Archeologia Polski, t. 60 (2015), pp. 164-177

HENRYK W. WITAS

O RYGORACH METODYCZNYCH ANALIZOWANIA KOPALNEGO DNA I SKUTKACH ICH NIEPRZESTRZEGANIA[1]

Abstrakt: Procedura analizy kopalnego DNA przedstawiona w rozdziale 5 obszernej monografii na temat szczątków z okresu kultury amfor kulistych (stanowisko Koszyce 3; M. Kuś, A. Ossowski 2013) sugeruje szereg metodycznych nieprawidłowości. Analiza DNA tego samego materiału przeprowadzona zgodnie z powszechnie przyjętymi rygorami analizy kopalnego DNA każe wątpić w autentyczność publikowanych sekwencji oraz sposób interpretowania uzyskanych danych.

Słowa kluczowe: kopalny DNA, sekwencjonowanie DNA, mtDNA, haplotyp, haplogrupa.

Abstract: An overview of the methods used by the authors of Chapter 5 from a monograph on analysis of the Globular Amphorae culture remains from the Koszyce site 3 (M. Kuś, A. Ossowski 2013) suggests a series of methodological objections. DNA analysis of the same material performed in accordance with generally accepted rigors of ancient DNA research raises doubts about authenticity of the published sequences and their interpretation.

Keywords: ancient DNA, DNA sequencing, mtDNA, haplotype, haplogroup.

WSTĘP

Niedawno miałem okazję zapoznać się z elektronicznym egzemplarzem obszernej monografii, której treść niesie ze sobą potężny ładunek informacji o wartości bioarcheologicznej. Jako badacz z doświadczeniem w analizowaniu kopalnego DNA (aDNA) winien jestem szerokiej rzeszy archeologów oraz antropologów ocenę wyników przedstawionych w rozdziale 5 tej pozycji

[1] Praca przygotowana w ramach realizacji projektu badawczego NCN nr 2013/08/M/HS3/00379.

(M. Kuś, A. Ossowski 2013, s. 109), zarówno z punktu widzenia poprawności przeprowadzonego izolowania i analizy mitochondrialnego DNA, jak i interpretacji uzyskanych danych.

Badanie DNA izolowanego z materiałów kopalnych jedynie z pozoru nie różni od analizy DNA ludzi żyjących współcześnie, stosowanej m.in. na użytek diagnostyki lub kryminalistyki. Omawiana analiza jest niemal wzorcowym tego przykładem. Decyzję o napisaniu poniższego tekstu podjąłem, aby przestrzec środowisko archeologów i antropologów przed publikowaniem nieweryfikowanych danych molekularnych. Jak uczy historia badań aDNA, niezrozumienie istoty i przebiegu całego procesu badawczego, od wydobycia szczątków, poprzez izolowanie cząsteczek, ich identyfikację i analizę, a w rezultacie nieprzestrzeganie procedur określonych rygorem pracy, przekłada się na identyfikowanie nieautentycznych fragmentów DNA, błędne wnioskowanie i zniekształcenie informacji o badanym osobniku. Nietrudno ocenić, jak dalece może być to mylące i szkodliwe dla procesu rekonstrukcji przeszłości.

Niedoskonały, moim zdaniem, jest także sam proces wydawniczy wspomnianej publikacji, skoro omawiany tekst, odstający od reszty rozdziałów przedmiotem analizy i stosowaną metodyką, nie spotkał się z oceną merytoryczną badacza z doświadczeniem w tego typu analizach.

Przygotowując tekst, kierowałem się własną wieloletnią praktyką, wiedzą i opiniami na temat procesu badawczego zaczerpniętymi z literatury przedmiotu, a także – co jest kluczowe dla przedstawianej oceny – wynikami analizy porównawczej tego samego materiału kopalnego, możliwej dzięki uprzejmości dr hab. Anity Szczepanek z Katedry Anatomii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz dra hab. Wiesława Lorkiewicza z Katedry Antropologii Uniwersytetu Łódzkiego, którzy dostarczyli materiał do badań.

KILKA PODSTAWOWYCH INFORMACJI O KOPALNYM DNA

W badaniach, których głównym przedmiotem jest analiza sekwencji DNA izolowanego z organizmów żyjących w przeszłości, dwie grupy czynników decydują o ich powodzeniu. Pierwsza wiąże się z właściwościami wypełniska, głównie jego pH i temperaturą, a nie, jak wykazano wcześniej, z czasem upływającym od śmierci organizmu (J. Elsner, J. Schibler, M. Hofreiter, A. Schlumbaum 2014, s. 1; S. Pääbo, H.N. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Despres, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, I. Vigiland, M. Hofreiter 2004, s. 645). Warunkują one przebieg procesów tafonomicznych, w tym szybkość degradacji/modyfikacji struktury chemicznej oraz zakres jakościowych i ilościowych zmian DNA (A.W. Briggs, U. Stenzel, P.L. Johnson, R.E. Green, J. Kelso, K. Prufer, M. Meyer, J. Krause, M.T. Ronan, M.T. Lachmann, S. Pääbo 2007, s. 14616). Druga to zanieczyszczenie egzogennymi cząsteczkami DNA. O ile badacz nie ma wpływu na pH i temperaturę otoczenia, w którym zdeponowana jest próba przed wydobyciem, o tyle może ocenić, a nawet kontrolować, udział prawdopodobnych zanieczyszczeń w puli izolowanych fragmentów i oszacować udział autentycznych, które należą do badanego osobnika. Kopalne cząsteczki analizować można na dwa sposoby. Procedura klasyczna, stosowana niemal od początku historii badań aDNA, tj. od trzech dekad (M. Hofreiter, D. Serre, H.N. Poinar, M. Kuch, S. Pääbo 2001, s. 353; M.T. Gilbert, E. Willrslev, A.J. Hansen, I. Barnes, L. Rudbeck, N. Lynnerup, A. Cooper 2003, s. 32; E. Willerslev, A. Cooper 2005, s. 3), najczęściej do analizy krótkich fragmentów i pojedynczych zmian, składa się z trzech głównych, następujących po sobie, etapów – izolowania cząsteczek DNA, ich namnażania (PCR) i sekwencjonowania produktów PCR metodą Sangera (F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson 1977, s. 5463). Głównie ze względu na wieloetapowość procesu i udział w nim wielu osób, jest on wrażliwy na zanieczyszczenia, i stąd konieczność kontrolowania jego przebiegu na każdym etapie. Druga metoda, stosowana od 2005 r. (M. Margulies, M. Egholm, W.E. Altman, S. Attiya, J.S. Bader, L.A. Bemben, J. Berka, M.S. Braverman, Y.J. Chen, Z. Chen, S.B. Dewell, L. Du, J.M. Fierro, X.V. Gomes, B.C. Godwin, W. He, S. Helgesen, C.H. Ho,

G.P. Irzyk, S.C. Jando, M.L. Alenquer, T.P. Jarvie, K.B. Jirage, J.B. Kim, J.R. Knight, J.R. Lanza, J.H. Leamon, S.M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K.L. Lohman, H. Lu, V.B. Makhijani, K.E. McDade, M.P. McKenna, E.W. Myers, E. Nickerson, J.R. Nobile, R. Plant, B.P. Puc, M.T. Ronan, G.T. Roth, G.J. Sarkis, J.F. Simons, J.W. Simpson, M. Srinivasan, K.R. Tartaro, A. Tomasz, K.A. Vogt, G.A. Volkmer, S.H. Wang, Y. Wang, M.P. Weiner, P. Yu, R.F. Begley, M.J. Rothberg 2005), określana jest mianem sekwencjonowania nowej generacji, NGS (New Generation Sequencing), lub sekwencjonowaniem wysokoprzepustowym, HTS (High Throughput Sequencing; np. R.E. Green, A.W. Briggs, J. Krause, K. Prüfer, H.A. Burbano, M. Siebauer, M. Lachmann, S. Pääbo 2009; D. Reich, R.E. Green, M. Kircher, J. Krause, N. Patterson, E.Y. Durand, B. Viola, A.W. Briggs, U. Stenzel, P.L. Johnson, T. Maricic, J.M. Good, T. Marques-Bonet, C. Alkan, Q. Fu, S. Mallick, H. Li, M. Meyer, E.E. Eichler, M. Stoneking, M. Richards, S. Talamo, M.V. Shunkov, A.P. Derevianko, J.J. Hublin, J. Kelso, M. Slatkin, S. Pääbo 2010; E. Rizzi, M. Lari, E. Gigli, G. De Bellis, D. Caramelli 2012; S. Sawyer, J. Krause, K. Guschanski, V. Savolainen, S. Pääbo 2012). Wykorzystywana głównie w sekwencjonowaniu genomów, metodyka NGS nie wymaga klonowania, pozwala ocenić zmiany struktury chemicznej DNA występujące *post mortem*, a nawet wykorzystać je do oceny autentyczności analizowanej sekwencji, jako efekt jednoczesnego sekwencjonowania ogromnej liczby cząsteczek z badanej próby. Najnowsze urządzenia do NGS pozwalają określić w czasie jednego oznaczenia 10^{12} nukleotydów w preparacie i pięćdziesięciokrotnie wykonać procedurę oznaczania badanej sekwencji z ilości materiału nie większej niż 1 μg. Więcej szczegółów na temat NGS znajdzie czytelnik, korzystając z literatury tematu (np. M. Knapp, M. Hofreiter 2010, s. 227; M. Hofreiter, J.L.A. Paijmans, H. Goodchild, C.F. Speller, A. Barlow, G.G. Fortes, J.A. Thomas, A. Ludwig, M.J. Collins 2015, s. 284)

GŁÓWNE ZASTRZEŻENIA METODYCZNE

Pierwsze zastrzeżenie dotyczy izolowania i analizowania DNA z jednego tylko fragmentu szkieletu, w tym przypadku jednego zęba od każdego osobnika, praktyki dopuszczalnej jedynie w przypadku NGS. Wybrana przez autorów metoda, wciąż stosowana równolegle z NGS (R. Bollongino, O. Nehlich, M.P. Richards, J. Orschiedt, M.G. Thomas, C. Sell, Z. Fajkosová, A. Powell, J. Burger 2013), wymaga potwierdzania autentyczności analizowanego fragmentu, tj. klonowania produktów PCR (W. Haak, O. Balanovsky, J.J. Sanchez, S. Koshel, V. Zaporozhchenko, C.J. Adler, C.S. Der Sarkissian, G. Brandt, C. Schwarz, N. Nicklisch, V. Dresely, B. Fritsch, E. Balanovska, R. Villems, H. Meller, K.W. Alt, A. Cooper; Members of the Genographic Consortium 2010; T.S. Plantinga, S. Alonso, N. Izagirre, M. Hervella, R. Fregel, J.W. van der Meer, M.G. Netea, C. de la Rúa 2012) lub, co ustalono stosunkowo niedawno, izolowania, sekwencjonowania i analizy DNA z więcej niż jednego fragmentu materiału szkieletowego od danego osobnika (M. Winters, J.L. Barta, C. Monroe, B.M. Kemp 2011).

Jednym z powszechnie stosowanych sposobów kontroli zanieczyszczenia generowanego po wydobyciu próby na stanowisku jest oznaczanie haplotypów, charakterystycznych osobniczo cech mtDNA, należących do osób mających kontakt z badaną próbą, co autorzy omawianej pracy najpewniej przeoczyli. Wiadomo, że archeolodzy, a także antropolodzy opisujący cechy próby, osoby transportujące ją, przechowujące itd., są najczęstszym źródłem zanieczyszczenia. Potwierdzają to doświadczenia innych (np. M.L. Sampietro, M.T. Gilbert, O. Lao, D. Caramelli, M. Lari, J. Bertranpetit, C. Lalueza-Fox 2006; E. Pilli, A. Modi, C. Serpico, A. Achilli, H. Lancioni, B. Lippi, F. Bertoldi, S. Gelichi, M. Lari, D. Caramelli 2013) oraz nasze (np. H.W. Witas, J. Tomczyk, K. Jędrychowska-Dańska, G. Chaubey, T. Płoszaj 2013; W. Lorkiewicz, T. Płoszaj, K. Jędrychowska-Dańska, E. Żądzińska, D. Strapagiel, E. Haduch, A. Szczepanek, R. Grygiel, H.W. Witas 2015; H.W. Witas, T. Płoszaj, K. Jędrychowska-Dańska, P.J. Witas, A. Masłowska,

B. Jerszyńska, T. Kozłowski, G. Osipowicz 2015; T. Płoszaj, B. Jerszyńska, K. Jędrychowska-Dańska, M. Lewandowska, D. Kubiak, K. Grzywnowicz, A. Masłowska, H.W. Witas 2015). Zdarza się, że do mojego Zakładu dociera pięć prób przeznaczonych do analizy kopalnego DNA, a towarzyszy im więcej niż 10 prób, które pochodzą od archeologów i osób, które miały kontakt z materiałem szkieletowym! Dzięki takiej praktyce dysponujemy już całkiem pokaźną bazą mtDNA osób współpracujących, co znacznie ułatwia weryfikację kolejnych prób. Okazało się, że autorzy rozdziału 5 poprzestali na oznaczeniu wyłącznie własnych haplotypów, choć z pewnością dostęp do DNA innych uczestników projektu badawczego realizowanego na stanowisku Koszyce 3 nie był trudny (wykopaliska rozpoczęły się w 2006 r.). Stosując powyższe postępowanie należy oczywiście założyć, że nie cały materiał kostny był zanieczyszczony w jednakowym stopniu, co próbowaliśmy potwierdzić, izolując i analizując DNA od osobników przebadanych przez zespół z PUM (Pomorski Uniwersytet Medyczny).

Powtarzające się w kilku próbach identyczne zmiany sekwencji HVR-I mtDNA (tabela 1, np. osobniki 1, 3, 6, 12), według autorów z PUM, świadczą o wspólnym pochodzeniu w linii żeńskiej. Chociaż w przypadku badanego materiału taka sytuacja jest prawdopodobna, znalezienie tych samych cech DNA w wielu próbach może także sygnalizować ich zanieczyszczenie cząsteczkami DNA członka zespołu realizującego. Warto wspomnieć, że cząsteczki egzogennego DNA zanieczyszczające badaną próbę mogą być wielokrotnie liczniejsze niż autentyczne, co znacznie utrudnia, a często uniemożliwia, identyfikację fragmentów endogennych, ułatwiając jednocześnie oznaczanie egzogennych.

Kolejne poważne zastrzeżenie metodyczne wynika ze sposobu traktowania materiału do badań. Treść rozdziału 5 sugeruje, że czyszczenie i kruszenie materiału kostnego oraz izolowanie DNA wykonywane były w pomieszczeniu, w którym rutynowo badany jest materiał współczesny. Należy zatem sądzić, że zanieczyszczenie mogło pochodzić nie tylko od ludzi mających kontakt z materiałem na stanowisku archeologicznym, ale także z pomieszczeń, w których izolowano i analizowano wcześniej tzw. współczesny DNA. Wspomniane przez autorów zabezpieczenie przed zanieczyszczeniem w postaci noszenia przez biologów molekularnych ubrania ochronnego, w tym nawet podwójnych rękawic, nie zmienia statusu materiału szkieletowego, jeśli został on wcześniej zanieczyszczony na stanowisku archeologicznym lub jest zanieczyszczany w laboratorium. Konieczność przygotowywania materiału kopalnego i izolowania DNA w pomieszczeniu, w którym nigdy nie analizowano cząsteczek współczesnego DNA, jest jednym z dziewięciu rygorów sformułowanych już w roku 2000 i należy do niewielu spośród tych, które przetrwały próbę czasu (A. Cooper, H.N. Poinar 2000).

W ustępie o przygotowywaniu materiału do izolowania DNA autorzy pracy piszą „...fragmenty kostne zostały oczyszczone z zewnątrz jałowymi wymazówkami nasączonymi 5% roztworem podchlorynu sodu, a potem wodą destylowaną". Powszechne stosowanie tego silnego utleniacza, aby wyeliminować egzogenne cząsteczki DNA, wymaga nieco bardziej zdecydowanego działania niż tylko „czyszczenia wymazówkami". Otóż, całe fragmenty, np. zęby, przygotowywane do izolowania DNA są zazwyczaj moczone w roztworze NaOCl o stężeniu od 3% do 6% minimum przez 15 minut, a często dłużej, nawet przez godzinę (B.M. Kemp, D.G. Smith 2005; J.L. Barta, C. Monroe, B.M. Kemp 2013). Niektórzy autorzy wcześniej rozdrabniają fragment kostny, po czym inkubują uzyskany proszek w podchlorynie (M. Salamon, N. Tuross, B. Arensburg, S. Weiner 2005). Należy zaznaczyć, że nawet przedłużona do godziny inkubacja zęba nie gwarantuje całkowitego usunięcia cząsteczek egzogennego DNA, więc wynik porównania „kąpieli" w roztworze NaOCl z „czyszczeniem wymazówkami" nie jest trudny do przewidzenia. Najpewniej, zasadne i wystarczające jest stosowanie takiej procedury do analizy współczesnego materiału, ponieważ, jak wspomniałem, proporcja zawartości DNA endogennego do egzogennego jest wielokrotnie większa w próbach współczesnych i zanieczyszczenie

Tabela 1. Porównanie wyników analizy mtDNA wyizolowanego przez niezależne laboratoria z materiału kostnego 10 osobników ze stanowiska Koszyce 3 (kultura amfor kulistych)
Table 1. Comparison of mtDNA sequences isolated from 10 individuals from the Koszyce 3 archaeological site and analyzed by independent labs (Globular Amphorae culture)

	Zakład Medycyny Sądowej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie		Zakład Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi		
Nr próby	Haplotyp (HVR-I)	Haplo-grupa*	Haplotyp (HVR-I)	Haplo-grupa	Trawienie 7025
1	16270T 16356C	H1ba lub U5	16223T 16234T 16263C 16294T 16304C	M/T	+
2	brak produktu		brak produktu		
3	16270T 16356C	H1ba lub U5	19189C 16316G	H27	–
4	16294T 16304C	H5a4	16172C/T 16224T/C 16304C	F/R	+
5	brak produktu		brak produktu		
6	16270T 16356C	H1ba lub U5	brak produktu		
7	brak produktu		nie oznaczano		
8	16126C 16294T 16296T 16304C	T2b	16134C/T 16172C/T	?	+
9	16270T 16356C	H1ba lub U5	16183C/T 16189C/T 16217C/T	B4	+
10	16294T 16304C	H5a4	16134T/C 16188T/C 16298C	HV0	+
11	16294T 16354T	H2a1	brak produktu		
12	16270T 16356C	H1ba lub U5	16224C 16311C	K	+
13	brak produktu		16189C/T 16176A/C 16157T/C	?	+
14	brak produktu		16298C	HV0	+
15	16192T 16270T	U5	16298C	HV0	+

Objaśnienia: * haplogrupa określana na podstawie haplotypów uzyskanych przez zespół PUM; „+" miejsce restrykcyjne *Alu*I w części kodującej mtDNA w pozycji 7025, które wskazuje na haplogrupę mtDNA inną niż H; haplogrupy określano na podstawie bazy danych HaploGrep.

Explanation: * haplogroup determined on the basis of haplotypes obtained by the Department of Forensic Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin team; "+" corresponds to the *Alu*I restriction site within the coding region of mtDNA in position 702, suggesting a haplogroup other than hg H. Haplogroups were identified with the help of the HaploGrep database.

jest praktycznie nieidentyfikowalne w przeciwieństwie do próby sprzed 4 tys. lat. Z tego m.in. faktu powinna, w przypadku stosowania procedury klasycznej, wynikać troska o zapobieganie zanieczyszczeniom i skuteczne ich eliminowanie, a także weryfikowanie uzyskanych danych, bądź na podstawie analizy produktów klonowania z udziałem bakterii, bądź dzięki wielokrotnemu powtórzeniu stosowanej procedury z więcej niż jednego fragmentu szkieletu tego samego osobnika, co jest praktykowane przez innych (O.O. Sverrisdottir, A. Timpson, J. Toombs, C. Lecoeur, P. Froguel, J.M. Carretero, J.L. Arsuaga Ferreras, A. Götherström, M.G. Thomas 2014) i przez nas (H.W. Witas, J. Tomczyk, K. Jędrychowska-Dańska, G. Chaubey, T. Płoszaj 2013; T. Płoszaj, B. Jerszyńska, K. Jędrychowska-Dańska, M. Lewandowska, D. Kubiak, K. Grzywnowicz, A. Masłowska, H.W. Witas 2015; H.W. Witas, T. Płoszaj, K. Jędrychowska-Dańska, P.J. Witas, A. Masłowska, B. Jerszyńska, T. Kozłowski, G. Osipowicz 2015).

Z punktu widzenia rozważań metodycznych trudno także zrozumieć powód, dla którego autorzy nie zamieścili w tekście dokładnego opisu postępowania lub właściwego doń odniesienia do literatury, ponieważ jego pominięcie znacznie utrudnia ocenę poprawności przeprowadzonej analizy. Nieznane są tak istotne parametry, jak długość namnażanego odcinka HVR-I mtDNA, rodzaj stosowanych polimeraz, sekwencja starterów, których autorzy używali, brakuje profilu temperaturowego PCR itd. Nie wyjaśniono także, jaki był powód stosowania dwóch metod izolowania DNA, ponieważ w tekście ani nie porównano wydajności, ani nawet nie wyjaśniono, którą z nich stosowano. Mam nieodparte wrażenie, że autorzy posługiwali się gotowymi zestawami odczynników i ustalonymi przez producenta warunkami analizy zupełnie innego rodzaju materiału badawczego, co zwykli wykorzystywać w ich codziennej praktyce. Często, uwzględniając stopień zanieczyszczenia inhibitorami PCR, stopień degradacji DNA, zawartość namnażalnych cząsteczek – dzięki ilościowej PCR, możliwość tworzenia wiązań krzyżowych DNA-DNA lub DNA-białko, należy zmienić wartość szeregu parametrów związanych z namnażaniem kopalnego DNA, w tym m.in. liczbę cykli PCR, zawartość jonów magnezu, a także zastosować inny rodzaj polimerazy.

O ZNACZENIU ANALIZY mtDNA

Identyfikacja haplotypów mtDNA, wykorzystywana m.in. do identyfikacji osobniczej i analizy filogenetycznej, często ograniczana jest do najbogatszego w zmiany i niosącego największy ładunek informacji odcinka HVR-I mtDNA (mtDNA hypervariable region I). Jednak w przypadku wątpliwości konieczna jest weryfikacja oznaczonego haplotypu i haplogrupy poprzez identyfikację zmian w innych fragmentach HVR mtDNA, tj. HVR-II i HVR-III, a także w ważnych informacyjnie miejscach polimorficznych zlokalizowanych w regionie kodującym cząsteczki. Rutynowo wykonujemy analizę restrykcyjną, której wynik zazwyczaj wyjaśnia, czy np. badany mtDNA należy do populacji cząsteczek wskazujących na haplogrupę H, czy nie. W tym konkretnym przypadku trawimy enzymem restrykcyjnym *Alu*I w pozycji 7025 (zob. tabela 1). Trawienie w pozycji 7025 (część kodująca mtDNA; oznaczenie w tabeli symbolem „+") wykluczyło haplogrupę H z wyjątkiem próby nr 3, gdzie oznaczyliśmy hg H27. Ku pełnemu zaskoczeniu, nasze dane pochodzące z dwukrotnie, niezależnie, przeprowadzonej procedury izolowania i analizy DNA, realizowanej według wcześniej opisanej metodyki (H.W. Witas, J. Tomczyk, K. Jędrychowska-Dańska, G. Chaubey, T. Płoszaj 2013; H.W. Witas, T. Płoszaj, K. Jędrychowska-Dańska, P.J. Witas, A. Masłowska, B. Jerszyńska, T. Kozłowski, G. Osipowicz 2015), nie potwierdziły w żadnym przypadku haplotypów opisanych przez zespół z PUM (tabela 1). Porównawcza analiza wyników zdaje się sugerować fakt, że szczeciński zespół nie znalazł zanieczyszczających cząsteczek tylko w tych próbach, które nie dały, według nich, produktu namnażania, tj. 2, 5, 7, 13 i 14, a brak produktu PCR w próbach analizowanych przez mój zespół, tj. 6 i 11, zdaje się potwierdzać to przypuszczenie (tabela 1). Szczegółowa analiza haplotypów i ostateczne ustalenie przez mój zespół haplogrupy jest niemożliwe bez kontynuowania oznaczeń w przypadku prób 8 i 13, a niepewne dane w przypadku prób 1 i 4 wynikają z braku dostatecznej ilości materiału do badań. Nasze dane są zupełnie odmienne od uzyskanych przez zespół z PUM i świadczą m.in. o braku sugerowanego w monografii pokrewieństwa w linii żeńskiej pomiędzy osobnikami 1, 3, 6, 9 i 12, natomiast wskazują na pokrewieństwo osobników 14 i 15, także w linii żeńskiej (zmiana 16298C, hg HV0).

Należy zaznaczyć, że o ile wynik analizy haplotypu prób 1, 3, 12, 14 oraz 15 uzyskany przez mój zespół (ryc. 1) nie nastręczał większego kłopotu podczas identyfikacji poszczególnych zmian sekwencji, o tyle w przypadku prób 4, 8, 9, 10 i 13 uzyskaliśmy wynik niepewny, jak zilustrowano

na przykładzie (ryc. 2). Występowanie więcej niż jednego nukleotydu, oznaczone strzałkami na ryc. 2, w tej samej pozycji łańcucha wymaga powtórzenia analizy, a oceniane na tym etapie sekwenogramy świadczyć mogą o zjawisku heteroplazmii, stosunkowo rzadkim we współczesnej populacji (A. Ramos, C. Santos, L. Mateiu, M. González Mdel, L. Alvarez, L. Azevedo, A. Amorim, M.P. Aluja 2013) i nie opisywanym dotąd w próbach kopalnych. Kiedy sekwencjonowanie tych ostatnich sugeruje heteroplazmię, to najpewniej powodem jest masowe zanieczyszczenie. Występowanie takich samych zmian, obserwowane przez zespół z PUM w pięciu spośród dziesięciu analizowanych preparatów, powinno wzbudzić jego czujność. Nasze doświadczenie podpowiada, że powtórzenie procedury z innym fragmentem materiału szkieletowego tego samego osobnika, rozcieńczenie preparatu jednoznaczne ze zmniejszeniem stężenia inhibitorów PCR, modyfikacja ustawień sekwenera lub kombinacja tych zabiegów zaskakująco skutecznie mogą wpłynąć na jakość uzyskanego sekwenogramu. Na przeszkodzie ustalenia przez mój zespół ostatecznego haplotypu i haplogrupy we wszystkich przypadkach stanął brak materiału biologicznego od osób zaangażowanych w procesie kolekcjonowania szczątków oraz wystarczającej liczby prób o wątpliwym wyniku. Oznaczone dotąd haplotypy i sugerowane na podstawie bazy danych HaploGrep haplogrupy (A. Kloss-Brandstatter, D. Pacher, S. Schonherr, H. Weissensteiner, R. Binna, G. Specht, F. Kronenberg 2011, s. 25) określają zupełnie inne od proponowanego przez autorów rozdziału 5 pochodzenie, niekiedy zaskakujące – hg M/T, hg F/R i hg B4 (możliwe pochodzenie azjatyckie), obok charakterystycznego dla neolitu (K, HV0, H27). Uzyskany wynik każe traktować jako kontrowersyjną treść dyskusji przedmiotowej monografii! Jakże odmiennej interpretacji – pochodzenia, pokrewieństwa, a także zdarzeń wiodących do powstania wspólnej mogiły – od przedstawionej na s. 259–264 (rozdział 15), może dostarczyć sekwencja autentycznych fragmentów mtDNA badanych osobników.

ODNIESIENIE WYNIKÓW DO DOSTĘPNYCH DANYCH

Odrębnym zagadnieniem jest przydatność stosowanej przez autorów rozdziału oceny prawdopodobieństwa wystąpienia identyfikowanego haplotypu na podstawie bazy EMPOP. Sami autorzy musieli mieć wątpliwości, stosując bazę EMPOP, ponieważ stwierdzili, używając charakterystycznych dla siebie nieco karkołomnych konstrukcji językowych, że „odnosi się [ona – H.W.] głównie do współczesnej populacji europejskiej, dlatego względem populacji neolitycznych, które nie posiadają specyficznych dla siebie [? – H.W.] baz danych, może stanowić podstawę do wysunięcia bardzo ogólnych wniosków". Stosowanie bazy danych mtDNA ludzi współcześnie żyjących do analizy cząsteczek ludzi żyjących 4 tys. lat temu jest nieporozumieniem i świadczy o zupełnym niezrozumieniu istoty zagadnienia. Sposób formowania współczesnej i pochodzenie europejskiej puli genowej jest aktualnie obiektem dociekań (np. I. Lazaridis, N. Patterson, A. Mittnik, G. Renaud, S. Mallick, K. Kirsanow, P.H. Sudmant, J.G. Schraiber, S. Castellano, M. Lipson, B. Berger, C. Economou, R. Bollongino, Q. Fu, K.I. Bos, S. Nordenfelt, H. Li, C. de Filippo, K. Prüfer, S. Sawyer, C. Posth, W. Haak, F. Hallgren, E. Fornander, N. Rohland, D. Delsate, M. Francken, J.M. Guinet, J. Wahl, G. Ayodo, H.A. Babiker, G. Bailliet, E. Balanovska, O. Balanovsky, R. Barrantes, G. Bedoya, H. Ben-Ami, J. Bene, F. Berrada, C.M. Bravi, F. Brisighelli, G.B. Busby, F. Cali, M. Churnosov, D.E. Cole, D. Corach, L. Damba, G. van Driem, S. Dryomov, J.M. Dugoujon, S.A. Fedorova, I. Gallego Romero, M. Gubina, M. Hammer, B.M. Henn, T. Hervig, U. Hodoglugil, A.R. Jha, S. Karachanak-Yankova, R. Khusainova, E. Khusnutdinova, R. Kittles, T. Kivisild, W. Klitz, V. Kučinskas, A. Kushniarevich, L. Laredj, S. Litvinov, T. Loukidis, R.W. Mahley, B. Melegh, E. Metspalu, J. Molina, J. Mountain, K. Näkkäläjärvi, D. Nesheva, T. Nyambo, L. Osipova, J. Parik, F. Platonov, O. Posukh, V. Romano, F. Rothhammer, I. Rudan, R. Ruizbakiev, H. Sahakyan, A. Sajantila, A. Salas, E.B. Starikovskaya, A. Tarekegn, D. Toncheva, S. Turdikulova,

I. Uktveryte, O. Utevska, R. Vasquez, M. Villena, M. Voevoda, C.A. Winkler, L. Yepiskoposyan, P. Zalloua, T. Zemunik, A. Cooper, C. Capelli, M.G. Thomas, A. Ruiz-Linares, S.A. Tishkoff, L. Singh, K. Thangaraj, R. Villems, D. Comas, R. Sukernik, M. Metspalu, M. Meyer, E.E. Eichler, J. Burger, M. Slatkin, S. Pääbo, J. Kelso, D. Reich, J. Krause 2014; I. Olalde, C. Lalueza-Fox 2015), zatem ocena prawdopodobieństwa wystąpienia haplotypu człowieka żyjącego tysiące lat temu, w populacji o innej strukturze genetycznej niż współczesna, często różnej również od sąsiadujących grup, o nieznanych z nimi relacjach, śladowej w porównaniu ze współczesną populacją liczebności i, w związku z tym, nieprzewidywalnym profilu zmian częstości cech, zdaje się być ponurym żartem. Do czegóż archeologowi lub antropologowi mogłaby przydać się taka informacja? Nawiasem mówiąc, żadnemu spośród badaczy analizujących kopalny DNA nie wpadł dotąd do głowy szaleńczy pomysł wykorzystania do analizy danych metodyki, która ma zupełnie inne zastosowanie. Zamiast bezużytecznej oceny prawdopodobieństwa występowania współcześnie zidentyfikowanej w materiale sprzed 4 tys. lat haplogrupy, należałoby spróbować ocenić np. relację z innymi, ancestralnymi i współczesnymi analizowanej populacjami, np. na podstawie indeksu utrwalenia (F_{ST}) (np. B. Bramanti, M.G. Thomas, W. Haak, M. Unterlaender, P. Jores, K. Tambets, I. Antanaitis-Jacobs, M.N. Haidle, R. Jankauskas, C.J. Kind, F. Lueth, T. Terberger, J. Hiller, S. Matsumura, P. Forster, J. Burger 2009) lub analizy PCA (Principle Component Analysis; np. G. Brandt, A. Szécsényi-Nagy, C. Roth, K.W. Alt, W. Haak 2014).

WARSTWA JĘZYKOWA

Choć przedstawiana polemika dotyczy warstwy metodycznej, należy choćby wspomnieć niektóre z poważniejszych braków dezinformujących niezorientowanych w temacie czytelników, głównie badaczy poruszających się w zupełnie innym obszarze wiedzy. Poniżej ustosunkuję się do niektórych z nich.

1. „Użyte zostały dwie pary starterów co pozwoliło na zsekwencjonowanie nici w obydwie strony i pozwoliło wykluczyć niepewne mutacje" (M. Kuś, A. Ossowski 2013, s. 110). Oprócz trudno akceptowalnych zawiłości językowych, zupełnie niezrozumiałe jest wykluczanie „niepewnych mutacji" poprzez sekwencjonowanie nici przeciwbieżnych. Czym „niepewne mutacje" różnią się od mutacji pewnych?

2. „Następnie mieszanina oczyszczona została przez dwie egzonukleazy, a produkt oczyszczania stanowił matrycę dla kolejnej reakcji PCR – procesu sekwencjonowania, która pozwala na odczyt kolejności nukleotydów budujących odcinek HV1 mitochondrialnego DNA" (M. Kuś, A. Ossowski 2013, s. 110). Pomijając niepoprawne sformułowanie zdania, m.in. „reakcja PCR" (litera R w skrócie oznacza reakcję), autorzy nie sygnalizują czytelnikowi sensu stosowania egzonukleaz (oczyszczanie – z czego i czego?), jakich enzymów używano, w jakich warunkach prowadzono reakcję, i jak długo. Nawiasem mówiąc, niektórzy (A.D. Briggs, U. Stenzel, M. Meyer, J. Krause, M. Kircher, S. Pääbo 2010) rzeczywiście stosują enzymy, ale nie egzonukleazy, a ich działanie sprowadza się w pewnym sensie do „oczyszczania". Dotyczy ono eliminowania z wyizolowanych fragmentów DNA głównego produktu degradacji chemicznej *post mortem*, tj. cząsteczek tyminy, która powstaje w wyniku deaminacji cytozyny. Stosowane są w mieszaninie dwa enzymy: uracylo-*N*-glikozylaza i endonukleaza Endo VIII. Pierwszy eliminuje z łańcucha DNA cząsteczki tyminy (zmienione cytozyny), pozostawiając miejsce apirymidynowe, drugi hydrolizuje łańcuch w miejscu apirymidynowym, chroniąc w ten sposób produkty PCR przed powielaniem błędów. Po raz kolejny mam wrażenie, że autorzy stosowali procedury/zestawy odczynników wykorzystywane w ich codziennej praktyce analizy tzw. współczesnego DNA.

3. „W przypadku degradacji DNA jądrowego, pokrewieństwo między osobnikami ocenić można na podstawie mutacji występujących w obrębie mitochondrialnego DNA" (M. Kuś,

A. Ossowski 2013, s. 110). Zdanie to wyraźnie wskazuje, że DNA jądrowy jest chemicznie zupełnie degradowany, co sugeruje, że jest bardziej wrażliwy na czynniki degradujące niż mtDNA, który zachowuje integralność cząsteczkową, co nie jest prawdą.

4. „W jednej komórce występować może od kilku do kilkunastu tysięcy sztuk mitochondriów, z czego każde może zawierać do 10 kulistych cząsteczek DNA. Liniowa forma mitochondrialnego DNA (warunkująca mniejszą podatność na degradację), ogromna ilość kopii, a także brak rekombinacji (spowodowany dziedziczeniem w linii matecznej) i mnogość polimorfizmów przydatnych przy identyfikacji, rzutuje na przewagę jego analiz w stosunku do STR" (M. Kuś, A. Ossowski 2013, s. 110). Fragment ten zawiera łącznie kilka merytorycznych nieścisłości. Początek zdania sugeruje, że mitochondria m o g ą występować w komórce n a s z t u k i. Tak czy inaczej, ich liczba „kilkanaście tysięcy" jest znacznie przesadzona. W cementoblaście i cementocycie tworzących cement zęba, najbogatszą w DNA jego część, i podobnie jak w osteocycie występuje ich niewiele w porównaniu z najbogatszym w mitochondria hepatocycie, który zawiera od 10^3 do 2×10^3 organelli. Wyjątkiem są ogromne oocyty, które mogą zawierać od 10^4 do 10^5 mitochondriów (M. Satoh, T. Kuroiwa 1991). Ponadto, wiadomo, że mtDNA jest koliste, a nie kuliste(!) i, jak sama nazwa wskazuje, nie może być jednocześnie liniowe! Zupełnie niezrozumiałe jest także sugerowanie większej podatności na degradację kolistej cząsteczki DNA w porównaniu z liniową. Prawdą jest, że znacznie większą wrażliwość na degradację chemiczną mają te nukleotydy, które są zlokalizowane w jednoniciowych zakończeniach fragmentów DNA powstających w wyniku degradacji chemicznej *post mortem* (A.W. Briggs, U. Stenzel, P.L. Johnson, R.E. Green, J. Kelso, K. Prüfer, M. Meyer, J. Krause, M.T. Ronan, M. Lachmann, S. Pääbo 2007). Nieprawdą jest, że mtDNA nie rekombinuje, dowodem na co, według Autorów, jest fakt przekazywania go w linii matczynej. Wiadomo, że cząsteczki mtDNA rekombinują w obrębie mitochondrium, przy czym z identycznymi cząsteczkami (B. Thyagarajan, R.A. Padua, C. Campbell 1996) i z tego powodu niedostrzegalne są zmiany spowodowane procesem. Efekt tego ostatniego zjawiska, brak mechanizmu naprawczego oraz znacznie większa częstość występowania mutacji w obrębie genomu mitochondrialnego w porównaniu z jądrowym decydują o wykorzystywaniu wyników analizy sekwencji mtDNA do oceny relacji filogenetycznych w linii matczynej.

Ponadto w artykule stosowane są niepoprawnie takie terminy, jak „polimorfizm", który oznacza zjawisko, i niepoprawnym jest jego używanie w sensie „zmiana". Praca obfituje w inne niewłaściwie stosowane określenia, np. „izolacja" zamiast „izolowanie", „kontaminacja" zamiast „zanieczyszczenie" itd.

PODSUMOWANIE

Powyżej przedstawiłem archeologom i antropologom tylko niektóre z metodycznych nieprawidłowości, które mogą wystąpić podczas analizowania kopalnego DNA przez niedoświadczonych badaczy i które w rezultacie decydują o uzyskaniu nieautentycznych danych oraz błędnym wnioskowaniu. Pokazuję, jak bardzo złudne może być ich przekonanie o możliwościach warsztatu stosowanego do analizy aDNA. Podejście Autorów – M. Kuś i A.Ossowskiego – jest zapewne właściwe w kontekście funkcjonowania laboratorium medycyny sądowej, ale z pewnością jest nieuzasadnione w przypadku badania aDNA. W rezultacie czego, dane uzyskane w wyniku analizy fragmentów o niepotwierdzonej autentyczności dyskwalifikuje je, jako źródło rzetelnej informacji o przeszłości, dostarczając fałszywej charakterystyki poszczególnych osobników i populacji oraz przyczynia się do mylnej oceny dynamiki zmian wewnątrz populacji i wzajemnych relacji pomiędzy populacjami indukowanych np. migracjami.

WYKAZ CYTOWANEJ LITERATURY

Barta J.L., Monroe C., Kemp B.M.
2013 *Further evaluation of the efficacy of contamination removal from bone surfaces*, "Forensic Science International", 231 (1–3), s. 340–348.

Bollongino R., Nehlich O., Richards M.P., Orschiedt J., Thomas M.G., Sell C., Fajkosova Z., Powell A., Burger J.
2013 *2000 years of parallel societies in Stone Age Central Europe*, "Science", 342 (6157), s. 479–481.

Bramanti B., Thomas M.G., Haak W., Unterlaender M., Jores P., Tambets K., Antanaitis-Jacobs I., Haidle M.N., Jankauskas R., Kind C.J., Lueth F., Terberger T., Hiller J., Matsumura S., Forster P., Burger J.
2009 *Genetic discontinuity between local hunter-gatherers and central Europe's first farmers*, „Science", 326 (5949), s. 137–140.

Brandt G., Szécsényi-Nagy A., Roth C., Alt K.W., Haak W.
2014 *Human paleogenetics of Europe – The known knowns and the known unknowns*, „Journal of Human Evolution", 79, 73–92.

Briggs A.W., Stenzel U., Johnson P.L., Green R.E., Kelso J., Prufer K., Meyer M., Krause J., Ronan M.T., Lachmann M., Pääbo S.
2007 *Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal*, „Proceedings of the National Academy of Sciences USA", 104 (37), s. 14616–14621.

Briggs A.W., Stenzel U., Meyer M., Krause J., Kircher M., Pääbo S.
2010 *Removal of deaminated cytosines and detection of in vivo methylation in ancient DNA*, „Nucleic Acids Research", 38, e87.

Cooper A., Poinar H.N.
2000 *Ancient DNA: do it right or not at all*, „Science", 289 (5482), s. 1139.

Elsner J., Schibler J., Hofreiter M., Schlumbaum A.
2014 *Burial condition is the most important factor for mtDNA PCR amplification success in Palaeolithic equid remains from the Alpine foreland*, „Archaeological and Anthropological Sciences", http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12520-014-0213-4.

Gilbert M.T., Willerslev E., Hansen A.J., Barnes I., Rudbeck L., Lynnerup N., Cooper A.
2003 *Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA*, „American Journal of Human Genetics", 72 (1), s. 32–47.

Green R.E., Briggs A.W., Krause J., Prufer K., Burbano H.A., Siebauer M., Lachmann M., Pääbo S.
2009 *The Neandertal genome and ancient DNA authenticity*, „The EMBO Journal", 28 (17), s. 2494–2502.

Haak W., Balanovsky O., Sanchez J.J., Koshel S., Zaporozhchenko V., Adler C.J., Der Sarkissian C.S., Brandt G., Schwarz C., Nicklisch N., Dresely V., Fritsch B., Balanovska E., Villems R., Meller H., Alt K.W., Cooper A.; Members of the Genographic Consortium
2010 *Ancient DNA from European early neolithic farmers reveals their near eastern affinities*, „PLoS Biol", 8 (11), e1000536.

Hofreiter M., Serre D., Poinar H.N., Kuch M., Pääbo S.
2001 *Ancient DNA*, „Nature Review Genetics", 2 (5), s. 353–359.

Hofreiter M., Paijmans J.L.A., Goodchild H., Speller C.F., Barlow A., Fortes G.G., Thomas J.A., Ludwig A., Collins M.J.
2015 *The future of ancient DNA: Technical advances and conceptual shifts*, „Bioessays", 37, s. 284–293.

Kemp B.M., Smith D.G.
2005 *Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth*, „Forensic Sciences International", 154 (1), s. 53–61.

Kloss-Brandstatter A., Pacher D., Schonherr S., Weissensteiner H., Binna R., Specht G., Kronenberg F.
2011 *HaploGrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups*, „Human Mutation", 32, s. 25–32.

Knapp M., Hofreiter M.
2010 *Next Generation Sequencing of Ancient DNA: Requirements, Strategies and Perspectives*, „Genes", 2010 (1), s. 227–243.

Kuś M., Ossowski A.
2013 *Analiza mtDNA ludzkich szczątków kostnych*, [w:] *Koszyce, stanowisko 3. Przemoc i rytuał u schyłku neolitu*. M.M. Przybyła, A. Szczepanek, P. Włodarczyk red., Kraków–Pękowice, s. 109–113.

Lazaridis I., Patterson N., Mittnik A., Renaud G., Mallick S., Kirsanow K., Sudmant P.H., Schraiber J.G., Castellano S., Lipson M., Berger B., Economou C., Bollongino R., Fu Q., Bos K.I., Nordenfelt S., Li H., de Filippo C., Prüfer K., Sawyer S., Posth C., Haak W., Hallgren F., Fornander E., Rohland N., Delsate D., Francken M., Guinet J.M., Wahl J., Ayodo G., Babiker H.A., Bailliet G., Balanovska E., Balanovsky O., Barrantes R., Bedoya G., Ben-Ami H., Bene J., Berrada F., Bravi C.M., Brisighelli F., Busby G.B., Cali F., Churnosov M., Cole D.E., Corach D., Damba L., van Driem G., Dryomov S., Dugoujon J.M., Fedorova S.A., Gallego Romero I., Gubina M., Hammer M., Henn B.M., Hervig T., Hodoglugil U., Jha A.R., Karachanak-Yankova S., Khusainova R., Khusnutdinova E., Kittles R., Kivisild T., Klitz W., Kučinskas V., Kushniarevich A., Laredj L., Litvinov S., Loukidis T., Mahley R.W., Melegh B., Metspalu E., Molina J., Mountain J., Näkkäläjärvi K., Nesheva D., Nyambo T., Osipova L., Parik J., Platonov F., Posukh O., Romano V., Rothhammer F., Rudan I., Ruizbakiev R., Sahakyan H., Sajantila A., Salas A., Starikovskaya E.B., Tarekegn A., Toncheva D., Turdikulova S., Uktveryte I., Utevska O., Vasquez R., Villena M., Voevoda M., Winkler C.A., Yepiskoposyan L., Zalloua P., Zemunik T., Cooper A., Capelli C., Thomas M.G., Ruiz-Linares A., Tishkoff S.A., Singh L., Thangaraj K., Villems R., Comas D., Sukernik R., Metspalu M., Meyer M., Eichler E.E., Burger J., Slatkin M., Pääbo S., Kelso J., Reich D., Krause J.
2014 *Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans*, „Nature", 513 (7518), s. 409–413.

Lorkiewicz W., Płoszaj T., Jędrychowska-Dańska K., Żądzińska E., Strapagiel D., Haduch E., Szczepanek A., Grygiel R., Witas H.W.
2015 *Between the Baltic and Danubian Worlds: The Genetic Affinities of a Middle Neolithic Population from Central Poland*, „PLoS One", 10 (2), e0118316.

Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y.J., Chen Z., Dewell S.B., Du L., Fierro J.M., Gomes X.V., Godwin B.C., He W., Helgesen S., Ho C.H., Irzyk G.P., Jando S.C., Alenquer M.L., Jarvie T.P., Jirage K.B., Kim J.B., Knight J.R., Lanza J.R., Leamon J.H., Lefkowitz S.M., Lei M., Li J., Lohman K.L., Lu H., Makhijani V.B., McDade K.E., McKenna M.P., Myers E.W., Nickerson E., Nobile J.R., Plant R., Puc B.P., Ronan M.T., Roth G.T., Sarkis G.J., Simons J.F., Simpson J.W., Srinivasan M., Tartaro K.R., Tomasz A., Vogt K.A., Volkmer G.A., Wang S.H., Wang Y., Weiner M.P., Yu P., Begley R.F., Rothberg J.M.
2005 *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors*, „Nature", 437, s. 376–380.

Olalde I., Lalueza-Fox C.
2015 *Modern humans' paleogenomics and the new evidences on the European prehistory*, „Science and Technology of Archaeological Research", 1 (1), s. 1–9.

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", 38, s. 645–679.

Pilli E., Modi A., Serpico C., Achilli A., Lancioni H., Lippi B., Bertoldi F., Gelichi S., Lari M., Caramelli D.
2013 *Monitoring DNA contamination in handled vs. directly excavated ancient human skeletal remains*, „PLoS One", 8 (1), e52524.

Plantinga T.S., Alonso S., Izagirre N., Hervella M., Fregel R., van der Meer J.W., Netea M.G., de la Rúa C.
2012 *Low prevalence of lactase persistence in Neolithic South-West Europe. European journal of human genetics*, „European Journal of Human Genetics", 20 (7), s. 778–782.

Płoszaj T., Jerszyńska B., Jędrychowska-Dańska K., Lewandowska M., Kubiak D., Grzywnowicz K., Masłowska A., Witas H.W.
2015 *Mitochondrial DNA genetic diversity and LCT-13,910 and deltaF508 CFTR alleles typing in the medieval sample from Poland*, „Homo", 66 (3), s. 229–250.

Ramos A., Santos C., Mateiu L., González Mdel M., Alvarez L., Azevedo L., Amorim A., Aluja M.P.
2013 *Frequency and Pattern of Heteroplasmy in the Complete Human Mitochondrial Genome*, „PLoS One", 8 (10), e74636.

Reich D., Green R.E., Kircher M., Krause J., Patterson N., Durand E.Y., Viola B., Briggs A.W., Stenzel U., Johnson P.L., Maricic T., Good J.M., Marques-Bonet T., Alkan C., Fu Q., Mallick S., Li H., Meyer M., Eichler E.E., Stoneking M., Richards M., Talamo S., Shunkov M.V., Derevianko A.P., Hublin J.J., Kelso J., Slatkin M., Pääbo S.
2010 *Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia*, „Nature", 468 (7327), s. 1053–1060.

Rizzi E., Lari M., Gigli E., De Bellis G., Caramelli D.
2012 *Ancient DNA studies: new perspectives on old samples*, „Genetics Selection Evolution", 44 (1), s. 21.

Salamon M., Tuross N., Arensburg B., Weiner S.
2005 *Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones*, „Proceedings of the National Academy of Sciences USA", 102 (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*, „Mololecular Biology and Evolution", 23 (9), s. 1801–1807.
Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.
1977 *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*, „Proceedings of the National Academy of Sciences USA", 74 (12), s. 5463–5467.
Satoh M., Kuroiwa T.
1991 *Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell*, „Experimental Cell Research", 196, s. 137–140.
Sawyer S., Krause J., Guschanski K., Savolainen V., Pääbo S.
2012 *Temporal Patterns of Nucleotide Misincorporations and DNA Fragmentation in Ancient DNA*, „PLoS One", 7 (3), e34131.
Sverrisdottir O.O., Timpson A., Toombs J., Lecoeur C., Froguel P., Carretero J.M., Arsuaga Ferreras J.L., Götherström A., Thomas M.G.
2014 *Direct estimates of natural selection in Iberia indicate calcium absorption was not the only driver of lactase persistence in Europe*, „Mololecular Biology and Evolution", 31 (4), s. 975–983.
Thyagarajan B., Padua R.A., Campbell C.
1996 *Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity*, „Journal of Biological Chemistry", 271, s. 27536–27543.
Willerslev E., Cooper A.
2005 *Ancient DNA*, „Proceedings of Royal Society Biological Sciences", 272 (1558), s. 3–16.
Winters M., Barta J.L., Monroe C., Kemp B.M.
2011 *To clone or not to clone: method analysis for retrieving consensus sequences in ancient DNA samples*, „PLoS One", 6 (6), e21247.
Witas H.W., Tomczyk J., Jędrychowska-Dańska K., Chaubey G., Płoszaj T.
2013 *mtDNA from the early Bronze Age to the Roman period suggests a genetic link between the Indian subcontinent and Mesopotamian cradle of civilization*, „PLoS One", 8 (9), e73682.
Witas H.W., Płoszaj T., Jędrychowska-Dańska K., Witas P.J., Masłowska A., Jerszyńska B., Kozłowski T., Osipowicz G.
2015 *Hunting for the LCT-13910*T allele between the Middle Neolithic and the Middle Ages suggests its absence in dairying LBK people entering the Kuyavia region in the 8th millennium BP*, „PLoS One", 10 (4), e0122384.

HENRYK W. WITAS

ON THE RIGORS OF METHODICAL ANALYSIS OF ANCIENT DNA AND CONSEQUENCES OF THEIR NEGLECT

Summary

A. Kuś and A. Ossowski, who apply classical forensic methodology in their everyday practice, have recently published data produced in analysis of ancient DNA (aDNA) from skeletons found at a Neolithic site Koszyce 3 (M. Kuś and A. Ossowski 2013, pp. 109–113). The description of DNA isolation procedure and subsequent molecular analysis raises a series of methodological objections, related to

ignorance of commonly accepted classical methodology. The results and their interpretation presented by the authors constitute an example of misunderstanding of the essence of aDNA analysis, which is only apparently similar to that of modern DNA commonly used in diagnostic or forensic practice.

The history of aDNA classical methodology teaches us that the nature and course of the entire research process, from the uncovering of remains, through isolation of molecules, to their identification and analysis, requires a rigorous procedure in order to guarantee, with the highest possible probability, analysis of authentic fragments and proper description of a studied individual, including his/her origin. It is not difficult to assess how far it can be confusing and detrimental to the process of reconstruction of the past, if the analyzed sequences are not authentic. The main objections concern the presented methodology, including the fact that DNA was isolated and analyzed only from one fragment of the skeleton, a practice acceptable only as a part of the NGS methodology. The haplotype identification of all people involved in the procedure, which starts at the archaeological site, is another methodological rigor not met by the authors, who limited the number of potentially contaminating mtDNA fragments to their own haplotypes. Another serious objection concerns the treatment of samples: cleaning and crushing of bone material as well as DNA isolation procedure were carried out in a room intended for the processing of modern molecules. Thus, contamination was possible not only from people who came into contact with the material, at the archaeological site for example, but also from lab spaces where modern DNA had earlier been isolated and analyzed. The above negligence favors massive contamination of ancient samples. It is obvious that the proportion of endogenous to contaminating DNA molecules in any ancient sample is many times smaller than in modern material. Data obtained after isolation and analysis of the same samples, performed according to the previously described methodology (H.W. Witas, J. Tomczyk, K. Jędrychowska-Dańska, G. Chaubey, T. Płoszaj 2013; W. Lorkiewicz, T. Płoszaj, K. Jędrychowska-Dańska, E. Żądzińska, D. Strapagiel, E. Haduch, A. Szczepanek, R. Grygiel, H.W. Witas 2015; H.W. Witas, T. Płoszaj, K. Jędrychowska-Dańska, P.J. Witas, A. Masłowska, B. Jerszyńska, T. Kozłowski, G. Osipowicz 2015; T. Płoszaj, B. Jerszyńska, K. Jędrychowska-Dańska, M. Lewandowska, D. Kubiak, K. Grzywnowicz, A. Masłowska, H.W. Witas 2015), confirmed the possibility of massive contamination of the studied samples as suggested above. We did not confirm the presence of any mtDNA haplotypes already published, not even a single HVR-I change being the same. Thus, the haplogroups presented by the authors and the origin of the studied individuals appears to be controversial.

Another questionable aspect of the publication is the way the data were interpreted. The authors applied the EMPOP database to follow the likelihood of identified haplotype occurrence. Using a description of modern mtDNA sequences to analyze sequences isolated from the remains of people living 4 Ky ago confirms a complete misunderstanding of the matter, for many reasons.

Looking for the probability of ancient haplotype occurrence among people living today is even more confusing in view of the fact that the genetic structure and size of a 4 Ky old population was completely different. Instead of useless assessment of the likelihood of ancient haplogroup occurrence today, one should attempt to assess the relationship with other contemporary populations, for which data are already available.

Adres Autora:

Prof. dr hab. Henryk W. Witas
Zakład Biologii Molekularnej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. G. Narutowicza 60
91-236 Łódź
henryk.witas@umed.lodz.pl
http://zbm.umed.pl