

## GENETIKA I ARHEOLOGIJA - MOGUĆNOSTI INTERDISCIPLINARNOG POVEZIVANJA

UDK 902

Primljeno/Received: 1997.10.29.

Prihvaćeno/Accepted: 1997.12.15.

Marcel Burić  
HR-10000 Zagreb, Hrvatska  
Trnsko 1e  
E-mail: mburic@ffzg.hr

*Rad u prvom dijelu donosi osnovne pojmove o DNA molekuli, a u drugom o njenim mogućnostima u arheologiji uz neke primjere dosadašnje primjene u svijetu. Također su prikazani glavni problemi samog očuvanja potencijalnog materijala i metodologije njegova izoliranja.*

*Glavne riječi: molekula DNA, arheologija, analiza, PCR*

Od početka živog svijeta malo je stvari u njemu ostalo toliko nepromijenjeno kao DNA molekula. Kao što je u svijetu fizike atom najmanja čestica, tako je ona najmanja čestica koja u cijelosti predstavlja nas same. Ta čudesna malena nit koja se može preciznim tehnikama ekstrakcije vidjeti golim okom, (slika 1)<sup>1</sup> sadrži podatke o svakome od nas: boji očiju, kose, fizičkoj građi, nasljednim bolestima, podrijetlu svake osobe, ali i čovječanstva u cijelosti. Istovremeno je prvi i najveći "izum" koji je živa priroda ikada izumila. Da bismo što bolje razradili temu naznačenu u naslovu, konzultirat ćemo područja drugih znanosti, ponajprije genetiku.

Otkako je čovjek postao svjestan prirode i utemeljio prirodne znanosti, jedno od temeljnih pitanja bilo je kako je Zemlja, nekoć pusta i beživotna, buknila životom koji danas buja na njoj? Kako je, kada se pojavila jedna vrsta života, iz njega nastala druga? Kako je ni iz čega nastalo nešto?

Carl Sagan, jedan od velikih znanstvenika današnjice poznat po svojoj multidisciplinarnosti, o tome nam je govorio ovako: "... Zemlja se zgusnula iz međuzvijezdanog plina i prašine prije nekih četiri i pol milijarde godina. Na osnovi fosilnih tragova znamo da se život rodio ubrzo nakon toga, prije

otprilike četiri milijarde godina u jezerima i morima pradavne Zemlje... U tim ranim danima, munje i ultraljubičasto zračenje razlagali su jednostavne, vodikom bogate molekule praatmosfere, a ti su se dijelovi zatim spontano rekombinirali u sve složenije molekule. Proizvodi ove rane kemije otapali su se u oceanima, tvoreći "organsku juhu" sve veće složenosti, sve dok jednog dana, potpuno slučajno, nije nastala takva molekula koja je bila u stanju raditi grube kopije same sebe upotrebljavajući kao građevni materijal ostale molekule u juhi. Ona je najdavniji predak DNA molekule - gospodarice života na Zemlji." (Sagan 1983.).

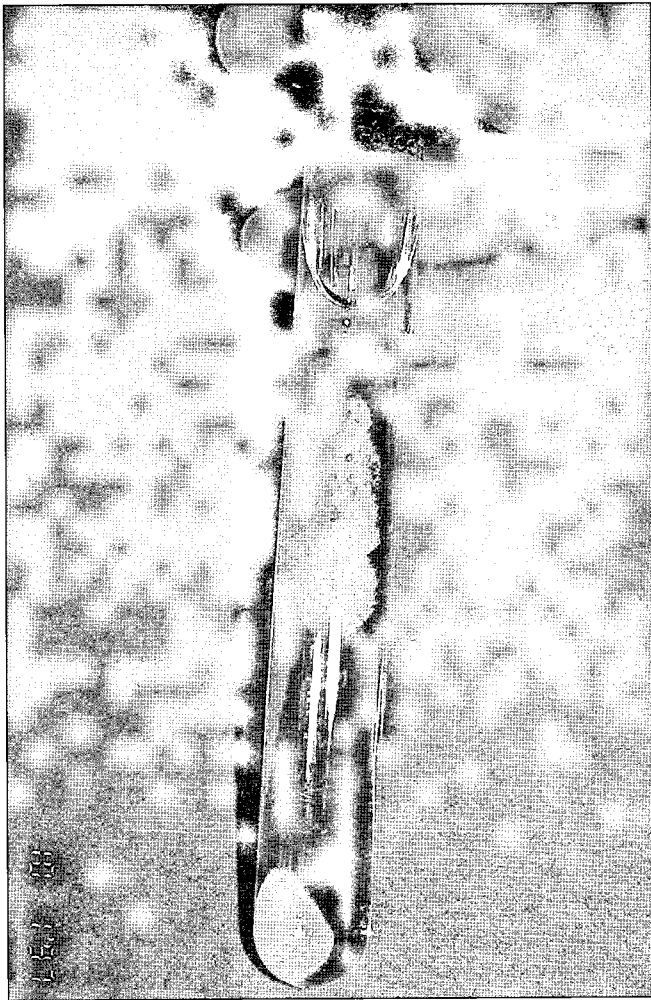
Iz ovog uvoda može se postaviti pitanje jesu li onda npr. američka sekvoja i aboridžin iz Australije vrlo, vrlo udaljeni rodaci. Ma kako čudno to bilo, odgovor je da!

O čemu je zapravo riječ?

Glavni je lik u cijeloj priči jedna od nukleinskih kiselina: *deoksiribonukleinska kiselina* - (engl. DNA-DeoxyriboNucleic Acid), poznata kao nositelj nasljednih osobina. Otkrio ju je švicarski bio-kemičar Mischer. Pored njega, dva najznačajnija istraživača DNA

---

<sup>1</sup> Susretljivošću DNA laboratorija, Zavoda za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 1

molekule (iz tog ranijeg razdoblja), su James Watson i Francis Crick. Uskladišći podatke kemijskih analiza i rentgenskih istraživanja te na temelju ostalih rezultata predložili su "trodimenzionalni model DNA molekule" koji je po njima nazvan Watson-Crickov lanac (slika 2), a za koji su obojica dobili i Nobelovu nagradu. Biološka funkcija molekule razjašnjena je kada su pokusi pokazali da *Drosophila Melanogaster*, (vinska mušica ili doslovno *crnotijelac ljubitelj rose*), nakon što je izložena difrakciji rentgenskih zraka, nije u sposobnosti reproducirati enzim neophodan za razmnožavanje.

DNA spada u najveće organske molekule i čini osnovnu strukturu svake žive stanice svih živih bića. Sjedište joj je u stanici, odnosno na kromosomima, koji se pak nalaze u citoplazmi. Sastavljena je od velikog broja jednostavnijih molekula-nukleotida, velike molekularne težine, koji se nalaze na dvije spiralno uvijene paralelne niti, te vodikovih veza koje ih međusobno spajaju (Watson-Crickov model). Svaka molekula sadrži jednu purinsku bazu adenin i gvanin te pirimidinsku bazu citozin i timin, uz po jednu molekulu šećera deoksiriboze i fosforne kiseline, dakle ukupno četiri različita nukleotidna oblika koja čine četiri "slova" genetskog koda. Upravo kombinacije spomenuta četiri nukleotida daju sve oblike života.

Dakle, svaki živi organizam ima drukčiji redoslijed slova, ali ispisan istim jezikom. Međutim, ne samo da se DNA replicira u samu sebe, nego se jezik baza precizno prenosi u jezik aminokiselina. Time dolazi do prijenosa informacija između, za živi svijet, ključnih molekula. Njen nastanak i reprodukcija označavaju početak života svake jedinice i unose u nju osobine roditelja. Gledano kroz prizmu reprodukcije, to izgleda ovako: pri spajanju muška i ženska spolna stanica nose svoju polovicu genetskog koda buduće jedinice. Kako čovjek ima 23 pari kromosoma, broj kromosoma koje daje svaki roditelj je 23. Svaki par ima dva kromosoma sastavljena od po jednog u obliku slova X i jednog u obliku Y. Par kromosoma koji daje otac, sadrži X i Y, a koji daje majka dva X kromosoma. Embrij će naslijediti po jedan od svakog roditelja; ako su to dva X, spol će biti ženski, a ako su X i Y, bit će muški. Na sličan se način određuje boja očiju, visina, eventualne nasljedne bolesti itd. Broj mogućih genetskih kombinacija može se prikazati formulom:  $2$  na dvadeset treću puta  $2$  na dvadeset treću jednako otprilike 70 000 000 000 000 kombinacija. (Wenke 1990.). Možemo navesti još jedan sasvim suprotan primjer. Na jednom od kromosoma u ljudskoj stanici postoji jedan gen nazvan p53. Zadaća mu je da kontrolira stvaranje novih stanica koje započinju reduplikacijom DNA. Ako u procesu dođe do nekontroliranog rasta broja tih stanica, odnosno nekontroliranog redupliciranja DNA, p53 uništava tu "bolesnu" molekulu i zaustavlja proces. Na taj način jedan segment jedne molekule kontrolira nastanak druge molekule. Međutim, može se dogoditi da p53 ne obavi svoju zadaću uslijed njegove oštećenosti ili mutacije. Tada dolazi do uništenja stanice. Taj proces započet u jednoj stanici može dovesti i do smrti cijeloga organizma. DNA ima izuzetnu moć - stvara život, ali ga može i uništiti. Ovdje nam se onda nameće jedno pitanje: zašto je baš DNA dobila ovako važnu ulogu u evoluciji? Odgovor nalazimo u semikonzervativnoj replikaciji DNA koja se ostvaruje preciznošću manjom od deset na minus desetu pogrešaka po sintezi, što nije karakteristika niti jedne druge molekule. Ova točnost učinila je upravo nju "bazom podataka" evolucije.

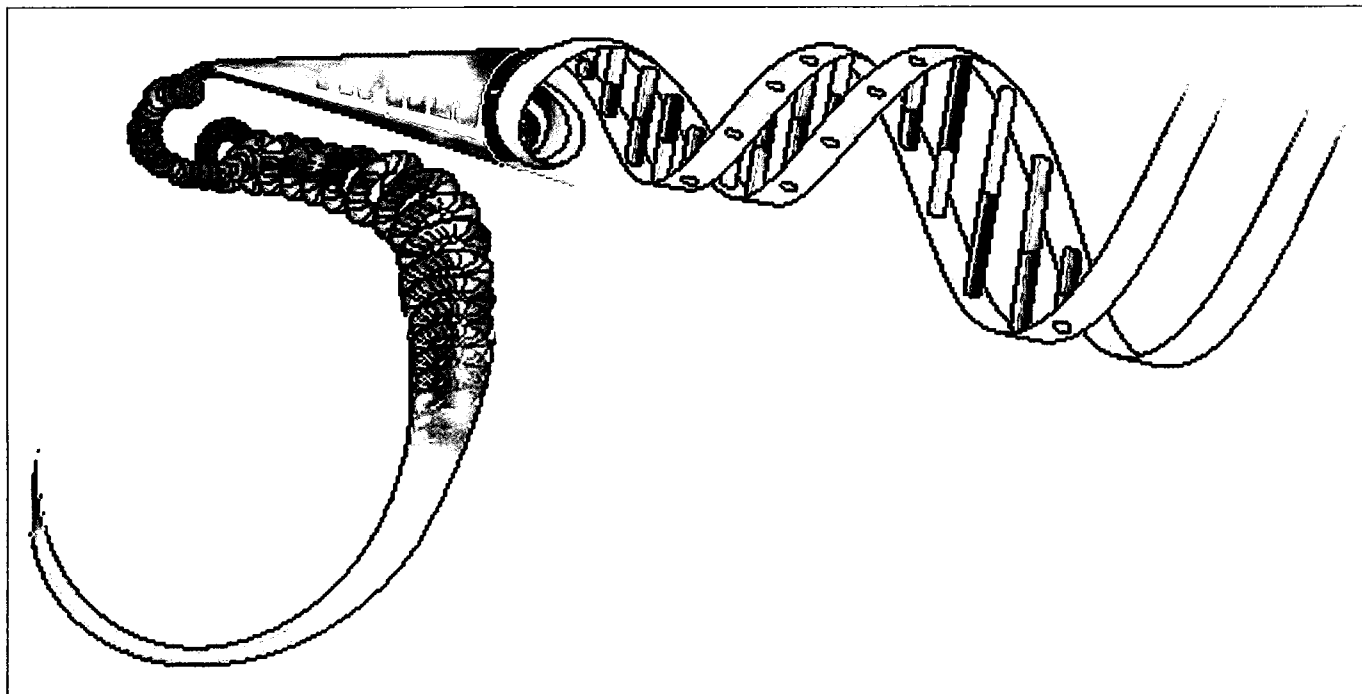
Tri su temeljne etape rada svake DNA molekule:

*replikacija* ili udvostručenje znači prenošenje informacije u novosintetiziranu DNA,

*transkripcija* ili prepisivanje znači prenošenje informacije na *messenger* RNA, a

*translacija* je prenošenje informacija na aminokiseline.

Za vrijeme njenog glavnog zadatka - replikacije same sebe DNA obje svoje spirale spojene vodikovim vezama razdvaja pomoću proteina i zatim svaka strana sintetizira istu kopiju koristeći "građevni" materijal u stanici. Enzim *DNA polimeraza* osigurava da proces teče precizno, odnosno ubacuje nukleotide na svoja mjesta. Humana DNA ima milijardu nukleotida i, npr.



Slika 2

eritrociti (crvena krvna zrnca) kod Europljana imaju približno okrugao izgled, no kod nekih ljudi afričkog podrijetla imaju srpast oblik. Srpaste stanice prenose manje kisika, što dovodi do jedne vrste anemije, ali zato osiguravaju bolju otpornost na malariju koja je u Africi vrlo česta. Spomenuta razlika je razlog promjene jednog jedinog od tih milijardu nukleotida DNA ljudske stanice. (Sagan 1983.).

Kako možemo vidjeti, od prve stranice života DNA ima ključnu ulogu.

Evolucija je svih proteklih tisućljeća djelovala kroz dvije temeljne sastavnice: mutaciju i selekciju. Mutacije se mogu dogoditi npr. ako polimeraza (enzim) "pogriješi", djelovanjem radioaktivnosti, ultraljubičastim (UV) zračenjem ili pak nekim kemikalijama u okolini. Ako je stopa mutacija previsoka, tada se gubi sav trud evolucije, ako je pak preniska, novi oblici ne mogu nastati da bi se priviknuli promjeni životne sredine. To je selekcija, a ona je svojstvo organizama da samo najjači preživljavaju, dok ključnu ulogu u njoj vrši upravo DNA.

O tome nam Sagan priča jednu priču:

"...Godine 1185. japanski je car bio sedmogodišnji dječak imenom Antoku. Kao takav, bio je vođa jednog samurajskog klana zvanog Heike, koji se nalazio u dugotrajnom i krvavom ratu sa suparničkim klanom po imenu Gendži. Svaki je klan polagao pravo na prijestolje. Odlučna pomorska bitka u prisutnosti cara na jednom od brodova odigrala se u Japanskom moru kod Danoure, 24. travnja 1185. godine. Heike su bili brojčano slabiji i poraženi. *Mnogi ratnici su pobijeni, a ono malo preživjelih masovno se bacalo u more i utapljalo.* Gospodarica Nii, careva baka, odlučila je da nju i Antoku ne zarobe neprijatelji..."

Slušajući ovu priču od svojih djedova i očeva, lokalni su ribari uvjereni da Heike samuraji još uvijek hodaju morskim dnom u obliku rakova.

No, znanstvena je činjenica da se u tom području zbilja mogu naći rakovi koji na svojim leđima imaju šare koje uznemirujuće podsjećaju na namrgođena ljudska lica. Ti se rakovi pri ulovu, iz poštovanja, vraćaju u more. Kako se moglo dogoditi da je lik čovjeka urezan u oklop tolikog broja morskih rakova koji žive na jednom području? Jednostavno - to su učinili ljudi.

"Raspored šara nasljedna je osobina i prenosi se DNA molekulom. Pretpostavimo da se slučajno, među precima ovih rakova, našao jedan čije su šare, makar u magli, podsjećale na samurajsko lice. Bacivši iz poštovanja prema legendi takvog raka u more, ribar je započeo jedan evolucijski proces: ako je rak bio "običan"- ljudi će ga pojesti, ali ako je imao oklop koji imalo liči na ljudsko lice, odnosno lice samuraja, bit će bačen u more i spašen. Imat će svoje potomstvo, koje će imati mnoge njegove osobine pa tako i sličan oklop. Kako su prolazile generacije rakova i ribara, najviše izgleda da prežive imali su "rakovi-samuraji". Tako se i dogodilo. (Sagan 1983.).

DNA je u ovom slučaju, osim temeljne uloge za nastanak rakova kao vrste, imala i neizravnu ulogu u njihovom preživljavanju, u ovom slučaju, umjetnim odabirom.

To su zadaće i načini djelovanja DNA molekule u prirodi koja je, kako smo rekli, vezana uza sve živo. Nakon ovog medicinskog, no neizbježnog uvoda da bi se objasnila važnost i funkcija DNA molekule, nameće se jedno drugo pitanje: kako arheolozi koji pronalaze "sve mrtvo" mogu koristiti njene potencijalne informacije i koje su to, te koliko dugo DNA može preživjeti i biti upotrebljiva u spomenutom kontekstu?

Odgovor genetičara na ovo drugo pitanje vrlo je raznolik. Biokemičar Thomas Lindhal iz Great Britain's Imperial Cancer Research Fund-a vjeruje da se DNA molekula može upotrijebiti nakon 50 do čak 100 tisuća godina. Mnogi drugi tvrde da je to moguće samo na puno mlađem materijalu. No rezultati novijih istraživanja paleontologa govore da je DNA molekulu moguće izvući iz materijala starog milijune godina, npr. iz jantara što je prije otprilike dvije godine bilo vrlo aktualno, (Höss et al. 1996.), a neki su stručnjaci vršili istraživanja na tzv. super-starim molekulama, vađenim iz fosila. Prva izolacija i reduplikacija stare<sup>2</sup> DNA molekule učinjena je 1984. godine u Njemačkoj na 140 godina starom srodniku zebre. Nadalje, dr. Svante Pääbo (Zoologisches Institut, Universität München) ekstrahirao je 1985. prvu staru ljudsku molekulu iz 2400 godina stare egipatske mumije. Taj je događaj naznačio mogućnosti analize i u arheologiji, te označio početak razvoja jedne nove discipline koju bismo slobodno mogli nazvati arheogenetikom. Problem koji je tada bio pred znanstvenicima bio je kako umjetno multiplicirati molekulu da bi se proniknulo u njenu strukturu. Odgovor je bio u PCR-u (*Polymerase Chain Reaction*), tj. lančanoj reakciji polimeraze, što je brza metoda proizvodnje velikih količina bilo kojeg fragmenta DNA molekule (Rose & Powledge 1996.), otkrivenoj 1987. (otkrivači su K.B. Mullis i F. Faloon). Godine 1989. uspjelo je znanstvenicima izolirati stanice iz čvrstog tkiva: kosti i zubi. Tu se pokazalo da se analiza može napraviti iz onoga što arheolozi vrlo često nalaze, a to su kosti, tj. da za nju nisu potrebne izuzetne okolnosti očuvanja materijala (mumificiranje i sl.), iako je stupanj očuvanja molekule jedan od presudnih faktora. U godinama koje su dolazile, DNA analiza se pokazala kao vrlo efikasno sredstvo za ispitivanje genetičkog materijala izumrlih vrsta. Nedavno su uspoređivana genetička nasljeđa špiljskog medvjeda (*Ursus spelaeus*) i smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*), odnosno njihove mtDNA (mitohondrijska DNA). Uzeti su uzorci 60 reprezentativnih primjeraka. Podrijetlo smeđeg medvjeda vodilo je u dva smjera: na istok i na zapad. Istočni su vodili u Rusiju i Rumunjsku, a zapadni u Španjolsku, Italiju, Sloveniju, Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu i Bugarsku. Te su se dvije podvrste "razišle" prije cca. 850 tisuća god., a imaju direktnog zajedničkog pretka - špiljskog medvjeda izumrlog prije 20 000 godina (Hänni et al. 1994.). Godine 1994. S.Pääbo sa suradnicima uspio je dokazati da je moguće dobiti rezultate iz tako starih molekula kao što su one iz doba pleistocena. Dakle, ne iz okamine nego iz upravo toliko starog mekog tkiva. Izvršili su analizu na pet vunastih mamuta (*Mamuthus primigenius*) zaleđenih i pronađenih u sibirskim prostranstvima, čija je starost varirala od 9700 do više od 50 000 godina. Kod četiri

je primjerka bilo dostupno više od jednog uzorka molekule koji se mogao iskoristiti. Na specimenu starom 9700 godina autorima je pošlo za rukom sastaviti čak 93 bazna para u nizu mitohondrijske rRNA.<sup>3</sup> Na drugima se uspjelo složiti jedva koje "slovo" u nizu baza, (Pääbo et al. 1994.), a te su razlike uvjetovane različitim stupnjevima očuvanja, te rukovanjem neposredno nakon otkrića. Kako vidimo, za sada su težišta ovakvih istraživanja na materijalu koji je dobro sačuvan i konzerviran. Razlog tome je u metodologiji koja još uvijek ima problema s materijalom koji nije tako dobro očuvan, tj. onakvim kakav je najčešće arheološki. Kosti koje nalazimo vrlo su često u sredini koja nije najbolja za očuvanje molekula. O tome će biti više govora kasnije.

Realno gledajući, u jednoj stanici postoji više vrsta DNA molekula. Od onih o kojima će se govoriti u ovom tekstu, jedne su tzv. genomske koje sadrže poruku oba roditelja, a druge, već spominjane, mitohondrijske (mtDNA), koje nam pričaju samo o srodstvu po majci. Majka je, genetički gledano, ključna osoba u životu svakoga od nas jer se muški Y kromosom prenosi samo s oca na sina i vrlo je sklon sklon mutacijama pa se koristi kao "DNA sat" u paleolitičkoj problematici u svezi s "Out of Africa" i multiregionalnim modelom doseljenja *Homo sapiens sapiens* u Europu, a ima ga samo u genomskoj DNA. Mitohondrijska DNA mnogo je manje kompleksna, a sadrži skup od 37 gena, (stanična ih može imati između 60 i 100 tisuća), pa je tako više iskoristiva u analizama gdje je stupanj degradacije velik ili je njena količina vrlo mala. Isto tako ju je lakše izolirati iz stanice. (Rose & Powledge 1996.). Postoji razlika između izgleda genomske i mitohondrijske DNA. Watson-Crickov lanac prikazuje genomsku koja je dvostruko spiralnog izgleda (tzv. Double Helix), a mitohondrijska je kružnog oblika. To je ključni razlog zašto je ona otpornija na raspadanje od genomske, jer enzimi koji ih najviše degradiraju, teže cijepaju te kružne veze.

Francuski su znanstvenici iz Pasteurovog Instituta u Lilleu s dr. Catherine Hänni na čelu, među prvima uspjeli amplificirati relativno velik broj baznih parova (384) iz dvije kosti neolitičkog razdoblja koje pripadaju vremenu 4500.-5000. godina prije sadašnjosti s lokaliteta Devois de l'Estang u Francuskoj iz prvog hipervarijabilnog<sup>4</sup> segmenta mitohondrijske DNA. Po autorima one su najvjerojatnije dijelovi femura. To je jedan skupni ukop. Cilj je eksperimenta bio taj da se željelo doći do DNA molekule bilo koje osobe koja nije kontaminirana drugima u okolini s obzirom na prirodu ukopa. Međutim, rezultat PCR-om je onemogućen jer je otkrivena prisutnost inhibitora Taq polimeraze koji je posljedica kemijskih modifikacija koje utječu na molekulu tijekom vremena

<sup>2</sup> pod pojmom "stare" misli se na molekule koje spadaju u arheološki, paleontološki ili sličan kontekst (eng. ancient DNA).

<sup>3</sup> također jedna od nukleinskih kiselina.

<sup>4</sup> svaka mtDNA molekula ima dva hipervarijabilna segmenta (HV I i HV II) koji su dio kontrolne regije.

i koji sprječava samu analizu. Ovaj problem posebno se može očekivati kod masovnih ukopa koji su inače vrlo prikladni za međusobne usporedbe između individua. Da bi ipak došli do rezultata, morali su upotrijebiti drugačiju metodu gdje je razlikovanje osoba vršeno pomoću oligonukleotida, pri čemu je mogućnost da bi dvije individue, koje nemaju rodbinske veze, ipak mogle imati jednake mtDNA tipove bila 2,6%. Ukoliko je genetski kod jednak (naravno, u određenim segmentima), a ne vide se tragovi mutacije pouzdano znamo da su one povezane po materinskoj liniji. Ako se u analizi koriste obje hipervarijabilne regije, vjerojatnost za pozitivni rezultat bit će preko 97%. Eksperiment je ponovo pokazao isti broj baznih parova, dakle, svih 384 otkrivenih parova nisu posljedica naknadne kontaminacije uzorka niti pri laboratorijskoj obradi, nego su vjerodostojni, dakle već postoji mehanizam da se dokažu (ili pobiju) rodbinske veze u skupnim ukopima arheološkog konteksta i prouče populacijska kretanja u prošlosti. (Hänni et al. 1995.)

U Hrvatskoj iz više razloga još nije izvršena niti jedna analiza te vrste, (mada je prva upravo u tijeku). Prvi i glavni je taj što je ta metoda nova i do sada je u svijetu objavljeno relativno malo takvih rezultata; drugo, sama je po sebi prilično skupa (odnosno, bolje bi bilo reći da još nije komercijalizirana), iako to nije nerješiv problem, na što ćemo ukazati kasnije. Kako pišući ovaj tekst nismo naišli na konkretan primjer analize vezane uz kontekst arheologije, odnosno rezultat koji bi nakon genetičke obrade interpretirao arheolog i koji bi dovoljno jasno ilustrirao ovaj problem, a da bismo ipak vidjeli kako to može funkcionirati, zamislimo sljedeću situaciju:

U muzej dolazi seljak i govori kako je na svojoj njivi, na položaju zvanom Turčin, orući vrlo često nailazio na mnogo komadića "cigle", a nedavno mu je ralo propalo u rahliji dio zemljišta i izbacilo posude te komadiće metala. Kustos se upućuje na navedeno mjesto u blizini kojega je već istraženo i analizirano nekoliko tumula i utvrđuje da se također radi o pretpovijesnom tumulu, u međuvremenu opljačkanom i tijekom godina iznizeliranom dugogodišnjom obradom zemljišta, s najvjerojatnije jednim i to kneževskim ukopom. Budući da je mjesto opustošeno, on uzima sa sobom ono što je ukopano u prapovijesni humus - kosti, te ih odnosi u muzej tj. u laboratorij na analizu DNA. Nakon antropološke obrade i analize DNA njegov bi izvještaj mogao izgledati ovako:

*Pokojnik je bio muškarac u dobi od oko 40-45 godina starosti. Uzrok smrti je postupno odumiranje nekih mišića u tijelu, te se pretpostavlja da je neko vrijeme prije smrti bio nepokretan. Bio je visok oko 1,75 m. Bolovao je od dijabetesa. Po poroznosti čeine kosti može se pretpostaviti neadekvatna ishrana, odnosno manjak željeza. Podrijetlom je s obala Crnoga Mora. Rodbinski je vezan sa ženom iz jednog od ranije istraženih obližnjih tumula, što pouzdano pokazuje da tumuli u ovoj regiji koji imaju više ukopa nisu porodični...*

Tu se izvještaj ove izmišljene priče ne bi završio, nego bi išao i dalje do gotovo nevjerojatnih detalja koji se mogu pročitati iz jedne izolirane molekule DNA i antropološke analize kostiju. Ovdje se može prigovoriti da bismo saznali nebitne podatke za arheologiju, što se tiče datacije i interpretacije, osim, npr. njegova crnomorskog podrijetla i rodbinske veze, mada se iz ta dva podatka može rekonstruirati štošta iz socijalne stratigrafije, ali treba naglasiti da bi to bi najnezgodniji primjer kada ostajemo bez iskopavanja, stratigrafije, analize metalnih i keramičkih predmeta; svega onoga što najčešće imamo i iz čega se datiranje po klasičnoj arheološkoj metodi izvodi. Činjenica je da analiza najbolje dolazi do izražaja kada se može uspoređivati nekoliko uzoraka i čak među njima povlačiti porodične veze, međutim i kod pojedinačnih nalaza može dati sjajne rezultate. Upravo to upućuje na zaključak da bi spoj arheološkog istraživanja i analize DNA bio gotovo idealan, a možda koji put i spektakularan.

Jedan od mnogih problema koji bi mogao biti riješen ovom metodom jest problem društvene stratigrafije unutar pojedinih kultura ili regija.

Zadržimo se na brončanom ili željeznom dobu.

Današnjim stanjem istraživanja daleko smo od točke kada ćemo moći reći da poznajemo to razdoblje, ali smo tu u kud-i-kamo boljoj situaciji nego na prijelazu neolitika u eneolitik. Znamo neke smjerove penetracija pojedinih etnika, po priložima u pojedinim periodima prilično rutinirano razaznajemo muški od ženskog groba (općenito govoreći), znamo velik broj radioničkih središta, znamo gotovo sve izvore sirovina, popriličan broj točno ubiciranih trgovačkih puteva, dakle znatan broj pouzdano dokazanih činjenica.

No, bilo bi sjajno saznati, uza sve ovo do sada rečeno, kako su npr. stanovnici gradina ranog halštatskog razdoblja u jugoistočnim Alpama birali svoje vođe-kneževe? Je li to bila nasljedna čast ili se to stjecalo hrabrošću i umijećem pokazanom u bojovima? H. Müller-Karpe je npr. u pokojnicima iz grobova bogatim priložima iz Podzemelja, Kleinkleina itd. vidio potomke populacija koje su ovdje živjele još u doba kulture polja sa žarama, koji su krajem spomenutog perioda obilježnog nemirima i previranjima uzrokovana u Karpatskoj kotlini (u arheološkom materijalu evidentirana kao "trako-kimerijski udar"), politički i vojno ojačali te ponovo uveli red (Gabrovec 1987.). Ili je to ipak neka nova grupa koja se jednostavno nametnula došavši iz istočnog ili nekog drugog područja. Jesu li u grupacijama od nekoliko tumula bili pokapani pokojnici tijekom jednog kraćeg razdoblja, koje mi po keramografiji i metalu još uvijek nismo u mogućnosti razlikovati ili pripadnici jedne porodice? Jesu li su u horizontima tumula, koje datiramo u isti vremenski period, dakle, kad postoji veći broj pokojnika pokopanih u isto vrijeme, pokojnici ubijeni ili podlegli nekoj opakoj bolesti?

Tko su oni i odakle su došli, ako su uoče došli?

O navedenim problemima postoje teorije arheologa koji su istraživali pojedine lokalitete, ali nitko od njih nema pouzdan dokaz za svoje mišljenje.

Odakle dolaze badenci te s kime su više u svezi, s područjem sjeverno ili južno od matičnog područja, kamo nestaju vučedolci, a rasprave o autohtonosti vinčanske kulture ne treba ni spominjati. To su pitanja na koja bi odgovor najpreciznije i najtočnije mogla dati DNA molekula.

Postoji još jedan problem koji vrlo često zadaje muke arheolozima, odnosno antropolozima pri obradi osteološkog materijala iz grobalja. Kako na grobljima često određen postotak skeleta pripada djeci, iz njihovih nerazvijenih kostiju morfološki je vrlo teško odrediti spolnu pripadnost. Još je češći slučaj da su kosti fragmentirane pa je spolna determinacija također otežana ili čak nemoguća. Takav se problem može riješiti pomoću *Amelogenina* - gena koji se može naći u DNA molekuli i na X i na Y kromosomima. Prilikom jednog takvog ispitivanja uzeti su uzorci 20-ero ljudi, te 20 arheoloških uzoraka s lokaliteta u središnjem Illinoisu (SAD) datiranog u 1300. godinu. Kod modernih individua iz svih je uzoraka pogođen spol, a kod arheoloških je od 20 točno određen spol kod njih 19, što pokazuje ovu metodu točnom više od 95%(!) (Stoneking et al. 1996.).

U novije je vrijeme nađen nalaz u Europi koji je to mogao i potvrditi. Naglašavamo - *mogao je*, ali nije. Otkriven je slučajno 19. rujna 1991. g. na samoj talijansko-austrijskoj granici u pokrajini Tirol, na 3210 metara nadmorske visine. Riječ je o poznatom "Ice man"- ledenom čovjeku. Sačuvana je iznimna količina organskog materijala iz kojeg se moglo mnogo toga rekonstruirati, počev od samog tijela umrlog, pa do toga od čijih su životinjskih koža napravljeni tobolac, kapa, cipele, od kojeg drveta strijele i sl. Radiokarbonska analiza tijela daje nam nekalibrirane datume 4500+-30 i 4555+-35 godina prije sadašnjosti. (Barfield 1994.).

Na samom su nalazu izvršena rentgenska i CT (kompjutorska tomografija) snimanja. Do sada su pod mikrobiološku analizu stavljeni ostaci biljaka, odnosno polena, nađeni na njegovoj odjeći o čemu je već pisano (Höpfel & Platzer & Spindler 1992.), te jedan dio kože s bedra. Ti uzorci su poslani u različite laboratorije najpoznatijih genetičara, među kojima i prof. Pääba. Na veliku žalost iznimnog broja stručnjaka različitih područja, (od arheologa, antropologa do genetičara), materijali su dali različite informacije što je posljedica kontaminacije uzorka pri njegovu vađenju iz leda. Prof. Pääbo čak ne isključuje kontaminaciju u laboratoriju (priopćenje prof. Pääba pismom). Ipak, dva su uzorka bila dovoljna da pokažu kako je ledeni čovjek bio sjevernoeuropskog podrijetla (pojam "sjevernoeuropski" nije pobliže definiran) (Rose & Powledge 1996.). Da je slučajno bilo drugačije, tj. da je materijal ostao nekontaminiran, zbog stupnja svoje očuvanosti, pružio bi zadivljujuće podatke o sebi odnosno čovjeku od prije 5000 godina. Interesantno je možda naglasiti da je nalaz dostupan svaka dva tjedna na vrijeme od 20 minuta. Realne su šanse da se iz ledenog čovjeka jednom ponovo uzme uzorak koji bi ono "mogao je" s početka ovog paragrafa, pretvorio u "je". U europskoj arheologiji ima nekoliko takvih primjera kada su nalazi bili izvanredno očuvani. ("Lindow man", mamuti i ljudski ostaci iz Sibira itd.).

Koliko je situacija s kontaminacijom relativna stvar kada je u pitanju stara DNA, pokazat će nam sljedeći primjer. Početkom mjeseca srpnja 1997. genetičari su došli do zapanjujućeg rezultata koji na ovaj problem baca novo svjetlo; uspjeli su izolirati DNA molekulu iz prvog nađenog ostatka neandertalskog čovjeka, poznatog nalaza iz doline Neander kraj Düsseldorfa otkrivenog 1856. godine, koji je od 1993. godine na projektu interdisciplinarnog istraživanja pod pokroviteljstvom Rajnskog pokrajinskog muzeja (Rheinisches Landesmuseum) u Bonnu. Uspjeti doći do ovoga otkrića na uzorku koji je izvađen prije više od 140 godina i koji je tijekom njih prošao kroz nebrojen broj ruku, apsolutni je tehnološki i metodološki trijumf moderne genetike. No, na stranu metodologija. Iz uzorka mase 3.5 grama, od čega 0,4 g otpada na masu same DNA, "pročitano" je 379 slova genetskog koda od cca. 16000 koliko ih ima mitohondrijska DNA molekula (Pääbo et al. 1997.). Ljudi se razlikuju jedan od drugoga po oko osam slova, (tj. osam hipervarijabilnih pozicija po segmentu), a uvaženi gospodin iz Düsseldorfa razlikuje se po 25,6 slova u prosjeku, što je indikator prilične evolucione razlike po dr. Stonekingu, jednom od autora eksperimenta, što opet pak upućuje na zaključak da su neandertalci ipak prilično udaljeni rođaci modernog čovjeka, tj. da nemaju genetsku vezu. Ovo dakle daje novi argument spomenutom "Out of Africa" modelu koji zastupa teoriju da su moderni ljudi došli iz Afrike i zamijenili tadašnje populacije po svijetu, uključujući i europske neandertalce, a da se s njima nisu miješali. (Kahn & Gibbons 1997.) Budući da je razlika zapanjila mnoge antropologe, uključujući i jednog od najvećih stručnjaka u tom polju dr. Wolpoffa, paralelno je načinjena analiza kod prof. Pääba u Münchenu koja je potvrdila malu vjerojatnost da je rezultat pogrešan radi kontaminacije. Naravno, pri proceduri se uzimaju i DNA podaci znanstvenika koji neposredno sudjeluju u projektu kako bi se na taj način odmah vidjelo dali je stara molekula naknadno kontaminirana. Kako se mtDNA najmanje mijenja tijekom evolucije te je tako pouzdan pokazatelj srodnosti, odnosno evolucionih promjena, ovo najnovije otkriće treba uzeti u obzir kao znanstvenu činjenicu. U drugu ruku, kako reče dr. Wolpoff, postoji realna mogućnost da je baš ovaj primjerak bio različit i od svojih srodnika pa će se ovo otkriće nepobitno potvrditi tek kada se naprave analize kod još nekoliko uzoraka iz tog vremena, međutim, po riječima autora vjerojatnost za to je mala (Pääbo et al. 1997.). Ma kako se stvari razvijale u svezi s ovim slučajem, on će sigurno pokazati dvije osnovne smjernice u daljnim istraživanjima. Sada apsolutno znamo da se mikrobiološki može obraditi materijal tolike starosti i što je možda još i važnije, kontaminacija uzorka postaje manje bitna ako je on dovoljno kvalitetno sačuvan. U tom je pogledu najveći problem onaj koji prati arheologa na svim iskopavanjima - proces raspadanja organskog materijala u najranijem vremenu nakon ukopavanja, te oštećenost same molekule.

DNA molekule koje pronalazimo u arheološkom kontekstu, oštećuju uglavnom dvije vrste oštećenja. Prvo su to hidrolitička oštećenja koja uzrokuju deaminaciju, depurinaciju i depirimidinaciju baze, tj. uništavaju "slova" u genetskom kodu. Druga su oštećenja uzrokovana oksidacijom. Oštećenja uzrokuje npr. i UV zračenje, no ono ne dopire do arheološkog materijala koji se nalazi pod zemljom. (Pääbo et al. 1996.). Led čuva ostatke u odličnom stanju. Dijametralno suprotno, druga idealna tvar je pijesak, odnosno bili kakav suhi medij, koji uzrokuje brzo sušenje gdje se tkivo, pa tako i kosti, također mogu dugo sačuvati. (U Institutu, svoje sasvim recentne uzorke tkiva skladište na temperaturi od -80° C.)

Na temelju dosad iznesenoga, nameće se nekoliko činjenica. Vrlo je prisutan, kod ledenog čovjeka već spomenut, problem kontaminacije uzorka, koji se može izbjeći pažljivim pristupom uzorku, odnosno, uvjeti bi trebali biti što sterilniji. Početak DNA analize trebao bi "početi" već na samom lokalitetu na način da to učini priroda, kao što je to slučaj kod tirolskog nalaza, ili da to učini arheolog s nalazom odmah nakon otkrivanja. Ostaci se ne smiju dodirivati golim rukama, jer se tako nalaz trenutačno kontaminira istraživačevim molekulama DNA. Uzorak bi trebao biti što manje izložen zraku i odmah spremljen u plastičnu vrećicu do njenog otpremanja u laboratorij. Bilo bi dobro da sve skupa stoji na što hladnijem mjestu. Trebalo bi izbjegavati izravno polaganje u vatru, koja može zadati poteškoće laborantu pri čišćenju, nego sve učvrstiti vatom ili gazom s vanjske strane "paketića" itd. Kostii s kojima je uspjeh analize najsigurniji jesu kosti glave (*cranium*) i zubi.

U listopadu 1996. godine u Stenjevcu (Zagreb) izvedena je još jedna u nizu kampanja sondažnog istraživanja srednjovjekovnog groblja datiranog u X. – XIII. st. Istraživanje traje od 1983. g., a vodi ga Katica Simoni iz Arheološkog muzeja u Zagrebu. Lokalitet se nalazi na jednoj savskoj terasi (Sava je ovuda tekla prije oko 7200-4700 godina) i uz njega je vezan jedan interesantan geološki podatak. Naime, mjesto na kojemu se vrše istraživanja, nije bilo plavljeno u zadnjih 2500 godina (Šegota, 1986.), što je jedan od činitelja geološke strukture tla samog nalazišta. Iz sonde 1996/1 izvađen je uzorak zemlje s dubine od cca. 150 cm i dan na pH analizu, a dobiveni rezultat iznosio je 7,0; tj. pokazao neutralan faktor što ukazuje da je okolina u kojoj su ostaci pokojnika pronađeni izrazito povoljna, bar što se tiče kiselosti zemlje. Pri otkrivanju jedinog groba u spomenutoj sondi - groba broj 161<sup>5</sup>, iz fragmentirane lubanje izvađene su kosti te dva zuba. Pri vađenju su se nosile sterilne gumene rukavice za jednokratnu upotrebu i kirurška maska da bi se spriječila kontaminacija pri disanju, a svaka kost i zub spremljeni su u zasebnu plastičnu vrećicu. Taj je materijal otpremljen u DNA laboratorij Zavoda za sudsku medicinu i kriminalistiku

Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon čišćenja materijala i pripreme za samu analizu ustanovljeno je da bi se jedino iz zubi moglo doći do rezultata. Nažalost, veći i važniji zub (kutnjak) bio je gotovo potpuno uništen karijesom. Prilikom sljedeće kampanje istraživanja u listopadu ove godine iz groba 191 ponovo je uzet uzorak, ovoga puta mandibula sa zubima koji je ponovo predan u laboratorij<sup>6</sup>.

Stupanj očuvanosti skeleta u spomenutom grobu otprilike je jednak kao i grobova iz prethodnih nekoliko kampanja, u kojima smo i sami sudjelovali (1993.-1997.g.), što bi moglo uputiti na zaključak da je pH vrijednost na cijeloj površini groblja više-manje jednaka, dakle vrlo povoljna. Ovdje treba naglasiti da komponenta aciditeta zemljišta u kojemu leži materijal, nije jedina koja utječe na njegovo očuvanje iako ima važnu ulogu u prezervaciji organskog materijala. Imajući to u vidu, stenjevečki bi materijal potencijalno mogao biti prikladan za DNA analizu većeg broja grobova kojom bi se mogli utvrditi izuzetni podaci za demografiju.

Uopćeno govoreći, razvoj prirodnih znanosti i njihova prisutnost u arheologiji od posebne su važnosti. Svojevremeno je jedan nalaz bio prava senzacija stoga što je polen oko groba pokojnika bio dan na analizu. Radi se o poznatoj pećini Shanidar u Iraku gdje je nađeno više ukopa neandertalskog čovjeka koji su sami po sebi bili senzacija jer se prije toga mislilo da je briga za pokojnike svojstvena tek *Homo sapiens sapiens*. Arheolozi su rekli da je pokojnik iz vremena od prije 60 000 godina, a palinolozi nadodali da je umro negdje u proljeće ili ljeto jedne od tih silnih tisuća godina jer je grob bio ukrašen divljim cvijećem (Trinkaus & Shipman 1993.). Prilično paradoksalno; nitko ne može reći koje od tih mnogih godina, ali se može sa sigurnošću reći jednoga proljeća. Ova činjenica nikada ne bi bila poznata da nije bilo mikrobiološke analize.

Vratimo se našoj temi.

DNA je neponovljiv i vrhunski proizvod evolucije živog svijeta koja traje četiri milijarde godina. Kako je već rečeno, njena analiza mogla bi arheolozima biti od velike pomoći podacima i točnošću kojima ih pruža u modernoj medicini i forenzici, (danas se već može na temelju jedne jedine vlasi kose saznati putem DNA molekule, koju vrstu droge i koliko dugo ju je čovjek uzimao), a ovaj je tekst samo pokušaj približavanja te teme našoj arheološkoj javnosti. Tu je navedeno nekoliko primjera koji su smatrani najpogodnijima za taj "informativni prikaz", a svi su oni svojevremeno zapanjili genetičku znanost pa čak i same autore projekata, a sve to skupa i nije bilo tako davno. Radi se o razdoblju od unatrag dvije-tri godine. Vjerojatno je i samo jedan dan prije otkrića spomenute 93 mamutske baze malo tko vjerovao da je moguće sintetizirati tako staru molekulu

<sup>5</sup> neobjavljeno

<sup>6</sup> u trenutku predaje teksta još nisu bili poznati nikakvi rezultati pripreme uzorka.

u tolikoj dužini, odnosno u tolikom broju nukleotida. Pitanje je trenutka kada ćemo moći dobiti i prve slične rezultate o ljudskim migracijama o kojima je posredno govoreno u tekstu. Pogledati u nešto najsitnije i najmanje što još uvijek predstavlja nas same, stvarno vidjeti slova kojima su ispisane riječi tko smo i odakle dolazimo bilo je nevjerovatno. Pokrenula se lavina pitanja, skepsi i oduševljenja. Na neka od tih pitanja još uvijek nemamo odgovor, no na tome se ubrzano radi, a rezultati su vrlo obećavajući. Prvo se uspjelo u teoriji pa onda i u praksi, baš onako kako to i treba biti. Sada je na genetičarima da razviju tehnologiju tako da bi očuvanost molekule bila što manje bitna karika u DNA analizi, a to je, sada već možemo reći, pitanje trenutka. Mogućnosti za manevre su goleme. Upravo je to i najveća prednost analize, jer se njome mogu koristiti čitavi spektri znanstvenih disciplina na jednom uzorku. Nekima će biti više uspješna, nekima manje. Drugi će put biti obrnuto. Tako bi ona zbog svoje višenamjenske komponente uvijek mogla biti vrlo prihvatljiva za financiranje jer bi ono moglo dolaziti iz više zainteresiranih znanstvenih područja. (Npr. utvrditi razvoj i način djelovanja nasljednih kancerogenih bolesti od prije nekoliko stotina ili tisuća godina bilo bi od posebne važnosti za moderna medicinska istraživanja na tom polju.) Danas kada se arheologija sve više usredotočuje na mikroregionalne analize i kulturnu antropologiju, kada se sve više pokušavaju rekonstruirati prava, nazovimo ih "dnevna" zbivanja na lokalitetima što zahtijeva precizna i detaljno bilježena istraživanja te praćenje najmanjih stratigrafskih detalja, analiza DNA se sjajno uklapa u te pristupe i pridonosi rezultatima te vrste, tj. upravo jednom od krajnjih ciljeva arheologije: rekonstrukciji i prezentaciji načina života ljudi u prošlosti. Moglo bi se reći da time "klasična" škola arheologije dokazuje "novoj" arheologiji da i ona može koristiti ultra nove metode koje se temelje na prirodnim znanostima i da ima adute na koje se mora računati. Očito je arheologija u posljednje vrijeme prestala biti društvena znanost što zapravo nikada nije samo i bila jer je oduvijek proučavala život i sve vezano uz njega u njegovom najširem smislu, samo s tom iznimkom što je taj život davno ugasnuo.

Na početku pisanja ovog teksta, negdje sredinom 1996. g., malo je toga bilo poznato o pristupu

materijalu, njegovom potencijalnom pozitivnom rezultatu, jedino što je bilo jasno bila je tadašnja visoka cijena analize i rizik od negativnog ishoda, dakle, sigurno je sve izgledalo puno manje optimistično. Prava otkrića pojavila su se nekako baš od tog vremena i dala ovom problemu jednu novu dimenziju. Tko je u znanstvenim krugovima prije pet godina ozbiljno spominjao staru DNA, u najmanju je ruku bio "malo čudno gledan", kako nam sami rekoše neki pioniri te struke. Danas imamo rezultate na uzorku iz Neandertala koji zacijelo okreće novu stranicu u istraživanjima na ovom polju.

Na kraju, ako se predviđanja obistine, analizom ćemo dobiti sjajan izvor informacija o npr. demografiji nekog groblja, ergo, naselja, razvoju i stagnaciji pojedinih bolesti. DNA će nam govoriti podatke o patologiji pojedinaca kao i stanovništva u cjelini te njegovu pordrijetlu, što će sa sobom kao usputnu pojavu nužno dovesti do rješenja brojnih, potpuno arheoloških problema...ispričat će nam priču o Čovječanstvu...

#### ZAHVALA:

Zahvaljujem gđi. Katici Simoni iz Arheološkog muzeja u Zagrebu što mi je ustupila uzorke iz grobova 161 i 191, dr. Milovanu Kubatu i ing. Ivani Furač iz DNA laboratorija Zavoda za sudsku medicinu i kriminalistiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na njegovoj obradi, te dr. Sanji Drča iz DNA laboratorija Instituta "Ruđer Bošković" na stručnim savjetima. Zahvaljujem prof. dr. Tihomili Težak-Gregl (Filozofski fakultet, Odsjek za Arheologiju, Sveučilište u Zagrebu) na svestranoj pomoći pri pisanju teksta. Posebno ističem g. Franza Josefa Schäfera i g. Sašu Bilića iz "MERCK d.o.o. Hrvatska", g. Igora Toljana iz "Zrinjevac d.o.o." Zagreb, te prof. Antu Miloševića iz Muzeja hrvatskih arheoloških spomenika u Splitu što su našli interesa sponzorirati moj put na konferenciju "Ancient DNA IV" u Göttingen na kojoj sam dobio ključne smjernice za ovaj rad. Na kraju zahvaljujem dr. Els Jehaes iz Center of Human Genetics, University of Leuven, Belgija, na beskrajnom strpljenju pri objašnjavanju temeljnih principa genetike, kao i prof. Svanteu Pääbu na savjetima, separatima i pismima.

#### POPIS LITERATURE

- Bahn 1996. P. G. Bahn (Ed.), A Story of Archaeology.  
 Gabrovec 1987. S. Gabrovec, Jugoistočnoalpska regija sa zapadnim Podunavljem, u: A. Benac (ed.) Praistorija jugoslavenskih zemalja V, Sarajevo, 111.  
 Hääni et al. 1994. C. Hääni & V. Laudet & D. Stèhelin & P. Taberlet, Tracking the Origins of the Cave Bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA Sequencing. *Evolution*, Vol. 91, , December 1994., 12336-12340.  
 Hääni et al. 1994. C. Hääni & V. Laudet & J. Coll & D. Stèhelin An Unusual Mitochondrial DNA Sequence Variant from an Egyptian Mummy. *Genomics* 22, 487-489



- Hääni et al. 1995. C. Hääni & V. Laudet & A. Bergue & D. Stèhelin, Molecular Typing of Neolithic Human Bones. *Journal of Archaeological Science* 22, 649-658.
- Hääni et al. 1995. C. Hääni & V. Laudet & T. Brousseau & D. Stèhelin, Isopropanol Precipitation Removes PCR Inhibitors from Ancient Bone Extracts. *Nucleic Acids Research* Vol. 23, No. 5, 881-882.
- Höpfel & Platzer & Spindler 1992. F. Höpfel & W. Platzer & K. Spindler, Der Man in Eis. Band I, Bericht über das Internationale Symposium 1992 in Innsbruck.
- Höss et al. 1996. S. Pääbo & M. Höss & A. Dilling & A. Currant, Molecular Phylogeny of the Extinct ground sloth *Mylodon darwini*. *Evolution*, Vol. 93, 181-185.
- Kahn & Gibbons 1997. P. Kahn & A. Gibbons, DNA From an Extinct Human, *Nature* Vol. 277, 176-178., 11. July 1997.
- Pääbo et al. 1996. S. Pääbo & O. Handt & M. Krings & R. H. Ward, The Retrieval of Ancient Human DNA Sequences. *American Journal of Human Genetics* 59, 368-376.
- Pääbo et al. 1994. S. Pääbo & O. Handt & M. Höss & M. Krings, Ancient DNA: Methodological challenges. *Experientia* 50, 524-529, 1994.
- Pääbo et al. 1994. Svante Pääbo & Matthias Höss & N. K. Vereshchagin, Mammoth DNA Sequences, *Nature* Vol. 370, 4. August 1994.
- Pääbo et al. 1996. S. Pääbo & H. N. Poinar & M. Höss & J. L. Bada, Amino Acid Racemization and the Preservation of Ancient DNA, *Science*, Vol. 272, 864-866, 10. May 1996.
- Pääbo et al. 1996. S. Pääbo & M. Höss & P. Jaruga & T. H. Zastawny & M. Dizdaroglu, DNA Damage and DNA Sequence Retrieval from Ancient Tissues, *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, No.7, 1304-1307.
- Pääbo et al. 1997. S. Pääbo & M. Krings, A. Stone, R. W. Schmitz, H. Krainitzki, M. Stoneking, Neanderthal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans. *Cell*, Vol. 90, p. 19-30, 11. July 1997.
- Rose & Powledge 1996. M. Rose & T. Powledge, The Quest for DNA. *Archaeology*, 1996.
- Sagan 1983. C. Sagan, *Kozmos*, Opatija
- Stoneking et al. 1996. S. Pääbo, A. C. Stone, G. M. Milner, M. Stoneking, Sex Determination of Ancient Human Skeletons Using DNA. *American Journal of Physical Anthropology* 99, p. 231-238.
- Šegota 1986. T. Šegota, Neke kvartarološke i arheološke implikacije fluktuacije vodostaja Save u Zagrebu, *RAD Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti*. Knj. 424, 289-322.
- Trinkaus & Shipman 1993. E. Trinkaus & P. Shipman *The Neanderthals*, Pimlico.
- Wenke 1990. R. Wenke, *Patterns in Prehistory: First Million Years of Human Kind*.

## SUMMARY

### GENETICS AND ARCHAEOLOGY: THE POSSIBILITIES OF INTERDISCIPLINARY LINKS

Key words: DNA molecule, archaeology, analysis, PCR

DNA, as the basic ingredient of the living world, is a data base about every unit or individual (Fig. 2). The species, genus, order, the shape of leaves, the length of fur in animals, the eye color, are only some of the information printed in its chain. Given that it holds such fundamental information, it is a source of a large amount of data that can be read from it. From the many types of such molecules, mitochondian DNA is dealt with in this merely informative and general text. Mitochondian DNA is a type of molecule located in the chromosomes whose basic characteristic is that it is inherited only in the maternal line (X chromosome) and that it is not subject to mutations. It is thus an excellent indicator of two basic facts: possible inherited illnesses of individuals and their direct family, and the development of such illnesses. It would be possible, among other things, to perceive the reasons for the death rate of some microregion or settlement, and so forth. Other data are in the category of so-called population genetics, with which the population variants of certain ethnic groups in the past can be proven and explained. One and the other can be the result of a single systematic investigation, and in such a case, with anthropological support, they would give their maximum. The author cites certain examples to illustrate this.

The history of this discipline, which can be called archacogenetics, started not long ago, in 1989, when the experts at the Zoologisches Institut in Munich, under the leadership of Prof. Svante Pääbo, succeeded in isolating a human molecule from a 2400 year old Egyptian mummy. After the discovery of PCR (an operation that allows duplicating a certain part of a molecule in a large number of copies), in 1987 scientists succeeded in isolating cells from the material that archaeologists most frequently find: bones and teeth. Research into the genetic material of extinct species began. For example, the molecules were compared of the extinct cave bear (*Ursus spelaeus*) and the brown bear (*Ursus arctos*), where it was shown that the descent of the brown bear leads in two directions, two sub-species, that separated 850,000 years ago, and that have a common ancestor — the cave bear, extinct over 20,000 years. Experiments have been performed on samples from the Pleistocene, on woolly mammoths (*Mamuthus primigenius*) from the frozen wastes of Siberia, where enviable results were achieved considering the age of the samples. The team of Dr. Catherine Hääni from the Pasteur Institute in France proved that a mechanism exists through which it is possible to prove or disprove family relations in group burials in an archaeological context, which is yet another method to perceive population changes in the past. Analysis of amelogenin, a gene that is located on both X and Y chromosomes, can lead to information about skeletons from mediaeval cemeteries, for instance,

where this is morphologically made difficult because of poor preservation, or for child skeletons, when the classical anthropological method is very difficult. Experiments performed in the USA show that this method is over 95% accurate.

The greatest achievement of modern genetics in archaeology occurred in July 1997, when a team led by the already mentioned Prof. Svante Pääbo and Dr. Stoneking (Pennsylvania State University) succeeded in isolating a molecule from the well-known find of a Neanderthal found in 1856 at Neanderthal near Düsseldorf in Germany. This experiment was particularly important as it was performed on material over 140 years old, which had also passed from hand to hand among scientists. One of the greatest problems in archaeogenetics is the degree of contamination of the sample. There are two most common types of damage that harm DNA molecules in archaeological contexts. The first is hydrolithic, which destroys the genetic code, and the other is caused by oxidation. The conditions under which a sample is taken must be as "sterile" as possible, in other words it cannot be touched by bare hands, as it then is contaminated momentarily, making the analysis yet more difficult, which shows the exceptional success of the German and American genetic researchers in the above case. Humans are distinguished from each other by at most eight hypervariable positions, on one of two hypervariable segments in a molecule (HV I and HV II). The find from Neanderthal exhibited a difference on circa 25 of them, which shows a considerable difference and would support the "out of Africa" model of the settlement of modern man in Europe.

In October 1997, during a campaign of excavation at the mediaeval cemetery at Stenjevec (Zagreb, Croatia), a sample of a mandible and accompanying tooth was taken from grave 191 to undertake DNA analysis. The acidity of the soil from the immediate vicinity of the grave was 7.0 pH, which gives hope that the sample could well yield a positive result. The results had not yet arrived by the time this article had to be turned in. This site has been excavated since 1983 by Katica Simoni of the Archaeological Museum in Zagreb, and this site could offer potential for DNA analysis of a larger number of graves, which in turn could lead to a demographic picture of the cemetery, or rather the corresponding settlement, which has not yet been discovered.

From this and the other examples cited in the text, it is apparent that analysis primarily is concentrated on archaeological samples with better than average preservation. The main reason for this is that the basic methodology is still being developed. The mentioned results with all their data even astonished the authors themselves. To look into the tiniest thing that represents us ourselves and see certain letters with which the pages of our very existence are written has given birth to hundreds of questions. To some we have received answers, but the true answers have yet to come. Interest for such research need not necessarily come merely from archaeology. In the context of modern medical research, it could be very interesting to learn of the development and stagnation of certain form of carcinomas from the period of several hundred or thousands of years ago. Such DNA research could be performed from a multidisciplinary aspect. Archaeology has yet again shown that it has ceased to be a social science, which in fact it never really was, as it has always studied life and everything related to it in the broadest possible sense, only with the exception that such life was extinguished long ago.

#### Acknowledgments:

I would like to thank Katica Simoni of the Archaeological Museum in Zagreb for allowing me to take samples from graves 161 and 191 at Stenjevec, Dr. Milovan Kubat and Ivana Furač from the DNA Laboratory of the Institute for Forensic and Criminal Medicine, at the Faculty of Medicine of the University of Zagreb for their analysis, and Dr. Sanja Drča of the DNA laboratory of the Ruđer Bošković Institute for expert advice. I am also grateful to Prof. Dr. Tihomila Težak-Gregl (Department of Archaeology, Faculty of Philosophy, University of Zagreb) for her generous help when this text was being written. I would also like to thank Franz Josef Schäfer and Saša Bilić of "MERCK Ltd. Croatia" and Igor Toljan of "Zrinjevac Ltd.", both in Zagreb, and Ante Milošević of the Museum of Croatian Archaeological Monuments in Split, who sponsored my trip to the "Ancient DNA IV" conference in Göttingen, where I received essential information for this work. And finally, I would like to express my thanks to Dr. Els Jehaes of the Center for Human Genetics at the University of Leuven in Belgium, for his endless patience in explaining the fundamental principles of genetics, and also Prof. Svante Pääbo for his advice, offprints, and letters.

Translated by B. Smith-Demo