

Starodavna DNA: kratka predstavitev tematike ter njen pomen za razumevanje preteklosti

Ancient DNA: A Short Introduction of the Field and its Influence on our Understanding of the Past

© Brina Zagorc

University of Vienna, Department of Evolutionary Anthropology; brina.zagorc@gmail.com

Izvilleček: Začetek preučevanja starodavne DNA sega v leto 1984, od takrat pa se je precej razširilo, predvsem zaradi različnih izboljšav na področju laboratorijskih tehnik in sekvenciranja genomov. Veliko odmevnim odkritjem je botrovalo zlasti sekvenciranje naslednje generacije tako na področju evolucije vrst kot na področju razumevanja naše preteklosti. Raziskave starodavne DNA vključujejo skrbno pripravo vzorcev ter skrb za preprečitev kontaminacije vzorcev v času izvajanja vseh laboratorijskih postopkov. Glede na izbrano metodo mednje spadajo vzorčenje, mletje vzorcev kosti, izolacija DNA, priprava knjižnic za sekvenciranje, pomnožitve fragmentov s pomočjo verižne reakcije s polimerazo, iskanje tarče, več kontrol kakovosti vzorca in samo sekvenciranje. Rezultate sekvenciranja bioinformatiki nadalje analizirajo s pomočjo bioinformatičnih orodij in pripravljenih cevovodov, prirejenih analizam starodavne DNA. S pomočjo starodavne DNA lahko podrobneje analiziramo evolucijo vrst (na primer človeka, živali, rastlin, virusov itd.), izmenjavo genov in introgresijo arhaičnih genov, pa tudi prilagajanje vrst skozi življenjske spremembe. S pomočjo populacijske genetike lahko odgovorjamo na vprašanja kompleksnih grobišč, raziskujemo demografske značilnosti pokopanih skupnosti ter se poglobimo v njihova sorodstvena razmerja in prednike. To nam lahko veliko pove tudi o migracijskih vzorcih. Namen tega članka je bralca seznaniti s tematiko starodavne DNA, od njenih začetkov do laboratorijskih postopkov in različnih smeri interpretacije.

Ključne besede: starodavna DNA, laboratorijske tehnike za sekvenciranje starodavne DNA, paleogenomika, bioarheologija

Abstract: The start of the ancient DNA studies goes back to the year 1984. Since then, the field has expanded quickly, especially with different lab methods and sequencing techniques, which has resulted in various breakthroughs in the evolution of species and understanding of our past. The studies of ancient DNA include careful sample preparation and taking care of contamination risks during handling of the sample through all laboratory procedures. These among others and depending on the chosen method include the sampling itself, the bone drilling/grinding, DNA extraction, library preparation, PCR amplifications, Capture reactions, several quality controls, and sequencing with the Next Generation Sequencing machines. The bioinformaticians analyse the sequenced results with bioinformatic tools and pipelines, which are specifically designed for ancient DNA samples and for processing the results to the point where the latter can be interpreted and can serve to answer our research questions. Ancient DNA results can help us to better understand the evolution of species (e.g., human, animal, plant, viruses, etc.), their admixture, introgression, and influence they had on each other. Furthermore, population genetics can also aid us in understanding complex burial sites and its deceased communities, including their kinship and ancestry relations which can tell us more about migration patterns and demographic structures of the analysed populations. The aim of this paper is to familiarise the reader with the field of the ancient DNA studies and the research workflow that leads to the interpretation of the results.

Keywords: ancient DNA, lab techniques for ancient DNA sequencing, paleogenomics, bioarchaeology

Uvod

Starodavna DNA (angl. *ancient DNA*, okrajšava: aDNA; DNA je okrajšava za deoksiribonukleinsko kislino) je v zadnjem desetletju močno vplivala na razumevanje naše preteklosti ter na razvoj številnih ved, med drugim arheologije. Študije, ki so vključevale analize starodavne DNA, so se hitro metodološko razvijale na področju izolacije DNA, predvsem pa na področju verižne reakcije s polimerazo (angl. *Polymerase Chain Reaction*; okrajšava PCR) (Krstić 2019, 2) in Sanger sekvenciranjem, najbolj pa je na razvoj raziskav v zadnjih šestnajstih letih vplivalo sekvenciranje naslednje generacije (angl. *Next Generation Sequencing*; okrajšava NGS). Te omogočajo vedno bolj natančne rezultate sekvenciranja DNA z vedno večjo pokritostjo genov znotraj sekvenciranega genoma in s tem vedno boljše razumevanje evolucije različnih

vrst. Analize starodavne DNA so tako močno pripomogle k širjenju vede paleogenomike¹ in s tem k sekvenciranju genomov že izumrlih vrst – tako živalskih (na primer vrst rodu mamuta – *Mammuthus* – ali jamskega medveda – *Ursus spelaeus*) kot arhaičnih človeških vrst (na primer *Homo denisova*, *Homo neanderthalensis*, *Homo antecessor*) in skupin ljudi iz naše bližnje zgodovine.

V raziskavah, ki vključujejo analize starodavne DNA, je kontaminacija vzorcev največja ovira, s katero se raziskovalci srečujejo, prav tako pa je v ta proces vključenih veliko dejavnikov in postopkov, ki skrbijo za verodostojnost rezultatov in njihovo nadaljnjo interpretacijo. V članku najprej predstavljam trenutno stanje raziskav na

¹ Paleogenomika je znanstvena veda znotraj vede genomike, ki se osredotoča na rekonstrukcijo in analizo genetskih informacij izumrlih vrst.

področju starodavne DNA, zatem pa opisujem enega od možnih molekularnih metodoloških postopkov, ključnih za procesiranje vzorcev od začetka do konca. V članek sem prav tako vključila osnovne pojme o starodavni DNA in različne smeri, v katere nas lahko vodijo raziskave. Ker je na področju starodavne DNA v Sloveniji zaenkrat manj raziskav, je namen tega članka približati temo arheologom, boljše razumevanje področja, osveščenost oziroma osnovno razumevanje procesa analiziranja vzorcev in problematika kontaminacije vzorcev, ki so vključeni v raziskave. Poleg tega je cilj prispevka pomen interdisciplinarnosti in interpretacije rezultatov.

Kratek pregled zgodovine raziskav starodavne DNA

Za rojstvo nove znanstvene discipline paleogenomike, ki preučuje starodavno DNA, štejemo leto 1984, ko so Higuchi *et al.* (1984) objavili sekvence izoliranih fragmentov mitohondrijske DNA posušene mišice izumrle vrste zebre – kvage (*Equus quagga*). V osemdesetih letih prejšnjega stoletja je Svante Pääbo objavil prvo študijo, v kateri so bili objavljeni fragmenti človeške DNA, in sicer mumije, stare 2400 let (Pääbo 1985). Leta 1988 je s sodelavci objavil sekvenco mitohondrijske DNA 7000 let starih človeških možganov, kar je bil še en dokaz, da je mogoče analizirati človeško starodavno DNA (Pääbo *et al.* 1988). Študije človeške starodavne DNA so se nadaljevale. Tako smo bili v prvih letih 21. stoletja priča številnim študijam ljudstev iz preteklosti, med drugim hominidov, neandertalcev (Caramelli *et al.* 2003; Ovchinnikov *et al.* 2000), neolitskih kmetovalcev (Haak *et al.* 2005) in avstralskih staroselcev (Adcock *et al.* 2001). Do leta 2006 je bilo objavljenih že enajst delnih mitohondrijskih genomov neandertalcev, dve večji študiji pa sta se posvetili analizi neandertalske jedrne DNA. To sta bili študiji Noonan *et al.* (2006) ter Green *et al.* (2006), pri čemer se je slednja kasneje izkazala za kontroverzna, saj sta Wall in Kim (2007) dokazala, da je bila raziskava kontaminirana z moderno človeško DNA. Green in njegovi sodelavci (med drugim Svante Pääbo) študije nikoli niso preklicali, vsekakor pa je bil v skupnosti izpostavljen velik problem, povezan s kontaminacijo vzorcev.

Pri omenjenih študijah je šlo za pomnoževanje fragmentov DNA (tj. za analize z reakcijo PCR) in za sekvenciranje s Sangerjem.² Za enega večjih preskokov v metodologiji

in tehniki sekvenciranja starodavnih genomov pa lahko štejemo pričetek uporabe sekvenciranja genomov s pomočjo NGS. Analize NGS so bile načeloma v uporabi za moderno medicino, Poinar *et al.* (2006) pa je bila prva študija, ki je sekvenciranje z NGS uporabila tudi za starodavno DNA. Sekvencirali in objavili so DNA mamuta, pri čemer se je število sekvenciranih baznih parov (okrajšava: *bp*) povečalo iz 229 na milijone,³ sekvencirani vzorci različnih vrst pa so od takrat datirani tudi do 780.000 let nazaj (Orlando *et al.* 2013). Razvoj vede se je od začetkov uporabe NGS in hitrega razvoja metodologij močno pospešil. Leta 2010 so Rasmussen *et al.* (2010) objavili prvi sekvencirani človeški genom, ki ni pripadal današnjemu človeku, temveč Paleoeskimu. Tri leta kasneje so Prüfer *et al.* (2013) objavili prvi genom neandertalca, ki je hkrati prvi objavljen genom druge človeške vrste, ki ni anatomsko moderni človek (ali *Homo sapiens*). Sekvenciranje nove generacije je tako v zadnjem desetletju botrovalo številnim novim odkritjem znotraj evolucije človeške vrste, med drugim odkritju nove vrste *Homo denisova* (v nadaljevanju denisovci), sestrške vrste *Homo sapiens*, ki se je skupaj z neandertalci od zadnjega skupnega prednika odcepila pred približno 800 tisoč leti (Meyer *et al.* 2012; Reich *et al.* 2010). Število objavljenih genomov drugih hominidov se je povzpelo na 11, med katerimi je tudi genom otroka neandertalca in denisovca (Slon *et al.* 2018).

Z znižanjem cen sekvenciranja naslednje generacije in izboljšanimi metodami izolacije DNA je analiziranje starodavne DNA postalo dostopnejše tudi manjšim raziskovalnim skupinam, hkrati z nižjo ceno sekvenciranja pa sorazmerno narašča število študij na področju paleogenomike (na primer leta 2015 jih je bilo okoli 350, medtem ko jih je danes že več kot 3000) (Skoglund, Mathieson 2018, 397). Moramo pa se zavedati, da na število raziskav ter na izbor lokacij vzorcev vpliva tudi ohranjenost starodavne DNA, na kar opozarja tudi trenutni trend raziskav starodavne DNA. Večina objavljenih genomov namreč izhaja iz zahodne Evrazije, kjer smo priča pristranskosti zahodnih znanstvenih institucij, ki imajo več financiranja in zanimanja za tovrstne tematike, ter boljši ohranjenosti starodavne DNA v hladnejših okoljih.

prav tako pa so odsotni referenčni človeški genomi za primerjavo med rezultati (Pajnič Zupanič 2020; Furlong 2021).

² Gre za metodo, ki vključuje tehnologijo kapilarne elektroforeze, vendar ima na področju starodavne DNA omejeno zmogljivost,

³ Za primerjavo, pri Higuchi *et al.* (1984) so s pomočjo fluorescenčne prepoznali 229 bp brez metode pomnoževanja fragmentov, medtem ko so že leta 2006 pri Poinar *et al.* z NGS sekvencirali 28 milijonov bp, od tega jih je 13 milijonov pripadalo mamutu.

Tudi v Sloveniji je na Inštitutu za sodno medicino prenovljen Laboratorij za molekularno genetiko (Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani), ki že več kot desetletje preučuje vzorce starodavne DNA. Njihove raziskave se med drugim posvečajo iskanju najprimernejših skeletnih elementov za molekularnogenetsko identifikacijo starih človeških ostankov, predvsem iz časa druge svetovne vojne. V okviru tega so objavili že veliko uspešnih študij, ki vključujejo tudi starejše skeletne ostanke (na primer Zupanič Pajnič, Fattorini 2021; Geršak *et al.* 2019; Zupanc *et al.* 2020). Poleg tega so uspešno analizirali starodavno DNA iz 300 let starih skeletov iz grobnice družine Auersperg (Zupanič Pajnič 2013) in iz več različno datiranih skeletov ali drugih ostankov iz različnih arheoloških obdobij in najdišč (na primer Zupanič Pajnič *et al.* 2022; Lipar *et al.* 2020). Prav tako slovenski arheologi uspešno sodelujejo pri različnih večjih mednarodnih projektih, financiranih iz evropskih ali drugih mednarodnih sredstev (naj omenim dva večja: HistoGenes, financiran s strani Evropskega raziskovalnega centra – ERC, in The Ancient DNA Atlas of Humanity, financiran s strani John Templeton Foundation).

Starodavna DNA

Kaj pa pravzaprav je starodavna DNA? Starodavna DNA je fragmentirana in v mnogih primerih močno poškodovana DNA, kjer dolžina prepoznanih fragmentov običajno ne presega 300 bp. Da lažje razumemo pomen starodavne DNA, članek nadaljujem s krajšim opisom, kaj DNA sploh je.

Nekaj osnovnih pojmov o DNA

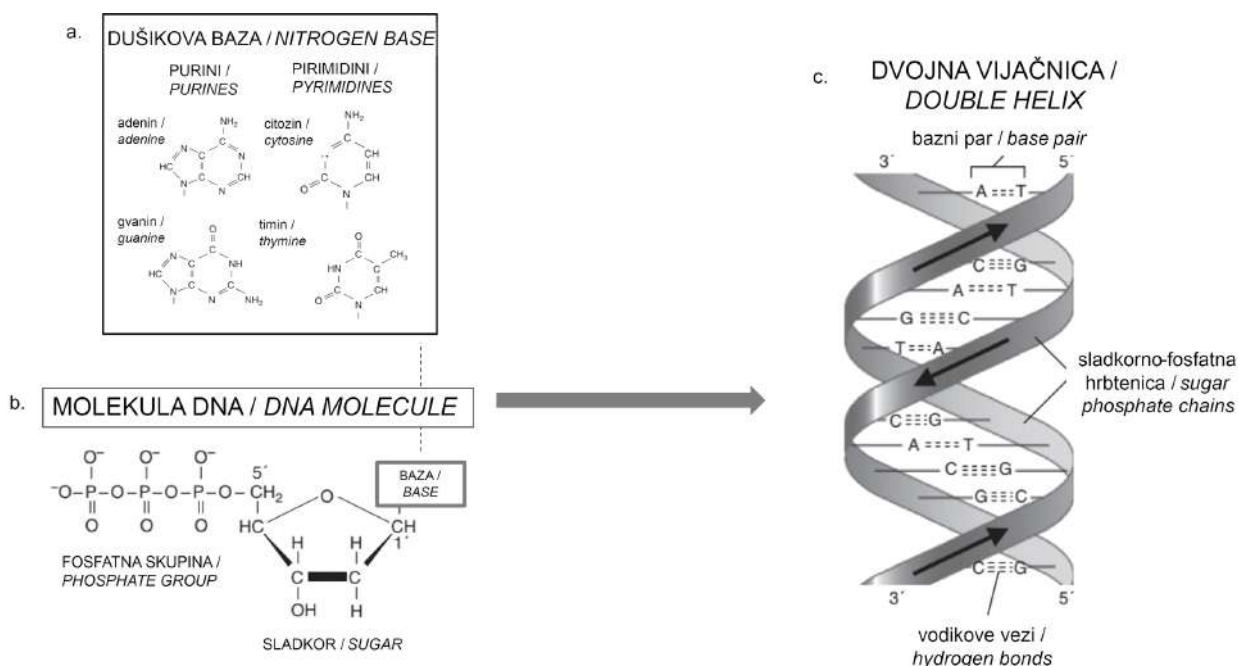
DNA je torej okrajšava za deoksiribonukleinsko kislino, katere strukturo sta s pomočjo rentgenske difrakcije razložila Watson in Crick (1953). DNA je polimerska molekula (slika 1b), ki jo sestavljajo štirje nukleotidni monomeri. Ti so sestavljeni iz deoksiriboze, tipa sladkorja, ki je sestavljen iz petih ogljikovih atomov, na katere se pripne naslednja podenota, tj. dušikova baza, ki tvori nukleotide (slika 1a). Lahko gre za pirimidin (citozin – C in timin – T) ali purin (adenin – A in gvanin – G), pripenja pa se na 1'-ogljik sladkorja. Zadnja podenota je fosfatna skupina, ki se pripenja na 5'-ogljik sladkorja. Vsaka molekula DNA je sestavljena še iz dveh polinukleotidov, ki skupaj tvorita dvojno vijačnico (slika 1c), pri čemer se vsaka stran vrti v svojo smer. Vijačnico stabilizirajo

bazni pari med dvema polinukleotidoma, ki ju skupaj veže vodikova vez. Bazni pari so med seboj komplementarni, in sicer se tvorijo med adeninom in timinom ter med gvaninom in citozinom (A-T in C-G) (Brown, Brown 2011, 13–14). Tako dobimo značilno dvojno vijačnico, ki velja za simbol moderne genetike in biologije.

Vsak organizem je sestavljen iz niza molekul DNA, ki skupaj tvorijo mnogo večjo celoto. Ta se imenuje genom in vsebuje vse biološke informacije o organizmu, ki so zapisane v mnogo manjših enotah znotraj genoma – v genih. Genom človeka vsebuje okoli 25.000 genov, gen pa je sestavljen iz različnega števila baznih parov. Red, v katerem so nanizani bazni pari, vsebuje navodila za tvorjenje beljakovin znotraj telesa in za prenos dednega materiala na hčerinske celice (Jobling *et al.* 2014, 21–22).

Jedrna in mitohondrijska DNA

Genom prokariotov oziroma enoceličnih organizmov, kot so bakterije in mitohondriji, je v celični citoplazmi. V evkariotih, kot je človek (in drugi večcelični organizmi), pa lahko genom razdelimo na dva dela, in sicer na jedrni genom in mitohondrijski genom, oba pa sta znotraj iste celice (Albert 2019, 52). Človeški nuklearni genom, nuklearna DNA ali jedrna DNA je v nukleusu – jedru celice (slika 2) in ga sestavlja 3.200.000.000 baznih parov znotraj 24 kromosomov, pri čemer dva od teh pogojujeta biološki spol organizma (spolna kromosoma X in Y). Znotraj celice pa imamo tudi več mitohondrijev (slika 2), v katerih je mitohondrijska DNA (okrajšava: mtDNA) ali mitohondrijski genom. Ta vsebuje 16.569 baznih parov, kar je znatno manj kot pri jedrni DNA, vendar je kopij mtDNA mnogo več kot jedrne DNA, saj je jedro v celici zgolj eno, mitohondrijev pa je 100 do 1000 na celico (Jobling *et al.* 2014, 20–21, 37–40). Dedni material, ki nas v raziskavah starodavne DNA navadno najbolj zanima, se nespremenjeno deduje po materini liniji v mitohondrijski DNA in po očetovi liniji prek spolnega kromosoma Y (in ni prisoten pri ženskah). Oba nam omogočata vpogled v genetsko raznolikost in variacije v zgodovini vrst, hkrati pa imamo na voljo mnogo referenčnih genomov sodobnih populacij za primerjave in boljše analize. MtDNA nas zanima tudi zaradi boljše ohranjenosti, saj je pred razpadom (glej spodnje poglavje) bolje zaščiten (Zupanič Pajnič 2020, 178).



Slika 1. a. Kemijska sestava dušikovih baz, ki so del molekule DNA. b. Molekula DNA in njene tri sestavne komponente: fosfatna skupina, deoksiriboza in dušikova baza. c. Molekule DNA se povežejo med seboj v polinukleotid in skupaj s komplementarnim polinukleotidom, ki se vrti v drugo smer, tvorijo dvojno vijačnico, ki se med seboj povezuje z baznimi pari (prirejeno po Brown, Brown 2011, Fig. 2.1.a, 2.3).

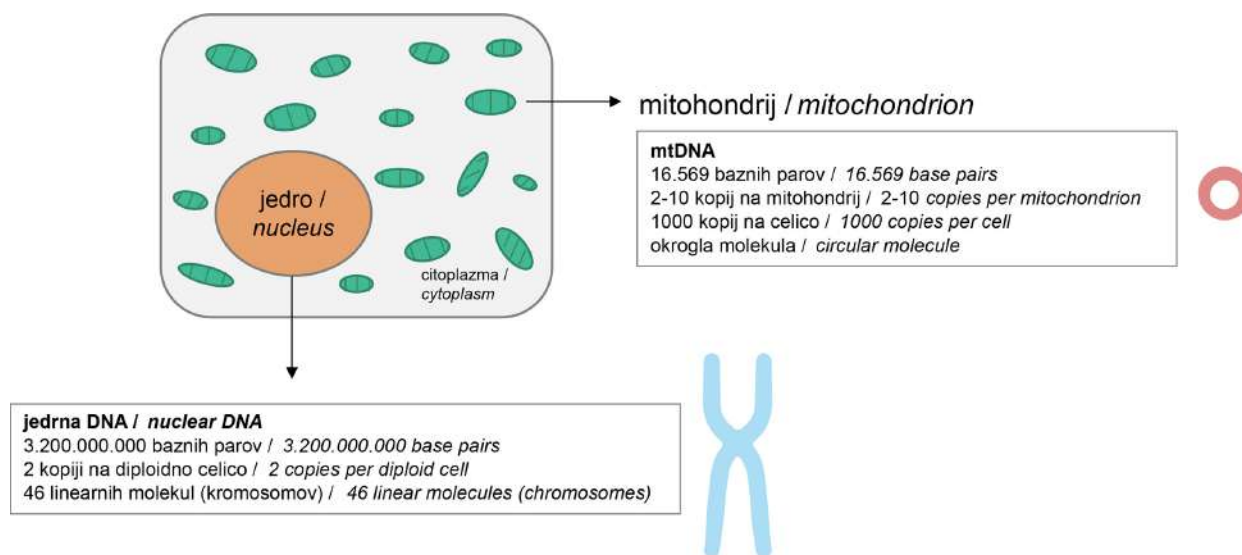
Figure 1. a. Chemical structure of the nitrogen bases which are a part of the DNA molecule presented in 1b. b. DNA molecule and its three main components: phosphate group, deoxyribose (sugar) and nitrogen base. c. DNA molecules bonding together with base pairs and forming a double-helix chain (modified from Brown, Brown 2011, Fig. 2.1a, 2.3).

Propadanje molekul DNA po smrti

Po smrti organizma se takoj začne propadanje organskih snovi, med drugim tudi molekul DNA. Dušikove baze se postopoma spremenijo v sladkorne fosfate (krajše fragmente DNA), hkrati pa hidroliza vodi do deaminacije baz in depurinacije. Deaminacija je kemijska sprememba v molekuli DNA, ki vključuje izgubo aminske skupine ($-\text{NH}_2$). V primeru deaminacije citozina se ta pretvori v uracil, ta pa se veže skupaj z adeninom (U-A) in ne z gvaninom, s katerim se je pred pretvorbo vezal citozin (Jobling *et al.* 2014, 615). Prisotnost uracila v molekuli DNA pa posledično jasno kaže, da imamo opravka s starodavno DNA. Čeprav gre za jasno indikacijo, da gre za starodavno DNA, lahko deaminacijski vzorci vplivajo tudi na končno branje sekvenc, zato se raziskovalci velikokrat poslužijo različnih metod, ki izločijo uracile znotraj izolatov DNA (več o tem v nadaljevanju). Takšne metode lahko sicer še dodatno skrajšajo fragmente in

otežijo overitev starodavne DNA v vzorcih, so pa rezultati zanesljivejši. Poleg deaminacije ob propadanju celic prihaja tudi do depurinacije, ki pomeni izgubo purinske baze (purina sta adenin in gvanin). Rezultat tega je zlom hrbtenice DNA – dvojna vijačnica se zlomi na delčke, ki so lahko več kot milijonkrat krajši od originalne dolžine v času življenja (Orlando *et al.* 2021, 9–10). Ohranitev DNA po smrti je odvisna tudi od interakcije nukleinskih kislin s hidroksiapatitom in kolagenom, ki sestavljata mineralno in organsko osnovo kosti. DNA se tako po smrti veže na hidroksiapatit skozi pozitivno nabite kalcijeve ione ter negativno nabite fosforjeve skupine verige DNA, ki pa kažejo manjšo stopnjo depurinacije v primerjavi s prostimi molekulami (Korlević *et al.* 2015, 87).

Na propadanje in spremembo kemijske sestave molekul DNA vplivajo tudi zunanji diagenetski in tafonomski procesi, ki lahko spremenijo sestavo ali dodatno uničijo strukturo starodavne DNA. Diageneza kosti in ohranjenost



Slika 2. Shematski prikaz diploidne somatske celice z vključenim jedrom in mitohondriji, skupaj z osnovnimi značilnostmi mtDNA in jedrne DNA (prirejeno po Jobling *et al.* 2014, Fig. 2.2., 2.14, 2.19, ikona kromosoma je licenčna in dostopna na Servier <https://smart.servier.com/> pod licenco CC-BY 3.0 Unported <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Figure 2. A schematic overview of a diploid somatic cell including the nucleus and mitochondria along with their DNA characteristics (modified from Jobling *et al.* 2014, Fig. 2.2., 2.14, 2.19, chromosome-blue icon is licensed by Servier <https://smart.servier.com/> under CC-BY 3.0 Unported <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

kostnega materiala skozi čas je zelo zapleten fenomen, ki vključuje različne fizikalne, kemijske, mehanske in histološke spremembe (Stathopoulou *et al.* 2008, 168), te pa imajo posledice tudi na genetskem materialu in njegovih poškodbah. Na diagenozo vplivajo različni dejavniki, kot na primer temperatura, prisotnost vode, geokemija in pH zemlje (Hedges 2002, 324–326), pa tudi smrt človeka, časovni interval med smrtjo in pokopom ter ravnanje s pokojnikom pred pokopom (Garland, Janaway 1989). Geografska lokacija in klimatski pogoji prav tako vplivajo na ohranjenost DNA, pri čemer pomembno vlogo igra stabilna letna temperatura in čim manj vlage (Kistler *et al.* 2017, 6317). Ravno to pa je eden od razlogov, zakaj je največ vzorcev, ki imajo dobre rezultate analiz starodavne DNA, z območij z manj vlage (na primer jamska okolja) in iz hladnejših podnebnih okolij (na primer permafrost). Starost vzorca pa nima nujno odločilnega vpliva na kvaliteto in ohranjenost starodavne DNA (Kistler *et al.* 2017, 6318).

Poleg vsega naštetega je treba upoštevati, kako ravnamo z vzorcem potem, ko ga vzamemo iz *in situ* lokacije, saj

lahko naše nespretno ali neprimerno rokovanje z njim vpliva tudi na stopnjo kontaminacije starodavne DNA. Endogena⁴ starodavna DNA je namreč sestavljena iz molekul različnih vrst, od tega jih je večina mikrobnega izvora (> 95 %) in le nekaj je endogenih (nekontaminiranih) človeškega izvora (Korlević *et al.* 2015, 87).

Izzivi kontaminacije vzorcev

Skeletni ostanki, oziroma kateri koli ostanki, ki jih lahko analiziramo s pomočjo starodavne DNA, so pogosto kontaminirani z moderno DNA. Ta lahko popolnoma spremeni rezultate in s tem celotne hipoteze, ki jih raziskovalci z analizami želijo raziskati. Starodavna DNA je prisotna v zelo majhnih količinah ter je v večini primerov poškodovana in fragmentirana, zato jo je že samo po sebi težko pomnoževati z metodo PCR. Nasprotno od starodavne DNA pa je sodobna DNA prisotna povsod, je načeloma v dobrem stanju, je veliko in jo je zato razmeroma enostavno pomnoževati (Jobling *et al.* 2014, 125).

⁴ Endogeno: »ki deluje od znotraj, notranje« (Splet 1); V tem primeru gre za DNA, ki je notranjega izvora in je izvirna DNA.

Do kontaminacije genetskega materiala lahko pride v vsakem trenutku obravnavanja materiala. Deloma lahko do nje pride že med procesom propadanja organskega tkiva po smrti organizma, pomembnejši dejavnik kontaminacije pa se pojavi ob odkritju in odstranitvi tkiva za analizo iz njegovega *in situ* položaja. Do kontaminacije starodavne DNA največkrat pride ob analizah v laboratoriju, saj so v njem kljub različnim preventivnim metodam delci prejšnjih analiz. Prav tako je dejavnik kontaminacije raziskovalec, ki vzorec obdeluje in analizira. Če, na primer, analiziramo živalske kosti in pride do človeške kontaminacije, se ta poleg živalske pomnoži z metodo PCR, vendar lahko v nadaljnjih bioinformatičnih analizah ločimo živalsko in človeško DNA, zato kontaminacija druge vrste ne vpliva bistveno. Na drugi strani pa imamo problem človeške kontaminacije pri analizi starejših človeških vzorcev, saj se moderna DNA pomnoži skupaj s starodavno DNA, tako da ju je v takšnem primeru nemogoče zagotovo ločiti, s tem pa vzorec postane neuporaben. Obstaja sicer možnost, pri kateri je ob postopku priprave knjižnic za sekvenciranje fragmente starodavne DNA od drugih mogoče ločiti na podlagi vzorcev deaminacije. Deaminacija je mogoča le pri starodavni DNA, zato lahko te fragmente ločimo od drugih, ki nimajo deaminacijskih vzorcev (Korlević *et al.* 2015). Problem tega pristopa je v tem, da lahko zavržemo velik del fragmentov starodavne DNA, ki nimajo pretvorbe citozina v uracil, kar pa je pri že tako majhnem obsegu ohranjene starodavne DNA tako iz finančnega kot raziskovalnega vidika nesmiselno.

Zato se pri raziskavah starodavne DNA poslužujemo različnih preventivnih postopkov, da bi zagotovili čim večjo zaščito vzorcev pred kakršno koli kontaminacijo med potekom analiz. V idealnih pogojih to pomeni že izkopavanje in preliminarno analiziranje vzorcev v čim bolj čistem oziroma sterilnem okolju. V realnosti je to seveda nemogoče, saj izkopavanja potekajo na različnih krajih, njihov potek pa je mnogokrat vse prej kot sterilen; prav tako za potencialne vzorce pogosto ne vemo, ali bodo šli na nadaljnje analize. Vzorčenje in pregled vzorcev bi tako morala potekati v čim bolj čistem okolju, z uporabo rokavic in mask, da preprečimo prenos svoje ali druge DNA na vzorce.

Nato so vzorci v laboratorijih, specializiranih za starodavno DNA, podvrženi popolnoma sterilnemu in ločenemu okolju. Prav tako je ključnega pomena, da so prostori, v katerih se pripravlja kostni prah, in prostor za pripravljanje knjižnic za sekvenciranje ločeni od prostora, kjer

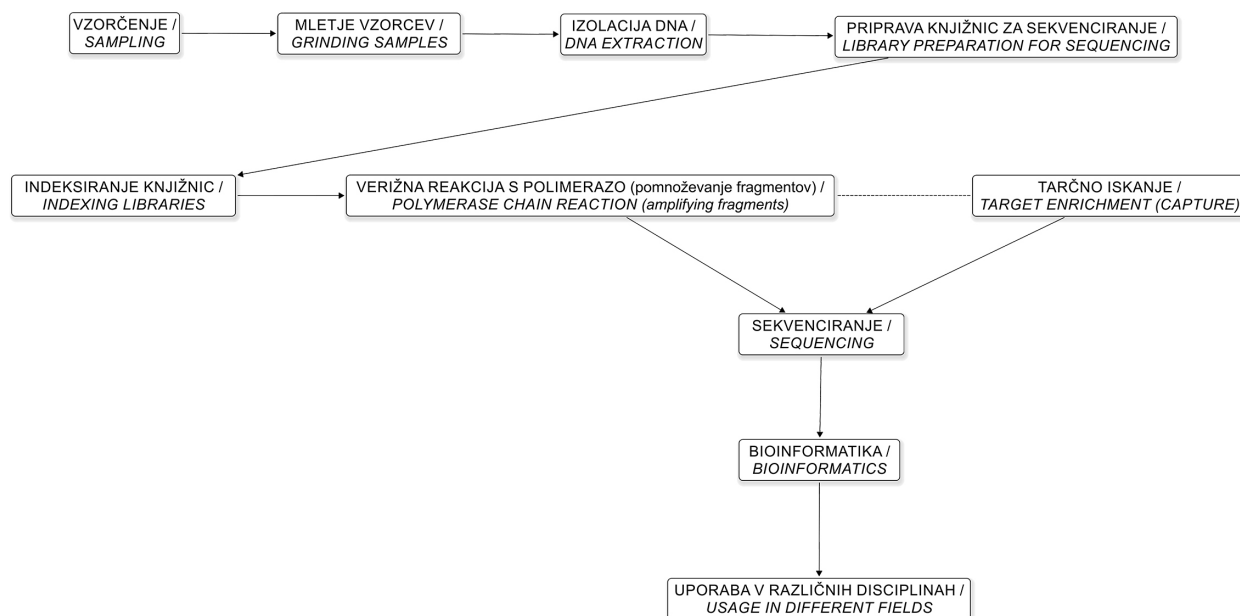
poteka pomnoževanje fragmentov z reakcijo PCR. Sterilno okolje je v tem primeru prostor, ki je popolnoma ločen od drugih in ima svoj prezračevalni sistem. V njem so vse površine, naprave in pripomočki dekontaminirani s pomočjo uporabe belila in UV svetlobe. Oseba, ki v tem prostoru dela (pripravlja vzorce ali opravlja analize), je oblečena v zaščitno obleko, lase ima pokrite s posebno kapico, nosi masko, posebne nogavice za enkratno uporabo in vsaj dva para rokavic (spodnja plast pred prihodom v prostor, nadalje menja zgornjo plast ob vsakem dotiku vzorca, ki bi lahko pomenil kontaminacijo naslednjega). Za dobro laboratorijsko prakso velja tudi čiščenje površin z belilom pred pričetkom in ob koncu pripravljanja vzorcev oziroma analiz ter žarčenje vseh pripomočkov (tubic, spatul, flomastrov itd.) in vzorcev v posebej temu namenjenih, na primer *Crosslinker* UV komorah.

Laboratorijske metode

Po izdelavi načrta za raziskavo je treba vedeti, kaj potrebujemo za raziskavo. Najpomembnejši del tega je primerna izbira vzorcev in dogovarjanje z institucijami oziroma arheologi, ki skrbijo za ostanke, ki jih želimo analizirati. Izbira vzorcev vpliva na potek raziskave in rezultate, s katerimi želimo odgovoriti na raziskovalna vprašanja. Na sliki 3 je predstavljen cevovod glavnih točk rokovanja z vzorci od vzorčenja do interpretacije v nadaljnjih raziskavah. Gre za splošen pregled cevovoda v primeru sekvenciranja vzorcev enoverižnih ali dververžnih knjižnic starodavne DNA z metodo NGS (angl. *shotgun sequencing*).

V nadaljevanju za lažje razumevanje postopkov analize starodavne DNA opisujem postopek priprave vzorcev in osnovne postopke v laboratoriju v primeru, ko raziskava uporablja metodo *shotgun* sekvenciranja. Opis začnjam z izbiro primernega vzorca za raziskave in nadaljujem s procesiranjem vzorcev v sterilnem okolju, vključno z izolacijo in pripravo vzorcev do sekvenciranja z uporabo naprav Illumina⁵ (NovaSeq, NextSeq ali MiSeq kot primeri pogosto uporabljenih naprav). Opisani postopki

5 Velja omeniti tudi Ion Torrent, ki je prav tako naprava za sekvenciranje naslednje generacije in je verjetno primernejša za sekvenciranje krajših fragmentov. Večina večjih institucij pa uporablja naprave Illumina, saj je bila večina vzorcev starodavne DNA v zadnjem desetletju sekvencirana z njimi. Zato to napravo povečini še naprej uporabljamo, saj omogoča boljše primerjavo med že sekvenciranimi vzorci ter s tem boljše primerjalne študije na večji ravni in dostopnost že objavljenih študij.



Slika 3. Poenostavljen cevovod laboratorijskih postopkov analize vzorcev starodavne DNA v primeru uporabe metode za shotgun sekvenciranje. Cevovod vključuje glavne točke laboratorijskih metodoloških postopkov, s puščicami pa je nakazan njihov vrstni red. Črtkana črta med verižno reakcijo s polimerazo in Capture nakazuje, da je postopek Capture odvisen od tipa raziskave. Če z laboratorijskim cevovodom zaključimo po verižni reakciji s polimerazo, običajno sekvenciramo po načelu shotgun. Če želimo tarčno sekvenciranje, je treba pred sekvenciranjem izvesti tarčno iskanje oziroma Capture.

Figure 3. A simplified pipeline of aDNA laboratory procedures for shotgun sequencing. The pipeline includes main checkpoints with arrows indicating their order in the pipeline. The dashed line between the PCR and target enrichment (Capture) indicates that performing the Capture method depends on the type of study. Whether we wish to do a shot-gun sequencing run the pipeline stops at the PCR amplifying point whereas the Capture point follows the PCR amplification if we want a specific target capture.

so posplošeni in povzeti po različnih objavljenih protokolih ter v uporabi v večjih mednarodnih projektih, niso pa edini. Vsak laboratorij protokole podredi svojim potrebam in zmogljivostim, da iz vzorcev dobi čim večji del endogene DNA, zato spodaj opisani postopki niso edini način izolacije in priprave knjižnic, so si pa v opisani metodi povečini podobni.

Vzorčenje

Vzorci, ki so na splošno primerni za analize starodavne DNA (in ne le za izbrano opisano metodo), so najpogostejše vzorci človeških ali živalskih dolgih kosti z gostim premerom diafize ali zob. V zadnjem desetletju je bilo objavljenih veliko študij o problematiki, ki se ukvarja s tem, kateri deli kosti so najprimernejši za vzorčenje in analizo starodavne DNA (glej Rasmussen *et al.* 2014;

Gamba *et al.* 2014; Pinhasi *et al.* 2015; Sirak *et al.* 2020), rezultati študij pa kažejo, da so za analizo starodavne DNA najprimernejši deli senčnice in korenine zob.

Senčnica

Senčnica (*os temporale*) je parna ploščata lobanjska kost, ki leži ob straneh lobanje proti bazalnemu delu. Sestavljena je iz petih glavnih delov (luska, bradavičar, bobničica, šilasti odrastek in skalnica), pri čemer skalnica premore največ endogene DNA in je posledično najbolj zaželen za vzorčenje starodavne DNA. Skalnica ima 4- do 16-krat več endogene DNA kot zobje in do 183-krat več kot drugi deli skeleta (Gamba *et al.* 2014). V skalnici je polž (*cochlea*) (slika 4), ki ga ciljamo ob vzorčenju (zaenkrat gre za destruktivno metodo), saj vsebuje največ endogene DNA. Gre za del človeškega okostja, ki se začne razvijati *in utero* in tako premore vse genetske



Slika 4. Desna skalnica z označeno okvirno lokacijo polža, ki leži globlje znotraj ušesnega kanala (grob 1057, zgodnji srednji vek, Muljava, foto: B. Zagorc, 2019).

Figure 4. Right petrous bone. Arrow pointing to an approximate location of the cochlea which is located deeper in the ear canal (grave 1057 from an early medieval site Muljava, Photo: B. Zagorc, 2019).

informacije, prav tako pa se v času življenja ne remodelira in ostane enak. Kost je precej gosta in zato zelo primerna za raziskave starodavne DNA. V skalnici (znotraj ušesnega kanala) so tudi slušne koščice, ki jih lahko hitro spregledamo in zaradi njihove velikosti izgubimo. Rezultati Sirak *et al.* (2020) kažejo, da imajo slušne koščice podobne vrednosti endogene DNA kot polž, zato so primerne za analize starodavne DNA.

Zobje

Zobje so prav tako ustrezna izbira za vzorčenje, vendar jedrna in mitohondrijska DNA v zobnih tkivih (dentin, pulpa, cement, sklenina; slika 5) nista enakomerno porazdeljeni. Kot so pokazali Higgins *et al.* (2015), na ohranitev starodavne DNA v zobeh močno vpliva več *ante mortem* in *post mortem* dejavnikov, pri čemer pri slednjih upoštevajo predvsem interval od pokopa ter temperaturo zemlje, v kateri je zob. Mineraliziran zunanji del zobne korenine, cement, se je v raziskavi izkazal kot najprimernejši del zoba za analize starodavne DNA, saj zaradi svoje strukture in zaščite notranjega dela mineralne matrice ščiti večino jedrne DNA pred *post mortem* propadanjem.

Ostalo

Čeprav je starodavna DNA najboljše ohranjena v skalnici (natančneje, v polžu) in zobni korenini, je lahko prisotna tudi v kompakti predvsem dolgih kosti (na primer dolge kosti nog – stegenice ali golenice), medtem ko v spongiozi⁶ ni dovolj ohranjena (Zupanič Pajnič 2020). Raziskave Geršak *et al.* (2019) kažejo tudi potencial analiz dlančnic in stopalnic. Poleg kosti starodavno DNA najdemo tudi v drugih tkivih in materialih.

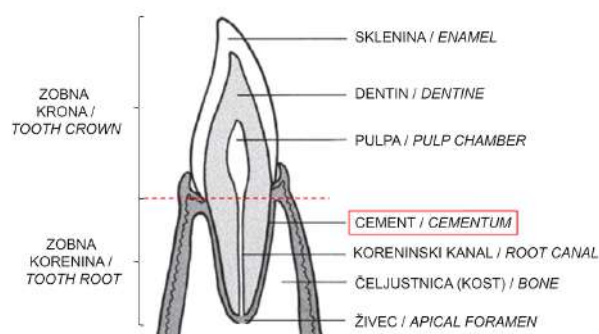
V primeru dobro ohranjenih posameznikov ali najdb v permafrostu in zelo hladnih podnebjih je torej za starodavno DNA mogoče vzorčiti tudi kožo ali lase. Primer tega je ena najodmevnejših najdb človeških ostankov zadnjih desetletij – ledeni človek Ötzi (Keller *et al.* 2012). Poleg človeških in živalskih vzorcev je mogoče vzorčiti DNA rastlinskih vrst, če so se primerno ohranile, sedimente (na primer iz jam ali dobro dokumentiranih najdišč) in nedotaknjena ledena jedra. V takšnih primerih lahko starodavno DNA analiziramo tudi več sto tisoč let v preteklost in potrdimo na primer človeško ali živalsko prisotnost na preiskovanem območju, četudi ni nobenih materialnih ostankov (Vernot *et al.* 2021).

Za analize človeške starodavne DNA sta torej najprimernejša skalnica in dobro ohranjen (nepoškodovan) zob. Ostali deli skeleta so primerni po predhodnem dogovoru z raziskovalno ustanovo, ki bo analize izvedla. Primerni so tudi sterilni sedimenti ob pravilnem vzorčenju (zopet dogovor z laboratorijem) ter druge živalske kosti in mehka tkiva, pri čemer pa se moramo zavedati, da so rezultati v določenih primerih mnogokrat manj informativni ali neuspešni.

Priprava vzorcev

Način priprave vzorcev (na primer izbira destruktivne ali nedestruktivne metode) je odvisen od načrta raziskave. Priprava vzorca se začne z odvzemom primernih delov skeleta za analize (skalnica, zobje), lahko tudi že med antropološko analizo skeletnih ostankov, nadaljuje pa se v sterilnem laboratoriju, kjer je treba preprečiti kontaminacijo vzorcev.

⁶ Kompakta ali kompaktna kostnina je gosta kostnina na površju kosti, medtem ko je spongioza ali spongiozna kostnina (znana tudi pod imenom puhlica) v trabekule urejena kostnina v notranjosti kosti (Splet 4).



Slika 5. Anatomija zoba s posebej označenim cementom, ki je mineraliziran del zobne korenine in odlično ščiti starodavno DNA pred propadom. Rdeča črtkana črta nakazuje linijo, kjer zobno korenino ločimo od krone (prirejeno po White, Folkens 2005, Fig. 8.2).

Figure 5. Anatomy of a tooth with a marked cementum, the mineralized part of the tooth root that helps preserve the aDNA. The red dotted line marks the cut mark, separating the tooth crown from the root (modified from White, Folkens 2005, Fig. 8.2).

Nedestruktivne metode

Med nedestruktivne metode spada namakanje vzorcev v ekstrakcijskem pufru za več dni na sobni temperaturi. Metodo so prvi predstavili Rohland *et al.* (2004), in sicer gre za izolacijo mitohondrijske DNA, medtem ko je Hofreiter (2012) slabo desetletje kasneje isti postopek objavil tudi za pridobitev jedrne DNA. Najnovejšo metodo za izolacijo starodavne DNA so objavili Harney *et al.* (2021), in sicer gre za metodo namakanja zgolj konice zobne korenine v ekstrakcijskem pufru, čemur sledi nekajurna inkubacija. Metoda se je izkazala za učinkovitejšo in z veliko več endogene DNA kot pri namakanju celotnega zoba. Načelo te metode se še zmeraj uporablja, predvsem kadar analiziramo krhke ali zelo dragocene vzorce (na primer muzejske). Vendar pa zobje niso vedno učinkoviti, prav tako je dokazano, da deli skalnice vsebujejo veliko več endogene DNA, s čimer je lahko analiza starodavne DNA veliko uspešnejša, če se poslužimo minimalno destruktivnih metod in se poskušamo prebiti do polža.

Destruktivne metode

V ta namen se moramo poslužiti minimalno invazivnih in destruktivnih metod. Destruktivne metode, kot pove

že ime, za analize uničijo vzorec, ki ga je tako pogosto nemogoče vrniti ali uporabiti še enkrat. Te metode so zaenkrat najuspešnejše pri pridobivanju kostnega prahu z najvišjimi vrednostmi endogene DNA. Mednje spada rezanje in mletje kosti. Rezanje kosti v sterilnem okolju je najlažje doseči s peskanjem. Gre za napravo, ki pod pritiskom piha sterilni droben pesek (angl. *sandblasting machine*), ki kosti sterilno prereže in omogoča, da dosežemo dele kosti, ki so globlje in torej ne na površini (Pinhasi *et al.* 2015), s tem pa preprečimo kontaminacijo vzorca iz okolja. Nato odrezane korenine zob, dele skalnic (najboljše polž) ali druge dele kosti zmeljemo v kostni prah. Kostni prah je osnova za nadaljnje analize in predvsem za izolacijo DNA, ki je naslednji korak priprave vzorca do sekvenciranja. Za primer, ko skalnica ni ločena od lobanjskih kosti in je pred nami lobanja v celoti, so Sirak *et al.* (2017) predstavili minimalno invazivno metodo za vrtanje senčnice oziroma lobanjskega dna (angl. *cranial base drilling*) s ciljem priti do notranjosti ušesnega kanala. Z vrtanjem tako že neposredno prideemo do kostnega prahu, ki ga nato uporabimo za nadaljnje stopnje analize.

Izolacija DNA

Izolacija DNA poteka v ločenem sterilnem okolju, kamor prenesemo kostni prah, ki je shranjen v različnih vialah, katerih velikost je odvisna od nadaljnje metode (lahko govorimo, na primer, o 50-mililitrskih tubah Falcon ali 2-mililitrskih tubicah Eppendorf). Raziskovalne skupine za izolacijo starodavne DNA uporabljajo različne laboratorijske protokole, osnovni in najbolj ustaljen protokol pa so objavili Dabney *et al.* (2013). Od takrat je bilo objavljenih že več izboljšav, ki vključujejo tako uporabo drugih reagentov kot tudi druge laboratorijske opreme (glej na primer Korlević *et al.* 2015; Dabney, Meyer 2019). V nadaljevanju opisujem enega od postopkov izolacije DNA, pri številnih laboratorijih pa gre povečini za podobna načela, postopke in reagente (vsaj z uporabo EDTA in proteinaze K).

Starodavna DNA je močno fragmentirana in se zato obnaša drugače kot običajne molekule DNA (Orlando *et al.* 2021, 8). V tem primeru postopek izolacije temelji na uporabi ekstrakcijskega pufru, ki ga sestavljata EDTA in proteinaza K, ter veznega pufru, ki starodavno DNA v Roche tubah veže na kolono iz silike (po Dabney, Meyer 2019). Drugi laboratorijski protokoli lahko namesto

kolone iz silike uporabljajo magnetne kroglice, obložene s siliko, ali pa DNA vežejo na delce silike v kaotropnem veznem pufu (Orlando *et al.* 2021, 8). Po uporabi čistilnih pufrov in s pomočjo nizko slanosti pufrov (kot je na primer TET) iz raztopine dobimo izolirano starodavno DNA, ki je osnova za nadaljnje analize, te pa vključujejo pripravo knjižnic za sekvenciranje. Ob pripravi izolatov istočasno pripravljamo tudi negativno kontrolo (angl. *extraction negative blank*), ki služi za kontrolo kontaminacije reagentov in jo izvajamo v celotnem procesu priprave vzorcev do sekvenciranja kot pri drugih vzorcih. Kontrola je sestavljena iz enake količine reagentov, ki so prisotni v posamičnem izolatu, namesto vzorca pa je v viali destilirana sterilna voda.

Priprava knjižnic za sekvenciranje naslednje generacije z napravo Illumina

Preden izolirano starodavno DNA sekvenciramo, moramo narediti knjižnice za sekvenciranje. Izolirana DNA je sestavljena iz kratkih fragmentov zelene DNA, ki pa so bili po smrti poškodovani, zato jih med pripravljanjem knjižnic poskušamo popraviti.

Poškodbe izolatov DNA vsebujejo fragmentacijo v zelo kratke fragmente DNA, konverzijo štirih nukleotidov v derivative in navzkrižno povezovanje DNA z drugimi molekulami (glej zgoraj). Vse to načeloma vpliva na to, koliko uporabnih informacij lahko pridobimo iz izolatov, zato je popravljanje poškodb še toliko bolj pomembno. V procesu priprave knjižnic za sekvenciranje je največji poudarek na popravljanju poškodb, ki so nastale kot posledica fragmentacije DNA. Laboratorijski protokoli (glej na primer Meyer, Kircher 2010) so sestavljeni iz več korakov, ki zagotovijo optimalno pripravljene fragmente starodavne DNA za sekvenciranje naslednje generacije.

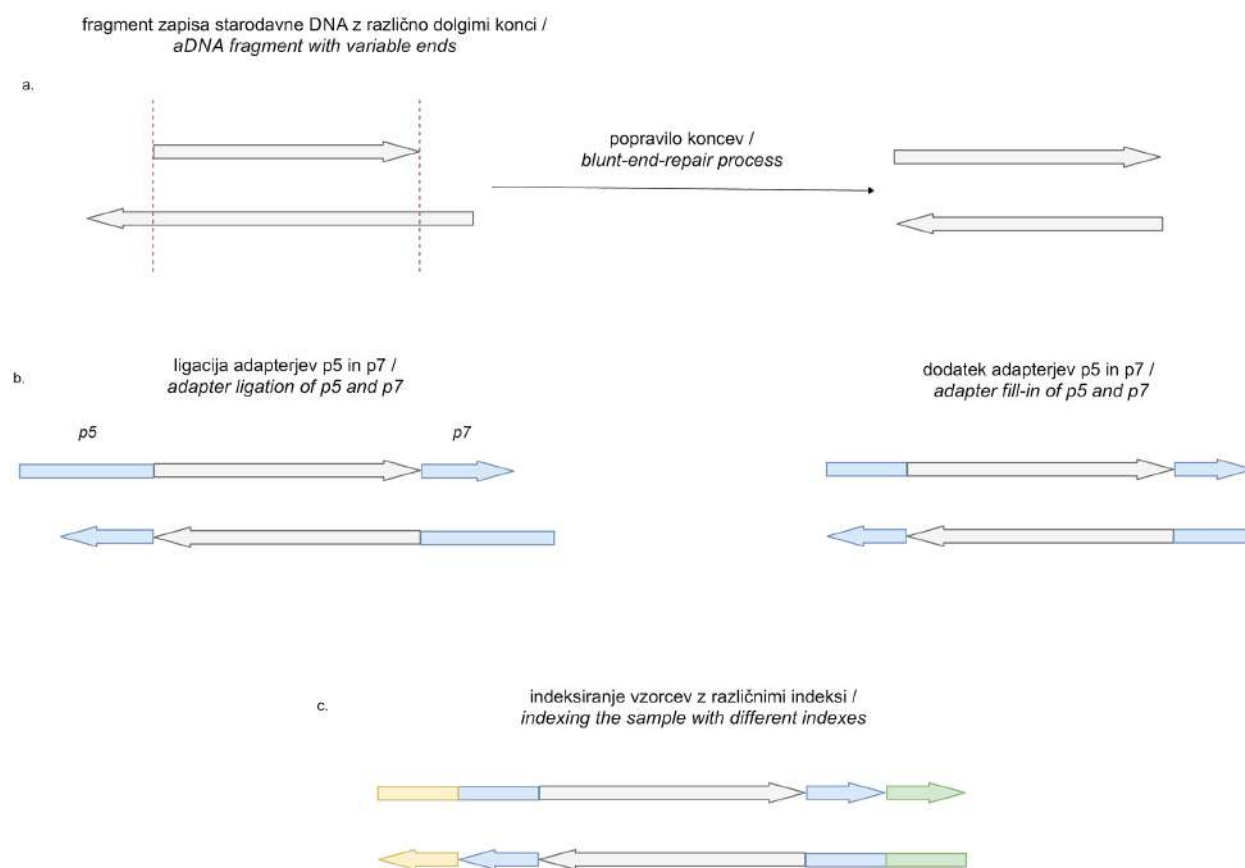
Knjižnice so lahko enoverižne (angl. *single-stranded DNA*; ssDNA) ali dvoverižne (angl. *double stranded DNA*; dsDNA), odvisno od potreb raziskave in želenih rezultatov. Za nekakšen zlati standard velja priprava enoverižnih knjižnic, ki se za razliko od dvoverižnih knjižnic bolje obnesejo pri sekvenciranju previsnih koncev na fragmentu DNA (glej sliko 6a in narisani previsni konec na spodnjem fragmentu), ki jih dvoverižne knjižnice odrežejo. Enoverižne knjižnice ta proces zaobidejo z ligacijo adapterjev (pojasnjeno v nadaljevanju) neposredno na te previsne konce (Liu *et al.* 2022).

Takšne knjižnice pridejo v poštev predvsem v primerih, ko gre za starejše in dragocenejše vzorce, medtem ko za večino komercialnih raziskav v poštev pride priprava dvoverižnih knjižnic. Razlogi za to so predvsem boljša cenovna dostopnost, krajši čas priprave in konsistentnost rezultatov.⁷

V nadaljevanju opisujem primer priprave preproste dvoverižne knjižnice. Pri njeni pripravi prva točka temelji na popravilu poškodovanih previsnih koncev 5' in 3' ogljikovih atomov (angl. *blunt end repair*; slika 6a), ki z uporabo T4 polinukleotidne kinaze odreže ali dopolni konce fragmentov molekul DNA. Naslednji korak je uporaba T4 DNA ligaze, ki adapterja p5 in p7 veže na konce teh molekul (angl. *adapter ligation*; slika 6b). Adapterja nimata vpliva na sekvenciranje in stabilizirata fragmente za kasnejšo verižno reakcijo s polimerazo. Zadnji korak za optimizacijo knjižnice je dodatek adapterjev (angl. *adapter fill-in*; slika 6b), ki z uporabo molekul dNTP adapterje podaljšajo, da je knjižnica dokončno pripravljena na nadaljnje postopke (Meyer, Kircher 2010, 4, Fig. 1). Ob pripravi knjižnic tako kot pri izolaciji dodamo še negativno kontrolo za kontrolo kontaminacije reagentov (angl. *library negative blank*). V večini primerov dodamo tudi pozitivno kontrolo (angl. *library positive blank*), predvsem ko govorimo o vzorcih, pri katerih nismo prepričani, ali je v njih sploh ohranjena starodavna DNA.

Pri pripravi knjižnic velja omeniti tudi nov zlati standard predpriprave vzorcev s postopkom UDG (angl. *uracil DNA glycosylase*; okrajšava UDG) ali delnim postopkom UDG (v literaturi pogosto imenovan angl. *partial UDG treatment*). Gre za postopek, ki sem ga omenila že pred nekaj poglavji in v protokolu priprave knjižnic nastopi pred procesom popravila previsnih koncev (slika 6b). S postopkom UDG zmanjšamo učinek deaminacije in odstranimo vse deaminirane citozine (ki so po procesu deaminacije uracili) (Liu *et al.* 2022). Ker lahko s tem odstranimo velik del starodavnih molekul DNA, raziskovalci večinoma uporabljajo delni postopek UDG, ki je krajši in ohrani poškodovano strukturo molekul, hkrati pa kljub temu odstrani posmrtno pretvorbo (Rohland *et al.* 2015).

⁷ Ob tem je vredno omeniti nov, cenejši in hitrejši protokol priprave enoverižnih knjižnic (glej Kapp *et al.* 2021), ki bo sčasoma z dopolnitvami verjetno postal po ceni in konsistentnosti rezultatov ravno tako primeren za komercialne in večje projekte.



Slika 6. Poenostavljen prikaz priprave dvoverižne knjižnice vzorca za sekvenciranje naslednje generacije. a. Prikazuje fragment izolirane starodavne DNA in proces popravila previsnih koncev, da sta obe strani dvoverižnega fragmenta DNA poravnani. b. Ligacija in dodatek adapterjev p5 in p7 za stabilizacijo fragmentov med verižno reakcijo s polimerazo. c. Indeksiranje vzorca z različnimi zaporedji baznih parov, ki ločijo vzorec od drugega (povzeto po Meyer, Kircher 2010, Fig. 1).

Figure 6. A simplified view of the sample double-stranded library process preparation for the NGS. a. A fragment of aDNA following a blunt-end-repair process. b. Adapter ligation of p5 and p7 and furthermore adapter-fill-in for stabilization of the sample during the PCR process. c. Indexing the sample with different known indexes (barcodes) so the samples cannot be mixed during subsequent processes (PCR amplification, Capture, sequencing) (adapted from Meyer, Kircher 2010, Fig. 1).

Verižna reakcija s polimerazo in indeksiranje

Pred sekvenciranjem knjižnic je treba vzorce indeksirati oziroma kodirati (angl. *barcoding*; slika 6c), da se lahko razlikujejo drug od drugega, ko jih združimo v skupen vzorec za sekvenciranje. Indeksiranje še zmeraj poteka v čistem in sterilnem okolju, kjer je možnost kontaminacije vzorcev čim manjša, saj je ta postopek za sekvenciranje zelo pomemben, pomembna pa je tudi doslednost zapisovanja in vodenja laboratorijskega dnevnika, da se indeksi med seboj ne pomešajo. V primeru napake je

lahko celotna skupina vzorcev popolnoma neuporabna za sekvenciranje. Kot v prejšnjih dveh korakih tudi pri indeksiranju dodamo negativno kontrolo.

Indeksi so označeni (indeksirani) začetniki z znanimi zaporedji baznih parov (na primer CGGCATGCTA), ki se vežejo na oba konca molekul, in sicer na adapterje p5 in p7. Vsak indeks ima svoje zaporedje in je dodeljen le enemu vzorcu, posledično pa je vsak vzorec v sekvenciranju ločen od drugega. Po indeksiranju vzorcev sledi verižna reakcija s polimerazo, ki pomnoži že

obstoječe fragmente znotraj vzorcev za njihovo lažje sekvenciranje. Če je naš cilj sekvenciranje vzorca, kjer nas zanima vse, lahko po opravljenih kontrolah kvalitete vzorcev (uporaba naprav QuBit in BioAnalyzer ali Tape Station) te vzorce združimo in pošljemo na sekvenciranje naslednje generacije (angl. *shotgun sequencing*). To pomeni, da bodo sekvencirane vse molekule DNA znotraj vzorca, ki pa so lahko tudi okoljska, živalska, mikrobiot-ska in človeška DNA ter navsezadnje morebitna moderna kontaminacija. Takšno sekvenciranje je z vidika stroškov dražje, zato se veliko skupin odloča za tarčno sekvenciranje, ki omogoča sekvenciranje točno določenih molekul DNA, ki nas zanimajo (opis v nadaljevanju).

Tarčno sekvenciranje

Da lahko izvedemo tarčno sekvenciranje, je treba vzorce najprej pripraviti – postopek se imenuje *Capture* (slovenske ustreznice ni, najbližji prevod bi lahko bil *iskanje tarče*), temu pa sledi še obogatitev tarče. Metoda *Capture* temelji na tarčnem iskanju točno določenega dela vzorca, v večini primerov gre za iskanje jedrne DNA ali mitohondrijske DNA, v zadnjih letih pa so se razvile tudi vabe za različne virusne, bakterijske ali živalske DNA, prav tako pa lahko uporabljamo tarčno iskanje neandertalske ali denisovske DNA. Metoda *Capture* cilja na čim več preostale endogene DNA v molekulah (ki jih je kljub vsem opisanim postopkom le < 1 %) z uporabo RNA⁸ vab, ki temeljijo na modernih referenčnih bazah genomov (ali že izoliranih in sekvenciranih arhaičnih genomov). Vabe so posebej pripravljene za starodavno DNA v raztopinah in nase vežejo tarčo (na primer mtDNA ali DNA virusa *Yersinia pestis*), nato pa se vežejo na magnetne kroglice, prevlečene s streptavidinom. Nevezano DNA, ki v tem primeru predstavlja vse tisto, kar za raziskavo ni pomembno, v nadaljnjih postopkih speremo iz raztopine, ujeta DNA na magnetnih kroglicah pa nato eluciramo in obogatimo za sekvenciranje (Carpenter *et al.* 2013, 835). Naslednji korak je podoben koraku pred tarčnim iskanjem, saj elucirane vzorce z ujeto tarčno DNA obogatimo in pomnožimo s polimerazo v reakciji PCR.

Zadnja stopnja pred sekvenciranjem naslednje generacije je ponovno preverjanje kvalitete proizvedenih knjižnic

8 RNA ali ribonukleinska kislina je enoverižna molekula, sestavljena iz ribonukleotidov (ti pa imajo eno od že prej omenjenih štirih baz). Lahko naredi tudi dvojno vijačnico s komplementarno RNA ali DNA (Splet 2).

vzorcev z napravami QuBit in BioAnalyzer ali Tape Station. Nato vzorce združimo in pošljemo na sekvenciranje na napravi Illumina.

Analiza sekvenciranih vzorcev

Rezultate sekvenciranja moramo analizirati s pomočjo bioinformatike, saj so surovi in v različnih tipih datotek, ki jih je treba najprej urediti, preden jih lahko analiziramo za potrebe raziskave in raziskovalnih vprašanj. Bioinformatika, ki analizira sekvencirane podatke starodavne DNA, se zaradi narave fragmentirane in pogosto kontaminirane starodavne DNA poslužuje drugačnih postopkov kot bioinformatika sodobne genetike. Bioinformatiki rezultate sekvenciranja analizirajo z več različnimi postopki (cevvodi), ki so odvisni od metode priprave vzorcev (na primer *shotgun sequencing*). Ti v primeru uporabe zgoraj opisane metode dvoverižnih knjižnic vključujejo pregled in pretvorbo datotek v posebni formatih, pregled kvalitete podatkov (na primer uporaba orodja *FastQC*), obrezovanje adapterjev, filtriranje odčitkov zaporedja, filtriranje pomnoženih sekvenc v primeru tarčnega sekvenciranja, razlikovanje med kontaminiranimi in nekontaminiranimi vzorci (tega pri tarčnem sekvenciranju ni) ter popravilo poškodb DNA, ki so nastale *post mortem* (Schubert *et al.* 2012; 2014).

Pregledane in prečiščene sekvence bioinformatiki poravnajo z referenčnimi genomi (človeški, živalski, virusni, bakterijski, neandertalski itd.), kjer opazujejo, kolikokrat se sekvenca vzorca prekriva z referenčnim genomom. Število prekrivanj nam pove stopnjo pokritosti analiziranega genoma z referenčnim. Po poravnavi genoma sledi odstranjevanje duplikatov,⁹ ki so nastali med pomnoževanjem, zatem pa se začne analiza SNP-jev¹⁰ in anotacija genov (Altman *et al.* 2012), ki nas lahko ob podrobnejši bioinformatični analizi končno privedejo do kvalitativnih rezultatov, te pa lahko povežemo v širše celote.

9 Ob pomnoževanju fragmentov starodavne DNA z reakcijo PCR upamo na čim večjo pomnožitev teh kratkih fragmentov z namenom, da jih bomo ob *shotgun* sekvenciranju zaznali. Zaradi tega ob sekvenciranju nastanejo duplikati istih sekvenc fragmentov, ki pa pri nadaljnji analizi niso več potrebni in jih lahko odstranimo.

10 SNP je okrajšava za polimorfizem posameznega nukleotida (angl. *single nucleotide position*). Gre za mutacijo zaporedja DNA, ko se en nukleotid razlikuje od ostalih zaporedij iste vrste (Splet 3) in s tem nakazuje razliko v zapisu DNA med različnimi populacijami.

Diskusija

Kaj lahko preučujemo s starodavno DNA?

Nadaljnje bioinformatične analize so odvisne od raziskovalnih vprašanj projekta. Skoraj vse opisane točke v spodnjem poglavju analiziramo s pomočjo bioinformatičnih orodij in različnih programov. Po končanih analizah pa lahko rezultate povežemo v večje celote in poskusimo odgovoriti na vprašanja o specifični vrsti, dogodkih in življenju v preteklosti. V nadaljevanju sledi krajši pregled nekaterih področij, ki jih lahko preučujemo s pomočjo starodavne DNA.

Filogenetika

Eno izmed področij, ki jih lahko preučujemo s pomočjo starodavne DNA, je filogenetika, preučevanje sorodstvenih odnosov med različnimi vrstami ali med skupinami živega sveta. Z vsako novo raziskavo lahko širimo filogenetska drevesa vrst in tako raziskujemo njihov razvoj ter določamo natančnejše točke v zgodovini, kjer so se razdelile na podvrste. Dober primer filogenetskih dreves so raziskave evolucije človeka in njegovih arhaičnih prednikov (Slon *et al.* 2018; Narasimhan *et al.* 2019) ali celo evolucije virusov in bakterij. Med slednjimi je velikega porasta v številu raziskav deležna bakterija *Yersinia pestis*,¹¹ ki je bila v zgodovini kriva za izbruhe pandemij kuge (na primer Justinijanova kuga, izbruh kuge v poznosrednjeveški Evropi itd.). S pomočjo analize starodavne DNA so študije pokazale prisotnost bakterije tudi v času neolitika ter analizirale virulenco in mutacije te bakterije v naši preteklosti (Bos *et al.* 2011; Schuenemann *et al.* 2011; Spyrou *et al.* 2019).

Prilagajanje, introgresija in hibridizacija vrst

Z analizo starodavne DNA lahko opazujemo tudi prilagajanje (angl. *adaptation*), hibridizacijo ali izmenjavo genov (angl. *admixture*) ter introgresijo skozi hibridizacijo (angl. *introgression*) znotraj vrst *Homo* in med njimi. Prilagajanje je proces fenotipskih in genetskih sprememb, ki se zgodijo skozi čas in v določenem kontekstu prinašajo večjo sposobnost razmnoževanja (Racimo *et al.* 2015). Hibridizacija je genetska izmenjava med posamezniki iz dveh različnih populacij, ki sta bili v preteklosti izolirani,

pri čemer gre lahko za različni vrsti ali le dve med seboj izolirani ljudstvi. Introgresija (v primeru paleogenomike govorimo predvsem o introgresiji arhaičnih genov) pa je vnos genetskega materiala iz arhaičnih in danes že izumrlih populacij v naše prednike s pomočjo hibridizacije – dveh ločenih (geografsko, genetsko itd.) vrst, ki sta v preteklosti doživeli dogodek izmenjave genov (Nielsen *et al.* 2017).

S preučevanjem prilagajanja, hibridizacije oziroma izmenjave genov in introgresije lahko podrobneje sledimo evoluciji in opazujemo, kako so se vrste razvijale ter kakšen vpliv so imele druga na drugo. Primer tega so geni, ki smo jih sodobni ljudje podedovali od arhaičnih človeških vrst – na primer Neandertalcev in Denisovcev. Eden izmed njih je gen *EPAS1*, ki izvira iz Denisovcev in je povezan z življenjem na višjih nadmorskih višinah, še danes pa je prisoten v prebivalcih tibetanskih planot (Huerta-Sánchez *et al.* 2014). Na drugi strani poznamo prilagoditev človeka na pitje mleka in prisotnost encima laktaze tudi po času otroštva za lažje presnavljanje laktoze (Tishkoff *et al.* 2006).

Populacijska genetika

Populacijska genetika je zelo široko področje, ki ga lahko raziskujemo tudi v okviru starodavne DNA. Med drugim lahko raziskujemo razmerja med efektivno velikostjo populacije in njeno genetsko raznolikostjo (Hamilton 2009, 1), prav tako pa lahko vzorce analiziramo z demografskega vidika. Sekvencirani genom nam omogoča, da lahko z 99,9-odstotno gotovostjo ocenimo spol posameznika, to pa nam lahko med drugim omogoča podrobnejše študije osteoloških metod za oceno spola ali boljše razumevanje pridajanja grobnih pridatkov. Raziskujemo lahko tudi sorodstvene vezi med analiziranimi posamezniki ter vezi s predniki, in sicer s pomočjo haploskupin Y-kromosoma ali mtDNA. Te nam lahko veliko povedo o migracijskih poteh, ki so zaznamovale današnjo sestavo populacije in segajo več tisoč let v preteklost (Furtwängler *et al.* 2020; Olalde *et al.* 2018; Pinhasi *et al.* 2012).

Sobivanje vrst

Poleg preučevanja sodobnega človeka, njegovih arhaičnih vrst, živali, rastlin in drugih nekdanjih živih bitij nam analize starodavne DNA omogočajo podrobnejši vpogled v sobivanje vseh naštetih ter na spremembe, ki so

¹¹ Kuga je bolezen, ki jo povzroča enterobakterija *Yersinia pestis* (Gram-negativen bacil).

jih predvsem živali in rastline doživele zaradi gojenja rastlin in udomačitve živali. Kot primer gojenja rastlin lahko omenim spremembe v DNA zapisu koruze, ki se je gojenju prilagodila s spremenjenim časom cvetenja, boljšim shranjevanjem semen ter lažje dostopnim in užitim jedrom (Jaenicke-Després *et al.* 2003). Pri živalih naj omenim kokoši, ki so zaradi namerne reje v zadnjem tisočletju povečale produkcijo jajc, ter udomačitev konj in psov. Pri psih je zanimiv izsledek, da so se življenju s človekom prilagodili tudi z možnostjo presnavljanja škrobnih živil (Axelsson *et al.* 2013), česar pred tem niso mogli, medtem ko so konji spremenili velikost ter različne fizične lastnosti, kot na primer barvo kože (Der Sarkissian *et al.* 2015; Marciniak, Perry 2017).

Uporaba in interpretacija rezultatov analiz starodavne DNA v arheologiji

V zgornjih poglavjih sem predstavila laboratorijske tehnike in nekaj primerov interpretacije rezultatov, ki jih lahko dobimo s takšnimi analizami. V tem delu pa bi se rada na kratko posvetila uporabi in interpretaciji rezultatov analiz starodavne DNA v arheologiji.

Starodavna DNA v arheologiji močno pripomore pri razumevanju človeka, načina življenja in družbe v preteklosti, saj odpira možnost podrobnejšega preučevanja družbene strukture in dinamike med posamezniki tako na lokalni kot širši ravni. To pa je konec koncev eden izmed ciljev te vede (Kristiansen 2009, 26).

Naj omenim nekaj primerov, ki pričajo o dobri praksi kombinacije arheologije in starodavne DNA. Pri Fowler *et al.* 2022 so s pomočjo arheoloških in genetskih podatkov prišli do zanimivih zaključkov o družbeni dinamiki pokopanih posameznikov v zgodnjeneolitski grobnici Hazelton North v Angliji. Gre za pokop patriarhalne skupnosti, kjer je imel en moški potomce z vsaj štirimi različnimi ženskami, ki so bile skupaj z otroki in vnuki pokopane v isti grobnici, razdeljeni glede na matriarhalne linije. Analize starodavne DNA so omogočile podrobnejši vpogled v sorodstvene vezi med pokojniki, ki jih zgolj z arheološko analizo najdišča ne bi mogli ugotoviti. V oči so najbolj padli pokopani posamezniki, ki niso bili genetsko povezani z originalnim moškim prednikom, pri čemer so avtorji izpostavili možnost posvojitve in doje-manje družine ne glede na krvno sorodstvo. Starodavna DNA je v tem primeru močno pripomogla k razumevanju

pokopane neolitske skupnosti v Hazelton North ter odprla diskurz o družinski pripadnosti in vlogi posameznikov v družini, pri čemer biološka sorodnost ni nujno imela tako velikega pomena.

Na tak način lahko s pomočjo starodavne DNA preučujemo tudi odnose med več različnimi skupnostmi, ki so morda živele in bile pokopane na različnih mestih na istem najdišču. Takšne analize nam seveda ne morejo posredovati podatkov o družbenem sloju, lahko pa s pomočjo arheoloških podatkov o pokopavanju razvijemo hipoteze o družbeni dinamiki znotraj pokopanih skupnosti in med njimi. Primer takšne raziskave je raziskava Novak *et al.* 2021, v kateri so s pomočjo starodavne DNA ugotovili genetsko sestavo pokojnikov v 6200 let stari grobnici iz Potočanov na Hrvaškem. V grobnici je bilo pokopanih 21 posameznikov, ki so umrli nasilne smrti. Zgolj z antropološko in arheološko analizo najdišča raziskovalci niso mogli ugotoviti razloga za pokol. S pomočjo analiz starodavne DNA pa so lahko odgovorili na vprašanje, ali je šlo za kakršno koli preferenco v spolu in starosti ter ali je šlo za prišleke. Rezultati so pokazali, da v skupini ni bilo pristranskosti glede na spol ali starost, pokojniki pa med seboj niso bili v sorodstvenih razmerjih (razen nekaterih izjem). Genetsko prav tako niso kazali indicov, da so del druge skupine ljudi, ki se je pred kratkim naselila na tem območju, temveč del iste večje skupine ljudi, ki se je na širšem področju ukvarjala s kmetovanjem. Avtorji so tako lahko zaključili, da je šlo za organizirano nasilje (ali masaker) nad skupino ljudi znotraj večje skupnosti, nasilje pa je verjetno temeljilo na diskriminaciji, ki je s pomočjo arheoloških, antropoloških in genetskih raziskav ne moremo razkriti.

Analize starodavne DNA lahko tudi potrdijo ali ovržejo obstoj virusnih in/ali bakterijskih obolenj, kar lahko dodatno osvetli način pokopa določene skupine ljudi. Človeško zgodovino so močno zaznamovale epidemije različnih bolezni, med njimi pa izstopajo epidemije kuge in gubavosti (tj. Hansenova bolezen, ki na skeletu ni vedno nujno pustila sledov). S pomočjo genetskih analiz lahko na primer raziskujemo, ali so bila določena grobišča namenjena pokopu bolnih posameznikov (kot na primer leprozariji v okolici samostanov, kjer so skrbeli zanje – za podrobnejši pregled glej Pfrengle *et al.* 2021) ali pa je šlo za ločene grobnice, v katere so zapečatili pokojnike s kugo (za pregled glej Castex, Kacki 2022, za paleogenetsko analizo glej Bos *et al.* 2011).

Preučujemo lahko tudi migracije v različnih arheoloških obdobjih. V arheološki stroki so verjetno največ prahu dvignile migracije v času neolitika in bronaste dobe, pri čemer se je postavljalo vprašanje, ali govorimo o demski ali kulturni difuziji. Temu sledijo tudi novejša študije populacijske paleogenetike, kot na primer Patterson *et al.* (2022) in Olalde *et al.* (2019), ki sta preučevali družbene premike v času neolitika in bronaste dobe. Gre torej za čas, ko pisnih virov še nimamo, arheološki viri pa nam nudijo veliko prostora za interpretacije o prenosu tipa najdb po različnih geografskih območjih. Zdi se, da so rezultati analiz vzorcev starodavne DNA deloma odgovorili na vprašanje neolitske tranzicije in tehtnico prevesili na stran demske difuzije (González-Fortes *et al.* 2017). Genetsko gledano so dokazi za migracije znanstveno nedvoumni, vendar hkrati ne pojasnijo vzorcev obnašanja, interne družbene dinamike, zakaj je do migracij prišlo in kako so se odražale v materialni kulturi (Veeramah 2018, 83). V času zgodnje bronaste dobe v Evropi poznamo srečanje večjega števila prebivalstva s področij stepe, kot je bila skupina ljudi z »nalepko« Jamnaja, ki je mešanica vzhodnih kavkaških lovcev nabiralcev in zgodnjeneolitskih Irancev (Veeramah 2018, 84), kulture trakastih loncev in kulture zvončastih čaš (Haak *et al.* 2015; Olalde *et al.* 2018; Furholt 2018; Wang *et al.* 2019). V tem primeru se je izkazalo, da lahko določeno materialno kulturo prepoznamo na več različnih koncih Evrope, analize starodavne DNA pa so pokazale, da so njeni »lastniki« različne skupine ljudi. Iz tega lahko razberemo, da materialne kulture ne moremo enačiti z eno skupino ljudi in da njeni uporabniki niso nujno del iste homogene družbe ali skupine ljudi. Definirati in razumeti migracije je zelo težko, ker je treba poleg premika mase ljudi razumeti vlogo družbe in družbene dinamike, ki je privedla do migracije. Problematično je posploševanje rezultatov paleogenetskih analiz, ki so pogosto opravljene na majhnem številu vzorcev ter jih lahko zmotno interpretiramo in postavimo v širši geografski prostor (Veeramah 2018, 85).

Tudi pri uporabi termina demska difuzija moramo biti izjemno previdni, saj ne glede na rezultat genetskih analiz, ki dokazujejo migracijo skupin ljudi po Evropi, in z njo delno zamenjavo prejšnje populacije na preučevanem geografskem območju ne moremo trditi, da je to razlog za menjavo materialne kulture. Še zmeraj moramo upoštevati mešanje idej, prav tako pa človeku ne moremo zgolj na podlagi analiz DNA dati »nalepke«, ki naj bi pričala o tem, kdo naj bi ta oseba bila, in ga uvrstiti v predal dolo-

čene skupine ljudi. To problematiko je obravnavala tudi Tina Milavec (2021) v članku prejšnjega Arhea »Slovane imamo!«, zato tu ne želim ponavljati njenih besed, saj je v omenjenem prispevku odlično povzela celotna problematika predalčkanja. Bi pa rada izpostavila, da moramo biti pri interpretiranju analiz DNA previdni, prav tako kot pri kombiniranju analiz DNA in arheoloških najdb. »Nalepke« so do določene mere potrebne, da se lažje orientiramo v času in prostoru, predvsem kadar govorimo o rezultatih analiz DNA, saj »nalepke« v en predal uvrstijo ljudi s podobno genetsko sestavo in olajšajo nadaljnje analize. Kot trdijo Pohl *et al.* (2021, 1), genetika ponuja orodja, s katerimi lahko identificiramo in izoliramo posameznike in različne skupnosti. Paleogenetske raziskave, objavljene v zadnjem desetletju, so namreč prinesle mnogo različnih interpretacij naše preteklosti, ki pa so ravno zaradi tega, ker gre za paleogenetsko študijo, temelječo zgolj na paleogenetskih podatkih, v vedah, ki se ukvarjajo s preteklostjo, pustile globoke sledi. Posledično se je med disciplinami, kot sta paleogenomika in arheologija, razvila določena napetost (Lalueza-Fox 2013). Temu, čemur paleogenomiki pravijo »kmetovalci«, »Slovani« ali »Avari«, ni treba brezglavo slediti brez dodatnih raziskav in usklajevanja z rezultati analiz arheološkega materiala. Genetiki niso arheologi in obratno, zato se lahko slabi volji izognemo z razumevanjem drug drugega. V interpretacijo je treba vključiti večjo mero previdnosti in objektivnosti ter splošen konsenz, da pri podeljevanju t. i. nalepk dovolimo več prostora za drugačno interpretacijo. Genetiki nam torej s svojimi modeli migracij na podlagi večjih prostorskih analiz izdelajo okvir, medtem ko lahko arheologi to znanje in okvir uporabimo, ju pretvorimo v kontekst ter s pomočjo naših znanj in najdb razložimo družbeno dinamiko in družbene premike.

Tako kot so arheologijo pred stoletjem uporabljali za potrjevanje ideje rase (na primer evgenika v času nacizma s povečevanjem germanskih ljudstev in ozemeljskih teženj), so danes problematični medijski prikazi, odmevni naslovi in izbrano poročanje o naši preteklosti. Ljudje si želijo pripadati nečemu večjemu in slavnemu, zato so rezultati različnih sodobnih genetskih raziskav (na primer 23andMe, AncestryDNA), da smo na primer potomci Vikingov, toliko bolj senzacionalni, čeprav je od takrat minilo že več kot tisoč let. Težava torej ni v rezultatih genetskih analiz, temveč v interpretaciji in interpretatorjih (v tem primeru medijih ali nas samih), ki kontroverzno obračamo besede in pretekle skupine ljudi z razburljivo

preteklostjo enačimo z »nami« (Jobling *et al.* 2016, 145; Pohl *et al.* 2021, 2).

Ključnega pomena je torej, kdo interpretira rezultate analiz, pri razlagah pa je treba upoštevati interdisciplinarnost in tako ustvariti objektivni kontekst, ki upošteva znanja različnih disciplin. V tem primeru govorimo o paleogenomiki in arheologiji, vendar bi lahko brez dvoma dodali še vsaj zgodovino in lingvistiko. Poleg tega je treba ustvariti nove standarde za interpretacijo genetskega materiala iz preteklosti, kot poskušajo storiti pri projektu ERC – HistoGenes (Pohl *et al.* 2021). Smiselno je povečati obseg raziskav, ki analizirajo večja medgeneracijska grobišča oziroma več posameznikov znotraj njih in ne le nekaj zanimivih posameznikov, ter iz njih sestaviti celotno zgodbo grobišča. Poleg analiz starodavne DNA in arheološke materialne kulture je primerno vključiti analize drugih disciplin, kot na primer antropološke analize skeletov in analize stabilnih izotopov, ki dodatno razširijo sliko najdišč in so uporabne ne le na človeških ostankih, temveč tudi na samih najdbah.

Na tak način se med seboj povezujejo različne vede, ki skupaj zasnujejo raziskovalna vprašanja in nanje celostno odgovarjajo. Takšno povezovanje posledično omogoča, da pridemo do boljšega konteksta tako analiziranega grobišča kot družbe, ki je bila v njem pokopana (Veeramah 2018, 85).

Zaključne misli

Analize starodavne DNA torej niso zgolj posnetek preteklosti, temveč omogočajo vpogled v zgodovino vrst, njihov razvoj in izumrtje, z njimi pa lahko opazujemo povezave med bitji in mikrobi, ki so bili na Zemlji danes ali več deset tisoč (in v nekaterih primerih več sto tisoč) let v preteklosti. Glede na velikanski skok in napredek, ki ga je veda doživela v zadnjem desetletju, je nemogoče predvidevati, kaj vse bomo še lahko analizirali, kako

daleč nazaj bomo lahko potegnili letnice sekvenciranih genomov in koliko vrst bomo še odkrili. Vsekakor pa gre za vedo, ki hitro napreduje, z njo pa tudi laboratorijske tehnike, ki se hitro razvijajo z željo po čim večji optimizaciji, čim manjši kontaminaciji vzorcev ter uporabi čim manj destruktivnih metod vzorčenja.

Ne glede na velik potencial, ki ga ima veda paleogenomika za razlaganje naše davne in ne tako davne preteklosti, moramo biti pri analizi rezultatov previdni ter, da bi se izognili posploševanju ali napačnim tezam, upoštevati znanja drugih ved. Le tako lahko skupaj z interdisciplinarnim pristopom ustvarimo celosten kontekst najdišč, družbe in navsezadnje naše preteklosti.

Cilj tega prispevka je seznaniti arheološko stroko s tematiko starodavne DNA. Glede na to, da so takšne raziskave v porastu in vedno bolj cenovno dostopne, je prav, da tudi arheologi poznamo njihove osnove. Več arheologov bo razumelo osnove genetskih analiz, ki temeljijo na vzorcih z arheoloških najdišč, tem bolje. Tako se izogibamo slabi volji ob tem, ko dobimo rezultate, saj razumemo, kakšne so omejitve analiz in koliko dela je vloženega v vzorce, ki so lahko kontaminirani ali zelo slabo ohranjeni. Upam, da se bo vedno več arheologov odločilo analizirati izkopane vzorce z analizami DNA (tudi sedimente, ki so lahko več kot izpovedni pri potrjevanju človeških in živalskih vrst tam, kjer kostnih ostankov nimamo). Seveda pa arheologi od teh študij ne moremo pričakovati čudežev, predvsem tam, kjer so kostni ostanki zelo slabo ohranjeni. Pri analizi rezultatov pa moramo ohraniti veliko mero objektivnosti in previdnosti.

Zahvala

Zahvaljujem se Kadirju Toykanu Özdoganu za delitev svojega še neobjavljenega magistrskega dela z menoj ter Kristianu Urhu za pomoč pri prevajanju strokovnih izrazov.

Literatura / References

- ADCOCK, G. J., E. S. DENNIS, S. EASTEAL, G. A. HUTTLEY, L. S. JERMIIN, W. J. PEACOCK, A. THORNE 2001, Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: Implications for modern human origins. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 537–542.
- ALBERT, I. 2019, *The Biostar Handbook* (2. izd. / 2nd ed.). <https://www.biostarhandbook.com>.
- ALTMAN, A., P. WEBER, D. BADER, M. PREUSS, E. B. BINDER, B. MÜLLER-MYHSOK 2012, A beginners guide to SNP calling from high-throughput DNA-sequencing data. – *Human genetics* 131, 1541–1554.
- AXELSSON, E., A. RATNAKUMAR, M.-L. ARENDT, K. MAQBOOL, M. T. WEBSTER, M. PERLOSKI, O. LIBERG, J. M. ARNEMO, Å. HEDHAMMAR, K. LINDBLAD-TOH 2013, The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. – *Nature* 495, 360–364.
- BOS, K. I., V. J. SCHUENEMANN, G. B. GOLDING, H. A. BURBANO, N. WAGLECHNER, B. K. COOMBES, J. B. MCPHEE, S. N. DEWITTE, M. MEYER, S. SCHMEDES, J. WOOD, D. J. D. EARN, D. A. HERRING, P. BAUER, H. N. POINAR, J. KRAUSE 2011, A draft genome of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. – *Nature* 478, 506–510.
- BROWN, T., K. BROWN 2011, *Biomolecular Archaeology: An Introduction*. – Chichester, West Sussex, Malden, Wiley-Blackwell.
- CARAMELLI, D., C. LALUEZA-FOX, C. VERNESI, M. LARI, A. CASOLI, F. MALLEGGNI, B. CHIARELLI, I. DUPANLOUP, J. BERTRANPETIT, G. BARBUJANI, G. BERTORELLE 2003, Evidence for a genetic discontinuity between neandertals and 24,000-year-old anatomically modern Europeans. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6593–6597.
- CARPENTER, M. L., J. D. BUENROSTRO, C. VALDIOSERA, H. SCHROEDER, M. E. ALLENTOLT, M. SIKORA, M. RASMUSSEN, S. GRAVEL, S. GUILÉN, G. NEKHRIZOV, K. LESHTAKOV, D. DIMITROVA, N. THEODOSSIEV, D. PETTENER, D. LUISELLI, K. SANDOVAL, A. MORENO-ESTRADA, Y. LI, J. WANG, M. THOMAS, P. GILBERT, E. WILLERSLEV, W. J. GREENLEAF, C. D. BUSTAMANTE 2013, Pulling out the 1%: Whole-Genome Capture for the Targeted Enrichment of Ancient DNA Sequencing Libraries. – *The American Journal of Human Genetics* 93, 852–864.
- CASTEX, D., S. KACKI 2022, ‘Bring Out Your Dead.’ – V / In: Knusel, C. J., Schotsmans, E. M. J. (ur. / eds.), *The Routledge Handbook of Archaeoethnology*. – London, Routledge, 331–352.
- DABNEY, J., M. KNAPP, I. GLOCKE, M. T. GANSAUGE, A. WEIHMANN, B. NICKEL, C. VALDIOSERA, N. GARCÍA, S. PÄÄBO, J. L. ARSUAGA, M. MEYER 2013, Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 15758–15763.
- DABNEY, J., M. MEYER 2019, Extraction of Highly Degraded DNA from Ancient Bones and Teeth. – V / In: Shapiro, B., A. Barlow, P. D. Heintzman, M. Hofreiter, J. L. A. Paijmans, A. E. R. Soares (ur. / eds.), *Ancient DNA: Methods and Protocols*. – New York, Humana Press, 25–31.
- DER SARKISSIAN, C., L. ERMINI, M. SCHUBERT, M. A. YANG, P. LIBRADO, M. FUMAGALLI, H. JÓNSSON, G. K. BAR-GAL, A. ALBRECHTSEN, F. G. VIEIRA, B. PETERSEN, A. GINOLHAC, A. SEGUIN-ORLANDO, K. MAGNUSSEN, A. FAGES, C. GAMBABA, B. LORENTE-GALDOS, S. POLANI, C. STEINER, M. NEUDITSCHKO, V. JAGANNATHAN, C. FEH, C. L. GREENBLATT, A. LUDWIG, N. I. ABRAMSON, W. ZIMMERMANN, R. SCHAFBERG, A. TIKHONOV, T. SICHERITZ-PONTEN, E. WILLERSLEV, T. MARQUES-BONET, O. A. RYDER, M. MCCUE, S. RIEDER, T. LEEB, M. SLATKIN, L. ORLANDO 2015, Evolutionary genomics and conservation of the endangered Przewalski’s horse. – *Current Biology* 25, 2577–2583.
- FOWLER, C., I. OLALDE, V. CUMMINGS, I. ARMIT, L. BÜSTER, S. CUTHBERT, N. ROHLAND, O. CHERONET, R. PINHASI, D. REICH 2022, A high-resolution picture of kinship practices in an Early Neolithic tomb. – *Nature* 601, 584–587.

- FURHOLT, M. 2018, Massive Migrations? The Impact of Recent aDNA Studies on our View of Third Millennium Europe. – *European Journal of Archaeology* 21, 159–191.
- FURLONG, R. 2021, Waking the dead: sequencing archaic hominin genomes. – *Nature Research*. <https://www.nature.com/articles/d42859-020-00112-6>.
- FURTWÄNGLER, A., A. B. ROHRLACH, T. C. LAMNIDIS, L. PAPAC, G. U. NEUMANN, I. SIEBKE, E. REITER, N. STEURI, J. HALD, A. DENAIRE, B. SCHNITZLER, J. WAHL, M. RAMSTEIN, V. J. SCHUENEMANN, P. W. STOCKHAMMER, A. HAFNER, S. LÖSCH, W. HAAK, S. SCHIFFELS, J. KRAUSE 2020, Ancient genomes reveal social and genetic structure of Late Neolithic Switzerland. – *Nature communications* 11, 1–11.
- GAMBA, C., E. R. JONES, M. D. TEASDALE, R. L. MCLAUGHLIN, G. GONZALEZ-FORTES, V. MATIANGELI, L. DOMBORÓCZKI, I. KOVÁRI, I. PAP, A. ANDERS, A. WHITTLE, J. DANI, P. RACZKY, T. F. G. HIGHAM, M. HOFREITER, D. G. BRADLEY, R. PINHASI 2014, Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. – *Nature Communications* 5, 1–9.
- GARLAND, A. N., R. C. JANAWAY 1989, The taphonomy of inhumation burials. – V / In: Roberts, C., Lee, F., Bintliff, J. (ur. / eds.), *Burial Archaeology: Current Research, Methods and Developments*. – BAR publishing, 15–37.
- GERŠAK, Ž. M., I. ZUPANIČ PAJNIČ, M. ČREŠNAR, T. ZUPANC 2019, Determination of DNA yield rates in six different skeletal elements in ancient bones. – *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, The 28th Congress of the International Society for Forensic Genetics 7, 120–122.
- GONZÁLEZ-FORTES, G., E. R. JONES, E. LIGHTFOOT, C. BONSALE, C. LAZAR, A. GRANDALD'ANGLADE, M. D. GARRALDA, L. DRAK, V. SISKKA, A. SIMALCSIK, A. BORONEANȚ, J. R. VIDAL ROMANÍ, M. VAQUEIRO RODRÍGUEZ, P. ARIAS, R. PINHASI, A. MANICA, M. HOFREITER 2017, Paleogenomic Evidence for Multi-generational Mixing between Neolithic Farmers and Mesolithic Hunter-Gatherers in the Lower Danube Basin. – *Current Biology* 27, 1801–1801.e10.
- GREEN, R. E., J. KRAUSE, S. E. PTAK, A. W. BRIGGS, M. T. RONAN, J. F. SIMONS, L. DU, M. EGHOLM, J. M. ROTHBERG, M. PAUNOVIC, S. PÄÄBO 2006, Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. – *Nature* 444, 330–336.
- HAAK, W., P. FORSTER, B. BRAMANTI, S. MATSUMURA, G. BRANDT, M. TANZER, R. VILLEMS, C. RENFREW, D. GRONENBORN, K. WERNER ALT, J. BURGER 2005, Ancient DNA from the First European Farmers in 7500-Year-Old Neolithic Sites. – *Science* 310, 1016–1018.
- HAAK, W., I. LAZARIDIS, N. PATTERSON, N. ROHLAND, S. MALLICK, B. LLAMAS, G. BRANDT, S. NORDENFELT, E. HARNEY, K. STEWARDSON, Q. FU, A. MITNIK, E. BÁNFFY, C. ECONOMOU, M. FRANCKEN, S. FRIEDERICH, R. G. PENA, F. HALLGREN, V. KHARTANOVICH, A. KHOKHLOV, M. KUNST, P. KUZNETSOV, H. MELLER, O. MOCHALOV, V. MOISEYEV, N. NICKLISCH, S. L. PICHLER, R. RISCH, M. A. ROJO GUERRA, C. ROTH, A. SZÉCSÉNYI-NAGY, J. WAHL, M. MEYER, J. KRAUSE, D. BROWN, D. ANTHONY, A. COOPER, K. W. ALT, D. REICH 2015, Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe. – *Nature* 522, 207–211.
- HAMILTON, M. B. 2009, *Population genetics*. – Chichester, Hoboken, Wiley-Blackwell.
- HARNEY, É., O. CHERONET, D. M. FERNANDES, K. SIRAK, M. MAH, R. BERNARDOS, N. ADAMSKI, N. BROOMANDKHOSHBACHT, K. CALLAN, A. M. LAWSON, J. OPPENHEIMER, K. STEWARDSON, F. ZALZALA, A. ANDERS, F. CANDILIO, M. CONSTANTINESCU, A. COPPA, I. CIOBANU, J. DANI, Z. GALLINA, F. GENCHI, E. G. NAGY, T. HAJDU, M. HELLEBRANDT, A. HORVÁTH, Á. KIRÁLY, K. KISS, B. KOLOZSI, P. KOVÁCS, K. KÖHLER, M. LUCCI, I. PAP, S. POPOVICI, P. RACZKY, A. SIMALCSIK, T. SZENICZEY, S. VASILYEV, C. VIRAG, N. ROHLAND, D. REICH, R. PINHASI 2021, A minimally destructive protocol for DNA extraction from ancient teeth. – *Genome Research* 31, 472–483.

- HEDGES, R. E. M. 2002, Bone diagenesis: an overview of the process. – *Archaeometry* 44, 319–328.
- HIGGINS, D., A. B. ROHRLACH, J. KAIDONIS, G. TOWNSEND, J. J. AUSTIN 2015, Differential Nuclear and Mitochondrial DNA Preservation in Post-Mortem Teeth with Implications for Forensic and Ancient DNA Studies. – *PLoS ONE* 10, e0126935.
- HIGUCHI, R., B. BOWMAN, M. FREIBERGER, O. A. RYDER, A. C. WILSON 1984, DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. – *Nature* 312, 282–284.
- HOFREITER, M. 2012, Nondestructive DNA Extraction from Museum Specimens. – *Methods in Molecular Biology* 840, 93–100.
- HUERTA-SÁNCHEZ, E., X. JIN, ASAN, Z. BIANBA, B. M. PETER, N. VINCKENBOSCH, Y. LIANG, X. YI, M. HE, M. SOMEL, P. NI, B. WANG, X. OU, HUASANG, J. LUOSANG, Z. X. P. CUO, K. LI, G. GAO, Y. YIN, W. WANG, X. ZHANG, X. XU, H. YANG, Y. LI, JIAN WANG, JUN WANG, R. NIELSEN 2014, Altitude adaptation in Tibetans caused by introgression of Denisovan-like DNA. – *Nature* 512, 194–197.
- JAENICKE-DESPRÉS, V., E. S. BUCKLER, B. D. SMITH, M. T. P. GILBERT, A. COOPER, J. DOEBLEY, S. PÄÄBO 2003, Early Allelic Selection in Maize as Revealed by Ancient DNA. – *Science* 302, 1206–1208.
- JOBLING, M. A., E. HOLLOX, M. HURLES, T. KIVISILD, C. TYLER-SMITH 2014, *Human Evolutionary Genetics* (2. izd. / 2nd ed.). – New York, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- JOBLING, M. A., R. RASTEIRO, J. H. WETTON 2016, In the blood: the myth and reality of genetic markers of identity. – *Ethnic and Racial Studies* 39, 142–161.
- KAPP, J. D., R. E. GREEN, B. SHAPIRO 2021, A Fast and Efficient Single-stranded Genomic Library Preparation Method Optimized for Ancient DNA. – *The Journal of Heredity* 112, 241–249.
- KELLER, A., A. GRAEFEN, M. BALL, M. MATZAS, V. BOISGUERIN, F. MAIXNER, P. LEIDINGER, C. BACKES, R. KHAIRAT, M. FORSTER, B. STADE, A. FRANKE, J. MAYER, J. SPANGLER, S. MCLAUGH-
LIN, M. SHAH, C. LEE, T. T. HARKINS, A. SARTORI, A. MORENO-ESTRADA, B. HENN, M. SIKORA, O. SEMINO, J. CHIARONI, S. ROOTSI, N. M. MYRES, V. M. CABRERA, P. A. UNDERHILL, C. D. BUSTAMANTE, E. E. VIGL, M. SAMADELLI, G. CIPOLINI, J. HAAS, H. KATUS, B. D. O’CONNOR, M. R. J. CARLSON, B. MEDER, N. BLIN, E. MEESE, C. M. PUSCH, A. ZINK 2012, New insights into the Tyrolean Iceman’s origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing. – *Nature communications* 3, 1–9.
- KISTLER, L., R. WARE, O. SMITH, M. COLLINS, R. G. ALLABY 2017, A new model for ancient DNA decay based on paleogenomic meta-analysis. – *Nucleic Acids Research* 45, 6310–6320.
- KORLEVIĆ, P., T. GERBER, M. T. GANSAUGE, M. HAJDINJAK, S. NAGEL, A. AXIMU-PETRI, M. MEYER 2015, Reducing microbial and human contamination in DNA extractions from ancient bones and teeth. – *Bio-techniques* 59, 87–93.
- KRISTIANSEN, K. 2009, The Discipline of Archaeology. – V / In: Gosden, C., Cunliffe, B., Joyce, R. A. (ur. / eds.), *The Oxford Handbook of Archaeology*. – New York, Oxford University Press, 25–54.
- KRSTIĆ, M. 2019, *Učinkovita izolacija starodavne DNA iz kosti in koprolitov* (Neobjavljeno diplomsko delo / Unpublished bachelor’s thesis, Univerza na Primorskem). – Koper.
- LALUEZA-FOX, C. 2013, Agreements and misunderstandings among three scientific fields: Paleogenomics, archaeology, and human paleontology. – *Current Anthropology* 54, S214–S220.
- LIPAR, M., I. Z. PAJNIČ, M. COTMAN, J. Z. PIANO, J. ZHAO, D. PEKAROVIČ, T. LESKOVAR 2020, DNA, spectroscopic and geochemical analyses of bone fragments and associated speleothems in Postojna cave, Slovenia. – *Acta Carsologica* 49, 191–211.
- LIU, Y., E. A. BENNETT, Q. FU 2022, Evolving ancient DNA techniques and the future of human history. – *Cell* 185, 2632–2635.
- MARCINIAK, S., G. H. PERRY 2017, Harnessing ancient genomes to study the history of human adaptation. – *Nature Reviews Genetics* 18, 659–674.

MEYER, M., M. KIRCHER 2010, Illumina Sequencing Library Preparation for Highly Multiplexed Target Capture and Sequencing. – *Cold Spring Harbor Protocols* 2010, pdb.prot5448-pdb.prot5448.

MEYER, M., M. KIRCHER, M.-T. GANSAUGE, H. LI, F. RACIMO, S. MALLICK, J. G. SCHRAIBER, F. JAY, K. PRÜFER, C. DE FILIPPO, P. H. SUDMANT, C. ALKAN, Q. FU, R. DO, N. ROHLAND, A. TANDON, M. SIEBAUER, R. E. GREEN, K. BRYC, A. W. BRIGGS, U. STENZEL, J. DABNEY, J. SHENDURE, J. KITZMAN, M. F. HAMMER, M. V. SHUNKOV, A. P. DEREVIANKO, N. PATTERSON, A. M. ANDRÉS, E. E. EICHLER, M. SLATKIN, D. REICH, J. KELSO, S. PÄÄBO 2012, A High-Coverage Genome Sequence from an Archaic Denisovan Individual. – *Science* 338, 222–226.

MILAVEC, T. 2021, »Slovane imamo!« O izrazih in poimenih v zgodnjem srednjem veku. – *Arheo* 38, 83–87.

NARASIMHAN, V. M., N. PATTERSON, P. MOORJANI, N. ROHLAND, R. BERNARDOS, S. MALLICK, I. LAZARIDIS, N. NAKATSUKA, I. OLALDE, M. LIPSON, A. M. KIM, L. M. OLIVIERI, A. COPPA, M. VIDALE, J. MALLORY, V. MOISEYEV, E. KITOV, J. MONGE, N. ADAMSKI, N. ALEX, N. BROOMANDKHOSHBAHT, F. CANDILIO, K. CALLAN, O. CHERONET, B. J. CULLETON, M. FERRY, D. FERNANDES, S. FREILICH, B. GAMARRA, D. GAUDIO, M. HAJDINJAK, É. HARNEY, T. K. HARPER, D. KEATING, A. M. LAWSON, M. MAH, K. MANDL, M. MICHEL, M. NOVAK, J. OPPENHEIMER, N. RAI, K. SIRAK, V. SLON, K. STEWARDSON, F. ZALZALA, Z. ZHANG, G. AKHATOV, A. N. BAGASHEV, A. BAGNERA, B. BAITANAYEV, J. BENDEZU-SARMIENTO, A. A. BISSEMBAEV, G. L. BONORA, T. T. CHARGYNOV, T. CHIKISHEVA, P. K. DASHKOVSKIY, A. DEREVIANKO, M. DOBEŠ, K. DOUKA, N. DUBOVA, M. N. DUISENGALI, D. ENSHIN, A. EPIMAKHOV, A. V. FRIBUS, D. FULLER, A. GORYACHEV, A. GROMOV, S. P. GRUSHIN, B. HANKS, M. JUDD, E. KAZIZOV, A. KHOKHLOV, A. P. KRYGIN, E. KUPRIYANOVA, P. KUZNETSOV, D. LUISELLI, F. MAKUDOV, A. M. MAMEDOV, T. B. MAMIROV, C. MEIKLEJOHN, D. C. MERRETT, R. MICHELI, O. MOCHALOV, S. MUSTAFOKULOV, A. NAYAK, D. PETTENER, R. POTTS, D. RAZHEV, M. RYKUN, S. SARNO, T. M. SAVENKOVA, K. SIKHYMBAEVA,

S. M. SLEPCHENKO, O. A. SOLTOLBAEV, N. STEPANOVA, S. SVYATKO, K. TABALDIEV, M. TESCHLER-NICOLA, A. A. TISHKIN, V. V. TKACHEV, S. VASILYEV, P. VELEMÍNSKÝ, D. VOYAKIN, A. YERMOLAYEVA, M. ZAHIR, V. S. ZUBKOV, A. ZUBOVA, V. S. SHINDE, C. LALUEZA-FOX, M. MEYER, D. ANTHONY, N. BOIVIN, K. THANGARAJ, D. J. KENNETT, M. FRACHETTI, R. PINHASI, D. REICH 2019, The formation of human populations in South and Central Asia. – *Science* 365, eaat7487.

NIELSEN, R., J. M. AKEY, M. JAKOBSSON, J. K. PRITCHARD, S. TISHKOFF, E. WILLERSLEV 2017, Tracing the peopling of the world through genomics. – *Nature* 541, 302–310.

NOONAN, J. P., G. COOP, S. KUDARAVALLI, D. SMITH, J. KRAUSE, J. ALESSI, F. CHEN, D. PLATT, S. PÄÄBO, J. K. PRITCHARD, E. M. RUBIN 2006, Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. – *Science* 314, 1113–1118.

NOVAK, M., I. OLALDE, H. RINGBAUER, N. ROHLAND, J. AHERN, J. BALEN, I. JANKOVIĆ, H. POTREBICA, R. PINHASI, D. REICH 2021, Genome-wide analysis of nearly all the victims of a 6200 year old massacre. – *PLoS ONE* 16, 1–14.

OLALDE, I., S. BRACE, M. E. ALLENTOF, I. ARMIT, K. KRISTIANSEN, T. BOOTH, N. ROHLAND, S. MALLICK, A. SZÉCSÉNYI-NAGY, A. MITTNIK, E. ALTENA, M. LIPSON, I. LAZARIDIS, T. K. HARPER, N. PATTERSON, N. BROOMANDKHOSHBAHT, Y. DIEKMANN, Z. FALTYSKOVA, D. FERNANDES, M. FERRY, E. HARNEY, P. DE KNIJFF, M. MICHEL, J. OPPENHEIMER, K. STEWARDSON, A. BARCLAY, K. W. ALT, C. LIESAU, P. RIOS, C. BLASCO, J. V. MIGUEL, R. M. GARCIA, A. A. FERNANDEZ, E. BANFFY, M. BERNABO-BREA, D. BILLOIN, C. BONSALE, L. BONSALE, T. ALLEN, L. BUSTER, S. CARVER, L. C. NAVARRO, O. E. CRAIG, G. T. COOK, B. CUNLIFFE, A. DENAIRE, K. E. DINWIDDY, N. DODWELL, M. ERNEE, C. EVANS, M. KUCHARIK, J. F. FARRE, C. FOWLER, M. GAZENBEEK, R. G. PENA, M. HABER-URIARTE, E. HADUCH, G. HEY, N. JOWETT, T. KNOWLES, K. MASSY, S. PFRENGLE, P. LEFRANC, O. LEMERCIER, A. LEFEBVRE, C. H. MARTINEZ, V. G. OLMO, A. B. RAMIREZ, J. L. MAURANDI, T. MAJO, J. I. MCKINLEY, K. MCSWEE-

- NEY, B. G. MENDE, A. MOD, G. KULCSAR, V. KISS, A. CZENE, R. PATAY, A. ENDRODI, K. KOHLER, T. HAJDU, T. SZENICZEY, J. DANI, Z. BERNERT, M. HOOLE, O. CHERONET, D. KEATING, P. VELEMINSKY, M. DOBE, F. CANDILIO, F. BROWN, R. F. FERNANDEZ, A. M. HERRERO-CORRAL, S. TUSA, E. CARNIERI, L. LENTINI, A. VALENTI, A. ZANINI, C. WADDINGTON, G. DELIBES, E. GUERRADOCE, B. NEIL, M. BRITAIN, M. LUKE, R. MORTIMER, J. DESIDERI, M. BESSE, G. BRUCKEN, M. FURMANEK, A. HAUSZKO, M. MACKIEWICZ, A. RAPINSKI, S. LEACH, I. SORIANO, K. T. LILLIOS, J. L. CARDOSO, M. P. PEARSON, P. WODARCZAK, T. D. PRICE, P. PRIETO, P. J. REY, R. RISCH, M. A. R. GUERRA, A. SCHMITT, J. SERRALONGUE, A. M. SILVA, V. SMRCKA, L. VERGNAUD, J. ZILHAO, D. CAMELLI, T. HIGHAM, M. G. THOMAS, D. J. KENNETT, H. FOKKENS, V. HEYD, A. SHERIDAN, K. G. SJOGREN, P. W. STOCKHAMMER, J. KRAUSE, R. PINHASI, W. HAAK, I. BARNES, C. LALUEZA-FOX, D. REICH 2018, The Beaker phenomenon and the genomic transformation of northwest Europe. – *Nature* 555, 190–196.
- OLALDE, I., S. MALLICK, N. PATTERSON, N. ROHLAND, V. VILLALBA-MOUCO, M. SILVA, K. DULIAS, C. J. EDWARDS, F. GANDINI, M. PALA, P. SOARES, M. FERRANDO-BERNAL, N. ADAMSKI, N. BROOMANDKHOSHBAHT, O. CHERONET, B. J. CULLETON, D. FERNANDES, A. M. LAWSON, M. MAH, J. OPPENHEIMER, K. STEWARDSON, Z. ZHANG, J. M. JIMÉNEZ ARENAS, I. J. TORO MOYANO, D. C. SALAZAR-GARCÍA, P. CASTANYER, M. SANTOS, J. TREMOLEDA, M. LOZANO, P. GARCÍA BORJA, J. FERNÁNDEZ-ERASO, J. A. MUJICA-ALUSTIZA, C. BARROSO, F. J. BERMÚDEZ, E. VIGUERA MÍNGUEZ, J. BURCH, N. COROMINA, D. VIVÓ, A. CEBRIÀ, J. M. FULLOLA, O. GARCÍA-PUCHOL, J. I. MORALES, F. X. OMS, T. MAJÓ, J. M. VERGÈS, A. DÍAZ-CARVAJAL, I. OLLICH-CASTANYER, F. J. LÓPEZ-CACHERO, A. M. SILVA, C. ALONSO-FERNÁNDEZ, G. DELIBES DE CASTRO, J. JIMÉNEZ ECHEVARRÍA, A. MORENO-MÁRQUEZ, G. PASCUAL BERLANGA, P. RAMOS-GARCÍA, J. RAMOS-MUÑOZ, E. VIJANDE VILA, G. AGUILELLA ARZO, Á. ESPARZA ARROYO, K. T. LILLIOS, J. MACK, J. VELASCO-VÁZQUEZ, A. WATERMAN, L. BENÍTEZ DE LUGO ENRICH, M. BENITO SÁNCHEZ, B. AGUSTÍ, F. CODINA, G. PRADO, A. ESTALRRICH, Á. FERNÁNDEZ FLORES, C. FINLAYSON, G. FINLAYSON, S. FINLAYSON, F. GILES-GUZMÁN, A. ROSAS, V. BARCIELA GONZÁLEZ, G. GARCÍA ATIÉNZAR, M. S. HERNÁNDEZ PÉREZ, A. LLANOS, Y. CARRIÓN MARCO, I. COLLADO BENEYTO, D. LÓPEZ-SERRANO, M. SANZ TORMO, A. C. VALERA, C. BLASCO, C. LIESAU, P. RÍOS, J. DAURA, M. J. PEDRO MICHÓ, A. A. DIEZ-CASTILLO, R. FLORES FERNÁNDEZ, J. FRANCÈS FARRÉ, R. GARRIDO-PENA, V. S. GONÇALVES, E. GUERRADOCE, A. M. HERRERO-CORRAL, J. JUANCABANILLES, D. LÓPEZ-REYES, S. B. MCCLURE, M. MERINO PÉREZ, A. OLIVER FOIX, M. SANZ BORRÀS, A. C. SOUSA, J. M. VIDAL ENCINAS, D. J. KENNETT, M. B. RICHARDS, K. WERNER ALT, W. HAAK, R. PINHASI, C. LALUEZA-FOX, D. REICH 2019, The genomic history of the Iberian Peninsula over the past 8000 years. – *Science* 363, 1230–1234.
- ORLANDO, L., R. ALLABY, P. SKOGLUND, C. DER SARKISSIAN, P. W. STOCKHAMMER, M. C. ÁVILA-ARCOS, Q. FU, J. KRAUSE, E. WILLERSLEV, A. C. STONE, C. WARINNER 2021, Ancient DNA analysis. – *Nature Reviews Methods Primers* 1, 1–26.
- ORLANDO, L., A. GINOLHAC, G. ZHANG, D. FROESE, A. ALBRECHTSEN, M. STILLER, M. SCHUBERT, E. CAPPELLINI, B. PETERSEN, I. MOLTKE, P. L. F. JOHNSON, M. FUMAGALLI, J. T. VILSTRUP, M. RAGHAVAN, T. KORNELIUSSEN, A.-S. MALASPINAS, J. VOGT, D. SZKLARCZYK, C. D. KELSTRUP, J. VINTHER, A. DOLOCAN, J. STENDERUP, A. M. V. VELAZQUEZ, J. CAHILL, M. RASMUSSEN, X. WANG, J. MIN, G. D. ZAZULA, A. SEGUIN-ORLANDO, C. MORTENSEN, K. MAGNUSSEN, J. F. THOMPSON, J. WEINSTOCK, K. GREGERSEN, K. H. RØED, V. EISENMANN, C. J. RUBIN, D. C. MILLER, D. F. ANTCHAK, M. F. BERTELSEN, S. BRUNAK, K. A. S. AL-RASHEID, O. RYDER, L. ANDERSSON, J. MUNDY, A. KROGH, M. T. P. GILBERT, K. KJÆR, T. SICHERITZ-PONTEN, L. J. JENSEN, J. V. OLSEN, M. HOFREITER, R. NIELSEN, B. SHAPIRO, J. WANG, E. WILLERSLEV 2013, Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. – *Nature* 499, 74–78.
- OVCHINNIKOV, I. V., A. GÖTHERSTRÖM, G. P. ROMANOVA, V. M. KHARITONOV, K. LIDÉN, W.

GOODWIN 2000, Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. – *Nature* 404, 490–493.

PÄÄBO, S. 1985, Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. – *Letters to Nature* 314, 644–645.

PÄÄBO, S., J. A. GIFFORD, A. C. WILSON 1988, Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. – *Nucleic Acids Research* 16, 9775–9787.

PATTERSON, N., M. ISAKOV, T. BOOTH, L. BÜSTER, C.-E. FISCHER, I. OLALDE, H. RINGBAUER, A. AKBARI, O. CHERONET, M. BLEASDALE, N. ADAMSKI, E. ALTENA, R. BERNARDOS, S. BRACE, N. BROOMANDKHOSHBAHT, K. CALLAN, F. CANDILIO, B. CULLETON, E. CURTIS, L. DEMETZ, K. S. D. CARLSON, C. J. EDWARDS, D. M. FERNANDES, M. G. B. FOODY, S. FREILICH, H. GOODCHILD, A. KEARNS, A. M. LAWSON, I. LAZARIDIS, M. MAH, S. MALLICK, K. MANDL, A. MICCO, M. MICHEL, G. B. MORANTE, J. OPPENHEIMER, K. T. ÖZDOĞAN, L. QIU, C. SCHATTKKE, K. STEWARDSON, J. N. WORKMAN, F. ZALZALA, Z. ZHANG, B. AGUSTÍ, T. ALLEN, K. ALMÁSSY, L. AMKREUTZ, A. ASH, C. BAILLIF-DUCROS, A. BARCLAY, L. BARTOSIEWICZ, K. BAXTER, Z. BERNERT, J. BLÁŽEK, M. BODRUŽIĆ, P. BOISSINOT, C. BONSALE, P. BRADLEY, M. BRITAIN, A. BROOKES, F. BROWN, L. BROWN, R. BRUNNING, C. BUDD, J. BURMAZ, S. CANET, S. CARNICERO-CÁCERES, M. ČAUŠEVIĆ-BULLY, A. CHAMBERLAIN, S. CHAUVIN, S. CLOUGH, N. ČONDIĆ, A. COPPA, O. CRAIG, M. ČREŠNAR, V. CUMMINGS, S. CZIFRA, A. DANIELISOVÁ, R. DANIELS, A. DAVIES, P. DE JERSEY, J. DEACON, C. DEMINGER, P. W. DITCHFIELD, M. DIZDAR, M. DOBEŠ, M. DOBISÍKOVÁ, L. DOMBORÓCZKI, G. DRINKALL, A. ĐUKIĆ, M. ERNÉE, C. EVANS, J. EVANS, M. FERNÁNDEZ-GÖTZ, S. FILIPOVIĆ, A. FITZPATRICK, H. FOKKENS, C. FOWLER, A. FOX, Z. GALLINA, M. GAMBLE, M. R. GONZÁLEZ MORALES, B. GONZÁLEZ-RABANAL, A. GREEN, K. GYENSEI, D. HABERMEHL, T. HAJDU, D. HAMILTON, J. HARRIS, C. HAYDEN, J. HENDRIKS, B. HERNU, G. HEY, M. HORŇÁK, G. ILON, E. ISTVÁNOVITS, A. M. JONES, M. B. KAVUR, K. KAZEK, R. A. KENYON, A. KHREISHEH, V. KISS, J. KLEIJNE, M. KNIGHT, L. M. KOOTKER, P. F. KOVÁCS, A. KOZUBOVÁ, G. KULCSÁR, V. KULCSÁR, C. LE PENNEC, M. LEGGE, M. LEIVERS, L. LOE, O. LÓPEZ-COSTAS, T.

LORD, D. LOS, J. LYALL, A. B. MARÍN-ARROYO, P. MASON, D. MATOŠEVIĆ, A. MAXTED, L. MCINTYRE, J. MCKINLEY, K. MCSWEENEY, B. MEJLINK, B. G. MENDE, M. MENĐUŠIĆ, M. METLIČKA, S. MEYER, K. MIHOVILIĆ, L. MILASINOVIC, S. MINNITT, J. MOORE, G. MORLEY, G. MULLAN, M. MUSILOVÁ, B. NEIL, R. NICHOLLS, M. NOVAK, M. PALA, M. PAPWORTH, C. PARESYS, R. PATTEN, D. PERKIĆ, K. PESTI, A. PETIT, K. PETRIŠČÁKOVÁ, C. PICHON, C. PICKARD, Z. PILLING, T. D. PRICE, S. RADOVIĆ, R. REDFERN, B. RESUTÍK, D. T. RHODES, M. B. RICHARDS, A. ROBERTS, J. ROEFSTRA, P. SANKOT, A. ŠEFČÁKOVÁ, A. SHERIDAN, S. SKAE, M. ŠMOLÍKOVÁ, K. SOMOGYI, Á. SOMOGYVÁRI, M. STEPHENS, G. SZABÓ, A. SZÉCSÉNYI-NAGY, T. SZENICZEY, J. TABOR, K. TANKÓ, C. T. MARIA, R. TERRY, B. TERŽAN, M. TESCHLER-NICOLA, J. F. TORRES-MARTÍNEZ, J. TRAPP, R. TURLE, F. UJVÁRI, M. VAN DER HEIDEN, P. VELEMSKY, B. VESELKA, Z. VYTLAČIL, C. WADDINGTON, P. WARE, P. WILKINSON, L. WILSON, R. WISEMAN, E. YOUNG, J. ZANINOVIĆ, A. ŽITŇAN, C. LALUEZA-FOX, P. DE KNIJFF, I. BARNES, P. HALKON, M. G. THOMAS, D. J. KENNETT, B. CUNLIFFE, M. LILLIE, N. ROHLAND, R. PINHASI, I. ARMIT, D. REICH 2022, Large-scale migration into Britain during the Middle to Late Bronze Age. – *Nature* 601, 588–594.

PFRENGLE, S., J. NEUKAMM, M. GUELLIL, M. KELLER, M. MOLAK, A. CHARLOTTE, A. KUSHNAREVICH, N. MONTES, G. NEUMANN, E. REITER, R. TUKHBATOVA, N. BEREZINA, A. BUZHILOVA, D. KOROBOV, S. HAMRE, V. MATOS, M. FERREIRA, L. GONZÁLEZ-GARRIDO, S. WASTERLAIN, V. SCHUENEMANN 2021, Mycobacterium leprae diversity and population dynamics in medieval Europe from novel ancient genomes. – *BMC Biology* 19, 1–18.

PINHASI, R., D. FERNANDES, K. SIRAK, M. NOVAK, S. CONNELL, S. ALPASLAN-ROODENBERG, F. GERITSEN, V. MOISEYEV, A. GROMOV, P. RACZKY, A. ANDERS, M. PIETRUSEWSKY, G. ROLLEFSON, M. JOVANOVIĆ, H. TRINH HOANG, G. BAR-OZ, M. OXENHAM, H. MATSUMURA, M. HOFREITER 2015, Optimal ancient DNA yields from the inner ear part of the human petrous bone. – *PLoS ONE* 10, 1–13.

- PINHASI, R., M. G. THOMAS, M. HOFREITER, M. CURRAT, J. BURGER 2012, The genetic history of Europeans. – *Trends in Genetics* 28, 496–505.
- POHL, W., J. KRAUSE, T. VIDA, P. GEARY 2021, Integrating Genetic, Archaeological, and Historical Perspectives on Eastern Central Europe, 400–900 AD. – *Historical Studies on Central Europe* 1, 213–228.
- POINAR, H. N., C. SCHWARZ, J. QI, B. SHAPIRO, R. D. E. MACPHEE, B. BUIGUES, A. TIKHONOV, D. H. HUSON, L. P. TOMSHO, A. AUCH, M. RAMPP, W. MILLER, S. C. SCHUSTER 2006, Metagenomics to Paleogenomics: Large-Scale Sequencing of Mammoth DNA. – *Science* 311, 392–394.
- PRÜFER, K., F. RACIMO, N. PATTERSON, F. JAY, S. SANKARARAMAN, S. SAWYER, A. HEINZE, G. RENAUD, P. H. SUDMANT, C. DE FILIPPO, H. LI, S. MALLICK, M. DANNEMANN, Q. FU, M. KIRCHER, M. KUHLWILM, M. LACHMANN, M. MEYER, M. ONGYERTH, M. SIEBAUER, C. THEUNERT, A. TANDON, P. MOORJANI, J. PICKRELL, J. C. MULLIKIN, S. H. VOHR, R. E. GREEN, I. HELLMANN, P. L. F. JOHNSON, H. BLANCHE, H. CANN, J. O. KITZMAN, J. SHENDURE, E. E. EICHLER, E. S. LEIN, T. E. BAKKEN, L. V. GOLOVANOV, V. B. DORONICHEV, M. V. SHUNKOV, A. P. DEREVIANKO, B. VIOLA, M. SLATKIN, D. REICH, J. KELSO, S. PÄÄBO 2013, The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. – *Nature* 505, 43–49.
- RACIMO, F., S. SANKARARAMAN, R. NIELSEN, E. HUERTA-SÁNCHEZ 2015, Evidence for archaic adaptive introgression in humans. – *Nature Reviews Genetics* 16, 359–371.
- RASMUSSEN, M., S. L. ANZICK, M. R. WATERS, P. SKOGLUND, M. DEGIORGIO, T. W. STAFFORD, S. RASMUSSEN, I. MOLTKE, A. ALBRECHTSEN, S. M. DOYLE, G. D. POZNIK, V. GUDMUNDSOTTIR, R. YADAV, A. S. MALASPINAS, V. SAMUEL STOCKTON WHITE, M. E. ALLENTOLT, O. E. CORNEJO, K. TAMBETS, A. ERIKSSON, P. D. HEINTZMAN, M. KARMIN, T. S. KORNELIUSSEN, D. J. MELTZER, T. L. PIERRE, J. STENDERUP, L. SAAG, V. M. WARMUTH, M. C. LOPES, R. S. MALHI, S. BRUNAK, T. SICHERITZ-PONTEN, I. BARNES, M. COLLINS, L. ORLANDO, F. BALLOUX, A. MANICA, R. GUPTA, M. METSPALU, C. D. BUSTAMANTE, M. JAKOBSSON, R. NIELSEN, E. WILLERSLEV 2014, The genome of a Late Pleistocene human from a Clovis burial site in western Montana. – *Nature* 506, 225–229.
- RASMUSSEN, M., Y. LI, S. LINDGREEN, J. S. PEDERSEN, A. ALBRECHTSEN, I. MOLTKE, M. METSPALU, E. METSPALU, T. KIVISILD, R. GUPTA, M. BERTALAN, K. NIELSEN, M. T. P. GILBERT, Y. WANG, M. RAGHAVAN, P. F. CAMPOS, H. M. KAMP, A. S. WILSON, A. GLEDHILL, S. TRIDICO, M. BUNCE, E. D. LORENZEN, J. BINLADEN, X. GUO, J. ZHAO, X. ZHANG, H. ZHANG, Z. LI, M. CHEN, L. ORLANDO, K. KRISTIANSEN, M. BAK, N. TOMMERUP, C. BENDIXEN, T. L. PIERRE, B. GRONNOW, M. MELDGAARD, C. ANDREASEN, S. A. FEDOROVA, L. P. OSIPOVA, T. F. G. HIGHAM, C. B. RAMSEY, T. V. O. HANSEN, F. C. NIELSEN, M. H. CRAWFORD, S. BRUNAK, T. SICHERITZ-PONTÉN, R. VILLEMS, R. NIELSEN, A. KROGH, J. WANG, E. WILLERSLEV 2010, Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. – *Nature* 463, 757–762.
- REICH, D., R. E. GREEN, M. KIRCHER, J. KRAUSE, N. PATTERSON, E. Y. DURAND, B. VIOLA, A. W. BRIGGS, U. STENZEL, P. L. F. 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, Genetic history of an archaic hominin group from Denisova cave in Siberia. – *Nature* 468, 1053–1060.
- ROHLAND, N., H. SIEDEL, M. HOFREITER 2004, Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens. – *Biotechniques* 36, 814–821.
- ROHLAND, N., E. HARNEY, S. MALLICK, S. NORDENFELT, D. REICH 2015, Partial uracil–DNA–glycosylase treatment for screening of ancient DNA. – *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370, 20130624.
- SCHUBERT, M., A. GINOLHAC, S. LINDGREEN, J. F. THOMPSON, K. AS AL-RASHEID, E. WILLERSLEV, A. KROGH, L. ORLANDO 2012, Improving ancient

DNA read mapping against modern reference genomes. – *BMC Genomics* 13, 1–16.

SCHUBERT, M., L. ERMINI, C. DER SARKISSIAN, H. JÓNSSON, A. GINOLHAC, R. SCHAEFER, M. D. MARTIN, R. FERNÁNDEZ, M. KIRCHER, M. MCCUE, E. WILLERSLEV, L. ORLANDO 2014, Characterization of ancient and modern genomes by SNP detection and phylogenomic and metagenomic analysis using PALEOMIX. – *Nature Protocols* 9, 1056–1082.

SCHUENEMANN, V. J., K. BOS, S. DEWITTE, S. SCHMEDES, J. JAMIESON, A. MITTNIK, S. FORREST, B. K. COOMBES, J. W. WOOD, D. J. D. EARN, W. WHITE, J. KRAUSE, H. N. POINAR 2011, Targeted enrichment of ancient pathogens yielding the ppcp1 plasmid of *Yersinia pestis* from victims of the Black Death. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 746–752.

SIRAK, K. A., D. M. FERNANDES, O. CHERONET, M. NOVAK, B. GAMARRA, T. BALASSA, Z. BERNERT, A. CSÉKI, J. DANI, J. Z. GALLINA, G. KOCSIS-BURUZS, I. KÖVÁRI, O. LÁSZLÓ, I. PAP, R. PATAY, Z. PETKES, G. SZENTHE, T. SZENICZEY, T. HAJDU, R. PINHASI 2017, A minimally-invasive method for sampling human petrous bones from the cranial base for ancient DNA analysis. – *Biotechniques* 62, 283–289.

SIRAK, K., D. FERNANDES, O. CHERONET, E. HARNEY, M. MAH, S. MALLICK, N. ROHLAND, N. ADAMSKI, N. BROOMANDKHOSHBAHT, K. CALLAN, F. CANDILIO, A. M. LAWSON, K. MANDL, J. OPPENHEIMER, K. STEWARDSON, F. ZALZALA, A. ANDERS, J. BARTÍK, A. COPPA, T. DASHTSEVEG, S. ÉVINGER, Z. FARKAŠ, T. HAJDU, J. BAYARSAIKHAN, L. MCINTYRE, V. MOISEYEV, M. OKUMURA, I. PAP, M. PIETRUSEWSKY, P. RACZKY, A. ŠEFČÁKOVÁ, A. SOFICARU, T. SZENICZEY, B. M. SZŐKE, D. VAN GERVEN, S. VASILYEV, L. BELL, D. REICH, R. PINHASI 2020, Human auditory ossicles as an alternative optimal source of ancient DNA. – *Genome Research* 30, 427–436.

SKOGLUND, P., I. MATHIESON 2018, Ancient Genomics of Modern Humans: The First Decade. – *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 19, 381–404.

SLON, V., F. MAFESSONI, B. VERNOT, C. DE FILIPPO, S. GROTE, B. VIOLA, M. HAJDINJAK, S. PEYRÉ-GNE, S. NAGEL, S. BROWN, K. DOUKA, T. HIGHAM, M. B. KOZLIKIN, M. V. SHUNKOV, A. P. DEREVIANKO, J. KELSO, M. MEYER, K. PRÜFER, S. PÄÄBO 2018, The genome of the offspring of a Neanderthal mother and a Denisovan father. – *Nature* 561, 113–116.

SPYROU, M. A., K. I. BOS, A. HERBIG, J. KRAUSE 2019, Ancient pathogen genomics as an emerging tool for infectious disease research. – *Nature Reviews Genetics* 20, 323–340.

STATHOPOULOU, E. T., V. PSYCHARIS, G. D. CHRYSSIKOS, V. GIONIS, G. THEODOROU 2008, Bone diagenesis: New data from infrared spectroscopy and X-ray diffraction. – *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 266, 168–174.

TISHKOFF, S. A., F. A. REED, A. RANCIARO, B. F. VOIGHT, C. C. BABBITT, J. S. SILVERMAN, K. POWELL, H. M. MORTENSEN, J. B. HIRBO, M. OSMAN, M. IBRAHIM, S. A. OMAR, G. LEMA, T. B. NYAMBO, J. GHORI, S. BUMPSTEAD, J. K. PRITCHARD, G. A. WRAY, P. DELOUKAS 2006, Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. – *Nature Genetics* 39, 31–40.

VEERAMAH, K. R. 2018, The importance of fine-scale studies for integrating paleogenomics and archaeology. – *Current Opinion in Genetics and Development* 53, 83–89.

VERNOT, B., E. I. ZAVALA, A. GÓMEZ-OLIVENCIA, Z. JACOBS, V. SLON, F. MAFESSONI, F. ROMAGNÉ, A. PEARSON, M. PETR, N. SALA, A. PABLOS, A. ARANBURU, J. M. B. DE CASTRO, E. CARBONELL, B. LI, M. T. KRAJCARZ, A. I. KRIVOSHAPKIN, K. A. KOLOBOVA, M. B. KOZLIKIN, M. V. SHUNKOV, A. P. DEREVIANKO, B. VIOLA, S. GROTE, E. ESSEL, D. L. HERRÁEZ, S. NAGEL, B. NICKEL, J. RICHTER, A. SCHMIDT, B. PETER, J. KELSO, R. G. ROBERTS, J.-L. ARSUAGA, M. MEYER 2021, Unearthing Neanderthal population history using nuclear and mitochondrial DNA from cave sediments. – *Science* 372, eabf1667.

WALL, J. D., S. K. KIM 2007, Inconsistencies in neanderthal genomic DNA sequences. – *PLoS Genetics* 3, 1862–1866.

WANG, C. C., S. REINHOLD, A. KALMYKOV, A. WISSGOTT, G. BRANDT, C. JEONG, O. CHERONET, M. FERRY, E. HARNEY, D. KEATING, S. MALLICK, N. ROHLAND, K. STEWARDSON, A. R. KANTOROVICH, V. E. MASLOV, V. G. PETRENKO, V. R. ERLIKH, B. C. ATABIEV, R. G. MAGOMEDOV, P. L. KOHL, K. W. ALT, S. L. PICHLER, C. GERLING, H. MELLER, B. VARDANYAN, L. YEGANYAN, A. D. REZEPKIN, D. MARIASCHK, N. BEREZINA, J. GRESKY, K. FUCHS, C. KNIPPER, S. SCHIFFELS, E. BALANOVSKA, O. BALANOVSKY, I. MATHIESON, T. HIGHAM, Y. B. BEREZIN, A. BUZHILOVA, V. TRIFONOV, R. PINHASI, A. B. BELINSKI, D. REICH, S. HANSEN, J. KRAUSE, W. HAAK 2019, Ancient human genome-wide data from a 3000-year interval in the Caucasus corresponds with eco-geographic regions. – *Nature Communications* 10, 1–13.

WATSON, J. D., F. H. C. CRICK 1953, Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. – *Nature* 171, 737–738.

WHITE, T. D., P. A. FOLKENS 2005, *The Human Bone Manual*. – California, Elsevier.

ZUPANČ, T., E. PODOVŠOVNIK, M. OBAL, I. ZUPANIČ PAJNIČ 2020, High DNA yield from metatarsal and metacarpal bones from Slovenian Second World War skeletal remains. – *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 51, 102420.

ZUPANIČ PAJNIČ, I. 2013, Molekularnogenetska preiskava 300 let starih skeletov iz Auerspergove grobnice. – *Zdravniški vestnik* 82, 796–808.

ZUPANIČ PAJNIČ, I. 2020, Molekularnogenetski vidiki preiskav starodavne DNA. – *Zdravniški vestnik* 89, 171–189.

ZUPANIČ PAJNIČ, I., P. FATTORINI 2021, Strategy for STR typing of bones from the Second World War combining CE and NGS technology: A pilot study. – *Forensic Science International: Genetics* 50, 102401.

ZUPANIČ PAJNIČ, I., T. ZUPANČ, T. LESKOVAR, M. ČREŠNAR, P. FATTORINI 2022, Eye and Hair Color

Prediction of Ancient and Second World War Skeletal Remains Using a Forensic PCR-MPS Approach. – *Genes* 13, 1432.

Spletni viri / Web sources

SPLET 1 / WEB 1: <https://fran.si/iskanje?View=1&Query=endogen> (3. 9. 2021).

SPLET 2 / WEB 2: <https://www.termania.net/slovarji/mikrobioloski-slovar/7952149/rna> (5. 6. 2022).

SPLET 3 / WEB 3: <https://www.termania.net/iskanje?query=snp&SearchIn=All> (1. 9. 2021).

SPLET 4 / WEB 4: <https://www.termania.net/slovarji/slovenski-medicinski-slovar/5540326/substanca> (15. 8. 2022).

Ancient DNA: A Short Introduction of the Field and its Influence on our Understanding of the Past

(Summary)

This paper addresses the relatively new and rapidly evolving field of the ancient DNA. One of the biggest breakthroughs in the methodologies used, is the use of the Next Generation Sequencing (NGS) which allows us to sequence a much higher number of the ancient DNA sequences. In the past two decades we have thus witnessed many discoveries in the evolution of species, including a discovery of a new *Homo* species, the *Homo denisova*, a sister *Homo* species to the Neanderthals that derived from our most common recent ancestor over 800.000 years ago.

Ancient DNA, by its definition, is DNA that is fragmented and, in many cases, severely damaged DNA with the fragment length usually lower than 300 base pairs. After an organism dies its organic components start to degrade, DNA being one of them. We can observe multiple damage patterns in the backbone of the DNA helix and the chemical composition of the DNA (depurination and deamination). These changes affect the fragment length and can help us authenticate that we are really dealing with ancient DNA, or if we have modern DNA contamination. Subsequently, eliminating the modern contamination from the samples is one of the biggest challenges in the field, with many new lab techniques improving the detection and reduction of the contamination. This can also be achieved with careful sampling and following lab protocols in separated and de-contaminated laboratory rooms, dedicated to handling only aDNA samples. Best samples for ancient DNA analyses include the petrous bone (especially the *cochlea*), tooth roots, sediments, and other well-preserved organic materials, which are then prepared for DNA extraction; in most cases that means bone grinding. Following the DNA extraction is the library preparation for the NGS and indexing the samples with sample-specific barcodes. The indexed samples with extracted and fragmented DNA are then amplified using the polymerase chain reaction (PCR) but depending on the research questions the samples might also be targeted with the Capture method (e.g., genomic capture) as well. Following different quality controls, the samples are then

pooled and sent to sequencing. Bioinformatics then take care of the sequencing results, using different pipelines, designed specifically for ancient DNA analysis.

Furthermore, the results of the ancient DNA analysis can give us answers to our research question which span over many different fields and help us better understand our past. Evolution of species is one of them, but we can also produce and analyse phylogenetic relations between the species, dating their origins and diversions back in time, including the evolution of different viruses, bacteria, animals, and plants. Moreover, ancient DNA can also be used to explore adaptation, introgression, and admixture of species, including gene flow and genetic drifts. These can tell us about the relations between different species and the mark they left on their descendants. Modern population genetics can also be used as a tool to examine the demographics of different burial sites, producing accurate biological sex estimations (specifically useful for subadult remains), kinship relations, and ancestry analyses. The latter have been especially useful in tracing the migration patterns throughout our history. Subsequently, beside human adaptation, we can also explore the adaptation of other species, following our domestication of animals or cultivation of plants during the past millennia.

Ancient DNA has become a reliable source of information about our past and has evolved quickly in the past two decades. With new lab techniques and pipelines that aim for better optimisation of the sampling processes and lab procedures, this field has a lot more to offer in the next decades. But with many new studies of our past in the field of paleogenomics we must also be careful with the interpretation of acquired data. Unfortunately, interpretation of the results can in some cases be simplistic and calls for paradigms of the 19th century. That is why interdisciplinarity and collaboration between different fields, like archaeology and paleogenomics is essential for thorough analyses of the results, and with it our better understanding of the past.