

DISKUSIA / DISCUSSION



DESATERO O STAROBYLÉ DNA PRO ARCHEOLOGY

Kristýna Brzobohatá*

**Oddělení genetiky a molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, brzobohata@sci.muni.cz*

<https://doi.org/10.46283/musarch.2020.2.06>

Analýza DNA z historických tkání se během posledních 30 let stala nedílnou součástí výzkumu historie a prehistorie. Genetická informace našich předků pomohla objasnit celou řadu otázek historie, archeologie i antropologie. Mísili se neandrtálci s anatomicky moderními lidmi? Jakou cestou a jakým způsobem se šířilo zemědělství? Jaký je historický genetický základ dnešních populací? Jak jsme se geneticky adaptovali na změny klimatu a způsobu života? To jsou jen ukázky otázek, na které analýza starobylé DNA přinesla odpověď. A také mnoho dalších otázek...

Před deseti lety nastal prudký rozvoj zcela nových genetických metod a technologií, který posunul limity stáří zkoumaných molekul z tisíců let na stovky tisíc let, z jednotlivých genů na celé genomy, dostupnost z několika málo prestižních pracovišť do všech větších univerzit a také výrazně redukoval náklady na výzkum. Technologický boom v oblasti analýzy genomu, pokročilé statistické a bioinformatické přístupy a dostupnost analýz však přinesly do oblasti analýzy starobylé DNA také zmatek, nové odborné termíny, ale i genetický žargon, což může být pro archeology značně nesrozumitelné. Snadno může dojít k rozpojení řetězce spolupracujících stran ARCHEOLOG/HISTORIK – ANTROPOLOG – GENETIK – BIOINFORMATIK. Nastává situace, kdy každý odborník pracuje na své části projektu bez dostatečných informací od svých spolupracovníků. Následně mohou být přehlédnuty zajímavé výsledky, špatně interpretovaná data, nebo není využitý celý potenciál genetického materiálu a informací v něm ukrytých.

Cílem následujícího textu je přehlednou a jednoduchou formou shrnout základní informace o starobylé DNA, analýzách starobylé DNA, jejich možnostech i limitech.

1. aDNA

aDNA je zkratka anglického termínu ancient DNA, co je označení pro molekuly DNA z historických nálezů (kosti, mumifikovaná tkáň, koprolity atd.). Český překlad nejlépe vystihuje spojení starobylá DNA. V místní odborné literatuře je možné se setkat také s pojmy historická DNA nebo archaická DNA, ty však nevycházejí z termínů používaných mezinárodní vědeckou komunitou nebo jejich význam se liší od anglického originálu.

Hranice mezi vzorkem označeným jako současný a starobylý je velmi nejasná a neurčuje ji ani tak chronologické stáří jako charakteristické rysy molekuly DNA – její nízké množství, fragmentárnost a přítomnost posmrtných změn v molekulovém řetězci a liší se také postupy jejich analýz (*Ob et al. 2012*).

2. Historie

Historie výzkumů starobylé DNA sahá do poloviny 80. let minulého století. Tehdy bylo potvrzeno, že DNA je velmi stabilní molekula schopná přežít desítky až stovky let (Pääbo *et al.* 1985a). První úspěšnou analýzou aDNA byl vzorek z vyhynulé zebry quagga získaný z kůže v Londýnském muzeu (Higuchi *et al.* 1984), na ni navázal Pääbo s výzkumem DNA z egyptské mumie (Pääbo 1985b) a Hagelberg a Clegg (1991) zaměřili na výzkum aDNA z kosterního materiálu. Pole výzkumů starobylých molekul vypadalo slibně a bez limitů. V roce 1992 byl publikován článek od Cano a kolektivu (1992) s výsledky analýzy aDNA staré miliony let. Původní optimismus vědce brzy přešel, když Stoneking a kolektiv (1995) prokázali, že se jedná o falešně pozitivní výsledky z kontaminací DNA, která byla do vzorků zanesena z prostředí. Devadesátá léta tedy pokračovala zaváděním opatření k zamezení kontaminace současnou DNA a systému postupů analýz, které ověřovaly získané výsledky. V roce 2000 Cooper a Poinar publikovali klíčovou práci, kde je detailně popsáno, jak postupovat při analýze aDNA (Cooper – Poinar 2000). Přelom a začátek milénia byl věnován optimalizacím extrakce starobylé DNA a aplikacím metod forenzní genetiky, které byly vyvinuty také na degradovaný materiál. Byly také rozšiřovány analýzy našeho vyhynulého příbuzného, neandrtálce, kdy zprvu se podařilo získat pouze mitochondriální DNA (Kriings *et al.* 1997) a později také jadernou DNA s konkrétními geny (Lalueza-Fox *et al.* 2007; Krause *et al.* 2007).

Klíčovým rokem pro rozvoj a dostupnost analýz aDNA ses stal rok 2010, kdy byla představena nová technologie pro rychlé, levné a spolehlivé čtení DNA – sekvenování nové generace (next gene sequencing – NGS). Vědci se tak dostali z úrovně čtení jednotlivých genů na celé genomy a získali tak dostatek informací o životě, migraci mísení anatomicky moderního člověka s neandrtálci a také s neznámým homonin/da Denisovanem, který obýval paleolitickou Asii (Green *et al.* 2010; Rasmussen *et al.* 2010; Reich *et al.* 2010). Dále proběhly rozsáhlé studie procesu neolitizace (Haak *et al.* 2010), na migraci v době bronzové (Lacan *et al.* 2011) a cílem analýzy aDNA se staly také lidské patogeny – *Yersinia pestis* (Bos *et al.* 2011) způsobující mor nebo *Mycobacterium tuberculosis* zodpovědné za tuberkulózu (Bouwman *et al.* 2012).

3. Kontaminace

Manipulace se vzorky aDNA a jejich analýza mají řadu specifík, předepsaných pravidel, opatření a postupů, které jsou podřízené jednomu cíli – zamezit zanesení současné DNA do vzorku DNA. Ke kontaminaci může dojít v jakékoli fázi jeho zpracování, proto, v ideálním případě, je nejvhodnější dodržovat protikontaminační opatření už od fáze odkryvu materiálu v terénu (Eshleman – Smith 2001; Hummel *et al.* 2003). Výzkumníci musí pracovat v takovém ochranném oděvu, aby pokryli celý povrch těla (kombinéza, rukavice, návleky, maska; Willerslev – Cooper 2005). Veškeré použité nástroje, spotřební materiál, pomůcky musí být ideálně jednorázové a DNA free kvality. Genetická analýza probíhá ve specializovaných laboratořích, kde nesmí být manipulováno se současnou DNA a pro každý krok analýzy je samostatná místnost – Laboratoř extrakce aDNA, Laboratoř amplifikace aDNA a post PCR laboratoř. Prostory musí být vybaveny UV lampami ničícími volnou DNA, uzavřenou cirkulací vzduchu a uzavřenými kabinety (boxy) pro manipulaci se vzorky (Knapp *et al.* 2012). Veškeré pracovní plochy jsou před a po práci ošetřeny chemickými činidly rozkládajícími DNA a vystaveny UV záření (Kirsanow – Burger 2012).

4. Poškození

Asi čtyři minuty po smrti organismu začínají nezvratné rozkladné procesy (Lindahl 1993). K nim lze zařadit i rozklad nukleových kyselin, které jsou enzymy – nukleázami rozštěpány na krátké úseky. Pro rozklad DNA je ale klíčová předposlední fáze rozkladu organismu diagenese. V tomto stádiu jsou organické složky kostní tkáně nahrazovány anorganickými látkami z okolí. aDNA je tak vystavena především účinkům vody, tedy hydrolytickému poškození a dále účinkům volných radikálů, které způsobují oxidativní poškození. Hydrolytické poškození vede k další fragmentárnosti molekuly a ta se pak zachovává o délce v rozmezí 70 – 150 bází – písmen (Lindahl 1993). Následkem oxidace

jsou pak zejména jednonukleotidové poškození, které se ale ve výsledcích může projevit jako mutace a je těžké jej odlišit od původní genetické informace (*Gilbert et al. 2003*).

5. Inhibitory

Spolu s aDNA jsou z historických tkání extrahovány také další nežádoucí látky. Ty v pozdějších fázích negativně ovlivňují činnost enzymů, což může vést až k falešně negativním výsledkům (*Sutlovic et al. 2005*). Nejčastěji jsou přítomny huminové kyseliny, kolagen, hem nebo vápenaté ionty.

6. Zachovalost

Zachovalost starobylé DNA je dána řadou faktorů. Zcela klíčový je faktor známý jako „thermal age“. Tento termín kombinuje dvě hlavní proměnné ovlivňující preservaci starobylých molekul – čas a teplotu okolí. Čas ovlivňuje délku působení vnějších vlivů, teplota, zejména její střídání, pak intenzitu. Čím je hodnota thermal age menší, tím je DNA zachovalejší (*Burger et al. 1999; Collins et al. 2002*). Nejlépe je aDNA zachovalá v nálezech z trvale zmrzlé půdy – permafrostu. V případě nálezů z permafrostu jsou většinou k dispozici nejen kosti, ale také měkké tkáně. Dalším optimálním prostředím jsou jeskyně. Ty se vyznačují velmi stabilním prostředím s minimem světla a mikroorganismů. Dále je možnost, že se kosti obalí brašitem a stanou se odolnějšími vůči okolním vlivům. Dalším negativním vlivem prostředí je voda způsobující hydrolytické poškození.

Většina aDNA, která je analyzována, nepochází z jader kostních buněk, ale z mezibuněčné hmoty, kam je uvolňována během kostní resorbce při kostní přestavbě (*Campos et al. 2012*). Tvoří agregáty s kolagenem a hydroxyapatitem, které ji obalují a zároveň chrání před vnějšími rozkladnými vlivy (*Amory et al. 2012; Grunewald et al. 2014*).

7. Metody

Analýza starobylé DNA je velkou metodickou výzvou a její postupy vždy kopírují nejnovější trendy a poznatky na poli molekulární genetiky. Celý postup lze rozdělit do několika kroků – vzorkování, také známé jako vzorkování, extrakce aDNA, amplifikace DNA a čtení řetězce DNA.

Vzorkování

Sběr a výběr vhodného zdroje aDNA ideálně začíná již během terénních archeologických prací (*Pilli et al. 2013*). Je vhodné skrývat kosterní materiál s ochrannými pomůckami popsanými výše. V tomto bodě je nutná úzká a dlouhodobá spolupráce s archeologickými institucemi zajišťujícími výzkum. Po odběru je důležité vzorek nechat v temnu a v chladnu, aby nedošlo k rozmnožení mikroorganismů nebo růstu plísní, neumývat ho a z naleziště ideálně co nejrychleji uložit v mrazničce. V prostředí osteologické laboratoře je potom tkáň očištěna a dále upravena tak k lyzování, tedy rozpuštění ve vhodném substrátu a odstranění nežádoucí složky.

Extrakce aDNA

Extrakce DNA se skládá ze dvou kroků – lyzace kostní tkáně, která je prováděna zároveň s demineralizací, tedy odstraněním vápníku a proteinů a samotné purifikace aDNA. Vstupní množství materiálu, který je nejčastěji z jemně pulverizovaného zubu, dlouhé nebo skalní kosti se pohybuje okolo 100 mg. Pro purifikaci DNA existuje několik metodických přístupů. Nejpoužívanější je ale princip, kdy se aDNA naváže na povrch silikátových kolonek, které jsou promývány pufrý odstraňujícími nečistoty. Na záměr je získáno asi 100 µl roztoku, v němž je aDNA rozpuštěna a stabilizována.

Amplifikace aDNA

Následuje krok namnožení, tedy amplifikace, DNA. Zde se v drtivě většině případů používá metoda zvaná polymerázová řetězová reakce – PCR (z angl. polymerase chain reaction) a její četné modifikace. Klíčovou roli hraje enzym Taq polymeráza, který dokáže za střídajících se teplot kopírovat DNA. Dále jsou v reakční směsi nukleotidy – „stavební kameny“ pro nové kopie, hořčičnaté ionty – pomáhající činnosti enzymu, voda, templátová DNA a primery – krátké syntetické úseky DNA, které ohraničují oblast zájmu, kterou je třeba kopírovat. Není totiž kopírován celý genom, všechny tři miliardy písmen, ale pouze krátké úseky zájmu. Například pohlaví je možné určit z úseku o délce okolo 100 nukleotidů.

Díky polymerázové řetězové reakci je získán dostatek kopií DNA, aby bylo možné ji přečíst písmeno po písmenu – sekvenovat. Pro jednodušší analýzy je možné zvolit starší verzi metody tzv. Sangerovo sekvenování. Je-li nutné číst rozsáhlejší části genomu, zvolí se metoda sekvenování nové generace, NGS (z angl. next generation sequencing). Tato metoda bývá také v odborné literatuře nazývána jako vysokokapacitní sekvenování (high throughput sequencing) nebo masivní paralelní sekvenování (massive parallel sequencing). Poslední uvedený název nejlépe vystihuje podstatu tohoto přístupu. Během jedné analýzy dochází k namnožení tisíců úseků DNA napříč genomem, které jsou zároveň sekvenovány. Následně jsou data ze sekvenace bioinformaticky zpracována a vyhodnocena.

Poslední popsaná metoda, NGS, sehrála ve výzkumu aDNA klíčovou roli. Pro tento přístup nejsou nutné vysoké koncentrace DNA a zároveň jistá fragmentárnost molekuly je naopak žádoucí. Každý úsek zájmu, je navíc přečten ne jednou, jako v případě Sangerova sekvenování, ale stokrát až tisíckrát. Díky bioinformatickým nástrojům specializovaným pro hodnocení NGS dat z aDNA (např. Paleomix) je možné detekovat mutace a s vysokou pravděpodobností určit, zda existovaly před smrtí nebo až vznikly až po smrti jako následek rozkladných procesů (Ginolhac *et al.* 2011).

8. Cíle

Jak bylo zmíněno v předešlé kategorii, většinou se analýzy aDNA zaměřují na stanovení určitého znaku (např. genetické pohlaví) nebo části DNA (např. mitochondriální DNA). Analýza celých genomů je zatím vzácná a bývá aplikována především na paleolitické genomy. Analýzy jsou odborně nazývány jako markery nebo targety, eventuálně se při analýze zaměříme na lokus – konkrétní úsek DNA. Při analýze jsou určovány polymorfismy, někdy také nazývané jako mutace. Jedná se o záměnu bází (základních písmen genetického kódu) v řetězci DNA, která dá vzniknout rozdílnému proteinu. Rozdíl mezi polymorfismem a mutací může být definován jeho četností v populaci. Polymorfismus se vyskytuje v častěji než v 1 případě z 1000, mutace s nižší četností. Další definice rozdílu spočívá ve fenotypovém projevu, tedy jak se záměna projeví na živém člověku. V případě, že se jedná pouze o varietu, je způsobena polymorfismem, pokud má ale patologické následky, jedná se o mutaci.

V lidské DNA lze rozlišit kódující úseky a nekódující úseky. V kódující DNA jsou cílem analýz geny pro proteiny a změna jejich fenotypu. V nekódujících úsecích je uložena zdánlivě balastní DNA. Určité úseky nekódující DNA jsou natolik unikátní, že jejich analýza se používá pro určení totožnosti a příbuzenství.

Zkoumané cíle se také mohou lišit typem dědičnosti. Buněčné organely mitochondrie se při oplození nacházejí pouze ve vajíčku, takže jsou děděny pouze po maternální (mateřské) linii. Chromozom Y je naproti tomu přenášen pouze z otce na syna, podobně jako příjmení, paternálně. Mitochondriální DNA a DNA z chromozomu Y se bývají označovány také jako gonozomální DNA a cílí především na stanovení původu po mateřské nebo otcovské linii. Autozomální DNA uložená v jádře je pak děděna z půlky od matky a z půlky od otce.

9. Verifikace / autentifikace

I přes všechna protikontaminační opatření není nikdy možné zcela vyloučit kontaminaci současnou DNA. Je proto nutné vždy přistupovat k získaným výsledkům velmi kriticky. Systém autentifikace/verifikace výsledků analýz

aDNA zahrnuje několik doporučení, která jsou součástí klíčových publikací o práci s aDNA (*Hofreiter et al. 2001; Gilbert et al. 2003; Willerslev – Cooper 2005*).

Získané výsledky je vždy nutné potvrdit analýzou nezávislých vzorků. Například je vhodné stanovit genetický profil z DNA ze zubu a dlouhé kosti. V ideálním případě následuje stejná analýza v nezávislé aDNA laboratoři. Je nutné znát genetické profily a sekvenci mitochondriální DNA všech pracovníků, kteří přišli se vzorky do styku. Součástí postupů jsou i slepé kontroly (*Yang et al. 2003*). Ty obsahují veškeré složky reakce, kromě kostního prášku, aDNA nebo produktu PCR. V těchto kontrolách bych nemělo docházet k žádné reakci. Dalším kontrolním krokem je přesné stanovení kvantity a kvality aDNA po extrakci. aDNA je zachovává ve fragmentech do 200 nukleotidů a řádově v pikogramech na mikrolitr extraktu. Při neočekávaných výsledcích je vhodné extrakci zopakovat. Další postup pomáhá odhalit nespecifickou environmentální kontaminaci. Ta může být způsobena například přítomností fekálií v půdě. V rámci naleziště je odebrán také vzorek tkáně zvířecího původu, je z něj extrahována aDNA a následně v ní probíhá detekce lidsky specifických markerů (*Hardy et al. 1995*). V případě pozitivního výsledku je vhodné postup zopakovat a dále zhodnotit vhodnost nálezů pro analýzu aDNA.

10. Příklad spolupráce na ose ARCHEOLOG/HISTORIK – ANTHROPOLOG – GENETIK – BIOINFORMATIK

Nové objevy v archeologii jsou často dílem náhody a štěstí, než vytrvalé píle proto často nelze dopředu odhadnout a plánovat antropogenetické analýzy. Nicméně význam nálezů může být rozpoznán velmi rychle a je vhodné se co nejrychleji zamyslet nejen nad spoluprací s antropology, ale také genetiky.

Osu spolupráce dobře reprezentuje příklad výzkumu lokality Popůvky u Brna. V roce zde bylo během stavebních prací odkryto pohřebiště kultury zvoncovitých pohárů. Odborníci z Moravského zemského muzea provádějící výzkum kontaktovali Laboratoř biologické a molekulární antropologie na Masarykově univerzitě, kde probíhá výzkum starobylé DNA. Následně byl pracovník muzea podrobně zaškolen do systému odběru vzorků pro analýzu aDNA v terénu. Systémem doporučeným používaným v LBMA, odebral za dekontaminačních podmínek dolní čelist a uložit ji do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následovalo předání do LBMA, kde byl z čelisti odejmut zub jako zdroj pro extrakci aDNA. Ačkoliv kosterní materiál z této lokality je špatně až středně dobře zachovalý, pilotní studie ukázala vysoké výťažky aDNA, vyšší než např. u slovanských raně středověkých nalezišť, která jsou lépe zachovalá, ale vzorkování neproběhlo vzorkování *in situ*. Na takovém materiálu je pak možné provádět i rozsáhlejší analýzy, např. sekvenovat kompletní mitochondriální DNA.

Etické aspekty a kontroverze analýzy starobylé DNA diskuze

Analýzu aDNA doprovází určitá míra kontroverze již téměř od založení tohoto oboru. V 90. letech ve vědecké komunitě vyvolaly rozsáhlou kritiku (*Austin et al. 1997*) publikace, v nichž byly popisovány analýzy DNA staré miliony let (*Cano et al. 1992*). Záhy se totiž ukázalo, že se jedná o kontaminace a na výsledky analýz starobylé DNA se dlouho nahlíželo s velkou mírou despektu. Na počátku milénia byl tento problém částečně vyřešen zavedením striktních protikontaminačních opatření, nicméně určitá míra zdravého skepticismu se v oboru zakotvila. Vlivem překotného rozvoje sekvenačních technologií za současného poklesu nákladů se analýzy starobylé DNA staly dostupné i mimo několik vybraných pracovišť na špičkových institucích. Rozvoj a dosažitelnost analýz aDNA s sebou přináší i etické otázky a problémy, k nimž se nelze stavět zády. Předvídaní a řešení důsledků vědecké práce je základní odpovědností všech vědců (*Wagner et al. 2020*). Etické otázky bádání je nutné řešit již od prvních kroků projektu, v případě analýzy aDNA ještě před odběrem vzorku pro analýzu aDNA. Aplikované metody jsou invazivní a destruktivní, proto by se vzorkování měla věnovat zvýšená pozornost a postup konzultovat s antropology a archeology, aby nebyl ztracen materiál vhodný i pro jiné analýzy. Přínosy analýzy by měly převažovat nad nenávratností ztráty historického materiálu. V mnoha případech totiž nemusí být analýza aDNA nejproduktivnějším přístupem. Například hledání rodinné vazby mezi pohřbeným a našimi současníky je drahé, obtížné a z vědeckého hlediska bez většího přínosu (*Kaestle – Horsburgh 2002*).

Řada odborníků také často kritizuje přístup ke vzorkům starobylé DNA. Už samotný termín „vzorek aDNA“ v sobě postrádá fakt, že je součástí lidského subjektu. Přístup k analýze aDNA by měl vycházet z doporučení, která již v minulosti řešila tyto otázky v souvislosti s archeologickým a antropologickým výzkumem.

U starobylé DNA samozřejmě není možné získat individuální souhlas s výzkumem, nicméně je třeba vždy dodržovat zákony dané země a etické zásady instituce provádějící výzkum. Tento bod se týká především výzkumů kosterních pozůstatků etnik, komunit či minorit, jejichž kulturní dědictví je stále živé. Nejčastěji se tento aspekt etického rozměru výzkumu řeší v souvislosti s analýzou aDNA domorodého obyvatelstva, kdy kosterní nálezy prokazatelně náleží jejich předkům. Zde je nanejvýš vhodné vysvětlit dotčeným domorodým menšinám jaký vědecký význam mohou analýzy DNA jejich předků poskytnout. Je doporučováno vypracovat podrobný plán, jak bude nakládáno s ostatky jejich předků, s jejich aDNA a také s výslednými daty (*Wagner et al. 2020*).

Další samostatnou kapitolou, která dává prostor pro vznik kontroverzí, je interpretace výsledků, protože analýza aDNA několikrát prokázala svůj potenciál přepisovat historii lidstva. Pomine-li se diskutabilnost zvolených vědeckých postupů, velikost souboru vzorků či aplikace vhodných bioinformatických či biostatistických metod, vyvstává problém s interpretací biologických dat v kontextu s daty kulturními. Zde hrozí vyvozování zavádějících závěrů s potenciálem politického zneužití (*Wolinsky et al. 2019*). Příkladem, kdy politici směšují jazykovou, kulturní a genetickou identitu, může být nedaleké Maďarsko, kde byly úspěšně geneticky analyzovány ostatky Belly III. z dynastie Arpádovců (*Olasz et al. 2019*). Výsledky studie použil pro své politické cíle premiér Maďarska Viktor Orbán a začal původ Maďarů odvozovat od Hunů vedených bojovníkem Attilou a potlačovat význam vlivu ugrofinských kmenů. Pro „dokazování správného původu“ Maďarů založil Ústav pro maďarská studia (*Wolinsky et al. 2019*).

Závěr

Názory na analýzu starobylé DNA se i v odborných archeologických kruzích liší a mohou dosahovat až extrémů. Od velmi optimistických polů, kdy je předpokládáno, že je možná genetická analýza ze všech historických vzorků za každé situace a výsledky dají odpověď na každou otázku až po pohled zcela opačný, kdy jsou používané postupy stále zatíženy despektem z možných kontaminací a jejich nevěrohodností. Další častý názor, který panuje, tvrdí, že výzkum aDNA je natolik finančně náročný, že je nedosažitelný. Genetické analýzy samozřejmě nejsou levné, ale nejsou ani nedostupné a informace, které mohou přinést, často nelze získat žádným jiným způsobem.

Bibliografie

- Amory, S. – Huel, R. – Bilić, A. – Loreille, O. – Parsons, T. J. 2012: Automatable full demineralization DNA extraction procedure from degraded skeletal remains. Forensic Science International: Genetics 6, 398–406.*
- Austin, J. J. – Ross, A. J. – Smith, A. B. – Fortey, R. A. – Thomas, R. H. 1997: Problems of reproducibility – does geologically ancient DNA survive in amber-preserved insects?. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 264(1381), 467–474.*
- Bos, K. I. – Schuenemann, V. J. – Golding, G. B. – Burbano, H. A. – Waglechner, N. – Coombes, B. K. – McPhee, J. B. – DeWhite, S. N. – Meyer, M. – Schmedes, S. – Earn, D. J. D. – Herring, A. D. – Bauer, P. – Poinar, H. – Krause, J. – Wood, J. 2011: A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. Nature 478(7370), 506–510.*
- Bowman, A. S. – Kennedy, S. L. – Müller, R. – Stephens, R. H. – Holst, M. – Caffell, A. C. – Roberts, C. A. – Brown, T. A. 2012: Genotype of a historic strain of *Mycobacterium tuberculosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences 109(45), 18511–18516.*

- Burger, J. – Hummel, S. – Hermann, B. – Henke, W. 1999: DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis* 20, 1722–1728.
- Campos, P. F. – Craig, O. E. – Turner-Walker, G. – Peacock, E. – Willerslev, E. – Gilbert, M. T. P. 2012: DNA in ancient bone—Where is it located and how should we extract it? *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* 194, 7–16.
- Cano, R. J. – Poinar, H. – Poinar Jr, G. O. 1992: Isolation and partial characterisation of DNA from the bee *Proplebeia dominicana* (Apidae: Hymenoptera) in 25–40 million year old amber. *Medical Science Research* 20, 249–251.
- Collins, M. J. – Nielsen-Marsh, C. M. – Hiller, J. – Smith, C. I. – Roberts, J. P. – Prigodich, R. V. – Weiss, T. J. – Csapò, J. – Millard, A. R. – Turner-Walker, G. 2002: The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry* 44, 383–394.
- Cooper, A. – Poinar, H. N. 2000: Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 5482(1139), 416.
- Eshleman, J. – Smith, D. G. 2001: Use of DNase to eliminate contamination in ancient DNA analysis. *Electrophoresis* 22, 4316–4319.
- Gilbert, M. T. P. – Willerslev, E. – Hansen, A. J. – Barnes, I. – Rudbeck, L. – Lynnerup, N. – Cooper, A. 2003: Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *The American Journal of Human Genetics* 72, 32–47.
- Ginolhac, A. – Rasmussen, M. – Gilbert, M. T. P. – Willerslev, E. – Orlando, L. 2011: mapDamage: testing for damage patterns in ancient DNA sequences. *Bioinformatics* 27(15), 2153–2155.
- Green, R. E. – Krause, J. – Briggs, A. W. – Maricic, T. – Stenzel, U. – Kircher, M. – Patterson, N. – Li, H. – Zhai, W. – Fritz, M. H. – Hansen, N. F. – Durand, E. Y. – Malaspina, A. S. – Jensen, J. D. – Marques-Bonet, T. – Alkan, C. – Prüfer, K. – Meyer, M. – Burbano, H. A. – Good, J. M. – Schultz, R. – Aximu-Petri, A. – Butthof, A. – Höber, B. – Höffner, B. – Siegemund, M. – Weibmann, A. – Nusbaum, C. – Lander, E. S. – Russ, C. – Novod, N. – Affourtit, J. – Egholm, M. – Verna, C. – Rudan, P. – Brajkovic, D. – Kucan, Z. – Gusic, I. – Doronichev, V. B. – Golovanova, L. V. – Lalueza-Fox, C. – de la Rasilla, M. – Fortea, J. – Rosas, A. – Schmitz, R. W. – Johnson, P. L. – Eichler, E. E. – Falush, D. – Birney, E. – Mullikin, J. C. – Slatkin, M. – Nielsen, R. – Kelso, J. – Lachmann, M. – Reich, D. – Pääbo, S. 2010: A draft sequence of the Neanderthal genome. *Science* 328(5979), 710–722.
- Grunenwald, A. – Keyser, C. – Sautereau, A. M. – Crubézy, E. – Ludes, B. – Drouot, C. 2014: Adsorption of DNA on biomimetic apatites: Toward the understanding of the role of bone and tooth mineral on the preservation of ancient DNA. *Applied Surface Science* 292, 867–875.
- Haak, W. – Balanovsky, O. – Sanchez, J. J. – Kosbel, S. – Zaporozhchenko, V. – Adler, C. J. – Der Sarkissian, C. S. I. – Brandt, G. – Schwartz, C. – Nicklisch, N. – Fritsch, B. – Balanovska, E. – Villems, R. – Meller, H. – Alt, K. W. – Cooper, A. – Dresely, V. 2010: Ancient DNA from European early neolithic farmers reveals their near eastern affinities. *PLoS biology* 8(11): e1000536.
- Hagelberg, E. – Clegg, J. B. 1991: Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 244(1309), 45–50.
- 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* 312(5991), 282–284.
- Hofreiter, M. – Serre, D. – Poinar, H. N. – Kuch, M. – Pääbo, S. 2001: ANCIENT DNA. *Nature reviews. Genetics* 2, 353.

- Hummel, S. 2003:* Introduction. In: Ancient DNA typing: methods, strategies and applications. Springer Science & Business Media, Berlin Heidelberg, 1–18.
- Kaestle, F. A. – Horsburgh, K. A. 2002:* Ancient DNA in anthropology: methods, applications, and ethics. American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists 119(S35), 92–130.
- Kirsanon, K. – Burger, J. 2012:* Ancient human DNA. Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger 194(1), 121–132.
- Knapp, M. – Clarke, A. C. – Horsburgh, K. A. – Matisoo-Smith, E. A. 2012:* Setting the stage—building and working in an ancient DNA laboratory. Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger 194, 3–6.
- Krause, J. – Lalueza-Fox, C. – Orlando, L. – Enard, W. – Green, R. E. – Burbano, H.A. – Hublin, J.J. – Hänni, C. – Fortea, J. – de la Rasilla, M. – Bertranpetit, J. – Rosas, A. – Pääbo, S. 2007:* The derived FOXP2 variant of modern humans was shared with Neandertals. Current biology 17, 1908–1912.
- Krings, M. – Stone, A. – Schmitz, R. W. – Krainitzki, H. – Stoneking, M. – Pääbo, S. 1997:* Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans. Cell 90(1), 19–30.
- Lacan, M. – Keyser, C. – Ricaut, F. X. – Brucato, N. – Duranthon, F. – Guilaine, J. – Crubézy, E. – Ludes, B. 2011:* Ancient DNA reveals male diffusion through the Neolithic Mediterranean route. Proceedings of the National Academy of Sciences 108(24), 9788–9791.
- Lalueza-Fox, C. – Römpler, H. – Caramelli, D. – Stäubert, C. – Catalano, G. – Hughes, D. – de La Rasilla, M. 2007:* A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. Science 318(5855), 1453–1455.
- Lindahl, T. 1993:* Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 362, 709–715.
- Oh, C. S. – Lee, S. J. – Park, J. B. – Lee, S. D. – Seo, S. B. – Kim, H. Y. – Kim, J. – Kim, Y. – Shin, D. H. 2012:* Autosomal Short Tandem Repeat Analysis of Ancient DNA by Coupled Use of Mini-and Conventional STR Kits. Journal of forensic sciences 57, 820–825.
- Olasz, J. – Seidenberg, V. – Hummel, S. – Szentirmay, Z. – Szabados, G. – Melegb, B. – Kásler, M. 2019:* DNA profiling of Hungarian King Béla III and other skeletal remains originating from the Royal Basilica of Székesfehérvár. Archaeological and Anthropological Sciences 11(4), 1345–1357.
- Pääbo, S. 1985a:* Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies. Journal of Archaeological Science 12(6), 411–417.
- Pääbo, S. 1985b:* Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. Nature 314(6012), 644–645.
- 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: e52524.
- Rasmussen, M. – Li, Y. – Lindgreen, S. – Pedersen, J. S. – Albrechtsen, A. – Moltke, I. – Metspalu, M. – Metspalu, E. – Kivisild, T. – Gupta, R. – Bertalan, M. – Nielsen, K. – Gilbert, M. T. P. – Wang, Y. – Raghavan, M. – Campos, P. F. – Kamp, H. M. – Wilson, A. S. – Gledhill, A. – Tridico, S. – Bunce, M. – Lorenzen, M. E. D. – Binladen, J. – Guo, X. – Zhao, J. – Zhang, X. – Zhang, H. – Li, Z. – Chen, M. – Orlando, L. – Kristiansen, K. – Bak, M. – Tommerup, N. – Bendixen, C. – Pierre, T. L. – Grønnow, B. – Meldgaard, M. – Andreassen, C. – Fedorova, S. A. – Osipova, L. P. – Higham, T. F. G. – Bronk Ramsey,*

- C. – Hansen, T. V. – Nielsen, F. C. – Cranford, M. H. – Brunak, S. – Sicheritz-Pontén, T. – Villemis, R. – Nielsen, R. – Krogh, A. – Wang, J. – Willerslev, E. 2010: Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Indian Eskimo. *Nature* 463, 757–762.
- 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, 1053–1060.
- Stoneking, M. 1995: Ancient DNA: how do you know when you have it and what can you do with it? *American Journal of Human Genetics* 57(6), 1259.
- Sutlović, D. – Definis-Gojanović, M. – Anđelinović, Š. – Gugić, D. – Primorac, D. 2005: Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. *Croatian medical journal* 46, 556–562.
- Wagner, J. K. – Colwell, C. – Clan, K. G. – Stone, A. C. – Bolnick, D. A. – Hawks, J. – Kyle B. – Brothers, K. J. – Nanibaa’A, G. 2020: Fostering responsible research on ancient DNA. *The American Journal of Human Genetics* 107(2), 183–195.
- Willerslev, E. – Cooper, A. 2005: Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272(1558), 3–16.
- Wolinsky, H. 2019: Ancient DNA and contemporary politics: The analysis of ancient DNA challenges long-held beliefs about identity and history with potential for political abuse. *EMBO reports* 20(12), e49507.
- Yang, D. Y. – Watt, K. 2005: Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis. *Journal of Archaeological Science* 32, 331–336.