

# МОЛЕКУЛАРНА АНТРОПОЛОГИЈА: МОГУЋНОСТ ПРИМЕНЕ PCR-а

Биљана Чуљковић, Биолошки факултет, Београд,  
Софија Стефановић, Филозофски факултет, Београд и  
Станка Ромац, Биолошки факултет, Београд

Молекуларно генетичке анализе ДНК (дезоксирибонуклеинске киселине) изоловане из древних остатака представљају нову област истраживања, која укључује проучавање ДНК секвенци у циљу детерминације пола, реконструкције сродничких веза, популационо-генетичких анализа и различитих еволутивних аспеката. ДНК изолована из древних узорака означава се термином древна ДНК (дДНК). У Центру за примену и развој PCR-а (Биолошки факултет, Београд) урађене су до сада бројне анализе древне ДНК са различитих археолошких локалитета у Србији. Тако је нпр. извршена детерминација пола скелетних остатака инфанта са Лепенског Вира. Такође, код анализираних индивидуа са Лепенског Вира, процењена је учесталост алела четири аутозомална STR локуса и три STR локуса специфично везаних за Y-хромозом. Анализом аутозомалних и Y-везаних STR локуса могу се добити информације о генетичкој диференцијацији древних популација које су живеле у истом, односно различитом времену/простору.

Кључне речи: молекуларна антропологија, древна ДНК, сродничке везе, популационе анализе.

## Увод

Детекција органских компонената у древним остацима отворила је многа нова поља истраживања, а најзначајније откриће свакако је била могућност изоловања ДНК из фосилних и субфосилних остатака, биолошких трагова и музејских узорака. Изолацијом древне ДНК (дДНК, енгл.: "ancient DNA") омогућено је изучавање молекула који леже у основи еволуције живог света, у практично неограниченој временској скали.

Сазнање о очуваности једарних структура и нуклеинских киселина потиче још са почетка XX века када су ботаничари покушавали да "оживе" семена пронађена на различитим археолошким локалитетима,

након што су успешно показали постојање једарних елемената бојењем древног биљног материјала. Иако сасвим случајно, пионери хумане палеопатологије су добили сличне податке о једарном материјалу микроскопском анализом древних мумифицираних остатака.

Прву успешну екстракцију древне ДНК и РНК извршио је кинески тим истраживача радећи са постхумним остатцима "Old Lady of Mawangtui" (кинеска принцеза из Западне Хан династије), старих око 2000 година (Nunan Medical College 1980). Увођењем техника молекуларног клонирања започела је нова ера у изучавању древне ДНК. Прво успешно умножавање дДНК изоловане из животињског ткива објавили су Higuchi и сарадници 1984. године, а врло брзо затим је објављен рад о клонирању дДНК изоловане из египатских мумија (Раабо 1985). Нажалост, технике молекуларног клонирања захтевају велику количину изоловане ДНК из узорка који су добро очувани, што је био ограничавајући фактор у раду са њима.

Откриће ланчане реакције полимеразе (енгл.: "Polymerase Chain Reaction" – PCR) средином осамдесетих година (Saiki et al. 1985), довело је до великог пробоја у науци, а посебно у истраживању древне ДНК, пошто је за PCR довољна минимална количина ДНК<sup>1</sup>. Због тога је PCR постала метода избора за све истраживаче заинтересоване за изучавање прошлости на молекуларно биолошком нивоу, при чему је за изолацију дДНК довољна врло мала количина (неколико грама) древног материјала.

## Проблеми у раду са древном ДНК

Будући да на очуваност древног материјала утичу различити биохемијски и физичкохемијски фактори који су специфични за сваку врсту ткива, степен очуваности органских молекула је различит за сваки од њих. Велики број радова бави се проблемима који се тичу оштећења дДНК. Радијација (углавном UV), температура, влажност, рН, оксидативни агенси и механички утицаји су међу најзначајнијим факторима који могу деловати на очуваност дДНК током дијагенезе (Golenberg 1994). Иако разградња и нестајање ткива може бити успорено или чак прекинуто у врло раним стадијумима, древна ткива су увек мање или

---

<sup>1</sup> PCR је молекуларно биолошка техника којом је могуће умножити одређени сегмент ДНК више од милијарду пута употребом специфичних олигонуклеотида (прајмера) који ограничавају циљни фрагмент ДНК молекула и ензима ДНК полимеразе. Основни принцип PCR амплификације заправо представља имитацију репликације ДНК процеса који се нормално одиграва у свим живим организмима. За PCR реакцију је потребна таргет ДНК (једноланчна ДНК тј. денатурирани дуплекс ДНК) који се умножава, пар специфичних олигонуклеотида који ограничавају жељени фрагмент ДНК, нуклеотиди (градивни блокови ДНК молекула) и ензим (*Taq* полимеразе) који катализује уградњу нуклеотида по принципу комплементарности са матрицом (Ромац и др. 1999).

више деградирана и оштећена. Осим тога, ови узорци не потичу са стерилних места, већ из природне средине, а такође, као у случају узорака који се чувају у музејима, могу већ претходно бити у контакту са другим истраживачима. За анализу дДНК овакви услови могу бити узрок специфичних проблема.

- Контаминација савременом ДНК.– Будући да је PCR веома сензитивна метода, оваква контаминација је сасвим довољна за добијање лажно позитивних резултата. Адекватни претретман узорака пре саме процедуре екстракције дДНК смањује ризик од контаминације савременом ДНК. Такође, укључивање адекватних независних контролних узорака може потврдити порекло (аутентичност) испитиване ДНК, односно искључити могућност да амплификовани производи потичу од контаминације савременом ДНК.
- Просечна величина фрагмената дДНК обично није већа од неколико стотина базних парова (bp) због деградације ДНК услед деловања дијагенетских фактора (величина хуманог генома износи  $3 \times 10^9$  bp). Због тога у изолатима дДНК обично постоји врло мала количина целих секвенци које могу служити за PCR амплификацију, чак и у случају добро очуваних узорака.
- У изолатима дДНК могу се налазити и инхибиторне супстанце, које у PCR анализи могу довести до комплетне инхибиције *Taq* полимеразе, услед чега се могу добити лажно негативни резултати. Управо због тога је до сада обављено доста студија које се баве проблематиком пречишћавања дДНК из различитих узорака (Hagelberg 1994; Hanni et al. 1995; Yang et al. 1997; Yang et al. 1998; Bachmann et al. 2000).

### Анализа древне ДНК

Анализа дДНК даје могућност изучавања генетичког материјала древних организама у циљу добијања информације о индивидуалним карактеристикама, као и о популационо генетичким параметрима. Три најзначајнија питања од интереса у изучавању дДНК су:

1. Добијање генетичке информације на индивидуалном нивоу – добијање ових информација важно је у проучавању индивидуалних људских, животињских и биљних остатака с археолошких локалитета.
2. Добијање података на интрапопулационом нивоу – поређењем генетичких профила две или више индивидуа могу се утврдити њихове везе у смислу биолошке дистанце (сродничке везе).
3. Добијање генетичких информација на интерпопулационом нивоу – поређење генетичких профила различитих популација може омогућити одређивање генетичке дистанце између датих популација. На овај начин, анализа дДНК може пружити податке о миграцијама, генетичком мешању, величини древних популација, филогенетским везама и путевима ширења болести.

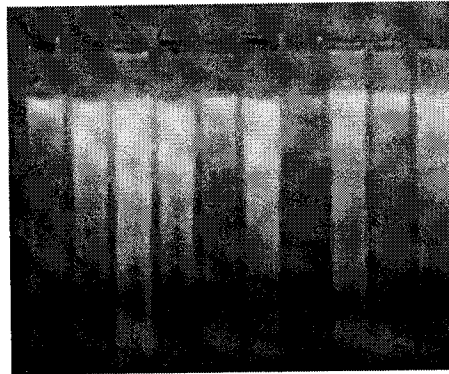
## Детерминација пола применом молекуларнобиолошких метода

У палеодемографским студијама веома су значајни подаци о разликама у морталитету мушкараца, жена и деце. Баш због тога, информације о полу одређене индивидуе су веома важне, али не могу увек бити добијене стандардном антрополошком анализом. Иако је антрополошка методологија утврђивања пола на основу скелетних остатака преко секундарних полних карактеристика развијена, постоје бројни случајеви када пол није могуће утврдити. Детерминација пола одраслих индивидуа, преко морфолошких и метричких параметара најчешће не представља проблем, међутим физичка антропологија нема поуздане методе за детерминацију пола оштећених и фрагментованих скелетних остатака, као и скелетних остатака индивидуа без изражених секундарних полних карактеристика и дечијих скелета. Осим у палеодемографији, подаци о полу индивидуе могу понекад бити веома важни и у појединачним археолошким контекстима. Информације о полу деце и индивидуа јувенилног узраста у древним популацијама такође имају палеодемографски значај. С обзиром на то да некрополе могу често садржати веома висок проценат скелета новорођенчади и индивидуа јувенилног узраста, детерминација пола ових индивидуа представља велик проблем у палеодемографији и сродним областима (Mays 1998). Врло често, на некрополама се поред појединачно сахрањених индивидуа, појављују и групе дислоцираних, често веома фрагментованих костију. Код фрагментованих скелета, пол углавном не може да се утврди, а у неким некрополама готово половина пронађених скелета припада групи дислоцираних костију. Будући да се некрополе готово никада у потпуности не истражују, антрополошки се анализира само део популације, а ако у оквиру тог дела није могуће добити податке о фрагментованим скелетима, јасно је за колико је умањен број палеодемографских података. Када стандардном антрополошком методологијом пол није могуће одредити, употребом молекуларно биолошких метода могуће је утврдити пол индивидуе, без обзира на њену археолошку старост (Чуљковић и др. 2000). PCR методом је могућа прецизна детерминација пола људских скелетних остатака различите археолошке старости, детекцијом репетитивних и уникалних секвенци специфичних за X и Y хромозом (Hummel and Hermann 1991; Faerman et al. 1995; Stone et al. 1996). Данас се све чешће примењују молекуларнобиолошке методе у детерминацији пола индивидуа сахрањених на локалитетима из разних периода (Colson et al. 1997).

До сада, најобимнији рад везан је за утврђивање пола код новорођенчади (инфаната) чији су скелети нађени у одводу испод купатила из римског периода у Асхкелону (Faerman and Bar-Gal 1998). Анализом древне ДНК изоловане из ових скелетних остатака утврђено је да је међу овим инфантима било много више дечака него девојчица. На

локалитету Лепенски вир пронађени су скелети новорођенчади сахрањене испод подова седамнаест кућа. Анализа скелетних остатака показала је да је већина новорођенчади била стара 38-40 недеља, што је узраст на самом рођењу (Stefanović and Borić, in press). Анализом гена за амелогенин из узорака ДНК изоловане из скелетних остатака инфаната са Лепенског вира, показано је да не постоји значајнија разлика у дистрибуцији полова (сл. 1).

В            1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Сл. 1. ДНК инфаната са Лепенског вира.            500 bp →

Fig. 1 DNA of infants from Lepenski Vir.            1500 bp →

Од 34 инфанта с овог локалитета, 22 припада мушком, а 12 женском полу (Šuljkić et al. in press). Наравно, с обзиром на процењену величину популације, сигурно да је ово само део инфаната који су умрли на Лепенском Виру. Пронађени инфанти су они који су изабрани да буду сахрањени испод подова кућа. На основу непостојања значајније разлике у дистрибуцији полова међу анализираним инфантима може се закључити да пол није представљао критеријум овог избора.

### Присуство патогених микроорганизама у древним остацима

Примена PCR методе у палеопатолошким студијама такође је веома значајна. На овај начин је могуће детектовати болести које не остављају трагове на костима, нпр. маларија, куга и колера (Roberts and Manchester 1995). Применом PCR-а до сада је детектован *Mycobacterium tuberculosis* у древним скелетним остацима и у узорку плућа мумије (Spigelman and Lemna 1993; Salo et al. 1994; Baron et al. 1996; Taylor et al. 1999). У раду Сало и сарадника је показано присуство туберкулозе у Јужној Америци у преколумбовској ери, односно пре контакта Новог света са Европом (Salo et al. 1994). Из узорака зубне пулле индивидуа из некрополе са краја XVI века у Француској, идентификована је бактерија *Yersinia pestis*

одговорна за сепсу. Такође је успешно детектована *Micobacterium leprae* из скелетних остатака (Rafi et al 1994) и *Trypanosoma cruzi* из узорака мумија старих 4000 година из северног Чилеа (Guhl et al. 1997). Исто тако, показано је присуство *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, који је узрочник сифилиса из скелетних остатака старих 200 година (Kolman et al. 1999). Анализом ДНК изоловане из музејских узорака крпеља, показано је постојање лајмске болести врло рано у Европи и у САД (Matuschka et al. 1996).

Употреба дДНК технологија за палеопатолошке студије је врло значајна не само због тога што омогућује праћење еволуције патогена, него и праћење миграција и еволуционих веза између популација.

### Сродничке везе и популационе анализе

За добијање генетичких информација из дДНК узорака до сада се највише користила анализа хиперваријабилног региона митохондријалне (мт) ДНК. У овом малом региону митохондријалног генома налази се релативно велики број полиморфизама секвенци (редослед нуклеотида у ДНК фрагменту). Велики број митохондрија по ћелији омогућава изоловање довољне количине мтДНК из древних узорака. Одсуство рекомбинације и унипарентални (углавном матернални) тип наслеђивања олакшава интерпретацију резултата у популационим и еволуционим студијама (Higuchi et al. 1987; Scholz and Pusch 1997). Један од важнијих радова у овој области везан је за анализу мтДНК изоловане из скелетних остатака неандерталца (Kriings et al. 1997). Неандерталци имају једно од значајнијих места у студијама еволуције човека, а њихова веза са прецима савремених људи није сасвим јасна. Резултати анализе неандерталске мтДНК указали су да се дивергенција неандерталаца десила пре 690.000-555.000 година, што је четири пута дужи временски период од процењене старости мтДНК заједничког претка савремене људске популације (150.000-120.000 година). Ови резултати такође указују на временски период од око 500.000 година независне еволуције неандерталаца и линије из које је еволуирао савремени човек. На основу ових резултата се такође могло закључити да није постојала размена мтДНК између неандерталаца и предака савремених људи, али се свакако не искључује могућност размене нуклеарних гена.

Углавном су студије на мтДНК из древних хуманих остатака ограничене на мали број узорака (Handt et al. 1994; Hauswirth et al. 1994; Kolman 1999; Kolman and Turross 2000). Анализом дДНК изоловане из скелетних остатака 3 индивидуе из Yety-Asar популације, показано је да се добијени хаплотипови мтДНК ових древних узорака могу наћи само међу савременом монголском популацијом, што је било у супротности са подацима морфолошких анализа скелета ове популације (Ovchinnikov et al. 1999).

Једна од студија која укључује већи број анализираних узорака је рад Oota и сарадника у коме је анализирано 58 узорака хуманих скелетних остатака са некрополе Yixi (Схандонг Провинција, Кина), старих око 2000 година (Oota et al. 1999). Анализом мтДНК утврђено је да је различитост унутар ове древне популације слична различитости уоченој у савременој популацији. Такође је показана већа генетичка сличност ове древне популације са модерном популацијом Таињан Хан Кинеза, у односу на савремену кинеску популацију.

С обзиром да се мтДНК код људи наслеђује преко мајке, анализа хиперваријабилних секвенци унутар мт генома може служити и за реконструкцију сродничких веза у ситуацијама када недостаје нека од генерација<sup>2</sup>.

### Анализа хиперваријабилних локуса геномске ДНК из древних узорака

Проналазак технологије генотипизације молекула ДНК засноване на генетичким анализама из веома малих узорака биолошког материјала (крв, длаке, пљувачка, семена течност, кожа, кости итд.) омогућује данас недвосмислену идентификацију особе која је тај биолошки материјал оставила (Jeffreys 1985). Анализа микросателитских или STR локуса (енгл.: "Short tandem repeat") постала је метода избора за анализу дДНК. Ови локуси показују високу полиморфност и наслеђују се по Менделовом типу наслеђивања, због чега су постали изузетно применљиви у хуманој идентификацији, реконструисању генеолошких стабала, популационој генетици, анализама везаности итд. Анализом STR локуса ДНК изоловане из скелетних остатака могуће је добити генетичке податке о некој индивидуи, али такође и генетичку структуру неке древне популације. Поред тога ове анализе могу помоћи у закључивању о евентуалним сродничким односима између особа чији су скелетни остаци анализирани (Schmerer et al. 1999; Burger et al. 1999).

Морфолошке сличности, за које није познат начин наслеђивања, као што су епигенетске (неметричке) варијације скелета, метрички параметри и карактеристике зуба до сада су биле једини начин за процену евентуалних сродничких веза. Због фенотипског карактера тих особина, резултати ових анализа нису поуздани. Међутим, сродност и сродничке

<sup>2</sup> Интересантан је случај Kasper Hauser-а, који се појавио у Нирнбергу 1828. и за кога се сумњало да је син грофа Carl von Baden-а и његове супруге Stephanie de Beauharnais, усвојене ћерке Наполеона Бонапарте. Weichhold и сарадници (1998) су анализом ДНК изоловане из мрља крви са његове одеће (која је чувана након његовог убиства 1833. прво у суду, а након тога у музеју), и ДНК изоловане из крви два жива рођака са женске линије Stephanie de Beauharnais, утврдили Kasper Hauser није син Stephanie de Beauharnais, односно Принц од Бадена.

везе се данас могу поуздано проценити анализом генетичких варијација између индивидуа на нивоу ДНК. Типизација већег броја полиморфних локуса је постала поред осталог, врло применљива за реконструкцију генеолошких стабала и анализу интрапопулационе структуре у смислу сродничких веза између индивидуа дате популације, што је један од веома важних елемената који могу допринети расветљавању историје древних популација. Управо висок степен полиморфизма ових локуса и висока хетерозиготност, фаворизују употребу STR локуса уместо анализе мтДНК за структурне анализе малих популација (Zierdt et al. 1996). Захваљујући могућностима примене PCR методе у анализи дДНК, истраживања у циљу хумане идентификације и одређивања сродничких веза вршена су у случају идентификације Josef Mengele-a (Jeffreys et al. 1992) и породице Романов (Gill et al. 1994). Наведени радови су се ипак бавили анализом узорака чија је старост била свега неколико деценија, али је у другим радовима показана могућност изоловања и анализе геномске ДНК из хуманих остатака старих и до неколико хиљада година (Hummel and Hermann 1991; Lawlor et. al 1991; Kurosaki et. al 1993; Woodward et al. 1994; Beraud-Colomb et al. 1995). Ипак, за сада је у у свим радовима анализиран веома мали број узорака.

Са довољним бројем анализираних локуса могуће је реконструисати генеолошка стабла (Chakraborty and Jin 1993), а утврђивање сродничких односа између индивидуа нађених у древним породичним и масовним гробницама, као и некрополама, може бити потпомогнуто такође и подацима о полу, годинама и археолошким подацима при дефинитивном закључивању. Такав пример је идентификација скелетних остатака и сродничких веза осам индивидуа сахрањених у гробници цркве Ст. Маргарета у Баварској, Немачка, за коју је познато да је била породична гробница Грофова од Konigsfeld-a у периоду 1546-1749. године (Hummel et al. 1999). Полиморфни локуси везани за Y хромозом, због искључиво патерналног начина наслеђивања и одсуства рекомбинације у одређеним секвенцама, од посебног су интереса за антрополошке, археолошке, форензичке, генетичке и демографске студије. (Kayser et al. 1997) Посебна предност примене Y везаних генских локуса у популационим струдијама лежи у чињеници да се хаплотипови Y хромозома наслеђују без рекомбинације, те је могуће пратити дугачке предачко-потомачке линије у људским популацијама. Анализе Y везаних STR маркера користе се у популационој генетици за праћење миграције мушкараца и процену популационе разноликости, а такође у судској медицини за хуману идентификацију и одређивање сродничких веза (Knijff et al. 1997). Као и у случају мтДНК, анализа Y везаних STR локуса је од великог значаја за утврђивање сродничких веза када узорци особа из неколико генерација недостају, тако да се преко мтДНК може пратити материнска линија (Weichhold et al. 1998), а преко Y хромозом везаних локуса може



се пратити наслеђивање мушке линије (Abbey 1999). Такође се анализом Y везаних STR локуса могу пратити миграције и генетичке сродности хуманих популација.

Анализа Y везаног STR локуса DYS19 извршена је на узорцима скелета инфаната са Лепенског Вира, за које је претходно утврђено да су мушког пола (Чуљковић 2000). Од 22 испитана узорка 17 поседује алел 16, што чини 77,3% свих испитаних инфаната. Овако висока учесталост једног алела може указивати на већи степен сродстава међу овим индивидуама. Чињеница да су неки од инфаната сахрањени испод пода исте куће (четири инфанта испод куће 27, Гроб 128, 129, 130 и 131 и два инфанта испод пода куће 37, Гроб 132 и 133) јесте одређена индикација да би се могло радити о потомцима исте линије. Таква ситуација доприноси већој учесталости овог алела, односно смањеној варијабилности овог генског локуса међу анализираним узорцима. Алел 13 је нађен код 1 индивидуе (4,54%), алел 14 код 3 индивидуе (13,6%) и алел 15 код 1 индивидуе (4,54%). Смањена варијабилности DYS19 локуса у испитаном делу популације Лепенског вира може се генерално везати за смањен број миграција међу праисторијским популацијама, као и за значајан ефекат генетичког дрефта у малим локалним популацијама. Много значајнији проток гена у новијој историји људске врсте одражава се у много већој варијабилности Y хаплотипова у савременој популацији (Santos 1996; Knijff et al. 1997; Kayser et al. 1997; Oota et al. 1999; Hammer et al. 2000).

## Закључак

Изоловања древне ДНК из скелетних остатака пружа могућност провере неких старих информација али што је далеко значајније, добијање потпуно нових информација. Генетичке информације на индивидуалном, интрапопулационом и интерпопулационом нивоу, свакако ће у будућности моћи да пруже значајан допринос не само антрополошким него и археолошким студијама. Поузданост детерминације пола молекуларно биолошким методама је веома значајна за анализу древних популација. Иако у већини студија није пронађена разлика између резултата ДНК анализа и антрополошких података (Ovchinnikov et al. 1998) неки аутори констатовали су неконзистентност између резултата добијених молекуларно биолошким и антрополошким анализама (Gotherstrom et al. 1997). Аутори сугеришу да је ова разлика вероватно резултат примене антрополошких стандарда који су засновани на полном диморфизму рецентних популација. С обзиром на висок биолошки варијабилитет популација, може се очекивати да се полни диморфизам људи мењао током времена, односно да се праисторијске, античке, средњовековне и савремене популације могу разликовати и по свом полном диморфизму, у зависности од тога где су живеле, када су живеле и на који начин су живеле. Широм употребом молекуларно биолошких метода за

утврђивање пола код древних популација, сигурно ће се у будућности јасније моћи пратити полни диморфизам, и тиме свакако побољшати и стандардни антрополошки методи за утврђивање пола. Свакако, значај детерминације пола код фрагментованих и дечијих скелета је веома велик, будући да физичка антропологија не може да реши ове проблеме.

Обећавајућа је употреба дДНК технологија за изучавање хуманих патогена, јер се могу добити подаци о еволуцији патогена, али и о миграцији и еволуционим везама између популација (Kolman 1999). С обзиром на то да су *subspecies* полиморфизми и полиморфизми између сојева већ детектовани за многе патогене који се брзо шире (Centurion-Lara et al. 1998), за болести које су се релативно скорије појавиле анализе древних узорака из различитих географских региона могу бити алтернативни начин за детерминацију оригиналних сојева патогена и еволуције група болести које нису значајно дивергирале (Kolmann 1999).

Генетичке дистанце мерене на основу анализе учесталости микросателитских локуса могу се користити за добијање одговора на питања популационе структуре и дивергенције. Анализом довољног броја микросателитских локуса и довољног броја индивидуа у оквиру различитих популација могу се добити подаци о генетичким, односно предачко-потомачким односима између древних популација, као и између древних и савремених популација. Поређење генетичких структура древних популација могло би заједно са археолошким, историографским, лингвистичким и подацима физичке антропологије помоћи у реконструисању историје популација, на основу закључивања о процесима миграције и мешања између географски блиских популација које су живеле у једном времену или у сукцесивним временским периодима. Процена учесталости алела STR локуса може бити исто тако значајна као и анализа мтДНК у давању одговора на еволуциона питања и реконструкцији популационих историја, као што су миграције и проток гена између популација (Hauswirth et al. 1994).

## БИБЛИОГРАФИЈА

- Abbey, D. 1999 The Thomas Jefferson Paternity Case, *Nature* 397: 32.
- Bachmann, L., Scholz, M., Broghammer, M., Giddings and Pusch, C. M. 2000 Voltage Induced Release of Nucleic Acids from Palaeontological Samples, *Electrophoresis* 21: 1488-1492.
- Baron, H., Hummel, S. and Herrmann, B. 1996 Mycobacterium Tuberculosis Complex DNA in Ancient Human Bones, *Journal of Archaeological Science* 23: 667-671.
- Beraud-Colomb, E., Roubin, R., Martin, J., Maroc, N., Gardeisen, A., Trabuchet, G. and Goossens, M. 1995 Human Beta Globin Gene Polymorphisms Characterized in DNA Extracted from Ancient Bones 12,000 Years Old, *American Journal of Human Genetic* 57: 1267-1274.

- Burger, J., Hummel, S., Herrmann, B. and Henke, W. 1999 DNA Preservation: a Microsatellite-DNA Study on Ancient Skeletal Remains, *Electrophoresis* 20: 1722-1728.
- Chakraborty, R. and Jin, L. 1993 Determination of Relatedness Between Individuals Using DNA Fingerprinting, *Human Biology* 65: 875-895.
- Centurion-Lara, A., Castillo, R., Shaffer, J. M., Van Voorhis, W. W. and Lukehart, S.A. 1998 The Flanking Region Sequences of the 15kDa Lipoprotein Gene Differentiate Pathogenic Treponemes, *Journal of Infection Diseases* 177: 1036-1040.
- Colson, I. B., Richards, M. B., Bailey, J. F., Sykes, B. C. and Hedges, R. E. M. 1997 DNA Analysis of Seven Human Skeletons Excavated from the Terp of Wijnaldum, *Journal of Archaeological Science* 24: 911-17.
- Čuljković, B. 2000 *Молекуларна археологија: Компаративна анализа геномске ДНК из костију људског порекла са различитих археолошких локалитета у Србији*, Doktorska disertacija, Биолошки факултет у Београду.
- Чуљковић, Б., Стефановић, С., Ромац, С. у штампи Могућност употребе PCR-а у физичкој антропологији – утврђивање пола, *Српски антрополошки гласник*.
- Čuljković, B., Stefanović, S. and Romac, S. in press DNA-based Sex Identification of the Infant Remains from Lepenski Vir, in *Iron Gates in Prehistory*, ed. C. Bonsall, Oxford.
- Golenberg, E.M. 1994 DNA From Plant Compression Fossils, in *Ancient DNA*, eds. B. Herrmann and S. Hummel, New York.
- Faerman, M., Filon, D., Kahila, G., Greenblatt, CL., Smith, P. and Oppenheim, A. 1995 Sex Identification of Archaeological Human Remains Based on Amplification of the X and Y Amelogenin Alleles, *Gene* 167: 327-332.
- Faerman, M. and Bar-Gal, K. B. 1998 Determining the Sex of Infanticide Victims from the Late Roman Era Through Ancient DNA Analysis, *Journal of Archeological Science* 25: 861-865.
- Fraser, C. M., Norris, S. J. and Weinstock, G. M. 1998 Complete Genome Sequences of *Treponema Pallidum*, the Syphilis Spirochete, *Science* 281: 375-388.
- Gill, P., Ivanov, P., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., Evett, I., Hagelberg, E. and Sullivan, K. 1994 Identification of the Remains of the Romanov Family by DNA Analysis, *Nature Genetics* 6: 130-135.
- Gotherstrom, A., Liden, K., Ahlstrom, T., Kallersjo, M. and Brown, T. A. 1997 Osteology, DNA and Sex Identification: Molecular and Morphological Sex Identifications of Five Neolithic Individuals from Ajvide, Gotland, *International Journal of Osteoarchaeology* 7: 71-81.
- Guhl, F., Jaramilla, C., Yockteng, R., Vellejo, G. A. and Cardenas-Arroyo, F. 1997 Isolation of *Trypanosoma Cruzi* DNA in 4,000-year-old Mummified Human Tissue from Northern Chile, *American Journal of Physical Anthropology* 108: 401-407.
- Hagelberg, E. 1994 Dried Samples: Hard Tissues: Mitochondrial DNA from Ancient Bones, in *Ancient DNA*, eds. B. Herrmann and S. Hummel, New York.
- Handt, O., Richards, M., Trommsdorff, C. and Kilger, A. 1994 Molecular Genetic Analyses of the Tyrolean Ice Man, *Science* 264: 1775-1778.
- Hanni, C., Brousseau, T., Laudet, V. and Stehelin, D. 1995 Isopropanol Precipitations Removes PCR Inhibitors from Ancient Bone Extracts, *Nucleic Acids Research* 23: 881-882.

- Hauswirth, W.W., Dickel, C.D. and Lawlor, D.A. 1994 DNA Analysis of the Windover Population, in *Ancient DNA*, eds. B. Herrmann and S. Hummel, New York, 152-158.
- Higuchi, R. G., Wrischnic, L. A., Oakes, E., George, M., Tong, B. and Wilson, A.C. 1987 Mitochondrial DNA of the Extinct Quagga: Relatedness and Extent of Postmortem Change, *Journal of molecular evolution* 25: 283-287.
- Hummel, S. and Herrmann, B. 1991 Y-chromosome-specific DNA Amplified in Ancient Human Bones. *Naturwissenschaften* 78: 266-67.
- Hummel, S., Schultes, T., Bramanti, B. and Herrmann, B. 1999 Ancient DNA Profiling by Megaplex Amplifications, *Electrophoresis* 20: 1717-1722.
- Hunan Medical College 1980 Study of an Ancient Cadaver in Mawangtui Tomb No1 of the Han Dynasty in Changsha, Beijing, *Ancient memorial Press* 1 : 184-187.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L. 1985 Individual-specific 'fingerprints' of Human DNA, *Nature* 316: 76-79.
- Jeffreys, A. J., Allen, M. J., Hagelberg, E. and Sonnberg, A. 1992 Identification of the Skeletal Remains of Josef Mengele by DNA Analysis, *Forensic Science International* 56: 65-76.
- Kayser, M. et al. 1997 Evaluation of Y-chromosomal STRs: a Multicenter Study, *International Journal of Legal Medicine* 110: 125-133.
- Knijff, P. et al. 1997 Chromosome Y Microsatellites: Population Genetic and Evolutionary Aspects, *International Journal of Legal Medicine* 110: 134-140.
- Kolman, C. J. 1999 Molecular Anthropology: Progress and Perspectives on Ancient DNA Technology, in *Genomic diversity: Applications in human population diversity*, eds. M. Papiha, S. Deka and D. Chakraborty, New York.
- Kolman, J., Centurion-Lara, A., Lukehart, S.A., Owsley, D. W. and Tuross, N. 1999 Identification of *Treponema Pallidum* Subspecies *Pallidum* in 200-year-old Skeletal Specimen, *Journal of Infection Diseases* 180: 2060-2063.
- Kolman, J. and Tuross, N. 2000 Ancient DNA Analysis of Human Populations, *American Journal of Physical Anthropology* 111: 5-23.
- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R.W., Kraintzki, H., Stoneking, M. and Paabo, S. 1997 Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans, *Cell* 90: 19-30.
- Kurosaki, K., Matsushita, T. and Ueda, S. 1993 Individual DNA Identification from Ancient Human Remains, *American Journal of Human Genetic* 53: 638-643.
- Lawlor, D.A., Dickel, C.D., Hauswirth, W.W. and Parham, P. 1991 Ancient HLA from 7500 Year Old Archeological Remains, *Nature* 349: 785-788.
- Matuschka, F.R., Ohlenbusch, A., Eiffert, H., Richter, D. and Spielman, A. 1996 Characteristics of Lyme Disease Spirochetes in Archived European Ticks, *Journal of Infection Diseases* 174: 424-426.
- Mays, S. 1998 *The Archaeology of Human Bones*, London.
- Oota, H., Saitou, N., Matsushita, T. and Ueda, S. 1999 Molecular Genetic Analysis of Remains of a 2,000-year-old Human Population in China – and its Relevance for the Origin of the Modern Japanese Population, *American Journal of Human Genetic* 64: 250-258.
- Ovchinnikov, I. V., Ovchinnikova, O.I., Druzina, E.B., Buzhilova, A.P. and Makarov, N.A. 1998 Molecular Genetic Sex Determination of Medieval Human Remains from North Russia: Comparison with Archaeological and Anthropological Criteria, *Anthropology* 56: 7-15.

- Ovchinnikov, I. V., Buzhilova, A. P., Mednikova, M., Goodwin, W. and Curry, G. 1999 Ethnic Affinities of the Ancient Human Jety Asar Population by Mitochondrial DNA Analysis, *Electrophoresis* 20: 1729-1732.
- Paabo, S. 1985 Molecular Cloning of Ancient Egyptian Mummy DNA. *Nature* 314: 644-645.
- Rafi, A., Spigelman, M., Stanford, J., Lemma, E., Donoghue, H. and Zias, J. 1994 Mycobacterium Leprae DNA from Ancient Bone Detected by PCR, *Lancet* 343: 1360-1361.
- Roberts, C. and Manchester, K. 1995 *The Archaeology of Disease*, New York.
- Romac, S., Vukosavić, S., Stojković, O. i Čuljković, B. 1999 *PCR u Kliničkoj dijagnostici*, Beograd.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. 1985 Enzymatic Amplification of B-globulin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia, *Science* 230: 1350-1354.
- Santos, F. R., Gerelsaikhani, T., Munkhtuja, B., Oyunsuren, T., Epplen, J. T. and Pena, S.D.J. 1996 Geographic Differences in the Allelic Frequencies of the Human Y-linked Tetranucleotide Polymorphism DYS19, *Human Genetics* 97: 309-313.
- Schmerer, W. M., Hummel, S. and Herrmann, B. 1999 Optimized DNA Extraction to Improve Reproducibility of Short Tandem Repeat Genotyping with Highlydegraded DNA as Target, *Electrophoresis* 20: 1712-1716.
- Scholz, M. and Pusch, C. 1997 An Efficient Isolation Method for High-quality DNA from Ancient Bones, *Technical Tips Online*, <http://www.elsevier.com/locate/tto> TO 1045.
- Spigelman, M. and Lemma, E. 1993 The Use of the Polymerase Chain Reaction (PCR) to Detect Mycobacterium Tuberculosis in Ancient Skeletons, *International Journal of Osteoarchaeology* 3: 137-143.
- Stefanović, S. and Borić, D., in press New-born Infant Burials Underneath House Floors at Lepenski Vir: in Pursuit of Contextual Meanings, in *Iron Gates in prehistory*, ed. C. Bonsall, Oxford.
- Stone, A. C., Milner, G. R., Pääbo, S. and Stoneking, M. 1996 Sex Determination of Ancient Human Skeletons using DNA, *American Journal of Physical Anthropology* 99: 231-238.
- Taylor, G. M., Sherwin, W. B. and Wayne, R.K. 1999 Genotypic Analysis of Mycobacterium Tuberculosis from Medieval Human Remains, *Microbiology* 145: 899-904.
- Weichhold, G. M, Bark, J. E., Korte, W., Eisenmenger, W. and Sullivan, K. M. 1998 DNA Analysis in the Case of Kaspar Hauser, *International Journal of Legal Medicine* 111: 287-291.
- Woodward, S. R., King, M. J. and Chiu, N. M. 1994 Amplification of Ancient Nuclear DNA From Teeth and Soft Tissues, *PCR Methods and Applications* 3: 244-247.
- Yang, H., Golenberg, E.M. and Shoshani, J. 1997 A Blind Testing Design for Authenticating Ancient DNA Sequences, *Molecular Phylogenetic Evolution* 7: 261-265.
- Yang, D. Y., Golenberg, E. and Shoshani, J. 1998 Technical Note: Improved DNA Extraction from Ancient Bone Using Silica-based Columns, *American Journal of Physical Anthropology* 105: 539-543.
- Zierdt, H., Hummel, S. and Herrmann, B. 1996 Amplification of Human Short Tandem Repeats from Medieval Teeth and Bone Samples, *Human Biology* 68: 185-199.

BILJANA ČULJKOVIĆ, SOFIJA STEFANOVIĆ and STANKA ROMAC

MOLECULAR ANTHROPOLOGY: POSSIBLE APPLICATION OF PCR

Summary

The molecular genetic analyzes of DNA isolated from ancient remains is an exciting research field, which includes the investigation of DNA sequences for the purpose of sex determination, reconstruction of kinship and evolutionary aspects. The development of the polymerase chain reaction (PCR) has allowed extremely small amounts of highly degraded DNA to be analysed.

The anthropological criteria of sex determination are based on qualitative assessment of the morphological features of the skull, long bones and pelvis. The problem of sex determination remains in dealing with fragmentary and/or children and infant skeleton. New developments in molecular biology, and especially in analysing DNA recovered from ancient bones, have provided reliable methods for sex determination based on amplification of DNA sequences specific to the X and/or Y chromosomes.

In the PCR Center in the Belgrade Faculty of Biology we have established most efficient method for aDNA isolation. Purified aDNA was used for specific amplification of single copy nuclear genes, regardless of archaeological age of samples. It was shown that maximal length of amplified fragments was 400 bp, and this length was limited by the rate of chemical modification of samples more than by the grade of degradation and age of samples. A lot of samples were analysed in the PCR Center, for example, it was performed sex determination of infants skeletal remains from prehistoric sites Lepenski Vir. From this site, also was analyzed allelic frequencies for three STR loci specifically linked to Y chromosome. Analyses of autosomal and Y-linked STR loci could reveal data about genetical differentiation of ancient populations that lived in the same or in a different time and area.

12. 04. 2001.