

HENRYK W. WITAS

KOPALNY DNA ŹRÓDŁEM INFORMACJI W BADANIACH
ARCHEOLOGICZNYCH¹

WSTĘP

Szczątki organizmów są przedmiotem badań przedstawicieli co najmniej kilku dyscyplin nauki, w tym od niedawna biologów molekularnych. Wraz z pierwszymi próbami badania DNA wyizolowanego z materiału kopalnego narodziła się zupełnie nowa gałąź nauki, przez niektórych określana jako archeologia molekularna. Informacja zawarta w kopalnym DNA stanowi nie tylko cenne uzupełnienie danych antropologicznych, archeologicznych i paleontologicznych, ale niejednokrotnie jest jedynym sposobem ich zdobycia.

Badanie kopalnego DNA (ancient DNA — aDNA, fossil DNA) musi frapować wszystkich, którzy choćby raz zetknęli się z metodą odtworzenia cech żyjącego w przeszłości organizmu poprzez analizę sekwencji nukleotydów. Struktura chemiczna cząsteczki przekazywanej w łańcuchu pokoleń jest chroniona *in vivo* przed modyfikacją chemiczną za sprawą procesów naprawy (nieobecnych w organellach komórkowych). Natomiast wraz ze śmiercią komórki rozpoczyna się gwałtowna degradacja cząsteczki matrycy zarówno pod wpływem czynników endogennych, jak i egzogennych. Tym samym dostęp do autentycznej informacji (występującej przyżyciowo) staje się utrudniony i należy podjąć określone działania podczas izolowania i analizy kopalnego DNA oraz interpretacji uzyskanych wyników, aby ustalić tzw. autentyczną strukturę pierwszorzędową.

W ciągu dwóch ostatnich dekad ulepszane metody badawcze umożliwiają coraz szerszy dostęp do danych, tak niedawno jeszcze zupełnie nieosiągalnych. W ostatniej części artykułu podano szereg przykładów wykorzystania analizy kopalnego DNA, które ilustrują różne jej zastosowanie.

¹ Praca została przygotowana w ramach projektu badawczego MNiSW nr N 303 003 31/0186.

HISTORIA BADAŃ KOPALNEGO DNA

Russ Higuchi w 1984 r. jako pierwszy podjął wyzwanie (R. Higuchi i in. 1984)². Wyizolował fragmenty matrycy DNA kwagi (*Equus quagga quagga*), muzealnego okazu reprezentującego gatunek wymarły pod koniec XIX w., a wyniki analizy wykorzystał do identyfikacji filogenetycznej zwierzęcia. Rok później S. Pääbo (1985) opublikował wynik sekwencjonowania fragmentu DNA o długości 3 400 pz (par zasad) wyizolowanego wcześniej z mumii chłopca egipskiego liczącej sobie około 2400 lat.

Pod koniec lat osiemdziesiątych XX w. wydawało się, że silnie pofragmentowany, zdegradowany chemicznie, sieciujący z białkami oraz wymieszany z cząsteczkami DNA bakterii i grzybów kopalny kwas nukleinowy trudno będzie klonować na większą skalę za pośrednictwem bakterii, jedyną dostępną wtedy metodą jego namnażania.

Warto podkreślić w tym miejscu, że obydwie wspomniane wyżej prace zostały opublikowane mniej więcej wtedy, kiedy Kary Mullis podejmował pierwsze próby namnażania fragmentów DNA *in vitro*. Niedługo potem opisano szczegóły metody (R.K. Saiki i in. 1985; K.B. Mullis, F. Faloona 1987), a w 1993 r. K. Mullis otrzymał nagrodę Nobla.

Czułość i wydajność łańcuchowej reakcji polimerazy (Polymerase Chain Reaction, PCR), dzięki której możliwe jest otrzymanie milionów kopii tylko określonego (wybranego, zaznaczonego) fragmentu DNA, a nie całej cząsteczki jak to ma miejsce podczas replikacji w komórce, jest jednocześnie jej zaletą i wadą. Powielaniu bowiem podlegają także wszelkie zanieczyszczenia egzogenne DNA znajdujące się w próbce. Niemniej jednak zastosowanie metody PCR stało się kamieniem milowym w badaniach kopalnego DNA, i dzisiaj, po kolejnych jej modyfikacjach, trudno sobie wyobrazić analizę molekularną materiału historycznego bez wcześniejszego jej zastosowania.

Wkrótce wielu badaczy zaczęło izolować i charakteryzować kopalne matryce ludzkie, zwierzęce, roślinne i bakteryjne. Początkowo muzea traktowane były jak magazyny kopalnego materiału do badań. Jednak po wielu latach doświadczeń okazało się, że istnieją znacznie bogatsze jego zasoby (wyjaśnienie poniżej). Wraz z rosnącą lawinowo liczbą publikacji pojawiły się pierwsze krytyczne uwagi poddające w wątpliwość autentyczność uzyskiwanych wyników. Obecnie kwestionowane lub wręcz dyskredytowane są wyniki wielu prac z tamtego okresu, które dowodziły obecności namnażalnych fragmentów DNA, szczególnie w materiale sprzed milionów lat, np. w halofitycznych bakteriach sprzed 250 mln lat

² Według zasady stosowanej w „Archeologii Polski” w tekście, w odnośnicach do literatury powinni być wymienieni wszyscy autorzy danej pozycji bibliograficznej zgodnie z zapisem w *Wykazie cytowanej literatury*. Ponieważ w niniejszym artykule Autor odwołuje się do wielu prac opublikowanych przez dość liczne zespoły badaczy, odstępujemy wyjątkowo od tej zasady, by nie przerywać toku wykładu długimi wstawkami bibliograficznymi. W przypadku prac jednego lub dwóch autorów podajemy ich nazwiska, natomiast przy cytowaniu artykułów opracowanych przez trzech i więcej (do trzydziestu) badaczy odnośniki ograniczamy do wymienienia nazwiska pierwszego z nich, a nazwiska pozostałych zastępujemy określeniem „i in.”. Dwukrotnie H.W. Witas powołuje się na artykuły opracowane przez ponad trzydziestu autorów; wówczas — zarówno w tekście, jak i w *Wykazie cytowanej literatury* — po wymienieniu pierwszego nazwiska stosowany jest skrót „i współ.” (przyp. Redakcji).

(R.H. Vreeland i in. 2000), a nawet 400–600 mln lat (E. Willerslev i in. 2004a), w kościach dinozaurów (S.R. Woodward i in. 1994), w owadach zachowanych w bursztynie (R.J. Cano i in. 1992) lub roślinach (P.S. Soltis i in. 1992). Przedstawiane wyniki, często nieweryfikowalne (J.J. Austin i in. 1997a), były niejednokrotnie tylko obrazem egzogenego DNA zanieczyszczającego próbę (G.I. Gutiérrez, A. Marín 1998). Publikowano dane, których wartość budzi do dzisiaj wątpliwości, ponieważ autorzy nie stosowali wszystkich wymaganych rygorów analitycznych lub nie potwierdzali wyników, przeprowadzając izolowanie i drugą analizę równoległe (G.J. Adcock i in. 2001; A. Cooper i in. 2001).

Wśród przyczyn powstawania błędów wskazywanych od początku badań była chemiczna degradacja DNA (T. Lindahl 1993; M. Höss i in. 1996) zniekształcająca strukturę pierwszorzędową cząsteczki, modyfikacje podczas enzymatycznego namnażania kopalnych matryc, a przede wszystkim brak kontroli jakościowej i ilościowej nad wszechobecnym egzogenym DNA.

Fakt istnienia postępującej degradacji DNA *post mortem* spowodował, że pionierzy dziedziny wybierali początkowo cząsteczki genomu mitochondrialnego (mtDNA), znacznie liczniej występujące niż cząsteczki genomu jądrowego (nuDNA). Liczba matryc mtDNA, setki razy większa w komórce, znacznie zwiększa szansę wyizolowania jego namnażalnych fragmentów.

Pomimo szeregu niepowodzeń (zakwestionowane zostały również wyniki pierwszych dwóch prac — R. Higuchi i in. 1984 oraz S. Pääbo 1985), archeologia molekularna rozwija się intensywnie, a to dzięki poznawaniu dalszych szczegółów mechanizmu degradacji, dróg rozprzestrzeniania się zanieczyszczeń i możliwości ich kontrolowania. Trwa także ulepszanie metod izolowania i analizy aDNA. Niemożliwe do niedawna stają się wykonalne wraz z pojawianiem się nowych narzędzi badawczych. Przykładem niech będzie sekwencjonowanie genomów gatunków wymarłych, mitochondrialnego (E.I. Rogaev i in. 2006) i jądrowego (J.P. Noonan i in. 2006; R.E. Green i in. 2006).

PRZEWIDYWANIE CZASU PRZETRWANIA I STANU ZACHOWANIA MATRYCY DNA. WSTĘPNA OCENA STOPNIA DEGRADACJI KOPALNEGO DNA

Wiele laboratoriów zmierzyło się z zagadnieniem degradacji DNA i oceną namnażalnej liczby jego cząsteczek w badanej próbce, co dzisiaj realizowane jest za pośrednictwem metody namnażania w czasie rzeczywistym (Real Time PCR). Wiadomo, że różne właściwości środowiska decydują o różnym stopniu degradacji, a w konsekwencji różnym czasie przetrwania namnażalnych fragmentów DNA. Według poszczególnych autorów granica przetrwania, którą wyznacza fizyczne otoczenie próby archeologicznej, może wahać się od 40 tys. do 1 mln lat (S. Pääbo, A.C. Wilson 1991; H.N. Poinar i in. 1996; J.J. Austin i in. 1997a; J.J. Austin i in. 1997b; M. Hofreiter i in. 2001a; C.I. Smith i in. 2001; E. Willerslev i in. 2004a; E. Willerslev i in. 2004b; S. Pääbo i in. 2004, E. Willerslev, A. Cooper 2005). Według powszechnie przyjętego modelu, w klimacie umiarkowanym ~100 tys. lat jest średnim maksymalnym okresem przetrwania krótkich fragmentów (około 100 pz; T. Lindahl 1993; C.I. Smith i in. 2001).

Często pośrednia ocena stopienia degradacji DNA stosowana jest przed przystąpieniem do izolowania matrycy i nie tylko oszczędza ponoszone koszty, ale stanowi także potwierdzenie autentyczności próby. Ocena procesu racemizacji aminokwasów (AA), który polega na zamianie enancjomeru L w D (częściowo), wykorzystywana zresztą przy datowaniu próby, charakteryzuje się energią aktywacji porównywalną do niezbędnej w procesie degradacji puryn (H.N. Poinar i in. 1996). Przyjęto, że wartość $\log D/L$ dla asparagianu (najbardziej wrażliwego aminokwasu) mniejsza niż $1/10$ świadczy ze znacznym prawdopodobieństwem o zachowaniu się w próbie namnażalnych fragmentów (przynajmniej 100 pz). Jednocześnie, kiedy uzyskana dla asparagianu wartość jest największa porównując z innymi AA, to wyizolowane fragmenty DNA pochodzą od jednego osobnika. Rzadziej wykorzystywany jako wskaźnik jest stopień degradacji kolagenu (H.M. Poinar, B.A. Stankiewicz 1999) lub wiek termiczny stanowiska (C.I. Smith i in. 2001).

DEGRADACJA DNA *POST MORTEM*

Kompletowanie wiedzy na temat zmian struktury pierwszorzędowej DNA *post mortem* jest ciągle jeszcze działaniem o kluczowym znaczeniu. Po śmierci organizmu ustaje ochrona przed działaniem degradujących czynników zewnętrznych, ponieważ tracą aktywność enzymy naprawiające DNA jądrowy. mtDNA nie jest naprawiany nawet *in vivo*, kumulując wszystkie zachodzące zmiany, i dlatego jest chętnie wykorzystywany do oceny zależności filogenetycznych. Dodatkowo, tuż po śmierci, uwalniane z lizosomów wewnątrzkomórkowe enzymy nukleolityczne rozpoczynają trawienie makrocząsteczek, w tym także fragmentację matrycy DNA. Nieco później na scenę wkraczają mikroorganizmy glebowe, tj. bakterie i grzyby.

Rozważania teoretyczne oraz idące za nimi dane empiryczne pokazują, że czas przetrwania i możliwość kopiowania matrycy DNA, jak już wspomniano wcześniej, zależy głównie od zewnętrznych czynników fizykochemicznych, a nie od czasu, który upłynął po śmierci. Chociaż wyniki przeprowadzanych dotychczas analiz nie są jednoznaczne, i zapewne nie wszystkie typy modyfikacji struktury są znane, to z pewnością wiadomo, że powstające pod wpływem działania enzymów hydrolitycznych fragmenty matrycy podlegają dalszym i ciągłym zmianom w obecności tlenu (utlenianie) i wody (hydroliza). Niestety, mechanizm i dynamikę procesów zachodzących *post mortem* można jedynie ekstrapolować do zjawisk obserwowanych w roztworze (T. Lindahl 1993; M.T.P. Gilbert i in. 2003). Powodzenie w namnażaniu izolowanych fragmentów DNA zależy także od temperatury, w jakiej przebywały *post mortem* analizowane szczątki. Wydajność namnażania DNA słabnie wraz z jej wzrostem. Większość prób z wiecznej zmarzliny zawiera namnażalny DNA (C.I. Smith i in. 2001; J.A. Leonard i in. 2000; I. Barnes i in. 2002), tylko $40 \pm 20\%$ prób z rejonu o temperaturze umiarkowanej, a mniej niż 5% (!) z suchego i gorącego rejonu (C.J. Edwards i in. 2004). Chociaż tlen, woda i temperatura są istotnymi czynnikami, które mają wpływ na stopień degradacji DNA, to jednak nie jedynymi.

Odczyn (pH) środowiska, potencjał red-oks, promieniowanie, skład chemiczny gleby/otoczenia mają również swój udział i modulują ten proces w różnym stopniu. Jest oczywiste, że w skomplikowanym, wieloczynnikowym układzie, a także wobec jego zmienności w czasie, nie sposób dokładnie przewidzieć, w jakim stanie będzie cząsteczka DNA izolowana z konkretnego materiału kopalnego. Ponadto, zazwyczaj dane opisujące środowisko są najczęściej weryfikowalne w momencie wydobywania próby na stanowisku archeologicznym i najczęściej jest nikła szansa na ich oszacowanie w okresie pomiędzy śmiercią osobnika a wydobywaniem szczątków (W.L. Nicholson i in. 2000).

O ile nieustanne skracanie łańcucha polinukleotydowego i depuracja ograniczają, a w efekcie uniemożliwiają, namnażanie matrycy DNA, o tyle modyfikacja struktury chemicznej jego składników (zasad purynowych i pirymidynowych), omówiona niżej, zmienia pierwotną informację, wiodąc do poważnych błędów interpretacyjnych, fałszując wnioskowanie filogenetyczne (B. Shapiro i in. 2004) i/lub strukturę odtwarzanych genomów gatunków należących do przeszłych środowisk (E. Willerslev i in. 2003; H.N. Poinar i in. 2006).

NAJCZĘŚCIEJ SPOTYKANE I IDENTYFIKOWANE MODYFIKACJE STRUKTURY DNA

Przyjmuje się, że główną modyfikacją struktury DNA *post mortem* jest depuracja (odłączanie pojedynczych zasad purynowych od cząsteczki matrycy). Wiadomo jednak, że i inne rodzaje zmian mają swój niemały udział w eliminowaniu cząsteczek matrycy lub utrudnianiu do niej dostępu. Podwójne pęknięcia skracają cząsteczkę, natomiast tranzycje adenina ↔ guanina (A/G) i cytozyna ↔ tymina (C/T) powodują zmianę pierwotnego znaczenia zapisu (M. Hofreiter i in. 2001b; M.T.P. Gilbert i in. 2003). Obecność inhibitorów polimerazy DNA podczas PCR, np. kwasów humusowych pochodzących z gleby lub produktów degradacji zasad purynowych i pirymidynowych, uniemożliwia namnażanie. W wielu przypadkach obecność namnażalnych fragmentów matrycy i pozbycie się inhibitorów polimerazy nie wystarczają, ponieważ wiązania sieciujące, wewnątrz i między cząsteczkami DNA, a także pomiędzy DNA i białkami uniemożliwiają dostęp enzymu namnażającego (W.L. Nicholson 2000; M.T.P. Gilbert i in. 2005). Jednak warto zdać sobie sprawę z oczywistego faktu, jakim jest współwystępowanie w izolowanej próbce fragmentów o różnej długości, tworzących pierwotnie wiele cząsteczek DNA badanego osobnika. Jest także oczywiste, że zdefiniowany rodzaj modyfikacji w określonym miejscu cząsteczki DNA nie występuje jednocześnie we wszystkich izolowanych matrycach. Znaczy to, że badający ma do czynienia z mieszaniną matryc. Jednoczesna identyfikacja wszystkich fragmentów znajdujących się w próbce i oddzielenie zdegradowanych od autentycznych, np. poprzez porównywanie z sekwencją referencyjną gatunku, umożliwia skompilowanie autentycznej pierwszorzędowej struktury matrycy. Pierwsze kroki w kierunku takiego rozwiązania już poczyniono (J.P. Noonan i in. 2006; R.E. Green i in. 2006).

Cztery możliwe rodzaje tranzycji puryn i pirymidyn klasyfikowane są zazwyczaj do dwóch głównych typów, co wynika z faktu, że mogą zachodzić na oby-

dwóch niciach DNA. Tranzycje typu 1, tj. adenina/guanina, tymina/cytozyna (A/G, T/C), i typu 2, tj. cytozyna/tymina, guanina/adenina (C/T, G/A), powstają jako efekt dezaminacji adeniny do hipoksantyny (A→H) i, odpowiednio, cytozyny do uracylu (C→U) oraz metylocytozyny do tyminy (met-C→T). Jeżeli cytozyna znajdująca się na nici 3' zostanie pozbawiona grupy aminowej, to podczas namnażania polimeraza włączy do nici 5' adeninę zamiast guaniny, ponieważ uracyl rozpoznawany jest jako tymina (G→A) (A.E. Hansen i in. 2001; M. Hofreiter i in. 2001b; M.T.P. Gilbert i in. 2003). Podobnie rzecz ma się z adeniną. Kiedy ulegnie deaminacji do hipoksantyny, odczytywana jako guanina, powoduje powstanie zmiany w produkcie namnażania w postaci tranzycji A/G lub T/C. Najczęściej stwierdzany rodzaj modyfikacji w kopalnym DNA (typ 2) jest zapewne wynikiem różnicy w szybkości deaminacji zasad. Cytozyna traci grupę aminową (NH₂) w roztworze ~30–50 razy szybciej niż adenina (T. Lindahl 1993). Niejasne jest, czy obserwowane *in vitro* tranzycje typu 1 są wynikiem uszkodzenia DNA, czy też błędów, które popełnia podczas namnażania enzym polimeryzujący (M. Hofreiter i in. 2001b; M.T.P. Gilbert i in. 2003; S. Pääbo i in. 2004).

Obydwa typy uszkodzenia występują z różną częstością w różnych rodzajach komórkowych kwasów nukleinowych (J. Binladen i in. 2006). Typ 1 uszkodzeń (A→G/T→C) stwierdzany jest rzadziej w nuDNA (15%) niż w mtDNA (24%), a typ 2 (C→T/G→A) częściej (78% vs. 56%). Bez względu na pochodzenie materiału do badań (np. wieczna zmarzlina, obiekty muzealne) typ 2 dominuje, występując 2–3 razy częściej (M.T.P. Gilbert i in. 2003; J. Binladen i in. 2006). Deaminacja cytozyny i jej metylowej pochodnej jest dominującym rodzajem uszkodzenia zarówno w mtDNA, jak i w nuDNA pomimo znacznej różnicy w liczbie kopii matrycy w komórce. Genów jądrowych jest 5×10^3 – 10^4 razy mniej niż tych, które tworzą genom mitochondrialny (H. Poinar i in. 2003). Kiedy porównano wartość TSH (total sequence heterogeneity), liczoną jako prawdopodobieństwo wystąpienia tranzycji w zdefiniowanym położeniu nukleotydu według wzoru $TSH = l/n$, gdzie l jest liczbą obserwowanych podstawień, a n jest liczbą nukleotydów przeanalizowanych, nie doszukano się istotnych różnic ilościowych pomiędzy mtDNA i nuDNA (J. Binladen i in. 2006).

Jedną z metod weryfikowania analizowanej sekwencji jest molekularne klonowanie produktów namnażania kopalnego DNA. Obserwowane często zróżnicowanie struktury pierwszorzędowej klonów produktu PCR może wiązać się z działaniem różnych czynników lub być wynikiem licznych procesów, niekoniernie degradacji DNA. Na przykład, działanie przyspieszonego tempa ewolucji, przynajmniej w odniesieniu do niektórych genów/sekwenacji, powoduje ich naturalny polimorfizm (A.E. Hansen i in. 2001). Zmiana sekwencji (miscoding lesions) może być także wynikiem błędnego włączania nukleotydów przez polimerazę DNA, cechy enzymu stosunkowo łatwej do wyeliminowania poprzez stosowanie enzymów, które „mylą się” rzadko (J.M. Flaman i in. 1994; P. Andre i in. 1997), np. polimerazę DNA Platinum Taq High Fidelity ($2,0 \times 10^{-6}$ – $6,5 \times 10^{-7}$ /nukleotyd/cykl). Również niewielka liczba kopii matrycy w próbie stanowić może przyczynę zwiększonego udziału klonów o zmienionej wtórnie sekwencji. Mała liczba kopii oznacza większy procentowy udział cząsteczek zmodyfikowanych w bada-

nej puli, a co za tym idzie, znaczący ich udział w puli produktów namnażania, szczególnie że liczba cykli podczas namnażania kopalnego DNA jest zwykle 2–3 razy większa niż w przypadku DNA współczesnego. Wpływ na stopień heterogenności allelicznej ma namnażanie pseudogenów lub zduplikowanych genów, a podczas analizy mtDNA także nieuprawniona synteza alleli jądrowych (A.D. Greenwood i in. 2001).

Namnażanie nuDNA w porównaniu z mtDNA jest ograniczane długością fragmentów (M. Bunce i in. 2003). Im więcej cząsteczek matrycy w materiale, jak to ma miejsce w przypadku mtDNA, tym większe prawdopodobieństwo znalezienia wystarczająco długich i nieuszkodzonych fragmentów zawierających analizowaną pozycję nukleotydową. Co więcej, nuDNA w przeciwieństwie do mtDNA jest związany z białkami. Z jednej strony bezpośredni kontakt białek jądrowych z DNA sprzyja sieciowaniu typu białko–DNA, jak wspomniano już wcześniej, z drugiej jednak strony polipeptydy wiążące kwas nukleinowy spełniać mogą funkcję ochronną. Wiadomo, że fragment o długości 147 pz połączony jest z oktamerym histonowym (V.G. Levitsky i in. 2005) i pozostaje pod bezpośrednią ‘ochroną’ przed degradacją, w przeciwieństwie do tych fragmentów, które znajdują się pomiędzy nukleosomami. Bromek *N*-fenyloacetylotiazolowy (PTB) uwalnia DNA z wiązań sieciujących i niewykluczone, że obserwowane w praktyce laboratoryjnej różnice jakościowe oraz ilościowe podczas namnażania różnych alleli z jednej próby można wyjaśnić różnym położeniem analizowanych fragmentów względem białek histonowych. Znamienny jest również fakt, że najskuteczniej namnażane są fragmenty o długości nieprzekraczającej 150 pz.

GENOMIKA KOPALNEGO DNA

Odczytana po raz pierwszy w 1972 r. struktura pierwszorzędowa całego genu kodującego białko płaszczka bakteriofaga MS2 (W. Min Jou i in. 1972) zainicjowała szereg badań, w efekcie których w 1995 r. możliwe było ogłoszenie struktury genomu pierwszego żywego obiektu — bakterii *H. influenzae* (R. Fleischmann i in. 1995). Na ogłoszenie przybliżonej struktury pierwszorzędowej genomu *H. sapiens* czekaliśmy niespełna sześć lat (J.C. Venter i współ. 2001; E.S. Lander i współ. 2001), a następne sześć przyniosły jej pełną weryfikację (W.S. Oetting 2007). Jeszcze niedawno tylko nieliczni przewidywali możliwość poznania struktury pierwszorzędowej jądrowego DNA należącego do organizmu, którego obecność w biosferze Ziemi przeszła do historii. Genomika kopalnego DNA narodziła się w dwóch ośrodkach, gdzie zaledwie od roku sekwencjonowany jest genom neandertalczyka (J.P. Noonan i in. 2006, R.E. Green i in. 2006), zapewne naszego najbliższego krewniaka, którego liczebność zaczęła maleć około 40 tys. lat temu, a wiek ostatnich znalezionych szczątków jego przedstawicieli oznaczono na 28–24 tys. lat (P.B. Pettitt 1999; C. Finlayson i in. 2006). Być może poznanie genomu *H. neandertalensis* wyjaśni udział *H. sapiens* w eliminowaniu najbliższej spokrewnionej z nami gatunku (I. Jankovic 2004) i pozwoli rozstrzygnąć szereg pytań pozostających ciągle bez odpowiedzi. Dowiemy się z pewnością, czy dwa blisko spokrewnione gatunki, współistniejące przez dziesiątki tysięcy lat na tym

samym obszarze, krzyżowały się, dzieląc wspólne terytorium (może tylko w pierwszym okresie wspólnej historii, jak to sugerują badacze, którzy rozpoczęli sekwencjonowanie genomu *H. neandertalensis*; J.P. Noonan i in. 2006; R.E. Green i in. 2006). Szczególnie interesujące będzie poznanie tych uwarunkowań genetycznych neandertalczyka, które leżą u podstaw zachowania, np. sposobu doboru partnerów. Porównanie genomów może między innymi udzielić odpowiedzi na pytania nieosiągalne w inny sposób, np. o kolor skóry, o zdolność do posługiwania się mową, o predyspozycje do chorób uwarunkowanych genetycznie, o profil immunologiczny, który zabezpieczał przed patogenami, oraz o inne niezliczone wątpliwości dotyczące możliwych fenotypów.

Analiza niespełna 0,03% genomu *H. neandertalensis* (1 mln pz; R.E. Green i in. 2006) pozwala oszacować czas dywergencji obydwu gatunków na 516 tys. lat (465–569) i potwierdza tym samym wcześniejsze wyliczenia uzyskane na podstawie analizy neandertalskiego mtDNA (M. Krings i in. 1997), zresztą nieco zawyżone w stosunku do danych archeologicznych, mówiących o około 400 tys. lat (K. Stringer 1998). Jeśli przyjąć jednak, że zmiany profilu genetycznego charakterystyczne dla gatunku kumulowane są w czasie, trudnym przecież do określenia, i wyprzedzają pojawienie się fenotypu, to dane genetyczne i antropologiczne łączą się w logiczną całość. Nieco bliższe archeologicznym są dane uzyskane przez drugi zespół sekwencjonujący neandertalski genom i opiewające na 370 tys. lat (120–670) (J.P. Noonan i in. 2006).

Porównując strukturę pierwszorzędową genomów, określić można nie tylko czas, jaki upłynął od najbliższego wspólnego przodka (MRCa), lecz także wyjściową liczebność populacji. Szacunki mówią, że osobna historia gatunków *Homo neandertalensis* i *Homo sapiens* rozpoczęła się od niewielkiej grupy wspólnych przodków, liczącej nie więcej niż 3 tys. osobników (R.E. Green i in. 2006).

Genomika kopalnego DNA, dostarczając nowych danych, ożywi z pewnością dyskusję trwającą od ponad dwóch dziesięcioleci na temat znaczenia w procesie ewolucji mutacji wiodących do zmian strukturalnych i funkcjonalnych białkowych produktów (zmian fenotypu) w porównaniu z rolą mutacji wpływającymi na regulację działania tych pierwszych (R. Higuchi i in. 1984).

ZANIECZYSZCZENIA — JAK POBIERAĆ MATERIAŁ DO BADAŃ

Wyniki stosowanych metod izolowania i analizy kopalnego DNA, choć niejednokrotnie obciążone niepewnością, stają się wiarygodne, kiedy spełniają określone kryteria (M.T.P. Gilbert i in. 2005).

Choć nie wszystko zapewne wiadomo na temat sposobów zanieczyszczania i źródła egzogenego DNA, to jednak są dowody na to, że ma ono miejsce głównie podczas wydobywania szczątków. Mianowicie, źródłem współczesnych cząsteczek nie są antropolodzy i genetycy molekularni wykonujący analizy, lecz najczęściej archeolodzy poszukujący, wydobywający i przygotowujący materiał kopalny do badań. Świeżo wydobyte szczątki, które nie są poddawane żadnym procedurom przygotowawczym, nie są nawet opłukiwane, zawierają kilka razy więcej DNA niż te poddawane standardowym procedurom (M.L. Sampietro i in.

2006). Zbieranie materiału archeologicznego do analizy powinno przebiegać zgodnie z zasadami stosowanymi podczas rutynowego kolekcjonowania materiału biologicznego, które gwarantują ograniczenie degradacji biocząsteczek do minimum. Szczątki należy pobierać, zachowując możliwie najbardziej sterylne warunki, tzn. używać jednorazowych rękawiczek, nakrycia głowy, maski i fartucha. Wydobyty materiał kopalny najlepiej przechowywać w niskiej temperaturze, a nawet zamrożony. Szacuje się, że po wydobyciu z ziemi DNA degraduje 50–70 razy szybciej (M. Pruvost i in. 2007).

Powszechnie stosowaną praktyką w pozbywaniu się egzogenego DNA z powierzchni szczątków jest płukanie w roztworze silnego utleniacza, np. podchlorynu. NaOCl degraduje zasady azotowe, utleniając je bądź powodując powstanie ich chlorowcopochodnych (M. Whiteman i in. 1997). Powstawanie pojedynczych i podwójnych pęknięć w konsekwencji degraduje DNA nawet do podstawowych składników. Ustalono, że płukanie fragmentów kostnych w 3% w/v roztworze NaOCl przez 15 min. usuwa wszystkie zanieczyszczenia powierzchniowe (B.M. Kemp, D.G. Smith 2005). Autorzy sugerują, że adsorpcja endogenego DNA na hydroksyloapatycie, składniku kości, zabezpiecza go przed degradującą kąpielą nawet w 6% roztworze podchlorynu przez 21 godzin. Także sproszkowane fragmenty szkieletu mogą być płukane w roztworze NaOCl bez uszczerbku dla struktury chemicznej cząsteczek endogennych. Co więcej, okazało się, że zanieczyszczające cząsteczki są znacznie wrażliwsze niż autentyczne, a względny stosunek zawartości niezdegradowanych do zdegradowanych przesuwają się na korzyść kopalnej matrycy tym bardziej, im krótszy fragment jest namnażany (H. Malström i in. 2007).

Rosnąca przyżyciowo w kości populacja agregujących kryształów zawiera związki organiczne (S. Weiner, P.A. Price 1986), w tym białka (M. DeNiro, S. Weiner 1988) i DNA (M. Salamon i in. 2005). Okazało się, że uwięzione w kryształach makromolekuły są odporne na działanie NaOCl, dając asumpt do pozbycia się niezwiązanych zanieczyszczeń z powierzchni. Izolowany z kryształów preparat kwasu nukleinowego charakteryzuje się obecnością dłuższych i mniej uszkodzonych fragmentów matrycy (M. Salamon i in. 2005).

Kontrola zanieczyszczenia badanej próby musi być realizowana praktycznie od momentu wydobycia szczątków z ziemi. W początkowej fazie poprzez unie możliwienie kontaktu próby z otoczeniem, a potem poprzez szereg kontroli polegających na namnażaniu próbek odczynników, namnażaniu fragmentów dłuższych niż 500 pz, których obecność wśród matryc kopalnego DNA jest mało prawdopodobna, analizie struktury pierwszorzędowej uzyskanych produktów namnażania, np. fragmentów mikrosatelitarnych (short tandem repeats — STRs), oraz jakościowej, porównawczej analizie struktury pierwszorzędowej klonowanych produktów namnażania.

Kontrolowanie identyfikujące zanieczyszczenia przedstawia się nieco inaczej, kiedy analizowane są szczątki zwierząt. Zanieczyszczenie ludzkim DNA jest łatwe do wykrycia, a daleko posunięte zachowanie ostrożności gwarantuje uzyskanie autentycznych matryc. Ostatnio opisano sposób izolowania kopalnego DNA z okazów muzealnych (~100 lat), który umożliwił filogenetyczną analizę tenreko-

watych (kretojeże). Co ciekawe, opisana metodyka polegająca na wypłukiwaniu DNA z fragmentów czaszek nie powodowała uszkodzenia zbiorów (R.J. Asher, M. Hofreiter 2006).

ZASTOSOWANIE ANALIZY KOPALNEGO DNA — PRZYKŁADY

Przykład 1. Osobnicza identyfikacja szczątków

Wątpliwości historyków dotyczą niejednokrotnie identyfikacji szczątków ludzi z życia publicznego lub członków ich rodzin. Wśród najświeższych danych rozwijających tego typu zastrzeżenia jest osobnicza identyfikacja szkieletu znajdującego się w Katedrze Roskilde, który przypisywano dotąd Estrid, matce ostatniego duńskiego króla Wikingów. Porównywano w tym przypadku fragmenty mtDNA: odcinek HVR-1 o długości 400pz oraz fragment obejmujący nukleotyd 7028, który decyduje o przynależności do haplotypu H (H-swoisty/H-nie-swoisty). Potwierdzono przynależność króla do haplogrupy H, natomiast szczątków kobiety do subgrupy H5a, co przy założeniu, że mtDNA jest dziedziczone po matce, przeczy domniemanemu pokrewieństwu (J. Dissing i in. 2007). Ocena wieku biologicznego szczątków, tj. 35 lat, a nie 70, jak wynika z badań historycznych, zdaje się potwierdzać uzyskane dane. Zidentyfikowana kobieta mogła być jedną z synowych króla Svena, bowiem obydwie nosiły imię Estrid i były królowymi.

Przykład 2. Ustalanie pochodzenia

Pochodzenie współczesnych Europejczyków jest tematem wielu opracowań archeologicznych, antropologicznych, a w ostatnim czasie genetycznych. Moglibyśmy mieć swoich przodków zarówno wśród paleolitycznych plemion zbieracko-łowieckich, obecnych w Europie od 40 tys. lat temu, lub być potomkami neolitycznych rolników, którzy pojawili się tutaj dopiero 7,5 tys. lat temu. Okazało się, że współcześni Europejczycy zachowali 100–150 razy mniej sekwencji określającej haplotyp N1a (mtDNA), obecny powszechnie u przedstawicieli pierwszych neolitycznych rolników w Europie, identyfikowanych jako przedstawiciele kultury ceramiki wstęgowej rytej i ceramiki linearnej (kultura Alföld) (D. Gronenborn 1999). Tak drastyczna zmiana częstości występowania wyznacznika genetycznego dzisiaj w porównaniu z DNA sprzed 7,5 tys. lat sugeruje, że współcześni Europejczycy pochodzą raczej od paleolitycznych przodków niż pierwszych neolitycznych rolników (W. Haak i in. 2005).

Przykład 3. Cechy badanej populacji

Wśród badanych prób DNA wczesnych rolników zamieszkujących Europę (5–6 tys. lat p.n.e.) nie znaleziono allelu T genu laktazy (polimorficzna pozycja 13910-C/T), związanego ze zdolnością do trawienia laktozy u dorosłego człowieka (N.S. Enattah i in. 2002). Wyliczony na podstawie analizy współczesnego DNA wiek allelu T wynosi według T. Bersaglieri i in. (2004) 2–20 tys. lat, a według

M. Coelho i in. (2005) 7,5–12 tys. lat i poprzedza czas wprowadzenia mleka do diety człowieka, szacowany w Europie na 6–8 tys. lat p.n.e. (C.A. Edmonds i in. 2004). Oceniona na podstawie analizy kopalnego DNA sprzed 7 tys. lat i znikoma, w porównaniu ze współczesną, częstość występowania allelu T (0,0–0,089 w zależności od przyjętej do obliczeń wartości współczynnika selekcji) sugeruje, że wprowadzenie do hodowli w Europie, w tym samym mniej więcej czasie, mleko-dajnych zwierząt miało znaczenie czynnika selekcyjnego (J. Burger i in. 2007). W związku z tym kulturowo-historyczny model rozprzestrzeniania się allelu T (A. Beja-Pereira i in. 2003) staje się najbardziej prawdopodobny (J. Burger i in. 2007).

Przykład 4. Choroby uwarunkowane genetycznie

Analizując ponad 150 chromosomów ludzi mieszkających w średniowieczu na obszarze współczesnej Polski, nie zidentyfikowano mutacji *delta F508 CFTR*, stanowiącej dzisiaj 50–60% wszystkich mutacji powodujących zachorowanie na mukowiscydozę (H.W. Witas i in. 2006).

Allele genów *CTLA-4* i *HLA DQB1* predysponują do chorób autoimmunizacyjnych, np. cukrzycy. Okazało się, że w średniowieczu częstość występowania alleli predysponujących była podobna do obserwowanej dzisiaj wśród chorych na cukrzycę (H.W. Witas i in. 2007). Znaczenie różnicy w częstości występowania alleli predysponujących powstałej na przestrzeni kilku wieków należy rozpatrywać osobno w przypadku każdego analizowanego genu. Zapewne obserwowane zjawisko ma związek z działaniem odmiennych od dzisiejszych czynników środowiska (przyjmuje się, że niektóre czynniki środowiska indukują chorobę autoimmunizacyjną, działając na predysponujący genotyp).

Identyfikacja mutacji *delta 32 CCR5* i analiza częstości allelu wskazująca podobną do dzisiejszej wartość w materiale historycznym wykazały jasno, że średniowieczne epidemie dżumy nie były czynnikiem ją selekcyjującym (H.W. Witas, P. Zawicki 2006).

Przykład 5. Identyfikacja gatunku w obiekcie historycznym

Wiadomo, że pergamin stanowił główny materiał pisarski średniowiecza i wyrabiany był z surowców zwierzęcych. Ostatnio przedstawiono wyniki analizy DNA wyizolowanego z pergaminu identyfikującej nie tylko gatunek zwierzęcia, ale także historię stada, z którego ono pochodziło (N. Poulakakis i in. 2007).

Przykład 6. Poznawanie genomów organizmów wymarłych

Dwa nowe podejścia metodyczne do analizy kopalnego DNA, tj. pirosekwenjonowanie (1 mln pz; R.E. Green i in. 2006) i zaadoptowana z badań środowiskowych metagenomika (65 tys. pz; J.P. Noonan i in. 2006), umożliwiły niedawno rozpoczęcie identyfikacji fragmentów jądrowego DNA neandertalczyka. Ostatnią z wymienionych metod zidentyfikowano już cały genom mitochondrialny mamuta (*Mammuthus primigenius*) (H.N. Poinar i in. 2006), a genom jądrowy wymarłego niedźwiedzia jaskiniowego (*Ursus spelaeus*) jest obecnie przedmiotem sekwencjo-

nowania (J.P. Noonan i in. 2005). Identyfikacja struktury pierwszorzędowej kolejnych zwierząt i roślin plejstocénskich, co jak wykazano do tej pory jest możliwe, da asumpt m.in. do analizy polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (single nucleotide polymorphisms, SNPs) w aspekcie genetyki populacyjnej. Z kolei odtworzenie cech populacji pozwoli ocenić, jaki wpływ na nią miał zmieniający się klimat późnej epoki lodowcowej i wczesnej polodowcowej oraz wnioskować o przyczynach i konsekwencjach czwartorzędowych wymierań. Najświeższe dane (I. Barnes i in. 2007) sugerują, że syberyjskie mamuty włochate (*Mammuthus primigenius*) rozprzestrzeniły się około 60 tys. lat temu, znacznie przed maksimum ostatniego zlodowacenia (około 20 tys. lat) tworząc dwie populacje, na Alasce i na Syberii, kiedy niemożliwe już było połączenie między kontynentami. Wnioskując na podstawie zmniejszającego się zróżnicowania genetycznego, autorzy uważają, że jedna z populacji, syberyjska, wyginęła wcześniej (około 40 tys. lat temu), a druga zajęła jej terytorium dopiero po ponownym powstaniu połączenia pomiędzy rozdzielonymi wcześniej rejonami. Gatunek zniknął ostatecznie z powierzchni Ziemi około 10 tys. lat temu raczej za sprawą zmieniających się znowu warunków środowiska (koniec epoki lodowcowej) niż jako konsekwencja ludzkiej działalności.

Dane uzyskane o wymarłych przecież tak niedawno gatunkach wraz z charakterystyką ówczesnego biotopu przyczynić się mogą zapewne do oceny warunków życia współczesnych wielkich ssaków i podjęcia właściwych decyzji zapobiegających ich wymieraniu w przyszłości.

Słowa kluczowe: kopalny DNA, aDNA, PCR, degradacja DNA, ewolucja

WYKAZ CYTOWANEJ LITERATURY

Wykaz skrótów

- „CB” — „Current Biology”, London.
 „MBE” — „Molecular Biology and Evolution”, Oxford.
 „NAR” — „Nucleic Acids Research”, Oxford.
 „PNAS” — „Proceedings of National Academy of Sciences USA”, Stanford.
 „TEE” — „Trends in Ecology and Evolution”, London.

Literatura

- Adcock G. J., Dennis E. S., Eastale S., Huttley G. A., Jermin L. S., Peacock W. J., Thorne A.
 2001 *Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: implications for modern human origins*, „PNAS”, t. 98, z. 2, s. 537–542.
- Andre P., Kim A., Khrapko K., Thilly W. G.
 1997 *Fidelity and mutational spectrum of Pfu DNA polymerase on a human mitochondrial DNA sequence*, „Genome Research”, t. 7, z. 8, s. 843–852.

- Asher R. J., Hofreiter M.
2006 *Tenrec phylogeny and the noninvasive extraction of nuclear DNA*, „Systematic Biologist”, t. 55, z. 2, s. 181–194.
- Austin J. J., Ross A. J., Smith A. B., Fortey R. A., Thomas R. H.
1997a *Problems of reproducibility — does geologically aDNA survive in amber-preserved insects?* „Proceedings of the Royal Society (London) Biological Sciences”, t. 264, z. 1381, s. 467–474.
- Austin J. J., Smith A. B., Thomas R. H.
1997b *Palaeontology in a molecular world: The search for authentic ancient DNA*, „TEE”, t. 12, z. 8, s. 303–306.
- Barnes I., Matheys P., Shapiro B., Jensen D., Cooper A.
2002 *Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears*, „Science”, t. 295, z. 5563, s. 2267–2270.
- Barnes I., Shapiro B., Lister A., Kuznetsova T., Sher A., Guthrie D., Thomas M. G.
2007 *Genetic Structure and Extinction of the Woolly Mammoth, Mammuthus primigenius* „CB”, t. 17, s. 1072–1075.
- Beja-Pereira A., Luikart G., England P. R., Bradley D. G., Jann O. C., Bertorelle G., Chamberlain A. T., Nunes T. P., Metodiev S., Ferrand N., Erhardt G.
2003 *Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes*, „Nature Genetics”, t. 35, z. 4, s. 311–313.
- Bersaglieri T., Sabeti P. C., Patterson N., Vanderploeg T., Schaffner S. F., Drake J. A., Rhodes M., Reich D. E., Hirschhorn J. N.
2004 *Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene*, „American Journal of Human Genetics”, t. 74, z. 6, s. 1111–1120.
- Binladen J., Wiuf C., Gilbert M. T. P., Bunce M., Barnett R., Larson G., Greenwood A. D., Haile J., Ho S. Y. W., Hansen A. J., Willerslev E.
2006 *Assessing the Fidelity of Ancient DNA Sequences Amplified From Nuclear Genes*, „Genetics”, t. 172, s. 733–741.
- Bunce M., Worthy T. H., Ford T., Hoppitt W., Willerslev E., Drummond A., Cooper A.
2003 *Extreme reversed sexual size dimorphism in the extinct New Zealand moa Dinornis*, „Nature”, t. 425, z. 6954, s. 172–175.
- Burger J., Kirchner M., Bramanti B., Haak W., Thomas M. G.
2007 *Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans*, „PNAS”, t. 104, z. 10, s. 3736–3741.
- Cano R. J., Poinar H. N., Roublik D. W., Poinar Jr. G. O.
1992 *Enzymatic amplification and nucleotide sequencing of portions of the 18S rRNA gene of the bee Proplebeia dominicana (Apidae: Hymenoptera) isolated from 25-40 million year old Dominican amber*, „Medical Science Research”, t. 20, s. 619–622.
- Coelho M., Luiselli D., Bertorelle G., Lopes A. I., Seixas S., Destro-Bisol G., Rocha J.
2005 *Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence*, „Human Genetics”, t. 117, z. 4, s. 329–339.

- Cooper A., Rambaut A., Macaulay V., Willerslev E., Hansen A.J., Stringer C.
2001 *Human origins and ancient human DNA*, „Science”, t. 292, z. 5522, s. 1655–1656.
- DeNiro M., Weiner S.
1988 *Chemical, enzymatic and spectroscopic characterization of „collagen” and other organic fractions from prehistoric bones*, „Geochimica et Cosmochimica Acta”, t. 52, z. 9, s. 2197–2206.
- Dissing J., Binladen J., Hansen A., Sejrnsen B., Willerslev E.
2007 *The last Viking King: a royal maternity case solved by ancient DNA analysis*, „Forensic Science International”, t. 166, z. 1, s. 21–27.
- Edmonds C.A., Lillie A.S., Cavalli-Sforza L.L.
2004 *Mutations arising in the wave front of an expanding population*, „PNAS”, t. 101, z. 4, s. 975–979.
- Edwards C.J., MacHugh D.E., Dobney K.M., Martin L., Russell N., Horwitz L.K., McIntosh S.K., MacDonald K.C., Helmer D., Tresset A., Vigne J.-D., Bradley D.G.
2004 *Ancient DNA analysis of 101 cattle remains: limits and prospects*, „Journal of Archaeological Science”, t. 31, z. 6, s. 695–710.
- Enattah N. S., Sahi T., Savilahti E., Terwilliger J.D., Peltonen L., Jarvela I.
2002 *Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia*, „Nature Genetics”, t. 30, z. 2, s. 233–237.
- Flaman J. M., Frebourg T., Moreau V., Charbonnier F., Martin C., Ishioka C., Friend S. H., Iggo R.
1994 *A rapid PCR fidelity assay*, „NAR”, t. 22, z. 15, s. 3259–3260.
- Fleischmann R., Adams M., White O., Clayton R., Kirkness E., Kerlavage A., Bult C., Tomb J., Dougherty B., Merrick J.
1995 *Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd*, „Science”, t. 269, z. 5223 s. 496–512.
- Finlayson C., Pacheco F.G., Rodríguez-Vidal J., Fa D.A., Gutierrez López J.M., Santiago Pérez A., Finlayson G., Allue E., Baena Preysler J., Cáceres I., Carrión J. S., Fernández Jalvo Y., Gleed-Owen C. P., Jimenez Espejo F. J., López P., López Sáez J. A., Riquelme Cantal J. A., Sánchez Marco A., Guzman F. G., Brown K., Fuentes N., Valarino C. A., Villalpando A., Stringer C. B., Martinez Ruiz F., Sakamoto T.
2006 *Late survival of Neanderthals at the southernmost extreme of Europe*, „Nature”, t. 443, z. 7113, s. 850–853.
- Gilbert M. T. P., Bandelt H. J., Hofreiter M., Barnes I.
2005 *Assessing ancient DNA studies*, „TEE”, t. 20, z. 10, s. 541–544.
- Gilbert M. T. P., Hansen A. J., Willerslev E., Rudbeck L., Barnes I., Lynnerup N., Cooper A.
2003 *Characterization of Genetic Miscoding Lesions Caused by Postmortem Damage*, „American Journal of Human Genetics”, t. 72, z. 1, s. 48–61.
- Green R.E., Krause J., Ptak S.E., Briggs A.W., Ronan M.T., Simons J.F., Du L., Egholm M., Rothberg J.M., Paunovic M., Pääbo S.
2006 *Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA*, „Nature”, t. 444, z. 7117, s. 330–336.

Greenwood A. D., Lee F., Capelli C., DeSalle R., Tikhonov A., Marx P. A., MacPhee R. D. E.

2001 *Evolution of endogenous retrovirus-like elements of the woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*) and its relatives*, „MBE”, t. 18, z. 5, s. 840–847.

Gronenborn D.

1999 *A variation on a basic theme: The transition to farming in southern Central Europe*, „Journal of World Prehistory”, t. 13, nr 2, s. 123–210.

Gutiérrez G. I., Marín A.

1998 *The most ancient DNA recovered from an amber-preserved specimen may not be as ancient as it seems*, „MBE”, t. 15, z. 7, s. 926–929.

Haak W., Forster P., Bramanti B., Matsumura S., Brandt G., Tänzer M., Villems R., Renfrew C., Gronenborn D., Alt K. W., Burger J.

2005 *Ancient DNA from the first European farmers in 7500-year-old Neolithic sites*, „Science”, t. 310, z. 5750, s. 1016–1018.

Hansen A., Willerslev E., Wiuf C., Mourier T., Arctander P.

2001 *Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates*, „MBE”, t. 18, z. 2, s. 262–265.

Higuchi R., Bowman B., Freiberger M., Ryder O. A., Wilson A. C.

1984 *DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family*, „Nature”, t. 312, z. 5991, s. 282–284.

Hofreiter M., Serre D., Poinar H. N., Kuch M., Pääbo S.

2001a *Ancient DNA*, „Nature Reviews in Genetics”, t. 2, z. 5, s. 353–359.

Hofreiter M., Jaenicke V., Serre D., von Haeseler A., Pääbo S.

2001b *DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA*, „NAR”, t. 29, z. 23, s. 4793–4799.

Höss M., Jaruga P., Zastawny T. H., Dizdaroglu M., Pääbo S.

1996 *DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues*, „NAR”, t. 24, z. 7, s. 1304–1307.

Jankovic I.

2004 *Neandertals... 150 years later*, „Collegium antropologicum”, t. 28, z. 2, s. 379–401.

Kemp B. M., Smith D. G.

2005 *Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth*, „Forensic Science International”, t. 154, z. 1, s. 53–61.

Krings M., Stone A., Schmitz R. W., Krainitzki H., Stoneking M., Pääbo S.

1997 *Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans*, „Cell”, t. 90, z. 1, s. 19–30.

Lander E. S. i współ.

2001 *Initial sequencing and analysis of the human genome*, „Nature”, t. 409, z. 6822, s. 860–921.

Leonard J. A., Wayne R. K., Cooper A.

2000 *Population genetics of Ice Age brown bears*, „PNAS”, t. 97, z. 4, s. 1651–1654.

- Levitsky V. G., Katokhin A. V., Podkolodnaya O. A., Furman D. P., Kolchanov N. A.
2005 *NPRD: nucleosome positioning region database*, „NAR”, t. 33, s. D67–70.
- Lindhahl T.
1993 *Instability and decay of the primary structure of DNA*, „Nature”, t. 362, z. 6422, s. 709–715.
- Malmström H., Svensson E. M., Gilbert M. T., Willerslev E., Götherström A., Holmlund G.
2007 *More on contamination: the use of asymmetric molecular behavior to identify authentic ancient human DNA*, „MBE”, t. 24, z. 4, s. 998–1004.
- Min Jou W., Haegeman G., Ysebaert M., Fiers W.
1972 *Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein*, „Nature”, t. 237, z. 5350, s. 82–88.
- Mullis K. B., Faloona F.
1987 *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction*, „Methods in Enzymology”, t. 155, s. 335–350.
- Nicholson W. L., Munakata N., Horneck G., Melosh H. J., Setlow P.
2000 *Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial trial environments*, „Microbiology and Molecular Biology. Reviews”, t. 64, z. 3, s. 548–572.
- Noonan J. P., Hofreiter M., Smith D., Priest J. R., Rohland N., Rabeider G., Krause J., Detter J. C., Pääbo S., Rubin E. M.
2005 *Genomic sequencing of Pleistocene cave bears*, „Science”, t. 309, z. 5734, s. 597–599.
- Noonan J. P., Coop G., Kudaravalli S., Smith D., Krause J., Alessi J., Chen F., Platt D., Pääbo S., Pritchard J. K., Rubin E. M.
2006 *DNA sequencing and analysis of neanderthal genomic*, „Science”, t. 314, z. 5802, s. 1113–1118.
- Oetting W. S.
2007 *The 2006 human genome variation society scientific meeting*, „Human Mutation”, t. 28, z. 5, s. 517–521.
- Pääbo S.
1985 *Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA*, „Nature”, t. 314, z. 6012, s. 644–645.
- Pääbo S., Wilson A. C.
1991 *Miocene DNA sequences — A dream come true?*, „CB”, t. 1, z. 1, s. 45–46.
- Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Despres V., Hebler J., Rohland N., Kuch M., Krause J., Vigilant L., Hofreiter M.
2004 *Genetic analyses from ancient DNA*, „Annual Review of Genetics”, t. 38, s. 645–679.
- Pettitt P. B.
1999 *Disappearing from the world: an archaeological perspective on Neanderthal extinction*, „Oxford Journal of Archaeology”, t. 18, z. 3, s. 217–240.
- Poinar H. N., Höss M., Bada J. L., Pääbo S.
1996 *Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA*, „Science”, t. 272, z. 5263, s. 864–866.

- Poinar H. N., Kuch M., McDonald G., Martin P., Pääbo S.
2003 *Nuclear gene sequences from a late Pleistocene sloth coprolite*, „CB”, t. 13, z. 13, s. 1150–1152.
- Poinar H. N., Schwarz C., Qi J., Shapiro B., MacPhee R. D. E., Buigues B., Tikhonov A., Huson D. H., Tomsho L. P., Auch A., Rampp M., Miller W., Schuster S. C.
2006 *Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA*, „Science”, t. 311, z. 5759, s. 392–394.
- Poinar H. N., Stankiewicz B. A.
1999 *Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues*, „PNAS”, t. 96, s. 8426–8431.
- Poulakakis N., Tselikas A., Bitsakis I., Mylonas M., Lymberakis P.
2007 *Ancient DNA and the genetic signature of ancient Greek manuscripts*, „Journal of Archaeological Science”, t. 34, z. 5, s. 675–680.
- Pruvost M., Schwarz R., Correia V. B., Champlot S., Braguier S., Morel N., Fernandez-Jalvo Y., Grange T., Geigl E. M.
2007 *Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA*, „PNAS”, t. 104, z. 3, s. 739–744.
- Rogaev E. I., Moliaka Y. K., Malyarchuk B. A., Kondrashov F. A., Derenko M. V., Chumakov I., Grigorenko A. P.
2006 *Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene Mammoth *Mammuthus primigenius**, „PLoS Biology”, t. 4, z. 3, e73, s. 0403–0410.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N.
1985 *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia*, „Science”, t. 230, z. 4732, s. 1350–1354.
- Salamon M., Tuross N., Arensburg B., Weiner S.
2005 *Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones*, „PNAS”, t. 102, z. 39, s. 13783–13788.
- Sampietro M. L., Gilbert M. T., Lao O., Caramelli D., Lari M., Bertranpetit J., Lalueza-Fox C.
2006 *Tracking down human contamination in ancient human teeth*, „MBE”, t. 23, z. 9, s. 1801–1807.
- Shapiro B., Drummond A. J., Rambaut A., Wilson M., Sher A., Pybus O. G., Gilbert M. T. P., Barnes I., Binladen J., Willerslev E., Hansen A., Baryshnikov G. F., Burns J., Davydov S., Driver J., Gubin S. V., Harington C. R., Keddie G., Kosintsev P., Kunz M. L., Martin L. D., Stephenson R., Storer J., Tedford R., Vorobiev A., Zimov S., Cooper A.
2004 *Rise and fall of the Beringian steppe bison*, „Science”, t. 306, z. 5701, s. 1561–1565.
- Smith C. I., Chamberlain A. T., Riley M. S., Cooper A., Stringer C. B., Collins M. J.
2001 *Neanderthal DNA: Not just old but old and cold?*, „Nature”, t. 410, z. 6830, s. 771–772.

- Soltis P. S., Soltis D. E., Smiley C. J.
 1992 *An rbcL sequence from a Miocene Taxodium (bald cypress)*, „PNAS”, t. 89, z. 1, s. 449–451.
- Stringer C.
 1998 *Chronological and biogeographic perspectives on later human evolution, [w:] Neandertals and modern humans in Western Asia*, T. Akazawa, K. Aoki, O. Bar-Yosef red., New York, s. 29–37.
- Venter J. C. i współ.
 2001 *The sequence of the human genome*, „Science”, t. 291, z. 5507, s. 1304–1351.
- Vreeland R. H., Rosenzweig W. D., Powers D. W.
 2000 *Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal*, „Nature”, t. 407, z. 6806, s. 897–900.
- Weiner S., Price P. A.
 1986 *Disaggregation of bone into crystals*, „Calcified Tissue International”, t. 39, z. 6, s. 365–375.
- Whiteman M., Jenner A., Halliwell B.
 1997 *Hypochlorous acid-induced base modifications in isolated calf thymus DNA*, „Chemical Research in Toxicology”, t. 10, z. 11, s. 1240–1246.
- Willerslev E., Hansen A. J., Binladen J., Brandt T. B., Gilbert M. T. P., Shapiro B., Bunce M., Wiuf C., Gilichinsky D. A., Cooper A.
 2003 *Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments*, „Science”, t. 300, s. 5620, 791–795.
- Willerslev E., Hansen A. J., Ronn R., Brand T. B., Barnes I., Wiuf C., Gilichinsky D., Mitchell D., Cooper A.
 2004a *Long-term persistence of bacterial DNA*, „CB”, t. 14, z. 1, s. R9–10.
- Willerslev E., Hansen A. J., Poinar H. N.
 2004b *Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost*, „TEE”, t. 19, s. 3, s. 141–147.
- Willerslev E., Cooper A.
 2005 *Ancient DNA*, „Proceedings of Biological Sciences”, t. 272, z. 1558, s. 3–16.
- Witas H. W., Jatzczak I., Jędrychowska-Dańska K., Żądzińska E., Wrzesińska A., Wrzesiński J., Nadolski J.
 2006 *Sequence of $\Delta F508$ CFTR allele identified at present is lacking in medieval specimens from Central Poland. Preliminary results*, „Anthropologische Anzeiger”, t. 64, z. 1, s. 41–49.
- Witas H. W., Zawicki P.
 2006 *Allele protecting against HIV (CCR5-delta32) identified in early medieval specimens from central Poland. Preliminary results*, „Przegląd Antropologiczny”, t. 69, z. 1, s. 49–53.
- Witas H. W., Zawicki P., Jędrychowska-Dańska K.
 2007 *Extremely high frequency of autoimmune-predisposing alleles in medieval specimens*, „Journal of Zhejiang University Science B”, t. 8, z. 7, s. 512–514.
- Woodward S. R., Weyand N. J., Bunell M.
 1994 *DNA sequence from Cretaceous period bone fragments*, „Science”, t. 266, z. 5188, s. 1229–1232.

HENRYK W. WITAS

ANCIENT DNA: A NEW SOURCE OF RETRIEVABLE DATA
IN ARCHAEOLOGICAL RESEARCH

S u m m a r y

A molecule of deoxyribonucleic acid (DNA) stores information characteristic and necessary for the organism at every level of life organization, i.e. individual, population and species. As the molecule is transferred from generation to generation, the DNA template is the most important and superior to other structural and functional entities. Coding sequences (within genes) as well as non-coding sequences (outside the genes) remain the source of information about an individual's phenotype even *post mortem*. Deciphering sequences of ancient DNA (aDNA) templates provides the opportunity to identify physiological as well as pathological traits of the individual studied, that are either confirmable or impossible to detect with archaeological measurements. These include the origin of the analysed individual in the phylogenetic sense, his relationship to other individuals unearthed in the neighbourhood, predispositions to hereditary as well as infectious diseases, even skin colour or the ability to speak. Moreover, a comparison of characteristic species sequences, and in the near future whole genomes, gives insight into evolutionary changes, and thus possible regulatory mechanisms. The information which is acquired from fragments of aDNA (sometimes very short), and translated into the language of population genetics, may offer surprising data. The most important are: impact of sudden and slow climate changes on new species formation, cause of their extinction or even characteristic behaviour of the species.

Although aDNA research was launched only two decades ago, rapid methodological progress in the field is observed due to growing knowledge of DNA chemical degradation. More and more sophisticated analytical procedures have made DNA retrieval possible, which is especially important in the case of extinct species.

Modification patterns of the chemical structure of DNA are reviewed in the paper. Degradation processes, which can significantly alter the authentic information encoded within the analysed sequence, are not the only obstacle encountered by an aDNA researcher. High risk of sample contamination with contemporary DNA needs to be considered as well. Special patience should be taken when the DNA of humans is analysed. Ubiquitous human sequences present in the surroundings can affect analysed samples at every step of the procedure, thus falsifying the obtained data. Therefore, a number of both simple and more sophisticated precautions should be undertaken by researchers, including the stage of archaeological sampling, collection, DNA isolation and analysis — in order to avoid contamination with modern molecules. A few methods commonly applied to authenticate the results as well as interpret the obtained data are discussed.

Diverse applications of the analysis of historical templates were described in the literature, some of them, representative of different fields of interest (including evolution) have also been reviewed. These include the most recent and spectacular DNA sequencing of our closest relative, i.e., Neandertal, as well as that of two extinct animals — the mammoth and the cave bear.

Key words: ancient DNA, evolution

Adres Autora:

Prof. nadzw. dr hab. Henryk W. Witas
Zakład Biologii Molekularnej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Sporna 36/50,
91-738 Łódź
hww@poczta.onet.pl

