yöntem kullanılır. Bu yöntemlerden birincisi dişin tamamen toz haline getirilmesi, ikincisi dişten kesit alınması ve son olarak ters kök kanal metodu veya doğru giriş kanal metodu ile dişin iç kısmındaki pulpa ve dentine girilmesi yöntemleridir. Dişlerin, paleontoloji ve antropoloji gibi bilim dalları için çok önemli bir veri kaynağı olması genel morfolojilerinin de korunmasını zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle de ters kök kanal metodu veya doğru giriş kanal metodu dişin sonradan tekrar morfolojik çalışmalarda kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Ancak bu yöntem içerisinde kullanılan ve dişin pulpa ve dentinine girilmesini sağlayan ters kök kanal metodu (dişin içine kök kısmından girilmesi) ve doğru giriş kanal metodu (dişin içine taç kısmından girilmesi) teknikleri kendi içerisinde değerlendirildiğinde, doğru giriş kanal metodunun diş morfolojisinin korunması ve DNA verimliliği açısından daha uygun olduğu belirtilmektedir.^{7,20,26-31}

aDNA ÇALIŞMALARININ KONULARI

Son yıllarda aDNA yayınlarının sayıca çok artmış olması bu alana büyük ilgi olduğunu göstermektedir. Özellikle geliştirilen yüksek kapasiteli dizileme teknolojileri ve biyoinformatik yöntemler, insan ve hayvan genomlarının tümünün dizilenmesi ve hızlı sonuçların alınabilmesi için gerekli olan maliyet ve zamanı büyük ölçüde azaltmıştır. aDNA çalışmalarında geliştirilen ve geliştirilmeye devam edilen bu yeni teknoloji ve yöntemler doğayı ve biyolojik çeşitliliği daha iyi anlamamıza olanak sağlamaktadır.^{9,32}

aDNA çalışmalarının konuları çalışmanın amacına, seçilen örneğin türüne ve kullanılacak moleküler belir-

teçlere göre değişmektedir. Bu çalışma konuları ve kullanılan moleküler belirteçler Tablo 1’de verilmiştir. Bunlardan kimliklendirme, cinsiyet tayini, soy ve akrabalık ilişkileri konuları doğrudan adli antropoloji ve adli bilimlerinde çalışma alanına girmektedir.³³

KİMLİKLENDİRME

Morfolojik analizlerle kimliklendirmenin yapılamadığı deprem ve tsunami gibi doğal afetler, uçak kazaları ve savaşlar gibi çok ya da eksik parçalı iskeletlerin bulunduğu toplu ölümlerde kimliklendirme yapmak için aDNA analizleri ideal bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Bu kemiklerden elde edilen aDNA daha önceden kayıp kaydı bulunan kişilerin eşyalarından ya da akrabalarından alınmış referans DNA’lar ile veya ilgili kurumlar tarafından oluşturulmuş DNA veri bankalarındaki örnekler ile karşılaştırılarak kimliklendirme yapılabilir. Adli genetikte de benzer yöntemlerle benzer konular çalışılmakla birlikte aDNA analizlerini bu çalışmalardan ayıran en önemli fark, aDNA analizlerde izole edilen DNA uzunluğunun 100 -300 baz çiftinden daha kısa olmasıdır. Çok az miktarlarda elde edilen bu DNA kontamine olmuş olabilir ve biyokimyasallar veya PZR inhibitörleri nedeni ile çoğaltılmayacak hale gelebilir.^{9,34}

aDNA analizleri, mezarı ya da iskeleti kayıp önemli tarihi kişilerin kalıntılarının bulunmasını ve bazı gizemli tarihsel olayların açığa çıkmasını da sağlamaktadır. Bu duruma en iyi örnek Rusya’nın son Çarı Romanow ailesinin 1918’de kaybolan kalıntılarının 1996 yılında yapılan aDNA çalışmaları sayesinde bulunmasıdır. Benzer şekilde Temple’de 1795’de ölmüş olduğu bilinen Normandiya dükü XVII. Louis’e ait kalıntılardan elde edilen mtDNA analizleri ile XVII. Louis’in, XVI. Louis ve Kraliçe Marie Antoinette’nin oğlu olmadığı belirlenmiştir.^{9,35}

CİNSİYET TAYİNLERİ

Antropolojik veya arkeolojik kazı alanlarında çıkarılan insan kalıntılarında cinsiyet tayinleri; cinsiyetler arasındaki ölüm oranlarının, hastalık dağılımlarının, diyet ve sosyo-ekonomik durumun, evlilik ve defin şekillerinin belirlenmesini sağlayarak geçmiş toplumların sosyal yapısının anlaşılmasında önemli rol oynar. Geleneksel yöntemlerle insan iskeletlerinden cinsiyet tayinleri, kemiklerin morfometrik analizleri ve göreceli olarak iskelet ile birlikte bulunan mezar kalıntıları aracılığı ile yapılmaktadır. Ancak bu geleneksel yöntemlerin uygulanamadığı bebek, çocuk, çok ya da eksik parçalı yetişkin

TABLO 1: aDNA çalışmalarında konu, amaç ve kullanılan başlıca moleküler belirteçler.³³

Konu	Amaç	Kullanılan Başlıca Moleküler Belirteçler
Kimliklendirme	- Doğal afetler, kazalar ve savaşlar nedeniyle meydana gelen toplu ölümlerde, bütünlüğü bozulmuş çok ya da eksik parçalı insan iskeletlerinde kimliklendirme yapmak - Bazı şüpheli tarihsel olayların aydınlatılması	Otozomal DNA Cinsiyet kromozomları (X ve Y)
Cinsiyet Tayini	- Öncelikle bebek ve çocuk olmak üzere morfolojik olarak cinsiyeti belirlenemeyen insan iskeletlerinde cinsiyetin belirlenmesi - Cinsiyetler arasındaki ölüm oranlarının, hastalık dağılımlarının, diyet ve sosyo-ekonomik durumun belirlenmesi - Evlilik ve defin şekillerinin anlaşılması	X ve Y kromozomları Amelogenin SRY STS
Soy ve Akrabalık İlişkileri	- Geçmişe dönük soy hattının izlenmesi - Sosyal yapı ve statünün belirlenmesi - Evlilik biçimlerinin ve ölü gömme geleneklerinin belirlenmesi	Mitokondrial DNA (mtDNA) Y- kromozomu Otozomal DNA
Nüfus Hareketleri ve Göçler	- Tarih öncesi nüfus hareketlerinin belirlenmesi - Antik popülasyonlar arasındaki ata torun ilişkilerinin belirlenmesi - Göçleri, göç yönlerini ve nedenlerini anlama	mtDNA, X ve Y kromozomları Otozomal DNA
Filogenetik Çalışmalar	- Türlerin evrimsel ilişkilerinin belirlenmesi - Modern insanın kökenini anlama.	mtDNA X ve Y kromozomları Otozomal DNA
Hayvan ve Bitki aDNA Çalışmaları	- Soyu tükenmiş canlıların biyolojik özelliklerinin belirlenmesi - Hayvan ve bitkilerin evcilleştirilme süreçlerinin ve buna bağlı olarak oluşan göç hareketlerinin belirlenmesi - Geçmişe dair beslenme alışkanlıklarının belirlenmesi - Çevresel koşulların belirlenmesi - İnsanlarla aynı ortamda yaşayan hayvan ve bitki türlerinin belirlenmesi - Hastalıklara sebep olan bakterilerin kökenlerinin belirlenmesi	mtDNA Kloroplast Otozomal DNA

iskeletlerinde cinsiyetin belirlenmesi için X ve Y kromozomlarına özgü DNA analizleri ideal bir çözüm sağlar. aDNA çalışmalarında cinsiyet tayinleri uygun cinsiyet belirteçleri kullanılarak yapılmaktadır. Cinsiyet belirlemede kullanılan PZR temelli en yaygın yöntemlerden biri amelogenin (*AMEL*) gen amplifikasyonu yöntemidir. Diş minesinin gelişiminde rol oynayan önemli bir proteini kodlayan amelogenin, insanlarda X ve Y kromozomları (Yp11.2, Xp22.31-p22.1) üzerinde yer alır ve cinsiyet belirlemede kullanılan yüksek derecede polimorfik amelogenin intron dizi homolojileri içerir. Yöntemin temeli, özel olarak geliştirilen amelogenin PZR primer çiftleri kullanılarak X ve Y kromozomları (106 ve 112 baz çifti) için uzunluk dimorfizimlerinin belirlenmesine dayanmaktadır. Tek bant örneğin dişi bir bireye, iki bant ise örneğin erkek bir bireye ait olduğunu göstermektedir. Ancak amelogenin gen bölgelerinde allel kaybına neden olabilecek mutasyonların varlığında, hücrede kromozom sayısının diploid sayıdan bir ya da birden fazla eksik olduğu anöploidi durumunda, hermafroditizm durumunda ve baskın kadın profillerinde bu yöntemin uygulanmasında sorunlar olduğu belirtilmektedir. Bu gibi durumlarda amelogenin ile birlikte Y kromozomu için SRY (sex-determining region Y), X kromozomu için DXZ4 hedef bölgelerinin genetik belirteçler olarak kullanılması önerilmektedir. SRY geni erkeklerde testislerin oluşumunu kodlar ve Y kromozomunun (Yp11.3) kısa kolu üzerinde bulunur. SRY geninden 93 baz çiftlik tek bir gen bölgesinin belirlenmesi erkeğe ait özgün bir DNA'yı dişi bir bireye ait DNA örneğinden ayırmaktadır. Genel olarak Y kromozomuna dayalı bu güncel yöntemlere alternatif olarak X kromozomu sayısının analizine dayalı kopya sayısı varyasyonunu (Copy Number Variation=CNV) belirleme yöntemi de mevcuttur.^{33,36-42}

Cinsiyet analizleri, farklı cinsiyetteki bireylerin ölüm oranlarının test edilmesi bakımından önemlidir. Böylece durumun doğal olarak mı yoksa insan faaliyetiyle mi gerçekleştiği belirlenmektedir. Bebek iskeletlerinin önemi hem mezar tipinin anlaşılması hem de cinsiyet farklılıklarının bir infantisit (kendi çocuğunu öldürme) veya çocuk kurbanı olayında rolünün olup olmadığı sorusunun cevaplanması açısından önemlidir. Ashkelon'da (İsrail) 4. ve 6. yüzyıllar arasında genelev olarak işletilen bir Roma hamamının altındaki kanalizasyonda bulunan bebek iskeletleri üzerinde aDNA ile yapılan cinsiyet tayinleri bu iskeletlerin %74'ünün erkek bebeklere ait olduğunu göstermiştir. Erkek bebeklerin ölüm oranının %74 gibi yüksek bir oranda olması kız çocuklarının daha az önemsendiği bilinen bu toplumda bebeklerin ölüm nedenleri ile ilgili farklı senaryoların

ortaya atılmasına neden olmuştur. Bu senaryolardan en ilginç olanı, bebek kalıntılarının bu dönemde genelev olarak kullanılan bu hamamda çalışan kadınlara ait olduğu ve kadınların bilinçli olarak erkek çocuklarını öldürüp kız çocuklarının yaşamalarına izin vermeleriydi. Burada cinsiyetler arasında bir tercihin olduğu ve kız çocuklarının bundan dolayı hayatta tutuldukları belirtilmektedir.³³

SOY VE AKRABALIK İLİŞKİLERİ

Soy ve akrabalık analizlerinde, anasal ve babasal soylar mtDNA ve Y kromozomu kullanılarak ortaya çıkarılabilmektedir. Eğer uzun ve birbirinden çok farklı DNA bölgeleri dikkatle gözden geçirilecek olursa bireylerde görülen ortak mutasyonların bireyler arasındaki yakınlık derecesine işaret ettiği görülmektedir. Mayotik bir mutasyon olmadığı taktirde, dişi bir birey aynı mtDNA mutasyonunu annesi, teyzesi, dayısı ve anne tarafından kuzenleriyle paylaşır. Erkekler de yine benzer şekilde, mayotik bir mutasyon olmadığı sürece aynı Y kromozomu mutasyonunu babası, amcası, erkek kardeşleri ve baba tarafından kuzenleriyle paylaşır. Ortaçağ İngiltere'sinde yaşamış olan Kral III. Richard'ın iskeleti üzerinde yapılan aDNA analizleri bu konuda yapılan çalışmalar için ideal bir örnektir. İngiltere kralı olan ve 1485 yılında Tudor hanedanlığının İngiliz kraliyetini ele geçirdiği Bosworth Savaşı'nda 32 yaşındayken hayatını kaybeden III. Richard'ın Leicester'da Greyfriars isiminde bir manastırda gömüldüğü bilinmekteydi. Fakat 1538'de manastırın tasfiye edilmesinden sonra kralın mezarı kaybolmuştur. Leicester Üniversitesi'nden bir ekip tarafından 2012 yılında III. Richard'ın mezarını bulmak için manastırın üstüne yapıldığı düşünülen bir otopark alanında kazı başlatılmıştır. Kazılar sonucunda manastıra ve III. Richard'a ait olabilecek bir iskelete ulaşılmıştır. İskeletten alınan aDNA örnekleri III. Richard'ın günümüzde yaşayan akrabalarıyla karşılaştırılmıştır. Anne soy hattının izlenilmesi için mtDNA, baba soy hattının izlenmesi için de Y kromozomu çalışılmış ve Kral III. Richard'ın mtDNA'sının, yaşayan akrabalarıyla eşleştiği ancak Y kromozomunun yaşayan akrabalarından farklı olduğu belirlenmiştir. Babadan geçen Y kromozomunun farklı olması 500 yıllık bir dönem içinde kraliçelerden birinin kral soyundan gelmeyen başka bir erkeğin çocuğunu doğurduğunu göstermektedir. Araştırmacılar ayrıca III. Richard'ın saç ve göz rengini belirlemek için diğer genetik özellikleri de incelemiş ve elde edilen sonuçlar Kral III. Richard'ın muhtemelen sarı saçlı ve mavi gözlü olduğunu ve bu tipolojinin de kralın o dönem çizilmiş resmi ile örtüştüğünü ortaya koymuştur.^{43,44}

NÜFUS HAREKETLERİ VE GÖÇLER

Günümüz modern insanının (*Homo sapiens*) yaklaşık 200 bin yıl önce Afrika'da ortaya çıktığı ve zamanla tüm kıtalara yayıldığı antropolojik, arkeolojik ve genetik çalışmalarla bilinmektedir. Avcı-toplayıcı yaşam biçimine sahip bu insanlar günümüzden 12 bin yıl önce tarıma başlamış, bitkileri ıslah etmiş, hayvanları evcilleştirmiş ve yerleşik hayata geçmişlerdir. Bereketli Hilal'de günümüzden 12000-11000 yıl önce başlayan Neolitik Devrim yaklaşık 10500-10300 yıl önce Orta Anadolu'ya oradan 10000-8600 yıl önce Kuzeybatı Anadolu ve Ege kıyısına ve oradan da 8000-9000 civarlarında Avrupa'ya ulaşmıştır. Neolitikleşme olarak adlandırılan bu sürecin nasıl gerçekleştiğine ve yayıldığına ilişkin cevaplanması gereken birçok soru olmakla birlikte bu sorulardan özellikle iki tanesi aDNA çalışmalarında ön plana çıkmaktadır. Bunlardan birincisi, Ortadoğuluların Avrupalıların atası olup olmadığı ikincisi de Avrupa'da tarımın ne zaman ve kimler tarafından başlatıldığı ve yayıldığıdır. Bu konularla ilgili arkeolojik, antropolojik ve genetik veriler ışığında birçok farklı görüş bulunmaktadır. Bu görüşlerden en çok tartışılanları; Bereketli Hilal üzerinde gelişen tarımın Anadolu üzerinden Avrupa'ya yayılırken bunun sadece kültürlerin değil aynı zamanda genlerin ve dillerinde yayılımına neden olduğu ve göç eden bu insanların avcı-toplayıcı Avrupalıların yerini aldığı görüşü ile buna karşı geliştirilen, Avrupalıların hem göç eden Ortadoğululardan hem de avcı toplayıcı Avrupalılardan köken aldığı ve tarımında aralıklı temaslarla Avrupa'ya yayıldığı görüşüdür. Bu farklı görüşleri netliğe kavuşturmak için Kılınç ve ark. (2016) Orta Anadolu'da Erken Neolitik dönem ile Çanak Çömlekli Neolitik dönem arasına tarihlendirilmiş dokuz insan iskeleti üzerinde aDNA çalışması yapmışlardır. Bu çalışma ile Anadolu'nun en eski çiftçilerindeki genetik çeşitliliğin belirgin bir şekilde az olduğu ve bu genetik çeşitliliğin Avrupalı avcı toplayıcıların genetik çeşitliliği ile karşılaştırıldığında onlarınkine yakın bir seviyede olduğu ortaya konulmuştur. Bununla birlikte Çanak Çömlekli Neolitik dönem ile birlikte toplumların genetik çeşitliliğinin arttığını ve genetik çeşitlilik seviyesinin daha sonraları erken Avrupalı çiftçilerde görülen seviyelere ulaştığını göstermişlerdir. Elde edilen sonuçlar en erken Neolitik dönem Anadolu çiftçilerinin Avrupa'ya yayılan ilk Neolitik göçmenler ile aynı gen havuzunu paylaştıklarını ortaya koymakla birlikte bu en eski çiftçi toplumlarının demografik olarak avcı toplayıcılara benzediğini ve bu çiftçilerin Avrupa'ya göç ederek buradaki çiftçi popülasyonlarını genişlettiklerini de önermektedir. Özellikle Anadolu'da bulunan farklı dönemlere tarihlen-

dirilmiş arkeolojik ve antropolojik kazı alanlarından elde edilen iskeletler üzerinde yapılacak olan aDNA çalışmalarının sayısının artması tartışılan bu konulara dair önerilen farklı cevap ve görüşlere netlik kazandıracaktır.⁴⁵⁻⁴⁸

EVİRİM VE FİLOGENETİK ÇALIŞMALAR

*Homo sapiens*in kökeni, yayılımı, Afrika dışına göçünde farklı türlerle karşılaşp karşılaşmadığı ve şayet karşılaştıysa da bu türlerle gen alışverişinde bulunup bulunmadığı insan evrimi çalışmalarında cevabı merak edilen sorulardır. Türler arasındaki yakınlık ve uzaklığın belirlenmesini sağlayan evrim ve filogenetik çalışmalarda bu ve benzeri sorulara moleküler düzeyde cevaplar bulmak için aDNA analizleri önemli bir araçtır. Buna en iyi örnekte son yıllarda ki birçok aDNA yayının konusunu oluşturan ve evrimsel hikâyemizdeki yeri halen merak konusu olan *Neanderthaller*dir. Bu türle ilgili cevabı aranan en temel iki sorudan birincisi neden ve nasıl yok oldukları ve modern insanla melezleşip melezleşmedikleridir.^{33,49}

Neanderthal genomunun büyük bir bölümü "Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojisi" yardımıyla 2010 yılında dizilenmiştir. Çalışmanın birinci aşamasında Hırvatistan'da bulunan Vindija Mağarası'nda elde edilen 21 *Neanderthal* kemiği incelenmiştir. Bu örnekler PZR ile *Neanderthal* mtDNA varlığını tespit etmek için taranmış ve sonraki analizler için uygun olan dokuz örnek seçilmiştir. İkinci aşamada, elde edilen aDNA içerisindeki özgün *Neanderthal* DNA'sının yüzdesi tahmin edilmiştir. Bu aşamada elde edilen aDNA insan, şempanze, rhesus maymunu ve fare genomlarının yanı sıra GenBANK'ta bulunan bütün nükleotit dizileriyle karşılaştırılarak aDNA dizilerinin primat genomlarıyla yakınlığı test edilmiştir. Son aşamada dizileme işlemi tamamlanmış ve 400mg kemik tozundan 5.3 Gb *Neanderthal* DNA sekansı elde edilmiştir. *Neanderthal* DNA dizilim sonuçları, *Neanderthal* ve modern insanın yaklaşık olarak 800 bin yıl önce ortak bir atayı paylaştıklarını, *Neanderthal* ve modern insan ataları arasında ki ayrımın 270-440 bin yıl önce olduğunu göstermiştir. Ayrıca modern insan DNA'larıyla kıyaslandığında *Neanderthal* DNA'sının birkaç genomik bölgesinin farklı olduğu gözlemlenmiştir. Bilişsel yetenek ve kafa morfolojisinde değişikliğe neden olan bu genomik bölge farklılığı, doğal seçilimin modern insana giden yolda bir avantajı olarak değerlendirilmektedir. Araştırmada ayrıca, Asyalı ve Güney Amerikalıların, Avrupalılara kıyasla daha fazla *Neanderthal* genine sahip olduğu anlaşılmıştır. *Neanderthallerin*, Avrupa ve Asya'nın ba-

tısında yaşamış olmasına rağmen Asya'nın doğusunda yaşamış olan ilk modern insanlarla da karışmış olabilecekleri, ancak paleolitik dönem insanların buraya daha fazla göç etmesiyle *Neanderthal* genlerin giderek azalmış olabileceği ifade edilmektedir.^{50,51}

Modern insanın evrimine ışık tutacak önemli bir çalışmada, Sibirya'nın güneyinde Altay Dağları'nda yer alan Denisova Mağarası'nda bulunan parmak kemiği ve diş buluntusundan elde edilen aDNA verileridir. Bu mağarada 2008 yılında keşfedilmiş olan parmak kemiği fosilinden bütün bir mtDNA dizilimi elde edilmiş ve bu veri 54 modern insan, 6 *Neanderthal* ve 30 bin yıllık bir modern insan mtDNA dizilimi ile karşılaştırılmış ve sonuç olarak Denisova insanının hepsinden farklı bir mtDNA dizilime sahip olduğu belirtilmiştir. *Neanderthal* mtDNA genomu ortalama 202 nükleotit pozisyonunda *Homo sapiens*ten farklı iken Denisova buluntusunun genomu ortalama 385 nükleotit pozisyonunda farklılık göstermiştir. Bu parmak kemiğinden elde edilen mtDNA dizilimi ile Denisova insanının farklı bir tür olduğu belirtilmektedir. Yine yapılan çalışmalarda bu türün, anatomik olarak *Neanderthal* ve modern insan ile benzer karakterler taşıdığı ve bu üç türün yaklaşık 1 milyon yıl önce ortak bir atayı paylaştıkları belirtilmiştir.^{52,53}

HAYVAN VE BİTKİ aDNA ÇALIŞMALARI

aDNA çalışmaları ile quagga, keseli kurt, kılıç dişli kaplan, mamut, moa (bir tür uçamayan kuş), karasal tembel hayvan ve mağara ayısı gibi soyu tükenmiş birçok türün biyolojik özellikleri belirlenmiştir. Bununla birlikte günümüz evcil hayvanlarından koyun, keçi, domuz, sığır, at ve deve gibi türlerin ne zaman, nerede ve hangi yabani türlerden evcilleştirildiği de aDNA çalışmaları ile ortaya konulmuştur. Örneğin koyun ve keçinin günümüzden 11000 yıl önce Bereketli Hilal'de evcilleştirildiği ve sonra da bu evcil türlerin Avrupa'ya yayıldığı

gösterilmiştir. Ancak bu yayılımın hangi yollardan ve nerelere kadar olduğu halen cevaplanması gereken sorulardır.^{54,55}

Tarih öncesi dönemlerde yaşamış insanların çevresel koşullarının, beslenme davranışlarının ve mevsimsel göçlerinin belirlenmesi bu insanların kültürel adaptasyonları ve davranış biçimlerini anlamamızı sağlamaktadır. Tarih öncesi yaşamış insanların diyetlerini anlamak için kullanılan aDNA çalışmaları ile bu insanların evcilleştirdikleri ve avladıkları hayvan ve bitki türleri belirlenebilmektedir. Bu çalışmalarda organik kalıntılar, taş aletler ve dışkı örnekleri kullanılmaktadır. Örneğin Teksas'ta Hinds Mağarası'nda bulunan fosil dışkı örnekleri kullanarak yapılan aDNA çalışmasında antilop, tavşan, sincap, çitlembik, meşe ve baklagiller gibi çeşitli bitki ve hayvan türlerine ait DNA'lar belirlenmiştir.^{14,33}

Hastalıkların kökeni ve yayılımı da insanlık tarihinde merak edilen konulardan biridir. Bir kişide bir genetik hastalığın varlığına dair morfolojik veya tarihe dayalı delillerin bulunduğu durumlarda, hastalığa neden olan gen bölgesi aDNA ile izole edilip çoğaltılabilir ve bu hastalıkla ilgili mutasyonlar ortaya çıkartılabilir. Örneğin, tüberküloz hastalığının Amerika'da ne zaman ortaya çıktığını anlamak için Kolomb öncesi yaşamış bir mummydan elde edilen aDNA çalışması bu hastalığın Amerika'da, Avrupalıların kıtayı keşfinden önce var olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde Tüberküloz hastalığına neden olan "*Mycobacterium tuberculosis*" bakterisinin Mısır'da 2.500 ile 5.000, Macaristan'da da 300 ile 1.300 yılları arasına tarihlendirilmiş insan kalıntılarında olduğu, Ortaçağ İngiltere'sindeki bireylerde Kara Humma olarak bilinen vebaya neden olan bakterinin (*Yersinia pestis*) 400 yıllık diş kalıntılarında bulunduğu ve cüzam hastalığına neden olan bakterinin de Almanya ve Macaristanda 300 ile 1.300 yılları arasına tarihlendirilmiş arkeolojik kalıntılarda olduğu aDNA çalışmaları ile gösterilmiştir.^{9,33}

KAYNAKLAR

1. Weaver TD, Roseman CC. New developments in the genetic evidence for modern human origins. *Evolutionary Anthropology* 2008;17(1): 69.
2. Higuchi R, Bowman B, Freiburger M, Ryder OA, Wilson AC. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 11/15/print 1984;312(5991):282-4.
3. Pääbo S. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA; 1985.
4. Krause J. From genes to genomes: what is new in ancient DNA. *MGfU* 2010;19:11-33.
5. Pääbo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989;86(6):1939-43.
6. Ricaut FX, Keyser-Tracqui C, Crubezy E, Ludes B. STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples. *Forensic Sci Int* 2005;151(1):31-5.
7. Kemp BM, Monroe C, Judd KG, Reams E, Grier C. Evaluation of methods that subdue the effects of polymerase chain reaction inhibitors in the study of ancient and degraded DNA. *Journal of Archaeological Science* 2014;42:373-80.
8. Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Paabo S. Ancient DNA. *Nat Rev Genet* 05/print 2001;2(5):353-9.
9. Kefi R. Ancient DNA investigations: A review on their significance in different research fields. *International Journal of Modern Anthropology* 2011;1(4).

10. Burger J, Hummel S, Herrmann B, Henke W. DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis* 1999;20(8):1722-8.
11. Bollongio R, Tresset A, Vigne JD. Environment and excavation: Pre-lab impacts on ancient DNA analyses. *Comptes Rendus Palevol* 2008;7(2-3):91-8.
12. Meyer M, Fu Q, Aximu-Petri A, et al. A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos. *Nature* 2014;505(7483):403-6.
13. Mulligan CJ. Anthropological applications of ancient DNA: Problems and prospects. *American antiquity* 2006. p.365-80.
14. Poinar HN. The top 10 list: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples. Paper presented at: International congress series 2003.
15. Yang DY, Watt K. Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis. *Journal of Archaeological Science* 2005;32(3):331-6.
16. Cooper A, Poinar HN. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 2000;289(5482):1139.
17. O'Rourke DH, Hayes MG, Carlyle SW. Ancient DNA studies in physical anthropology. *Annual Review of Anthropology* 2000:217-42.
18. Yang D. Contamination controls and detection in ancient DNA studies. *Acta Anthropologica Sinica* 2003;22(2):163-73.
19. Gilbert MT, Bandelt HJ, Hofreiter M, Barnes I. Assessing ancient DNA studies. *Trends Ecol Evol* 2005;20(10):541-4.
20. Sampietro ML, Gilbert MT, Lao O, et al. Tracking down human contamination in ancient human teeth. *Mol Biol Evol* 2006;23(9):1801-7.
21. Paabo S, Poinar H, Serre D, et al. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet* 2004;38:645-79.
22. Pinhasi R, Fernandes D, Sirak K, et al. Optimal ancient DNA yields from the inner ear part of the human petrous bone. *PLoS one* 2015;10(6):e0129102.
23. Richards MB, Sykes BC, Hedges RE. Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains. *Journal of Archaeological Science* 1995;22(2):291-9.
24. Rohland N, Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature protocols* 2007;2(7):1756-62.
25. Hagelberg E, Bell LS, Allen T, et al. Analysis of Ancient Bone DNA: Techniques and Applications [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 1991;333(1268):399-407.
26. Goodwin W, Linacre A, Hadi S. An introduction to forensic genetics. Vol 2: John Wiley & Sons; 2011.
27. Alia-Garcia E, Parra-Pecharroman D, Sanchez-Diaz A, et al. Forensic identification in teeth with caries. *Forensic Sci Int* 2015;257: 236-41.
28. Thomas P, Gilbert M, Rudbeck L, Willerslev E, et al. Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *Journal of Archaeological Science* 2005;32(5): 785-93.
29. Adler C, Haak W, Donlon D, Cooper A, Consortium G. Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *Journal of Archaeological Science* 2011;38(5):956-64.
30. Alakoc YD, Aka PS. "Orthograde entrance technique" to recover DNA from ancient teeth preserving the physical structure. *Forensic Sci Int* 2009;188(1-3):96-8.
31. Imamoglu O, Karapirli M, Akboyun N. Comparison Of Dna Extraction Methods From Teeth Samples And Evaluation In Terms Of Forensic Sciences. *Turkish Journal of Forensic Medicine* 2012;26(1):38-49.
32. Shapiro B, Hofreiter M. Analysis of ancient human genomes: using next generation sequencing, 20-fold coverage of the genome of a 4,000-year-old human from Greenland has been obtained. *Bioessays* 2010;32(5):388-91.
33. Kaestle FA, Horsburgh KA. Ancient DNA in anthropology: Methods, applications, and ethics. *American Journal of Physical Anthropology* 2002;119(S35):92-130.
34. Capelli C, Tschentscher F, Pascali VL. "Ancient" protocols for the crime scene?: Similarities and differences between forensic genetics and ancient DNA analysis. *Forensic Science International* 2003;131(1):59-64.
35. Jehaes E, Toprak K, Vanderheyden N, et al. Pitfalls in the analysis of mitochondrial DNA from ancient specimens and the consequences for forensic DNA analysis: the historical case of the putative heart of Louis XVII. *International journal of legal medicine* 2001;115(3):135-41.
36. Faerman M, Filon D, Kahila G, Greenblatt CL, Smith P, Oppenheim A. Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene* 1995;167(1):327-32.
37. Cemper-Kiesslich J, McCoy MR, Kanz F. Ancient DNA and Forensics Mutual Benefits a Practical Sampling and Laboratory Guide Through a Virtual Ancient DNA Study. *The Bulletin of Legal Medicine* 2014;19(1):1-14.
38. Skoglund P, Storå J, Götherström A, Jakobsson M. Accurate sex identification of ancient human remains using DNA shotgun sequencing. *Journal of Archaeological Science* 2013;40(12):4477-82.
39. Boberova K, Drozdova E, Pizova K. Application of molecular genetic methods in anthropological and paleodemographic studies of fragmentary and damaged skeletal material from rescue excavations. *Journal of Life Sciences* 2012;6(9):961.
40. Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of XY homologous gene amelogenin. *Biotechniques* 1993;15(4):636-8, 640-631.
41. Nakanishi H, Shoji H, Ohmori T, et al. A novel method for sex determination by detecting the number of X chromosomes. *Int J Legal Med* 2015;129(1):23-9.
42. Palmirotta R, Verginelli F, Di Tota G, et al. Use of a multiplex polymerase chain reaction assay in the sex typing of DNA extracted from archaeological bone. *International Journal of Osteoarchaeology* 1997;7(6):605-9.
43. Faerman M, Bar-Gal GK, Filon D, et al. Determining the Sex of Infanticide Victims from the Late Roman Era through Ancient DNA Analysis. *Journal of Archaeological Science* 9// 1998;25(9):861-5.
44. King TE, Fortes GG, Balaresque P, et al. Identification of the remains of King Richard III. *Nature communications* 2014;5.
45. Özdoğan M. Anatolia and the Balkans: archaeology. *The Global Prehistory of Human Migration* 2014:139.
46. Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. The history and geography of human genes: Princeton university press; 1994.
47. Özdoğan M. Anatolia: from the pre-pottery neolithic to the end of the early bronze age (10,500–2000 BCE). *The Cambridge World Prehistory* 2014;3:1508-44.
48. Kılınc GM, Omrak A, Özer F, et al. The demographic development of the first farmers in anatolia. *Current Biology* 2016;26(19):2659-66.
49. Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Pääbo S. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 1997;90(1):19-30.
50. Green RE, Krause J, Briggs AW, et al. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 2010;328(5979):710-22.
51. Lalueza-Fox C, Rosas A, Estalrich A, et al. Genetic evidence for patrilineal mating behavior among Neandertal groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; 108(1):250-3.
52. Krause J, Fu Q, Good JM, et al. The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia. *Nature* 2010;464(7290):894-7.
53. Reich D, Green RE, Kircher M, et al. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature* 2010;468(7327):1053-60.
54. Demirci S, Baştanlar EK, Dağtaş ND, et al. Mitochondrial DNA diversity of modern, ancient and wild sheep (*Ovis gmelinii anatolica*) from Turkey: New insights on the evolutionary history of sheep. *PLoS one* 2013;8(12):e81952.
55. Zeder MA, Hesse B. The initial domestication of goats (*Capra hircus*) in the Zagros Mountains 10,000 years ago. *Science* 2000;287(5461):2254-7.