

**Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek**

Drevna DNA – povijest života

(Ancient DNA – history of life)

ZAVRŠNI SEMINAR

Sanja Sviben

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

mentor: prof. dr. sc. Mirjana Kalafatić

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ:

1. Uvod	2
2. Povijesni razvoj i dostignuća na području istraživanja drevne DNA.....	3
2.1. Najranija istraživanja i razvoj PCR tehnologije	3
2.2. Drevna DNA i evolucija.....	4
3. Problemi u radu s aDNA	6
3.1 Molekularna oštećenja aDNA i kontaminacije	6
4. Doprinos istraživanja aDNA modernoj znanosti	9
4.1. Hominidi.....	9
4.1.1. Neandertalci	10
4.2. Prehrana i ponašanje.....	11
4.3. Medicinska molekularna arheologija	12
4.4. Pripitomljavanje biljaka i životinja	12
5. Zaključak.....	14
6. Literatura.....	15
7. Sažetak.....	25
8. Summary.....	25

1. Uvod

Izučavanje evolucijskih procesa kao i povijesti drevnih populacija bilo životinjskog bilo biljnog svijeta vrlo je zanimljiv aspekt znanstvene današnjice, tim više što su informacije o takvim događajima očuvane u ekstraktu genetičkog materijala iz povijesnih ostataka. Takav genetički materijal koji ostaje očuvan ponekad i milijunima godina naziva se drevna DNA.

Drevna DNA ili ancient DNA (aDNA) je u znanstvenoj terminologiji naziv za bilo koju DNA očuvanu u materijalu koji se koristi u DNA analizi skeleta, mumificiranog tkiva, konzerviranih životinjskih i biljnih ostataka te ostataka očuvanih u ledu, permafrostu, jantaru i sl. Te analize karakterizira niska kvaliteta i često visok stupanj oštećenosti DNA što značajno limitira istraživanja i ograničava rezultate. Također, brojni čimbenici kao što su vrijeme, voda i temperatura uvjetuju degradaciju aDNA te tako utječu na njezinu očuvanost.

Ovaj rad prikazuje postepeni razvoj ove grane u znanosti te njezinu važnost u shvaćanju i otkrivanju **molekularne genetičke evolucije** kao i u testiranju hipoteza u biologiji općenito. Također, predmetnost ovog rada je i problematika s kojom se neizostavno susreću svi znanstvenici čija istraživanja uključuju aDNA te budućnost koju nam takva istraživanja donose.

2. Povijesni razvoj i dostignuća na području istraživanja drevne DNA

Istraživanja povijesti i evolucije živog svijeta metodama aDNA započela su prije otprilike 25 godina. Kloniranje DNA iz zebre tipa Quagga (Higuchi et al., 1984) i egipatske mumije (Pääbo, 1985) bila su prva uspješna istraživanja na polju sekvencioniranja aDNA. No, pošto je udio DNA očuvane u tkivu bio jako malen, izolacija bakterijskih klonova koji nose iste DNA sekvence bila je nemoguća. Stoga, autentičnost rezultata bila je upitna jer oni nisu mogli biti ponovljeni. Razvojem PCR tehnologije to je promijenjeno te je započeo val revolucionarnih istraživanja. Analizirani su ostaci prirodno ili umjetno mumificiranih životinjskih ostataka (Higuchi et al., 1984; Pääbo, 1989), kosti (Cooper et al., 1992), individue očuvane u alkoholu (Junqueira et al., 2002), biljni i životinjski ostaci u uzorcima zemlje (Handt et al., 1994b) te brojni drugi uzorci koji su bili dovoljno dobro očuvani da bi se iz njih izolirala DNA.

2.1. Najranija istraživanja i razvoj PCR tehnologije

Prva uspješna istraživanja s drevnom DNA počela su 1984. godine (Higuchi et al., 1984) i predstavljala su pravu revoluciju u molekularnoj biologiji. Predmet istraživanja bio je 150 godina star muzejski primjerak izumrle vrste zebre Quagga čija je DNA ekstrahirana i sekvencionirana. Daljnja istraživanja na tom području pod vodstvom Svante Pääboa (Pääbo, 1985; 1986) potvrdila su da se ista istraživanja mogu izvesti i na nekoliko tisuća godina starim mumificiranim primjercima čovjeka. No, osnovni problem bilo je umnažanje DNA koje je tada vršeno uz pomoć bakterijskog kloniranja. Pravi napredak na tom području uslijedio je otkrićem PCR metode (Mullis & Faloona, 1987) krajem 80-ih godina prošlog stoljeća.

Nakon smrti organizma DNA prolazi kroz promjene koje se ponajprije očituju u pojavi mutacija čiji se broj s vremenom povećava. Sreća je u tome što su određene regije DNA podložnije takvoj degradaciji što olakšava istraživanje. Otkrićem PCR tehnologije brojni znanstveni timovi krenuli su s istraživanjem aDNA jer je tada bilo moguće da ista DNA sekvenca iz jedne jedinice bude amplificirana više puta te su rezultati istraživanja mogli biti ponovljeni. Uslijedila su istraživanja koja su obuhvaćala izolaciju aDNA iz jedinki starih milijun godina. Lindahl (1993a) je smatrao da se tako stara DNA može očuvati isključivo u jantaru.



Slika 1. Prikaz dijela jantara u kojem su očuvani primjerci insekata (preuzeto s <http1>).

Pošto u toj smoli najčešće nalazimo očuvane insekte (Sl. 1.), brojna istraživanja bila su usmjerena ka istraživanju termita (Desalle et al., 1992) i pčela (Cano et al., 1992a; 1992b; 1993). Općenito, insekti su nezanemarivi kada su u pitanju studije drevne DNA jer su važni u istraživanju ekosistema, klime i biodiverziteta koji su nekoć vladali na Zemlji. No, tadašnja istraživanja nisu bila usmjerena samo na fosile iz jantara, već i na fosile očuvane u sedimentu. Prva takva istraživanja provedena su na biljkama koje su datirale iz miocena (Golenberg et al., 1990; Golenberg, 1991; Poinar et al., 1993). Kako se sve više radova objavljivalo, istraživači različitih područja prirodnih znanosti ujedinjavali su se u istraživanjima te je započela era intenzivnijeg proučavanja evolucije na temelju izumrlih ostataka biljaka i životinja.

2.2. Drevna DNA i evolucija

Među prvim istraživanjima u kojima se počeo upotrebljavati PCR bilo je i ono koje se bavilo analizom mitohondrijskog gena koji kodira za citokrom b (Thomas et al., 1989). Ovo istraživanje je pokazalo da se PCR može upotrijebiti u svrhu istraživanja izumrlih životinja što je bilo od izuzetne važnosti za shvaćanje evolucije u cjelini. Analiza je provedena na primjerku vuka iz Australije. Naime, istraživanje je pokazalo da je tasmanijski vuk u srodstvu s ostalim australijskim karnivorima, ali ne i s južnoameričkim (Krajewski et al., 1992; 1997) kao što se nagađalo. To istraživanje inspiriralo je znanstvenike u daljnjem proučavanju izumrlih oblika života te pronalaženju njihove uloge u evoluciji. Naredna istraživanja bavila su se arheološkim nalazom novozelandske ptice moa (Sl. 2.) koja nije mogla letjeti (Cooper et al., 1992), a morfološki je sličila ptici kiwi s Novog Zelanda, nojevima u južnoj Africi i emuu

u Australiji. Analiza je pokazala sličnost s australijskim emuom što je iniciralo na činjenicu da je Novi Zeland koloniziran dva puta pticama koje ne mogu letjeti. Prvi put s precima ptice moa, a drugi put pretkom ptice kiwi. Interesantna su i istraživanja sisavaca iz kasnog pleistocena koja su uslijedila. Istraživana je DNA sekvenca mamuta (Hagelberg et al., 1994; Bailey et al., 1996). Sekvencirana je i DNA pleistocenskog velikog ljenjivca (Höss et al., 1996), špiljskog lava (Burger et al., 2004) i smeđeg medvjeda (Hänni et al., 1994; Barnes et al., 2002; Hofreiter et al., 2002) što je značajno pridonijelo rasvjetljavanju genetičkih odnosa tih izumrlih životinja.



Slika 2. Najvjerojatniji izgled ptice moa (preuzeto s <http2>).

Zanimljiva su istraživanja koja su zadirala u daleku prošlost. Primjerice, istraživanja DNA sekvenci bakterija nađenih u crijevima insekata fosiliziranih u jantaru (Cano & Borucki, 1995) kao i bakterija pronađenih u kristalima soli (Vreeland et al., 2000; Fish et al., 2002). No, ideja da DNA može preživjeti milijunima godina te tako pomoći u rasvjetljavanju evolucijske prošlosti s vremenom je postala upitna (Pääbo & Wilson, 1991; Lindahl, 1993b). Također, neki rezultati nisu mogli biti ponovljeni (Sidow et al., 1991; Austin et al., 1997) što je bacilo tračak sumnje na dotadašnja istraživanja. U prilog tome išla je i činjenica da se lignin u biljkama i hitin insekata ne mogu očuvati tako dugo (Logan et al., 1995; Stankiewicz et al., 1998). U jednom slučaju je čak pokazano da mitohondrijska DNA sekvenca zapravo potječe od mitohondrijske insercije u jezgrinom genomu čovjeka (Allard et al., 1995; Hedges & Schweitzer, 1995; Heinkoff, 1995). Jedno od takvih istraživanja imalo je velikog odjeka u biološkim i geološkim znanstvenim krugovima. Sekvencioniran je gen za mitohondrijski citokrom b iz kostiju dinosaura starog 80 milijuna godina (Woodward et al., 1994). Studija je nastavljena ekstrakcijom i sekvencioniranjem DNA iz jaja dinosaura koje je datiralo iz

razdoblja krede (An et al., 1995; Li et al., 1995). Iako se smatralo da će ta istraživanja biti prekretnica u istraživanju evolucijske prošlosti Zemlje, kasnije je otkriveno da je dinosauerska DNA zamijenjena s ljudskim Y kromosomom, odnosno, da je došlo do kontaminacije uzoraka. Takva i slična istraživanja natjerala su znanstvenike da diskutiraju o mogućim problemima koji su neizostavni u ovim istraživanjima što je utjecalo na kasnije usavršavanje metoda u radu s aDNA.

3. Problemi u radu s aDNA

Kada istraživači proučavaju genetički materijal povijesnih ostataka obično uzimaju ekstrakt iz kostiju i zubiju. Samo istraživanje je zahtjevno i teško jer u usporedbi s recentnom DNA, drevna DNA je uglavnom degradirana i prisutna u malim količinama. Zbog toga je rizik od kontaminacije vrlo velik. Zato, u svakom koraku procesa izolacije DNA, rezultati uvijek prolaze proces provjere. Istraživanje započinje ekstrakcijom i analizom DNA iz fosilnih ostataka (obično se radi s mitohondrijskom DNA) koja se potom duplicira i kasnije amplificira. Kopija DNA se analizira kako bi bili sigurni da uzorci nisu kontaminirani.

3.1 Molekularna oštećenja aDNA i kontaminacije

U živim stanicama integritet DNA molekula održava se enzimatskim mehanizmom popravka (Lindahl, 1993b). Nakon smrti organizma katabolizam predvođen enzimima se gasi. Kao posljedica, DNA se brzo degradira enzimima kao što je lizosomalna nukleaza (Pääbo et al., 2004). Uz to, brojne bakterije, gljivice i insekti koji se hrane degradiranim molekulama ubrzavaju proces degradacije. No, u vrlo rijetkim slučajevima, primjerice, kada je tkivo brzo isušeno nakon smrti ili je DNA apsorbirana u mineralni matriks, može se izbjeći enzimatska i mikrobnog degradacija (Pääbo et al., 2004). U takvim slučajevima samo kemijski procesi, koji su spori, utječu na DNA. No, pošto enzimatski sustav popravka nije aktivan, oštećenja se progresivno akumuliraju tijekom vremena dok DNA potpuno ne izgubi integritet. Već spomenuta PCR metoda omogućuje „spašavanje“ informacije u uzorcima u kojima degradacija nije potpuna.

DNA se obično degradira u dijelove od 100 do 500 pb (Pääbo, 1989; Hofreiter et al., 2001b). Redukcija u veličini povezana je s neenzimatskim cijepanjem fosfodieterskih veza u

šećer-fosfatnoj okosnici (Shapiro, 1981; Lindahl, 1993b) nakon smrti organizma. Glikozidne veze su također podložne hidrolitičkom cijepanju što rezultira gubitkom baza (Lindahl & Nyberg, 1972; Lindahl & Karlstro, 1973). Takva mjesta bez baza podložna su kemijskim promjenama zbog čega dolazi do cijepanja lanaca (Shapiro, 1981; Friedberg et al., 1995). Duljina DNA koja se može amplificirati PCR-om limitirana je upravo tim cijepanjem lanaca, ali i lezijama koje blokiraju elongaciju pomoću *Taq* polimeraze. Takve lezije obično su rezultat slobodnih kisikovih radikala (Hofreiter et al., 2001b). Također, problem predstavljaju i „cross-link“ oštećenja (Pääbo, 1989), kao i DNA modifikacije koje, iako dopuštaju proces amplifikacije PCR-om, uzrokuju ugradnju krivih, pogrešnih baza (Friedberg et al., 1995).

Danas su razvijene metode kojima se takve pogreške nastoje što efikasnije ukloniti. Primjerice, kada je sekvenca mitohondrijske DNA amplificirana iz ostataka pleistocenskog medvjeda (Hofreiter et al., 2001a) utvrđeno je da se ugradnja pogrešnih baza kod PCR-a može minimalizirati kad se amplificira više molekula, a ne smo jedna molekula DNA. Veliki problem predstavlja i kontaminacija egzogenom DNA. Primjerice, u istraživanju 24 ostatka neandertalaca iz različitih lokaliteta u Europi, samo 4 ostatka su sadržavala neanderalsku DNA (Hofreiter et al., 2001b). Pitanje koje se nameće jest kako izbjeći takve kontaminacije? Prvo, treba izbjeći kontaminaciju u laboratoriju na način da cijeli laboratorij treba biti sterilan i sva oprema nova (Pääbo, 1990). U idealnom slučaju, laboratoriji koji rade s aDNA trebali bi biti što više udaljeni od laboratorija koji rade s recentnom DNA. Sav rad ekstrakcije treba izvesti u zaštitnim odijelima, a radni prostor treba biti očišćen raznim oksidansima i zračen UV-om. Pritom su bitne tri stavke (Pääbo, 1989):

- Testiranje kontrolnih ekstrakata treba izvoditi paralelno s testiranjem ostalih ekstrakata iz jedinke radi lakšeg utvrđivanja kontaminacije koju uzrokuju reagensi i otopine tijekom ekstrakcije.
- Iz svake jedinke treba pripremiti više od jednog ekstrakta te svi trebaju rezultirati identičnom DNA sekvencom.
- Treba postojati inverzna korelacija između efikasnosti amplifikacije i veličine produkta amplifikacije što je odraz degradacije i oštećenja aDNA.

Ovi kriteriji su prošireni na temelju novijih istraživanja (Lindahl, 1993a; Handt et al., 1994a; Cooper & Poinar, 2000; Hofreiter et al., 2001b):

- Područje na kojem se vrši istraživanje mora biti fizički izolirano kako bi se izbjegle potencijalne kontaminacije.
- Amplifikacijski produkti moraju biti rutinski klonirani i sekvencionirani. To omogućuje detekciju bilo kakve heterogenosti u amplifikacijskom produktu.
- Radi detekcije kontaminacija nužno je pripremiti i „prazne“ PCR kontrole. Primjerice, ekstrakt aDNA obično sadržava šećere i mikrobnu DNA koje služe kao nosači u PCR-u zbog čega dolazi do umnažanja kontaminacija iako su one prisutne u niskoj koncentraciji (Pääbo, 1990). No, ta kontaminacija neće se amplificirati u „praznim“ PCR kontrolama ako je u njih dodan ekstrakt aDNA za koji korištene početnice neće funkcionirati.
- Potrebno je ponavljati amplifikaciju da bismo uočili kontaminaciju i krivo ugrađene baze tijekom PCR-a.
- Sekvence dobivene PCR amplifikacijom moraju imati filogenetski smisao.
- Kvantizacija broja amplificirajućih DNA molekula je nužna jer pokazuje da li su moguće konzistentne promjene u DNA ili ne.
- Zbog fragmentiranosti DNA amplifikacijska efikasnost mora biti inverzno korelirana s duljinom amplifikacije.
- Nužno je provesti biokemijska istraživanja aDNA kako bi se utvrdila njezina očuvanost. Dobra biokemijska prezervacija ide u prilog autentičnosti aDNA sekvence.
- Malo je vjerojatno da nekoliko različitih parova početnica preferentno amplificira točno određenu inserciju iz jezgrine DNA koja se nalazi u mitohondrijskoj DNA. Ako dobivamo takve rezultate, to je upozorenje da su jezgrine insercije u mtDNA amplificirane.
- Eksperiment treba ponoviti u drugom laboratoriju zbog detekcije kontaminacije kemikalija ili uzoraka u samom laboratoriju.

Kada je određena prva DNA sekvenca neandertalca svi navedeni uvjeti su uzeti u obzir (Krings et al., 1997). No, ako je jedinka kontaminirana recentnom DNA sekvencom, unatoč poštivanju svih kriterija rezultati će biti pogrešni. Primjerice, 30 000 godina star zub koji je pripadao medvjedu s područja Kine rezultirao je ljudskom DNA sekvencom (Pääbo et al., 2004). Stoga, dobivenim rezultatima uvijek treba pristupiti kritički i s oprezom.

4. Doprinos istraživanja aDNA modernoj znanosti

Istraživanja aDNA otvorila su vrata mogućnosti određivanja povezanosti izumrlih vrsta i određivanja molekularne filogenije te danas mnogi prirodoslovno-povijesni muzeji iz svojih kolekcija šalju uzorke na analizu (Suarez & Tsutsui, 2004). Očuvanost jedinki na pojedinim lokalitetima omogućuje nam da upravo preko aDNA pratimo promjene u populaciji tijekom vremena.

4.1. Hominidi

S obzirom na antropološki i arheološki te javni interes za ljudske ostatke, bilo je prirodno za očekivati da će izučavanje aDNA krenuti i na tom području. Zbog morfološke očuvanosti u mnogim studijama uzimano je mumificirano tkivo kao izvor ljudske aDNA. Primjeri su prirodno očuvani ostaci ledenog čovjeka, Ötzija, (Handt et al., 1994b) te umjetno očuvana tkiva kao što su kemijski tretirane mumije starog Egipta. No, mumificirani ostaci su limitirajući izvor podataka te se većina studija drevne DNA fokusira na ekstrakciju DNA iz očuvanih kostiju i zubiju. U zadnje vrijeme sve se više u obzir uzimaju i uzorci kose (Baker, 2001; Gilbert et al., 2004).

Studije o aDNA sekvencama ljudskih ostataka osiguravaju nam uvid u važna pitanja koja se tiču porijekla genetičkih bolesti, migracija naših predaka i sl., ali imaju relativno ograničen utjecaj na naše razumijevanje ljudske prošlosti i to se u bližoj budućnosti neće promijeniti (Hofreiter & Vigilant, 2003). Razlog tome su sveprisutni problemi kontaminacije ljudskom DNA i činjenica da mnoge moderne ljudske populacije dijele identične DNA sekvence unatoč brzom evoluciji mitohondrijskog genoma (Pääbo et al., 2004). S druge strane, analiza aDNA dala nam je uvid u migracije koje su započele iz Afrike u ostatak svijeta prije oko 100 000 godina. Današnja istraživanja često su zaokupljena istraživanjem neandertalaca.

4.1.1. Neandertalci

Neandertalci su živjeli u Europi i zapadnoj Aziji prije 100 000 do 30 000 godina. Na temelju fosilnih i kulturoloških nalaza neki paleontolozi smatraju da su doprinijeli genetičkoj strukturi novopridošlih modernih ljudskih populacija iz Afrike, odnosno, da su neandertalci preci modernih Europljana (Trinkaus & Duarte, 2000; Hawks & Wolpoff, 2001; Wolpoff et al., 2000; 2001). Analiza aDNA omogućila je testiranje takvih hipoteza i predviđanja.

Istraživanja neandertalskog genoma provode se zahvaljujući očuvanim ostacima mtDNA u području hipervarijabilne regije. Određivanje sekvence segmenta od 380 pb hipervarijabilne regije mitohondrijskog genoma neandertalca (Krings et al., 1997) pokazalo je da se neandertalski mitohondrijski tip prilično razlikuje od današnjeg ljudskog. Slična istraživanja (Krings et al., 1999; Ovchinnikov et al., 2000; Schmitz et al., 2002) došla su do istih rezultata. Dakle, očito je da neandertalci nisu doprinijeli mtDNA današnjih ljudi. No, ovi rezultati ne rješavaju problem mogućeg doprinosa neandertalaca ukupnoj zalihni gena (gene pool) modernih ljudi jer je takav doprinos mogao biti izbrisan genetičkim driftom (Krause et al., 1997; Nordborg, 1998) ili kontinuiranim ulaskom moderne ljudske DNA u neandertalski gene pool (Enflo et al., 2001). Također, ako su neki neandertalci nosili mtDNA sekvence slične našoj, moguće je da je ona detektirana kao kontaminacija (Trinkaus, 2001). Na sreću, taj problem postao je predmet istraživanja nekih znanstvenika (Serre et al., 2004).

Neka istraživanja (Krause et al., 2007) pokazala su da neandertalci imaju iste mutacije kao i moderni ljudi na FOXP2 genu koji se smatra genom odgovornim za govor. Taj gen je visoko konzerviran kod većine sisavaca, ali ljudi posjeduju dvije jedinstvene mutacije u proteinu za koji taj gen kodira, a koje su uzrokovane supstitucijom nukleotida na pozicijama 911 i 977 egzona 7. Istraživanje je pokazalo da neandertalci dijele dvije evolucijske promjene u FOXP2 genu s modernim čovjekom. Krause i njegovi suradnici pažljivo su izveli ekstrakciju ostataka iz špilje El Sidrón u Španjolskoj te su amplificirali FOXP2 gen koristeći neandertalske specifične početnice. Nakon amplifikacije i sekvencioniranja otkriveno je da je FOXP2 gen neandertalaca identičan onom današnjih ljudi. Točnije, na poziciji 911 egzona 7 kod neandertalaca je treonin zamijenjen asparaginskom kiselinom i na poziciji 977 je arginin zamijenjen serinom. Baš kao i kod ljudi. No, u razrješenju pitanja da li su neandertalci mogli komunicirati autori su vrlo oprezni te smatraju da su potrebna daljnja istraživanja kako bismo pobliže razumijeli evoluciju neandertalaca pa i samog čovjeka općenito.

4.2. Prehrana i ponašanje

Istraživanja aDNA danas su proširena i na proučavanje prehrane i ponašanja životinja koje su živjele u dalekoj prošlosti. Vrlo često se uz same ostatke životinja pronalazi i njihov izmet odnosno, u fosiliziranom obliku, **koprolit**. Pošto se pokazalo, primjerice u slučaju medvjeda (Höss et al., 1992), da koproliti sadrže i DNA defekatora i DNA probavljenih biljaka te da se tako ekstrahirana DNA može koristiti za određivanje mikrosatelitnih lokusa (Constable et al., 1995; Vigilant et al., 2001), uzorkovanje izmeta i koprolita postala je rutinska tehnika za proučavanje prehrane rijetkih i ugroženih, ali i izumrlih životinja (Kohn & Wayne, 1997). U jednom istraživanju analizirano je 6 koprolitskih nakupina čija je starost radioaktivnom metodom izotopa ugljika procijenjena na 11 000, 20 000 i 28 500 godina. Detektirana je mtDNA identična onoj koja je sekvencirana iz kosti izumrlog velikog ljenjivca *Nothrotheriops shastensis*, Sinclair 1905 (Sl. 3.) (Poinar et al., 1998). Također, umnožen je segment od 157 pb gena koji kodira za veliku podjedinicu kloroplastne ribuloza bisfosfat-karboksilaze (*rbcL*). On je uspoređen s istim genom koji sadrže biljke koje danas žive na tom istom području. Identificirano je 13 redova biljaka što upućuje na činjenicu da se ljenjivac hranio drvećem, ali i biljkama i travom. Također, na temelju određenih redova biljaka utvrđeno je da je klima prije 11 000 godina na istom području bila suša nego prije 20 000 i 28 500 godina. Isto tako utvrđeno je da su se ljenjivci hranili u blizini izvora vode češće prije 11 000 godina nego ranije. Dakle, prehrambene navike i okoliš prije, tijekom i nakon posljednje glacijacije, u ovom slučaju, proučavan je isključivo na temelju nalaza koprolita. Ovaj aspekt proširen je i na istraživanje ljudskih koprolita u kojima su uz biljne, pronađeni i ostaci probavljenih životinja (Poinar et al., 2001).



Slika 3. *Nothrotheriops shastensis* (preuzeto s <http3>).

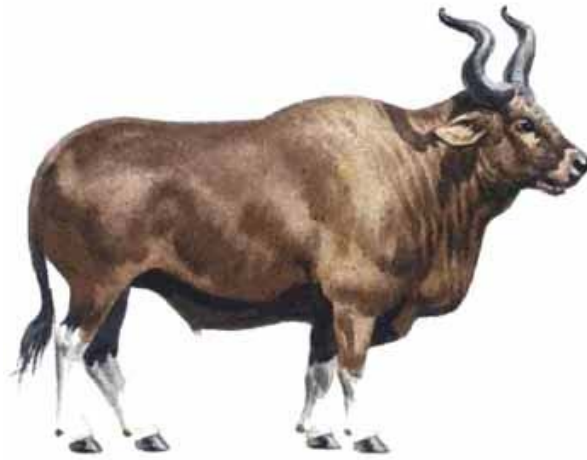
4.3. Medicinska molekularna arheologija

Jedna od potencijalnih atraktivnih primjena aDNA je i u proučavanju patogenosti bakterija i virusa. Velik broj radova govori o pronalasku bakterija kao što su *Mycobacterium tuberculosis* (Salo et al., 1994; Arriaza et al., 1995; Donoghue et al., 1998; Haas et al., 2000) i *Yersinia pestis* (Drancourt et al., 1998, Raoult et al., 2000) kao i o virusu gripe vezanom uz veliku epidemiju 1918. godine (Reid et al., 1999). Ovo je još uvijek relativno nov i vrlo zanimljiv pristup proučavanju aDNA jer evolucija nekih patogena može biti dovoljno brza da dođe do genetičkih promjena koje možemo pratiti kroz desetljeća pa i stoljeća. No, uvijek postoje potencijalni izvori kontaminacije. Primjerice, bakterije tla mogu sadržavati DNA sekvence slične *Mycobacterium tuberculosis* zbog čega su neki znanstvenici pomalo skeptični spram ovog područja (Gilbert et al., 2004).

4.4. Pripitomljavanje biljaka i životinja

Pripitomljavanje ili udomaćivanje životinja i biljaka započelo je prije oko 10 000 godina. Ono je uključivalo selekciju određenih karakteristika u divljim populacijama. Varijabilni genetički lokusi koji nisu selekcionirani tijekom pripitomljavanja, primjerice mtDNA, danas se koriste u istraživanjima da li su i u kolikoj mjeri različite divlje populacije doprinijele ukupnoj količini gena (gene pool) današnjih pripitomljenih populacija. Geni koje su ljudi selekcionirali tijekom pripitomljavanja mogu se identificirati na temelju niske stope varijabilnosti u odnosu na gene divljeg pretka (Pääbo et al., 2004). Jednom kad se takav gen identificira može se odrediti kada je, vremenski, određena karakteristika selekcionirana tijekom pripitomljavanja. Primjerice, uspoređene su sekvence mtDNA današnjeg goveda i njegovog izumrllog pretka iz Europe, divljeg goveda (Bailey et al., 1996; Troy et al., 2001). Rezultati su pokazali da europsko divlje govedo (Sl. 4.) ima drugačiju mtDNA u usporedbi s današnjim govedom. To znači da se današnja goveda, koja su pripitomljena na Bliskom Istoku, a zatim dovedena u Europu, nisu parila s lokalnim divljim govedima u Europi. Nažalost, uzorci izumrllog divljeg goveda sa Srednjeg Istoka nisu sadržavali dovoljno dobro očuvanu aDNA te divlji potomci populacije današnjih goveda nisu identificirani. Također, slična istraživanja provedena su i za konje (Vila et al., 2001), pse (Vila et al., 1997; Leonard et al., 2002), svinje (Watanabe et al., 2001; 2002), koze (Kahila et al., 2002) zečeve (Hardy et

al., 1995) i kukuruz (Matsuoka et al., 2002) gdje je upravo na temelju aDNA razriješena tematika evolucije pripitomljavanja.



Slika 4. Izumrlo divlje govedo iz Europe (preuzeto s <http4>).

5. Zaključak

U zadnje vrijeme sve se više znanstvenika bavi istraživanjima aDNA kako bi shvatili evoluciju živog svijeta. Međutim, dobivanje pouzdanih i zanimljivih rezultata zahtijeva primjenu različitih složenih metoda koje se danas upotrebljavaju u molekularnim laboratorijima. Osnova svakog takvog istraživanja je prije svega razumijevanje kako i u kolikoj mjeri nam analiza aDNA može rasvijetliti zadanu problematiku te skeptičan pristup prema vlastitom radu. Primjerice, istraživač koji predlaže studiju raznolikosti mtDNA kod jedinki koje se nalaze na 1000 godina starom groblju treba predvidjeti da se jako malo mutacija može očekivati za period od 1000 godina te da će tako dobiveni rezultati dati jako malo informacija o raznolikosti mtDNA dok će kontaminacija na tom području biti vrlo problematična.

Kriteriji objašnjeni u ovom radu tek su okvir za validne rezultate te njihova efikasnost ovisi o njihovoj integriranoj primjeni. S time na umu, trebamo biti svjesni da nam analiza uz pomoć aDNA nudi jedinstvenu mogućnost da dobimo uvid u povijest života te da izumrle vrste doprinesu našem razumijevanju **molekularne genetičke evolucije**. Neki drugi projekti kao što je analiza aDNA javnih i poznatih osoba ili povijesnih ličnosti (kraljevskih obitelji, bivših američkih predsjednika, Elvisa Presleya, Staljina, Karla Velikog,...) javnosti bi bili puno zanimljiviji. Takva istraživanja osim što nisu znanstveno usmjerena, ponekad su i etički upitna (Andrews et al., 2004). No, što nam budućnost na ovom području donosi tek ćemo vidjeti.

6. Literatura

Allard MW, Young D, Huyen Y. 1995. Detecting dinosaur DNA. *Science* **268**:1192

An C-C, Li Y, Zhu Y-X. 1995. Molecular cloning and sequencing of the 18S rDNA from specialized dinosaur egg fossil found in Xixia Henan, China. *Acta Sci Nat Univ Pekinensis* **31**:140-147

Andrews LB, Buenger N, Bridge J, Rosenow L, Stoney D. 2004. Constructing ethical guidelines for biohistory. *Science* **304**:215–16

Arriaza BT, Salo W, Aufderheide AC, Holcomb TA. 1995. Pre-Columbian tuberculosis in Northern Chile—molecular and skeletal evidence. *Am. J. Phys. Anthropol.* **98**:37–45

Austin JJ, Ross AJ, Smith AB, Fortey RA, Thomas RH. 1997. Problems of reproducibility – does geologically ancient DNA survive in amber-preserved insects? *Proc. R. Soc. London Ser. B* **264**:467–474

Bailey JF, Richards MB, Macaulay VA, Colson IB, James IT. 1996. Ancient DNA suggests a recent expansion of European cattle from a diverse wild progenitor species. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **263**:1467–1473

Baker LE. 2001. Mitochondrial DNA haplotype and sequence analysis of historic Choctaw and Menominee hair shaft samples. PhD Thesis. University of Tennessee, Knoxville.

Barnes I, Matheus P, Shapiro B, Jensen D, Cooper A. 2002. Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears. *Science* **295**:2267–2270

Burger J, Rosendahl W, Loreille O, Hemmer H, Eriksson T. 2004. Molecular phylogeny of the extinct cave lion. *Panthera leo spelaea*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **30**:841–849

Cano RJ, Borucki MK. 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25-million-year-old to 40-million-year old Dominican amber. *Science* **268**:1060–1064

Cano RJ, Poinar H, Poinar Jr GO. 1992a. Isolation and partial characterisation of DNA from the bee *Problebeia dominicana* (Apidae:Hymenoptera) in 25-40 million year old amber. *Med Sci Res* **20**:249-251

Cano RJ, Poinar HN, Pieniazek NJ, Acra A, Poinar GO. 1993. Amplification and sequencing of DNA from a 120–135-million-year-old weevil. *Nature* **363**:536–538

Cano RJ, Poinar HN, Roubik DW, Poinar Jr GO. 1992b. Enzymatic amplification and nucleotide sequencing of portions of the 18S rRNA gene of the bee *Problebeia dominicana* (Apidae:Hymenoptera) isolated from 25-40 million year old Dominican amber. *Med Sci Res* **20**:619-622

Constable JJ, Packer C, Collins DA, Pusey AE. 1995. Nuclear DNA from primate dung. *Nature* **373**:393

Cooper A, Mourer-Chauvire C, Chambers GK, von Haeseler A, Wilson AC, Pääbo S. 1992. Independent origins of New Zealand moas and kiwis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:8741–8744

Cooper A, Poinar HN. 2000. Ancient DNA: Do it right or not at all. *Science* **289**:1139

Desalle R, Gatesy J, Wheeler W, Grimaldi D. 1992. DNA sequences from a fossil termite in Oligomiocene amber and their phylogenetic implications. *Science* **257**:1933–1936

Donoghue HD, Spigelman M, Zias J, Gernaey-Child AM, Minnikin DE. 1998. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in calcified pleura from remains 1400 years old. *Lett. Appl. Microbiol.* **27**:265–269

Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Dutour O, Raoult D. 1998. Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12637–12640

Enflo P, Hawks J, Wolpoff M. 2001. A simple reason why Neanderthal ancestry can be consistent with current DNA information. *Am. J. Phys. Anthropol.* **114**:62

Fish SA, Shepherd TJ, McGenity TJ, Grant WD. 2002. Recovery of 16S ribosomal RNA gene fragments from ancient halite. *Nature* **417**:432–436

Friedberg EC, Walker GC, Siede W. 1995. *DNA Repair and Mutagenesis*. Washington, DC: ASM Press. 698 pp.

Gilbert MTP, Cuccui J, White W, Lynnerup N, Titball RW. 2004. Absence of *Yersinia pestis*-specific DNA in human teeth from five European excavations of putative plague victims. *Microbiology-Sgm* **150**:341–354

Gilbert MTP, Wilson AS, Bunce M, Hansen AJ, Willerslev E, Shapiro B, Higham TFG, Richards MP, O'Connell TC, Tobin DJ, Janaway RC, Cooper A. 2004. Ancient mitochondrial DNA from hair. *Current Biology* **14**:463-464

Golenberg EM, Giannasi DE, Clegg MT, Smiley CJ, Durbin M, Henderson D, Zurawski G. 1990. Chloroplast DNA sequence from a Miocene *Magnolia* species. *Nature* **344**:656-658

Golenberg EM. 1991. Amplification and analysis of Miocene plant fossil DNA. *Philos Trans R Soc Lond B* **333**:419-426; discussion 426-427

Haas CJ, Zink A, Molnar E, Szeimies U, Reischl U. 2000. Molecular evidence for different stages of tuberculosis in ancient bone samples from Hungary. *Am. J. Phys. Anthropol.* **113**:293–304

Hagelberg E, Thomas MG, Cook CE Jr., Sher AV, Baryshnikov GF, Lister AM. 1994. DNA from ancient mammoth bones. *Nature* **370**:333–334

Handt O, Höss M, Krings M, Pääbo S. 1994a. Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia* **50**:524–529

Handt O, Richards M, Trommsdorf M, Kilger C, Simanainen J, Georgiev O, Bauer K, Stone A, Hedges R, Schaffner W, Utermann G, Sykes B, Pääbo S. 1994b. Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science* **264**:1775-1778

Hänni C, Laudet V, Stehelin D, Taberlet P. 1994. Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:12336–12340

Hardy C, Callou C, Vigne JD, Casane D, Dennebouy N. 1995. Rabbit mitochondrial DNA diversity from prehistoric to modern times. *J. Mol. Evol.* **40**:227–237

Hawks JD, Wolpoff MH. 2001. The accretion model of Neandertal evolution. *Evolution* **55**:1474–1485

Hedges SB, Schweitzer MH. 1995. Detecting dinosaur DNA. *Science* **268**:1191–1192

Henikoff S. 1995. Detecting dinosaur DNA. *Science* **268**:1192

Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC. 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* **312**:282–284

Hofreiter M, Capelli C, Krings M, Waits L, Conard N. 2002. Ancient DNA analyses reveal high mitochondrial DNA sequence diversity and parallel morphological evolution of Late Pleistocene cave bears. *Mol. Biol. Evol.* **19**:1244–1250

Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, Haeseler Av, Pääbo S. 2001a. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res.* **29**:4793–4799

Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S. 2001b. Ancient DNA. *Nat. Rev. Genet.* **2**:353–359

Hofreiter M, Vigilant L. 2003. Ancient human DNA: phylogenetic applications. In *Nature Encyclopedia of the Human Genome*, ed. DN Cooper, pp. 116–119. London: Nature Publ. Group

Höss M, Dilling A, Currant A, Pääbo S. 1996. Molecular phylogeny of the extinct ground sloth *Myiodon darwini*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:181–185

Höss M, Kohn M, Pääbo S, Knauer F, Schröder W. 1992. Excrement analysis by PCR. *Nature* **359**:199

Junqueira ACM, Lessinger AC, Azeredo-Espin AML. 2002. Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. *Med Vet Entomol.* **16**:39-45

Kahila Bar-Gal G, Khalaily H, Mader O, Ducos P, Kolska Horwitz L. 2002. Ancient DNA evidence for the transition from wild to domestic status in Neolithic goats: a case study from the site of Abu Gosh, Israel. *Ancient Biomolecules* **4**:9–17

Kohn MH, Wayne RK. 1997. Facts from feces revisited. *Trends Ecol. Evol.* **12**:223–227

Krajewski C, Buckley L, Westerman M. 1997. DNA phylogeny of the marsupial wolf resolved. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **264**:911–917

Krajewski C, Driskell AC, Baverstock PR, Braun MJ. 1992. Phylogenetic relationships of the thylacine (Mammalia: Thylacinidae) among dasyuroid marsupials: evidence from cytochrome *b* DNA sequences. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **250**:19–27

Krause J, Lalueza-Fox C, Orlando L, Enard W, Green RE, Burbano HA, Hublin JJ, Hänni C, Fortea J, Rasilla M, Bertranpetit J, Rosas A, Pääbo S. 2007. The derived *FOXP2* variant of modern humans was shared with neandertals. *Current Biology* **17**:1908-1912

Krings M, Geisert H, Schmitz RW, Krainitzki H, Pääbo S. 1999. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neandertal type specimen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5581–5585

Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Pääbo S. 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* **90**:19–30

Leonard JA, Wayne RK, Wheeler J, Valadez R, Guillen S, Vila C. 2002. Ancient DNA evidence for OldWorld origin of NewWorld dogs. *Science* **298**:1613–1616

Li Y, An C-C, Zhu Y-X. 1995. DNA isolation and sequence analysis of dinosaur DNA from Cretaceous dinosaur egg in Xixia Henan, China. *Acta Sci Nat Univ Pekinensis* **31**:148-152

Lindahl T, Karlstro O. 1973. Heatinduced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution. *Biochemistry* **12**:5151–5154

Lindahl T, Nyberg B. 1972. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **11**:3610

Lindahl T. 1993a. Recovery of antediluvian DNA. *Nature* **365**:700

Lindahl T. 1993b. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**:709–715

Logan GA, Smiley CJ, Eglinton G. 1995. Preservation of fossil leaf waxes in association with their source tissues, Clarkia, Northern Idaho, USA. *Geochim. Cosmochim. Acta* **59**:751–763

Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez GJ, Buckler E, Doebley J. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 6080–6084

Mullis KB, Faloona F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**:335-350

Nordborg M. 1998. On the probability of Neanderthal ancestry. *Am. J. Hum. Genet.* **63**:1237–1240

Ovchinnikov IV, Götherström A, Romanova GP, Kharitonov VM, Liden K, Goodwin W. 2000. Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature* **404**:490–493

Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Després V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M. 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* **38**:645–679

Pääbo S, Wilson AC. 1991. Miocene DNA sequences—a dream come true? *Curr. Biol.* **1**:45–46

Pääbo S. 1985. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* **314**:644–645

Pääbo S. 1986. Molecular genetic investigations of ancient human remains. *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol.* **51**:441–446

Pääbo S. 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:1939–1943

Pääbo S. 1990. Amplifying ancient DNA. In *PCR-Protocols and Applications—A Laboratory Manual*, ed. MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White, pp. 159–166. San Diego: Academic

Poinar HN, Cano RJ, Poinar GO. 1993. DNA from an extinct plant. *Nature* **363**:677

Poinar HN, Hofreiter M, Spaulding WG, Martin PS, Stankiewicz BA. 1998. Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science* **281**:402–406

Poinar HN, Kuch M, Sobolik KD, Barnes I, Stankiewicz AB. 2001. A molecular analysis of dietary diversity for three archaic Native Americans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:4317–4322

Raoult D, Aboudharam G, Crubezy E, Larrouy G, Ludes B, Drancourt M. 2000. Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of Medieval Black Death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:12800–12803

Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, Taubenberger JK. 1999. Origin and evolution of the 1918 “Spanish” influenza virus hemagglutinin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:1651–1656

Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA. 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a Pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:2091–2094

Schmitz RW, Serre D, Bonani G, Feine S, Hillgruber F. 2002. The Neandertal type site revisited: interdisciplinary investigations of skeletal remains from the Neander Valley, Germany. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:13342–13347

Serre D, Langaney A, Chech M, Teschler-Nicola M, Paunovic M. 2004. No evidence of Neandertal mtDNA contribution to early modern humans. *PLoS Biol.* **2**:313–317

Shapiro R. 1981. Damage to DNA caused by hydrolysis. In *Chromosome Damage and Repair*, ed. E Seeberg, K Kleppe, pp. 3–12. New York: Plenum

Sidow A, Wilson AC, Pääbo S. 1991. Bacterial DNA in *Clarkia* fossils. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **333**:429–432; discussion 32–33

Stankiewicz B, Poinar H, Briggs D, Evershed R, Poinar G. 1998. Chemical preservation of plants and insects in natural resins. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **265**:641–647

Suarez AV, Tsutsui ND. 2004. The value of museum collections for research and society. *BioScience* **54**:66–74

Thomas RH, Schaffner W, Wilson AC, Pääbo S. 1989. DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature* **340**:465–467

Trinkaus E, Duarte C. 2000. The hybrid child from Portugal. *Sci. Am.* **282**:102–103

Trinkaus E. 2001. The Neandertal paradox. In *Neanderthals and Modern Humans in Late Pleistocene Eurasia*, ed. C Finlayson, pp. 73–74. Gibraltar: Gibraltar Museum

- Troy CS, MacHugh DE, Bailey JF, Magee DA, Loftus RT. 2001. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* **410**:1088–1091
- Vigilant L, Hofreiter M, Siedel H, Boesch C. 2001. Paternity and relatedness in wild chimpanzee communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:12890–12895
- Vila C, Leonard J, Götherström A, Marklund S, Sandberg K. 2001. Widespread origins of domestic horse lineages. *Science* **291**:474–477
- Vila C, Savolainen P, Maldonado JE, Amorim IR, Rice JE. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science* **276**:1687–1689
- Vreeland RH, Rosenzweig WD, Powers DW. 2000. Isolation of a 250 million-year old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* **407**:897–900
- Watanabe T, Ishiguro N, Nakano M, Takamiya H, Matsui A, Hongo H. 2002 Prehistoric introduction of domestic pigs onto the Okinawa islands: ancient mitochondrial DNA evidence. *J. Mol. Evol.* **55**:222–231
- Watanabe T, Ishiguro N, Okumura N, Nakano M, Matsui A. 2001. Ancient mitochondrial DNA reveals the origin of *Sus scrofa* from Rebun Island, Japan. *J. Mol. Evol.* **52**:281–289
- Wolpoff MH, Hawks J, Caspari R. 2000. Multiregional, not multiple origins. *Am. J. Phys. Anthropol.* **112**:129–136
- Wolpoff MH, Hawks J, Frayer DW, Hunley K. 2001. Modern human ancestry at the peripheries: a test of the replacement theory. *Science* **291**:293–297
- Woodward SR, Weyand NJ, Bunnell M. 1994. DNA sequence from Cretaceous period bone fragments. *Science* **266**:1229–1232

Korištene internetske stranice:

http1 - http://www.sevcikphoto.com/images/jantar_amber_2.jpg

http2 - http://s3.amazonaws.com/readers/2009/03/01/gianthaastseagleattackingnewzealandmoa_1.jpg

http3 - <http://www.paleospot.com/illustrations/shasta-giant-sloth.jpg>

http4 - <http://culture.polishsite.us/images-08/tur.jpg>

7. Sažetak

Drevna DNA predmet je mnogih istraživanja današnjice. Intrigira brojne znanstvenike koji proćavaju genetićki materijal povijesnih ostataka kako bi interpretirali njihovo biološko i socijalno znaćenje. Osnovna svrha tih istraživanja je shvaćanje evolucijske povijesti života.

Ovaj rad prikazuje postepen razvoj ovog aspekta u znanosti kroz lepezu razlićitih istraživanja koja su dovela do usavršavanja metoda rada s drevnom DNA i revolucijom na području molekularne genetićke evolucije. Također, obrađen je i problem degradacije i kontaminacije DNA uzoraka koji je glavni limitirajući faktor u istraživanjima. Napravljen je osvrt i na ulogu drevne DNA u modernoj znanosti.

8. Summary

Ancient DNA is a subject of many researches today. It arouses interest of many scientists who explore genetic material of ancient remains to interpret their biological and social meaning. The basic purpose of these studies is to understand evolutionary history of life.

This paper presents development of this aspect in science thanks to many different studies that resulted in improvement of aDNA methods and revolution in understanding molecular genetic evolution. Degradation and contamination of aDNA, which is limiting factor during researches, is discussed. A review of the role of ancient DNA in modern science is given in this paper, too.