

Mitochondrial Genome Analyses and Haplo-Group Determination in Human Skeletons

İnsan İskeletlerinde Mitokondriyal Genom Analizi ve Haplo-Grup Tayini

^{1,2}Nefize Ezgi ALTINIŞIK ve ³Ercan ARICAN

¹İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 34134, Vezneciler-İstanbul/TÜRKİYE

² Hacettepe Üniversitesi, Edebiyat Fakültesi, Antropoloji Bölümü, Antropoloji Anabilim Dalı,
06800, Beytepe-Ankara/TÜRKİYE

³İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 34134,
Vezneciler-İstanbul/TÜRKİYE

Abstract

Molecular anthropology has been dramatically enhanced recently by the development of high-throughput next generation sequencing. Significant datas have been obtained in respects of bio-cultural evolution of human under favour of ancient DNA researches in recent years. In Turkey, even if giving consequence to this field has been increased for five years, it is still limited. In this study, *d-loop* region of mitochondrial DNA extracted from human skeletons which uncovered from Nif Mountain Excavations in İzmir, Turkey was sequenced and haplo-groups were determined. Then, it was aimed to set down migration patterns using bioinformatic tools. In-depth information about Western Anatolia was revealed by evaluating this datas with archeological findings. This study has importance to pave the way of ancient DNA researches that is going to conduct in the future in Turkey. Information was got from this study has qualification to be a source future researches from archeological excavations of Western Anatolia. This thesis that bears archeological and historical records out has also a potential to lead to interdisciplinarity fields.

Keywords: ancient DNA, mitochondrial DNA, haplogroup, migration patterns

Öz

Moleküler antropoloji, son yıllarda ilerleyen yüksek çıktılı dizileme teknolojileri sayesinde büyük bir hızla gelişen bir alandır. Antik DNA çalışmaları ile son yıllarda insanın biyo-kültürel evrimine dair önemli veriler elde edilmiştir. Türkiye’de bu alana ilgi son beş yılda artmış olsa da halen sınırlıdır. Bu tez çalışmasında, İzmir İli Nif Dağı Kazıları’nın üç farklı bölgesi olan Karamattepe, Balıcaoluk ve Başpınar alanlarından çıkarılan üç farklı bireye ait iskeletlerden aDNA izolasyonları yapıldı. Elde edilen aDNA’ların mitokondriyal DNA d-loop bölgesi 8 primer kullanılarak “touchdown PCR” yöntemi ile çoğaltıldı. Çoğaltılan bölgeler sanger

yöntemiyle dizilendi ve bu üç bireyin haplogrupları biyoinformatik araçlar yardımıyla tespit edildi. Bu çalışma, Türkiye’de gelecekte yapılacak antik DNA çalışmalarının önünü açacak nitelikte olması açısından önem arz etmektedir. Batı Anadolu’nun arkeolojik ve tarihsel kayıtlarını destekleyen bu tez, aynı zamanda disiplinler arası çalışmalara öncülük etme potansiyeli taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: antik DNA, mitokondriyal DNA, haplogrup, göç örüntüleri

Giriş

İnsan var olduğu süre boyunca merak eden bir canlı olmuştur. Dolayısıyla bilimin tarihi de en az insanlığın tarihi kadar eskidir. İnsanlığın ilk icatlarından biri olarak kabul gören alet kullanımını aynı zamanda beynin gelişimi sürecine de büyük katkılar sunmuştur. Evrimsel süreç için kısa sayılacak yaklaşık 2 milyon yılda beynin biyokültürel evrimi bugünkü uygarlıkları kuracak seviyeye ulaşmıştır (Özbek, 2007). Son 2 milyon yılda insanın antropolojik tarihi büyük değişimler kayıt altına almıştır. Bu değişimler çoğunlukla birbirine sıkı sıkıya bağlıdır. Bipedal (iki ayak üzerinde) yaşama geçiş, alet yapma, el-göz koordinasyonunun sağlanması, iletişim becerilerinin sistematik hale gelmesi ve beynin evrimi insanın biyokültürel evriminde köşe taşlarıdır (Morgan, et al., 2015). 20. yüzyılda DNA ile yapılan çalışmalar hızla ilerlemiş, birçok farklı alana yayılmıştır. Teknolojik birikim ve donanım da bu çalışmalara paralel olarak artmış, bu sayede dizileme teknolojileri gelişmiş ve canlıların tüm genom dizileri saptanmaya başlamıştır. 20. yüzyılın son çeyreğinde ise artık insan genomunun dizilenmesi konuşulmaya başlanmış, büyük bütçelerle İnsan Genom Projesi hayata geçirilmiş ve ilk taslak sonuçları 2001 yılında açıklanmıştır (Rajan, 2012). Bugün DNA teknolojisi sentetik organizma üretiminden (Pennisi, 2010) veri depolamaya (George, et al., 2012) kadar birçok alanda kullanılmaktadır. Antik DNA (aDNA) çalışmaları ise bu tarihe paralel olarak ilerlemiştir. İlk olarak Higuchi ve arkadaşları (1984) tarafından soyu tükenmiş güney afrika zebrasının bir alt türüne ait olan iskeletin DNA'sı izole edilmiş, daha sonra ise Pääbo (1985) tarafından Mısırlı bir mumyaya ait DNA parçası bakteriye klonlanmıştır. Ancak az miktarda ve kalitesiz olan bu DNA, bakteriden geri izole edilememiştir. Mullis'in (1987), DNA'yı enzimatik olarak *in vitro* ortamda çoğaltmayı sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemini bulunması ile aDNA'lardan da sayısız miktarda kopya elde edilebilmesinin önü açılmıştır (Hagelberg, et al., 2015). Antik DNA çalışmaları, taksonomide, adli tıpta, soyu tükenmiş türlerin biyolojik adresinin tespitinde, göç örüntülerinin belirlenmesinde ve sıklıkla evrim çalışmalarında bilim dünyasına önemli katkılar sunmaktadır (Pääbo, et al., 2004). Bu çalışmada, İzmir ili Nif Dağı Kazı alanından çıkarılan insan iskeletlerinden mitokondriyal genom *d-loop* bölgesi dizilenecek haplogrup tespiti yapmak ve bölgeye dair göç yollarını aydınlatmak amaçlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilecek verilerin, bölgede sürmekte olan kazı çalışmalarının çıktılarıyla birleştiğinde bölgenin tarihsel geçmişinin aydınlatılabileceği öngörülmektedir.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada kullanılan ve 3 farklı bireye ait olan dişler, İ.Ü. Edebiyat Fakültesi, Arkeoloji Bölümü, Klasik Arkeoloji ABD tarafından Temmuz – Ağustos aylarında gerçekleştirilen, İzmir İli Nif Dağı Kazılarının Ballicaoluk, Karamattepe ve Başpınar alanlarında bulunan insan iskeletlerinden alınmıştır. Mezar açıldıktan sonra, mezar civarında en az sayıda kişinin kalması sağlanmış ve örnekleme mümkün olan en steril koşullarda yapılmıştır. Örnekleme, Avustralya Antik DNA Merkezi'nin (ACAD) yayınladığı örnekleme prosedürüne uygun olarak yapıldı (Cooper & Haak , 2010). Bu protokole uygun olarak iskeletin yatış pozisyonu ve kafatasının konumu belirlendikten sonra örnekleme yapılacak dişlerin yeri belirlenmiş ve steril eldiven ile maskeler kullanılarak kanin dişler alındı. Örneklemede, tek köklü olması ve kolayca çıkarılması nedeniyle genellikle kanin dişler alınmış, kaninlerin uygun olmaması veya bulunamaması durumunda diğer dişler tercih edilmiştir. Alınan örnekler, laboratuvara ulaştırılana kadar +4 °C'de muhafaza edilmiş ve laboratuvara soğuk zincir yöntemi kullanılarak ulaştırılmıştır. Örnekler, laboratuvar çalışmaları başlayana kadar +4 °C'de saklanmıştır.

Yüzey Sterilizasyonu

DNA izolasyonu yapılacak olan laboratuvar çalışma öncesi 2 saat boyunca UV ışık ile sterilize edildi. Daha sonra örnekler, 5 dakika süresince, 1/3 (v/v) oranında steril destile su ile sulandırılmış sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içerisinde bekletildi ve 30 dakika boyunca UV ışığa maruz bırakıldı. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen dişler boyun kısmından kesici alet (SKIL Rotation tool 1415 AC) ile kesildi ve cihaza her yeni örnek kesimi işleminden sonra steril uç takıldı. Kesilen diş kökü steril havanlarda ezilerek toz haline getirildi.

DNA İzolasyonu

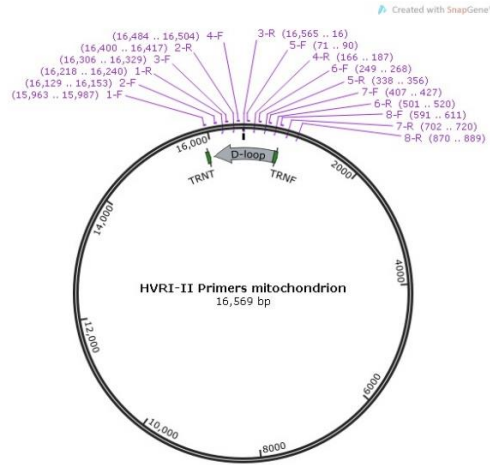
DNA izolasyonunda, ticari olarak temin edilen The Invisorb Spin Forensic Kit (STRATEC Biomedical AG, Germany, Katalog Numarası: 1034110300) kullanıldı ancak bu kitin aDNA çalışmalarına uygun hale getirilmesine yönelik optimizasyonu yapıldı. Kit dahilindeki Bone Lysis Enhancer solüsyonu yerine 490 µL EDTA ve 10 µL Proteinaz K solüsyonu kullanıldı ve toz haline getirilen diş kökü, bir gece 56 °C sıcaklıkta çalkalayıcıda inkübe edildi. DNA izolasyonun devamı, kit prosedürüne uygun olarak yapıldı. Her bir örnekten iki ayrı DNA izolasyonu yapıldı ve izole edilen DNA'ların miktar ve saflık tayinleri nanodrop (Thermo Scientific Nanodrop 2000, ABD) ile saptandı.

Mitokondri Dna'sının D-Loop Bölgesinin “Touchdown” Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Touchdown Pcr) İle Çoğaltılması

Örneklerden izole edilen DNA'larda mitokondri DNA'sı d-loop bölgesinin tamamının çoğaltılabilmesi için bu bölgeye özgün 8 adet primer “NCBI Primer Blast” çevrimiçi programı kullanılarak tasarlandı (Tablo 1). Primerlerin çoğalttığı bölge (amplikon) “SnapGene” programı kullanılarak belirlendi (Şekil 1).

Tablo 1: Primer listesi

| Adı | Dizisi (5' → 3') | PB (bc) | Tm (°C) | %GC | ÜB (bc) |
|---------|---------------------------|---------|---------|-------|---------|
| HVR_1-F | AAAAGTCTTTAACTCCACCATTAGC | 25 | 57,78 | 36 | 278 |
| HVR_1-R | TGATGTGTGATAGTTGAGGGTTG | 23 | 58,42 | 43,48 | |
| HVR_2-F | GGTACCATAAATACTTGACCACCTG | 25 | 59,18 | 44 | 289 |
| HVR_2-R | TTTCACGGAGGATGGTGG | 18 | 56,54 | 55,56 | |
| HVR_3-F | CATAGTACATAAAGCCATTTACCG | 24 | 55,75 | 37,5 | 280 |
| HVR_3-R | TGATAGACCTGTGATCCATCG | 21 | 56,71 | 47,62 | |
| HVR_4-F | TGAACTGTATCCGACATCTGG | 21 | 57,2 | 47,62 | 273 |
| HVR_4-R | CGCCTGTAATATTGAACGTAGG | 22 | 57,03 | 45,45 | |
| HVR_5-F | GTATGCACGCGATAGCATTG | 20 | 57,78 | 50 | 286 |
| HVR_5-R | GGGGTTTGGCAGAGATGTG | 19 | 58,43 | 57,89 | |
| HVR_6-F | ATGTCTGCACAGCCACTTTC | 20 | 58,76 | 50 | 272 |
| HVR_6-R | GTGTGTGCTGGTAGGATGG | 20 | 60,39 | 60 | |
| HVR_7-F | TTGGCGGTATGCACITTTAAC | 21 | 57,44 | 42,86 | 314 |
| HVR_7-R | ACTCACTGGAACGGGGATG | 19 | 59,02 | 57,89 | |
| HVR_8-F | CCTCCTCAAAGCAATACACTG | 21 | 56,61 | 47,62 | 299 |
| HVR_8-R | CACGAAATTGACCAACCCTG | 20 | 57,3 | 50 | |



Şekil 1: Primerlerin taradığı bölge

Amplikonların verimli olarak çoğaltılabilmesi için üç farklı ticari PCR kiti prosedürlerine uygun olarak denendi. Bu kitler sırasıyla; GeneDirex Taq Polimeraz (KN: MB101-0500), Norgen Taq Polimeraz (KN: 28095) ve High Fidelity PCR Master (Roche Diagnostics, Deutschland, KN: 11732650001) kitleri olarak belirlendi. Buna ek olarak, polimerizasyon reaksiyonu aşamasında primerlerin kalıp bölgelere bağlanmasını arttırabilmek amacıyla High Fidelity PCR Master kiti ile yapılan demeye kit prosedüründen farklı olarak H₂O yerine 2.5 µl (stok 5M) betain eklendi. Reaksiyonların tamamı “Touchdown PCR” yöntemi ile C1000 Thermal Cycler (Biorad Laboratories, Inc., ABD) cihazı kullanılarak Tablo 2’de belirtilen koşullarda yapıldı.

Tablo 2: PCR koşulları

| 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 |
| Saklama | 1 | Süresiz | 4 °C |

D-Loop Bölgesine Ait Çoğaltılan Amplikonların Dizilenmesi ve Biyoinformatik Analizleri
PCR ile çoğaltılan d-loop bölgesine ait amplikonların sanger dizilenmeleri, DONE Genetik ve Biyoinformatik Anonim Şirketi tarafından ABI 3730 XL (Applied Biosystems, ABD) cihazı

kullanılarak yapılmıştır. Dizileme işleminden sonra, ham dizi verileri düzenlenerek FASTA formatına dönüştürüldü ve tüm amplicon dizileri birleştirildi. Birleştirilen diziler ilk olarak CLUSTALW yazılımıyla revize edilmiş Cambridge Referans Dizisi'ne (rCRS) göre hizalama yapıldı ve MEGA4 yazılımıyla neighbour-joining yaklaşımıyla filogenetik ağaç oluşturuldu. Haplo-grup tespitleri, *phylotree* veri tabanını kullanarak çalışan MitoTool platformu ile yapıldı.

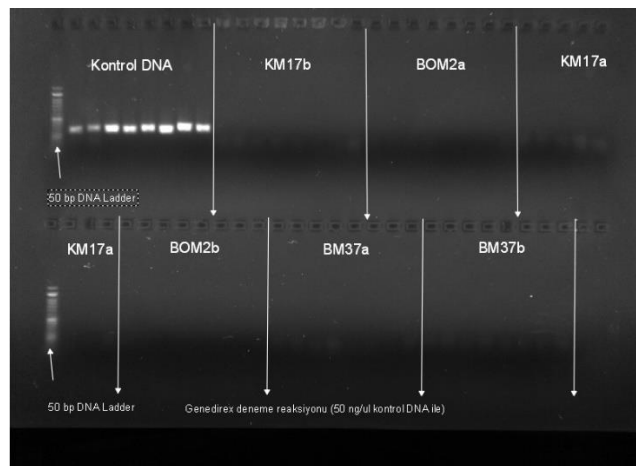
Bulgular

Her üç örnekten de iki set halinde yapılan DNA izolasyonlarının nanodrop cihazı ile yapılan spektrofotometri ölçüm sonuçları Tablo 3'de gösterilmiştir.

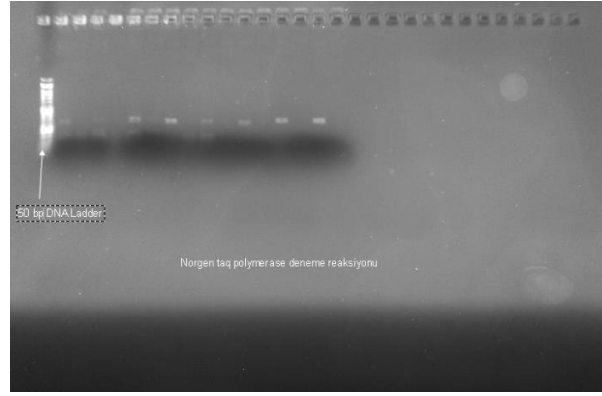
Tablo 3: Konsantrasyon ölçüm sonuçları.

| Örnek No. | Konsantrasyon (ng/μL) | 260/280 | 260/230 | Kazı Alanı |
|-----------|-----------------------|---------|---------|-------------|
| KM17a | 3,8 | 2,06 | 0,17 | Karamattepe |
| KM17b | 7,4 | 1,85 | 0,11 | |
| BOM2a | 19,5 | 1,56 | 0,22 | Ballicaoluk |
| BOM2b | 24,7 | 1,53 | 0,21 | |
| BM37a | 3 | 2,33 | 0,09 | Başpınar |
| BM37b | 9,7 | 1,68 | 0,08 | |

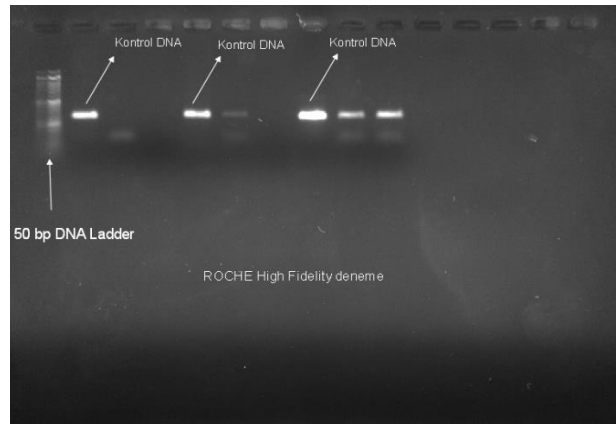
Çoğaltım tepkimeleri için ve Taq Polimeraz denenmiştir. Bu polimerazlardan GeneDirex Taq Polimeraz ve Norgen Taq Polimeraz'dan sonuç alınmazken High Fidelity PCR Master reaksiyonunda bant saptanmıştır (Şekil 2, 3 ve 4).



Şekil 2: Genedirex deneme reaksiyonu.

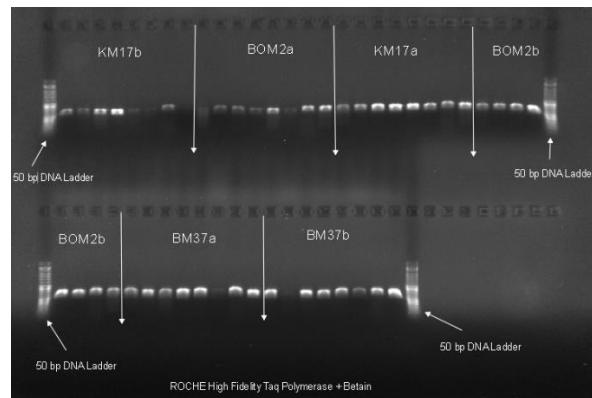


Şekil 3: Norgen Taq Polimeraz deneme reaksiyonu.



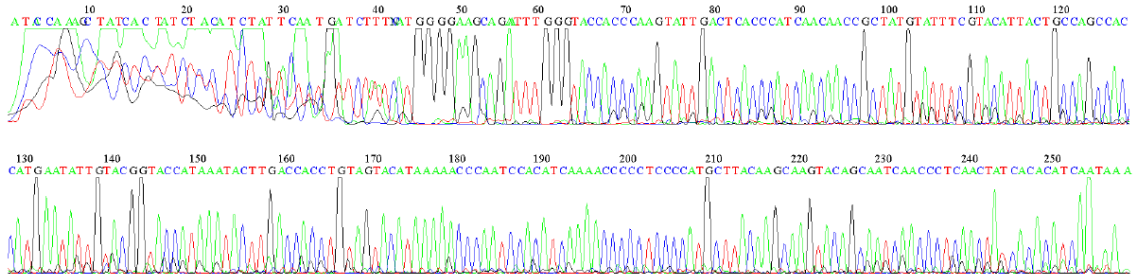
Şekil 0: ROCHE High Fidelity Taq Polimeraz deneme reaksiyonu.

Bu denemeler sonucunda ROCHE High Fidelity Taq Polimeraz kullanılmasına karar verilmiş, bağlanmayı arttırarak çoğaltımı daha kaliteli hale getirmek için reaksiyona H₂O yerine betain eklenmiştir ve daha yoğun bantlar gözlenmiştir. Buna bağlı olarak tüm örneklerden 8 primer ile çoğaltım yapılmış ve her örnek için tüm ampliconlar çoğaltılabildiği (Şekil 5).

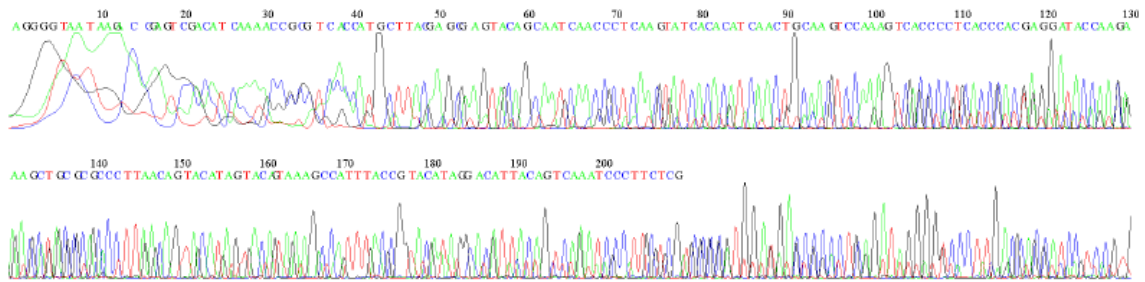


Şekil 5: ROCHE High Fidelity Taq Polimeraz+Betain reaksiyonu.

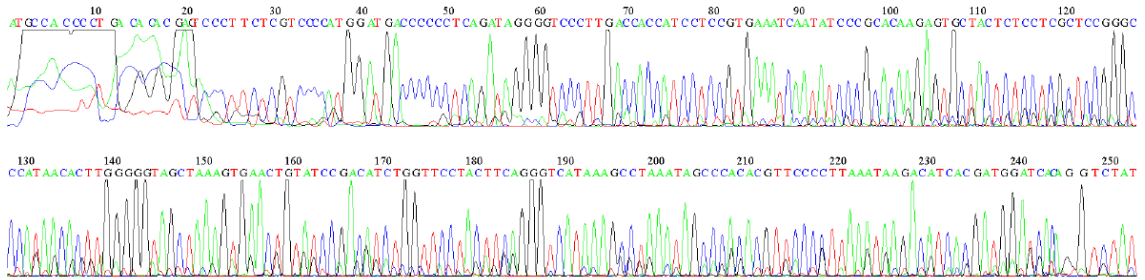
Daha sonra, çoğaltılan amplikonlar dizilenmiştir. ABI 3730 XL yeni nesil dizileme cihazı kullanılarak yapılan dizileme sonuçlarına dair kromatogramlar Şekil 6-12 arasında gösterilmiştir.



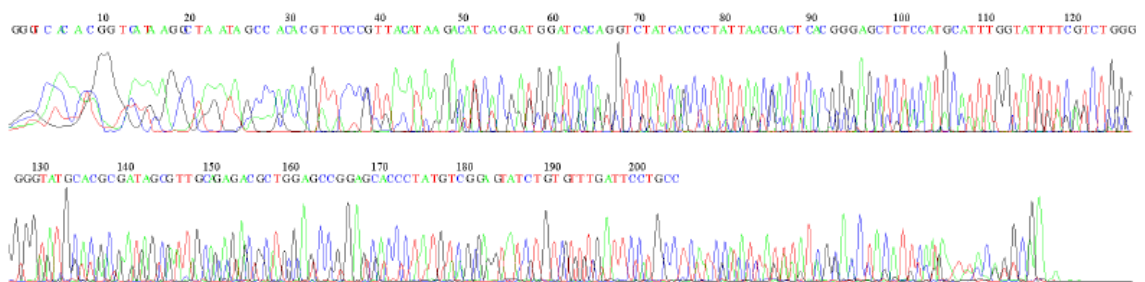
Şekil 6: BM37a Amplikon 1



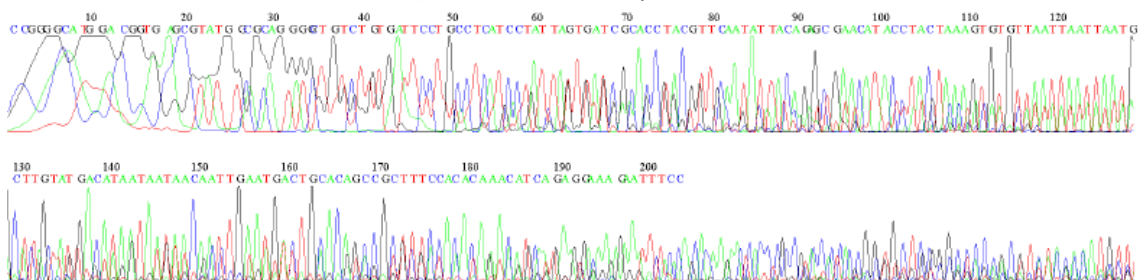
Şekil 7: BM37a Amplikon 2



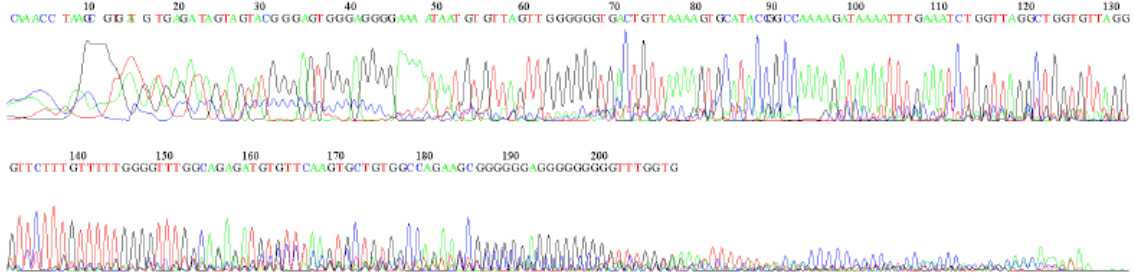
Şekil 8: BM37a Amplikon 3



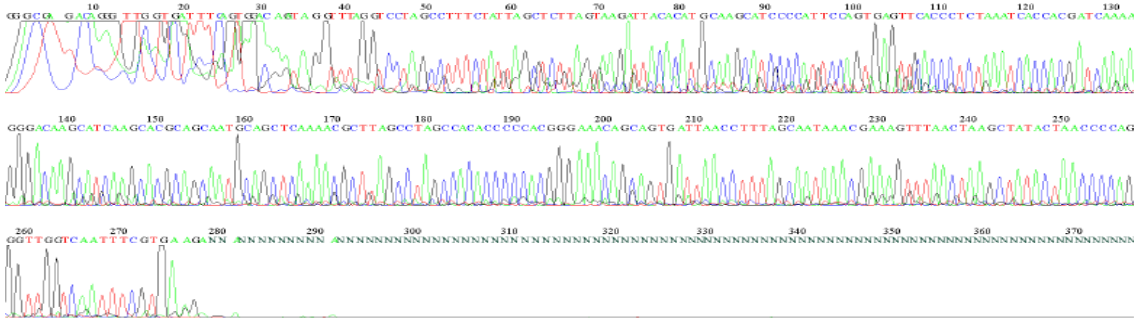
Şekil 9: BM37a Amplikon 4



Şekil 10: BM37a Amplikon 5

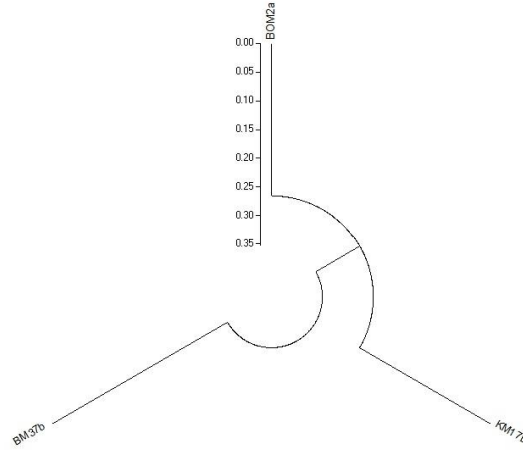


Şekil 11: BM37a Amplikon 6



Şekil 12: KM17b Amplikon 8

Kromatogramlar değerlendirildiğinde, dizileme kalitesinin aDNA'nın hasarlı yapısı ve kontaminasyondan dolayı düşük olduğu gözlemlendi. İlk olarak tüm örnekler rCRS'ye göre hizalandı ve hatalı örnekler tespit edildi. Yüksek oranda hatalı olduğu tespit edilen BM37a, BOM2b ve KM17a olmak üzere üç örnek analiz sonuçlarına katılmadı. Daha sonra bireylerin birbirleriyle olan ilişkileri göstermek amacıyla MEGA4 yazılımı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil 13). Evrimsel akrabalık ağacına bakıldığında, BOM2 örneği ile KM17 örneğinin birbirlerine BM37 örneğinden daha yakın olduğu saptandı.



Şekil 13: Neighbour-joining metodu ile çizilen evrimsel akrabalık ağacı.

MitoTool yazılımı kullanılarak yapılan haplo-grup tespitleri Tablo 4’te gösterilmiştir.

Tablo 0: Belirlenen haplo-grup tespitleri

| Birey | Haplo-grup | Hatalar |
|-------|--------------------------|--|
| | | H2a1f:263; |
| BM37 | H2a1f, U5a2b1b, U5a2b2a1 | U5a2b1b:73, 263, 16256; U5a2b2a1:73, 263, 16256 |
| BOM2 | P4b1 | P4b1:73, 263 |
| KM17 | T2c1, T2k | T2c1:73, 263; T2k:73, 263 |

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada İzmir İli Nif Dağı Kazılarının üç farklı araştırma alanından çıkarılan iskeletlerin mitokondriyal genomlarının haplo-gruplarının ve birbirleriyle olan ilişkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu hedefe yönelik olarak, 3 bireyin DNA izolasyonları yapıldı ve mtDNA *d-loop* bölgeleri dizilendi. Son aşamada, biyoinformatik yöntemler kullanılarak haplo-grup tespiti yapıldı. DNA sonrası yapılan spektrofotometrik ölçümlerin sonuçlarına göre, DNA miktarı ve saflık değerinin aDNA çalışmaları açısından başarılı olduğu gözlenmiştir. Uzun yıllar toprak altında kalmış olması nedeniyle DNA miktarı ve kalitesinin düşük olması aDNA çalışmalarının ortak sorunudur. Bu nedenle, başarılı çoğaltım yapılabilmesi amacıyla farklı PCR prosedürleri ve protokolleri denenmiştir. En başarılı sonucun betain eklenerek yapılan reaksiyondan alındığı tespit edilmiştir (Şekil 5). Bu yöntem ile tüm örnekler çoğaltılabildi, daha sonra dizileme işlemi yapılmıştır. Dizileme kromatogramlarına bakıldığında arka planda yoğun miktarda gürültü bulunduğu tespit edilmiştir. Her ne kadar kontaminasyon riskine karşı gerekli önlemler alınmış olsa da, arka plandaki gürültünün nedeninin kontaminasyon olduğu açıktır. Tüm analizler bu durum göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Aynı sebepten, sonuçların yanlış yorumlanmasına sebep olabilecek üç örnek analizlerden çıkarılmıştır. Üç bireyin birbirleriyle olan ilişkileri çizilen evrimsel ağaçta gösterilmiştir. Bu bulgu, arkeolojik verilerle desteklenmektedir. Evrimsel ağaçta birbiriyle ilişkili görünen BOM2 bireyi (Ballicaoluk) ile KM17 bireyinin (Karamattepe) yaşadıkları bölgeler, coğrafi olarak yakın konumlarda buldukları gibi, tarihsel olarak da yakın dönemde yaşamış olabilecekleri düşünülmektedir. BM37 kodlu Başpınar mevkiinde Bizans Döneminde yaşamış olan birey ise evrimsel ağaçta diğerlerinden uzakta konumlanmıştır (Şekil 12). Haplo-grup verilerine bakıldığında, KM17 bireyinin T2, BM37 bireyinin U5a2 veya H2a, BOM2 bireyinin ise P4b1 haplo-grubuna dâhil olabileceği saptanmıştır. P4b1 haplo-grubu Avustralya Aborjinlerine özgüdür (van Holst Pellekaan, et al., 2006). Yaklaşık olarak MÖ 4. Yüzyıla tarihlenen BOM2 örneğinin Avustralya Aborjinleri ile akraba olabileceğine dair tarihsel bir kayıt bulunmadığından haplo-grup tespitinde hata olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

George, C. M., Gao, Y. & Kosuri, S., 2012. *Next-Generation Digital Information Storage in DNA*, basım yeri bilinmiyor: Science,

Hagelberg, E., Hofreiter, M. & Keyser, C., 2015. Ancient DNA: The first three decades. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 370(20130371), pp. 1-4.

Higuchi, R. ve diğeri, 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, Cilt 312, pp. 282-284.

Morgan, T. J. ve diğeri, 2015. Experimental evidence for the co-evolution of hominin tool-making teaching and language.. *Nature communications*, 6(6029).

Mullis, K. B., 1987. *Process for amplifying nucleic acid sequences*. US California, Patent No. 4,683,202.

Özbek, M., 2007. *Dünden Bugüne İnsan*. 2 dü. Ankara: İmge Yayınevi.

Pääbo, S., 1985. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, Cilt 314, pp. 644-645.

Pääbo, S. ve diğeri, 2004. Genetic Analysis from Ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.*, Cilt 38, pp. 645-679.

Pennisi, E., 2010. Synthetic Genome Brings New Life to Bacterium. *Science*, 21 05, pp. 958-959.

Rajan, K. S., 2012. *Biyokapital Genom-Sonrası Hayatın Kuruluşu*. 1 dü. İstanbul: Metis Yayıncılık.

van Oven, M., 2014. *Phylotree*. [Çevrimiçi]
Available at: <http://www.phylotree.org/tree/main.htm>
[Erişildi: 12 02 2015].

van Oven, M. & Kayser, M., 2008. Updated Comprehensive Phylogenetic Tree of Global Human Mitochondrial DNA Variation. *Human Mutation*, 29(1039), pp. 386-394.