

ДРЕВНА ДНК У АРХЕОЛОГИЈИ: ОД АРХЕОЛОШКИХ ИСКОПАВАЊА ДО ЛАБОРАТОРИЈСКИХ АНАЛИЗА

Александра Жегарац

Филозофски факултет, Универзитет у Београду

e-mail: klea064@gmail.com | Прегледни рад

Примљено: 9. 4. 2019. | УДК: 902.2:575

Прихваћено: 8. 10. 2019.

Апстракт: *Са развојем технологије, анализе древне ДНК постале су саставни део истраживања у археологији, доприносећи сазнањима везаним за историју популација. Међутим, анализе древне ДНК представљају изазов из неколико разлога. Деструктивне су и скупе, а осим тога, у археолошком узорку је присутна веома мала количина деградоване и хемијски измењене ендогене ДНК. Неповољни средински услови у којима је материјал пронађен и складиштен (попут високих температура и влаге) подстичу даљу деградацију органског материјала. Додатни проблем је и могућа контаминација савременом ДНК, до које може доћи у било ком кораку анализа. Оптимално и пажљивије руковање узорцима приликом ископавања и складиштења истог, доводи до повећања количине ендогене ДНК у узорку и смањивања цене секвенцирања. Показано је да се највећи принос древне ДНК постиже издавањем из калцификованог материјала, а посебно унутрашњег дела петрозне кости. Претварање костију у прах обавља се у лабораторијама специјално посвећеним овим анализама, у којима су предузете одређене мере и протоколи како би се контаминација спречила. У зависности од истраживачког питања и након провере очуваности ДНК, доноси се одлука да ли ће се секвенцирати цео геном и на којој дубини или само делови генома од интереса. У случају недоступности једарне ДНК, митохондријална ДНК као и полиморфни генетички маркери на Y хромозому могу бити информативни при одређивању матералних, тј. патералних линија, али за разлику од једарне ДНК не могу пружити потпуну информацију о демографским променама и популационој динамици. Међутим, како бисмо стварно разумели прошлост, неопходна је добра комуникација и размена информација између археолога, антрополога, генетичара и лингвиста.*

Кључне речи: *древна ДНК, очуваност ДНК, ендогена ДНК, контаминација, археолошко ископавање, складиштење материјала, материјал за анализу древне ДНК, НГС*

Увод

Анализе људских остатака са археолошких локалитета саставни су део истраживања чији је циљ разумевање прошлости. Поред основне фи-

зичко-антрополошке анализе могуће је спровести низ физичко-хемијских анализа које омогућавају добијање одговора на бројна археолошка питања. Једна од метода односи се на проучавање древне ДНК. Палеогенетичким методама омогућено је посматрање генетичког диверзитета и његових промена током времена (Itan et al. 2009; Mathieson et al. 2015), као и проучавање еволуције и филогеније врсте (Green et al. 2010; Krause et al. 2010; Reich et al. 2010). За археологију ове методе имају вишеструки значај, пре свега за добијање одговора на питања о популацијама у прошлости, њиховим кретањима и међусобним односима (Lazaridis et al. 2014; Allentoft et al. 2015; Hofmanová et al. 2016, Mathieson et al. 2018), сродству и обрасцима настањивања на нивоу заједница, а затим у спрези са археолошким доказима доприносе разумевању социјалних разлика у прошлости (Keyser-Tracqui et al. 2003; Naak et al. 2008; Knipper et al. 2017; O’Sullivan et al. 2018).

За еволуциону и конзервациону биологију, али и за форензику и археологију, развој молекуларних метода, а нарочито развој методе нове генерације секвенцирања – НГС (енгл. *Next Generation Sequencing*) (Sanger et al. 1977; Moolis and Falona 1987; Metzker 2010), посебно је важан јер је тиме омогућено умножавање мале количине ДНК молекула и добијање поузданих података и из веома малих и оштећених узорака. Међутим, палеогенетичке студије имају и ограничења. Наиме, изолат древне ДНК представља сложу мешавину ДНК која потиче из различитих извора. Он се састоји од ендогене ДНК (ДНК организма од интереса), микробне и срединске ДНК (ДНК из земљишта и места где је материјал складиштен) и ДНК која је резултат контаминације¹ након ископавања и представља ДНК која нарушава аутентичност резултата (Yang and Watt 2005). Дакле, у археолошком узорку се обично налази врло мала количине ендогене ДНК, која је сведена на фрагменте дужине око 70 базних парова (бп) и хемијски је промењена (Rääbo et al. 2004; Knapp and Hofreiter 2010). Данас, упркос развоју специјалних лабораторија за анализе древне ДНК и развоју палеогенетичких метода (Gansauge and Meyer 2013; Damgaard et al. 2015; Korlević and Meyer 2019, 15–19), контаминација савременом ДНК, као и деградација ДНК у скелетном материјалу, представљају велики проблем у овим студијама. Ограничавањем фактора који доводе до контаминације и деградације ДНК, резултати ДНК анализа постају поузданији.

¹ Контаминација се пре свега односи на ДНК исте или блиско сродне врсте ендогеној ДНК од интереса. У случају анализе човека, ДНК бактерија и гљива не сматра се контаминацијом, већ она може потицати из мртвих ћелија коже, косе, пљувачке, зноја, крви. У студијама флоре и фауне, савремени референтни узорци који се користе за морфолошку компарацију представљају највећу опасност да дође до контаминације (Yang and Watt 2005).

Контаминација, као и даља деградација материјала могу се спречити адекватним опхођењем према људским остацима. У овом раду, с обзиром на значај повећања количине ДНК од интереса, предложени су кораци који се односе на руковање људским остацима од ископавања до узорковања, одабир ДНК метода у односу на постављена археолошка питања, само узорковање и начин чувања и складиштења узорака. Узимајући у обзир да су ДНК анализе скупе и деструктивне, правилно третирање постаје још важније.

Очуваност и деградација древне ДНК

Резултат дијагенеза је деградација и фрагментација ДНК, као и значајно присуство неендогене ДНК у узорку (Pääbo 1989; Lindahl 1993; Dabney et al. 2013). Степен деградације и очуваности макромолекула у археолошком материјалу зависи од многих фактора, као што су средински услови (просечна температура, влажност средине, рН земљишта, присутни микроорганизми и минерали), ткива из кога се ДНК издваја, старост материјала и време и услови његовог складиштења (Bollongino et al. 2008; Allentoft et al. 2012; Elsner et al. 2015).

Главни фактор распада ДНК представља вода јер разлаже хидроксиапатит у костима и дозвољава микроорганизмима да метаболишу органске компоненте костију, расту и размножавају се, што води ка хидролитичким и оксидативним оштећењима (Lindahl 1993).

Из тог разлога, биолошки материјал најбоље је очуван у срединама где не постоје варијације у температури и влажности, на пример у пећинама – сува, хладна, тамна, анаеробична места са благо алкалним условима и константно ниском температуром током читаве године (Bollongino et al. 2008; Elsner et al. 2015). Виши проценат издвојене ДНК очекује се у хладнијим срединама јер високе температуре и влажнија клима убрзавају деградацију узорака због повећане репродукције и активности микроорганизма из земљишта у тим условима, као и убрзавања хемијских реакција (Lindahl 1993; Bollongino et al. 2008; Orlando et al. 2013).

Као што количина ендogene ДНК опада са повећањем температуре, запажено је да опада и у зависности од типа земљишта, при чему кречњак смањује активност микроорганизма и разлагање апатита у односу на земљишта са нижом рН вредношћу (Bollongino et al. 2008). Наиме, киселе средине разлажу CaPO_4 и уништавају апатит у костима и упркос доброј морфолошкој очуваности, деградација ДНК је значајна. Насупрот томе, у веома базним срединама повећава се количина бикарбоната и CO_2 , који такође повећавају деградацију апатита, те је најоптималније стање хидроксиапатита на рН око

7–8 (Bollongino et al. 2008). Такође, од пресудног значаја могу бити неки детаљи, као што су метални објекти који садрже бакар и могу инхибирати раст бактерија, или присуство кречњака или керамике поред костију, који могу заштитити апатит и неутралисати кисело земљиште (Bollongino et al. 2008).

Ископавање скелетног материјала

Приликом самог ископавања материјала, као и за време његовог одлагања и складиштења, требало би поштовати одређену процедуру како би се спречила даља деградација макромолекула и контаминација савременом ДНК. Узимајући у обзир да контаминација може потицати из различитих извора у било којој фази истраживања (руку биолога и археолога, радне средине као и из реагенаса), важно је на адекватан начин руковати материјалом како би се материјал заштитио од даље деградације и контаминације. На тај начин се може умногоме утицати на однос ендogene и екзогене ДНК у узорку, а самим тим и на цену секвенцирања и могућност добијања одговора на постављена питања.

Приликом руковања материјалом пожељно је носити латексне рукавице за једнократну употребу, како би се спречило остављање ДНК истраживача на костима и потенцијална контаминација. На терену и приликом одабира узорака саветује се ношење два пара рукавица, како кожа ни у једном тренутку не би дошла у контакт са материјалом у случају пуцања рукавица или док се искоришћен пар замењује новим паром рукавица и том приликом се додирну нечисти објекти, други узорци, коса и лице (Bollongino et al. 2008; Llamas et al. 2017). Такође, саветује се и ношење дугих рукава, као и маске преко органа за дисање и косе.

Нагло мењање средине након ископавања може имати негативан ефекат на узорке и очуваност ДНК. Ово је нарочито изражено у подручјима с топлијом климом, где долази до топлотног шока услед високих температура и сунчеве светлости, те би материјал требало заштитити од кише и сунца како би се колико год је могуће спречила хидролиза и оксидација. Узорке би након ископавања требало паковати у одвојене, чисте и суве кесе, како влага и бактерије не би оштетиле ДНК, и складиштити их у хладу и на константној температури (Bollongino et al. 2008; Llamas et al. 2017). Уколико су узорци мокри, не треба их одлагати у пластичну кесу због влаге и бактерија, нити сушити директно на сунчевој светлости, већ би их требало прекрити марамцама и ставити у папирну кесу (Yang and Watt 2005).

Скелетни материјал не треба чистити од земље јер земља може спречити улазак контаминаната дубље у ткиво. Такође, не би га требало прати

јер вода убрзава даље разлагање материјала тако што продире кроз порозне кости и зубе и носи површинску контаминацију дубље у ткиво која се изолује заједно са ендеогеном ДНК. Уместо да се перу, узорке би требало обрисати сувом четком уколико је то неопходно (нпр. због изложби) или најпре одвојити материјал за ДНК анализу (Llamas et al. 2017). Добро очувани узорци због своје компактности неће дозволити продор контаминанта унутар кости, а земља и површинска контаминација ће се лако уклонити машином која користи фини и гранулирани песак под високим притиском у стерилним условима лабораторије. Такође, треба избегавати било какав хемијски третман јер може инхибирати ензимске реакције у процесовању ДНК (Llamas et al. 2017). Алатке и радну површину требало би чистити изабелјивачем и дејонизованом водом пре рада на сваком следећем узорку (Llamas et al. 2017).

Складиштење скелетног материјала

Варијације у срединским условима непожељне су и након ископавања скелетног материјала, те су услови складиштења веома битни за очуваност ДНК. Најбоље је да то буде неко место које је хладно и суво током целе године, где не долази до значајних промена срединских фактора (Bollongino et al. 2008; Elsner et al. 2015; Llamas et al. 2017). Анализе су показале да су кости које су након ископавања подвргнуте различитим условима имале различит принос ендеогене ДНК (Pruvost et al. 2007). Док су узорци складиштени 57 година на сувом месту и собној температури имали само 18% ендеогене ДНК, свеже ископани узорак, складиштен у сличним условима као у седименту и нетретиран водом или хемикалијама, водио је ка вишем приносу ДНК, чак 46% (Pruvost et al. 2007).

Узорковање материјала за анализу древне ДНК

Иако цена секвенцирања опада, анализе древне ДНК и даље су скупе, поготово када се узме у обзир да је понекад потребно много експерименталног понављања да би се добио резултат. Процес анализа, тј. да ли ће се секвенцирати цео геном или само одређени делови генома, зависи од количине ендеогене ДНК, што у великој мери утиче на буџет и добијену информацију (Fu et al. 2013; Llamas et al. 2017). С обзиром на то да проценат ендеогене ДНК значајно варира чак и у оквиру истог археолошког налазишта и временског периода, избор узорака представља веома важан и тежак корак. Управо зато је неопходно бирати узорке у складу с њиховом очуваношћу и њиховим контекстом. Информације са ископавања, као што су информације о типу

земљишта и клими, као и услови складиштења материјала, могу бити веома корисни приликом одабира и даље обраде материјала (Allentoft et al. 2012).

Досадашња истраживања су показала да је за издвајање древне ДНК најбоље користити калцификован материјал, посебно петрозне кости (Gamba et al. 2014; Pinhasi et al. 2015) и зубе (Adler et al. 2011; Hansen et al. 2017). Процес деградације се у калцификованом материјалу одвија знатно спорије него у меканом ткиву, захваљујући смањеној порозности и минералном матриксу који штити ћелије од срединског утицаја (Adler et al. 2011)². У случају одсуства петрозне кости и зуба, могу се узорковати кортикалне кости (Fu et al. 2013; Alberti et al. 2018). Иако је визуелним посматрањем тешко предвидети количину ендogene ДНК у узорку, морфологија узорка се може користити као индикатор очуваности, те се за анализу древне ДНК бирају тврде, компактне и тешке кости, на супрот фрагментованим и порозним костима или костима са рупама и линијама, које су знак активности микроорганизама (Hansen et al. 2017). Напукле и танке кости са видљивим сунђерастим ткивом треба избегавати јер је могућност уласка воде и микроорганизама који доводе до деградације ДНК већа (Bollongino et al. 2008). Боја такође може бити показатељ очуваности ДНК, то јест светлија боја је пожељнија од тамније (Bollongino et al. 2008).

Највреднији материјал за анализе целог генома представља унутрашњи део петрозне кости која је део темпоралне кости и уједно најгушћа кост у телу сисара (Gamba et al. 2014; Pinhasi et al. 2015). Издвајање ДНК из њеног унутрашњег, најкомпактнијег дела (лат. *cochlea*), уз минимални губитак морфолошке информације, може водити ка високом приносу ДНК чак и када је визуелна очуваност веома лоша (Sirak et al. 2017; Hansen et al. 2017). Када се упоредила количина ендogene ДНК у петрозној кости, зубима (дентину и цементу) и дугој и темпоралној кости, највећи принос ендogene ДНК добијен је из петрозне кости (Gamba et al. 2014; Hansen et al. 2017). Тиме се цена секвенцирања генома знатно смањила, а могућност да се одговори на различита питања повећала. Зато петрозне кости не би требало давати за потребе других анализа, већ их треба чувати за потенцијалне анализе древне ДНК.

Здрави зуби (углавном молар или премолар), глатке и нетакнуте површине, такође су корисни за анализе ДНК. Глеђ и цемент су минерализоване супстанце које обезбеђују заштиту ДНК у различитим срединама, те зубе

² Кости садрже две трећине минералног ткива (калцијум-фосфата у форми хидроксиапатита), за који се везује ДНК и на тај начин се успорава деградација. Само једну трећину костију чине ћелије и колаген, чијим распадом долази до повећања порозности костију, а самим тим и до повећања изложености води и микроорганизмима што доводи и до брже деградације ДНК (Adler et al. 2011).

одликује мања порозност и подложност контаминацији од дугих костију. Иако је дентин најчешће коришћен за изолацију древне ДНК, доказано је да је количина и квалитет митохондријалне ДНК (мтДНК) највећи у цементу (чак 4 до 5 пута у односу на дентин), што је у корелацији са већом минерализацијом и густином хелија (Adler et al. 2011). Насупрот једарној ДНК, која је подложнија деградацији и пожељно је изоловати је из петрозне кости, већа пропорција мтДНК може се наћи у цементу јер је метаболички активнији део (Hansen et al. 2017).

Поред калцификованог материјала, ДНК је могуће издвојити и из кератинског материјала (коса, рог, нокти, перо), који је у изузетно хладним срединама веома отпоран на деградацију и спољашње контаминанте, захваљујући својој хидрофобној природи и начину паковања (Gilbert et al. 2007; Rasmussen et al. 2010; Campos and Gilbert 2019, 57–63). Такође, древна ДНК се може анализирати из копролита (минерализованих остатака фецеса) (Kuch and Poinar 2012, 37–42; Tito et al. 2012), као и очуваних делова биљака (Wales and Kistler 2019, 45–55), у циљу реконструисања исхране праисторијских популација. У веома хладним и сувим условима, очуваност ДНК може бити одлична чак и у меканим ткивима (Ermini et al. 2008). Материјал културног наслеђа (коже, папируса, лепка, остатака садржаја из чинија и посуда), може бити користан као извор древне ДНК уколико није агресивно третиран хемикалијама, и пружити информације о исхрани, медицинској пракси и култури (Burger et al. 2000; Pruvost et al. 2007).

Узорковање костију за потребе анализа требало би урадити уз што мањи губитак материјала. Оно се најчешће обавља диск-бушилицом, по могућности у комори са добром вентилацијом. Како би се избегла међу-контаминација узорака, диск-бушилицу би требало очистити избељивачем између узорака (Yang and Watt 2005; Llamas et al. 2017). Претварање скелетних елемената у прах из кога ће се издвојити ДНК врши се у специјалним лабораторијама са стерилним собама намењеним искључиво овим истраживањима³ (Knapp et al. 2012; Llamas et al. 2017). Материјал у лабораторији подлеже зрачењу са обе стране ради површинске деконтаминације узорака. Физичке методе којима се исечени и озрачени скелетни елементи претварају

³ Један од најбитнијих предуслова за анализу древне ДНК јесте постојање специјалних лабораторија за ову врсту истраживања и апсолутна физичка одвојеност археолошког материјала од савременог. Лабораторија мора имати одвојене пре-PCR и пост-PCR собе (енгл.: *PCR – Polymerase Chain Reaction*), и морају се поштовати одређене процедуре (Pääbo et al. 2004; Knapp et al. 2012; Llamas et al. 2017). Такође, развијене су посебне технике, критеријуми и протоколи за проверу аутентичности резултата специфичним биоинформатичким методама (Jónsson et al. 2013; Renaud et al. 2019, 163–194).

у прах различите су, од директног бушења узорака ручном бушилицом до пулверизације⁴ (Adler et al. 2011), или уситњавања костију у посебној машини (Gondek et al. 2018).

Материјал за ДНК анализе складишти се у фрижидеру, на температури од +4°C. Замрзивач, у којем су температуре знатно ниже, погодан је за складиштење узорака само у случају одлагања на дуже време и када се не зна поуздано када ће се користити за анализе. Тако се избегавају велике осцилације у температури, као и кондензовање воде и стварање кристала леда у замрзивачу, који могу бити штетни по ДНК (Bollongino et al. 2008).

Одабир методе ДНК анализе и интерпретација

Након секвенцирања по Сангеру (Sanger et al. 1977), које је означило прву генерацију секвенцирања, развија се НГС, који омогућава секвенцирање целих генома релативно великог броја узорака, из само око 0,1 г до 0,5 г узорка. Такође, омогућено је добијање информације из веома малих фрагмената карактеристичних за древну ДНК, као и лакше детектовање нових и ретких варијанти у популацији, што је раније било веома тешко. НГС подразумева специјалну припрему узорка и библиотеке, секвенцирање и технике осликавања и на крају обраду велике количине података сложеним биоинформатичким методама (Metzker 2010; Kircher 2012, 197–228).

С обзиром на то да су анализе древне ДНК деструктивне, временски захтевне и скупе, а да проценат ендогене ДНК значајно варира чак и у оквиру истог археолошког налазишта, најчешће се прво ради проверавање очуваности неколико узорака (енгл. *screening*), да би се донела одлука како да се настави са анализама. Само проверавање количине ендогене ДНК обично носи довољно информација за одређивање пола индивида на основу односа X и Y секвенци (Skoglund et al. 2013), што је нарочито значајно у случају скелетних остатака деце и недовољно очуваних скелета, када антрополошке методе не омогућавају одређивање пола.

У зависности од истраживачког питања, као и очуваности ДНК, доноси се одлука да ли ће се секвенцирати цео геном и на којој дубини⁵ или ће се циљати одређени делови генома. Мала дубина секвенцирања обично

⁴ Бушилица на контактної површини ствара велику количину топлоте (за разлику од пулверизације, када је енергија распоређена по целој запремини узорка), те ће се најчешће користити само уколико постоји потреба за морфолошком очуваношћу узорка, нпр. за остеоолошке анализе, изложбу или форензичку идентификацију (Adler et al. 2011).

⁵ Ниво поузданости података секвенцирања зависи од тога колико је пута једна позиција на геному прочитана, тј. од броја различитих секвенци, који потврђује да се ту налази одређена база (енгл. *coverage*) (Kircher 2012, 197–228; Peltzer et al. 2016).

је довољна за истраживање сродства као и за основне анализе популационе генетике које поређењем узорака од интереса са другим древним и савременим геномима могу да доведу до нових сазнања о пореклу индивидуе и њиховој генетичкој сличности. На тај начин долази се до информација о односима међу популацијама и њиховим кретањима (Lazaridis et al. 2014, Allentoft et al. 2015; Mathieson et al. 2018). Насупрот томе, да би се добила информација о сложенијим демографским променама и еволутивној историји људи, примењују се компликованија моделовања, за које је потребно да узорак буде секвенциран на већој дубини, чиме се повећава и цена анализа (Stoneking and Krause 2011; Li and Durbin 2011).

Митохондријална ДНК често је предмет анализа у случају лоше очуваности једарне ДНК. С обзиром на то да се наслеђује по мајчиној линији, показала се веома корисном у одређивању матералних породичних веза (Haak et al. 2005; Bramanti et al. 2009, Bollongino et al. 2013). Слично мтДНК, посматрање полиморфних генетичких маркера⁶ на Y хромозому, који се наслеђује само од оца, може дати информацију о кретању мушког дела популације (Kivisild 2017; O'Sullivan et al. 2018). Међутим, за разлику од једарне ДНК, која се наслеђује од оба родитеља, а самим тим је и информативнија, хаплогрупе мтДНК и Y хромозома не могу пружити потпуну информацију о демографским променама и популационој динамици.

Последњих година дошло је до великих побољшања у методологији, која су знатно редуковала цену анализа. Када очуваност узорка није добра (било због срединских услова или старости материјала), уместо секвенцирања целих генома могу се применити методе заробљавања специфичних делова ДНК од интереса (engl. *selective capture*) или обогаћивања узорака (González Fortes and Paijmans 2019, 93–105). На тај начин се повећава однос између ендогене и егзогене ДНК, омогућава се добијање хиљада једарних варијанти, а самим тим се постиже и већа статистичка резолуција и добијају се комплетнији и поузданији резултати (Fu et al. 2013; Haak et al. 2015; Mathieson et al. 2015). Применом ових метода, специјално дизајниране пробе везују се за комплементарне секвенце из узорка (нпр. мтДНК или појединачне нуклеотидне генетичке маркере), које се касније умножавају, док се неvezана ДНК испира (Maričić et al. 2010; Enk et al. 2014; González Fortes and Paijmans 2019, 93–105).

⁶ Генетички маркери су јединствене секвенце ДНК које се налазе на специфичном месту у геному. Да би генетички маркери били информативни, они морају бити полиморфни, односно морају се налазити у више варијанти у популацији. Најинформативнији и најчешће коришћени генетички маркери јесу полиморфизми појединачних нуклеотида (енгл.: *SNP – Single Nucleotide Polymorphisms*), који пружају информацију уколико се ДНК молекул две индивидуе разликује у једном базном пару.

Приликом обављања свих анализа најважније је веома пажљиво тумачити резултате како би се избегло олако закључивање и погрешно коришћење терминологије (Eisenmann et al. 2018; Furholt 2018; Frieman and Hofmann 2019). Из ових разога, резултате ДНК студија неопходно је посматрати искључиво у археолошком контексту и у сарадњи са археолозима, антрополозима и лингвистима, како се биолошки податак индивидуе из прошлости не би мешао са данашњим културним идентитетом. Додатни проблем студија древне ДНК јесте мањак броја узорака, те приликом интерпретација треба бити опрезан, јер се добијени подаци не морају односити на целу популацију или археолошку културу која је у фокусу интересовања.

Закључак

Проучавања древне ДНК, заједно са другим физичко-хемијским анализама, представљају поуздану методу за добијање нових сазнања и одговора на археолошка питања. Оне су неизмерно важне пре свега зато што се информација добија директно из индивидуе у прошлости, односно подаци се посматрају у оквиру одређеног периода и контекста. Поред тога што омогућавају праћење промена у популацијама током времена, омогућавају и директну упоредну анализу са савременим популацијама људи, животиња и биљака.

С обзиром на то да се очуваност ДНК не може са сигурношћу утврдити макроскопским методама, већ само генетичким истраживањима, одговарајућа брига о узорцима за време и након ископавања може имати пресудан утицај на могућност примене анализа, цене, али – што је најважније – на поузданост резултата. Иако постоји могућност издвајања ДНК и из веома лоше очуваних узорака, што се нарочито односи на узорке који потичу из топлих средина (Llorente et al. 2015; Skoglund et al. 2016, Posth et al. 2018), већа је вероватноћа да ће се добити поуздани резултати уколико се узорцима рукује на адекватан начин. На истраживачу је да пружи свој максимум како не би дошло до даље контаминације и деградације материјала у циљу спровођења веродостојних анализа. Такође, познавањем срединских услова археолошког налазишта и складиштења, омогућава се боље бирање материјала, што доводи до значајне уштеде времена и новца (Allentoft et al. 2012).

Међутим, потпунија слика о прошлости може се добити једино кроз сарадњу стручњака из различитих области, пре свега археолога, антрополога, генетичара и лингвиста. То у првом реду подразумева кооперацију, добру комуникацију и размену информација у сваком кораку истраживања, од постављања истраживачких питања до интерпретације резултата. Ово је

кључно за разумевање прошлости с обзиром на то да су биологија и култура међусобно зависни, те их стога никако не би требало одвајати приликом истраживања живота давно несталих заједница.

Истраживање је резултат рада на пројекту *Биоархеологија древне Европе – људи, животиње и биљке у праисторији Србије* (бр III 47001), које је финансирало Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

БИБЛИОГРАФИЈА

- Adler, C. J., Haak, W., Donlon, D., Cooper, A. and The Genographic Consortium.** 2011. Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *Journal of Archaeological Science* 38: 956–964.
- Alberti, F., Gonzalez, J., Paijmans, J. L., Basler, N., Preick, M., Henneberger, K., ... Barlow, A.** 2018. Optimized DNA sampling of ancient bones using computed tomography scans. *Molecular ecology resources* 18 (6): 1196–1208.
- Allentoft, M. E., Collins, M., Harker, D., Haile, J., Oskam, C. L., Hale, M. L., ... Bunce, M.** 2012. The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279 (1748): 4724–4733.
- Allentoft, M. E., Sikora, M., Sjogren, K. G., Rasmussen, S., Rasmussen, M., ... Willerslev, E.** 2015. Population genomics of Bronze Age Eurasia. *Nature* 522: 167–172.
- Bollongino, R., Nehlich, O., Richards, M. P., Orschiedt, J., Thomas, M. G., Sell, C., Fajkošová, Z., Powell, A., Burger, J.** 2013. 2000 years of parallel societies in Stone Age Central Europe. *Science* 342 (6157): 479–481.
- Bollongino, R., Tresset, A. and Vigne, J.D.** 2008. Environment and excavation: pre-lab impacts on ancient DNA analyses. *Comptes Rendus Palevol* 7: 91–98.
- Bramanti, B., Thomas, M. G., Haak, W., Unterlaender, M., Jores, P., Tambets, K., ... Burger, J.** 2009. Genetic discontinuity between local hunter-gatherers and Central Europe's first farmers. *Science* 326 (5949): 137–140.
- Burger, J., Hummel, S. and Herrmann, B.** 2000. Palaeogenetics and cultural heritage. Species determination and STR-genotyping from ancient DNA in art and artefacts. *Thermochimica Acta* 365: 141–146.
- Gamba, C., Jones, E. R., Teasdale, M. D., McLaughlin, R. L., Gonzalez-Forbes, G., Mattiangeli, V., ... Pinhasi, R.** 2014. Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nature Communications* 5: 5257.
- Gansauge, M. T and Meyer, M.** 2013. Single-stranded DNA library preparation for the sequencing of ancient or damaged DNA. *Nature Protocols* 8 (4): 737–748.
- Gilbert M. T. P. Tomsho, L. P., Rendulic, S., Packard, M., Drautz, D. I., Sher, A., ... Schuster, S.C.** 2007. Whole genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts. *Science* 317 (5846): 1927–1930.
- Gondek, A. T., Boessenkool, S. and Star, B.** 2018. A stainless-steel mortar, pestle and sleeve design for the efficient fragmentation of ancient bone. *BioTechniques* 64: 266–269.

- González Fortes, G. and Paijmans, J. L. A.** 2019. Whole-genome capture of ancient DNA using homemade baits, in *Ancient DNA: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, eds. B. Shapiro et al. (2nd ed.), 93–105. New York: Springer, Humana Press.
- Green, R. E., Krause, J., Briggs, A. W., Maricic T., Stenzel, U., ... Pääbo, S.** 2010. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328: 710–722.
- Dabney, J., Meyer, M. and Pääbo, S.** 2013. Ancient DNA damage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5: a012567.
- Damgaard, P. B., Margaryan, A., Schroeder, H., Orlando, L., Willerslev, E. and Al-
lentoft, M. E.** 2015. Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth. *Scientific Reports* 5: 11184.
- Eisenmann, S., Bánffy, E., van Dommelen, P., Hofmann, K. P., Maran, J., Lazaridis, I., ... Stockhammer, P.W.** 2018. Reconciling material cultures in archaeology with genetic data: the nomenclature of clusters emerging from archaeogenomic analysis. *Scientific reports* 8 (1): 13003.
- Elsner, J., Schibler, J., Hofreiter, M. and Schlumbaum, A.** 2015. Burial condition is the most important factor for mtDNA PCR amplification success in Palaeolithic equid remains from the Alpine foreland. *Archaeological and anthropological sciences* 7 (4): 505–515.
- Enk, J. M., Devault, A. M., Kuch, M., Murgha, Y. E., Rouillard, J. M. and Poinar, H. N.** 2014. Ancient whole genome enrichment using baits built from modern DNA, *Molecular Biology and Evolution* 31 (5): 1292–1294.
- Ermini, L., Olivieri, C., Rizzi, E., Corti, G., Bonna, R., Soares, P., ... Rollo, F.** 2008. Complete mitochondrial genome sequence of the Tyrolean Iceman. *Current Biology* 18: 1687–1693.
- Itan, Y., Powell, A., Beaumont, M. A., Burger, J., Thomas, M. G.** 2009. The origins of lactase persistence in Europe. *PLoS Computational Biology* 5 (8): e1000491.
- Jónsson, H., Ginolhac, A., Schubert, M., Johnson, P. L. F. and Orlando, L.** 2013. mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics* 29 (13): 1682–1684.
- Keyser-Tracqui, C., Crubezy, E., and Ludes, B.** 2003. Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *American Journal of Human Genetics* 73: 247–260.
- Kircher, M.** 2012. Analysis of high-throughput ancient DNA sequencing data, in *Ancient DNA: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, eds. B. Shapiro and M. Hofreiter. (1st ed.), 197–228. New York: Springer, Humana Press.
- Kivisild, T.** 2017. The study of human Y chromosome variation through ancient DNA. *Human genetics* 136 (5): 529–546.
- Knapp, M. and Hofreiter, M.** 2010. Next generation sequencing of ancient DNA: requirements, strategies and perspectives. *Genes*: 222–243.
- Knapp, M., Clarke, A. C., Horsburgh, K. A. and Matisoo-Smith, E. A.** 2012. Setting the stage – building and working in an ancient DNA laboratory. *Annals of Anatomy* 194: 3–6.

- Knipper, C., Mittnik, A., Massy, K., Kocumaka, C., Kucukkalipci, I., Maus, M., ... Stockhammer, P.W.** 2017. Female exogamy and gene pool diversification at the transition from the Final Neolithic to the Early Bronze Age in Central Europe. *Proceedings of the National Academy of Science USA Early Edition*, doi:10.1073/pnas.1706355114.
- Korlević, P. and Meyer, M.** 2019. Pretreatment: removing DNA contamination from ancient bones and teeth using sodium hypochlorite and phosphate, in *Ancient DNA: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, eds. B. Shapiro et al. (2nd ed.), 15–19. New York: Springer, Humana Press.
- Krause, J., Fu, Q., Good, J. M., Viola, B., Shunkov, M. V., Derevianko, A. P. and Pääbo, S.** 2010. The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia. *Nature* 464 (8): 894–897.
- Kuch, M. and Poinar, H.** 2012. Extraction of DNA from paleofeces, in: *Ancient DNA: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, eds. B. Shapiro and M. Hofreiter. (1st ed.), 37–42. New York: Springer, Humana Press.
- Lazaridis, I., Patterson, N., Mittnik, A., Renaud, G., Mallick, S., Kirsanow, K., ... Krause, J.** 2014. Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans. *Nature* 513 (7518): 409–413.
- Li, H. and Durbin, R.** 2011. Inference of human population history from individual whole-genome sequences. *Nature* 475: 493–497.
- Lindahl, T.** 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature* 362: 709–715.
- Llamas, B., Valverde, G., Fehren-Schmitz, L., Weyrich, L. S., Cooper, A. and Haak, W.** 2017. From the field to the laboratory: controlling DNA contamination in human ancient DNA research in the high-throughput sequencing era. *STAR: Science & Technology of Archaeological Research* 3:1, 1–14.
- Llorente, MG., Jones, E., Eriksson, A., Siska, V., Arthur, K., Arthur, J., ... Manica, A.** 2015. Ancient Ethiopian genome reveals extensive Eurasian admixture in Eastern Africa. *Science* 350 (6262): 820±2.
- Maričić, T., Whitten, M., and Pääbo, S.** 2010. Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS ONE* 5 (11): e14004.
- Mathieson, I., Alpaslan-Roodenberg, S., Posth, C., Szecsenyi-Nagy, A., Rohland, N. ... Riech, D.** 2018. The genomic history of southeastern Europe. *Nature* 555: 197–203.
- Mathieson, I., Lazaridis, I., Rohland, N., Mallick, S., Patterson, N., ... Reich, D.** 2015. Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians. *Nature* 528: 499–503.
- Metzker, M. L.** 2010. Sequencing technologies – the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11: 31–46.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335–350.
- O’Sullivan, N., Posth, C., Coia, V., Schuenemann, V. J., Douglas Price, T., Wahl, J., Pinhasi, R., Zink, A., Krause, J., Maixner, F.** 2018. Ancient genome-wide analyses infer kinship structure in an Early Medieval Alemannic graveyard. *Science Advances* 4: eaao1262, 1–8.

Orlando, L., Ginolhac, A., Zhang, G., Froese, D., Albrechtsen, A., Stiller, M., ... Willerslev, E. 2013. Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* 499: 74–78.

Pääbo, S. 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 86: 1939–1943.

Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Despres, V., Hebler, J., Rohland, N., ... Hofreiter, M. 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics* 38: 645–79.

Peltzer, A., Jager, G., Herbig, A., Seitz, A., Kniep, C., Krause, J. and Nieselt, K. 2016. EAGER: efficient ancient genome reconstruction. *Genome Biology* 17: 60.

Pinhasi, R., Fernandes, D., Sirak, K., Novak, M., Connell, S., Alpaslan-Roodenberg, S., ... Hofreiter, M. 2015. Optimal ancient DNA yields from the inner ear part of the human petrous bone. *PLoS ONE* 10 (6): e0129102.

Posth, C., Nakatsuka, N., Lazaridis, I., Skoglund, P., Mallick, S., ... Reich, D. 2018. Reconstructing the deep population history of Central and South America. *Cell* 175: 1185–1197.

Pruvost, M., Schwarz, R., Bessa Correia, V., Champlot, S., Braguier, S., More, N., ... Geigl, E.M. 2007. Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 104 (3), 739–744.

Rasmussen, M., Li, Y., Lindgreen, S., Pedersen, J. S., Albrechtsen, A., ... Willerslev, E. 2010. Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. *Nature* 463: 757–762.

Reich, D., Green, R. E., Kircher, M., Krause, J., Patterson, N., ... Pääbo, S. 2010. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova cave in Siberia. *Nature* 468: 1053–1060.

Renaud, G., Schubert, M., Sawyer, S. and Orlando, L. 2019. Authentication and assessment of contamination in ancient DNA, in *Ancient DNA: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, eds. B. Shapiro et al. (2nd ed.), 163–194. New York: Springer, Humana Press.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). *Biochemistry* 74 (12): 5463–5467.

Sirak, K. A., Fernandes, D. M., Cheronet, O., Novak, M., Gamarra, B., Balassa, T., ... Pinhasi, R. 2017. A minimally-invasive method for sampling human petrous bones from the cranial base for ancient DNA analysis. *BioTechniques* 62: 283–289.

Skoglund, P., Posth, C., Sirak, K., Spriggs, M., Valentin, F., Bedford, S., ... Reich, D. 2016. Genomic insights into the peopling of the Southwest Pacific. *Nature* 538 (7626): 510–513.

Skoglund, P., Stora, J., Gotherstrom, A., & Jakobsson, M. 2013. Accurate sex identification of ancient human remains using DNA shotgun sequencing. *Journal of Archaeological Science* 40: 4477e4482.

- Stoneking, M. and Krause, J.** 2011. Learning about human population history from ancient and modern genomes. *Nature* 12: 603–614.
- Tito R. Y., Knights D., Metcalf J., Obregon-Tito A. J., Cleeland L., ... Lewis Jr, C. M.** 2012. Insights from characterizing extinct human gut microbiomes. *PLoS ONE* 7 (12): e51146.
- Frieman, C. J. and Hofmann, D.** 2019. Present pasts in the archaeology of genetics, identity and migration in Europe: a critical essay. *World Archaeology*: 1–18.
- Fu, Q., Meyer, M., Gao, X., Stenzel, U., Burbano, H. A., Kelso, J., and Pääbo, S.** 2013. DNA analysis of an early modern human from Tianyuan Cave, China. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 110 (6): 2223–2227.
- Furholt, M.** 2018. Massive migrations? The impact of recent aDNA studies on our view of third millennium Europe. *European Journal of Archaeology* 21 (2): 159–191.
- Haak, W., Forster, P., Bramanti, B., Matsumura, S., Brandt, G., Tänzer, M., ... Burger, J.** 2005. Ancient DNA from the first European farmers in 7500-year-old Neolithic sites. *Science* 310 (5750): 1016–1018.
- Haak, W., Brandt, G., de Jong H. N., Meyer, C., Ganslmeier, R., Heyd, V., ... Alt, K. W.** 2008. Ancient DNA, strontium isotopes, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the Later Stone Age. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 18226–18231.
- Haak, W., Lazaridis, I., Patterson, N., Rohland, N., Mallick, S., ... Reich, D.** 2015. Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe. *Nature* 522: 207–211.
- Hansen, HB., Damgaard, PB., Margaryan, A., Stenderup, J., Lynnerup, N., Willerslev, E. and Allentoft, M. E.** 2017. Comparing ancient DNA preservation in petrous bone and tooth cementum. *PLoS ONE* 12 (1): e0170940.
- Hofmanová, Z., Kreutzer, S., Hellenthal, G., Sell, C., Diekmann, Y., ... Burger, J.** 2016. Early farmers from across Europe directly descended from Neolithic Aegeans. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 113 (25): 6886–689.
- Campos, P. F. and Gilbert, M. T. P.** 2019. DNA Extraction from Keratin and Chitin, in *Ancient DNA: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, eds. B. Shapiro et al. (2nd ed.), 57–63. New York: Springer, Humana Press.
- Yang, D. Y. and Watt, K.** 2005. Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis. *Journal of Archaeological Science* 32: 331–336.
- Wales, N. and Kistler, L.** 2019. Extraction of Ancient DNA from Plant Remains, in *Ancient DNA: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, eds. B. Shapiro et al. (2nd ed.), 45–55. New York: Springer, Humana Press.

Aleksandra Žegarac

Faculty of Philosophy, University of Belgrade

**ANCIENT DNA IN ARCHAEOLOGY:
FROM ARCHAEOLOGICAL EXCAVATION TO
LABORATORY ANALYSES**

Key words: *ancient DNA, DNA preservation, endogenous DNA, contamination, archaeological excavation, material storage, material for isolation of aDNA, NGS*

With the development of molecular methods, especially Next Generation Sequencing platforms, ancient DNA analyses have been integrated into archaeological analyses so as to help answer the questions about past populations. However, the extraction of ancient DNA (aDNA) from archaeological samples is a very challenging process as the amount of endogenous DNA is often very low due to several reasons. Firstly, aDNA is very badly preserved in samples, especially in warm and humid climates. Even in optimal conditions, such as caves and cold and dry environments, DNA is degraded to shorter fragments and chemically modified. Secondly, besides the DNA of interest, there is a huge amount of exogenous and microbial DNA in samples. And finally, contamination with modern DNA represents a constant threat to the authenticity of the analysis and could be introduced at any step of the analyses, either during excavation, museum storage or laboratory work. Since these methods are destructive and expensive, it is a duty of archaeologists, museum curators as well as biologists, to take certain steps to prevent further degradation of the material and possible contamination. One of the most essential steps is the use of gloves while handling samples. Moreover, samples should not be washed or chemically treated and they should be properly stored in a dry place, without fluctuations in temperature and moisture. The optimal storage and handling could greatly affect the amount of endogenous DNA in samples, which dictates further possibilities of analyses as well as the cost.

Researches so far have showed that the inner part of petrous bones yields the highest amount of endogenous DNA, as it is the densest bone in mammals and therefore more resistant to contamination. In the absence of petrous bones, other material such as teeth or hard, but not porous bones could be used as well. Conversion of bones into powder for DNA extraction has to be carried out in special facilities dedicated only to aDNA analysis to prevent contamination. With the development of NGS, it became possible to successfully determine very short and degraded sequences (characteristic for aDNA) even from very small amounts

of old and badly preserved samples and to significantly reduce the time of sequencing, as well as its cost. Whether the research includes sequencing of the whole genome at different sequencing depth or capturing specific sequences of the genome depends greatly on DNA preservation, research question and the cost. In addition, mitochondrial DNA and genetic markers on Y chromosome could be very informative of maternal and paternal genetic ancestry, respectively.

However, regardless of the research question, it is of the outermost importance that genetic data is observed in context, together with anthropological and archaeological data. It is only in this way that we can obtain reliable information about the past.