

Antik DNA (aDNA)

DOÇ. DR. ERCAN ARICAN
İ.Ü. FEN FAKÜLTESİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ



İlk Çalışmalar;

İlk ancient DNA (aDNA) çalışması, 1984 yılında at/zebra ailesinin bir üyesi ve nesli tükenmiş bir hayvan olan " quagga " üzerinde yapıldı.



İnsanlar üzerinde ise ilk aDNA çalışması 1985 yılında yapılmıştır.

En iyi şartlar altında dahi DNA'nın 130.000 yıldan daha fazla varlığını koruyamayacağını unutmamak gerekir.

aDNA analizleri ile;

- Antropoloji alanında, aDNA tekniklerinin uygulanması ile, insanlığın kökeni ve davranışları hakkında bilgi edinmek,
- Populasyonlar arasındaki ata-torun ilişkisini ayrıntılı bir şekilde incelemek;
- İnsan/primat evrimini ve hikayesini anlamak;
- Eski tarihlerde yaşamış insanlara ait kalıntılardan elde edilen moleküler bilgi ile sosyal yapı modeline açıklık getirmek;
- Cinsiyet belirlemek;
- Bu bilgilerden yola çıkarak, sosyal konumlar, evlilik modelleri, cenaze törenleri, farklı hastalıklar ve cinsiyete bağlı ölümler üzerine ışık tutmak mümkün olmaktadır.

aDNA çalışmalarında yararlanılan iki temel DNA kaynağı vardır:

- **Nukleus içinde:** genomik DNA'nın büyük çoğunluğu hücrede çekirdek içinde bulunur.
- **Organeller içinde:** hücre başına düşen toplam genomik DNA'nın çok az bir kısmı da mitokondri ve kloroplast içindedir. Bir hücrede her bir organelde yüzlerce bulunmaktadır ve her biri de DNA'nın birçok kopyasını içerir. Sonuç olarak hücre başına total mitokondri ve kloroplasttan kaynaklanan binlerce DNA kopyası düşer. Bu yüksek miktardaki kopya sayısı organellerden DNA'nın intakt segmentlerini elde etmemizi sağlar.

*Nukleus DNA'sı ile karşılaştırılacak olursa aDNA çalışmalarında organel DNA'sı tercih edilir.

*mtDNA yalnız anneden kalıtlanır ve replikasyona uğramaz!

Fakat mtDNA ile çalışmak birtakım sorunları da beraberinde getirir:

- Nükleer DNA 'daki çoklu genlerle karşılaştırılınca tek bir genle kalıtlanması dezavantaj sağlamaktadır çünkü; tek bir lokus rastgele oluşan genetik düzensizliklerden daha çok etkilenir.
- Farklı gruplardan kadın ve erkeklerin evlenmesi de söz konusu olabildiğinden mtDNA çalışmalarından elde edilen sonuçlar nükleer DNA analizi sonuçlarına uymayabilir.

İnsan dışındaki hayvan türlerinin analizinde de mtDNA ve nukleus DNA'sı benzer şekilde kullanılabilir. Bu noktada, antropoloji alanında, insan dışındaki organizmalara ait aDNA, daha çok tür/cins belirlemek için veya filogenetik analizler yapabilmek için kullanılmaktadır.

Uygulamalar

- insan kaynakları
 - bireysel seviyede
 - ailesel seviyede
 - lokal seviyede
 - Populasyon seviyesinde
 - tür seviyesinde
- insan dışındaki kaynaklar: çevresel
- Kültür kaynakları
 - mevsimsel populasyon göçleri
 - beslenme
 - diğer biyolojik kalıntılar
 - primatlar
 - enfeksiyonel hastalıklar
 - hayvanlar

insan kaynakları

bireysel seviyede aDNA çalışmaları;

- **X ve Y kromozomları üzerindeki markerları** kullanarak kişinin cinsiyetini belirlememizi ve kim olduğunu tespit etmemizi sağlar. Bu, kişinin varsayılan torunlarının DNA'ları ile karşılaştırma yapılarak bulunur.
- Morfolojik nitelikler bir kişinin genetik veya enfeksiyonel bir hastalık taşımış olabileceğini gösteriyorsa, aDNA, enfeksiyon ajanının veya hastalık yapan allelin varlığını doğrulamak için kullanılır.

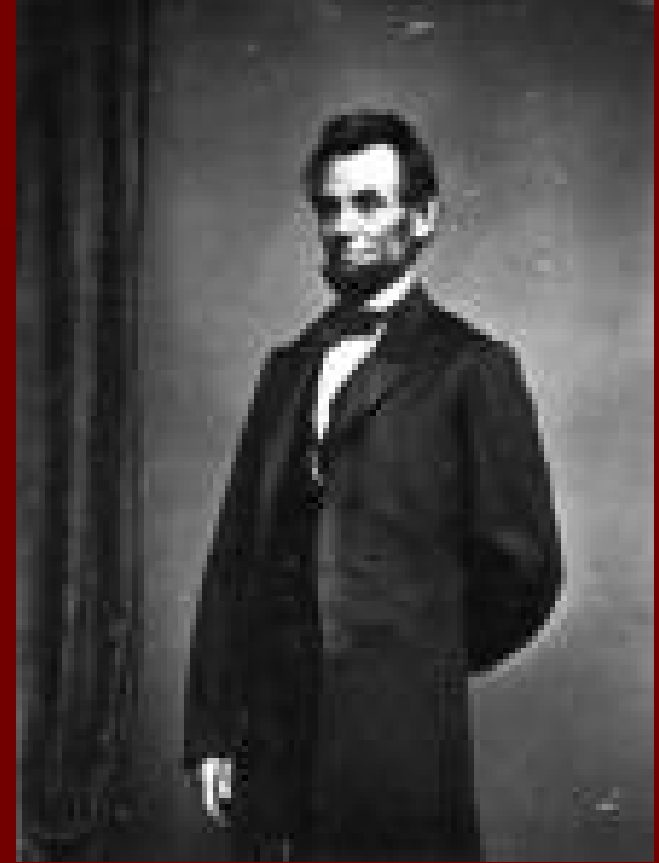
Bu konuyla ilgili ilginç bir örnek;

Ashkelon'da yapılan kazılarda, 4-6. y.y arasında genelev olarak işletilen bir Roma hamamının altındaki kanalizasyonda yaklaşık olarak 100 bebek kalıntısı ortaya çıkarılmıştır. İlgili kişiler bu durumun yeni doğan çocukları öldürmelerinden kaynaklandığı tahmin ettiler. 43 sol femur kullanılarak yapılan genetik cinsiyet analizleri 19 bireyin 14'ünün erkek ve 5'inin kız olduğunu ortaya çıkardı. Erkek çocukların %74 gibi yüksek bir oranda ölü olması ya da öldürülmesi şaşırtıcıydı çünkü toplum genelinde kız çocuklarının daha az olduğu biliniyordu. Bundan dolayı bebek kalıntılarının fahişelerin çocuklarına ait olduğu fikri ileri sürüldü. Ortada bir tercih söz konusuydu ve kadınlar bilinçli olarak erkek çocukları öldürüp kız çocukları yetiştiriyorlardı.

Kalıntıların cinsiyetinin belirlenmesi farklı mortalite oranlarının test edilmesi bakımından bize yardımcı olur. Böylece durumun doğal olarak mı yoksa insan faaliyeti ile mi gerçekleştiği hakkında fikir sahibi oluruz.

Otozomal kromozomlar üzerindeki bireysel varyasyonlar da değişik amaçlar için kullanılabilir. Bir kişide, bir genetik hastalığın varlığına dair morfolojik veya tarihe dayalı delillerin bulunduğu durumlarda, hastalığa neden olan gen bölgesi aDNA'dan amplifiye edilebilir ve bu hastalıkla ilgili mutasyonlar ortaya çıkartılabilir.

Örneğin; Abraham Lincoln'un büyük-büyük-büyük babasının (Mordecai Lincoln) torunlarında genetik bir hastalık olan ve 15. kromozomda lokalize olan fibrilin genindeki bir mutasyondan kaynaklanan Marfan sendromu tanısı konmuştur. Kendisinde de bu hastalığın semptomlarına rastlanmıştır. Eğer gerçekten bu hastalık zamanında Abraham Lincoln'de vardı ise bugün dahi ortaya çıkartılabilir.



Eğer, bireyin çocukları belirlenebilirse, Brezilya'da yapılan bazı kazılardan ortaya çıkan kalıntıların Josef Mengele'e ait olduğunu anlamak için kullanıldığı gibi mikrosatellit markerlardan faydalanılarak "ters" annelik-babalık testleri yapılabilir.



Eğer, direkt anne veya baba tarafından akrabalar belirlenebilirse mtDNA veya Y kromozom haplotipleri bireyin kim olduğunun ortaya çıkarılmasında kullanılabilir. Romanov ailesi bu tip çalışmalarla belirlenmiştir.



Ve yine benzer
şekilde XVII. Louis'in,
XVI. Louis'in ve
Marie Antoinette'nin
oğlu olmadığı
gösterilmiştir.



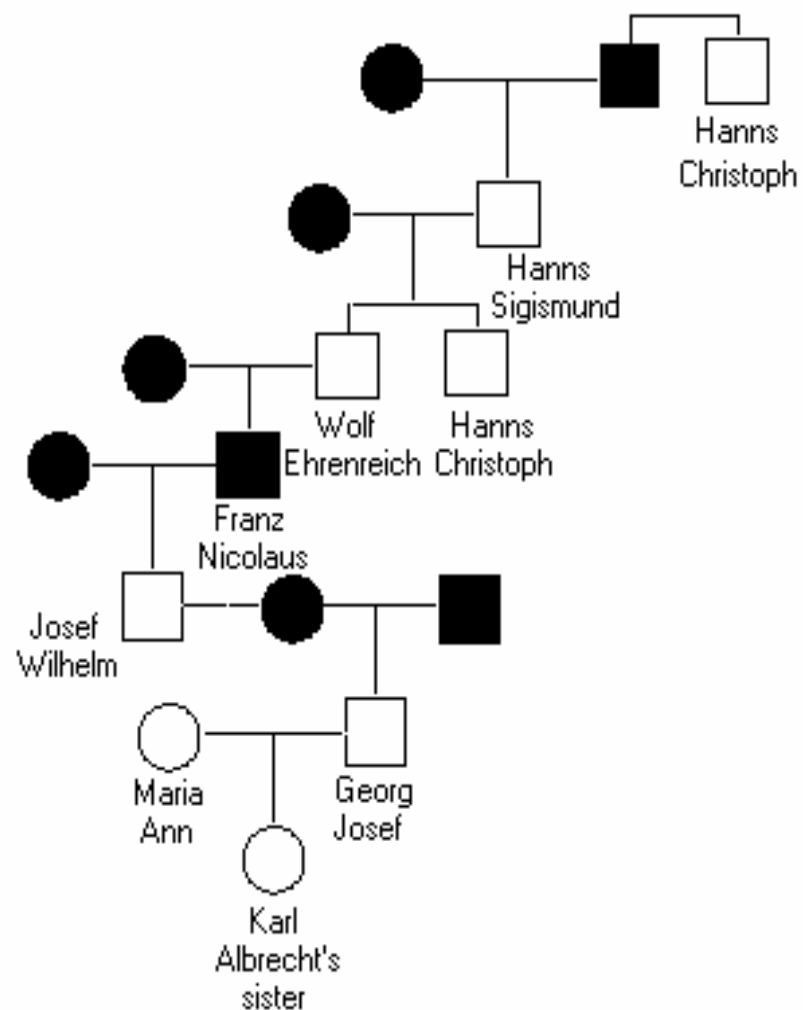
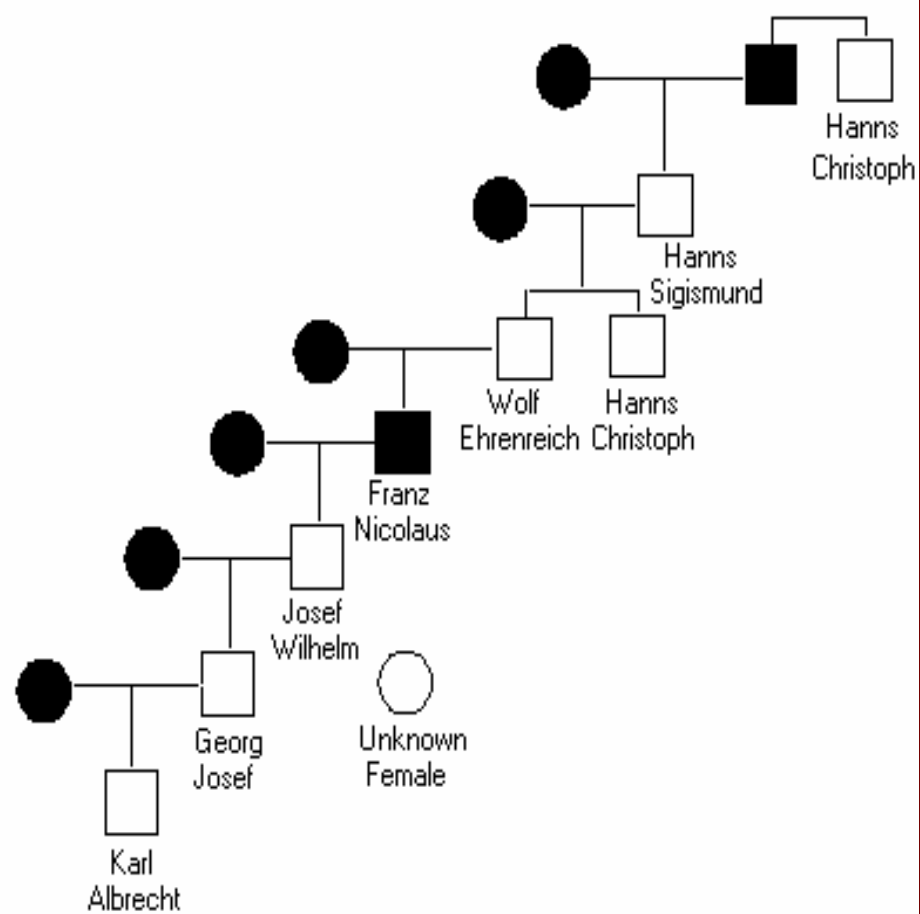
Ailesel seviyede

Pedigri analizleri antropoloji alanında çok uzun süredir kullanılmaktadır ve bugün aDNA analizleri bu uygulamaları geçmişe uzatmamıza olanak sağlar. Basit düzeyde, anasal ve babasal soylar mtDNA ve Y kromozomu kullanılarak ortaya çıkarılabilmektedir. Eğer uzun ve birbirinden çok farklı DNA bölgeleri dikkatle gözden geçirilecek olursa bireylerden aynı nadir mutasyonları taşıyanların birbirlerine yakın akraba oldukları görülür ama bu metod annelik veya babalık durumunun açığa çıkartılmasında çok da güvenilir değildir.

- Mayotik bir mutasyon olmadığı taktirde, bir birey aynı mtDNA mutasyonunu annesiyle, teyze ve dayısıyla, anne tarafından kuzenleriyle paylaşır.
- Erkekler de yine benzer şekilde, mayotik bir mutasyon olmadığı sürece aynı Y kromozom mutasyonunu babası, amcası, erkek kardeşleri ve baba tarafından kuzenleriyle paylaşır .

St. Margareth kilisesinde yapılan kazılar sonucu açığa çıkan gerçekler oldukça ilginçtir. Kilisedeki mezar taşları üzerindeki yazıtlar Königsfeld ailesinin 8 erkek üyesinin (7 jenerasyondan) 1546-1749 yılları arasında oraya gömüldüğünü işaret eder. Fakat 8. iskelet, mezarlık hırsızları tarafından yerinden kaldırılmıştır. Bu 7 birey üzerinde yapılan genetik testlerin sonuçları ile tarih kaynakları arasında uyuşmayan bazı noktalar vardır. Erkek olduğu düşünülen bu 7 bireyin 2 sinin bayan olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca otozomal ve Y kromozomu mikrosatellit analizleri bazı başka anomalileri ortaya çıkardı. Markerlar, yaşça büyük ve en kıdemli iki kontun(Hanns Christoph ve Hans Sigmund) iskeletlerinin muhtemelen kazılar sırasında yer değiştirildiğini ve Georg Josef'in önceki kontun (Josef Wilhelm) biyolojik oğlu olamayacağını gösterdi. Bu nedenle, bu kişi, ya Königsfeld ailesinin bir üyesi değildi ya da babası bu aileden değildi.

Bayan bireylerden birinin otozomal haplotipi bu kişinin Georg Josef'in kızı ve Karl Albrecht'in kız kardeşi olduğunu ortaya çıkardı oysa tarihsel delillere göre bu kişinin Karl Albrecht'in kendisi olduğu sanılıyordu. Diğer bayanın otozomal haplotipi ise o kişinin Maria Ann'in annesi olduğunu doğruladı.



Tür seviyesinde

Modern insan ve diğer hominidler arasındaki akrabalık ilişkilerinin aydınlatılmasında aDNA araştırmaları oldukça verimli sonuçlar sunmaktadır. Neandertallerin modern insanlara benzedikleri fakat aynı olmadıkları kabul edilmekle beraber evrimsel hikayemizdeki yerleri hala önemli bir tartışma konusunun başlığıdır.

İlk kez bir Neandertalin DNA sekansının ortaya çıkarılmasından sonra bundan başka iki Neandertal bireyin mtDNA sekansları da ortaya çıkarıldı ve Neandertale ait mtDNA sekansının modern insanınkinden çok farklı olduğu görüldü.

Enfeksiyonel hastalıklar

Tarih öncesi hastalıklara ait sorulara cevap bulabilmek için de yine aDNA teknikleri kullanılır;

- **Tuberkuloza** neden olan mikroorganizma yani *Mycobacterium tuberculosis* 1000 yıllık bir mumyadan başarılı bir şekilde amplifiye edilmiştir. Amerika yerlilerinden elde edilen *Mycobacterium tuberculosis*'in amplifikasyonu bu hastalığın Yeni Dünya'da Avrupalı koloniler tarafından yayılmadığını kanıtladı. Ayrıca 1400 yıllık bir **Byzantine fragmentinde** (kireçlenme olan akciğer dokusundan) teşhis edilmiş olup Avrupalıların Yeni Dünya ile ilişkilerinden önce Eski Dünya'da da bu hastalığın varlığı doğrulanmış oldu.

1918 yılında dünyada 20 milyon insanın ölmesine yol açan **influenza** salgını sırasında pek çok patoloji örneği toplandı. Virüs RNA'sı ekstrakte edildi ve RT PCR kullanılarak (reverse transkriptaz; RNA→DNA) amplifiye edildi, sonuç olarak influenza genine ait 9 fragmentin sekansı yapıldı. Sekansı yapılan genler bilinen domuz nezlesi hastalığındakilere en yakın olanlardı.





Kara ölüm adı da verilen **veba** hastalığı 1590 ve 1722 yıllarında Avrupa'da salgın oldu ve vebadan ölen insanların diş örneklerinden ***Yersinia pestis***'e ait DNA bulundu.(Drancourt and Raoult,2002)

İnsan dışı primatlar

Nesli tükenen Malagazi lemurlarının filogenetik akrabalık ilişkilerini çalışmak üzere yine aDNA teknikleri kullanılmıştır. Madagaskar bölgesindeki lemurların 500 yıl öncesine kadar var oldukları bilinmektedir. Fakat morfolojik karakterlerindeki yüksek seviyedeki homoplaziye bağlı olarak filogenetik akrabalıkları tam olarak açıklanamamıştır.



Aynı zamanda, aDNA analizlerinde kullanılan teknikler yaşayan primatlara da uygulanabilir.

aDNA ve zarar verici analizler

Minimum hasarla uzun kemiklerden DNA ekstrakte etmek ve dişin dentin tabakasından DNA'yı ekstrakte ettikten sonra dişleri yeniden yapıştırmak (yerine koymak) mümkün olmasına rağmen, genelde, aDNA metodları eldeki materyale zarar verir. Bunlar yeri değiştirilemez kaynaklardır ve analizler ancak ya önemli bir soruşturma için ya da ilginç bir hipotezi test etmek için bilgi gerektiğinde ve başka araştırmaları tehlikeye atmayacak şekilde mümkün olabilir.

Diğer bir önemli kaygı da sorulara cevap olabilecek örneklerde DNA'nın iyi bir şekilde korunuyor, saklanıyor olmasıdır. Sonuç alınamayacak olursa sarfedilen örneğin yeri hiçbir şekilde doldurulamaz.

Ayrıca bazı örnekler gelecekte yapılacak muhtemel araştırmalar için saklanmalıdır. Çünkü o an için teknik yeteri kadar gelişmemiş olabilir.

aDNA çalışmalarının etik yönü

İnsanlarla yapılan her türlü çalışmada, işin etik, sosyal ve yasal taraflarını göz önünde bulundurmak çok önemlidir.

- Araştırma sonuçlarından etkilenebilecek gruplara ve konunun merkezindeki insanlara danışmak
- mümkün olduğunca onları tehlikeden uzak tutmak
- çalışmanın federal ve kurumsal birtakım düzenlemelere uygun olması gerekir
- eğer insan ölmüşse
- ölmüş olsa da bazı hakları var

aDNA çalışmaları yaşayan ve ölü bireyler arasındaki biyolojik bağların kanıtlanmasını sağlar. Böyle kanıtlar mesela toprak üzerine hak iddia etmek için kullanılabilir.

Potansiyel kaynaklar:

- aDNA çeşitli organik kalıntılarda bulunabilir. Bunlar, daha çok, yumuşak dokular, dişler ve kemiktir. Bu kaynaklar çeşitli yerlerde bulunabilir ve bulundukları ortamın koşullarına göre kuru, nemli veya donmuş halde olabilirler.
- Bununla beraber ilgili organik materyaller müzelerde, medikal ve özel koleksiyonlar ile sanat müzelerinde de bulunabilir.
- Bir hayvan ya da bitkiden örnekleme yapmak daha kolaydır ama yine de bu, kaynağın genetik özelliklerine bağlıdır. (modern insan DNA'sı tarafından çok fazla miktarda kontamine olmuş olabilir veya PCR için inhibe edici özellikte olabilir)
- Bakteriler ve virüsler

Çalışacak mı?

- aDNA'nın ekstraksiyonu işleminin başarılı olması örneğin yaşına ve daha da önemlisi ölümünden itibaren maruz kaldığı çevreye bağlıdır.
- **Depürinasyon**, aDNA yapısının bozulmasına yola açan en önemli faktördür; yapıda kırılmalar ve riboz halkasının zarar görmesi söz konusudur.
- **DNA** degradasyonunun oranı:
 - Ortamın sıcaklığına
 - Nisbi neme
 - Ve eğer örnek gömülü ise toprağın pH'ına bağlıdır.
- DNA ekstraksiyon işlemi, DNA ile birlikte, PCR reaksiyonunu inhibe edecek bazı kimyasalları da ekstrakte eder. Tüm bu faktörlerin birleşimi kalıntıların kaba morfolojileri üzerine etkilidir.
- Eğer iskelet ve diş kalıntıları hafif basınç altında parçalanıyorsa, bu kaynaklardan amplifiye edilebilir yani intakt haldeki DNA'yı elde etmek zor veya olanaksızdır. Örnek (diş, kemik gibi), mineralize olması dışındaki durumlarda, ne kadar sertse analizler için intakt haldeki DNA'nın bulunma ve elde edilme olasılığı o kadar yüksektir.

- Aminoasitlerin sağ el konformasyonu/sol el konformasyonu, örnek içinde DNA'nın olma olasılığını gösterir. Şöyle ki;
 - Bu oran yüksek ise intakt haldeki DNA miktarı az demektir.
 - Oran nispeten düşük ise intakt haldeki DNA'nın bulunma olasılığı kesin olamamakla birlikte önceki duruma göre daha yüksektir.
- Kemiğin kollojen içeriği de örneğin ne durumda olduğunu anlamamız için bir işarettir.
- Bir bölgede bulunan insan kalıntılarına ait DNA için başka bir test yöntemi de aynı bölgedeki hayvan kalıntıları üzerinde çalışmaktır. Bu, o bölge koşulları altında aDNA'nın ne kadar korunduğuna dair hedef DNA'ya zarar vermeden fikir sahibi olmamızı sağlar.

Örneğe yapılan ön muameleler:

Kontaminasyon:

- Plastik malzemeler ve DNA'nın ekstraksiyonu işleminde kullanılan çözeltilerden,
- İskelet kalıntıları ile çalışılırken kullanılan bazı standart işlemlerden (jelatin içeren tutkalla stabilize işlemi gibi)
- Modern insan DNA'sından
- Başka organizmalara ait DNA'lardan kaynaklanabilir.

Kontaminasyona karşı;

- Örnek yüzeyinin zımpara ile uzaklaştırılması
- Kısa dalga boylu UV ışığı (254 nm)
- Çamaşır suyu
- Asit ile muamele etmek
- aDNA analizlerinin yapıldığı laboratuvarlar moleküler analizlerinin yürütüldüğü diğer laboratuvarlardan ayrı tutulmalı
- Korumalı giysiler (özel başlıklar, galoşlar, eldivenler ve yüz maskeleri gibi) kullanılmalı
- Laboratuvar yüzeyleri sterilize edilmelidir.

DNA Ekstraksiyonu:

Bu işlemle DNA, hücrelerden veya hücre kalıntılarından çözelti içine alınır.

Tipik bir ekstraksiyon tamponu:

- TrisHCl
- EDTA : Kalsiyum iyonlarını bağlayarak hücre duvarını yıkar.
- Bir sodyum ya da potasyum tuzu: Serbest nükleik asitlerin kararlılığı için izotonik bir ortam oluşturur.
- Proteinaz K : Proteinleri parçalar
- İyonik olmayan bir deterjan : Tamponun ve DNA'nin kararlılığı için.

DNA İzolasyonu:

Hücre yığınınından DNA izole edebilmek için, genellikle fenol-kloroform ekstraksiyonu kullanılır. Şu noktalara çok dikkat edilmelidir;

- Fenolün çok az miktarları bile Taq polimeraz'ın tümünü inhibe edebilir.
- Organik fazdan, sıvı (akışkan) fazı ayırırken geride az miktarda sıvı faz bırakmak tavsiye edilir.

DNA Konsantrasyonu:

DNA'nın konsantre edilmesi ve saflaştırılması etanol çöktürmesi veya etanol ile yıkama ile yapılır.

- $2/3$ = Etanol/ DNA solüsyonu oranı çöktürme için uygundur ve iyi sonuç verir.
- Sıvı faz içinde DNA'yı santrifüj kullanarak mekanik olarak çöktürmek

İlave Saflaştırma İşlemleri:

- **Silika-guanidinum thiocyanate:** DNA'nın, GuSCN baskısı altında matrikse (silika jel) seçici olarak bağlanması ile gerçekleşir.
- **Elektroforez:** DNA ile birlikte izole edilmiş bileşiklerden DNA'nın ayrımı sağlanabilir. Tuzlar ve topraktan kaynaklanan maddeler veya başka asit içeren kaynaklar agaroz jelde etidyum-bromür varlığında yeşil-mavi floresans verir. DNA ise portakal rengi floresans verir ve kolaylıkla ayırt edilir. Bu bölge (portakal renkli bölge) kesilir, eritilir ve yeniden ekstrakte edilir.

PCR İnhibisyonu:

- Fenol-kloroform yerine **silika-GuSCN**'ın kullanılması
- İnhibitörlerin bağlandığı **BSA**'nın (Bovine Serum Albümin) ilave edilmesi
- Örnekleri **proteinaz K** veya **kollojenaz** ile muamele etmek veya **NaOH** ilavesi bu problemi ortadan kaldırır veya minimize eder.

Önemli Markerlar:

- hem Y ve hem de X kromozomunda bulunan fakat çok farklı sekanslar içeren **Amelogenin** geni
 1. fragment boyutuna
 2. sekans farklılıkları
- **mikrosatellitler**, sadece X'te veya sadece Y'de bulunan bölgelerdir.
- mtDNA üzerindeki **cyt b** geni tür tayini için kullanılabilir.

Kadınlar erkeklerden bir adım önde!

- Günümüzde yaşayan kadınlarla aynı temel genetik özelliklere sahip olan maternal atalarımızın evrim sürecinde karşı karşıya geldikleri erkekler ilkel bir Y kromozomuna sahipti.
- En yakın paternal atalarımızın günümüzden 59.000 yıl önce, fakat maternal atalarımızdan 84.000 bin yıl sonra görüldükleri bulundu.



Neandertaller ve modern insanlar

Yeni deliller Neandertaller ile modern insanların,önceden düşünüldüğü gibi farklı türler olmadığını, birlikte evrimleştiklerini ve hatta üreyebildiklerini göstermektedir. Dr. Andrew Kramer, bu iki grubun bireylerine ait kafatasları üzerinde ölçümler ve analizler yaptı.

Sonuçlar, bu iki popülasyonun Akdeniz'in doğusunda birbirleriyle karıştıklarını ve aslında tek bir türün bireyleri olduklarını gösterdi.



Yakın bir zamanda modern insan ve Neandertal özelliklerine sahip olan genç bir erkeğin iskeleti bulundu. İskelet yaklaşık olarak 25.000 yıllıktı. Yüz özellikleri *Homo sapiens* 'te olduğu gibiydi fakat güçlü kol ve bacaklara ve neandertal gövdesine sahipti.

Bu aynı zamanda modern insanların ve neandertallerin üreyebildiklerini de gösteriyordu.



Bulunabilmiř En Eski DNA

Bu konuda rekor kıran örnekler 400.000 yıl önce Sibirya'da var olan bitkilerden elde edildi.

Analizler sonucu, en az 19 bitki familyasına ve tabii ki mamut, bizon ve at gibi herbivor hayvanlara ait DNA sekansı yapıldı.



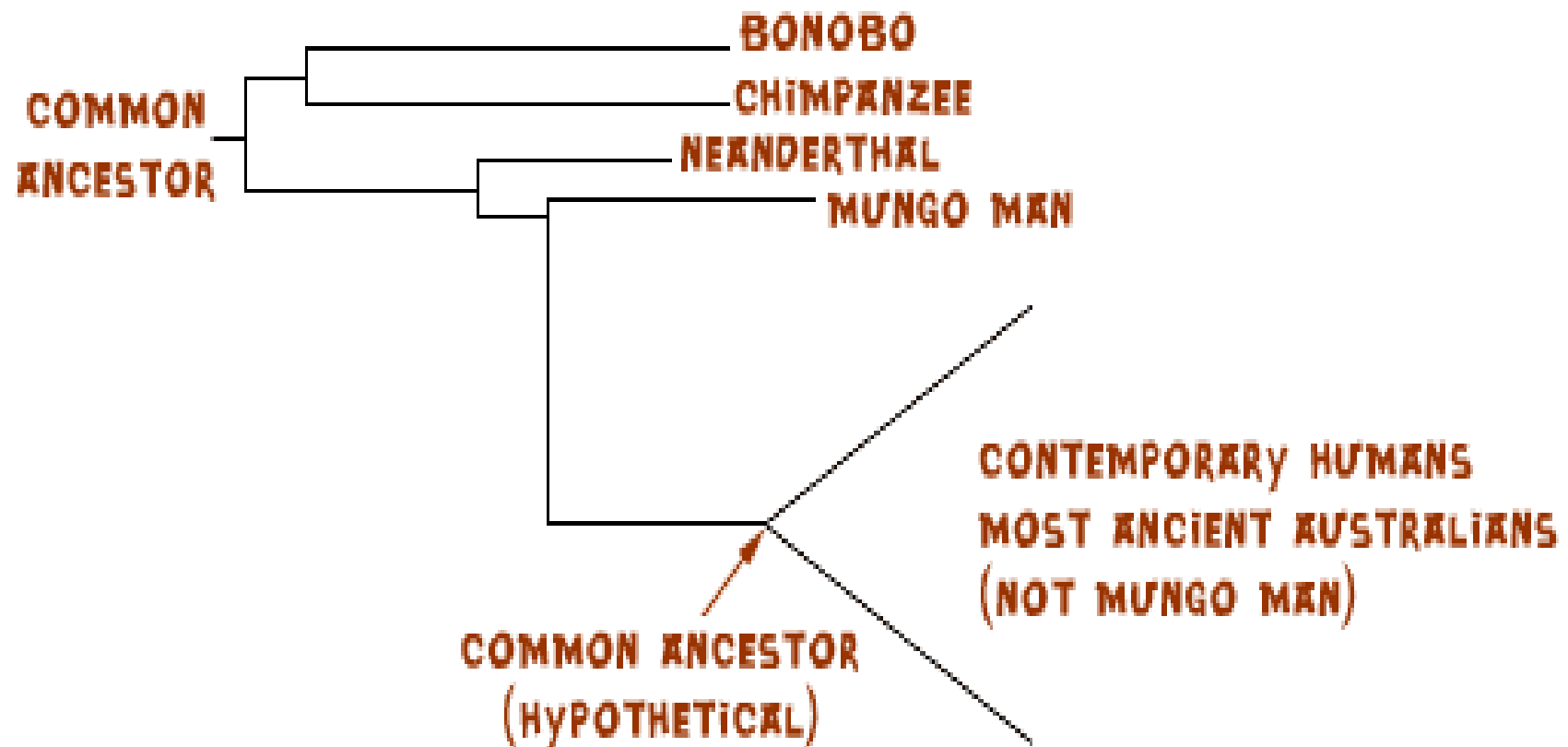
MUNGO MAN

60 bin yıl önce öldüğü tahmin edilen, modern anatomik özelliklere sahip ve şu anda olmayan bir genetik soydan gelen Mungo Man Avustralya'da, şu anda kuru olan, Mungo gölü civarında bulundu.

ANU'dan evrimsel genetikçi Simon Eastial Mungo Man'ın DNA'sını 45 yaşayan aborjin, dünyanın birçok yerinden 3453 insan, 2 Avrupalı Neandertal, şempanzeler, bonobolar ve cüce şempanzelerin DNA'sıyla karşılaştırdı.



"EVOLUTIONARY TREE" OF MITOCHONDRIAL DNA GENE



Croatia'da bulunan ve
bir zamanlar
Neandertallerin
yaşadığı bir
mağaradan elde edilen
bu ayı kafatasından
nukleer DNA elde
edilmiş ve sekansı
yapılmıştır. Neandertal
DNA'sına ait sekanların
da yapılması umut
edilmektedir.



Almanya'nın ünlü
Feldhofer
Neandertaline ait
bacak kemiđi ile
yapılan çalışmalar
sonucu mtDNA
sekanslarının
modern
insaninkinden çok
farklı olduğu
bulundu.





1991 yılının Eylül ayında, Alp'lerin Oetzel bölgesinde, eriyen buz içinde, donmuş bir beden bulundu. Yapılan radyokarbon analizleri sonucu bu kişinin ölümünün üzerinden 5300 yıl geçtiği açığa çıktı.