

تعیین توالی DNA میتوکندری (mtDNA) بقایای اسکلتی دوره‌ی ایلام میانی محوطه‌ی باستانی هفت تپه^۱

مریم رمضانی*

دانشجوی دکتری باستان‌شناسی دانشگاه تهران، تهران، ایران

محمدتقی اکبری

دانشیار گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران

مصطفی منتظر ظهوری

استادیار گروه ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان

شهره زارع

استادیار گروه زیست‌شناسی - ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین پیشوا

مهدی نیکنامی

استادیار گروه رادیولوژی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

نغمه لسانی

دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی - ژنتیک دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد، واحد علوم تحقیقات، تهران

(از ص ۷۳ تا ۸۶)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۰۶/۲۶؛ تاریخ پذیرش قطعی: ۹۶/۰۸/۱۰

چکیده

علم نوپای ژنتیک باستان‌شناسی (Archaeogenetics) که بر پایه‌ی آمیزه‌ی علوم ژنتیک و باستان‌شناسی است، پتانسیل بسیار بالایی در کشف حقایق و ناگفته‌های فرهنگی و معیشتی دوران باستان از قبیل منشأ انسان مدرن و سیر تکاملی آن، چگونگی مهاجرت و توزیع جغرافیایی آن در پنج قاره جهان و همچنین بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های DNA باستانی در نقاط مختلف جهان و مقایسه‌ی تحلیلی آن با جمعیت انسان امروزی دارد. مناطق بسیار پلی‌مورفیک DNA هسته‌ای مانند مارکرهای STR کروموزوم Y و مناطق بسیار متغیر DNA میتوکندریایی (mtDNA) برای بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های باستانی استفاده می‌شود. در پژوهش حاضر DNA باستانی از تعدادی از نمونه‌های استخوانی و دندان انسانی استخراج شد. نمونه‌ها از حفاری منطقه هفت تپه متعلق به دوره‌ی ایلام میانی به‌دست آمد. سپس مناطق HVI و HVII مولکول mtDNA، با استفاده از روش PCR تکثیر و در ادامه تعیین توالی شد. توالی‌ها با توالی مرجع مقایسه و هاپلوگروپ این اقوام R2 و R5 تعیین شد. با ردیابی این هاپلوگروپ‌ها از مناطق آریانشین مشخص شد که منشأ هاپلوگروپ R2 جنوب غربی ایلام و تمدن ایلام است.

واژه‌های کلیدی: ژنتیک باستان‌شناسی، تمدن ایلام، تعیین توالی، فوق متغیر ۱ و ۲، mtDNA

*رایانامه‌ی نویسنده‌ی مسئول: maryamrameza@ut.ac.ir

۱. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دکتری مریم رمضانی با عنوان: «هاپلوگروپ‌های ژنوم میتوکندری در یک جمعیت از قوم کرد ایرانی: ابزاری در تشخیص افراد مجهول‌الهویه» است که به راهنمایی دکتر کمال‌الدین نیکنامی در سال ۱۳۹۳ در دانشگاه تهران به انجام رسیده است.

۱. مقدمه

ژنتیک باستان‌شناسی به معنای مطالعه‌ی پیشینیان با استفاده از تکنیک‌های ژنتیکی مولکولی است. در ژنتیک باستانی، اطلاعات DNA گروه‌های نژادی مختلف از سراسر جهان به منظور تجزیه و تحلیل وقایع پیش از تاریخ و اثبات گزارش‌ها و منابع تاریخی به کار می‌رود. داده‌های DNA برای در معرض نمایش قرار دادن گذشته با نتایج باستان‌شناسان، زبان‌شناسان و دیرین‌انسان‌شناسان تطبیق می‌یابد.

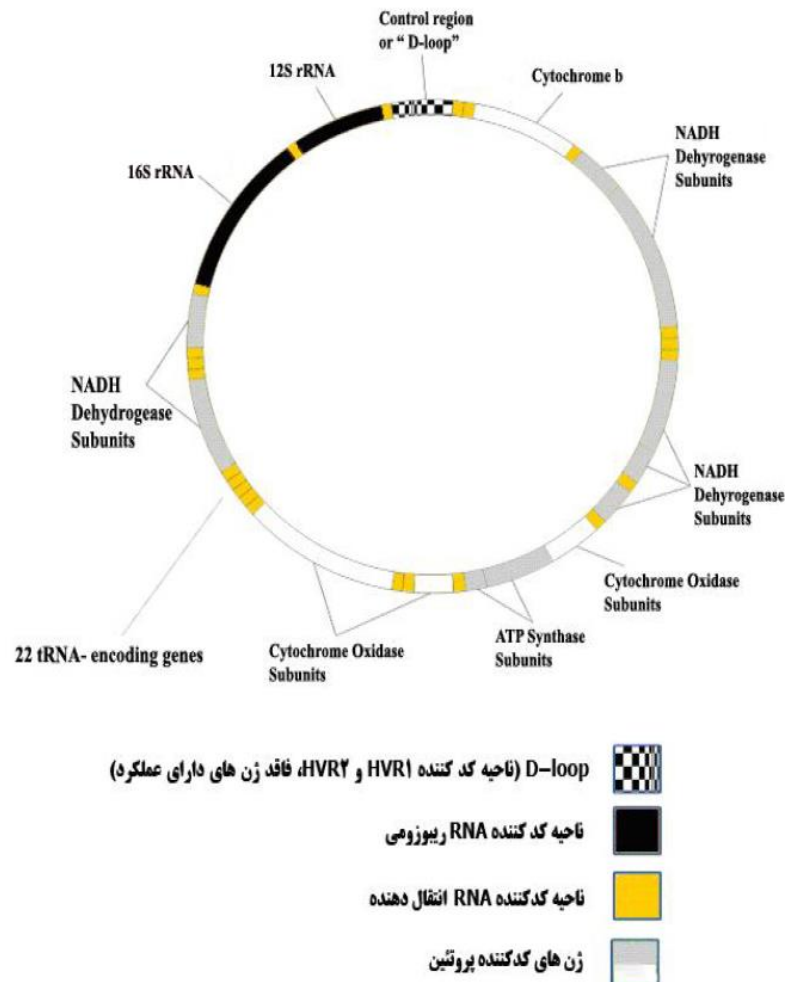
DNA شامل اطلاعات موروثی ژنتیکی است که ساختمان، تکامل و متابولیسم بدن را کنترل می‌کند. این مولکول در تمام سلول‌ها، مانند سلول‌های استخوانی (استئوسیت‌ها)، سلول‌های سازنده استخوان (استئوبلاست‌ها) و سلول‌های خورنده‌ی استخوان (استئوکلاست‌ها) وجود دارد. اطلاعات ژنتیکی موجود در DNA استخوان‌های باستانی، می‌تواند در مطالعه‌ی ارتباطات اقوام و در ابعاد کوچک‌تر، گروه‌ها و افراد مدفون در یک گورستان، سودمند باشد؛ نیز، می‌تواند در تعیین جنسیت اسکلت‌ها مفید باشد. حتی در برخی از مطالعات پالئوپاتولوژیک روی این نمونه‌ها، می‌توان به آن دسته از بیماری‌های ارثی و عفونی پی برد که سبب آلودگی DNA موجود در استخوان‌ها شده‌اند، هرچند برخی از دانشمندان آن را به کلی رد کرده‌اند. برخی از مواد قابل مطالعه‌ی ژنتیک باستان‌شناسی عبارت‌اند از: بقایای جانوری مومیایی شده‌ی طبیعی یا مصنوعی، استخوان، دندان، مدفوع انسان‌های باستانی، نمونه‌های نگه‌داری شده در الکل، بقایای حشرات باقی‌مانده در کهربا، بقایای گیاهی خشک و اخیراً بقایای گیاهی و جانوری از نمونه‌های خاکی است. البته بهترین مورد، استخراج DNA از استخوان و دندان است. DNA نیز از این قاعده مستثنی نیست. در بسیاری از نمونه‌های باستانی، هیچ DNA قابل شناسایی‌ای وجود ندارد؛ اما در مواردی، مقداری DNA یافت شده که تا حدی تخریب شده‌اند و تنها کمی بیش از یکصد نوکلئوتید سالم در آن‌ها باقی‌مانده است. در موارد مشابه که DNA در استخوان‌های باستانی یافت شده، معمولاً تعداد آن بسیار کم و حتی کمتر از ۲٪ از مقداری است که در نمونه‌های متأخر استخوانی پیدا می‌شوند (Richards, et al. 1995, Higuchi, et al. 1984). آلودگی، از دیگر مشکلات بزرگ تکنیکی به‌هنگام مطالعه و استخراج DNA باستانی است. آلودگی با DNA انسانی مدرن، ممکن است در حین حفاری، در مراحل پس از کاوش یا در آزمایشگاه ایجاد شود. DNA های مدرن، برخلاف DNA باستانی، نسبتاً سالم هستند و به مقادیر بسیار بیشتری وجود خواهند داشت و به این معنی است که آلودگی با DNA مدرن، سبب نادیده‌گرفتن DNA باستانی خواهد شد. در نتیجه باعث خواهد شد PCR به جای DNA باستانی، عموماً DNA مدرن را شناسایی کند؛ این مسئله، بزرگ‌ترین شاخص آلودگی DNA باستانی است. سلول‌های پوستی انسان، تعرق و بزاق، عوامل مهمی در آلوده کردن DNA باستانی هستند. البته با انجام یک‌سری اقدامات می‌توان تا حدودی از آلودگی DNA باستانی جلوگیری کرد.

بیشتر ماده ژنتیکی بدن انسان در هسته سلول‌ها قرار دارد. علاوه بر DNA هسته‌ای، یکی از اندامک‌های سلول که نقش تأمین‌کننده‌ی انرژی را برای سلول دارد، دارای DNA مستقل حلقوی است. که به‌عنوان DNA میتوکندریایی شناخته می‌شود. ویژگی‌های DNA میتوکندری باعث شد تا به‌عنوان یک نشانگر مولکولی مطلوب در تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی شناخته شود. این مشخصات عبارت‌اند از: به ازای هر سلول، تقریباً ۱۰۰۰ نسخه و بیشتر موجود است که باعث بهبود شرایط آزمایشی و بررسی علمی آن می‌شود (Renfrew, 2000)، به همین دلیل می‌توان از آن‌ها، به‌خصوص زمانی که نمونه‌ها کم باشد (به‌ویژه در نمونه‌های باستانی)

استفاده کرد. ساختار ژنتیکی آن بسیار ساده است و با توجه به دقت روزافزون وسایل آزمایشگاهی، راندمان تشخیص DNA بالا می‌رود (Aris-Brosou and Excoffier 1996). نکته‌ی مهم در بررسی DNA این است که عامل وراثت mtDNA از طریق مادر انتقال می‌یابد. به عبارت دیگر، توارث آن به فرزندان (اعم از پسر و دختر) تنها از طریق مادر امکان‌پذیر است. خصوصیت دیگر mtDNA، وجود نواحی حفاظت‌شده و حفاظت‌نشده (مانند D-loop) است (Kim, et al. 2002 Parsons, et al. 1997) این مجموعه خصوصیات که دورنمایی در خصوص علت‌یابی و جانمایی مجموعه ژن انسانی به دست می‌دهد؛ نشانگر بسیار مطلوبی نیز برای تشخیص بیناگونه‌ای در گروه‌هایی است که به مدت صد تا ده‌هزار سال جدا از هم می‌زیسته‌اند (Stringer and Andrews 1988, Vigilant, et al. 1991a, Sykes, et al. 1995, Matthee and Davis 2001). به عنوان مثال، در بررسی mtDNA بقایای استخوانی غار دنیسوا در جنوب روسیه مشخص شد که در حدود شصت هزار سال پیش، انسان هوموساپینس، بعد از مهاجرت مجدد به آفریقا با گونه‌های نئاندرتال آمیزش داشته است. نتایج مثبت آزمایش‌ها در بررسی بیناگونه‌ای از یک‌سو، و سرعت بالای تکامل DNA میتوکندری در مقایسه با DNA هسته‌ای از سویی دیگر، باعث شد mtDNA در مطالعات تکاملی نظیر شناخت اعقاب انسانی و انشعاب آن‌ها از شامپانزه (نزدیک‌ترین گونه به انسان) (Adachi and Hasegawa 1995) و نیز بررسی منشأ ژنتیکی انسان مدرن، به عنوان مهم‌ترین ابزار مطالعاتی محسوب شود (King and Wilson 1975, Cann, et al. 1984, Cann et al. 1987, Wilson et al. 1991, Koji Lum and Cann 2000). در پدیده‌هایی نظیر مهاجرت (مانند نخستین مهاجرت از آمریکا و اسکان مردمان در کشور ایسلند) (Avise, Arnold et al. 1987, Hagelberg, et al. 1989, Hagelberg, et al. 1999, Helgason, et al. 2000, Vigilant, et al. 1991b) و نیز مواردی مانند پزشکی قانونی و موارد مربوط به آن، آنالیز mtDNA پاسخ‌های حیرت‌انگیزی پیش‌روی متخصصان نهاده است (لسانی، سادات 2013). (et al. 2013).

بعضی از مناطق در ژنوم میتوکندری، ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از همین مناطق در ژنوم دچار تغییر می‌شوند. این مناطق در پزشکی قانونی به کار می‌روند. ژنوم میتوکندری حاوی دو ناحیه‌ی کدکننده‌ی پروتئین و ناحیه‌ی وسیع غیرکدکننده‌ای است که تقریباً در موقعیت نوکلئوتیدی ۱۶۰۲۴ تا ۵۷۶ قرار دارد و با عنوان ناحیه کنترل (CR/D-loop) شناسایی می‌شود (Anderson, et al. 1981). بیشترین تنوع در بین افراد، در منطقه D-loop و در دو ناحیه HV1 (Hypervariable1) و ناحیه HV2 (Hypervariable 2) اتفاق می‌افتد.^۱ هرکدام از این دو ناحیه در حدود ۲۵۰ تا ۳۵۰ باز را به خود اختصاص داده‌اند (Lutz, Weisser et al. 2000). (Lutz, et al. 2000) (Budowle, et al. 1999). همان‌طور که در تصویر ۱ می‌بینید، معمولاً ناحیه HV1 از باز ۱۶۰۲۴ تا ۱۶۳۶۵ و ناحیه HV2 از باز ۷۳ تا ۳۴۰ را در اختیار دارند (Malyarchuk and Derenko 2001). (Budowle, Allard et al. 2002) (Stoneking, et al. 1991) (Salas, et al. 2000) (Meyer, et al. 1999). اگرچه HVI و HVII برای تحلیل و تعیین وراثت سودمند هستند، باید توجه داشت بخش HVII اطلاعات فیلوژنتیکی اندکی را نشان می‌دهد. باین وجود، بعضی از نوکلئوتیدها در تعیین هاپلوگروپ‌های ژنوم میتوکندری نقش به‌سزایی ایفا می‌کنند؛ مانند باز ۷۳ از ناحیه HVII که به حل معمای تبارزایی اروپایی‌ها کمک کرد (Wilkinson-Herbots, et al. 1996) با این تفاسیر، مطالعات بسیاری از مردم‌شناسان (Lutz, Weisser et al. 1996) بر بخش HVI متمرکز شده است (Röhl, et al. 2001) (Handt, et al. 1998). با

تعیین توالی این ناحیه (HVI) می‌توان تغییرات نوکلئوتیدی (پلی مورفیسم) را مشخص کرده و با توجه به جداول و درخت‌های فیلوژنی، هاپلوگروپ‌ها را تعیین کرد.



تصویر ۱: تصویر شماتیک ساختار حلقوی DNA میتوکندری که حاوی ۲۲ ناحیه‌ی ژنی کد کننده tRNA و ۱۳ ناحیه‌ی کد کننده پروتئین است (Kim, Lee et al. 2002)

توالی‌یابی میتوکندری با مقایسه نوکلئوتیدها و تشخیص اختلاف بین توالی‌های مختلف، تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی تعیین می‌شود. به گروهی از ژن‌ها که در یک جاندار با همدیگر از یک والد به ارث می‌رسند، هاپلوتیپ می‌گویند. از تجمع هاپلوتیپ‌ها بر درخت فیلوژنتیک، خوشه‌هایی به صورت هاپلوگروپ شکل می‌گیرد (لسانی، سادات ۲۰۱۳). درخت فیلوژنتیک DNA میتوکندری به بزرگ‌هاپلوگروپ‌های R, M, N, L (طبقه‌بندی می‌شود. هر یک از بزرگ‌هاپلوگروپ‌ها به یک منطقه‌ی جغرافیایی خاص از کره زمین تعلق دارد. هاپلوگروپ‌های L به قاره آفریقا، هاپلوگروپ‌های C, D, G, Z (که متعلق به ماکروهاپلوگروپ M هستند) به اوراسیای شرقی و هاپلوگروپ‌های H, V, U, T, J, HV (که متعلق به بزرگ‌هاپلوگروپ R هستند) بیشتر به اوراسیای غربی تعلق دارند (همان).

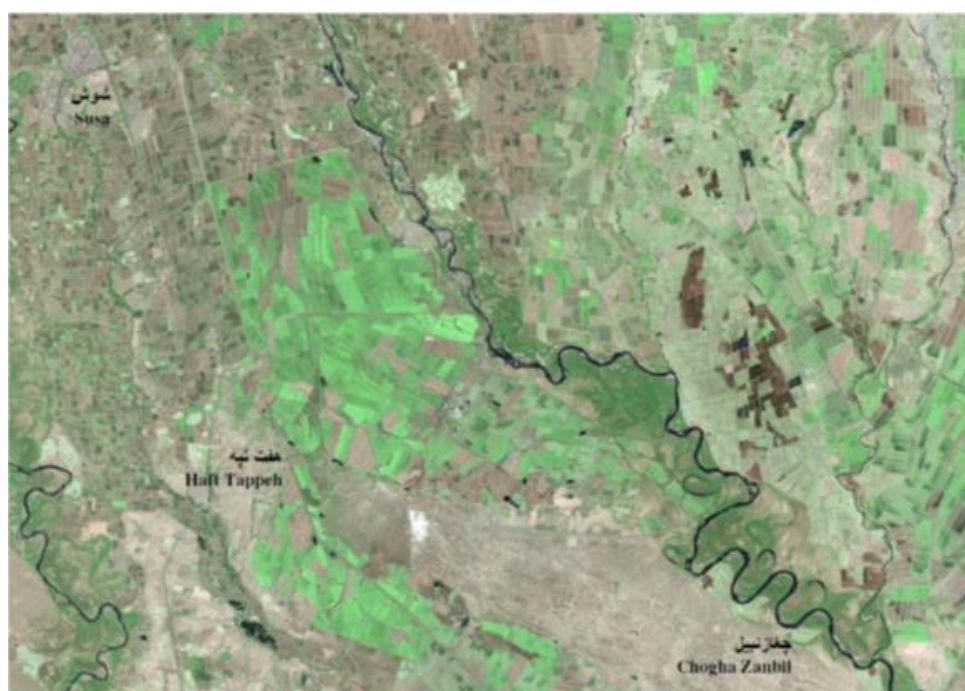
تاکنون هیچ‌گونه تحقیقی در رابطه با DNA باستانی استخوان‌های انسان در ایران صورت نگرفته است، بنابر موقعیت جغرافیایی ایران و اهمیت آن در دنیای باستان از لحاظ مهاجرت و علیرغم این حقیقت که

گذرگاه ایرانیان هم‌اکنون پذیرای جمعیت‌هایی با پیش‌زمینه‌های متمایز بر اساس منشأ، زبان، مذهب و مدل‌های معیشتی بوده و توسط آن‌ها اشغال شده‌اند و بومی بودن بقایای اسکلتی هفت‌تپه، به تعیین هاپلوگروپ mtDNA بقایای اسکلتی فوق با قدمت دوره‌ی ایلام میانی اقدام کردیم تا در نهایت بتوانیم تصویر واضحی از پیشینه‌ی ژنتیک ایرانیان ارائه دهیم.

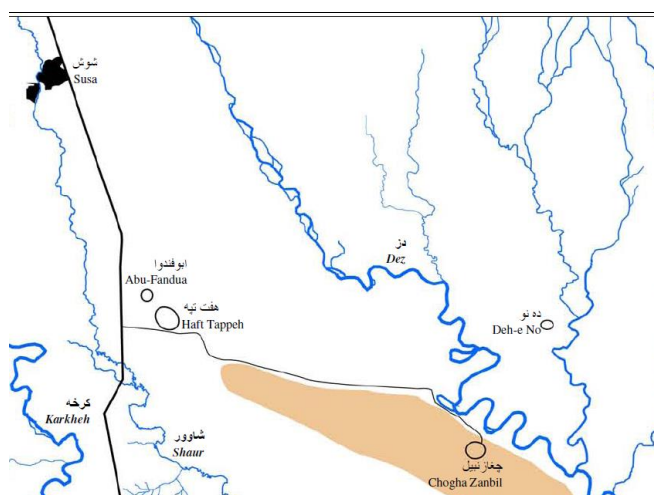
۲. مواد و روش‌ها

استان خوزستان با مساحتی در حدود شصت و چهار هزار و دویست و سی و شش کیلومتر مربع، در جنوب غربی ایران واقع شده است. این استان از شمال غربی با استان ایلام، از شمال با استان لرستان، از شمال شرقی و شرق با استان‌های چهارمحال و بختیاری و کهگیلویه و بویراحمد؛ از جنوب با خلیج فارس و از غرب با کشور عراق هم‌مرز است. استان خوزستان را از نظر پستی و بلندی می‌توان به دو منطقه کوهستانی و جلگه‌ای تقسیم کرد؛ منطقه کوهستانی به‌طور عمده در شمال و شرق استان قرار گرفته و در حدود دو پنجم مساحت کل استان را شامل می‌شود. خوزستان جز در برخی از مناطق کوهستانی شمالی و شرقی دارای اقلیم خشک و نیمه‌خشک است.

منطقه هفت‌تپه، در جنوب غربی دشت خوزستان قرار دارد (تصویر ۱) در هفت‌تپه خوزستان، قدیمی‌ترین بقایای فرهنگی متعلق به دوره سوکل مخ (نیمه‌ی اول از هزاره دوم پیش از میلاد) و ایلام میانی شناسایی شده است (نصرآبادی، بهزاد ۲۰۱۵). این محوطه دارای مساحت ۸۰۰×۱۵۰۰ متر است.

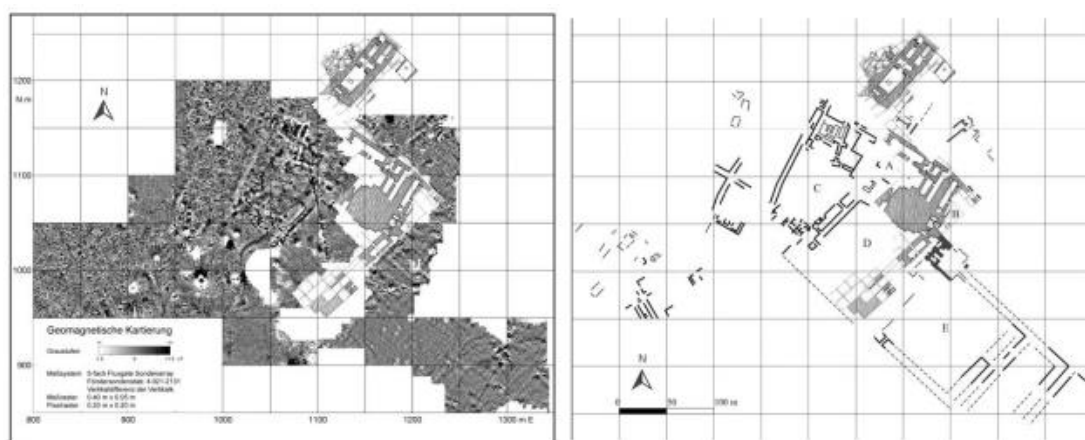


تصویر ۲: عکس هوایی از محوطه خوزستان و موقعیت هفت تپه (همان)



تصویر ۳: موقعیت بخش شمالی خوزستان (همان)

نخستین عملیات حفاری به سرپرستی عزت‌الله نگهبان در ۱۳۴۴ در این محل آغاز شده و به‌صورت منقطع تا ۲۰۱۲ ادامه داشته است. در نقشه‌ی ژئوفیزیک، حداقل پنج مجموعه دیده می‌شود که به‌ترتیب با حروف لاتینی A تا E نامگذاری شده است (تصویر ۴). داده‌های مربوط به این پروژه مربوط به کاوش ۲۰۱۲ از مجموعه C است. در این سال یکی از نگارندگان (مریم رضانی) به‌منظور نمونه‌برداری از بقایای اسکلتی هفت تپه به‌منظور استخراج aDNA در این پروژه شرکت کردند. حفاری در بخشی در شمال مجموعه C برای شناخت لایه‌های ساختاری در ترانشه‌های ۲۹۸ و ۲۹۴ که هر کدام به ابعاد ۱۰×۱۰ متر بودند، انجام شد.



تصویر ۴: مجموعه‌های شناسایی شده در هفت تپه (راست) سمت چپ بر مبنای اندازه‌گیری‌های ژئومغناطیسی (همان)

در ۲۰۱۲، در ترانشه ۲۹۸ تعداد زیادی اسکلت متعلق به دوره ایلام میانی یافت شد که ویژگی‌های تدفین را نداشتند، بلکه به‌صورت نامنظم قرار داشتند و متعلق به اشخاصی بودند که کشته شده و در محل رها شده بودند. به همین دلیل تخمین زده شد که شهر پس از دوره‌ی سوم ساختاری یا پس از چهارمین دوره‌ی ساختاری، بر اثر جنگ تخریب شده است. اسکلت‌ها به‌شکلی نامنظم روی هم قرار گرفته بودند، پس می‌توان به‌یقین تصور کرد اجساد بر روی هم نهاده شده‌اند. حتی در بعضی از قسمت‌ها، به‌نظر می‌آید چندین مجموعه جدا از پیکر، کنار هم افتاده‌اند. استخوان‌ها به‌شدت فرسایش یافته بودند و آزادسازی آن‌ها مستلزم صرف زمان

طولانی و کار دقیق بود. این کشتار باید هنگام تسخیر و تخریب شهر روی داده باشد. هنوز به‌درستی مشخص نیست که دشمنان این اجساد را بر روی هم ریخته‌اند یا اینکه دشمنان پس از غارت شهر، آن‌جا را ترک کرده و بازماندگانی که خود را در اطراف پنهان کرده بودند، اجساد را به‌صورت دسته‌جمعی گرد آورده‌اند و بر روی آن‌ها خاک ریخته‌اند؟ گاهی در میان اسکلت‌ها، قطعه‌های ظروف سفالی دیده می‌شد. همچنین یک حلقه کوچک برنزی به‌صورت شکسته یافت شد که احتمالاً گوشواره بوده است (همان). به دلیل فرسایش اسکلت‌ها و برای اجتناب از هرگونه اشتباه از ۱۰ نفر به‌صورت جداگانه استخوان فمور، استخوان تیپیا و دندان مولار برداشت شد.



تصویر ۵: مخزن نمونه (همان)

پس از برداشت نمونه از افراد متفاوت، آن‌ها را با مشخصات کامل، داخل فویل و سپس داخل یخچالی با درجه سرمایش معمولی قرار دادیم. پس از نمونه‌برداری، داده‌های استخوانی به آزمایشگاه ژنتیک تهران (دکتر اکبری) منتقل شد.

به‌منظور آلودگی‌زدایی از نمونه‌ها، ابتدا دو میلی‌متر از سطح استخوان به‌وسیله سنباده برداشته شد، تا آنجایی که سطح استخوان به رنگ سفید براق متمایل شود. سپس به‌مدت بیست دقیقه در محلول آب‌ژاول رقیق ۲۰ درصد گذاشته شد. سپس استخوان‌ها با آب دوبار تقطیر (که اشعه UV خورده است) شسته شد. پس از شستشو، به مدت ۲۰ دقیقه داخل انکوباتور (Ancubator) در دمای ۶۰ درجه قرار گرفت؛ این مرحله دوبار انجام شد. برای اطمینان بیشتر در انتهای کار از اتانول نیز استفاده شد. در مرحله‌ی بعد استخوان‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در معرض اشعه UV قرار گرفت و در قدم بعد استخوان‌ها در هاون پودر شدند. قابل ذکر است برای ارتقای نتیجه‌ی آزمایش‌ها، غیر از این نمونه‌های استخوانی از دندان مولار یک کودک که در قبر متعلق به یک ترانسه دیگر قرار داشت نیز استفاده شد. سپس DNA از پودر استخوان و دندان با استفاده از کیت Usa-mp-bio101-Geneclean kit for ancient DNA استخراج شد.

نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر یافت (جدول ۱). سپس با استفاده از BLAST در پایگاه بانک جهانی ژن، میزان هم‌پوشانی آن‌ها با توالی‌های موجود مقایسه شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای قطعات HVI و HVII

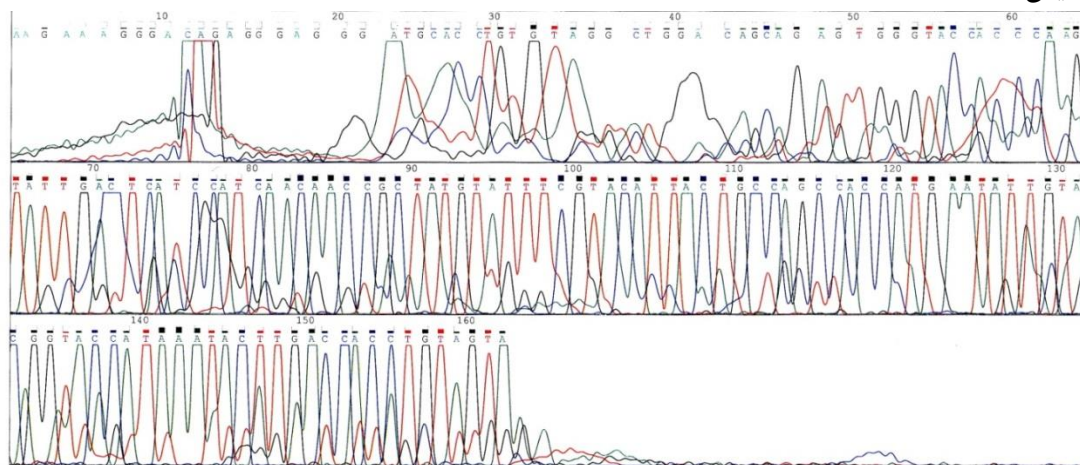
قطعه	توالی پرایمر
HV1-CF HV1-CR	5'-CCC CAT GCT TAC AAG CA-3' 5'-TGG CTT TAT GTA CTA TGT AC-3'
HV1-AR HV1-AF	5'-TAC TAC AGG TGG TCA AGT AT-3' 5'-CCC AAA GCT AAG ATT CTA AT-3'
HV1-BR HV1-BR	5'-CAC CAT GAA TAT TGT ACG GT-3' 5'-TGT GTG ATA GTT GAG GGT TG-3'
HV1-DF HV1-DR	5'-CAC TAG GAT ACC AAC AAA CC-3' 5'-GAG GAT GGT GGT CAA GGG AC-3'

واکنش PCR در حجم ۳۰ میکرولیتر با غلظت‌های زیر و شرایط دمایی و زمانی زیر صورت گرفت:

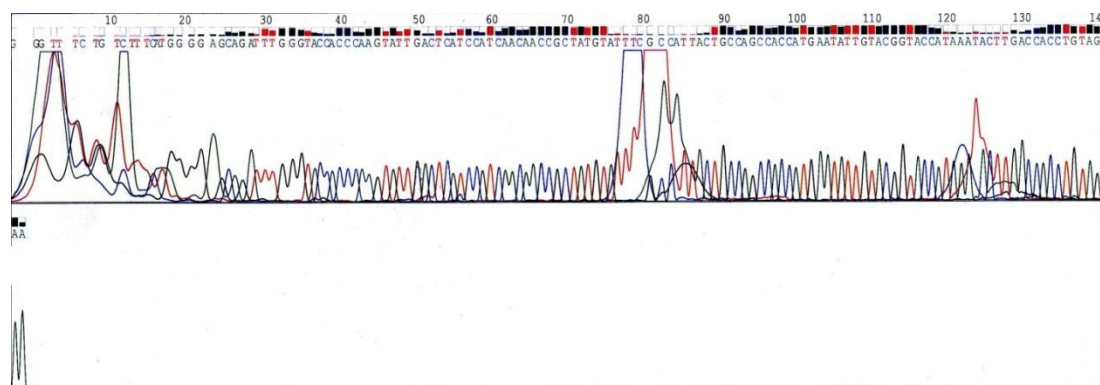
DNA (با غلظت ۱۰ ng/ml)، ۲، ۱X PCR Buffer ۲۵٪ میلی‌مولار از هر dNTP، ۲/۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ۱۰ پیکومول از مخلوط پرایمرها و ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase صورت گرفت. تکثیر در ۳۲ سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، در ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام شد. دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و طول‌سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. پس از تکثیر نواحی موردنظر، نمونه‌ها تعیین توالی شدند.

۳. یافته‌ها

در این مطالعه برای تعیین هاپلوگروپ‌های پنج استخوان انسانی مربوط به دوره‌ی ایلام میانی، DNA باستانی استخوان‌ها استخراج و تعیین توالی شد. در تصویر ۱، نمونه‌ای از گراف‌های تعیین توالی ارائه شده است. سپس توالی‌های حاصله با برنامه Clustal X مقایسه شده و هاپلوتیپ هر فرد مشخص گردید. توالی‌های به‌دست‌آمده با برنامه‌ی Clustal x با توالی مرجع کمبریج در سایت NCBI³ مقایسه شد و نوکلئوتیدهای جهش‌یافته و پلی‌مورفیسم‌ها در ژنوم میتوکندری هر فرد مشخص شد. به‌منظور بررسی دنباله‌ی اعقاب ایرانیان، سعی شد DNA میتوکندری داده‌های استخوانی ساکنان هفت‌تپه در دوره‌ی ایلام میانی تعیین توالی شود. به این منظور پس از تعیین توالی و تشخیص پلی‌مورفیسم‌ها، هاپلوگروپ این مردمان، R2 و R5 تشخیص داده شد.



تصویر ۲: الکتروگرام قسمتی از HV2



تصویر ۳: الکتروگرام قسمتی از HV1

۴. نتیجه

بنابر شناسه‌های سلول اعم از نوع، کاربری و حتی سن، میتوکندری موجود در آن دارای یک یا چند مولکول DNA حلقوی است که کاملاً مجزا از DNA هسته‌ای است. mtDNA حاوی ناحیه بسیار متغیری به نام D-loop است که پروتئینی کد نمی‌کند و با فرکانسی بالا، تمایل به جهش دارد. میزان بالای جهش و دامنه تغییر بالا در این ناحیه در افراد مختلف، سبب شد تا بررسی این ناحیه در تشخیص هویت افراد و همچنین ارتباط اقوام مختلف و مهاجرت‌ها سودمند باشد. از آنجایی که در گستره ژنتیک باستان‌شناسی، بسیار به استخوان‌هایی برمی‌خوریم که به علت قدمت زیاد، دفن نامناسب، اکوسیستم نامطلوب برای بقای DNA یا حتی آلودگی آن به واسطه هم‌زیستی با DNA باقی‌مانده از بقایای موجودات دیگر، داده‌های تخریب شده یا مشکوک دریافت می‌شود، به دلیل وجود نسخه‌های بسیار در ژنوم mtDNA موجود در یک سلول، احتمال استخراج DNA توسط DNA میتوکندری، نسبت به سایر شاخص‌های پلی‌مورفیک هسته‌ای (نظیر نشانگرهای STR) بیشتر است (Kim, et al. 2002). دیگر برتری mtDNA نسبت به DNA هسته‌ای این است که برخلاف کروموزوم Y که تنها از طریق پدر به پسر منتقل می‌شود، صفات مادری را می‌توان از طریق mtDNA ردیابی کرد. خصوصیت انتقال توارث مادری mtDNA در طول نسل‌های متمادی، کمابیش بکر به ارث می‌رسد و نوترکیبی ژنتیکی، تنوع جدیدی در آن ایجاد نمی‌کند. از تفاوت موجود در توالی نوکلئوتیدهای ژنوم میتوکندری، می‌توان برای ایجاد شبکه فیلوژنتیکی، به منظور نمایش رابطه این تغییرات با موقعیت جغرافیایی و تخمین زمان پیدایش هاپلوگروپ‌ها بهره گرفت (لسانی، سادات et al. 2013). در ابتدا تصور می‌شد حدود ۷۷٪ از ژنوم میتوکندری آسیایی‌ها متعلق به هاپلوگروپ M هستند و به دلیل وجود ایران در قاره آسیا، انتظار می‌رفت فراوانی بالایی از این هاپلوگروپ در ایران مشاهده شود. اما بررسی‌های مسعود هوشمند و همکاران ایشان، آمار بسیار پائینی از این هاپلوگروپ نشان داده است (همان). همچنین بررسی ژنوم میتوکندری توسط لسانی و همکارانش، جمعیت کُرد را خارج از هاپلوگروپ M نشان داد. برطبق آزمایش‌های صورت گرفته مشخص شده بود که نزدیک به ۹۹٪ از ژنوم میتوکندری اروپایی‌ها حداقل متعلق به یکی از ۹ هاپلوگروپ X, W, V, U, T, K, J, I, H است؛ ۶ هاپلوگروپ W, T, K, J, I, H تنها به جمعیت اروپایی تعلق دارد و برطبق بررسی‌های صورت گرفته، منشأ آن‌ها قفقاز تخمین زده شد که به‌طور ژنتیکی از آفریقایی‌ها و آسیایی‌ها جدا شده‌اند. از سویی دیگر، هاپلوگروپ U از دیگر هاپلوگروپ‌ها قدیمی‌تر است و بنا بر تقریب، زمان پیدایش آن

۵۱۰۰۰ تا ۶۷۰۰۰ سال پیش است. هاپلوگروپ J، چیزی در حدود ۳/۱۱٪ و هاپلوگروپ K نزدیک به ۱/۹٪ در ژنوم میتوکندری اروپایی‌ها دیده شده است. در نتایج پژوهش لسانی و دیگران در تعیین هاپلوگروپ اقوام کُرد و یزد، فراوانی هاپلوگروپ‌های J و H نزدیک به ۲۱٪، ۱۴٪ U، ۸٪ T، ۴٪ K و سایر هاپلوگروپ‌ها در حدود ۱۵٪ مشاهده شد. نتایج مذکور، تشابه بسیاری را با هاپلوگروپ‌های شناخته‌شده از جمعیت‌های اروپایی نشان می‌دهند. این مطالعه نشان می‌دهد هاپلوگروپ‌های ویژه‌ی اوراسیای غربی (J, T, U, HV) در اقوام کرد غالب است. در سال ۲۰۰۸، فخرز و همکارانش، مطالعاتی بر روی اقوام ایرانی انجام دادند. آن‌ها هاپلوتاایپ‌های ناحیه‌ی HV1 ژنوم میتوکندری ۳۵۷ نفر را از اقوام فارس، ترک آذری، گیلک، کرد، سیستانی، بلوچ، عرب و ترکمن بررسی کردند. نتایج مطالعه نشان داد که شاخه‌های مربوط به اوراسیای غربی (J, T, U, V, H) در فارس‌ها، آذری‌ها، گیلک‌ها، کردها و سیستانی‌ها غالب است و هاپلوگروپ‌های اوراسیای شرقی و اوراسیای غربی در عرب‌ها و بلوچ‌ها، با فراوانی تقریباً یکسانی وجود دارد. در ترکمن‌ها، هاپلوگروپ‌های ویژه اوراسیای شرقی (N, R, M) غالب‌تر از شاخه‌های اوراسیای غربی است. تعیین توالی کامل mtDNA نشان داد تنوع ژنتیکی بالایی در میان جمعیت‌های مطالعه شده‌ی ایرانی وجود دارد و قابل مقایسه با گروه‌های دیگری نظیر قفقاز جنوبی، آناتولی و اروپا هستند. البته بررسی‌های زبان‌شناختی، هیچ قرابتی میان جمعیت‌های آناتولی، قفقاز و ایران نشان نمی‌دهد؛ اما برخلاف این تصور، شواهد ژنتیکی دال بر قرابتی میان ایرانی‌ها و قشقایی و همچنین میان ارمنی‌ها و آذری‌های ایران و گرجستان است؛ به‌خصوص اینکه ایرانیان با زبان هندواروپایی‌ها از لحاظ مادری، دارای یک مخزن ژنتیکی با قشقایی‌های ترک‌زبان هستند (Derenko, et al. 2013). در یک نتیجه‌گیری کلی از جمعیت‌های مطالعه شده ایرانی، می‌توان میزان فراوانی هاپلوگروپ‌های موجود در اوراسیا را به‌صورت زیر بیان کرد:

U و N1, N2, N3, X, R0, R2'JT در اوراسیای غربی: ۹۹/۹٪ در بین آذری‌ها، ۸۶/۷٪ در بین ایرانی‌ها و ۹۱/۱٪ در بین قشقایی‌ها.

A4, B4, C4, C5, D4, F1b1, G2a3 در اوراسیای شرقی: ۹/۱٪ در بین آذری‌ها، ۱/۱٪ در بین ایرانی‌ها و ۴/۵٪ در بین قشقایی‌ها.

به‌منظور بررسی دنباله‌ی اعقاب ایرانیان، DNA میتوکندری داده‌های استخوانی ساکنان هفت‌تپه در دوره‌ی ایلام میانی به‌عنوان افراد بومی ایرانی، تعیین توالی شد. پس از تعیین توالی و تشخیص پلی‌مورفیسم‌ها، هاپلوگروپ این مردمان، R2 و R5 تشخیص داده شد. در ژنتیک میتوکندری انسانی، هاپلوگروپ R در DNA میتوکندری بسیار گسترده و شایع‌ترین هاپلوگروپ در غرب اوراسیا است (Derenko, et al. 2013). هاپلوگروپ R از زیرگروه‌های بزرگ هاپلوگروپ N است. R و زیرگروه‌های آن در سراسر اوراسیا، اقیانوسیه و آمریکا پراکنده شده‌اند و زیرگروه‌های R بیشتر در غرب اوراسیا متمرکز هستند. در ۲۰۰۹، مطالعات نشان داد که منشأ این هاپلوگروپ به ۶۶۸۰۰ سال پیش می‌رسد (Budowle, et al. 2002). در طی این مطالعات ژنتیکی مشخص شده بود که جمعیت‌های ایران، آناتولی، قفقاز و قسمتی از شبه‌جزیره عربستان (عمان و یمن) مجموعه مشترکی از اقوام مادری را دارا هستند (Grugni, et al. 2009) (Karmin 2005). (Soares, et al. 2009). (2012). برآورد شده است برخی از اعقاب این نوع از mtDNA از ایران خارج نشده‌اند و در همین منطقه گسترش یافته‌اند و در بین آن‌ها، R2 که در جنوب پاکستان و در هند با فراوانی کمی و در نواحی همسایه

(مانند خاور نزدیک، قفقاز، فلات ایران، شبه‌جزیره عرب و آسیای مرکزی) وجود دارد و در مناطق بلوچستان پاکستان (Al-Abri, et al. 2012)، راجستان و اوتارپرادیش (شمال هند) (Salas, et al. 2000)، گرجستان و ترکیه (Grugni, et al. 2012) یافت شده است، بنابراین می‌تواند از نظر مهاجرت هندوایرانیان مهم جلوه کند؛ درحالی‌که R2 هاپلوگروپی نادر است و پیدایش آن، با تقریب، پیش از آخرین دوره یخ‌بندان (۲۵۰۰۰-۱۹۰۰۰ سال پیش) است؛ همچنین هاپلوگروپ R5 که فراوانی آن در محدوده‌ی مرکز هند گسترانده شده است.

برای تحقق نتایج دقیق‌تر مناطق مذکور را از نظر هاپلوگروپ کروموزوم Y نیز موردبررسی قرار دادیم، بررسی‌ها حاکی از آن است که بین مناطقی که هاپلوگروپ DNA میتوکندریایی R2 و R5 در آن‌ها وجود دارد با هاپلوگروپ‌های J2, L, R1b, R1a کروموزوم Y هم‌پوشانی وجود دارد. هاپلوگروپ R1a به‌عنوان هاپلوگروپی که با مناطق آریانشین ارتباط دارد شناخته شده است. محدوده‌ی جغرافیای این هاپلوگروپ‌های Y-DNA عبارت‌اند از:

J2: غرب آسیا، آسیای مرکزی، اروپای جنوبی و آفریقای شمالی

R1a: آسیای مرکزی، آسیای جنوبی، اروپای مرکزی، اروپای شمالی و اروپای شرقی

R1b: اروپا، قفقاز، آسیای مرکزی، آسیای جنوبی، آفریقای جنوبی، آفریقای شمالی و آفریقای مرکزی

L: آسیای جنوبی، آسیای مرکزی، آسیای جنوب غربی و مدیترانه

در کل، تجزیه و تحلیل توالی mtDNA و کروموزوم Y این مناطق مشخص کرد که تنوع ژنتیک بالایی در جمعیت‌های بررسی‌شده‌ی ایرانی وجود دارد که قابل قیاس با دیگر گروه‌ها از قفقاز جنوبی، آناتولی و اروپا است.

تعیین توالی DNA میتوکندری بقایای اسکلتی هفت‌تپه به‌عنوان افراد بومی ایران با قدمت ایلام میانی، با توجه به مناطقی که این هاپلوگروپ R2 از آن به‌دست آمد و هم‌پوشانی آن با هاپلوگروپ R1b کروموزوم Y نشان داد که، این هاپلوگروپ می‌تواند با مهاجرت هندوایرانیان ارتباط داشته باشد، این هاپلوگروپ حداقل از ۳۰۰۰ سال پیش (۱۴۵۰-۱۱۰۰ ق.م) در ایران وجود داشته است و منشأ آن را باید در جنوب غرب ایران و در تمدن ایلام جستجو کرد.

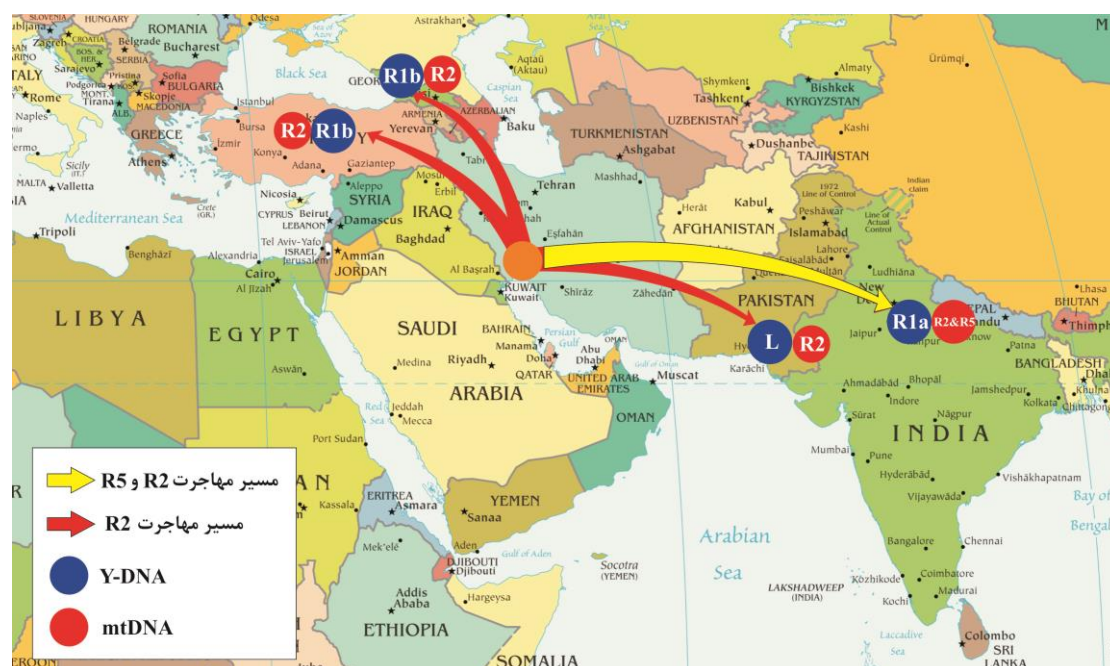
پی‌نوشت

۱. در برخی از منابع HVR3 دارای ۱۳۸ جفت باز شامل بازهای ۴۳۸ تا ۵۷۶ نیز ذکر شده است.
۲. با توجه به اینکه غلظت DNA باستانی، آلودگی بسیاری دارد و DNA با غلظت پایینی را می‌توان به‌دست آورد، از این مقدار DNA استفاده کردیم که در برخی موارد این غلظت بالاتر نیز می‌رود.

3. National Center for Biotechnology Information.

تشکر و قدردانی

از آقای دکتر بهزاد مفیدی نصرآبادی سرپرست گروه حفاری باستان‌شناسی فصل هفتم هفت‌تپه که صمیمانه اجازه دادند از یافته‌های ایشان در این تحقیق استفاده شود تشکر می‌نماییم.



تصویر ۴: نقشه فراوانی هاپلوگروپ R2 و R5 و مقایسه آن با هاپلوگروپ‌های Y-DNA

منابع

لسانی، نغمه؛ اکبری، محمدتقی؛ زارع کاریزی، شهره (۱۳۹۳)، «هاپلوگروپ‌های ژنوم میتوکندری در یک جمعیت از قوم کرد ایرانی: ابزاری در تشخیص افراد مجهول الهویه»، *طب/انتظامی*، دوره ۲ شماره ۲، صفحات ۶۷-۷۴.

مفیدی نصرآبادی، بهزاد (۱۳۹۴)، «گزارش مقدماتی حفاری‌های محوطه باستانی هفت تپه ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۱ شمسی، الامیکا ۵، صص ۱۹۶-۱۹۹.

Adachi, J. and M. Hasegawa 1995. Improved dating of the human/chimpanzee separation in the mitochondrial DNA tree: heterogeneity among amino acid sites, *Journal of Molecular Evolution* 40 (6): 622-628.

Al-Abri, A., E. Podgorná, J. I. Rose, L. Pereira, C. J. Mulligan, N. M. Silva, R. Bayoumi, P. Soares and V. Černý 2012. Pleistocene-Holocene boundary in Southern Arabia from the perspective of human mtDNA variation, *American Journal of Physical Anthropology* 149 (2): 291-298.

Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe and F. Sanger 1981, Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature* 290 (5806): 457.

Aris-Brosou, S. and L. Excoffier 1996. The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism, *Molecular Biology and Evolution* 13 (3): 494-504.

Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb and N. C. Saunders 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics, *Annual Review of Ecology and Systematics* 18(1): 489-522.

Budowle, B., M. W. Allard and M. R. Wilson 2002. Critique of interpretation of high levels of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA hypervariable region I from hair, *Forensic Science International* 126(1): 30-33.

Budowle, B., J. A. DiZinno and M. R. Wilson 1999. Interpretation guidelines for mitochondrial DNA sequencing, *Tenth International Symposium on Human Identification*.

- Cann, R. L., W. M. Brown and A. C. Wilson 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA, *Genetics* 106(3): 479-499.
- Cann, R. L., M. Stoneking and A. C. Wilson 1987. Mitochondrial DNA and human evolution, *Nature* 325(6099): 31-36.
- Derenko, M., B. Malyarchuk, A. Bahmanimehr, G. Denisova, M. Perkova, S. Farjadian and L. Yepiskoposyan 2013. Complete mitochondrial DNA diversity in Iranians, *PloS one* 8(11): e80673.
- Forster, P., R. Harding, A. Torroni and H.-J. Bandelt 1996. Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal, *American Journal of Human Genetics* 59(4): 935.
- Grugni, V., V. Battaglia, B. H. Kashani, S. Parolo, N. Al-Zahery, A. Achilli, A. Olivieri, F. Gandini, M. Houshmand and M. H. Sanati 2012. Ancient migratory events in the Middle East: new clues from the Y-chromosome variation of modern Iranians, *PloS one* 7(7): e41252.
- Hagelberg, E., N. Goldman, P. Lio, S. Whelan, W. Schiefenhöel, J. Clegg and D. Bowden 1999. Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 266(1418): 485-492.
- Hagelberg, E., B. Sykes and R. Hedges 1989. Ancient bone DNA amplified, *Nature* 342(6249): 485.
- Handt, O., S. Meyer and A. von Haeseler 1998, Compilation of human mtDNA control region sequences, *Nucleic Acids Research* 26(1): 126-129.
- Helgason, A., S. Sigurðardóttir, J. Gulcher, K. Stefansson and R. Ward 2000. *Sampling saturation and the European mtDNA pool: implications for detecting genetic relationships among populations, archaeogenetics: DNA and the population prehistory of Europe*, McDonald Institute for Archaeological Research, Cambridge pp. 285-294.
- Higuchi, R., B. Bowman, M. Freiberger, O. A. Ryder and A. C. Wilson 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family, *Nature* 312(5991): 282.
- Karmin, M. 2005. *Human mitochondrial DNA haplogroup R in India: dissecting the phylogenetic tree of South Asian-specific lineages*, M.Sc. Thesis, Department of Evolutionary Biology, University of Tartu.
- Kim, K. I., J. H. Lee, K. Li, Y. P. Zhang, S. S. Lee, J. Gongora and C. Moran 2002. Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism, *Animal Genetics* 33(1): 19-25.
- King, M.-C. and A. C. Wilson 1975. Evolution at two levels in humans and chimpanzees, *Science* 188(4184): 107-116.
- Koji Lum, J. and R. L. Cann 2000. mtDNA lineage analyses: origins and migrations of Micronesians and Polynesians, *American Journal of Physical Anthropology* 113(2): 151-168.
- Lutz, S., H.-J. Weisser, J. Heizmann and S. Pollak 1996. mtDNA as a tool for identification of human remains, *International Journal of Legal Medicine* 109(4): 205-209.
- Lutz, S., H.-J. Weisser, J. Heizmann and S. Pollak 2000. Mitochondrial heteroplasmy among maternally related individuals, *International Journal of Legal Medicine* 113(3): 155-161.
- Lutz, S., H. Wittig, H.-J. Weisser, J. Heizmann, A. Junge, N. Dimo-Simonin, W. Parson, J. Edelmann, K. Anslinger and S. Jung 2000. Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions?" *Forensic Science International* 113(1-3): 97-101.
- Malyarchuk, B. and M. Derenko 2001. Mutational hotspots and hypervariable nucleotide motifs in the non-coding human mtDNA control region. *American Journal of Human Genetics*, 4(69):391-391.
- Mathee, C. A. and S. K. Davis 2001. Molecular insights into the evolution of the family Bovidae: a nuclear DNA perspective, *Molecular Biology and Evolution* 18(7): 1220-1230.

- Meyer, S., G. Weiss and A. von Haeseler 1999. Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA, *Genetics* 152(3): 1103-1110.
- Parsons, T. J., D. S. Muniec, K. Sullivan, N. Woodyatt, R. Alliston-Greiner, M. R. Wilson, D. L. Berry, K. A. Holland, V. W. Weedn and P. Gill 1997. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region, *Nature Genetics* 15(4): 363.
- Richards, M. B., B. C. Sykes and R. E. Hedges 1995. Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains, *Journal of Archaeological Science* 22(2): 291-299.
- Röhl, A., B. Brinkmann, L. Forster and P. Forster 2001. An annotated mtDNA database, *International Journal of Legal Medicine* 115(1): 29-39.
- Salas, A., V. Lareu, F. Calafell, J. Bertranpetit and A. Carracedo 2000. mtDNA hypervariable region II (HVII) sequences in human evolution studies, *European Journal of Human Genetics* 8(12): 964.
- Soares, P., L. Ermini, N. Thomson, M. Mormina, T. Rito, A. Röhl, A. Salas, S. Oppenheimer, V. Macaulay and M. B. Richards 2009. Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock, *American Journal of Human Genetics* 84(6): 740-759.
- Stoneking, M., D. Hedgecock, R. G. Higuchi, L. Vigilant and H. A., Erlich 1991. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes, *American Journal of Human Genetics* 48(2): 370.
- Stringer, C. B. and P. Andrews 1988. Genetic and fossil evidence for the origin of modern humans, *Science* 239(4845): 1263-1268.
- Sykes, B., A. Leiboff, J. Low-Beer, S. Tetzner and M. Richards 1995. The origins of the Polynesians: an interpretation from mitochondrial lineage analysis, *American Journal of Human Genetics* 57(6): 1463.
- Vigilant, L., M. Stoneking, H. Harpending, K. Hawkes and A. C. Wilson 1991a. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA, *Science* 253(5027): 1503-1507.
- Vigilant, L., Wilson, A., and H., Harpending 1991b. Evolution of human mitochondrial DNA in African population, *American Journal of Human Genetics*, 253:1503-1507.
- Wilkinson-Herbots, H., M. B. Richards, P. Forster and B. Sykes 1996. Site 73 in hypervariable region II of the human mitochondrial genome and the origin of European populations, *Annals of Human Genetics* 60(6): 499-508.