

Antik DNA: Geçmişten Geleceğe Bir Köprü

Aleyna Tuğçe Efecan^{Y.}, İrem Coşkun^{E.}

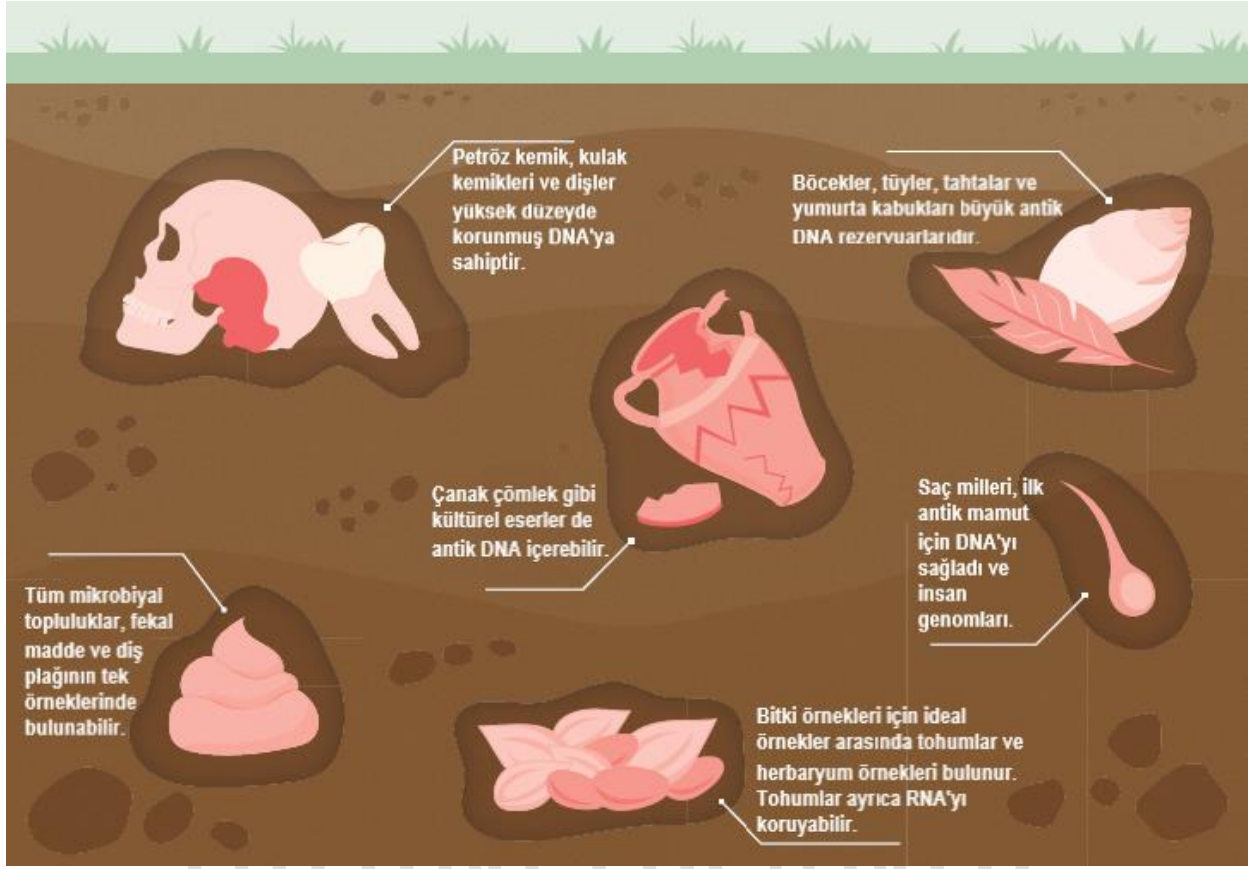
Antik DNA (aDNA), tarihi ve arkeolojik olarak tortuların da dâhil olduğu alt fosil materyallerinde korunmuş dokulardan (diş, kemik, sert dokular, mumyalanmış cilt, saç vb.) elde edilen kısa ve izole DNA dizilerine denilmektedir (Şekil 1)¹. aDNA analizleri insan genetiği, antropoloji, arkeoloji ve evrimle ilgili geniş bir alanı kapsamaktadır. Hayvanlar ve bitkilerdeki evcilleştirme çalışmaları, eski mikrobiyom ve patojenlerin keşfedilmesi, geçmişte yaşamış insanların yaşamları, beslenme şekilleri gibi birçok konuda bilgi vermektedir².

1984 yılında soyu tükenmiş bir Güney Afrikalı *quagga*'nın (*Equus quagga quagga*) müzedeki fosilinin kasından kurutulmuş kısa DNA parçasının izolasyonu ile elde edilen 229 baz çifti (bp) uzunluğundaki dizi verisi **ilk aDNA çalışması** olarak literatüre geçmiştir¹. İlk analizler, eski örneklerde varlığını sürdüren genetik materyalin mantar ve mikrobiyal kökenli olduğunu ve endojen DNA'nın mitokondriyal DNA (mtDNA) gibi çok kopyalı lokusların kısa ve hasarlı parçalarında düşük konsantrasyonlarda bulunduğunu göstermiştir. **Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)** yönteminin keşfedilmesi ise moleküllerin rutin olarak amplifiye edilmesi sağlanmış ve aDNA analizlerinin sayısı ve aralığı çeşitlendirilmiştir³. PCR, korunmuş örneklerde çok az miktarda genetik materyal ile araştırma

yapma imkânı sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem ile belirli lokusların hedeflenmesi ve amplifiye edilmesi mümkündür; ancak zarar görmüş ve bozulmuş aDNA'lar için uygun olmayabileceği belirtilmektedir. Teknolojideki gelişmeler dâhilinde 2007 yılında ise **ölüm sonrası (post-mortem) DNA** modifikasyon hasarını ele almak için tek primer uzatma amplifikasyonu tanıtılmıştır⁴. 2009 yılında aDNA araştırmaları alanında yüksek verimli ve ucuz **Yeni Nesil Dizileme (NGS)** teknikleri kullanılmaya başlanmıştır. Bu yaklaşım sayesinde eski ve soyu tükenmiş organizmaların genomlarının yeniden yapılandırılması gerçekleştirilmiştir⁵.

aDNA, doğası gereği parçalanmış ve yüksek düzeyde post-mortem DNA hasarı ve bozulması içerdiği için analiz edilmesi zor bir genetik materyaldir². aDNA çalışmaları titiz bilimsel analizler, etik planlama ve araştırma gerektirmektedir. Araştırma planı oluşturulduktan sonra, numuneler özel laboratuvarlara alınmaktadır ve DNA **demineralizasyon/parçalama** işlemiyle ana materyaller arındırılmaktadır. Çoğu numune yüksek düzeyde bozulmaya sahiptir ve başka DNA kaynakları ile kontaminasyona yatkındır; bu yüzden HEPA filtreli pozitif hava basıncı sistemleri, UV'ye maruz kalma ve numunelerin temas ettiği bençlerin yüzeylerine günlük dekontaminasyon işlemleri

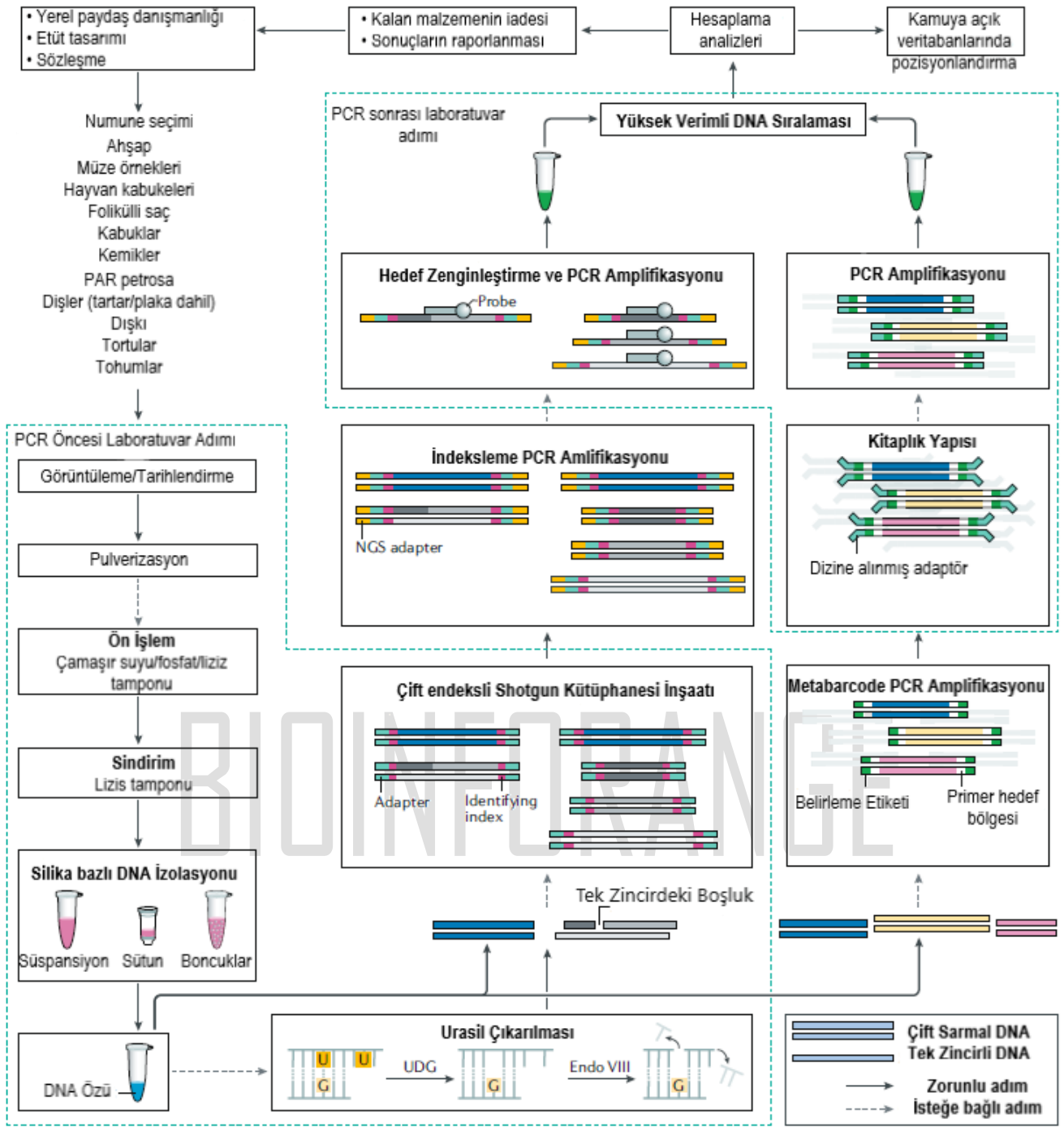
ile steril ortamlarda korunmaktadır. aDNA kaybına engel olunamamaktadır².
Safılaştırma yöntemlerine rağmen endojen



Şekil 1. aDNA analizi için çeşitli kalıntı örnekleri kullanılabilir².

Numune tipleri ve koruma durumlarını barındıracak şekilde deneysel adımlar uygulanmaktadır ve bazıları **radıyokarbon tarihleme** ya da **proteomik analizler** için proteinlerin aynı anda çıkarılmasına izin vermektedir. Numuneler önce mekanik olarak toza çevrilmektedir. Daha sonra mineral matrisleri kireçten arındırılıp, proteinleri ve lipidleri parçalayan ve organik, inorganik bileşiklerle DNA etkileşimlerini bozan tamponlarda inkübasyon yoluyla DNA elde edilmektedir. Bazı durumlarda da fenol-

kloroform safılaştırma aşamasında alternatif tamamlayıcı bir yaklaşım olarak kullanılabilir. Safılaştırma ve konsantrasyon adımlarından sonra aDNA'lar NGS kitaplığında yapılandırılıp, sıralanmaktadır (Şekil 2). Bu adımlara ek olarak kitaplık oluşturulmadan önce oluşan hasarları kısmen veya tamamen ortadan kaldırılması, genetik hedeflerin zenginleştirilmesi gibi etkileri elde etmek için ek adımlar eklenebilir¹.



Şekil 2. Deneysel İş Akış Şeması¹. Antik DNA (aDNA) analizlerinde çok sayıda kalıntı bulunmaktadır. Bunun için önce araştırma planı konusunda anlaşmaya varılmalıdır. Farklı laboratuvar prosedürleri, aDNA tesislerinde çevresel kontaminasyonu en aza indirecek şekilde gerçekleştirilip numune hazırlama, DNA izolasyonu ve DNA kitaplığı oluşturmak da dahil olmak üzere tüm amplifikasyon öncesi deneysel adımları içermektedir. Numunelerden elde edilen aDNA, PCR amplifikasyonu ve sonrasında yeni nesil dizileme (NGS) ile oluşturulan dizi verileri, hesaplama sunucularında işlenerek halka açık şekilde sistemlere yüklenmektedir.

1. Kalıntı Materyalinden DNA İzolasyonu

Kalıntıların bütünlüğünü en üst düzeye çıkarmak ve potansiyel olarak daha ileri moleküller veya morfolojik analizlere izin vermek için kemik, diş, böcek veya bitki örneklemek üzere minyatür olarak tahrip edici yöntemler önerilmiştir. aDNA boru hattı (pipeline), deneysel ve hesaplamalı adımlarla hassasiyeti önemli ölçüde artırmış ve örnek miktarını için gerekli olan malzeme miktarını azaltmayı sağlamıştır. DNA moleküllerinin küçük olması endojen DNA'yı kontaminasyon DNA'sından ve akış yönündeki enzimatik reaksiyonlarda inhibitör görevi görebilecek küçük moleküllerden ayırmayı zorlaştırmaktadır. Optimize edilmiş protokoller, numune türlerini ve koruma durumlarını barındıracak şekilde deneysel adımlara uyarlanmaya çalışılmaktadır. Çoğu durumda numuneler ilk olarak mekanik şekilde toz haline getirilmektedir ve DNA, diğer moleküllerle etkileşimlerini bozan tamponlarda inkübasyonla elde edilmektedir. Bu yaklaşımlar da farklı derecelerde endojen aDNA kaybına sebep olmaktadır⁶.

DNA fragmantasyonu, örneklerden gelen yüksek moleküler ağırlıkta genomik DNA'ya göre farklı davranır ve verimli şekilde toplanması için özel protokoller gerektirmektedir; ayrıca aDNA izolasyonu için en sık kullanılan yöntemdir. DNA moleküllerinin çözeltide spin kolonları üzerinde veya askıda silis kaplı manyetik parçacıklar üzerinde kaotropik bağlayıcı tampondaki silis parçacıklarına emilmesinden

faydalanılmaktadır. Daha sonra DNA, etanol yıkama işleminden sonra düşük tuz tamponları ile temizlenmektedir. Bazen de fenol-kloroform arıtma adımı da alternatif veya tamamlayıcı olarak kullanılabilir⁷.

2. DNA Bozulması

2.1. Hasar ve Onarım

aDNA çalışmalarının metodolojik problemlerinin merkezinde nükleik asitlerin post-mortem kararsızlığı bulunmaktadır. Metabolik olarak aktif dokularda DNA moleküllerinde oluşan hasar bir dizi onarım yolu ile hızlı ve verimli bir şekilde onarılmaktadır. Buna karşılık, DNA hasarı, kendiliğinden hidroliz ve oksidasyon gibi faktörler sebebiyle aktif olmayan hücrelerde zamanla gerçekleşmektedir⁸.

İlk araştırmalarda elde edilen bilgilerden yola çıkarak, post-mortem DNA bozulmasının iplik kopmaları, yanlış kodlama, temelsiz bölgeler ve çapraz bağlarla karakterize olduğu ve bunların dizileme artefaktları ile hasar görmemiş kontamine DNA'nın tercihli amplifikasyonuna neden olduğu anlaşılmıştır⁹.

Post-mortem biyokimyasal reaksiyon yolları, zincir tanımlanabilmesi ve mutasyon olayları için sınırlı olabilmektedir. Bu sınırlandırmalar post-mortem DNA bozulmasına ilişkin karmaşık çalışmalar ve sıçrayan PCR artefaktlarının saptanması için bir araç sağlamaktadır. Diğer yandan yanlış kodlanan lezyonların mtDNA genomu boyunca rastgele dağılmadığı; ancak tekrarlanan isabetlerin meydana geldiği sıcak noktalarda yoğunlaştığı gözlenmiştir. Sığırlarda ve insanlarda

düzenli olarak hasar gören bölgelerin dağılımı, düzenli evrimsel ikamelerde gözlemlenenlere benzemektedir; yani aDNA hasarı, beklenen evrimsel değişiklikleri taklit eden dizi artefaktları üretebilmektedir⁸. Post-mortem modifikasyonları önlemek ve çoğaltılabilir DNA şablonlarının kalitesini, miktarını ve güvenilirliğini arttırmak için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. **Urasil-N- glikosilaz (UNG)**, sitozinin deaminasyon ürünlerini uzaklaştırarak dizi varyasyonunun kökenlerini test etmede kullanılmaktadır. Pfu ve Taq-HiFi gibi polimeraz enzimleri, dizi hata oranlarını en aza indirmektedir ve amplifikasyon verimliliğini arttırmada kullanılmaktadır¹⁰.

2.2. Uzun Süreli Hayatta Kalma

aDNA moleküllerinin ömürlerinin uzun olmasında düşük sıcaklık değerleri merkezi bir rol oynamaktadır. Hızlı kuruma ve yüksek tuz konsantrasyonları gibi diğer özellikler de DNA'nın hayatta kalmasını uzatan faktörlerdir. Bunlarla beraber kinetik hesaplamalar, küçük DNA parçalarının (100-500 bp) ılıman bölgelerde 10 kilo yıldan (kyr) fazla ve hidrolitik hasar nedeniyle daha soğuk enlemlerde maksimum 100 kyr'de hayatta kalabileceği tahmin edilmektedir¹¹. İdeal koşullar altında çoğaltılan DNA'nın 1 milyon yıldan da (Myr) uzun bir süre boyunca hayatta kalacağı düşünülmektedir¹².

3. Mini barkod PCR Güçlendirilmesi

aDNA araştırmalarındaki PCR tarafından işlenmemiş DNA bölümlerini doğrudan güçlendiren alanlardan birisi **DNA barkodlanması** yoluyla geçmişteki türlerin

toplulukları hakkında bilgi kurtarmaya çalışan paleo-çevresel yeniden yapılandırma alanlarıdır¹³. Bu tip hayvanlarda sitb, CO1, 12S veya 16S129, bitkilerde kloroplast genomunun trnL döngüsünü hedef alan loci yükseltebilen PCR kullanımıyla elde edilmektedir. Bu hedefler, barkodlar gibi haplotipler tarafından tanınmasını ve bu sayede diğer türlerden ayrılmasını belirleyebilmek için görece yüksek değişkenlik temelinde seçilmektedir¹⁴.

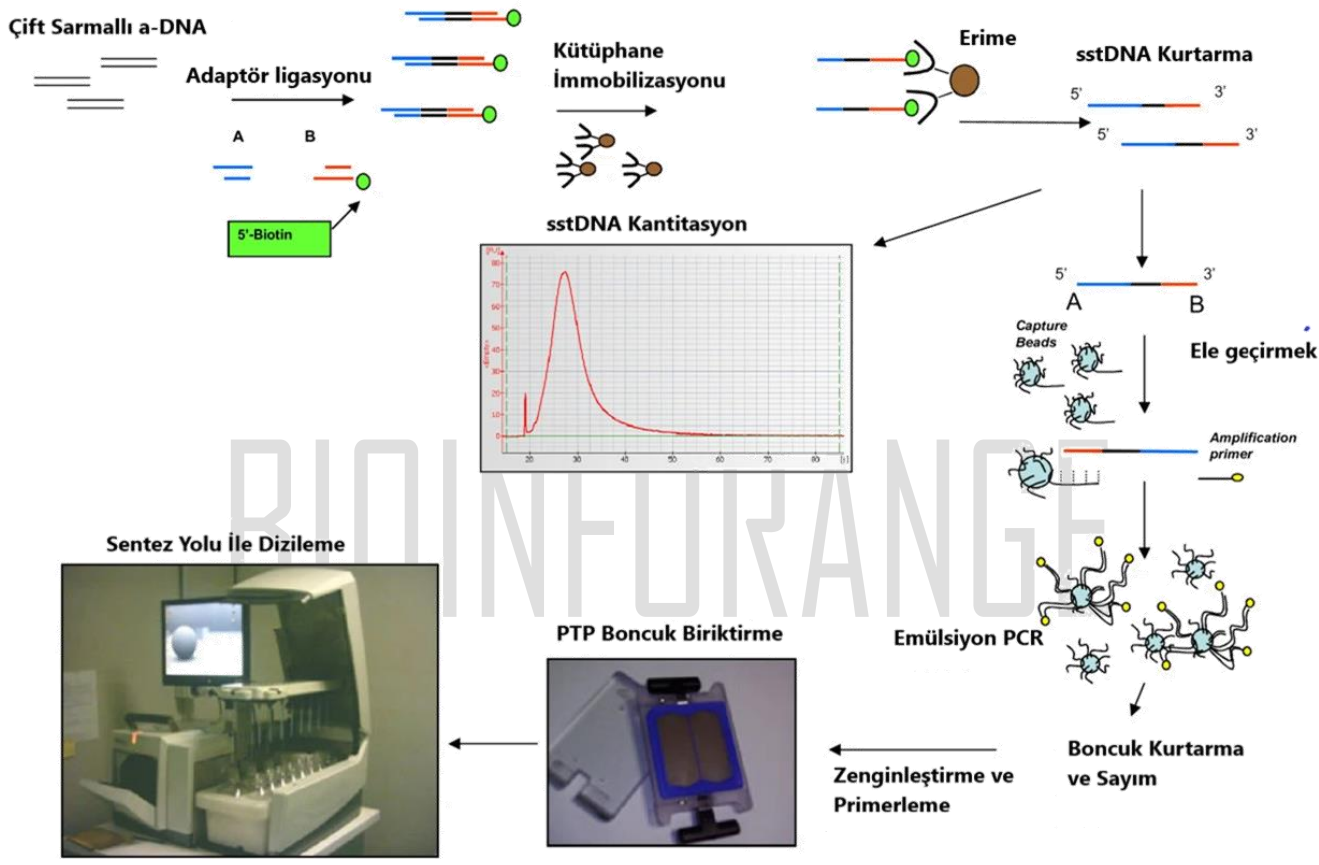
Yüksek taksonomik çözünürlük, barkod PCR'ı NGS ile birleştiren ve etiketli primerleri kullanan meta kodlama ile elde edilmektedir. Bu yöntem sayesinde geleneksel moleküler klonlama ihtiyacını ve tek tek dizileri ampikon havuzlarında ayırma ihtiyaçlarını ortadan kaldırmıştır. Kısa numunelere özel dizi sekanslarının PCR primerlerine dahil edilmesiyle 4-6 tabanlı birden fazla numunenin eşzamanlı olarak sıralanması sağlanabilmektedir¹⁵.

4. aDNA Kütüphanesi Oluşturma

PCR ampikonlarının bakteriyel plasmidlerinden moleküler klonlanması, DNA kütüphanelerinde aDNA parçaları oluşturmak için kullanılan ilk yöntemdir. Daha sonra kapiler elektroforez kullanarak dizileme için yeterli kültür oluşturulmaktadır; ancak bu yöntemler yeterli dizileme verimi sağlayamamaktadır. Sentez dizileme için şu anda iki ana kitaplık hazırlama yöntemi mevcuttur; bununla birlikte aDNA için kullanılan ana kitaplık hazırlama yöntemi NGS'dir¹⁶.

DNA analizleri alanında kullanılan en önemli NGS platformları 454/Roche FLX (Şekil 3) ve Illumina Genome Analyzer'dır (Şekil 4). İki teknolojiye de dizilerin üretimi aynıdır; ancak amplifikasyon prosedüründe ve dizilemede kimyasal farklılıklar göstermektedirler. NGS teknolojilerinin yüksek hassasiyet ve üretkenliğine rağmen sinyal algılama

sistemleri tek bir molekülden kaynaklanan dizileme sinyalini ölçmek için yeteri kadar hassas değildir. Algılama sistemleri yalnızca milyonlarca DNA molekülü tarafından üretiliyorsa bir sinyali tanımlayabilmektedir. Bu nedenle dizileme kitaplığının amplifikasyonu gerekmektedir¹⁷.

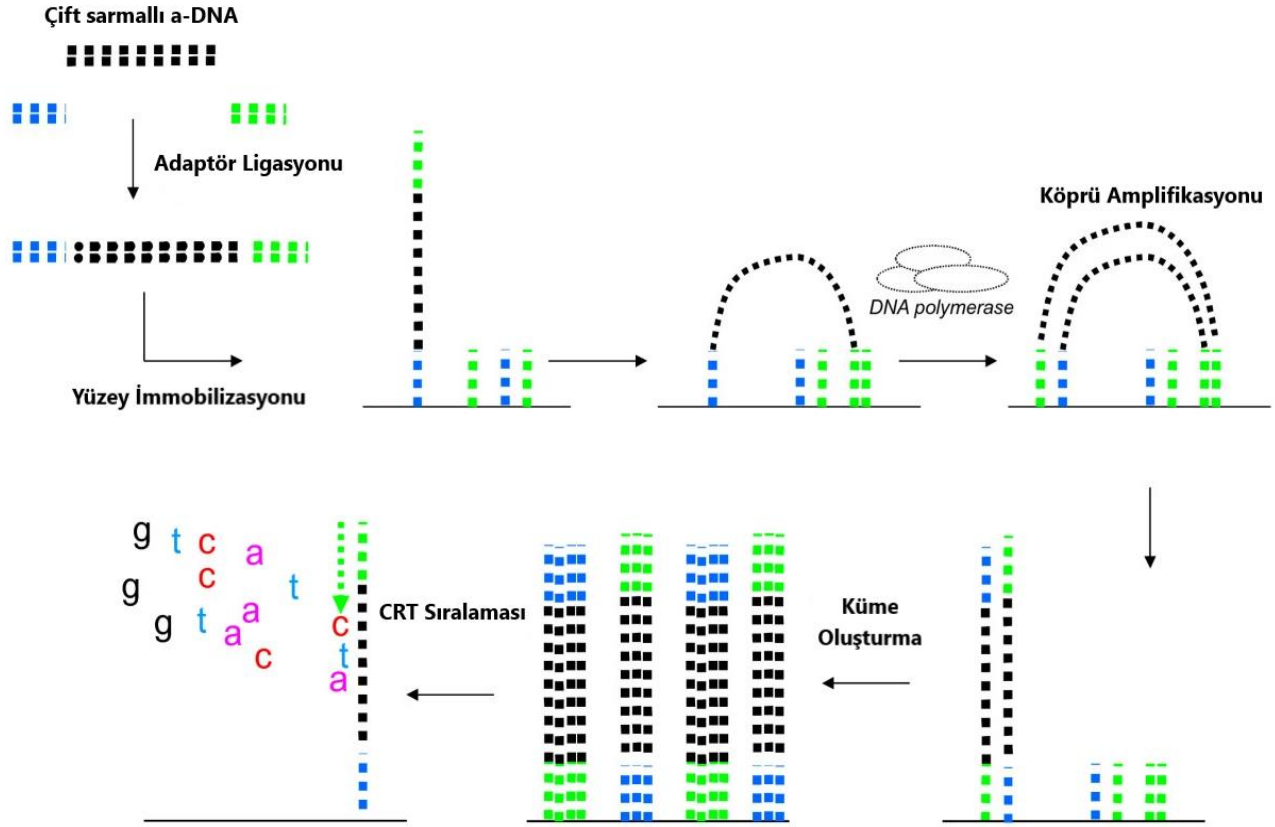


Şekil 3. 454/Roche NGS prosedürü¹⁸. Çift iplikli aDNA, spesifik 454 adaptörün (A ve B) ligasyonu ile tek zincirli DNA kütüphanesine dönüştürülmektedir. Emülsiyon PCR, zenginleştirilen ve piro-dizileme reaksiyonu için PicoTiter Plate (PTT) üzerine yüklenen yakalama boncukları üzerindeki kitaplık moleküllerini çoğaltmaktadır.

4.1. Kütüphane Hazırlığı

PCR amplifikasyonu için her iki uçtaki DNA adaptörlerine bağlanan aDNA fragmanlarından oluşan bir kitaplık hazırlanması gerekmektedir. DNA'yı örnekten izole ettikten sonra, çift iplikli DNA 3' ve 5' uçlarında parlatılmaktadır ve kör uç DNA'ya dönüştürülmektedir. Parlatma aşaması, DNA

polimeraz ve 5' konumunda fosforilasyonu katalize eden bir polinükleotid kinaz kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Kitap hazırlama, adaptörlerin parlatılması ve fosforile edilmiş uçlarına bağlanmasıyla devam edmektedir. Adaptör, kitaplık amplifikasyonu ve dizileme için tamamlayıcı primerlerin tasarımına izin veren kısa oligonükleotidlerden oluşmaktadır¹⁸.



Şekil 4. Illumina örnek prosedürü¹⁸. Çift sarmallı aDNA, Illumina kütüphanesine dönüştürmektedir ve akış hücresinin yüzeyinde bulunan köprü amplifikasyonları ile amplifiye edilmektedir. Amplifiye edilen moleküller döngü tersinir sonlandırma (CRT) metodolojisi ile sıralanmaktadır.

4.2. Kütüphane Amplifikasyonu

Illumina ve 454/Roche platformları farklı amplifikasyon prosedürleri kullanmaktadır. 454/Roche, kitaplık bir yağ içinde su emülsiyonu PCR'ından (emPCR) amplifiye edilmektedir. Kitaplıktaki her bir DNA molekülü, PCR desteği olarak kullanılan sulu bir damlacık içerisinde amplifiye olan bir boncukla bağlanmaktadır. Illumina sisteminde moleküller bağımsız olarak amplifiye edilerek izotermal köprü amplifikasyon işlemi ile gerçekleştirilmektedir. Bu sitemde hem amplifikasyon hem de dizilemede aynı akış hücresi kullanılırken, 454/Roche sistemindeki iki adım da farklı destekler üzerinden sağlanmaktadır¹⁹.

4.3. Dizileme Yaklaşımları

4.3.1. Shotgun Dizileme

Shotgun dizilemesi, herhangi bir önsel seçim olmadan izole edilmiş DNA dizilemesiyle gerçekleştirilmektedir. Shotgun yaklaşımı, toplam DNA kemik ve diş örneğinden izole edildiğinde tüm bilinen türleri tanımlama kapasitesine sahiptir. Shotgun dizileme projesinin amacı, izole edilmiş örnekte bulunan tüm olası bilinen organizmaları tanımlamak ve metagenomik çalışmalar için kullanmaktır. Bu projede elde edilen tüm diziler genellikle dizi veritabanlarıyla eşleştirilerek, BLAST kullanarak blastlama prosedürü ile tanımlanmaktadır. Bu yaklaşım Miller ve Poinar tarafından mamut DNA'sını dizileyerek yüksek miktarlarda eksojen

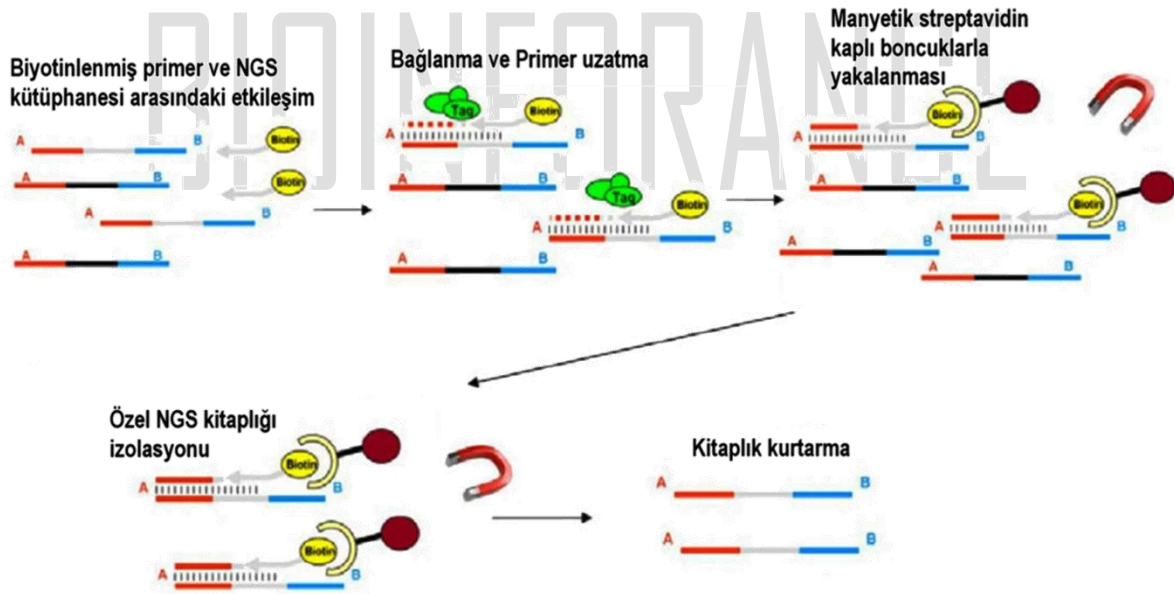
DNA'nın varlığı ile doğrulamıştır²⁰.

4.3.2. Amplikon Dizileme

PCR, hedef DNA bölgesini seçici olarak seçmek için en iyi ve etkili prosedürdür. Her özel uygulama için optimize edilebilmesi için bir dizi adımı içermektedir. En önemli adım, primerlerin tasarlanmasıdır. PCR yaklaşımının en önemli avantajı, DNA amplifikasyon yoluyla dizilenebilen bir NGS kitaplığından kolayca dönüştürülen PCR ürünleri veya amplikonlar gibi yüksek miktarda materyal elde edilebilmesidir. **Dezavantajı** ise aDNA çalışmalarında önemli belirteç olan fragman uçlarındaki yanlış birleşme oranının artmasıdır²¹.

4.3.3. Dizi Yakalama

Dizi yakalama, hedef DNA'yı tanıyıp, yakalamak için özel tasarlanmış problemlerin kullanılmasıyla hem numune zenginleştirmede hem de 3' ve 5' fragman uçlarındaki DNA'ların yanlış birleşmeleri hakkında bilgilerin kurtarılmasına izin veren bir metodolojidir²³. aDNA da kullanılan ilk yakalama metodolojisi, belirli bölgeleri tanımak ve DNA parçalarının sonuna kadar uzamaya izin vermek için özel tasarlanmış biyotinlenmiş primerleri kullanarak **primer uzatma yakalama (PEC)** yaklaşımıdır (Şekil 5)²².



Şekil 5. Primer uzatması yakalama²². Spesifik genomik bölgeler, biyotinlenmiş yakalama primeleri ve NGS kütüphanesi dizileri arasındaki hibridizasyon ile hedeflenir. Bu yöntem iplik uzatması, yakalama adımları ile zenginleştirilmiş kitaplığın kurtulmasına izin verir.

5. Kontaminasyon ve Kontaminasyonun Tespiti

Kontaminasyonun saptanması ve önlenmesindeki en büyük zorluk, ilgili

sorunların ölçeğinin kolayca anlaşılabilmesidir. Üç ana sinyal, aDNA'daki kontaminasyonun varlığı hakkında bilgi vermektedir²³.

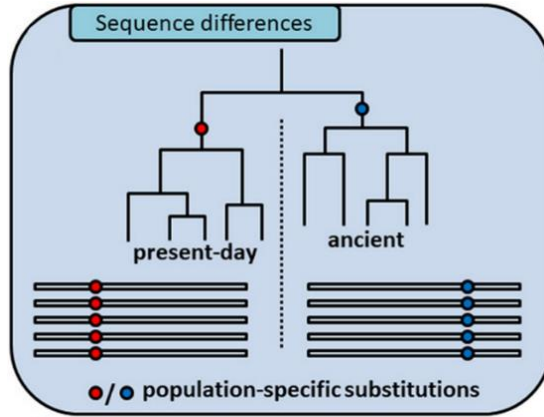
5.1. Tahmin Etmek İçin Kullanılan Sinyallerin Sınıflandırılması

ölçümleri de kontaminasyon yokluğundaki değerler ile karşılaştırılarak

5.1.1. DNA Dizisindeki Farklılıklar

Çalışılan genom ile kontamineler arasında farklılık gösteren bölgeler, genom dizileri önceden bilindiğinde tanımlanabilmektedir. Dizi farklılıklarının yanında dizi farklılıkları

incelenebilmektedir. Bu sınıftaki yaklaşımların hepsi kontamine ve eski bireyler arasındaki ilişki hakkında ön bilgi gerektirmektedir(Şekil 6)²⁴.

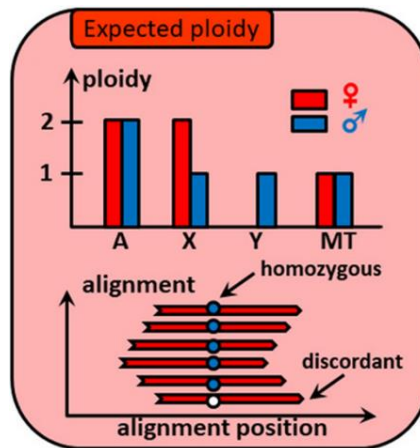


Şekil 6. DNA Dizilerindeki Farklılıklar²³. DNA dizisindeki farklılıklar, her iki grup için bilgilendirici olan türetilmiş varyantlar dahil olmak üzere eski ve günümüzdeki bireylerin soy ilişkilerini gösterir. Mavi varyantlar, endojen dizileri gösterirken kırmızı varyantlar kontaminasyonları göstermektedir.

5.1.2. Beklenen Ploidi'den Sapma

Kontaminasyon, bir numunenin olağandışı ploidi desenleri göstermesine neden olabilmektedir. Ploidi tabanlı yöntemler

genellikle çok katı kapsama gerektirmektedir; bununla birlikte, kontamine ve eski birey arasındaki ilişki hakkında önceden bilgi sahibi olunmaması avantajına sahiptirler(Şekil 7)²⁵.



Şekil 7. Beklenen Ploidi'den Sapma¹⁴. Otozomal (A), X ve Y kromozomları ve dişiler (kırmızı), erkekler (mavi) için mitokondriyal genom (MT) için beklenen ploidiyi gösterir. Beklenen değerdeki sapmalar karşı cinsten bulaşmayı gösterir. Alt kısımdaki grafik, referans genoma hizalanmış dizileri göstermektedir. Bu diziler noktalarla temsil edilen iki farklı alel taşır; ancak alel (beyaz), diğer alel (mavi) ile karşılaştırıldığında nadirdir. Heterozigot bir bölge için beklenen 50:50 oranı ile uyumlu değildir. Bu sonuç uyumsuz alel kontaminasyonundan kaynaklanabilmektedir¹⁴.

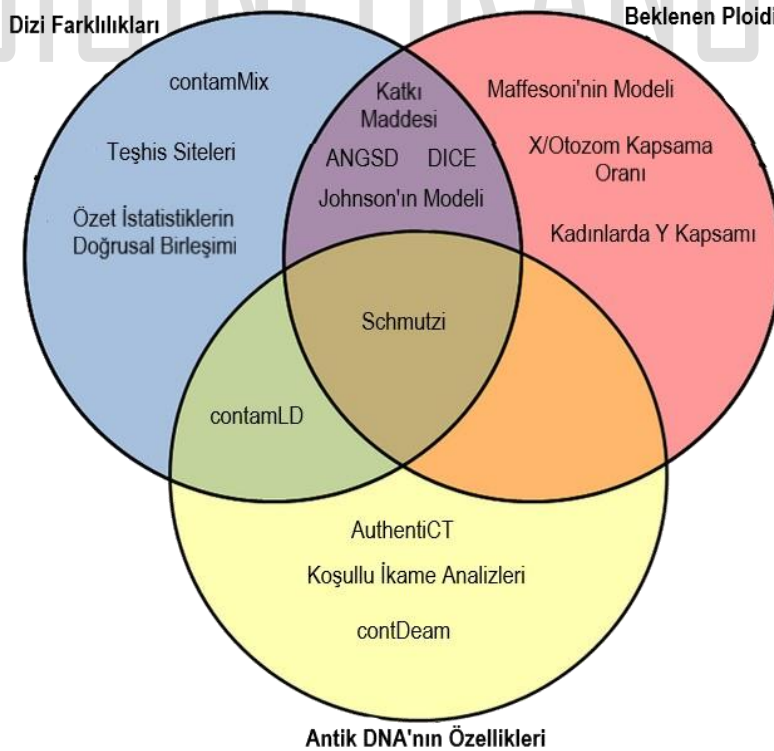
5.1.3. Antik DNA Bozulma Modelleri

DNA'nın bozulması, aDNA dizilerinin günümüz DNA kontaminasyonundan ayırt edebilmek için kullanılan karakteristik modeller bırakmaktadır. En yaygın hasar sitozin deaminasyonundan kaynaklanmaktadır ve DNA moleküllerinin uçlarında daha sık meydana gelmektedir. Sitozin deaminasyon, sitozinleri (C) urasilere (U) dönüştürmektedir ve daha sonra bunlar DNA kitaplığı hazırlama sırasında kullanılan DNA polimerazları tarafından timinler (T) olarak yanlış okunmaktadır. Dizi verilerinde hatalı C-to-T ikamelerine yol açmaktadır. Deaminasyon ile indüklenen C-T süstitüsyonlarının prevalansı numunelerin yaşıyla beraber artmaktadır; ancak iklim gibi diğer faktörlerin de önemli

etkisi bulunmaktadır. C-to-T ikamelerin sıklığı, hasar görmemiş günümüz DNA'sı ile karşılaştırarak kontaminasyonu ölçmeyi sağlamaktadır. Tanısal olmasa da aDNA dizilerinin uzunluğu gibi özelliklerde kullanılabilir. Bu modeller daha az sayıda dizi gerektirmektedir ve daha önceden genetik ilişkiler hakkında bilgisi gerektirmemektedir²⁶.

5.2. Kontaminasyon Tahmin Etme Yöntemleri

aDNA'ların kontaminasyonunu tahmin etmek için birçok yöntem geliştirilmiştir (Şekil 8). Bu yöntemler kontaminasyon sinyallerine dayanmaktadır. Bu yüzden yöntem seçerken analiz edilecek verinin türünü dikkate alınması gerekmektedir²⁴.



Şekil 8. Kontaminasyon tahmin etme yöntemlerinin sınıflandırılması²⁴. Yöntemler kullandıkları sinyallere göre sınıflandırılmaktadır. Dizi farklılıkları (mavi), beklenen ploidi (kırmızı) ve aDNA özellikleri (sarı) olarak gösterilmektedir²⁴.

5.2.1. Mitokondriyal DNA

aDNA çalışmalarında ilk olarak mitokondriyal genom dizilemesi gerçekleştirilmektedir. Hücrelerde yüksek mitokondri kopya sayısı, onların küçük genomu ve mitokondriyal DNA için zenginleştirme yöntemlerinin geniş mevcudiyetleri, mitokondriyal genomu nükleer genomdan daha yüksek kapsamaya göre sıralamayı kolaylaştırmaktadır^{27,28}.

5.2.2. Cinsiyet Kromozomları

Cinsiyet kromozomları, mitokondriyal genomlardan daha az erişilebilirdir. Popülasyonlar arasında cinsiyete dayalı göçü ve karışımı incelemek için araç olarak görülmektedir. Erkek cinsiyet kromozomlarının haploid durumuna veya dişilerde Y kromozomununun yokluğuna dayanan kontaminasyon tahminleri cinsiyet kromozom verileri için geliştirilmiştir^{29,30}.

5.2.3. Otozomal DNA

Otozomal DNA'dan kontaminasyonu tahmin etmek diploidi nedeniyle oldukça zordur ve dizi kapsamı genellikle düşük olmaktadır. Ek olarak, popülasyon geçmişi ve seçiminin incelenmesi için otozomal veriler vazgeçilmezdir. Doğru sonuçları sağlamak için doğru kontaminasyonların tahminleri çok önemlidir²³.

Sonuç olarak, antik DNA insanın geçmişi merakı sayesinde gün geçtikçe gelişmekte ve büyümekte olan multidisipliner bir alandır. aDNA'nın elde edilmesinden analizine kadar geçen süreç hassasiyet gerektirmektedir. Bu süreçte endişe veren sorunlar da bulunmaktadır. Bu sorunların başında kontaminasyon gelmektedir. Yeni yöntemler ve sistemler ile bu sorunları çözmeye uğraşmaktadır.

Referanslar:

1. Orlando, L., Allaby, R., Skoglund, P., Der Sarkissian, C., Stockhammer, P. W., Ávila-Arcos, M. C., Fu, Q., Krause, J., Willerslev, E., Stone, A. C., & Warinner, C. (2021). Ancient DNA analysis. *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/s43586-020-00011-0>
2. Ancient DNA analysis. (2021). *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00016-3>
3. Paabo, S. (1989). Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(6), 1939–1943. <https://doi.org/10.1073/PNAS.8.6.6.1939>
4. Brotherton, P., Endicott, P., Sanchez, J. J., Beaumont, M., Barnett, R., Austin, J., & Cooper, A. (2007). Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C > U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. *Nucleic Acids Research*, 35(17), 5717. <https://doi.org/10.1093/NAR/GK M588>
5. Bennett, E. A., Massilani, D., Lizzo, G., Daligault, J., Geigl, E. M., & Grange, T. (2014). Library construction for ancient genomics: Single strand or double strand? *BioTechniques*, 56(6), 289–300. <https://doi.org/10.2144/000114176>
6. Höss, M., & Pääbo, S. (1993). DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research*, 21(16), 3913. <https://doi.org/10.1093/NAR/21.16.3913>
7. Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M. T., Weihmann, A., Nickel, B., Valdiosera, C., García, N., Pääbo, S., Arsuaga, J. L., & Meyer, M. (2013). Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(39), 15758–15763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314445110>
8. Gilbert, M. T. P., Willerslev, E., Hansen, A. J., Barnes, I., Rudbeck, L., Lynnerup, N., & Cooper, A. (2003). Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *American Journal of Human Genetics*, 72(1), 32–47. <https://doi.org/10.1086/345378>
9. Höss, M., Jaruga, P., Zastawny, T. H., Dizdaroglu, M., & Pääbo, S. (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research*, 24(7), 1304–1307. <https://doi.org/10.1093/NAR/24.7.1304>
10. Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., Von Haeseler, A., & Pääbo, S. (2001). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research*, 29(23), 4793–4799. <https://doi.org/10.1093/NAR/29.23.4793>
11. Poinar, H. N., Höss, M., Bada, J. L., & Pääbo, S. (1996). Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5263), 864–866. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.272.5263.864>
12. Casassa, G. , A. Rivera , M. Aniya , and R. Naruse. (2002). The Patagonian Icefields: A Unique Natural Laboratory for Environmental and Climate Change Studies. Kluwer Academic/Plenum Publishers. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0645-4>
13. Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2002.2218>
14. Hofreiter, Michael, Mead, J. I., Martin, P., & Poinar, H. N. (2003). Molecular caving. *Current Biology: CB*, 13(18). <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2003.08.039>
15. Ziesemer, K. A., Mann, A. E., Sankaranarayanan, K., Schroeder, H., Ozga, A. T., Brandt, B. W., Zaura, E., Waters-Rist, A., Hoogland, M., Salazar-García, D. C., Aldenderfer, M., Speller, C., Hendy, J., Weston, D. A., MacDonald, S. J., Thomas, G. H., Collins, M. J., Lewis, C. M., Hofman, C., & Warinner, C. (2015). Intrinsic challenges in ancient microbiome reconstruction using 16S rRNA gene amplification. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/SREP16498>
16. Noonan, J. P., Hofreiter, M., Smith, D., Priest, J. R., Rohland, N., Rabeder, G., Krause, J., Detter, J. C., Pääbo, S., & Rubin, E. M. (2005). Genomic sequencing of Pleistocene cave bears. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5734), 597–600. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1113485>
17. Millar, C. D., Huynen, L., Subramanian, S., Mohandesan, E., & Lambert, D. M. (2008). New developments in ancient genomics. *Trends in Ecology &*

- Evolution*, 23(7), 386–393.
<https://doi.org/10.1016/J.TREE.2008.04.002>
18. Rizzi, E., Lari, M., Gigli, E., De Bellis, G., & Caramelli, D. (2012). Ancient DNA studies: New perspectives on old samples. *Genetics Selection Evolution*, 44(1), 1–19.
<https://doi.org/10.1186/1297-9686-44-21>
 19. Meyer, M., Briggs, A. W., Maricic, T., Höber, B., Höffner, B., Krause, J., Weihmann, A., Pääbo, S., & Hofreiter, M. (2008). From micrograms to picograms: quantitative PCR reduces the material demands of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Research*, 36(1).
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKM1095>
 20. Miller, W., Drautz, D. I., Ratan, A., Pusey, B., Qi, J., Lesk, A. M., Tomsho, L. P., Packard, M. D., Zhao, F., Sher, A., Tikhonov, A., Raney, B., Patterson, N., Lindblad-Toh, K., Lander, E. S., Knight, J. R., Irzyk, G. P., Fredrikson, K. M., Harkins, T. T., ... Schuster, S. C. (2008). Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature*, 456(7220), 387–390.
<https://doi.org/10.1038/NATURE07446>
 21. Vestheim, H., & Jarman, S. N. (2008). Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Frontiers in Zoology*, 5, 12.
<https://doi.org/10.1186/1742-9994-5-12>
 22. Briggs, A. W., Good, J. M., Green, R. E., Krause, J., Maricic, T., Stenzel, U., Lalueza-Fox, C., Rudan, P., Brajković, D., Kućan, Z., Gušić, I., Schmitz, R., Doronichev, V. B., Golovanova, L. V., De La Rasilla, M., Fortea, J., Rosas, A., & Pääbo, S. (2009). Targeted retrieval and analysis of five Neandertal mtDNA genomes. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5938), 318–321.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1174462>
 23. Peyrégne, S., & Prüfer, K. (2020). Present-Day DNA Contamination in Ancient DNA Datasets. *BioEssays*, 42(9), 2000081.
<https://doi.org/10.1002/BIES.202000081>
 24. Green, R. E., Malaspinas, A. S., Krause, J., Briggs, A. W., Johnson, P. L. F., Uhler, C., Meyer, M., Good, J. M., Maricic, T., Stenzel, U., Prüfer, K., Siebauer, M., Burbano, H. A., Ronan, M., Rothberg, J. M., Egholm, M., Rudan, P., Brajković, D., Kućan, Ž., ... Pääbo, S. (2008). A complete Neandertal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing. *Cell*, 134(3), 416–426.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.06.021>
 25. Racimo, F., Renaud, G., & Slatkin, M. (2016). Joint Estimation of Contamination, Error and Demography for Nuclear DNA from Ancient Humans. *PLoS Genetics*, 12(4).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1005972>
 26. Renaud, G., Slon, V., Duggan, A. T., & Kelso, J. (2015). Schmutzi: estimation of contamination and endogenous mitochondrial consensus calling for ancient DNA. *Genome Biology*, 16(1).
<https://doi.org/10.1186/S13059-015-0776-0>
 27. Maricic, T., Whitten, M., & Pääbo, S. (2010). Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS one*, 5(11), e14004.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014004>
 28. Wagner, S., Lagane, F., Seguin-Orlando, A., Schubert, M., Leroy, T., Guichoux, E., Chancerel, E., Bech-Hebelstrup, I., Bernard, V., Billard, C., Billaud, Y., Bolliger, M., Croutsch, C., Čufar, K., Eynaud, F., Heussner, K. U., Köninger, J., Langenegger, F., Leroy, F., Lima, C., ... Orlando, L. (2018). High-Throughput DNA sequencing of ancient wood. *Molecular ecology*, 27(5), 1138–1154.
<https://doi.org/10.1111/mec.14514>
 29. Karmin, M., Saag, L., Vicente, M., Wilson Sayres, M. A., Järve, M., Talas, U. G., Rootsi, S., Ilumäe, A. M., Mägi, R., Mitt, M., Pagani, L., Puurand, T., Faltyskova, Z., Clemente, F., Cardona, A., Metspalu, E., Sahakyan, H., Yunusbayev, B., Hudjashov, G., DeGiorgio, M., ... Kivisild, T. (2015). A recent bottleneck of Y chromosome diversity coincides with a global change in culture. *Genome research*, 25(4), 459–466.
<https://doi.org/10.1101/gr.186684.114>
 30. Poznik, G. D., Xue, Y., Mendez, F. L., Willems, T. F., Massaia, A., Wilson Sayres, M. A., Ayub, Q., McCarthy, S. A., Narechania, A., Kashin, S., Chen, Y., Banerjee, R., Rodriguez-Flores, J. L., Cerezo, M., Shao, H., Gymrek, M., Malhotra, A., Louzada, S., Desalle, R., Ritchie, G. R., ... Tyler-Smith, C. (2016). Punctuated bursts in human male demography inferred from 1,244 worldwide Y-chromosome sequences. *Nature genetics*, 48(6), 593–599.
<https://doi.org/10.1038/ng.3559>