

MARTA GAJEWSKA i WIESŁAW BOGDANOWICZ

Muzeum i Instytut Zoologii PAN
Wilcza 64, 00-679 Warszawa
E-mail: mgajewska@miiz.waw.pl
wieslawb@miiz.waw.pl

KOPALNY DNA CZYLI LEKCJA Z PRZESZŁOŚCI

DLACZEGO KOPALNY DNA?

Poznanie i zrozumienie przeszłości fascynuje ludzi od tysiącleci. W 1984 r. po raz pierwszy opublikowano sekwencję wymarłego zwierzęcia, wytępionego przez człowieka afrykańskiego przedstawiciela koniowatych – kwagi *Equus quagga quagga* (HIGUCHI i współaut. 1984). Od tego czasu pojawiły się dziesiątki prac dotyczących różnych gatunków z przeszłości naszej planety. Badania materiału genetycznego pochodzącego ze znalezisk paleontologicznych, materiałów archeologicznych, preparatów muzealnych i mikrośladów stworzyły zupełnie nowe perspektywy dla wielu dziedzin biologii, ale

także dla archeologii, historii, kryminalistyki, sądownictwa, medycyny itd. Wiele hipotez, do tej pory opieranych na niezbyt miarodajnych przesłankach, zyskało możliwość weryfikacji dzięki wynikom otrzymanym metodami genetyki molekularnej. Badania kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) wymarłych gatunków zwierząt i roślin z pewnością pozwalają lepiej zrozumieć historię współczesnego świata ożywionego, dają również szereg wskazówek na przyszłość, wspierając działania mające na celu ochronę środowiska i jego zasobów.

CZYNNIKI DEGRADUJĄCE DNA

Kiedy można powiedzieć, że mamy do czynienia z kopalnym DNA (ang. ancient DNA, aDNA)? Granica czasowa jest trudna do ustalenia. W niektórych przypadkach z materiału zakonserwowanego kilkanaście lub kilkadziesiąt lat temu można wyizolować materiał genetyczny, którego jakość nie odbiega od uzyskiwanego ze świeżych próbek. Kiedy indziej z tkanek, które mają zaledwie kilka tygodni czy miesięcy otrzymujemy DNA, do którego świetnie pasuje termin „kopalne”. Wydaje się zatem, że lepszym kryterium niż wiek próbki, w przypadku podziału na współczesny i kopalny DNA, może być jakość zawartego w nim kwasu dezoksyrybonukleinowego. Należy pamiętać, że DNA, jak wszystkie makromolekuły, ulega stopniowej degradacji pod wpływem czynników zewnętrznych. Najbar-

dziej zauważalnym przejawem tej degradacji jest fragmentacja materiału genetycznego. Jak wykazały badania PÄÄBO (1989) pofragmentowany DNA zazwyczaj składa się z odcinków o długości ok. 100–500 par zasad (pz). Co istotne, nie ma korelacji pomiędzy wiekiem próbki, a wielkością fragmentów DNA; podobną wielkość fragmentów zaobserwowano zarówno w suszonej wieprzowinie sprzed 4 lat, jak i w izolatach z kości sprzed 13 tysięcy lat (PÄÄBO 1989). Istnieje jednak zależność między warunkami „przechowywania” DNA, a jego jakością. Z próbek zakonserwowanych w niskiej temperaturze (np. w wiecznej zmarzlinie) stosunkowo często udaje się wyizolować duże ilości DNA o dobrej jakości (np. HÖSS i współaut. 1994, WILLERSLEV i współaut. 1999, SHAPIRO i COOPER 2003, ROGAEV i współaut.

2006). Podobnie mikroklimat niektórych jaskiń wapiennych może sprzyjać lepszemu przechowywaniu materiału genetycznego (OVCHINNIKOV i współaut. 2000). Procesy degradacji dotyczą jednak nie tylko fragmentacji, ale również zmian w sekwencji na skutek działania wody i tlenu (uszkodzenia hydrolityczne i oksydacyjne) (PÄÄBO 1989, LINDAHL 1993). Stabilność pierwszorzędowej struktury DNA (czyli jego sekwencji nukleotydowej) *in vivo* jest głównie zasługą rozbudowanych i sprawnie działających enzymatycznych systemów naprawczych. W przypadku kopalnego DNA systemy te, rzecz jasna, nie funkcjonują. Co więcej, wraz ze śmiercią komórki rozpoczyna się proces fragmentacji DNA przez endonukleazy komórkowe. Dodatkowym czynnikiem mogącym przyspieszać degradację kwasów nukleinowych jest wysoka temperatura. Również niektóre substancje chemiczne używane niekiedy do konserwacji tkanek (np. formalina czy mydło arsenowe), mogą prowadzić do uszkodzeń DNA lub utrudniać jego ekstrakcję. Należy także wspomnieć o szkodliwym wpływie mikroorganizmów. Po pierwsze, mogą one powodować degradację kwasów nukleinowych, a po drugie ich materiał genetyczny

może stanowić źródło kontaminacji. Stabilności struktury pierwszorzędowej aDNA sprzyjają jednak niektóre z substancji naturalnych, np. hydroksyapatyt (w organizmie stanowi przede wszystkim mineralne rusztowanie tkanki łącznej, odpowiedzialnej za mechaniczną wytrzymałość kości), którego adsorpcja dwukrotnie zmniejsza poziom depurynacji. Dzięki temu możliwe jest uzyskiwanie względnie dobrej jakości DNA nawet z kości liczących kilkanaście lub kilkadziesiąt tysięcy lat. Tkanki zakonserwowane w niektórych osadach bagiennych również są cennym źródłem „dobrego” DNA, przede wszystkim dzięki ograniczeniu destrukcyjnego wpływu mikroorganizmów. Co ciekawe, w osadach, głównie torfowych, dobrze przechowują się nie tylko kości, ale także tkanki miękkie. Jednym z przykładów tak zachowanych organizmów jest nosorożec włochaty odkryty w 1929 r. w kopalni wosku ziemnego w Staruni. Szacuje się, że maksymalny czas, jaki kwas dyzoksyrybonukleinowy może przetrwać w geosferze to, w zależności od warunków w jakich znajdowała się próbka, od 50 tysięcy do 1 miliona lat (HEBSGAARD i współaut 2005).

ŹRÓDŁA KOPALNEGO DNA

Kopalny DNA może być pozyskiwany z wielu różnych źródeł. Najczęściej jest on izolowany z kości i zębów. Wiele wskazuje na to, że DNA zachowany w zębach może być lepszej jakości niż w kościach. Chroniące go szkliwo jest najtwardszą i najtrwalszą tkanką zwierzęcą. Kości leżące setki lub tysiące lat w glebie są często zanieczyszczone kwasami nukleinowymi pochodzenia mikroorganicznego, także cząsteczkami naniesionymi np. przez wodę. Szczególnie ten drugi typ zanieczyszczeń jest trudny do wykrycia i może być źródłem fałszywie pozytywnych rezultatów. W przeciwieństwie do kości miazga zębowa chroniona przez szkliwo zachowuje jedynie DNA gospodarza i niektórych mikroorganizmów, które w nim bytowały za życia osobnika. Tę cechę wykorzystano m.in. w badaniach nad bakterią *Yersinia pestis* - zarazka wywołującego dżumę (DRANCOURT i RAOULT 2002). Innym materiałem, który okazał się cennym źródłem aDNA są włosy. DNA w nich zawarty jest chroniony przed degradacją przez warstwę keratyny. W próbkach izolowanych z włosów rzadko stwierdzano kontaminację, pomimo, że włosy narażone były

na kontakt z obcym materiałem genetycznym - zarówno pochodzenia mikroorganicznego, jak i organizmów tego samego gatunku, co badana próbka. Wart podkreślenia jest również fakt, że DNA obcego pochodzenia można stosunkowo łatwo usunąć z włosów (np. przez płukanie w odpowiednich buforach) bez szkody dla materiału genetycznego badanej próbki (GILBERT i współaut. 2004). Potencjalnym źródłem kopalnego DNA mogą być także tkanki miękkie, które zostały zakonserwowane chemicznie, tzw. mumie naturalne (PÄÄBO i współaut. 1988), jak też ciała poddane celowym procesom konserwacji (HIGUCHI i współaut. 1984, PÄÄBO 1985, THOMAS i współaut. 1989). Niezwykle cennym źródłem aDNA o dobrej jakości są tkanki organizmów zachowanych w wiecznej zmarzlinie (HAGELBERG i współaut. 1994). Również odchody zwierząt i ludzi sprzed setek czy nawet tysięcy lat mogą być źródłem materiału genetycznego - zarówno pochodzącego od gospodarza, jak i z niestrawionych resztek jego pokarmu (POINAR i współaut. 1998). Badania takich prób pozwalają z jednej strony uzyskać informacje o sposobie życia bada-

nego osobnika, z drugiej zaś dają spojrzenie na skład gatunkowy flory w odległej przeszłości. Duże nadzieje wiązano z fragmentami tkanek zakonserwowanymi w bursztynie. Książka i film „Jurassic Park” rozbudziły nadzieje na poznanie przynajmniej fragmentów genomów organizmów żyjących w odległych okresach geologicznych. Zakładano, że DNA takich okazów może przetrwać w stosunkowo dobrym stanie, ponieważ jest chronione zarówno przed dostępem tlenu i wody, jak i przed działaniem mikroorganizmów. Niestety, podejmowane do tej pory próby analizy próbek bursztynowych zakończyły się fiaskiem. Prawdopodobnie długi czas przekształcania się żywicy w bursztyn (ponad 5 milionów lat), jak również niektóre składniki żywicy powodują tak duże uszkodzenia DNA, że nie może on być efektywnie badany przy

pomocy dostępnych metod molekularnych (LINDHAL 1997).

W badaniach historycznych i archeologicznych wykorzystuje się nie tylko DNA izolowany bezpośrednio z tkanek, ale także kwas dezoksyrybonukleinowy pochodzący z przedmiotów wytwarzanych przez człowieka: narzędzi, naczyń, książek (BURGER i współaut. 2000). Dzięki wynikom tych badań możemy uzyskać szeroką wiedzę na temat twórców badanych przedmiotów, np. możemy ocenić ich przynależność etniczną, dowiedzieć się jakie uprawiali rośliny i jakie hodowali zwierzęta, jakich sposobów używali by konserwować swoje wyroby. Lista pytań, na które można otrzymać odpowiedzi badając aDNA jest bardzo długa, a naukowcy mają wciąż nowe pomysły.

STRATEGIE ANALIZY aDNA

Badanie aDNA wykonuje się głównie bazując na łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR). Jest to enzymatyczny proces umożliwiający *in vitro* zwielenokrotnienie liczby kopii (amplifikację) wybranych fragmentów DNA. W reakcji tej już z pojedynczej cząsteczki kwasu nukleinowego można otrzymać miliony kopii wybranego fragmentu. Ilość ta jest wystarczająca do przeprowadzenia innych analiz, np.

sekwencjonowania, oceny długości markerów mikrosatelitarnych lub wykrywania tzw. polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (ang. single nucleotide polymorphism, SNP). Najbardziej miarodajne wyniki uzyskuje się poprzez bezpośrednie sekwencjonowanie produktów PCR, bądź klonów tych produktów (RICHARDS i SYKES 1995, POINAR 2003, HEBSGAARD i współaut. 2005, WILLERSLEV i COOPER 2005).

ANALIZOWANE FRAGMENTY aDNA

W badaniach aDNA najczęściej wykorzystywany jest mitochondrialny lub chloroplastowy kwas dezoksyrybonukleinowy. Ze względu na to, że organellowy DNA występuje w komórce w wielu kopiach, a ponadto jest chroniony przed czynnikami degradującymi błoną okrywającą mitochondrium lub chloroplast, jest on zazwyczaj dużo lepiej zachowany niż jądrowy DNA. Najczęściej otrzymywane fragmenty amplifikowanego DNA organellowego mają długość poniżej 200 pz i tylko w wyjątkowych przypadkach udaje się namnożyć fragmenty dłuższe, mające nawet 300 pz. Prawdopodobnie jest to wówczas zasługą wyjątkowo korzystnych warunków środowiskowych, w jakich znajdowały się próbki. Aby uzyskać dłuższą sekwencję należy zaprojektować startery do fragmentów zachodzących na siebie. Tym sposobem można otrzymać sekwencje o łącznej długości

ci przekraczającej nawet 1000pz. Najczęściej analizowane fragmenty mitochondrialnego DNA to region kontrolny, cytochrom *b*, podjednostki rRNA, a ostatnio także oksydaza cytochromowa I (COI) (LAMBERT i współaut. 2005). Jądrowy DNA jest namnażany w postaci jeszcze krótszych fragmentów – ok. 100 pz. W tym przypadku najczęściej analizowanymi sekwencjami są fragmenty chromosomów X i Y u ssaków (CAPELLINI i współaut. 2004) lub W i Z u ptaków, umożliwiające określenie płci badanego osobnika (HYUNEN i współaut. 2003). Jednak w próbkach starszych niż 1000 lat analiza taka może być obciążona dużym błędem, a jej wyniki często są niejednoznaczne (MATHESON i LOY 2001, LARCOMBE i współaut. 2005). Jak zwykle wyjątkiem mogą tu być tkanki zakonserwowane w bardzo niskich temperaturach – w wiecznej zmarzlinie lub w lodowcach. Również

wykorzystanie markerów mikrosatelitarnych jest ograniczone. Te krótkie, liczące zazwyczaj 100–200 pz fragmenty DNA zbudowane są z powtarzających się, krótkich sekwencji np.: CTCTCTCTCTCT lub GACGACGACGAC (gdzie C = cytozyna, T = tymina, G = guanina, A = adenina). Określa się je niekiedy mianem „genetycznego jąkania”. Pomimo, że nie kodują istotnych dla organizmu białek, od lat są intensywnie badane i wykorzystywane, m.in. w kryminalistyce i sądownictwie. Okazało się, że liczba powtórzeń motywu charakterystycznego dla danego markera (liczba „zająknięć”) może bardzo różnić się między poszczególnymi osobnikami. Ta właściwość sprawia, że każda osoba ma swój jedyny i niepowtarzalny obraz DNA zwany „profilem mikrosatelitarnym”. Oznaczając długości wybranych markerów mikrosatelitarnych można bardzo precyzyjnie zidentyfikować daną

osobę, a także określić jej pokrewieństwo z innymi. Metoda ta wykorzystywana jest rutynowo do testowania ojcostwa, a także w badaniach kryminalistycznych. Dla naukowców niezwykle kuszącą perspektywą jest np. możliwość dokładnego określenia pokrewieństwa pomiędzy postaciami historycznymi. Niestety, markery mikrosatelitarne nie zawsze zachowują się w postaci umożliwiającej ich analizę. Do tej pory udało się zamplifikować i oznaczyć długość fragmentów mikrosatelitarnych głównie w próbach nie starszych niż 3000 lat, a i tu wyniki często nie były jednoznaczne (SCHULTES i współaut. 1999, BURGER i współaut. 2000, CLISSON i współaut. 2002). Niemniej jednak ostatnie badania tkanek zakonserwowanych w wiecznej zmarzlinie zapowiadają przesunięcie tej granicy o wiele tysięcy lat wstecz (LYDOLPH i współaut. 2006, ROGAEV i współaut. 2006).

KONTAMINACJA – NIEUSTAJĄCE ŹRÓDŁO PROBLEMÓW

Praca z kopalnym DNA stwarza dużo większe trudności techniczne, niż praca z materiałem współczesnym. Zawartość aDNA w próbce jest bardzo mała, a ponadto jest on najczęściej silnie zdegradowany. Stosowane powszechnie polimerazy dużo łatwiej namnażają nawet niewielkie ilości współczesnego, niezniszczonego DNA niż materiału kopalnego, dlatego szczególnie istotnym zagrożeniem w tego typu badaniach jest zanieczyszczenie współczesnym materiałem genetycznym. Weryfikacja autentyczności otrzymanej sekwencji jest zatem niezbędnym elementem badań kopalnego DNA. Oto główne zasady postępowania przy określaniu autentyczności otrzymanych wyników (wg POINARA 2003, HEBGAARDA i współaut. 2005, WILLERSLEVA i COOPERA 2005):

1. miejsce pracy, w którym prowadzi się analizy aDNA powinno być fizycznie odseparowane od laboratorium, w którym bada się próby współczesne; liczba pracowników mających kontakt z materiałem powinna być ograniczona do niezbędnego minimum;

2. sprzęt laboratoryjny i odczynniki muszą być przeznaczone jedynie do pracy z ma-

teriałem kopalnym; niezbędne jest zachowanie sterylności laboratorium;

3. dla każdej serii izolacji powinna być wykonana kontrola negatywna – poddana takiej samej obróbce jak izolowany materiał, lecz nie zawierająca badanej tkanki;

4. również dla każdej reakcji PCR musi być wykonana kontrola negatywna, wykonywanie kontroli pozytywnej jest niewskazane;

5. amplifikowane sekwencje powinny mieć odpowiednią długość (produkt zazwyczaj w granicach 200 pz, na pewno nie większy niż 1000 pz);

6. produkty PCR, szczególnie aDNA hominidów i mikroorganizmów powinny być klonowane, a następnie przynajmniej kilka klonów dla jednego produktu PCR powinno być poddane sekwencjonowaniu;

7. analizy powinny być powtórzone niezależnie w przynajmniej dwóch różnych ośrodkach badawczych, otrzymane wyniki powinny być zgodne;

8. otrzymane sekwencje powinny mieć sens filogenetyczny.

ODKRYWANIE WYMARŁEGO ŚWIATA

Badanie kopalnego DNA stwarza możliwość dokładniejszego spojrzenia w czasy minione. Możemy niemal dotknąć ewolucji,

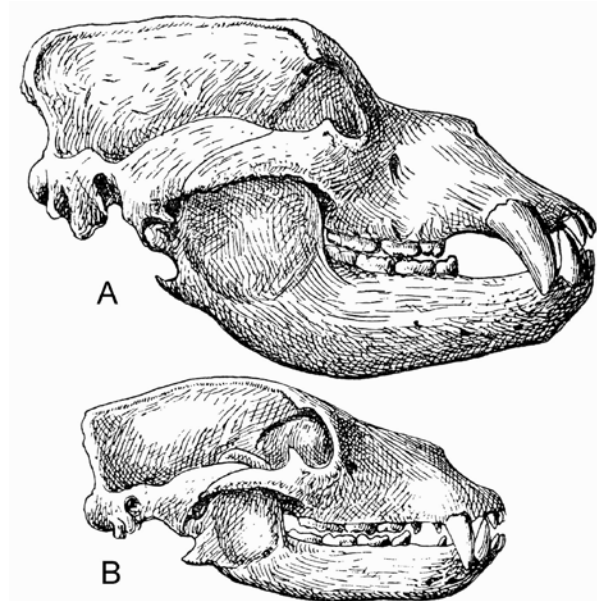
spojrzeć na dawne populacje czy też zbadać wpływ czynników środowiskowych na pojawianie się i znikanie różnych grup or-

ganizmów na Ziemi. Możemy także ocenić wpływ zmian klimatycznych, fragmentacji środowiska czy wreszcie samego człowieka na poszczególne gatunki roślin i zwierząt. Stajemy przed wyzwaniem spojrzenia na własną historię nie tylko przez pryzmat nauk humanistycznych, ale również chłodnego oka genetyki.

Sztandarowe działania genetyków zajmujących się aDNA dotyczą głównie zwierząt z okresu przed ostatnim zlodowaceniem. Tereny, na których obecnie żyjemy, przechodziły w ciągu ostatnich kilkudziesięciu tysięcy lat burzliwe przemiany klimatyczne. Wiązało się to także z dramatyczną przebudową składu fauny na obszarze dzisiejszej Europy. Szczątki tych organizmów od wieków znajdowane były w jaskiniach rozrzuconych na całym kontynencie. Analiza molekularna kości zwierząt z późnego plejstocenu jest dopełnieniem prowadzonych od dziesiątków lat badań paleontologicznych. Stąd też wiele prac dotyczy zwierząt występujących w Eurazji. Przedmiotem badań są m.in. niedźwiedzie jaskiniowe (HOFREITER i współaut. 2002) (Ryc. 1), hieny jaskiniowe (HOFREITER i współaut. 2004) i lwy jaskiniowe (BURGER i współaut. 2004). Wydaje się jednak, że najwięcej informacji dostarczyły przypadkowe, ale na ogromną skalę, znaleziska z Ameryki Północnej. Intensywne wydobywanie złota na Alasce zaowocowało niespodziewanym odkryciem doskonale zakonserwowanych złóż skamieniałości

w okolicach Fairbanks. W latach 1930–1960 z wiecznej zmarzliny wydobyto tam tysiące kości i zębów zwierząt z późnego plejstocenu. Ponad 8 ton okazów paleontologicznych zdeponowano głównie w American Museum of Natural History w Nowym Jorku (SHAPIRO i COOPER 2003). Materiał ten stwarza unikalną możliwość poznania zarówno zależności filogenetycznych pomiędzy poszczególnymi gatunkami, jak i pośrednio na charakterystykę warunków środowiskowych Beringii – pomostu lądowego łączącego w okresach zlodowaceń Azję i Amerykę Północną. Duża ilość dobrej jakości DNA pozwala również na przeprowadzenie analiz populacyjnych i określenie np. zmienności genetycznej badanych populacji, oszacowanie ich liczebności i poziomu migracji (BARNES i współaut. 2002, WILLERSLEV i współaut. 2003).

Niektóre grupy zwierząt wzbudzają wyjątkowe zainteresowanie zarówno badaczy, jak i opinii publicznej. Z pewnością należą do nich przedstawiciele megafauny, szczególnie mamuty. Ci wymarli przedstawiciele Elephantidae zamieszkiwali rozległe tereny Eurazji i Ameryki Północnej, obecnie w dużej części znajdujące się pod wieczną zmarzliną – fakt ten niewątpliwie ułatwił badania DNA tych zwierząt. Już w I połowie lat 90. ubiegłego wieku udało się zsekwencjonować pierwszy fragment cytochromu b czterech mamutów włochatych (*Mammuthus primigenius*) z Syberii, których wiek określono na 9700 – ponad 50 000 lat (HAGELBERG i współaut. 1994, HÖSS i współaut. 1994). W następnych latach publikowano kolejne fragmenty mitochondrialnego DNA (OZAWA i współaut. 1997, DEBRUYNE i współaut. 2002), aż do kompletnej sekwencji liczącej 16842 pz (ROGAEV i współaut. 2006). Analizy te pozwoliły wreszcie odpowiedzieć na pytanie, z którym ze współcześnie żyjących gatunków słoni te wymarłe olbrzymy były najbliższe spokrewnione. Obecnie nie ma już wątpliwości, że były to słonie indyjskie. Z powodzeniem badane są też inne grupy wymarłych ssaków – m.in. jelenie olbrzymie (KUEHN i współaut. 2005), ogromne naziemne leniwce (GREENWOOD i współaut. 2001), przodkowie koniowatych (JANSEN i współaut. 2002, WEINSTOCK i współaut. 2005), lemury olbrzymie (KARANTH i współaut. 2005). Ciekawe wyniki uzyskano w przypadku jednego z ostatnich żyjących przedstawicieli megafauny – pizmowoła (*Ovibos moschatus*). Naturalny zasięg tych ssaków obejmuje obecnie obszary tundry Ameryki Północnej i Grenlandii, chociaż ich



Ryc. 1. Porównanie czaszek (A) niedźwiedzia jaskiniowego (*Ursus spelaeus*) i (B) niedźwiedzia brunatnego (*U. arctos*) (wg ABLA 1920).

szczątki znane są także z Eurazji. Dzisiejsza populacja tych wielkich, doskonale przystosowanych do arktycznych mrozów przeżuwaczy charakteryzuje się bardzo niskim poziomem zmienności genetycznej. Testy materiału genetycznego sprzed 20–40 tysięcy lat wykazały, że po osiągnięciu maksimum przez ostatnie zlodowacenie piżmowoly były bliskie całkowitego wyginięcia. Ich populacja gwałtownie się zmniejszyła i przetrwały jedynie nieliczne osobniki w Nowym Świecie. Dlaczego w czasie, kiedy ginęły ostatnie mamuty piżmowolom, choć z trudem, udało się przetrwać? Oto kolejne frapujące pytanie, które, jak na razie, pozostaje bez odpowiedzi (MACPHEE i współaut. 2005). Wiele gatunków zwierząt wyginęło lub zostało wytępionych przez ludzi już w czasach historycznych. Informacje o nich mieliśmy do tej pory z wykopalisk, niekiedy z rysunków. Kopalny DNA izolowany z ocalałych tkanek tych zwierząt nie daje pełnego wyobrażenia o tym jak wyglądały czy żyły, pozwala jednak umieścić je w konkretnym miejscu na drzewie filogenetycznym. Przynajmniej wiemy, co straciliśmy! Jednym z najdrastyczniejszych przykładów niszczyielskiej działalności człowieka jest wytępienie krowy morskiej (*Hydrodamalis gigas*) – ssaka z rzędu syren, niegdyś zamieszkującego płytkie arktyczne wody Morza Beringa. Bezbronne wobec człowieka, zabijane głównie na mięso i skóry, krowy morskie wyginęły w II połowie XVIII w., zaledwie 27 lat po ich odkryciu. Analiza DNA potwierdziła bezspornie przynależność tego wielkiego ssaka (o masie ciała do 10 ton) do syren i większe podobieństwo genetyczne do diugonia (*Dugong dugon*) niż do manatów (rodzaj *Trichechus*) (OZAWA i współaut. 1997).

Prawdopodobnie najlepiej poznаныmi przedstawicielami wytępionej przez człowieka fauny są strusie moa (Ryc. 2), które występowały na obu wyspach Nowej Zelandii od późnego plejstocenu po holocen. Wszystkie zostały wytępione po zasiedleniu wysp przez ludność polinezyjską już w czasach historycznych. Maorysi upodabali sobie bowiem moa jako atrakcyjne źródło mięsa (HOLDAWAY i JACOMB 2000). Moa zamieszkiwały bardzo różne siedliska i znacznie różniły się wielkością (1–2 m wys. mierzone u nasady szyi, masa ciała ok. 35–250 kg). Początkowo, na podstawie analiz morfologicznych, sugerowano, że na Nowej Zelandii żyło bardzo wiele form tych ptaków – pierwsze prace z XIX w. mówiły nawet o 64 gatunkach. Stopniowo ich liczbę zmniejszono do 38, a następ-

nie do 11. Niemniej jednak analizy aDNA pozwoliły ustalić, że gatunków tych ogromnych strusi było nie więcej niż dziewięć. Powodem tak dużych rozbieżności był niespotykany u innych ptaków dymorfizm płciowy. Samice moa, szczególnie z rodzaju *Dinornis*, były znacznie większe niż samce – osiągały ok. 150% wysokości samców i mniej więcej 280% ich masy ciała (BUNCE i współaut. 2003, HYUNEN i współaut. 2003). Dzięki dostępności dużej ilości stosunkowo „świeżego” materiału (próby nie starsze niż 1000 lat) możliwe było zsekwencjonowanie całego genomu mitochondrialnego moa olbrzymiego *Dinornis* spp. (COOPER i współaut. 2001). Zebrany materiał pozwolił także na przeprowadzenie analizy fragmentów jądrowego DNA z chromosomu W. Pozwoliło to na rozróżnienie płci osobników i ostateczne rozstrzygnięcie kwestii tak dużej zmienności morfologicznej (HYUNEN i współaut. 2003).

Częstym problemem w badaniach paleontologicznych i archeologicznych jest obec-



Ryc. 2. Szkielet moa olbrzymiego (rodzaj *Dinornis*) – dla porównania szkielet człowieka (wg BUICKA 1931).

ność niewielkich fragmentów kości lub też materiałów pochodzących od organizmów bardzo podobnych morfologicznie – z taką sytuacją mamy do czynienia np. w przypadku kóz i owiec, czy też zwierząt domowych i ich dzikich przodków (NEWMAN i współaut. 2002). Możliwość weryfikacji oznaczeń gatunkowych na podstawie badań DNA pozwala na wiarygodną weryfikację rozmaitych hipotez. Właśnie tego typu analizy położyły kres legendzie o nowym gatunku przeżuwaczy w południowo-wschodniej Azji. Na podstawie skąpych materiałów kostnych zbieranych od początku XX w. w 1994 r. opisano zwierzę *Pseudonovibos spiralis*. Przez wiele lat trwały spory, z kim najbliższym jest spokrewniony ten dziwny przeżuwacz. Badania materiału genetycznego wykazały, że znajdowane (głównie na targowiskach) nietypowe rogi nie należały do dzikiego mieszkańca niedostępnej dżungli, ale były zmyślnie spreparowanymi rogami bydła domowego (OLSON i HASSANIN 2003).

Badania aDNA wykorzystywane są także w analizach populacyjnych zwierząt współcześnie żyjących, szczególnie gatunków zagrożonych wyginięciem, np. niedźwiedzia grizzly; dostarczają informacji o poziomie zmienności genetycznej przed dziesiątkami, setkami czy nawet tysiącami lat (HAUSER i współaut. 2002, LAMBERT i współaut. 2002, MACPHEE i współaut. 2005). Dzięki analizie kopalnego DNA można również określić tempo przemian ewolucyjnych pod wpływem zmian klimatycznych (jak w przypadku piżmowola) lub zmian wywołanych w środowisku działalnością człowieka. W szczególnych przypadkach (m.in. u hawajskiej krzyżówki białookiej *Anas laysanensis* czy też u chrząszcza *Cicindela dorsalis dorsalis* z rodziny trzyszczowatych) testy aDNA pozwalają ustalić pierwotny zasięg występowania gatunku, co ułatwia późniejszą reintrodukcję ocalałych osobników (WILLERSLEV i COOPER 2005). Także nasz zespół, wspólnie z naukowcami z Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN w Krakowie oraz Oklahoma State University w Stillwater, dołączył do grona naukowców odkrywających tajemnice kopalnego DNA. Udało nam się wyizolować aDNA z zębów nietoperzy z rodzaju *Myotis* z Jaskini Nietoperzowej z Wyżyny Krakowsko-Częstochowskiej sprzed ponad 800 lat, a następnie zsekwencjonować cały, liczący 1140 nukleotydów gen mitochondrialny – cytochrom b. Zebrane dane pozwoliły odkryć nowy gatunek nietoperza dla Polski. Mamy nadzieję, że

szczegółowe analizy pozwolą nam również odpowiedzieć na szereg pytań dotyczących struktury populacji i migracji tych niezwykle interesujących ssaków (W. Bogdanowicz, M. Gajewska, T. Postawa, R. A. Van Den Bussche dane niepublikowane).

Niemniej jednak chyba najbardziej fascynującą częścią analiz kopalnego materiału genetycznego jest badanie ludzkiego DNA. Nowe horyzonty dla antropologii, archeologii czy historii przyciągają rzesze naukowców. Należy pamiętać, że jest to nie tylko najbardziej frapujący, ale także jeden najtrudniejszych rodzajów analiz genetycznych, ze względu na największą możliwość zanieczyszczenia materiałem współczesnym. Jednym z podstawowych pytań stawianych przez archeologów i antropologów jest pytanie o tempo i kolejność zasiedlania poszczególnych lądów przez *Homo sapiens*. Badania genetyczne są niezwykle pomocne w rozwikłaniu tej zagadki. Co ciekawe, badania te nie tylko obejmują człowieka, ale także zwierzęta, które mu w tych wędrówkach, nie zawsze za jego zgodą, towarzyszyły – analizy DNA pochodzącego ze szczątków szczurów pozwoliły prześledzić drogę kolonizacji wysp Pacyfiku (MATISOO-SMITH i ROBINS 2004). Badania aDNA umożliwiają także lepsze poznanie i zrozumienie antycznych kultur, m.in. Etrusków (CAPELLINI i współaut. 2004), Indian prekolumbijskich (JONES 2003), mieszkańców Wysp Andamańskich (ENDICOTT i współaut. 2003) i aborygenów z Australii (ADCOCK i współaut. 2001), dostarczają informacji o strukturze ludności i jej migracjach, powstawaniu i ewolucji języków, a nawet przyczynach i zasięgu chorób zakaźnych takich jak dżuma czy trąd (COOPER i WAYNE 1998). Jednymi z pierwszych prac poświęconych aDNA były badania mumii ze starożytnego Egiptu (PÄÄBO 1985). Mumifikacja szczątków stwarza dobre warunki do przetrwania fragmentów DNA o stosunkowo dobrej jakości. Polska archeologia ma ogromne osiągnięcia w odkrywaniu tajemnic Doliny Nilu, zatem pomysł interdyscyplinarnych badań na bazie materiałów ze starożytnego Egiptu był jedynie kwestią czasu. W analizy genetyczne staroegipskich mumii włączyli się naukowcy z Collegium Medicum w Bydgoszczy. Zsekwencjonowali oni fragment mitochondrialnego aDNA mumii kapłanki Izydy, znanej jako Aset-iri-khet-es, z nekropoli w el-Gamhud, a znajdującej się w Muzeum Archeologicznym w Krakowie. W badanym materiale udało się wykryć mutację stwierdzaną także współcześnie u mieszkańców Środka-

wego Wschodu, co z jednej strony pozwoliło na potwierdzenie przynależności etnicznej kapłanki, zaś z drugiej wskazało na bardzo dawne pochodzenie zaobserwowanej zmiany w DNA (GRZYBOWSKI i współaut. 2001). Coraz intensywniej rozwijają się także analizy z pogranicza kryminalistyki i archeologii, mające na celu identyfikację konkretnych osób. Najbardziej spektakularną była chyba identyfikacja na podstawie DNA ostatniego cara Rosji – Mikołaja II i jego rodziny (GILL i współaut. 1994). Analizy molekularne wykorzystano także w poszukiwaniach szczątków innych postaci historycznych – członków francuskiej rodziny królewskiej (JEHAES i współaut. 2001), włoskich rodów książęcych, a nawet Świętego Łukasza (VERNESI i współaut. 2001). Na weryfikację czekają szczątki kolejnych po-

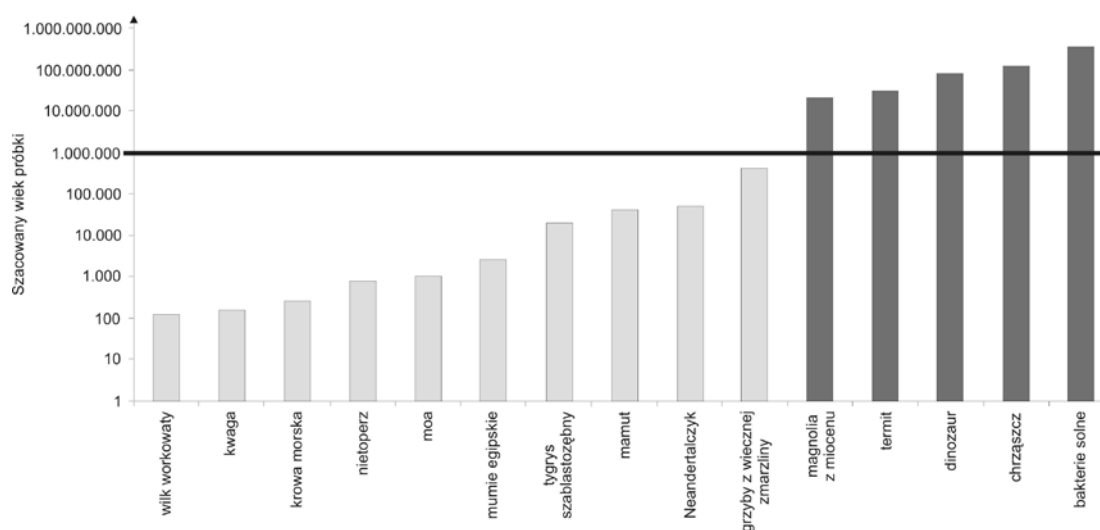
staci historycznych – m.in. odkryte niedawno w Katedrze Fromborskiej kości, należące najprawdopodobniej do Mikołaja Kopernika.

Badania genetyczne innych hominidów – przede wszystkim Neandertalczyka (*Homo neanderthalensis*), pozwalają również coraz dokładniej zbadać przeszłość *Homo sapiens*. Wiemy już z prac wykopaliskowych, że nie zawsze byliśmy jedynym rozumnym gatunkiem na naszej planecie. Niemniej jednak dopiero analizy aDNA u *H. neanderthalensis* dostarczyły niezbitych dowodów na to, że te dwie grupy hominidów nie krzyżowały się ze sobą, pomimo faktu, że występowały w tym samym czasie i w tych samych rejonach globu (SERRE i współaut. 2004). Dlaczego tak się działo? To pytanie pozostaje na razie bez jednoznacznej odpowiedzi.

NAJWIĘKSZE POMYŁKI

Historia badań aDNA to niekiedy historia sukcesów, które przeradzały się w klęskę. Przyczyną była zazwyczaj kontaminacja współczesnym materiałem genetycznym, do której dochodziło na skutek niezachowania odpowiedniego reżimu laboratoryjnego. Pierwsze sukcesy w analizie kopalnego DNA rozbudziły nie tylko marzenia badaczy, ale i żądzę sukcesu, chęć bycia tym, który odsłoni najstarszy fragment z historii życia na Ziemi. Prace publikowane w najlepszych czasopismach naukowych w I połowie lat 90. ubiegłego wieku donosiły o poznaniu sekwencji

coraz to starszych organizmów. Niestety, wszystkie wyniki dla prób starszych niż milion lat okazały się nieprawdziwe (Ryc. 3). W 1994 r. prestiżowe „Science” doniosło o zsekwencjonowaniu fragmentu DNA pochodzącego z kości dinozaura znalezionej w kopalni w USA (WOODWARD i współaut. 1994). Dość szybko jednak badany materiał okazał się być DNA pochodzącym od człowieka. Kompletnym fiaskiem zakończyły się badania owadów zakonserwowanych w bursztynie. Wyniki podane w równie prestiżowym „Nature” w 1993 r. jako licząca ok. 130 mi-



Ryc. 3. Porównanie wieku wybranych próbek, z których wyizolowano aDNA.

Ciemniejszym kolorem oznaczono próby, których wyniki zostały zakwestionowane. Grubą linią zaznaczono wiek 1 miliona lat – szacowany maksymalny okres przetrwania DNA w materiałach kopalnych.

lionów lat sekwencja chrząszcza z bursztynu libańskiego (CANO i współaut. 1993), to wynik zanieczyszczenia materiałem genetycznym współczesnych grzybów. Inne, „dużo” młodsze sekwencje owadów zamkniętych w bursztynie (szacowane na 20-40 milionów lat) także okazały się artefaktami. Również w przypadku roślin dochodziło do istotnych pomyłek. Sekwencja opisywana jako należąca do magnolii sprzed 20 milionów lat (GOLEMBERG i współaut. 1990) okazała się artefaktem, prawdopodobnie mikrobiologicznego pochodzenia. Także badania DNA izolowanego z kryształów halitu, a przypisywanego mikroorganizmom sprzed 250–415 milionów

lat (VREELAND i współaut. 2000) wzbudzają więcej głosów krytyki niż aprobaty. Kwestionuje się zarówno datowanie minerałów, jak i powtarzalność wyników, zastrzeżenia budzi także podobieństwo otrzymanych sekwencji do współczesnych organizmów (HEBSGAARD i współaut. 2005). Nie tylko bardzo stare próbki mogą być źródłem problemów. Zanim wykazano, że mityczny *Pseudonovibos spiralis* nie istnieje, na skutek zanieczyszczenia prób materiałem od różnych przeżuwaczy, opisywano go (w zależności od tego, czym była zanieczyszczona próbka) jako bliżej spokrewnionego z kozami lub bawołami (OLSON i HASSANIN 2003).

CO DALEJ Z aDNA?

Należy spodziewać się, że badania aDNA będą prowadzone na coraz szerszą skalę. Analizy materiału genetycznego zachowanego w pokrytych wiecznym lodem terenach Ameryki Północnej i Eurazji dostarczą nam z informacji o faunie i florze sprzed tysięcy lat, pozwolą prześledzić procesy ewolucyjne, migracje organizmów między Starym i Nowym Światem, być może ułatwią zrozumienie pojawiania się i znikania gatunków (LYDOLPH i współaut. 2006). Co rok do grona wielkich lub małych nieobecnych dołączają nowe gatunki roślin i zwierząt. Z niecierpliwością oczekiwane są wyniki badań aDNA odkrytych niedawno szczątków *Homo floresiensis* – hominida, wielkości Tolkienowskiego hobbita, który jeszcze kilkanaście tysięcy lat temu żył na indonezyjskiej wyspie Flores. Wraz z pojawianiem się nowych metod genetyki molekularnej możemy oczekiwać coraz dokładniejszych i precyzyjniejszych rezultatów. Prace opublikowane w ostatnich miesiącach donoszą np. o przeanalizowaniu 28 milionów (!) nukleotydów sekwencji jądrowego DNA mamuta włochatego. Stało się to możliwe dzięki zastosowaniu nowych technik namnażania i sekwencjonowania materiału genetycznego (POINAR i współaut. 2006). Czy zatem możemy oczekiwać prawdziwego „Parku Jurańskiego”? Jest to raczej mało prawdopodobne, biorąc pod uwagę, że wielkość całego genomu

ssaka to kilka miliardów nukleotydów. Nie należy liczyć na to, że w najbliższym czasie pojawia się stada mamutów ani tym bardziej dinozaurów stworzonych czy to na potrzeby turystów, czy też naukowców. Ale jedno jest pewne. Będziemy coraz lepiej poznawać przeszłość naszego, a może i nie tylko naszego świata. Pierwszym ciałem niebieskim, z którego materiały zostaną prawdopodobnie zbadane w ten sposób, będzie Mars (WILLERSLEV i COOPER 2005). Niskie temperatury panujące na tej planecie i sugerowana obecność wody, przynajmniej w minionych okresach geologicznych, dają szansę na znalezienie tam śladów życia, być może przypominającego ziemskie. Oczywiście procedury weryfikacji autentyczności takich wyników muszą być jeszcze ostrzejsze niż w przypadku prób ziemskiego pochodzenia. Badanie odległych ciał niebieskich to na razie sprawa przyszłości, jednak już dziś procedury opracowane na potrzeby kopalnego DNA znajdują praktyczne zastosowanie. Nasze laboratorium stosuje je m.in. w badaniu okazów muzealnych, a także wyrobów i produktów biologicznych nieznanego pochodzenia, np. zatrzymanych przez służby celne. Nie ulega wątpliwości, że analizy kopalnego DNA są coraz cenniejszym narzędziem w rękach naukowców i tylko pomysłowość badaczy jest granicą dla ich zastosowania.

ANCIENT DNA – LESSON FROM THE PAST

Summary

Under certain conditions small amounts of DNA can survive for long periods of time and may be

used as substrates in the polymerase chain reaction (PCR) for the study of phylogeny and population ge-

netics of extinct animals and plants. About 20 years ago, DNA sequences were separately described from the quagga and an ancient Egyptian individual; what made these DNA sequences exceptional was that they were derived from 140- and 2,400-year-old specimens. More recently, ancient DNA (aDNA) has been used to study phylogenetic relationships of protists, fungi, algae, plants, and higher eukaryotes such as extinct horses, cave bears, woolly mammoths, the moa, and Neanderthal. In the past few years, this approach has been extended to the study of infectious disease in ancient mummies from Egypt and South America; they suggested a butchery pattern indicative of a human population under resource stress, revealed dietary habits of ancient animals, and helped to understand how climatic change

impacts biological diversity. However, the field of aDNA is still regularly marred by erroneous reports, which underestimate the extent of contamination within laboratories and samples themselves. Deeper understanding of these processes and the effects of damage on aDNA templates has started to provide a more robust basis for research. DNA sequencing of the entire mitochondrial cytochrome b of *Myotis myotis sensu lato* in our molecular laboratory allowed the comparison of aDNA sequences (dating back to ca. 830 years BP) with those of modern bats to assess their genetic relationships. Initial results have revealed surprisingly complex population histories, and indicate that modern studies may give misleading impressions about even the recent evolutionary past.

LITERATURA

- ABEL O., 1920. *Lehrbuch der Paläozoologie*. Verlag von Gustav Fischer, Jena.
- ADCOCK G. J., DENNIS E. S., EASTEAL S., HUTTLEY G. A., JERMIIN L. S., PEACOCK J., THORNE A., 2001. *Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: Implication for modern human origins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 537–542.
- BARNES I., MATHEUS P., SHAPIRO B., JENSEN D., COOPER A., 2002. *Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears*. Science 295, 2267–2270.
- BUICK T. L., 1931. *The mystery of the moa*. Thomas Avery & Sons Ltd., New Plymouth, New Zealand.
- BUNCE M., WORTHY T. H., FORD T., HOPPITT W., WILLERSLEV E., DRUMMOND A., COOPER A., 2003. *Extreme reserved sexual size dimorphism in the extinct New Zealand moa Dinornis*. Nature 425, 172–175.
- BURGER J., HUMMEL S., HERRMANN B., 2000. *Palaeogenetics and cultural heritage. Species determination and STR-genotyping from ancient DNA in art and artifacts*. Thermochim. Acta 365, 141–146.
- BURGER J., ROSENDAHL W., LOREILLE O., HEMMER H., ERIKSSON T., GÖTHERSTRÖM A., HILLER J., COLLINS M., WESS T., ALT K. W., 2004. *Molecular phylogeny of the extinct cave lion Panthera leo spelaea*. Mol. Phylogenet. Evol. 30, 841–849.
- CANO R. J., POINAR H. N., PIENIAZEK N.J., ACRA A., POINAR G. O. JR., 1993. *Amplification and sequencing of DNA from a 120–135-million-year-old weevil*. Nature 363, 536–538.
- CAPELLINI E., CHIARELLI B., SINEO L., CASOLI A., DI GIOIA A., VERNESI C., BIELLA M. C., CARAMELLI D., 2004. *Biomolecular study of the human remains from tomb 5859 in the Etruscan necropolis of Monterozzi, Tarquinia (Viterbo, Italy)*. J. Archeol. Sci. 31, 603–612.
- CLISSON I., KEYSER C., FRANCFORT H. P., CRUBEZY E., SAMASHEV Z., LUDS B., 2002. *Genetic analysis of human remains from a double inhumation in a frozen kurgan in Kazakhstan (Berel site, Early 3rd Century BC)*. Int. J. Legal. Med. 116, 304–308.
- COOPER A., WAYNE R., 1998. *New uses for old DNA*. Curr. Opin. Biotechnol. 9, 49–53.
- COOPER A., LALUEZA-FOX C., ANDERSON S., RAMBAUT A., AUSTIN J., WARD R., 2001. *Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution*. Nature 409, 704–707.
- DEBRUYNE R., BARRIEL V., TASSY P., 2002. *Mitochondrial cytochrome b of the Lyakhov mammoth (Proboscidea, Mammalia): new data and phylogenetic analyses of Elephantidae*. Mol. Phylogenet. Evol. 26, 421–434.
- DRANCOURT M., RAOULT D., 2002. *Molecular insights into the history of plague*. Microbes Infect. 4, 105–109.
- ENDICOTT P., GILBERT T. P., STRINGER C., LALUEZA-FOX C., WILLERSLEV E., HANSEN A. J., COOPER A., 2003. *The genetic origin of the Andaman Islanders*. Am. J. Hum. Genet. 72, 178–184.
- GILBERT M. T. P., WILSON A. S., BUNCE M., HANSEN A. J., WILLERSLEV E., SHAPIRO B., HIGHAM T. F. G., RICHARDS M. P., O'CONNELL T. C., TOBIN D. J., JANAWAY R. C., COOPER A., 2004. *Ancient mitochondrial DNA from hair*. Curr. Biol. 14, 463–464.
- GILL P., IVANOV P. L., KIMPTON C., PIERCY R., BENSON N., TULLY G., EVETT I., HAGELBERG E., SULLIVAN K., 1994. *Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis*. Nat. Genet. 6, 130–135.
- GOLENBERG E. M., GIANNASI D. E., CLEGG M. T., SMILEY C. J., DURBIN M., HENDERSON D., ZURAWSKI G., 1990. *Chloroplast DNA sequence from a Miocene Magnolia species*. Nature 344, 656–658.
- GREENWOOD A. D., CASTRESANA J., FELDMAIER-FUCHS G., PÄÄBO S., 2001. *A molecular phylogeny of two extinct sloths*. Mol. Phylogenet. Evol. 18, 94–103.
- GRZYBOWSKI T., CZARNY J., WOŹNIAK M., MIŚCICKA-SŁIWKA D., 2001. *Sequencing of mtDNA region V from a 2300 years old Egyptian mummy*. [W:] *Mummy. Results of interdisciplinary examination of the Egyptian mummy of Aset-iri-khetes from the Archeological Museum in Cracow*. Polish Academy of Arts and Sciences, Kraków, 117–126.
- HAGELBERG E., THOMAS M.G., COOK C. E. JR., SHER A. V., BARYSHNIKOV G. F., LISTER A. M., 1994. *DNA from ancient mammoth bones*. Nature 370, 333–334.
- HAUSER L., ADCOCK G. J., SMITH P. J., BERNAL RAMIREZ J. H., CARVALLO G. R., 2002. *Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (Pagrus auratus)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 11742–11747.
- HEBSGAARD M. B., PHILLIPS M. J., WILLERSLEV E., 2005. *Geologically ancient DNA: fact or artefact?* Trends in Microbiol. 13, 212–220.
- 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.
- HOFREITER M., CAPELLI C., KRINGS M., WAITS L., CONNARD N., MÜNZEL S., RABEDER G., NAGEL D., PAU-

- NOVIC M., JAMBR SIĆ G., MEYER S., WEISS G., PÄÄBO S., 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., SERRE D., ROHLAND N., RABEDER G., NAGEL D., CONARD N., MÜNDEL S., PÄÄBO S., 2004. *Lack of phylogeography in European mammals before the last glaciation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 12963–12968.
- HOLDAWAY R. N., JACOMB C., 2000. *Rapid extinction of the moas (aves: Dinornithiformes): model, test, and implications*. Science 287, 2250–2254.
- HÖSS M., PÄÄBO S., VERESHCHAGIN N. K., 1994. *Mammoth DNA sequences*. Nature 370, 333.
- HYUNEN L., MILLAR C. D., SCIFIELD R. P., LAMBERT D. M., 2003. *Nuclear DNA sequences detect species limits in ancient moa*. Nature 425, 175–178.
- JANSEN T., FORSTER P., LEVINE M. P., OELKE H., HURLES M., RENFREW C., WEBER J., OLEK K., 2002. *Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 10905–10910.
- JEHAES E., TOPRAK K., VANDERHYEDEN N., PFEIFFER H., CASSIMAN J. J., BRINKMANN B., DECORTE R., 2001. *Pitfalls in the analysis of mitochondrial DNA from ancient specimens and the consequences for forensic DNA analysis: the historical case of the putative heart of Louis XVII*. Int. J. Legal. Med. 115, 135–141.
- JONES M., 2003. *Ancient DNA in pre-Columbian archaeology: a review*. J. Arch. Sci. 30, 629–635.
- KARANTH K. P., DELEFOSSE T., RAKOTOSAMIMANANA B., PARSONS T. J., YODER A. D., 2005. *Ancient DNA from giant extinct lemurs confirms single origin of Malagasy primates*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 5090–5095.
- KUEHN R., LUDT C. J., SCHROEDER W., ROTTMANN O., 2005. *Molecular phylogeny of Megaloceros giganteus - the giant deer or just a giant red deer?* Zool. Sci. 22, 1031–1044.
- LAMBERT D. M., RITCHIE P. A., MILLAR C. D., HOLLAND B., DRUMMOND A. J., BARONI C., 2002. *Rates of evolution in ancient DNA from Adelie penguins*. Nature 295, 2270–2273.
- LAMBERT D. M., BAKER A., HUYNEN L., HADDATH O., HERBERT P. D. H., MILLAR C. D., 2005. *Is a large scale DNA-based inventory of ancient life possible?* J. Heredity 96, 1–6.
- LARCOMBE L. A., NICKERSON P., HOPPA R. D., MATHE-SON C., 2005. *Detection of a single nucleotide polymorphism in the IL-6 promoter region of ancient nuclear DNA*. Infect. Genet. Evol. 5, 117–22.
- LINDAHL T., 1993. *Instability and decay of the primary structure of DNA*. Nature 362, 709–715.
- LINDAHL T., 1997. *Facts and artifacts of ancient DNA*. Cell 90, 1–3.
- LYDOLPH M. C., JACOBSEN J., ARCTANDER P., GILBERT M. T. P., GILICHINSKY D. A., HANSEN A. J., WILLER-SLEV E., LANGE L., 2006. *Beringian paleoecology inferred from permafrost-preserved fungal DNA*. Appl. Env. Microbiol. 71, 1012–1017.
- MACPHEE R. D. L., TIKHONOV A. N., MOL D., GREENWOOD A. D., 2005. *Late Quaternary loss of genetic diversity in muskox (Ovibos)*. BMC Evol. Biol., 5, 49.
- MATHESON C. D., LOY T. H., 2001. *Genetic sex identification of 9400-year-old human skull samples from Çayönü Tepesi, Turkey*. J. Arch. Sci. 28, 569–575.
- MATISOO-SMITH E., ROBINS J. H., 2004. *Origins and dispersal of Pacific peoples: Evidence from mtDNA phylogenies of the Pacific rat*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 9167–9172.
- NEWMAN M. E., PARBOOSINGH J. S., BRIDGE P. J., CERI H., 2002. *Identification of archeological animal bone by PCR/DNA analysis*. J. Arch. Sci. 29, 77–84.
- OLSON L. E., HASSANIN A., 2003. *Contamination and chimerism are perpetuating the legend of the snake-eating cow with twisted horns (Pseudonovibos spiralis). A case of study of the pitfalls of ancient DNA*. Mol. Phylogenet. Evol. 27, 545–548.
- OVCHINNIKOV I. V., GÖTHERSTRÖM A., ROMANOVA G. P., KHARITONOV V. M., LIDÉN K., GOODWIN W., 2000. *Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus*. Nature 404, 490–493.
- OZAWA T., HAYASHI S., MIKHELSON V. M., 1997. *Phylogenetic position of mammoth and Steller's sea cow with Tethytheria demonstrated by mitochondrial DNA sequences*. J. Mol. Evol. 44, 406–413.
- PÄÄBO S., 1985. *Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA*. Nature 314, 644–645.
- PÄÄBO S., 1989. *Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1939–1943.
- PÄÄBO S., GIFFORD J. A., WILSON A. C., 1988. *Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain*. Nucl. Acid Res. 16, 9775–9787.
- POINAR H. N., 2003. *The top 10 list: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples*. Intern. Congress Ser. 1239, 575–579.
- POINAR H. N., HOFREITER M., SPAULDING W. G., MARTIN P. S., STANKIEWICZ B. A., BLAND H., EVERSHERD R. P., POSSNERT G., PÄÄBO S., 1998. *Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth Nothotheriops shastensis*. Science 281, 402–406.
- POINAR H. N., SCHWARZ C., QI J., SHAPIRO B., MACPHEE R. D., BUIGUES B., TIKHONOV A., HUSON D. H., TOMSHO L. P., AUCH A., RAMPP M., MILLER W., SCHUSTER S. C., 2006. *Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA*. Science 311, 392–394.
- RICHARDS M. B., SYKES B. C., 1995. *Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains*. J. Arch. Sci. 22, 291–299.
- ROGAEV E. I., MOLIKA Y. K., MALYARCHUK B. A., KONDRASHOV F. A., DERENKO M. V., CHUMAKOV I., GRIGORENKO A. P., 2006. *Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene mammoth Mammothus primigenius*. PLOS Biology 4, 0001–0007.
- SCHULTES T., HUMMEL S., HERRMANN B., 1999. *Amplification of Y chromosomal STRs from ancient skeletal material*. Hum. Genet. 104, 164–166.
- SERRE D., LANGANEY A., CHECH M., TESCHLER-NICOLA M., PAUNOVIC M., MENNECIER P., HOFREITER M., POSSNERT G., PÄÄBO S., 2004. *No evidence of Neanderthal mtDNA contribution to Early Modern Humans*. PLOS Biology 2, 313–317.
- SHAPIRO B., COOPER A., 2003. *Beringia as an Ice Age genetic museum*. Quaternary Res. 60, 94–100.
- THOMAS R. H., SCHAFFNER W., WILSON A. C., PÄÄBO S., 1989. *DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf*. Nature 340, 465–467.
- VERNESI C., DI BENEDETTO G., CARAMELLI D., SECCHIERI E., SIMONI L., KATTI E., MALASPINA P., NOVELETTO A., MARIN V. T. W., BARBUJANI G., 2001. *Genetic characterization of the body attributed to the evangelist Luke*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 13460–13463.
- VREELAND R. H., ROSENZWEIG W. D., POWERS D. W., 2000. *Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal*. Nature 407, 897–900.

- WEINSTOCK J., WILLERSLEV E., SHER A., TONG W., HO S. Y. W., RUBENSTEIN D., STORER J., BURNS J., MARTIN L., BRAVI C., PRIETO A., FROESE D., SCOTT E., XU-LONG L., 2005. *Evolution, systematics, and phylogeography of Pleistocene horses in the new world: A molecular perspective*. PLOS Biol. 3 (8), e241.
- WILLERSLEV E., COOPER A., 2005. *Ancient DNA*. Proc. R. Soc. London, B 272, 3–16.
- WILLERSLEV E., HANSEN A.J., CHRISTENSEN B., STEFFENSEN J. P., ARCTANDER P., 1999. *Diversity of Holocene life forms in fossil glacier ice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 8017–8021.
- WILLERSLEV E., HANSEN A. J., BINLADEN J., BRAND T. B., SHAPIRO B., BUNCE M., WIUF C., GILICHINSKY D. A., COOPER A., 2003. *Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleisocene sediments*. Science 300, 791–795.
- WOODWARD S. R., WEYAND N. J., BUNNELL M., 1994. *DNA sequence from Cretaceous Period bone fragments*. Science 266, 1229–1232.