

IZOLÁCIA A ANALÝZA ARCHAICKEJ DNA Z ĽUDSKÝCH KOSTROVÝCH POZOSTATKOV

Isolation and analysis of ancient DNA from human skeletal remains

Lukáš Šebest¹, Klaudia Kyselicová¹,
Marian Baldovič¹, Csaba Bognár¹,
Radoslav Beňuš², Ľudevít Kádasi^{1,3}

¹Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského, Bratislava, Slovenská republika

²Katedra antropológie, Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského, Bratislava, Slovenská republika

³Ústav klinického a translačného výskumu,
Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied,
Bratislava, Slovenská republika

Abstract

The aim of this study was to isolate and analyse ancient DNA from the historical human skeletal remains of two populations who lived in 8th–9th and 11th–12th century for the purpose of sex determination and the determination of mitochondrial haplogroups for detecting the possible kinship and origin. Determination of sex was performed by PCR amplification and subsequent analysis of a specific region of the amelogenin gene. The obtained molecular-genetic data were compared with the results of morphoscopic determination of sex. Determination of mitochondrial haplogroups was performed by amplification and sequencing of the hypervariable region I of mitochondrial DNA. Possible kinship of individuals was determined based on the correlation of polymorphisms in its HVR I sequences. Sex determination based on molecular-genetic data helped successfully determine the sex of individuals with an uncomplete skeleton or infants and also verified the morphoscopic data based sex determination of other individuals. Determination of mitochondrial haplogroups revealed the presence of several haplogroups with various haplotypes in this two researched historical populations. Possible kinship was detected between/among six individuals.

Keyword: ancient DNA, sex determination, mitochondrial haplogroups, HVR I, kinship

Úvod

Pojem archaická DNA (aDNA) sa používa na pomenovanie všetkých typov DNA, ktoré je možné vyizolovať z biologických archeologických nálezov, múzejných preparátov či čiastočne fosilizovaných materiálov.

Vôbec prvá zmienka o aDNA pochádza z roku 1984, kedy sa ju podarilo izolovať a následne analyzovať zo 150 rokov starej vzorky svalového tkaniva vtedy už vyhynutej zebry Quagga (Higuchi, Bowman, Freiburger, Ryder, & Wilson, 1984). Výskum aDNA od tohto okamihu postupne napredoval a za 30 rokov svojej existencie zažil dva podstatné míľniky. Prvým bolo zavedenie metódy PCR do analýz aDNA, čo umožnilo získať milióny kópií aj z veľmi malého počtu molekúl DNA (Pääbo & Wilson, 1988). Druhým míľnikom bolo zavedenie techník „novej generácie sekvenovania“ (NGS)

do bežnej praxe (Poinar et al., 2006), ktoré sú v porovnaní s dovtedy používanou Sangerovou metódou sekvenovania niekoľko 100-násobne výkonnejšie a umožnili rekonštrukciu celých genómov dávno vyhynutých druhov (Miller et al., 2008).

Samotná izolácia a analýza aDNA je kvôli jej charakteristickým vlastnostiam veľmi náročný proces. Je to kvôli tomu, že molekuly aDNA sa v historickom materiáli nachádzajú vo veľmi nízkych koncentráciách a s vysokým obsahom sekvenčných lézií, čo je zapríčinené absenciou reparačných mechanizmov bunky po smrti organizmu a pôsobením rôznych environmentálnych faktorov. Okrem toho vo všetkých krokoch získavania či izolácie aDNA neustále hrozí riziko jej kontaminácie modernou DNA a preto je veľmi dôležité pri práci s ňou dodržiavať viaceré prísne pracovné a laboratórne opatrenia (Cooper & Poinar, 2000).

Informácie získané zo sekvencií aDNA si našli svoje uplatnenie v mnohých vedných odboroch a disciplínach. V súčasnosti je výskum aDNA zameraný prevažne na riešenie otázok súvisiacich s dávnou a aj pomerne recentnejšou históriou moderných ľudí. Predovšetkým v štúdiu vzťahu moderných ľudí voči ostatným hominidom (Sánchez-Quinto & Lalueza-Fox, 2015), paleopatológii (Anastasiou & Mitchell, 2013), genealógii (Keyser-Tracqui et al., 2003) či forenznom výskume obetí vojen a revolúcií (Coble et al., 2009).

Cieľ

Cieľom tejto práce bolo izolovať a analyzovať aDNA z ľudských kostrových pozostatkov z dvoch historických populácií. Analýzy boli zamerané na molekulárno-genetické určenie pohlavia, určenie mitochondriálnych haploskupín a na ich základe stanoviť pôvod a možné príbuzenské vzťahy skúmaných jedincov.

Metodika

Analýzované kostrové pozostatky pochádzali z dvoch archeologických nálezísk na území Slovenska. Prvé sa nachádzajú v obci Cífer-Pác (okr. Trnava) a jedná sa o slovansko-avarské pohrebisko z 8.–9. storočia obsahujúce 119 kostrových pohrebův (Čilinská, 1975; Chropovský & Fusek, 1984). Druhé sa nachádza na hrade Devín (Bratislava) a jedná sa o ranostredoveký cintorín z 11.–12. storočia obsahujúce 216 kostrových pohrebův (Plachá & Hlavicová, 1987). Obe archeologické náleziská obsahovali dostatočné množstvo relatívne dobre zachovaných kostrových pozostatkov, vhodných na komplexnejšiu genetickú analýzu.

Izolácie aDNA boli vykonané z kostrových pozostatkov 112 jedincov, pričom väčšia časť jedincov (66) pochádzala z náleziska v obci Cífer-Pác.

Ako vzorky na izoláciu aDNA boli odobraté zuby (*d. canini*, *d. incisivi*) a dlhé kosti (*tibia*, *ulna*, *radius*), ktoré boli pred samotnou izoláciou zbavené povrchových nečistôt a mechanicky spracované. V prípade zubov, boli odobraté vzorky na niekoľko sekúnd ponorené do roztoku chlórnanu sodného (NaClO), následne opláchnuté ultračistou vodou (upH₂O) a vysušené. Zo suchých vzoriek boli rezacím kotúčom (Dremel) odstránené korunky a korene boli vysvietené pod UV svetlom (260 nm) po dobu 5 minút. V prípade dlhých kostí, bola v miestach s ich najmenším priemerom odstránená 1mm povrchová vrstva (Dremel) a následne tu boli kosti narezané na 0,5 cm široké „kotúčiky“ (Dremel). Kostné „kotúčiky“ boli ešte vysvietené pod UV svetlom (260 nm) po dobu 5 minút. Vzorky zubov a kostí zbavené nečistôt boli mechanicky rozdrvené na jemný prach.

Izolačná metóda použitá v tejto práci bola kombináciou izolačných krokov použitých v dvoch rôznych štádiách zameraných na izoláciu aDNA, pričom hlavným kritériom pre ich

výber bola finančná a časová nenáročnosť. Kroky dekalifikácie a štiepenia proteínov boli podľa Deguilloux et al. (2010) a kroky fenolovej extrakcie a následnej precipitácie boli podľa Kemp et al. (2007). Objemy jednotlivých chemických látok a zloženie roztokov použitých v tejto kombinovanej izolačnej metóde boli optimalizované aby vyhovovali potrebám autorov.

Pri určovaní pohlavia bola využitá PCR amplifikácia a nasledovná fragmentová analýza špecifickej oblasti génu pre amelogenín, ktorej predchádzal návrh vlastných fluorescenčne značených primerov (amelX – 80 bp, amelY – 83 bp). Do celkového objemu PCR reakčnej zmesi 30 μ l bolo pridaných 1 μ l izolovanej aDNA; 3 μ l 10x reakčného pufru $S_{1.5}$ (0,1 M Tris-HCl /pH 8,8/; 15 mM $MgCl_2$; 500 mM KCl; 1,7 g \cdot l⁻¹ BSA; 1% Triton X-100); 0,3 μ l 2 pmol/l⁻¹ primerov; 0,19 μ l 10 mM dNTP; 6 μ l 25 mM $MgCl_2$; 0,9 μ l 10 mg/ml BSA; 1 μ l 5 U Taq DNA polymerázy a doplnených upH₂O. Samotná PCR amplifikácia bola vykonaná v termocykleri Labcycler (SensoQuest GmbH) s klasickým teplotným programom s predošle optimalizovanými anelačnými teplotami primerov.

Z PCR produktu amplifikácie špecifickej oblasti amelogenínového génu bol pridaný 1 μ l k 9 μ l HiDi formamidu s molekulovým štandardom GS LIZ 500 a celá zmes bola následne denaturovaná na 95 °C po dobu 5 minút. Denaturované produkty boli analyzované v 4-kapilárovom genetickom analyzátoe ABI PRISM *Avant* (AppliedBiosystems). Pri vyhodnocovaní fragmentovej analýzy bol použitý softvér GeneMapper® ID 4.1 (AppliedBiosystems), pričom pohlavie bolo určované na základe prítomnosti signálu pre X chromozóm (žena) alebo signálov pre X a Y chromozóm (muž). Výsledky genetického určenia pohlavia boli porovnávané s výsledkami morfoskopického určenia pohlavia, ktoré bolo stanovené na základe hodnôt DS indexu (degree of sexualisation) vypočítaného podľa metódy Acsádiho a Nemeskériho (1970). Pričom bolo hodnotených 55 znakov determinujúcich pohlavie (16 na lebke, 7 na sánke, 2 na krížovej kosti, 2 na ramennej kosti, 1 na laktovej kosti, 25 na panve a 3 na stehrovej kosti).

Pri určovaní mitochondriálnych haploskupín bola využitá amplifikácia a sekvenovanie HVR I mtDNA, ktorej predchádzal návrh 5 párov vzájomne sa prekrývajúcich primerov a súčasne pokrývajúcich celú HVR I. Do celkového objemu PCR reakčnej zmesi 40 μ l bolo pridaných 1 μ l izolovanej aDNA; 4 μ l 10x reakčného pufru $S_{1.5}$ (0,1 M Tris-HCl /pH 8,8/; 15 mM $MgCl_2$; 500 mM KCl; 1,7 g \cdot l⁻¹ BSA; 1% Triton X-100); 1 μ l 2 pmol/l primerov; 0,25 μ l 10 mM dNTP; 8 μ l 25 mM $MgCl_2$; 0,9 μ l 5 U Taq DNA polymerázy a doplnených upH₂O. Samotná PCR amplifikácia bola vykonaná v termocykleri Labcycler (SensoQuest GmbH) s klasickým teplotným programom s predošle optimalizovanými anelačnými teplotami všetkých 5 párov primerov.

Z PCR produktov amplifikácie HVR I mtDNA bolo nanášaných 9 μ l na 2% agarózový gél a po následnej elektroforéze boli ďalšej analýze podrobené len vzorky, u ktorých sa podarilo amplifikovať všetkých 5 amplicónov HVR I.

Pred sekvenovaním boli PCR produkty amplifikácie HVR I urifikované podľa doporučeného protokolu purifikačného kitu ExoSAP-IT® For PCR Product Clean-Up (Affymetix). Samotný proces sekvenovania bol vykonaný podľa doporučeného protokolu sekvenáčného kitu BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequence Kit (Invitrogen), pričom pre lepšie pokrytie HVR I boli jednotlivé amplicóny sekvenované „forward“ aj „reverse“ primerom. K 5 μ l sekvenáčného produktu bolo pridaných 20 μ l precipitačného roztoku (3 M NaOAc /pH 4,6/; 95% etanol; upH₂O). Celá zmes bola vortexovaná, inkubovaná pri -4 °C po dobu 10 minút a centrifugovaná pri 3700 rpm (Eppendorf 5804R) pri 4 °C po dobu 35 minút. Supernatant bol odstránený a k peletu bolo pridaných 100 μ l 70% etanolu. Celá zmes bola opäť centrifugovaná pri 3700 rpm (Eppendorf

5804R) pri 4 °C po dobu 10 minút. Supernatant bol odstránený a pelet bol dôkladne vysušený pri 37 °C. K vysušenému peletu bolo pridaných 10 μ l HiDi formamidu a celá zmes bola denaturovaná pri 95 °C po dobu 5 minút. Denaturované sekvenáčne produkty boli analyzované v 16-kapilárovom genetickom analyzátoe ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer (AppliedBiosystems). Sekvenáčne dáta boli analyzované za pomoci softvéru ChromasPro 1.5 (Technelysium), pričom mitochondriálne haploskupiny boli určované na základe zloženia SNP polymorfizmov v HVR I mtDNA a možné príbuzenské vzťahy na základe zhody týchto polymorfizmov medzi skúmanými jednotlivcami.

Na elimináciu rizika kontaminácie modernou DNA boli dodržané stanovené podmienky pre prácu s aDNA (napr. oddelené pracovné priestory, sterilné pracovné nástroje a chemikálie, využívanie viacerých kontrol pri izolácii a amplifikácii, opakovaná izolácie či qPCR kontaminačné a inhibičné testy).

Výsledky

Molekulárno-genetickým spôsobom bolo možné pohlavie určiť u 62 jedincov. Dosiagnuté výsledky boli následne porovnané s dostupnými výsledkami morfoskopického určenia pohlavia (Baldovič, 2003; Beňuš & Masnicová, 2012). U 10 jedincov sa výsledky určenia pohlavia navzájom nezhodovali a u 3 jedincov bolo možné určiť pohlavie len molekulárno-genetickým spôsobom (Tabuľka 1).

Mitochondriálne haploskupiny boli určené u 52 jedincov. V súbore jedincov pochádzajúcich z náleziska Cífer-Pác boli zistené tieto haploskupiny: H, H1a, H5, H6a, HV, HV2, J, K, T2, U5, U8a a W6. V súbore jedincov pochádzajúcich z náleziska Devín boli zistené tieto haploskupiny: H, H1, H1a, J2b, K, T1a, U5a, V a W.

U troch dvojíc jedincov pochádzajúcich z náleziska Cífer-Pác bolo zistené totožné zloženie SNP polymorfizmov v HVR I mtDNA. Označenie jedincov, ich pohlavie a zistené polymorfizmy sú uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 1. Jedinci s odlišnými výsledkami morfoskopického a molekulárno-genetického určenia pohlavia

Vzorka	Hrob	Pohlavie		DS index
		MS	MG	
1	8/75	muž	žena	1,037
2	8/77	žena	muž	-1,000
3	10/77	muž	žena	0,638
4	28/75	žena	muž	-0,161
5	53/79	muž	žena	0,698
6	102/83	žena	muž	-0,610
7	105/83	žena	muž	-0,560
8	123/84	muž	žena	0,500
9	145/85	žena	muž	-0,220
10	57/83	žena	muž	-0,500*
11	104/83a	–	žena	<i>infans I</i>
12	150/85	–	žena	<i>infans I</i>
13	160/85	–	žena	<i>senilis</i>

Poznámka: MS – morfoskopicky stanovené, MG – molekulárno-geneticky stanovené, * – na základe znakov lebky

Tabuľka 2. Jedinci s totožným zložením SNP polymorfizmov v HVR I mtDNA

Hrob	Pohlavie	Polymorfizmy
7/75	muž	16270C > T
117/83	muž	16270C > T
40/79	muž	16069C > T; 16126T > C
51/79	žena	16069C > T; 16126T > C
57/79	muž	16234C > T
58/79	žena	16234C > T

Diskusia

V prípade 49 jedincov došlo k zhode medzi výsledkami molekulárno-genetického a morfoskopického určenia pohlavia. Pri 10 jedincoch sa údaje molekulárno-genetického určenia pohlavia nezhodovali s morfoskopickými údajmi. U jedincov z hrobov 10/77; 28/75; 53/79; 102/83; 105/83; 123/84 a 145/85 sa hodnoty DS indexu pohybovali v rozmedzí -0,610 až 0,698. Ich odlišné molekulárno-genetické údaje by bolo možné vysvetliť absenciou dostatočného počtu sexuálne dimorfných znakov, ktorá mohla byť zapríčinená zníženou kvalitnou hodnoteného kostrového materiálu či tafonomickými procesmi, a preto sa na nich pôsobenie prírodných faktorov prejavilo v oveľa väčšej miere. U jedincov z hrobov 8/75 a 8/77 sa aj napriek vyšším hodnotám DS indexu (1,037 resp. -1,000), prikláňame k rovnakému zdôvodneniu ako u predošlých 7 jedincov. Morfoskopické pohlavie jedinca z hrobu 57/83 bolo určené len na základe znakov lebky (kostra končatín a trupu nebola k dispozícii) a preto mohlo byť stanovené nesprávne. U jedincov z hrobov 104/83a (*infans I*); 150/85 (*infans I*) a 160/85 (*senilis*) nebolo kvôli ich zachovalosti možné morfoskopicky určiť pohlavie, to bolo stanovené len na základe molekulárno-genetickej analýzy.

Mitochondriálne haploskupiny stanovené v populáciách žijúcich v 8.–9. storočí a 11.–12. storočí, zapadajú všetky do variability súčasných bežne rozšírených hlavných európskych mitochondriálnych haploskupín: H, J, K, N1, T, V, X, W, U4 a U5 (U) (Loogväli et al., 2012). Stanovené mitochondriálne haplotypy sa odlišovali medzi sebou (s výnimkou haplotypu CRS) a takisto aj od osôb zapojených do procesu izolácie a analýzy aDNA, čo je možné považovať za ďalší dôkaz o autenticite dosiahnutých výsledkov. Najviac sa vyskytovala haploskupina H a jej subhaploskupiny (celkom u 31 z 52 analyzovaných jedincov), čo koreluje s jej udávanou frekvenciou výskytu 40–60 % v Európe (Richards et al., 2000). Z najstaršej haploskupiny Európy U obsahujúcej sedem subhaploskupín U1–U6, U8 a K, boli určené haploskupiny U5 (3 jedinci), U5a (1 jedinec), U8a (1 jedinec) a haploskupina K (3 jedinci). Tieto výsledky je tiež možné porovnať s udávanou európskou frekvenciou výskytu haploskupiny U a jej podtried 7% (Finnilä, Hassinen, Alakokko, & Majamaa, 2000) a frekvenciou 6% haploskupiny K (Richards et al., 2000). Výskyt haploskupiny J (6 jedincov) a jej subhaploskupiny J2b (1 jedinec) je taktiež možno porovnať s európskou frekvenciou výskytu 10% (Dato et al., 2004). Zvyšné haploskupiny boli s výnimkou haploskupiny T2 (2 jedinci), zastúpené vždy len jedenkrát. Avšak pre detailnejšie porovnanie haploskupinového zloženia týchto dvoch historických populácií navzájom alebo so súčasnými populáciami, by bolo potrebné zanalyzovať omnoho väčší počet jedincov skúmanej skupiny. A okrem toho na to, aby sa v týchto dvoch populáciách vyskytovali úplne odlišné haploskupiny (v porovnaní s dnešnými) je 800 respektíve 1300 rokov príliš krátky časový úsek.

V súbore jedincov s určenými mitochondriálnymi skupinami sa vyskytli tri dvojice, u ktorých sa zhodovalo zloženie SNP polymorfizmov v HVR I mtDNA. Keďže sa mtDNA dedí matrilineárne (z matky na jej potomkov), nepodlieha pri tom rekombinácii (bez sekvenčných zmien) a dvojice pochádzali z archeologických náleziska Cífer-Pác (pohrebisko a nie cintorín), bolo u nich možné predpokladať určitý stupeň príbuznosti. Jedinci z hrobov 7/75 a 117/83 boli obaja mužského pohlavia s predpokladom, že sa pravdepodobne jednalo o dvoch bratov alebo bratrančov (pričom ich matky boli sestry). Jedincov z hrobov 40/79 a 51/79; 57/79 a 58/79 boli vždy muž a žena, a preto je možné predpokladať, že sa pravdepodobne môže jednať o príbuzenský vzťah: brat – sestra, matka – syn, alebo bratranec – sesternica (pričom ich matky boli sestry). Avšak úplné overenie alebo vyvrátenie týchto predpokladov, by do budúcnosti bola u spomínaných jedincov potrebná aj analýza

za polymorfizmov nachádzajúcich sa na Y chromozóme (dedený patrilineárne). A takisto by sa mohla využiť aj pri overovaní príbuznosti u jedincov s haplotypom CRS (spadajúcim pod haploskupinu H), ktorí majú identické sekvencie HVR I, ale tie neobsahujú polymorfizmy (v tejto štúdii neboli takýto jedinci bráni do úvahy).

Táto štúdia je vôbec prvou komplexnejšou prácou zameranou na analýzy aDNA zo Slovenska. Doposiaľ publikované práce využívali aDNA len na overenie pohlavia (Bauerová et al., 2005; Luptáková et al., 2005). Do budúca autori plánujú zamerať sa na analýzu vybraných polymorfizmov v géne MCM6 zodpovedných za laktózovú intoleranciu/perzistenciu, zaviesť pri určovaní príbuznosti používanie STR polymorfizmov a takisto by boli radi, ak by sa analýza aDNA stala bežnou súčasťou každého archeologického výskumu na území Slovenska.

Záver

Z ľudských kostrových pozostatkov pochádzajúcich z archeologického náleziska Cífer-Pác (8.–9. storočie) a Devín hrad (11.–12. storočie) sa podarilo izolovať aDNA a tú následne podrobiť viacerým analýzám. Molekulárno-genetickým spôsobom bolo možné úspešne stanoviť pohlavie z pozostatkov s nedostatočným počtom sexuálne dimorfných znakov potrebných na spoľahlivé určenie pohlavia (t.j. pozostatkov detí a starých ľudí, nekompletných či poškodených pozostatkov). Boli určené mitochondriálne haploskupiny u jedincov pochádzajúcich z dvoch odlišných historických populácií, pričom všetky spadali do variability súčasných bežne rozšírených európskych haploskupín. Na základe zhody polymorfného zloženia v HVR I mtDNA boli objavené tri dvojice, u ktorých je možné predpokladať istý stupeň príbuznosti, avšak na úplné overenie predpokladu bude nutné vykonať aj analýzu polymorfizmov Y chromozómu.

Súhrn

Cieľom tejto štúdie bolo izolovať a analyzovať archaickú DNA (aDNA) z ľudských kostrových pozostatkov z dvoch historických populácií žijúcich v 8.–9. a 11.–12. storočí za účelom stanovenia pohlavia a určenia mitochondriálnych haploskupín s možnosťou detekcie možných príbuzenských vzťahov a pôvodu.

Pohlavie bolo stanovované amplifikáciou špecifického regiónu génu pre amelogenín a následnou fragmentovou analýzou PCR produktov. Získané molekulárno-genetické dáta boli porovnávané s morfoskopickými výsledkami stanovenia pohlavia. Mitochondriálne haploskupiny boli určované prostredníctvom PCR amplifikácie a sekvenovania HVR I mitochondriálnej DNA. Pričom možné príbuzenské vzťahy boli detegované na základe zhody polymorfizmov v tejto oblasti.

Úspešne sa podarilo stanoviť pohlavie u jedincov s poškodenými či nekompletnými pozostatkami či pozostatkami detí. Podarilo sa určiť viaceré mitochondriálne haploskupiny s rôznymi haplotypmi. U troch párov jedincov boli detegované možné príbuzenské vzťahy.

Keľúčové slová: archaická DNA, stanovenie pohlavia, mitochondriálne haploskupiny, HVR I, príbuzenstvo

Literatúra

- Anastasiou, E., & Mitchell, P. D. (2013). Palaeopathology and genes: investigating the genetics of infectious diseases in excavated human skeletal remains and mummies from past populations. *Gene*, 528(1), 33–40.
- Acsádi, G., & Nemeskéri, J. (1970). *History of human life span and mortality*. Budapest: Akadémiai Kiadó.

- Baldovič, M. (2003). Antropologický rozbor pohrebiska Cífer – Pác (okr. Trnava) z 8.–9. storočia n. l. Diplomová práca. Bratislava: Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského.
- Bauerová, M., Vondráková, M., Omelka, R., Bauer, M., Fabiš, M., & Martinakova, M. (2005). Use of a silica matrix DNA purification method in sex determination from archeological bone remains. In *American Journal of Physical Anthropology* (pp. 71–71). United States: John Wiley & Sons Wiley-Liss.
- Beňuš, R. & Masnicová, S. (2012). Antropologická, paleodemografická a paleopatologická analýza historickej populácie z hradu Devín. *Slovenská archeológia (Slovak Archaeology)*, 60(1), 119–155.
- Čilinská, Z. (1975). Pohrebisko z 8. storočia v Cíferi – Páci. *Archeologické výskumy a nálezy na Slovensku v roku 1975*, 22–35.
- Coble, M. D., Loreille, O. M., Wadhams, M. J., Edson, S. M., Maynard, K., Meyer, C. E., ... Finelli, L. N. (2009). Mystery solved: the identification of the two missing Romanov children using DNA analysis. *PLoS ONE*, 4, e4838.
- Cooper, A., & Poinar, H. N. (2000). Ancient DNA: do it right or not at all. *Science*, 289(5482), 1139–1139.
- Dato, S., Passarino, G., Rose, G., Altomare, K., Bellizzi, D., Mari, V., ... De Benedictis, G. (2004). Association of the mitochondrial DNA haplogroup J with longevity is population specific. *European journal of human genetics*, 12(12), 1080–1082.
- Deguilloux, M. F., Soler, L., Pemonge, M. H., Scarre, C., Joussaume, R., & Laporte, L. (2010). News from the west: ancient DNA from a French megalithic burial chamber. *American Journal of Physical Anthropology*, 144(1), 108–118.
- Finnilä, S., Hassinen, I. E., Ala-Kokko, L., & Majamaa, K. (2000). Phylogenetic network of the mtDNA haplogroup U in Northern Finland based on sequence analysis of the complete coding region by conformation-sensitive gel electrophoresis. *The American Journal of Human Genetics*, 66(3), 1017–1026.
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. A., & Wilson, A. C. (1984). DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312, 282–284.
- ChromasPro 1.5 [Computer software]. (2015). Retrieved from <http://technelysium.com.au/>
- Chropovský, B. & Fusek, G. (1984). Výskum pohrebiska v Cíferi – Páci. *Archeologické výskumy a nálezy na Slovensku v roku 1983*, 89–90.
- Kemp, B. M., Malhi, R. S., McDonough, J., Bolnick, D. A., Eshleman, J. A., Rickards, O., ... Smith, D. G. (2007). Genetic analysis of early Holocene skeletal remains from Alaska and its implications for the settlement of the Americas. *American Journal of Physical Anthropology*, 132(4), 605–621.
- Keyser-Tracqui, C., Crubézy, E., Clisson, I., Gemmerich, I., Ludes, B., & Giscard, P. H. (2003). Megaplex analysis of a Mongolian population from the Egyin Gol site (300 BC–300 AD). In *International Congress Series* (Vol. 1239, pp. 581–584). Elsevier.
- Loogväli, E. L., Roostalu, U., Malyarchuk, B. A., Derenko, M. V., Kivisild, T., Metspalu, E., ... Pennarun, E. (2004). Disuniting uniformity: a pied cladistic canvas of mtDNA haplogroup H in Eurasia. *Molecular biology and evolution*, 21(11), 2012–2021.
- Luptáková, L., Babelová, A., Omelka, R., Kolena, B., Vondráková, M., & Bauerová, M. (2011). Sex determination of early medieval individuals through nested PCR using a new primer set in the SRY gene. *Forensic science international*, 207(1), 1–5.
- Miller, W., Drautz, D. I., Ratan, A., Pusey, B., Qi, J., Lesk, A. M., ... Schuster, S. C. (2008). Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature*, 456(7220), 387–390.
- Pääbo, S., & Wilson, A. C. (1988). Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. *Nature*, 334(6181), 387.
- Plachá, V., & Hlavicová, J. (1987). Nálezová správa za roky 1980–1987. Sektor 15 (Mestské múzeum v Bratislave). Nепublikované.
- Poinar, H. N., Schwarz, C., Qi, J., Shapiro, B., MacPhee, R. D., Buigues, B., ... & Schuster, S. C. (2006). Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science*, 311(5759), 392–394.
- Richards, M., Macaulay, V., Hickey, E., Vega, E., Sykes, B., Guida, V., ... & Bandelt, H. J. (2000). Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *The American Journal of Human Genetics*, 67(5), 1251–1276.
- Sánchez-Quinto, F., & Lalueza-Fox, C. (2015). Almost 20 years of Neanderthal palaeogenetics: adaptation, admixture, diversity, demography and extinction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 370(1660), 20130374.
- Šebest, L., Kyseliová, K., Baldovič, M., Bognár, C., Beňuš, R., Kádasi, E. (2016). Izolácia a analýza archaickej dna z ľudských kostrových pozostatkov. *Česká antropologie*, 66(2), 26–29.