

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
EVOLUTSIOONILISE BIOLOOGIA ÕPPETOOL

**VANA DNA PROOVI KVALITEEDI SÕLTUVUS VANUSEST JA PROOVILE
ANTUD VISUAALSEST HINNANGUST**

Bakalaureusetöö

Bioloogia

12 EAP

Kadri Irdt

Juhendajad MSc Lehti Saag

PhD Mait Metspalu

TARTU 2018

Vana DNA proovi kvaliteedi sõltuvus vanusest ja proovile antud visuaalsest hinnangust

Lühikokkuvõte. Töös antakse ülevaade vana DNA uuringutest: millistes tingimustes viibinud ja millistest bioloogilistest materjalidest DNA-d on suudetud eraldada. Kõige paremaid endogeense DNA tulemusi saadakse kuivas ja jahedas kliimas olnud proovidest ning parimaks materjaliks on kaljuluu ja hambad. Töö teises pooles analüüsiti Tartu Ülikooli evolutsioonilise bioloogia töögrupi liikmete uuritud hammaste vana DNA tulemusi. Selgus, et nooremates proovides on C→T asenduste osakaal väiksem kui vanemates ning endogeense DNA keskmine sisaldus suurem. Visuaalse vaatluse alusel hästi säilinuks nimetatud hammastest saab rohkem endogeenset DNA-d kui halvasti säilinutest.

CERCS teaduseriala: B220 Geneetika, tsütogeneetika, B460 Füüsiline antropoloogia, H341 Eelajalugu

Märksõnad: vana DNA, DNA säilimine, endogeenne DNA, DNA kahjustused.

The correlation between the quality of an ancient DNA sample and its age or the visual assessment given to it

Abstract. This paper gives an overview of ancient DNA studies: from which conditions and from which biological materials DNA has been extracted. Samples from dry and cold environments and from petrous bone or teeth are considered to be the best sources of endogenous DNA. In the second half of the paper, the ancient DNA results produced by the evolutionary biology workgroup of the University of Tartu by extracting DNA from teeth were analyzed. It turned out that younger samples contain fewer C→T substitutions and more endogenous DNA compared to older samples. Samples that are considered to be well preserved by visual inspection contain more endogenous DNA than those that are considered to be poorly preserved.

CERCS research specialization: B220 Genetics, cytogenetics, B460 Physical anthropology, H341 Prehistory

Keywords: ancient DNA, DNA preservation, endogenous DNA, DNA damage.

Sisukord

Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Vana DNA uurimise ajalugu ja meetodid.....	7
1.1.1 Esimene imetaja vana DNA genoom	8
1.1.2 Esimene inimese vana DNA genoom.....	9
1.1.3 Vana DNA uurimise ajalised piirangud	9
1.2 DNA säilimist mõjutavad tegurid ja uurimistingimused	10
1.2.1 Enamlevinud vana DNA kahjustused	11
1.2.2 DNA säilimine erinevates bioloogilistes materjalides	11
1.2.2.1 DNA säilimine luudes ja hammastes	11
1.2.2.2 DNA säilimine karvades.....	16
1.2.3 DNA säilimist mõjutavad keskkonnategurid	17
1.2.4 Vana DNA uurimiseks vajalikud tingimused.....	18
2. Uurimus	19
2.1 Töö eesmärk.....	19
2.2 Materjal ja meetoodika	19
2.2.1 Hambaproovid, mille andmeid kasutati	19
2.2.2 Statistiline analüüs: Studenti t-test	19
2.3 Tulemused ja arutelu.....	20
2.3.1 Ajaperioodi ja endogeense DNA sisalduse seos	20
2.3.2 Ajaperioodi ja C→T asenduste osakaalu vaheline seos.....	22
2.3.3 Proovi välimuse kirjelduse ja endogeense DNA sisalduse seos	24
Kokkuvõte	29
Summary.....	30
Kasutatud kirjandus	32
Lisad	36

Lisa 1. Koondtabel.....	36
Lihlitsents	40

Kasutatud lühendid

aDNA – vana DNA (ingl. k. *ancient DNA*)

BP –enne kaasaega (ingl. k. *before present*)

bp – aluspaar (ingl. k. *base pair*)

Gb – gigaalus, miljard nukleotiidi (ingl. k. *Gigabase*)

mtDNA – mitokondriaalne DNA

NGS – teise põlvkonna sekveneerimine (ingl. k. *next generation sequencing*)

qPCR – kvantitatiivne reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon (ingl. k. *quantitative polymerase chain reaction*)

SNP – ühenukleotiidne polümorfism (ingl. k. *single nucleotide polymorphism*)

Sissejuhatus

Ajaloo uurimiseks otsitakse pidevalt uusi ja täpsemaid meetodeid. Teadmine, millised geneetilised muutused on aja jooksul toimunud, on heaks eelduseks, et aru saada, miks uuritavad organismid on sellised, nagu nad praeguseks on. Üheks selliseks meetodiks on vana DNA (ingl. k. *ancient DNA*, *aDNA*) uuringud. Need võimaldavad geneetiliselt tasandil vaadata, mis on minevikus toimund. Sealt saab informatsiooni nii isendi genotüübi kui fenotüübi kohta ning lisaks näiteks ka haiguste kohta, mida vaadeldav indiviid põdes.

Kuna vana DNA eraldamine on keeruline ja kogused on väga väikesed, siis tuleb hoolikalt vaadata tingimusi, kus vaadeldav proov on olnud ning millisest materjalist proov võtta. Lisaks tuleb proovi võtta nii, et kahju säilmetele oleks minimaalne. Labor, kus DNA-d eraldatakse, peab olema väga puhas, et proovi ei satuks uurija enda DNA-d ega muud saastust.

Käesoleva töö eesmärgiks on anda kirjanduse alusel ülevaade erinevatest vana DNA uuringutest ning millistes tingimustes viibinud ja millistest bioloogilistest materjalidest pärinevat DNA-d on neis suudetud uurida. Samuti analüüsitakse põhilisi kahjustusi, mis vana DNA-l surmajärgselt võivad tekkida, ning põhjusi, mis teevad geneetilise informatsiooni kättesaamise proovidest keeruliseks. Antakse ülevaade vana DNA säilimistingimustest ja säilimist segavatest faktoritest, mis peaks andma meile teadmise, millisest materjalist, millistest tingimustest ning millise visuaalse säilimisastmega materjalidest saab vana DNA-d kõige paremini kätte.

Töö teises pooles analüüsitakse Tartu Ülikooli evolutsioonilise bioloogia töögrupi liikmete poolt Eesti Biokeskuse tuumiklaboris uuritud hammaste vana DNA tulemusi. Uuritakse endogeense DNA sisalduse sõltuvust proovi vanusest (ajaperioodist) ja hammaste välimusest ning seost C→T kahjustuste osakaalu ja proovi vanuse vahel. Saadavate statistiliste tulemustega üritatakse kinnitada või ümber lükata järgmisi artiklites esitatud väiteid: uuemast proovist saab rohkem endogeenset DNA-d, vanemas proovis on rohkem C→T kahjustusi ning parema väljanägemisega proovist saab rohkem endogeenset DNA-d.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Vana DNA uurimise ajalugu ja meetodid

Arvatakse, et umbes 99% kõikidest Maal elanud liikidest on tänapäevaks välja surnud (Römpler *et al.*, 2006). Selleks, et aimu saada, milliseid liigid on Maal elanud, milline on olnud nende elu ja kui kaugemale on nad rännanud, tuleb uurida Maa bioloogilist ajalugu. Just vana DNA uuringud aitavad meil mõista minevikku. Saame informatsiooni erinevatest liikidest, k.a. liikidest, mis on juba välja surnud (nt mammutid), samuti inimeste esiisade kohta.

Vana DNA-ks loetakse surnud organismist pärit DNA-d, milles on hakanud toimuma lagunemise protsessid (Herrmann ja Hummel, 1994). Nagu eelnevalt öeldud, on selle uurimine oluline, et mõista, kuidas on organismid aja jooksul muutunud. See annab aimu minevikus elanud isendite genotüübiliste ja fenotüübiliste tunnuste, päritolu ning rännete kohta. Näiteks on võimalik vana DNA uuringute abil kindlaks määrata indiviidi juuste ja silmade värvi (Rasmussen *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2012). Lisaks on võimalik uurida, mis haigusi uuritav indiviid on oma eluajal põdenud (Rasmussen *et al.*, 2010). Peale loomade ja inimeste on vana DNA abil võimalik uurida veel ka näiteks taimede evolutsioonis toimunud muutusi (Jaenicke-Despres *et al.*, 2003).

Uurimise teeb raskeks kvaliteetse materjali vähesus ja endogeense DNA ehk uuritava isendi DNA eraldamine materjalist. Lisaks uuritava indiviidi DNA-le on seal suure tõenäosusega veel mikroobide, seente, viiruste ja/või tänapäeva inimese DNA-d (Poinar *et al.*, 2006). Paljudel juhtudel on endogeense DNA sisaldus fossiilis ~1% või isegi vähem (Pinhasi *et al.*, 2015). Uurimise teeb keeruliseks ka materjali kättesaadavus. Näiteks kaljuluu uurimisel tuleb arvestada kahe asjaoluga: esiteks ühes koljus on ainult 2 kaljuluud ehk materjali kogus on piiratud ning teiseks tuleb selle kättesaamiseks koljusse auk teha, aga kuna tegemist on väärtusliku materjaliga, siis ei taheta seda nii lihtsalt lõhkuda (Hansen *et al.*, 2017).

Viimase 10 aasta tehnoloogilised avastused on teinud võimalikuks vana DNA uurimise. Varasemad seadmed olid nõudlikud nii ajakulu kui hinna osas (Der Sarkissian *et al.*, 2015). Proovi tuli mitu korda PCR-i abil paljundada ning lisaks tuli paljundamisel kasutada veel ka bakteriaalseid vektoreid (Hofreiter *et al.* 2001). Selleks, et olla kindel, kas saadud DNA sekveneerimise tulemus oli ikka õige, tuli seda protseduuri korrata ka mõnes teises laboris (Cooper ja Poinar, 2000). Alles siis, kui ka teises laboris suudeti sama tulemust korrata, sai kindlalt väita, et leitud DNA näol on tegemist uuritava indiviidi DNA-ga, mitte aga saastusega.

Algselt uuriti põhiliselt mitokondriaalset DNA-d (mtDNA) (Der Sarkissian *et al.*, 2015). mtDNA oli lihtsam sihtmärk, kuna sellel on rakus kõrgem koopiate arv (~500 mtDNA molekuli inimese raku kohta) ning suurem tõenäosus organismi surmajärgsete DNA kahjustuste kuhjumisele vaatamata alles jääda (Handt *et al.*, 1994). Raku surma järel, kui toimub tsütoplasma ja organellide lagunemine ning dehüdratsioon, on mtDNA paremini kaitstud just tänu oma kahekordsele membraanile (Gilbert *et al.*, 2006). Tänu teaduse ja tehnoloogia arengule on tänapäeval võimalik vana DNA proovist sekveneerida kogu genoom. Kui varasemate meetoditega sai siduda ainult kindlaid järjestusi, siis teise põlvkonna sekveneerimine (NGS) võimaldab siduda kõik proovis leiduvad erinevad lühikesed ning kahjustunud DNA fragmendid sekveneerimisraamatukogusse. NGS-i puhul immobiliseeritakse DNA ahelad alusele. Tänu sellele on võimalik teha tuhandeid kuni miljoneid sekveneerimise reaktsioone samaaegselt. NGS-meetodi eeliseks ongi selle võimekus toota lühikese ajaga suures koguses järjestusi (Metzker, 2010), samas tehes sekveneerimise odavamaks ja ka kiiremaks kui varasemad meetodid. Võimalus teha DNA raamatukogusid üheaahelalisest DNA-st on samuti aidanud kaasa vana DNA uurimisele (Meyer *et al.*, 2012).

1.1.1 Esimene imetaja vana DNA genoom

Esimene imetaja, kelle vana DNA genoomi suures mahus sekveneeriti, oli mammut. 2006. aastal uurisid Poinar ja kolleegid (Poinar *et al.*, 2006) materjali, mis pärines Venemaal Siberis Jakutski oblastis Khatanga linnas asuvast Mammuti muuseumist. Luuproovid võeti 8 paremini säilinud mammutilt. Proovist eraldati vana DNA, mida paljundati kvantitatiivse PCR meetodiga (qPCR). Selleks kasutati Aafrika ja Aasia elevanti primereid, mis olid disainitud mitokondriaalse DNA (mtDNA) molekuli paljundamiseks. Parim tulemus saadi ühe Taimõri järve Baikuraturku lahe kaldalt pärit mammuti hambutust alalõualuust. Pleistotseeni ajast pärit luu oli hästi säilinud tänu Taimõris valitsenud kliimale: ekstreemselt külmad talved, lühikesed jahedad suved ja vähene sademete hulk. Seejärel eraldati 1g luumaterjalist metagenoomne DNA, millest kontsentreeriti 100µl DNA lahust, millest valmistati DNA raamatukogu. Töö autoritel õnnestus sekveneerides genereerida 302 692 järjestust, keskmise pikkusega 95 aluspaari (bp). Esialgse fragmendi pikkus pärast lõikamist oli 630 bp. Töö tulemusena saadi 28×10^6 bp DNA-d, millest endogeenne DNA moodustas 13×10^6 bp (45,4%). Endogeense DNA kattuvus Aafrika elevanti DNA järjestusega oli suurem kui Aasia elevanti omaga, mis näitas ühtlasi ka seda, et Aafrika elevant on mammutiga lähedasemas suguluses kui Aasia elevant (Poinar *et al.*, 2006).

2007. aastal eraldati vana DNA ka mammuti karvaproovist (Miller *et al.*, 2008). Tegemist oli Siberist pärit ~20 000 aastat vana mammuti prooviga, millest sekveneeriti 2,982 miljardit

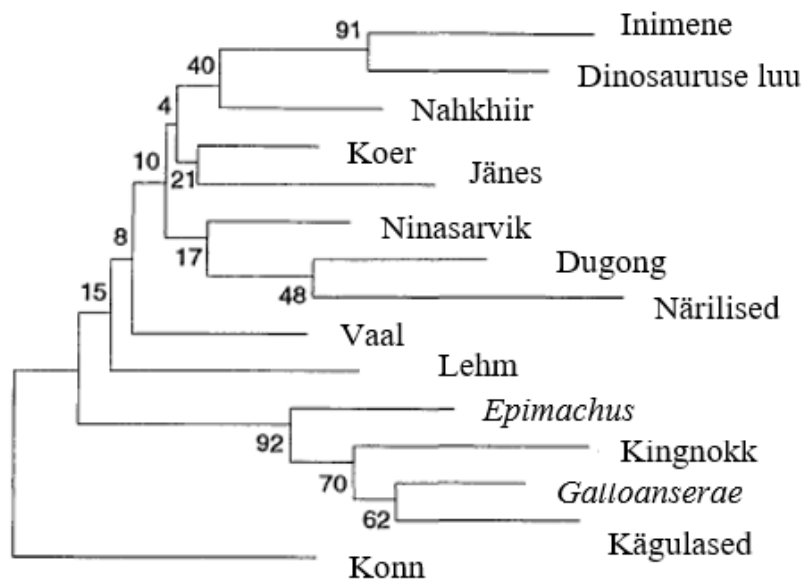
nukleotiidi (Gb) informatsiooni. Koos teiste mammuti proovidega saadi kokku 4,168 Gb pikkune järjestus, millest 80% moodustas mammuti DNA. Leiti, et mammuti ja Aafrika elevandi valkude aminohappeline järjestus oli 99,4% ulatuses identne (Miller *et al.*, 2008).

1.1.2 Esimene inimese vana DNA genoom

Esimene inimese vana DNA proov sekveeriti 2008. aastal. Tegemist oli 4000 aastat vanade igikeltsas säilinud juustega Gröönimaalt, mis kuulusid Saqqaqi paleoeskimo kultuuri meessoost indiviidile. Saadi esimene terviklik vana mtDNA genoom (Gilbert *et al.*, 2008). Proov oli piisavalt hea, et sellest sai sekveerida ka nukleaarse genoomi (Rasmussen *et al.*, 2010). Eraldatud materjalist moodustas endogeenne DNA 80%. Neil õnnestus katta 79% inimese genoomist ning nad hindasid, et teoreetiliselt oleks kasutatud meetodiga võimalik katta 85-87% genoomist, seega oli nende tulemus maksimaalsele päris lähedal. Ühenukleotiidsete polümorfismide (SNP) abil uurisid nad ka antud indiviidi fenotüübilisi tunnuseid. Näiteks said nad oma uurimisest teada, et antud indiviidil oli A+ tüüpi veri. Lisaks leiti, et tal ei olnud eurooplasele tüüpilist heledat nahka, tal olid tumedad ja tihedad juuksed ning tal oli risk kiilanemisele. See uurimistöö tõestas, et antud proov oli piisavalt hea, et teha populatsioonigeneetilisi analüüse ning kirjeldada fenotüübilisi tunnuseid mitu tuhat aastat tagasi elanud inimesel. Uurimistöö andis selgust ka inimeste rännete kohta: uuritav indiviid oli geneetiliselt lähedasem kaasaegsetele tšuktši ja korjaki populatsioonidele Põhja-Siberist kui tänapäevastele Gröönimaa inuitidele (Rasmussen *et al.*, 2010).

1.1.3 Vana DNA uurimise ajalised piirangud

1994 väitsid Woodward ja tema töörühm (Woodward *et al.*, 1994), et nad suutsid eraldada vana DNA 80 miljonit aastat vana dinosauruse luu fossiilist. Aasta hiljem lükati see väide ümber. Hedges ja Schweitzer (Hedges ja Schweitzer, 1995) tõid välja, et fülogeneetiliselt oli Woodwardi eraldatud DNA lähedasem inimesele (joonis 1), näidates, et eraldatud DNA näol oli tegemist saastusega. Lisaks tõid nad välja asjaolu, et saadud tulemust ei ole kinnitatud mõnes teises laboris.



Joonis 1. Tetrapoodide tsütokroom b DNA järjestuste fülogeneesipuu. Numbrid sõlmede juures näitavad *bootstrap* meetodil saadud statistilist tõenäosust, et antud harude morfoloogia on tõene. (Kohandatud: Hedges ja Schweitzer, 1995).

Mitu aastat loeti vanimaks sekveneeritud mtDNA genomiks Norrast Svalbard'i saarestikust Poolepynten'i pankrannikult leitud jääkaru vasakust alalõualuust eraldatud DNA-d (Lindqvist *et al.*, 2010). Selle vanuseks määrati 110 000 – 130 000 aastat, paigutades selle luufragmendi Viimase jääaja aegsesse aega (Ingólfsson ja Wiig, 2008).

2013. aastal avaldasid aga Orlando jt. (Orlando *et al.*, 2013) artikli, kus nad teatasid, et on suutnud eraldada vana DNA 2003. aastal Kanada Kesk-Lääne Yukon'i territooriumilt Thistle'i oja lähedalt leitud hobuse jäsemeluu fossiilist. Luu vanuseks määrati 560 000 – 780 000 aastat enne kaasaega (BP), mis teeb sellest praeguseks vanima vana DNA proovi.

1.2 DNA säilimist mõjutavad tegurid ja uurimistingimused

Pärast surma hakkavad organismid erinevate mikroorganismide koostöö tulemusena lagunema. Seejuures hakkab lagunema ka vaadeldava organismi DNA. Aja möödudes saastub organismi DNA erinevate mikroobide, seente ja muude organismide DNA-ga (Poinar *et al.*, 2006). Oma osa on ka loomadel, näiteks putukatel ja selgroogsetel, kes laibast toituvad, jättes sinna oma DNA-d. Samuti võivad proovi saastada säilmeid uurivad inimesed. Selle kõige tulemusena on uuritavad proovid tegelikult segu paljude erinevate organismide DNA-st. Seda arvesse võttes tuleks uurimiseks valida selline materjal, kust on kõige suurema tõenäosusega võimalik endogeenset DNA-d kätte saada. Lisaks saastumisele tuleb arvestada ka mitmete muude teguritega: näiteks erinevate DNA kahjustustega ja keskkonnatingimustega, kus proov on olnud.

1.2.1 Enamlevinud vana DNA kahjustused

Surmajärgselt hakkab DNA lagunema ning tekivad erinevad kahjustused. DNA ahelate katkemist on rohkem täheldatud puriinide (adeniin, guaniin) naabruses. Depuriinimine on protsess, mille käigus lõigatakse lämmastikalus (puriin) desoksüriboosidest ja fosforhappejääkidest koosneva DNA „selgroo“ küljest ära. Puuduva lämmastikaluse tõttu tekib ahelasse nõrgem koht ning seal tekib kergemini katkestus (Briggs *et al.*, 2007). DNA fragmendid, mis on lagunenu väiksemaks kui 30bp, eemaldatakse andmestikust, kuna neid ei ole võimalik usaldusväärset referentsgenoomile joondada – joonduda võivad ka teiste liikide DNA fragmendid (Saag *et al.*, 2017).

Tekkinud vana DNA fragmentide sekveneerimisjärjestustes leidub hulgaliselt ka nukleotiidide transitsioone (C→T 5' ja G→A 3' otstes). C→T transitsioon on tingitud tsütosiini deamineerimisest ehk tsütosiinilt eemaldatakse aminorühm, mille tulemusena saab sellest uratsiil (Briggs *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2010; Hofreiter *et al.*, 2001). Kuna DNA ahela ehituses uratsiil puudub, siis sünteesitakse sekvenaatoris selle asemel ahelasse tümiin. Tsütosiini transitsiooni (C→T) tulemusena sünteesitakse vastasahelasse guaniini asemel adeniin (G→A). Sellised kohad teevad evolutsiooniliste muutuste uurimise raskeks, kuna ei ole aru saada, kas tegemist on olnud evolutsiooni käigus tekkinud mutatsiooniga või hoopis surmajärgse vana DNA kahjustusega. Seepärast püütakse osades uuringutes enne vana DNA uurimist kindlaks teha kahjustatud kohad ning need uurimisest välja arvata (Rasmussen *et al.*, 2010). Üks viis kahjustuste vaatlemiseks on mapDamage programm (Ginolhac *et al.*, 2011). Ühtlasi aitavad kahjustused kindlaks teha, kas tegemist on ikka vana DNA või saastusega. Põhilised vana DNA-le omased tunnused, mille abil seda tuvastada, on lühikesed järjestused ja hulgaliselt nukleotiidide transitsioone (C→T 5' ja G→A 3' otstes) (Green *et al.*, 2009).

1.2.2 DNA säilimine erinevates bioloogilistes materjalides

Kuna tihtipeale on vana DNA erinevate võõrorganismide DNA-ga saastatud, siis on väga oluline teada, kust on kõige suurema tõenäosusega võimalik kätte saada endogeenset DNA-d. Tänapäeval eelistatakse vana DNA proove võtta kas hambast või võimalusel kaljuluust (Hansen *et al.*, 2017). Need kaks on siia maani näidanud kõige paremaid vana DNA sekveneerimise tulemusi. Proove on võimalik võtta ka näiteks juustest/karvadest (Miller *et al.*, 2008), koproliididest (Poinar *et al.*, 1998) ja merekarpidest (Der Sarkissian *et al.*, 2017).

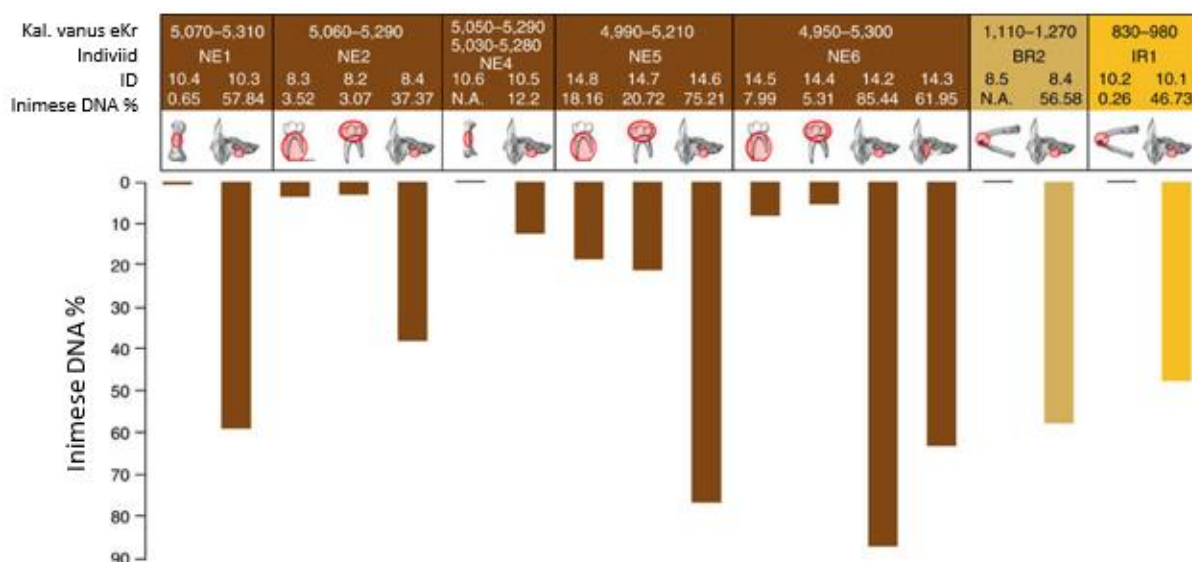
1.2.2.1 DNA säilimine luudes ja hammastes

Pärast surma hakkavad organismi enda ensüümid orgaanilist kudet lagundama. Sellele järgneb lagundamine mikroobide ja seente poolt. Selle tulemusena jääb järgi ainult ekso- või endoskelett ja keratiini sisaldavad elemendid nagu karvad ja suled. Luustikud säilivad paremini

kui pehme kude, mis tuleneb arvatavasti sellest, et vee ja ensüümide sisaldus luustikus on võrreldes pehme koega märksa madalam. Samuti on luustike eeliseks pehme koe ees see, et nende struktuur on mineraliseerunud ja kõva, tänu millele on nad paremini kaitstud ka mikroorganismide eest (Herrmann ja Hummel, 1994). Vana DNA uuringutes on eelistatud just tugevad, tihked luud, sest kuigi poorsed luud võivad samuti sisaldada suures koguses DNA-d, on see vähem tõenäoline (Prinz *et al.*, 2007).

Paljud luustikest võetud proovid sisaldavad kõigest ~1% endogeenset DNA-d, kuid leidub ka parema DNA säilivusega luid. Kõige sagedamini on kõrge endogeense DNA sisaldusega kaljuluud (Pinhasi *et al.*, 2015). Hanseni töögrupp (Hansen *et al.*, 2017) leidis, et uuritavast materjalist saadavat endogeense DNA hulka võib lugeda heaks, kui kogu eraldatud DNA-st moodustab see >10%.

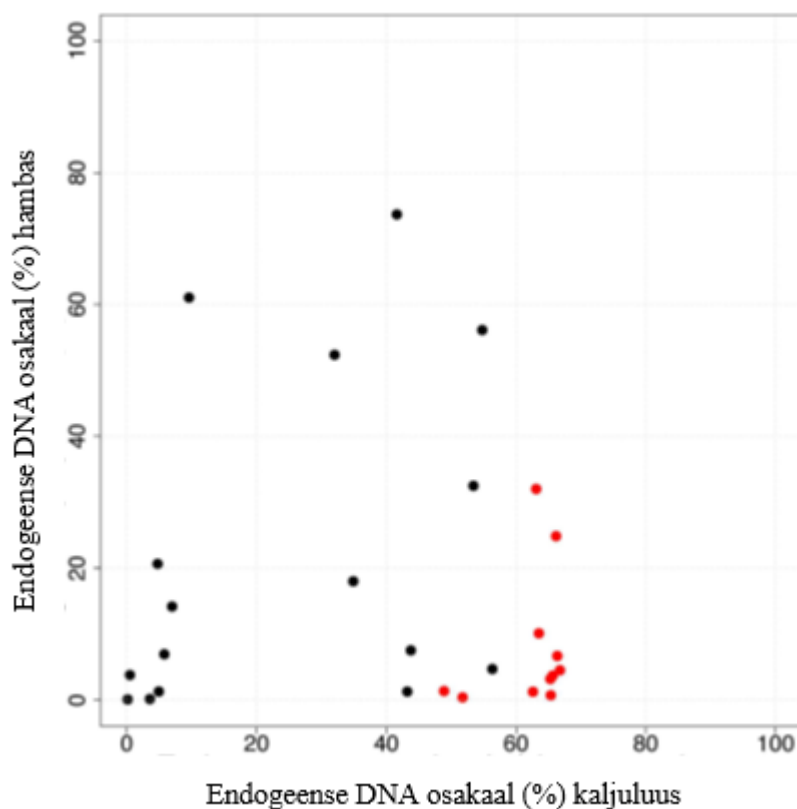
Gamba jt. (Gamba *et al.*, 2014) uurimistöö näitab, et võrreldes teiste luudega on kõige paremad tulemused saadud just kaljuluust. Tema töörühm uuris 13 Ungarist pärit indiviidi luustikke, mille vanused ulatusid varasest neoliitikumist (~5700 a. eKr) kuni rauaajani (~800 a. eKr). Neist seitsmele tehti võrdlev analüüs endogeense DNA sisalduse kohta. Gamba jt. võrdlesid omavahel kaljuluust ning vastava indiviidi mõnes teises luus leiduva endogeense DNA sisaldust (joonis 2). Kaljuluust saadud endogeense DNA hulk ületas hambast saadud DNA hulka 4 kuni 16 korda ja teiste luudega oli erinevus veelgi suurem (Gamba *et al.*, 2014).



Joonis 2. Kaljuluu võrdlus teiste luudega. Endogeense DNA protsent pärast sekveneerimist. Punase ringiga on märgitud luu osad, kust proov on võetud. N.A. viitab nendele proovidele, mille DNA raamatukogu kvaliteet ei olnud sekveneerimiseks piisavalt hea. (Kohandatud: Gamba *et al.*, 2014).

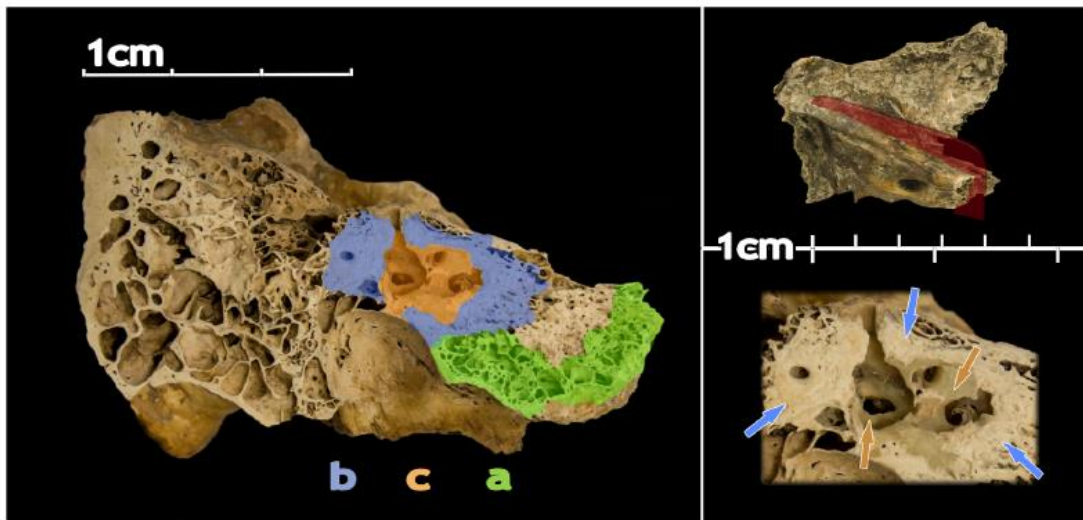
Häid tulemusi kaljuluust ja hammastest on saanud ka Hansen ja kolleegid (Hansen *et al.*, 2017). Kasutatavad materjalid olid erineva vanuse ja päritoluga ning materjali kvaliteedi hindamisel lähtuti hambal juuretsemendi olemasolust või puudumisest ning kaljuluul selle tugevusest lõikamisel. Hansen jt. (Hansen *et al.*, 2017) said uurimistöö tulemuseks, et endogeense DNA sisaldus hambas oli keskmiselt 16,4% ja kaljuluus 40%, näidates, nagu ka Gamba jt. (Gamba *et al.*, 2014), et kaljuluus on endogeense DNA sisaldus tunduvalt suurem kui hambas.

Võrreldes ühe ja sama indiviidi hambast ja kaljuluust saadava endogeense DNA kogust (joonis 3), sai luustikud jaotada kahte rühma: 1) luustikud, millel oli endogeense DNA sisaldus halb mõlemas materjalis ning 2) luustikud, millel endogeense DNA sisaldus oli hambas väiksem kui kaljuluus (Hansen *et al.*, 2017). Sellest tööst tuli lisaks välja, et kui hammas oli välimuselt hästi säilinud, siis kohati sai sealt parema proovi kui sama indiviidi kaljuluust. Kui aga hammas oli halvasti säilinud, siis oli endogeense DNA sisaldus seal palju madalam kui sama indiviidi kaljuluus (Hansen *et al.*, 2017). See näitab ühtlasi, et ainult hamba välimuse järgi ei saa kindlalt ennustada kaljuluust saadava endogeense DNA kogust. Samas võib väita, et hamba välimuse põhjal saab tuletada sealt saadava endogeense DNA hulka – välimuselt hästi säilinud hambast saab rohkem endogeenset DNA-d kui halvasti säilinust. Samuti sai teha järelduse, et halbadele keskkonnatingimustele on kaljuluu vastupidavam ja/või paremini kaitstud, kui seda on hamba juure tsement (Hansen *et al.*, 2017). Proovi välise vaatluse ja proovist saadava endogeense DNA koguse võrdlusel saadi tulemuseks, et visuaalne hinnang ja proovist saadav endogeense DNA kogus on 80% ulatuses vastavuses (Hansen *et al.*, 2017). Lisaks tuli Hanseni jt. (Hansen *et al.*, 2017) uurimistööst välja, et kaljuluus on tsütosiini deaminatsioonist (C→T) tingitud kahjustuse tase kõrgem kui hambas. Ajalisest aspektist vaadatuna oli vanemal hambal kahjustusi rohkem kui nooremal ning võrreldes hamba tsemendiga oli kaljuluus mtDNA/nukleaarse DNA suhe väiksem (Hansen *et al.*, 2017).



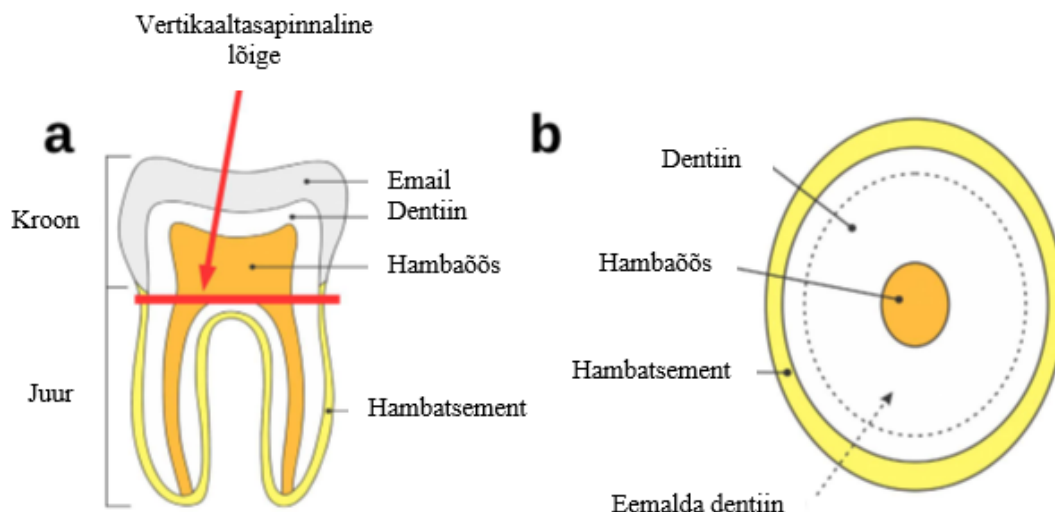
Joonis 3. Endogeense DNA sisaldus. Iga andmepunkt näitab sama indiviidi hamba tsemendi ja kaljuluu endogeense DNA omavahelist suhet. Punased punktid tähistavad proove, millel hamba proov oli välisel vaatlusel halb. (Kohandatud: Hansen *et al.*, 2017).

Kaljuluus on oluliseks DNA allikaks just luu sisemine osa (Hansen *et al.*, 2017), mida ka Pinhasi ja tema kolleegid (Pinhasi *et al.*, 2015) oma uurimistöös uurisid (joonis 4). Uurimistöös kasutasid nad 10 kaljuluu proovi, mis olid erineva vanusega ja pärit erinevatest luu osadest. Saadud tulemustest on näha, et kaljuluu tugevamast osast (osa C), mis moodustab luulise labürindi ehk teo, saadakse kõige paremad endogeense DNA tulemused. Seega on kõige parem võtta proov võimalusel just kaljuluu luulisest labürindist. Peale selle, et sealt on suurem võimalus kätte saada endogeenset DNA-d, on see ka oluline muu informatsiooni allikas. Kaljuluus olev luuline labürint areneb välja juba looteas (Jeffery ja Spoor, 2004). Lõplik luustumine toimub teise eluaasta lõpuks, pärast mida struktuurilisi ja keemilisi muutusi kaljuluus enam ei toimu (Jørkov *et al.*, 2009). Tänu sellele on kaljuluust võimalik strontsiumi isotoopide abil saada informatsiooni indiviidi geograafilise asukoha kohta ema raseduse ajal (Harving *et al.*, 2014). Samuti on võimalik saada andmeid varase lapsepõlve aegse toitumise kohta. Selle uurimine toimub lämmastiku ja süsiniku stabiilsete isotoobite kaudu (Jørkov *et al.*, 2009).



Joonis 4. Lõigatud vasaku kaljuluu mediaalne vaade. Suuremal fotol on erinevate värvidega ära näidatud uurimistöös kasutatavad kohad (A, B ja C). Üleval paremal pildil on näidatud lõikamise suunda. All paremal pildil on näidatud detailsemalt alad B ja C, millele viitavad vastavalt sinised ja oranžid nooled (Pinhasi *et al.*, 2015).

Hamba puhul võetakse proov eelistatult hamba juure osast (Hansen *et al.*, 2017), sest see on tsemendiga kaetud ning tänu sellele ka paremini kaitstud (joonis 5). Uurimismaterjali on võimalik võtta ka hamba dentiinist, sest see on pealt kaitstud emailiga ja alt juuretsemendiga (Adler *et al.*, 2011), vähendades seega keskkonnast tingitud kahjustuste ja saastatuse hulka. Võrreldes dentiiniga saab rohkem DNA-d kätte ikkagi hamba tsemendist, eriti just hamba juure tipu osast, sest seal on tsemendi hulk suurem (Adler *et al.*, 2011).



Joonis 5. Hamba ehitus. a. hamba ehitus ja vertikaaltasapinna lõike asukoht, b. hamba juure vaade vertikaaltasapinnilt. (Kohandatud: Damgaard *et al.*, 2015).

Teadmine, et hambajuurest ja eriti just tsemendi osast, saab kätte rohkem vana DNA-d kui hambakroonist, on oluline, sest see aitab säästa hambakrooni, millelt saab hiljem teha vaatlusi morfoloogiliste tunnuste jaoks. Juurest eemaldatud dentiinist (joonis 5b) saab teha stabiilsete isotoopide analüüse ning radiosüsiniku abil saab kindlaks määrata proovi vanuse (Damgaard *et al.*, 2015).

1.2.2.2 DNA säilimine karvades

Peale luumaterjalide on vana DNA-d võimalik eraldada ka juukse- ja karvaproovidest. Enamasti on juukse/karva proovidel kasutatud DNA saamiseks juure osa, kuna karvad ise koosnevad surnud keratiinist ja seal leidub DNA-d vähe (Gilbert *et al.*, 2007). On mitmeid põhjuseid, miks mõnikord eelistatakse juukse- või karvaproove luuproovidele. Esiteks, kui juuksematerjal on säilinud, siis on see heaks alternatiiviks luudest ja hammastest proovi võtmisele, sest viimane võib hävitada säilmete olulised morfoloogilised tunnused. Teiseks on juustes palju keratiini, mis kaitseb DNA-d ning tänu sellele on ka mtDNA tase nendes rakkudes suurem kui teistes kudedes (Gilbert *et al.*, 2007). Kolmandaks on täheldatud, et juukseproovide DNA uurimisel on leitud vähem saastet. See viitab sellele, et juuksed on kas vastupidavamad välisele saastusele või on neid lihtsam eksogeensest DNA-st puhastada (Gilbert *et al.*, 2004). Lisaks on täheldatud, et võrreldes luudega on karvades vähem tsütosiini deaminatsioonist tingitud kahjustusi: karvades 0,24% ja luudes 1,7% (Gilbert *et al.*, 2007).

2006. aastal viisid Gilbert jt. (Gilbert *et al.*, 2006) läbi katse, kus nad saastasid juukseproovid verega, süljega, kokkupuutel inimesega ning kastsid proovid puhta DNA lahusesse. Seejärel proovid puhastati ja kontrolliti nende DNA sisaldust. Enamikust proovidest ei leitud jälgi saastatusest, tõestades veelkord juuste vastupidavust välistele saastajatele. Erandiks olid kaks kõige rohkem lagunenuid proovi, mida vannitati süljes. Neil leidis lisaks doonori järjestusele ka teisi järjestusi (Gilbert *et al.*, 2006).

Juusked ja karvad on seega heaks DNA allikaks. Karvas olevad hüdrofoobsed valgud ning keratiini pakitud rakud moodustavad veekindla kaitse. See on arvatavasti ka põhjus, miks eksogeenne DNA ei pääse nii lihtsalt juuste sisse. Juuksekarva lagunemisel tekkiv poorsus lubab ära puhastada kogu võõr-DNA (Gilbert *et al.*, 2006).

Karvadest on eraldatud endogeenset DNA-d nii mammutitelt kui inimestelt. 2007. aastal eraldasid mammuti karvaproovist endogeense DNA Miller jt. (Miller *et al.*, 2008) ja 2008. aastal uurisid mammuti karvu Gilbert ja tema kolleegid (Gilbert *et al.*, 2008). Nad analüüsid igikeltsast leitud 5 mammuti karvaproove ning koos varasemalt teadaolevate proovide tulemustega panid kokku ühe suurima vana mtDNA andmestiku. Lisaks on üritatud uurida ka

mammuti karvade värvust. Uurimise tulemuseks saadi, et karvade värvi poolest olid mammutid polümorfsed: esines nii heleda kui tumeda karvaga isendeid (Römpler *et al.*, 2006).

2008. aastal eraldati ka inimese juuksekarvast mitokondriaalne genoom (Gilbert *et al.*, 2008). Uuritav proov oli piisavalt hea, et sai uurida ka tuumagenoomi ning määrata nii indiviidi juuksevärvi kui ka veregruppi (Rasmussen *et al.*, 2010). Samuti on juuksekarvadest saadud informatsiooni rännete ja päritolu kohta. 2011. aastal eraldati vana DNA Austraalia aborigeeni 100 aasta vanusest juukseproovist. Juuste uurimisel saadi kinnitust hüpoteesile, et tänapäeva aborigeenid põlvnevad esimestest Austraalsesse sisserännanud inimestest (Rasmussen *et al.*, 2011).

1.2.3 DNA säilimist mõjutavad keskkonnategurid

Kõige paremini säilib DNA külmades kuivades tingimustes. Sellised tingimused valitsevad näiteks igikeltsas ja kõrgmäestike koobastes (Wayne *et al.*, 1999). Igikeltsast pärineb ka juuste proov, millest sekveeriti esimene inimese vana DNA genoom (Gilbert *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2010). Esimese imetajana sekveeritud Taimõrilt pärit mammuti genoomi proov oli samuti säilinud tänu sealsele kliimale (Poinar *et al.*, 2006).

Üheks tuntumaks inimese leiuks on 1991. aastal Itaalia Ötztali alpidest leitud inimese surnukeha, mis oli osaliselt kaetud jää ja lumega. Tegemist oli 5300 aasta vanuse pronksiajast pärit indiviidiga, keda hakati leiukoha järgi nimetama Ötziks. Handt jt. (Handt *et al.*, 1994) võtsid jäämehest 8 proovi (lihaskoost, side- ja luukoost). Sekveeritud ~200 bp pikkune mtDNA järjestus oli kõige lähedasem tänapäeva eurooplastele (Alpidest põhja poole) (Handt *et al.*, 1994). Praeguseks on Ötzi täisgenoom sekveeritud 7,6-kordse katvusega ning on teada saadud, et autosoomiandmete tuginedes sarnaneb jäämees enim tänapäeva sardiinlastele. Lisaks järeldati, et Ötzil olid arvatavasti pruunid silmad, ta kuulus 0+ veregruppi ning tal oli laktoositalumatus. Proovist eraldatud järjestuse sekveerimisel leiti lisaks 60%-line kattuvus *Borrelia burgdorferi* bakteriga, mis põhjustab borrelioosi, tehes Ötzist teadaolevalt ühe varasema inimese, kes on seda haigust põdenud (Keller *et al.*, 2012).

Kuumast kliimast pärit proovidest üldiselt vana DNA-d ei leita või on kogused uurimiseks liiga väikesed. Egiptuse muumiatest on väidetavalt saadud vana DNA-d juba aastaid tagasi (Zink ja Nerlich, 2003), aga Gilbert jt. (Gilbert *et al.*, 2005) lükkasid need tulemused ümber, tuues põhiliseks põhjuseks seal valitseva kliima, mis on lagunemist soodustav. 2017. aastal tõestasid aga Schuenemann ja tema kolleegid (Schuenemann *et al.*, 2017), et Egiptuse muumiatest on NGS meetodikaga ikkagi võimalik vana DNA-d eraldada. Lisaks näitasid Pinhasi jt. (Pinhasi *et al.*, 2015), et soojast kliimast pärit kaljuluudest on võimalik endogeenset DNA-d kätte saada.

Samuti on endogeenset DNA-d eraldatud aastaid toatemperatuuri olnud juukseproovidest, näidates, et ka muuseumides olevatest proovidest on võimalik DNA-d kätte saada (Gilbert *et al.*, 2007).

Vana DNA eraldamine põletatud luudest ei ole seni tulemusi andnud (Hansen *et al.*, 2017). Samuti on ebatõenäoline vana DNA-d eraldada soodest leitud luustikest, sest happeline ning liigniiske keskkond mõjub DNA-le kahjustavalt (Lynnerup, 2015).

Fossiili termaalne režiim sõltub keskmisest temperatuurist ja selle temperatuuri kõikumisest keskmise ümber. Kuna aja jooksul on temperatuur kliimamuutuste tõttu palju kõikunud, tuleb seda arvesse võtta temperatuuriga seotud uuringute tegemisel. Materjali leiukoha termaalse ajaloo uurimine on oluline, et teada, kui tõenäoliselt on DNA proovis säilinud (Smith *et al.*, 2003).

1.2.4 Vana DNA uurimiseks vajalikud tingimused

Nagu eelnevalt öeldud, on vana DNA saastatud teiste organismide DNA-ga (Poinar *et al.*, 2006). Selleks, et sinna ei satuks DNA eraldamise ja sekveneerimisraamatukogude tegemise käigus veel lisaks uurija enda või muude organismide DNA-d, peab labor olema väga puhas. Vana DNA labor peaks asuma teistest DNA-ga tegelevatest laboritest eraldi, et sinna ei kantaks sisse võõrdNA-d (PCR-i produkte jms) (Knapp *et al.*, 2012). Samuti on soovitatav vana DNA laboris erinevaid protsesse läbi viia eri ruumides, et vähendada osakeste kandumist ühelt materjalilt teisele. Kuna kogu tegevus peab olema väga puhas, siis on ka laboris töötavad teadlased kaitseülikonnas ning kannavad maski, juuksevärku ja spetsiaalseid jalanõusid puhtuse hoidmiseks. Kuna laboris tuleb tihti kindaid vahetada, siis on korraga käes 2 paari kindaid, et vähendada ohtu naha paljastamiseks ja labori saastamiseks. Laborit puhastatakse DNA-d lõhkuvate kemikaalidega ja traditsiooniliselt ka UV valgusega, mistõttu peavad ruumides kasutatavad tööpinnad ja materjalid olema nendele tingimustele vastupidavad (Knapp *et al.*, 2012). Samas tuleb arvestada, et DNA lagundamise efektiivsus väheneb UV lambist kaugenedes, seega laes olevad lambid ei ole tööpindade puhastamiseks praktilised (Champlot *et al.*, 2010).

2. Uurimus

2.1 Töö eesmärk

Antud töö eesmärgiks oli kinnitada või ümber lükata järgmisi artiklitest lähtuvaid väiteid: nooremast proovist saab rohkem endogeenset DNA-d, parema väljanägemisega proovist saab rohkem endogeenset DNA-d ning vanemas proovis on rohkem C→T kahjustusi.

Keskendutakse kolmele võrdlusele:

1. Ajaperioodi ja endogeense DNA sisalduse seos.
2. Ajaperioodi ja C→T asenduste osakaalu vaheline seos.
3. Proovi välimuse kirjelduse ja endogeense DNA sisalduse seos.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Hambaproovid, mille andmeid kasutati

Antud töös analüüsiti Tartu Ülikooli (TÜ) Genoomika Instituudi Eesti Biokeskuse evolutsioonilise bioloogia grupi liikmete poolt uuritud 141 hamba vana DNA tulemusi (lisa 1). Kõik proovid, peale ühe Egiptuse mummia hamba, pärinesid parasvöötimest (Eesti, Läti, Valgevene, Venemaa, Kasahstan). DNA on eraldatud TÜ zooloogia osakonna vana DNA laboris ja Cambridge'i Ülikooli vana DNA laboris ajavahemikus 11.01.2016 – 19.02.2018. Proovid on sekveneeritud Eesti Biokeskuse tuumiklaboris ja analüüsitud TÜ arvutiklastris.

Ajaperioodi ja endogeense DNA sisalduse võrdluses ning C→T asenduse osakaalu ja ajaperioodi vahelise sõltuvuse võrdluses kasutati 25 pronksiaja, 59 rauaaja ja 56 keskaja proovi. Proovi välimuse kirjelduse ja sellele vastava endogeense DNA sisalduse võrdluses kasutati 18 visuaalselt halvasti säilinud, 50 hästi säilinud, 22 väga hästi säilinud, 3 klaasjat ja 7 tumedat proovi.

2.2.2 Statistiline analüüs: Studenti t-test

Statistilise analüüsi tegemiseks kasutati Excelit ja Studenti t-testi sõltumatute ja erinevate dispersioonidega valimite võrdlemiseks mõeldud versiooni (*Two-Sample Assuming Unequal Variances*). Kasutati seda versiooni, kuna võrreldi kahte erinevat valimit, milles oli erinev arv proove ning väärtuste varieeruvus oli samuti erinev. Selles testis püstitati null-hüpotees, milles väideti, et kahe valimi võrreldavate tunnuste väärtuste keskmised on samasugused. Võrreldes kahte valimit sai seda väidet kas kinnitada või ümber lükata. Keskmised on oluliselt erinevad, kui t-statistiku absoluutväärtus on suurem kui kahe sabaga testi t-kriitiline väärtus ja kahe sabaga testi p-väärtus on väiksem kui testi tehes valitud piirväärtus (enamasti ja ka siin 0,05).

P-väärtus näitab tõenäosust, et vaadeldav tulemus on saadud juhuslikult. Antud analüüsis vaadati just kahe sabaga (ingl. k. *two-tail*) testi tulemusi, kuna taheti kontrollida ega kahe valimi väärtuste keskmised ei erine kummaski suunas.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Ajaperioodi ja endogeense DNA sisalduse seos

Töös võrreldi omavahel endogeense DNA keskmist sisaldust erinevatel ajaperioodidel elanud indiviidide proovides. Uurimises kasutati 25 pronksiajast, 59 rauaajast ja 56 keskajast pärinevat proovi.

Pronksi- ja rauaaja statistilisel võrdlemisel saadi tulemuseks, et nende ajaperioodide proovides oli keskmine endogeense DNA sisaldus sarnane ehk ei olnud statistiliselt oluliselt erinev (tabel 1). Rauaaja 59 proovi keskmine endogeense DNA sisaldus oli 25% ja pronksiaja 25 proovil 24%.

Tabel 1. Pronksiaja ja rauaaja endogeense DNA sisalduse võrdlus.

	Pronksiaeg	Rauaaeg
Keskmine	0,2351	0,2507
Dispersioon	0,0529	0,0736
Vaatluste arv	25	59
Hüpoteetiline keskmiste erinevus	0	
Vabadusastmed	53	
t-statistik	-0,2689	
p-väärtus (ühe sabaga)	0,3945	
t-kriitiline (ühe sabaga)	1,6741	
p-väärtus (kahe sabaga)	0,7891	
t-kriitiline (kahe sabaga)	2,0057	

Pronksi- ja rauaaja proovide liidetud valimite võrdlemisel keskaja proovidega saadi tulemuseks, et nende ajaperioodide proovide keskmised endogeense DNA sisaldused olid statistiliselt oluliselt erinevad (tabel 2). Pronksi- ja rauaaja 84 proovi keskmine endogeense DNA sisaldus oli 25% ning keskaja 56 proovil 36%. Oluline erinevus säilis ka ainult rauaaja proovide võrdlemisel keskaja proovidega (tabel 3).

Tabel 2. Pronksi- ja rauaaja ning keskaja endogeense DNA sisalduse võrdlus.

	Pronks+raud	Keskaeg
Keskmine	0,2461	0,3629
Dispersioon	0,0668	0,0813
Vaatluste arv	84	56
Hüpoteetiline keskmiste erinevus	0	
Vabadusastmed	110	
t-statistik	-2,4639	
p-väärtus (ühe sabaga)	0,0076	
t-kriitiline (ühe sabaga)	1,6588	
p-väärtus (kahe sabaga)	0,0153	
t-kriitiline (kahe sabaga)	1,9818	

Tabel 3. Rauaaja ja keskaja endogeense DNA sisalduse võrdlus.

	Rauaaeg	Keskaeg
Keskmine	0,2507	0,3629
Dispersioon	0,0736	0,0813
Vaatluste arv	59	56
Hüpoteetiline keskmiste erinevus	0	
Vabadusastmed	112	
t-statistik	-2,1585	
p-väärtus (ühe sabaga)	0,0165	
t-kriitiline (ühe sabaga)	1,6586	
p-väärtus (kahe sabaga)	0,0330	
t-kriitiline (kahe sabaga)	1,9814	

Saadud statistilised tulemused näitavad, et võrreldes pronksi- ja rauaajaga on keskaja proovides keskmine endogeense DNA sisaldus suurem. See kinnitab kirjanduse ülevaates kirjeldatud väidet, et uuematest proovidest saab suurema tõenäosusega rohkem endogeenset DNA-d kui vanematest. Samas tuleb silmas pidada, et iga üksiku proovi kohta see väide ei kehti, kuna vaadeldavate keskaja proovide madalaim endogeense DNA väärtus on 0,07% ning pronksi- ja rauaaja proovide kõrgeim 86,82% (lisa 1).

Pronksi- ja rauaaja keskmise endogeense DNA sisalduse omavahelisel võrdlusel statistiliselt olulist erinevust ei leitud. Ilmselt tuleneb see sellest, et pronksi- ja rauaaja leidude vanusevahe on ~500 aastat, mis on liiga lühike aeg, et vähemalt antud valimi suuruse juures keskmiste erinevust tuvastada. Samas nende perioodide ja keskaja ajaline erinevus on ~2000 aastat, mistõttu keskmiste erinevus on samuti suurem.

Saadud tulemused kinnitavad, et mida rohkem aega möödub, seda rohkem DNA laguneb ning väheneb tõenäosus, et endogeenset DNA-d on uurimiseks piisavalt palju ja piisavalt pikkade fragmentidena säilinud. See info on kasulik, kuna võimaldab sarnaste keskkonnatingimustega piirkondade proove hõlmavat vana DNA uuringut planeerides arvestada sellega, et kui tahta vanemast ajaperioodist analüüsisse kaasata sama suurt valimit kui nooremast ajaperioodist, tuleb suure tõenäosusega DNA-d eraldada rohkematest proovidest.

2.3.2 Ajaperioodi ja C→T asenduste osakaalu vaheline seos.

Võrreldi omavahel C→T asenduste osakaalu erinevate ajaperioodide lõikes. Uurimises kasutati 25 pronksiaja, 59 rauaaja ja 56 keskaja proovi.

Pronksiaja ja rauaaja C→T asenduste osakaalu võrdlemisel saadud keskmised olid statistiliselt sarnased (tabel 4). Pronksiaja 25 proovi keskmine C→T kahjustuste osakaal oli 12% ja rauaaja 59 proovil samuti 12%.

Tabel 4. Pronksiaja ja rauaaja C→T asenduste osakaalu võrdlus.

	Pronksiaeg	Rauaaeg
Keskmine	0,1221	0,1244
Dispersioon	0,0008	0,0019
Vaatluste arv	25	59
Hüpoteetiline keskmiste erinevus	0	
Vabadusastmed	69	
t-statistik	-0,2819	
p-väärtus (ühe sabaga)	0,3894	
t-kriitiline (ühe sabaga)	1,6672	
p-väärtus (kahe sabaga)	0,7789	
t-kriitiline (kahe sabaga)	1,9949	

Pronksi- ja rauaaja C→T asenduste osakaalu võrdlemisel keskaja proovidega saadi tulemuseks, et keskmised on statistiliselt oluliselt erinevad (tabel 5). Pronksi- ja rauaaja 84 proovis oli see osakaal 12% ning keskaja 56 proovis 7%. Oluline erinevus säilis ka ainult rauaaja ja keskaja proovide võrdlemisel (tabel 6).

Tabel 5. Pronksi- ja rauaaja ning keskaja C→T asenduste osakaalu võrdlus.

	Pronks+raud	Keskaeg
Keskmine	0,1237	0,0660
Dispersioon	0,0016	0,0006
Vaatluste arv	84	56
Hüpoteetiline keskmiste erinevus	0	
Vabadusastmed	138	
t-statistik	10,5715	
p-väärtus (ühe sabaga)	8,3939E-20	
t-kriitiline (ühe sabaga)	1,6560	
p-väärtus (kahe sabaga)	1,6788E-19	
t-kriitiline (kahe sabaga)	1,9773	

Tabel 6. Rauaaja ja keskaja C→T asenduste osakaalu võrdlus.

	Rauaaeg	Keskaeg
Keskmine	0,1244	0,0660
Dispersioon	0,0019	0,0006
Vaatluste arv	59	56
Hüpoteetiline keskmiste erinevus	0	
Vabadusastmed	93	
t-statistik	8,8346	
p-väärtus (ühe sabaga)	2,9840E-14	
t-kriitiline (ühe sabaga)	1,6614	
p-väärtus (kahe sabaga)	5,9679E-14	
t-kriitiline (kahe sabaga)	1,9858	

Saadud statistilised tulemused näitavad, et vanemates proovides on C→T asenduste osakaal suurem. Seega, mida rohkem aega möödub, seda rohkem on DNA-s kahjustusi.

Pronksi- ja rauaaja proovide C→T asenduste osakaal oli sarnane. See on arvatavasti sarnaselt endogeense DNA sisalduse peatükis nähtule tingitud sellest, et vaadeldavate perioodide ajaline erinevus oli väike.

Proovide vanuse võrdlus näitas, et mida vanema prooviga on tegemist, seda suurem on C→T asenduste osakaal DNA-s. Sellele tuginedes võib öelda, et C→T asenduste alusel vana DNA autentsust hinnates ei ole põhjendatud erinevate ajaperioodide jaoks sama piirväärtuse kasutamine – vanema proovi jaoks saastuse kahtlusi tekitav väärtus võib noorema proovi jaoks täiesti ootuspärane olla. Samas tuleb silmas pidada, et antud uurimuses võrreldi ainult kolme ajastu proove ning kahjustuste ja endogeense DNA sisaldus oli pronksi- ja rauaaja materjalis sarnane, seega ei saa nende andmete põhjal teha kindlaid üldistavaid järeldusi. Kindlamate

tulemuste saamiseks oleks vaja uurida rohkemaid ajaperioode ning proovide kogust suurendada.

2.3.3 Proovi välimuse kirjelduse ja endogeense DNA sisalduse seos

Järgnevalt võrreldi omavahel proovi välimuse kirjeldust ja endogeense DNA sisaldust proovis. Uurimuses kasutatavad proovid jaotati eraldamise käigus minu juhendaja ja tema kolleegide poolt kirja pandud kirjelduste järgi 5 rühma: halvasti säilinud (18 proovi; peamisteks märksõnadeks kuiv, kaltsifitseerunud, pude (ingl. k. *dry, calcified, brickle*), hästi säilinud (50 proovi; proovid, mille kohta ei tekkinud uurijatel ei negatiivseid ega eriliselt positiivseid kommentaare; märksõnaks ok), väga hästi säilinud (22 proovi; peamisteks märksõnadeks hästi säilinud (ingl. k. *well preserved*), klaasjad (3 proovi; proov veidi läbikumav nagu klaaskomm) ja tumedad (7 proovi; hambajuur seest tume) (lisa 1).

Väga hästi ja hästi säilinud proovide keskmise endogeense DNA sisalduse võrdlemisel statistiliselt olulist erinevust ei leitud (tabel 7). Väga hästi säilinud 22 proovi keskmine endogeense DNA sisaldus oli 25% ja hästi säilinud 50 proovil 34%.

Tabel 7. Väga hästi ja hästi säilinud proovide endogeense DNA sisalduse võrdlus.

	Väga hästi säilinud	Hästi säilinud
Keskmine	0,2515	0,3388
Dispersioon	0,0524	0,0760
Vaatluste arv	22	50
Hüpoteetiline keskmiste erinevus	0	
Vabadusastmed	48	
t-statistik	-1,3978	
p-väärtus (ühe sabaga)	0,0843	
t-kriitiline (ühe sabaga)	1,6772	
p-väärtus (kahe sabaga)	0,1686	
t-kriitiline (kahe sabaga)	2,0106	

Hästi ja väga hästi säilinud proovide võrdlemisel halvasti säilinud proovidega saadi tulemuseks, et keskmine endogeense DNA sisaldus on statistiliselt oluliselt erinev (tabel 8). Hästi ja väga hästi säilinud 72 proovi keskmine endogeense DNA sisaldus oli 31% ja halvasti säilinud 18 proovil 0,9%.

Tabel 8. Hästi ja väga hästi säilinud proovide võrdlus halvasti säilinutega endogeense DNA sisalduse alusel.

	Hästi+v.hästi	Halvasti säilinud
Keskmine	0,3121	0,0099
Dispersioon	0,0696	0,0002
Vaatluste arv	72	18
Hüpoteetiline keskmiste erinevus	0	
Vabadusastmed	73	
t-statistik	9,6632	
p-väärtus (ühe sabaga)	5,3714E-15	
t-kriitiline (ühe sabaga)	1,6660	
p-väärtus (kahe sabaga)	0,0000	
t-kriitiline (kahe sabaga)	1,9930	

Saadud statistilised tulemused näitavad, et proovi välimus ja sellest saadava endogeense DNA hulk on omavahel seoses: kui proov näeb välisel vaatlusel hea välja, saab sealt suure tõenäosusega kätte analüüsimiseks piisavas koguses endogeenset DNA-d. Halva välimusega ehk kuivadelt ja kaltsifitseerunud ning pudedatelt proovidelt üldiselt head endogeense DNA sisaldust ei ole oodata. Väga hästi ja hästi säilinud proovidelt saadava endogeense DNA hulk oli sarnane. Samas tuleb arvestada, et paratamatult on kirjeldused subjektiivsed ja ei ole erinevate eralduste vahel päris sõltumatud. Nii võib juhtuda, et kui korraga vaadatakse halvasti ja hästi säilinud proove, siis tunduvad hästi säilinud proovid isegi väga hästi säilinutena, aga kui kõik vaadeldavad proovid on head, siis jäävadki need pigem lihtsalt heaks, kuna neid ei ole millegagi vastandada.

Uuritavate proovide seas oli ka veidi läbikumavaid ehk klaasjaid ja seest tumedaid proove. Selleks, et teada saada, kas need proovid on pigem head või halvad, võrreldi neid hästi ja väga hästi säilinud proovidega ning halvasti säilinud proovidega.

Klaasjate proovide keskmise endogeense DNA sisalduse võrdlemisel hästi ja väga hästi säilinud proovide keskmise endogeense DNA sisaldusega sain tulemuseks, et keskmised endogeense DNA sisaldused on statistiliselt sarnased (tabel 9). Kolme klaasja proovi keskmine endogeense DNA sisaldus oli 52% ning hästi ja väga hästi säilinud 72 proovil 31%.

Tabel 9. Klaasjate proovide võrdlus väga hästi ja hästi säilinud proovide endogeense DNA sisaldusega.

	Klaasjas	Hästi+v.hästi
Keskmine	0,5202	0,3121
Dispersioon	0,0190	0,0696
Vaatluste arv	3	72
Hüpoteetiline keskmiste erinevus	0	
Vabadusastmed	3	
t-statistik	2,4369	
p-väärtus (ühe sabaga)	0,0464	
t-kriitiline (ühe sabaga)	2,3534	
p-väärtus (kahe sabaga)	0,0928	
t-kriitiline (kahe sabaga)	3,1824	

Klaasjate proovide keskmise endogeense sisalduse statistilisel võrdlemisel halvasti säilinud proovide keskmise endogeense DNA sisaldusega sain tulemuseks, et keskmised on oluliselt erinevad (tabel 10). Kolme klaasja proovi keskmine endogeense DNA sisaldus oli 52% ning halvasti säilinud 18 proovil 0,9%.

Tabel 10. Klaasjate proovide ja halvasti säilinud proovide endogeense DNA sisalduse võrdlus.

	Klaasjas	Halvasti säilinud
Keskmine	0,5202	0,0099
Dispersioon	0,0190	0,0002
Vaatluste arv	3	18
Hüpoteetiline keskmiste erinevus	0	
Vabadusastmed	2	
t-statistik	6,4106	
p-väärtus (ühe sabaga)	0,0117	
t-kriitiline (ühe sabaga)	2,9200	
p-väärtus (kahe sabaga)	0,0235	
t-kriitiline (kahe sabaga)	4,3027	

Statistilise analüüsi tulemused näitavad, et proovide klaasjas välimus ei viita halvale DNA säilimisele. Kuna aga vaadeldavas valimis oli selliseid proove ainult kolm, siis ei saa seda päris kindlalt väita.

Tumedate proovide keskmise endogeense DNA sisalduse võrdlemisel hästi ja väga hästi säilinud proovide keskmise endogeense DNA sisaldusega saadi tulemuseks, et keskmised on

statistiliselt sarnased (tabel 11). Seitsme tumeda välimusega proovi keskmine endogeense DNA sisaldus oli 21% ning hästi ja väga hästi säilinud 72 proovil 31%.

Tabel 11. Tumede proovide võrdlus väga hästi ja hästi säilinud proovide endogeense DNA sisaldusega.

	Tume	Hästi+v.hästi
Keskmine	0,2072	0,3121
Dispersioon	0,0384	0,0696
Vaatluste arv	7	72
Hüpoteetiline keskmiste erinevus	0	
Vabadusastmed	8	
t-statistik	-1,3062	
p-väärtus (ühe sabaga)	0,1139	
t-kriitiline (ühe sabaga)	1,8595	
p-väärtus (kahe sabaga)	0,2278	
t-kriitiline (kahe sabaga)	2,3060	

Tumede proovide keskmise endogeense sisalduse statistilisel võrdlemisel halvasti säilinud proovide keskmise endogeense DNA sisaldusega saadi tulemuseks, et keskmised on oluliselt erinevad (tabel 12). Seitsme tumeda välimusega proovi keskmine endogeense DNA sisaldus oli 21% ning halvasti säilinud 18 proovil 0,9%.

Tabel 12. Tumede proovide ja halvasti säilinud proovide endogeense DNA sisalduse võrdlus.

	Tume	Halvasti säilinud
Keskmine	0,2072	0,0099
Dispersioon	0,0384	0,0002
Vaatluste arv	7	18
Hüpoteetiline keskmiste erinevus	0	
Vabadusastmed	6	
t-statistik	2,6629	
p-väärtus (ühe sabaga)	0,0187	
t-kriitiline (ühe sabaga)	1,9432	
p-väärtus (kahe sabaga)	0,0374	
t-kriitiline (kahe sabaga)	2,4469	

Statistilise analüüsi tulemuseks saadi, et juure sisemuse tumenemine pigem ei ole märk madalast endogeense DNA sisaldusest. Kuna aga tumedaid proove oli ainult seitse, siis ei saa seda päris kindlalt väita.

Saadud statistilised tulemused näitavad, et proovi välimus on oluline indikaator selles sisalduva endogeense DNA hulga kohta. Hästi säilinud (valgetest, kõvadest) proovidest saab suurema tõenäosusega rohkem endogeenset DNA-d kui halvasti säilinud (kriitjatest, kuivadest, pudedatest) proovidest. Samuti tuli välja, et nii klaasja kui tumeda välimusega proovidest on võimalik saada kätte piisavas koguses endogeenset DNA-d. Samas tuleb selle statistilise analüüsi puhul arvestada asjaoluga, et klaasjaid ja tumedaid proove oli valimis vähe ning seega ei saa kindlalt väita, kui head materjalid need tegelikult on. Klaasjaid ja tumedaid proove võrdlesin sellegi poolest, et evolutsioonibioloogia grupi vana DNA tööühma liikmetele aimu anda, mida nendest proovidest vähemalt olemasolevate andmete alusel võiks oodata.

Antud analüüs kinnitab, et visuaalne vaatlus on Tartu Ülikooli evolutsioonibioloogia tööühma kasutatava materjali puhul olnud üsna usaldusväärne endogeense DNA sisalduse ennustamiseks. See tähendab, et visuaalse vaatluse alusel proovide uuringusse kaasamata jätmine on üldiselt põhjendatud. Samas iga individuaalse hamba kohta see ei kehti, nii et kui vaadeldav proov on oluline uurimisküsimuse vastamiseks, siis tasub sealt võimalusel ikkagi vana DNA proov võtta.

Kokkuvõte

Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli anda kirjanduse alusel ülevaade erinevatest vana DNA uuringutest: millistes tingimustes viibinud ja millistest bioloogilistest materjalidest DNA-d on suudetud eraldada. Teiseks eesmärgiks oli kontrollida artiklitest lähtuvaid väiteid, et nooremast proovist saab rohkem endogeenset DNA-d, parema väljanägemisega proovist saab rohkem endogeenset DNA-d ning vanemas proovis on rohkem C→T kahjustusi.

Töö esimeses pooles vaadeldi vana DNA uurimise ajalugu, imetaja ja inimese esimesi vana DNA genome ning vana DNA uurimise ajalisi piiranguid. Kirjeldati põhilisi vana DNA kahjustusi ning uuriti vana DNA säilimist luudes, hammastes ja karvades. Analüüsitud artiklite põhjal järeldati, et kõige paremaid endogeense DNA tulemusi annavad kaljuluu ja hambad. Häid tulemusi on saadud ka karvadest, aga kuna need tihti ei säili, kasutatakse neid vähem. Lisaks uuriti DNA säilimist mõjutavaid keskkonnategureid ja vana DNA uurimiseks vajalikke tingimusi. Selgus, et kõige paremini säilib vana DNA külmades kuivades keskkondades. Kuna suurema osa vana DNA proovist moodustab teiste organismide DNA ning endogeenset DNA-d on proovides tavaliselt vähe, siis peavad vana DNA uurimislaborid olema väga puhtad, et proovile ei lisanduks uurijate enda DNA-d ega muud saastust.

Töö teises pooles analüüsiti Tartu Ülikooli evolutsioonilise bioloogia töögrupi liikmete poolt uuritud hammaste vana DNA tulemusi. Ajaperioodi ja endogeense DNA sisalduse statistilisel võrdlemisel selgus, et nooremates proovides on endogeense DNA sisaldus keskmiselt suurem kui vanemates. C→T asenduste osakaalu ja ajaperioodi vahelise seose statistilisel analüüsil leiti, et nooremates proovides esineb keskmiselt rohkem C→T asendusi kui vanemates. Nende kahe võrdluse kokkuvõttes saab öelda, et mida vanem on proov, seda rohkem on selles C→T asendusi ning seda vähem õnnestub sellest eraldada endogeenset DNA-d. Hamba kvaliteedi visuaalse hinnangu ja endogeense DNA sisalduse võrdlusest on võimalik järeldada, et hamba halb välimus on üsna usaldusväärne vahend selle madala endogeense DNA sisalduse ennustamiseks. Lisaks selgitati välja, millise välimuse kategooria alla võiks liigitada tumeda ning klaasja välimusega hambad – mõlemat tüüpi proovid andsid (väga) hästi säilinutena kirjeldatutega sarnaseid endogeense DNA tulemusi. Samas tuleb arvestada asjaoluga, et antud proove oli statistilises analüüsis väga vähe ja seega ei saa kindlalt väita, et saadud tulemus kehtib kõikidele proovidele. Saadud tulemused võimaldavad evolutsioonibioloogia töögrupi liikmetel tulevikus paremini vana DNA uuringutesse kaasatavaid proove valida.

The correlation between the quality of an ancient DNA sample and its age or the visual assessment given to it

Kadri Irdt

Summary

Understanding the genetic changes that took place during evolution is important to understand why organisms are the way they are today. Therefore scientists are always looking for new methods for learning about evolution. One of these methods is studying ancient DNA (aDNA). Since extracting aDNA is difficult and materials are limited it is very important to know which conditions and which biological materials to extract from. This thesis gives an overview of these conditions and materials. The second aim of this study was to verify the claims made in articles that older samples contain more C→T substitutions, younger samples contain more endogenous DNA and samples that are considered to be well preserved by visual inspection contain more endogenous DNA.

In the first part of the thesis, I gave an overview of the history of aDNA studies, described the first successful aDNA extractions from mammalian and human samples and wrote about the time limitations of aDNA research. I also described the main damage patterns that occur in aDNA and told about aDNA preservation in bones, teeth and hair. I learned that samples from petrous bones or teeth are considered to be the best sources of endogenous DNA. Ancient DNA has been successfully extracted also from hair but the use of hair is not very common since it is often not preserved. I also studied how different environmental conditions affect aDNA preservation and which are the laboratory conditions required to study aDNA. It turned out that samples from dry and cold environments are considered to be the best sources of endogenous DNA. Since aDNA samples are usually contaminated with DNA from other organisms and they often contain very little endogenous DNA, it is important that aDNA laboratories were extremely clean to prevent further contamination of the samples.

In the second half of the paper, I analyzed aDNA results that were produced by the evolutionary biology workgroup of the University of Tartu by extracting DNA from teeth. While comparing the time period and the amount of C→T substitutions of the samples with their endogenous DNA content, it turned out that younger samples contain fewer C→T substitutions and more endogenous DNA compared to older samples. This means that the older a sample is the more C→T substitutions and less endogenous DNA it contains. Comparing the quality estimate from a visual inspection of the sample before extraction and its endogenous DNA content showed

that samples that are considered to be well preserved by visual inspection contain more endogenous DNA than those that are considered to be poorly preserved. This proves that one can predict the endogenous DNA content of a sample by visual inspection. In addition, I determined whether dark and glass-like samples should be categorized as well preserved or poorly preserved. Since both types of samples had endogenous DNA percentages similar to well preserved samples, it is likely that these samples should be included in the well preserved category. At the same, time we must take into consideration that only 7 and 3 samples with the „dark“ or „glass-like“ description respectively were used in this study. Therefore we cannot be certain that the result applies to all samples. The results from this thesis will help the members of the evolutionary biology workgroup to better choose samples for their future research.

Kasutatud kirjandus

Adler, C. J., Haak, W., Donlon, D., Cooper, A. (2011). Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *J. Archaeol. Sci.* 38(5): 956-964.

Briggs, A. W., Stenzel, U., Johnson, P. L., ... Pääbo, S. (2007). Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *PNAS* 104(37): 14616-21.

Champlot, S., Berthelot, C., Pruvost, M., Bennett, E. A., Grange, T., Geigl, E.-M. (2010). An Efficient Multistrategy DNA Decontamination Procedure of PCR Reagents for Hypersensitive PCR Applications. *PLoS One* 5(9): e13042.

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

Damgaard, P. B., Margaryan, A., Schroeder, H., Orlando, L., Willerslev, E., Allentoft, M. E. (2015). Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth. *Sci. Rep.* 5: 11184.

Der Sarkissian, C., Allentoft, M. E., Avila-Arcos, M. C., ... Orlando, L. (2015). Ancient genomics. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 370(1660): 20130387.

Der Sarkissian, C., Pichereau, V., Dupont, C., ... Orlando, L. (2017). Ancient DNA analysis identifies marine mollusc shells as new metagenomic archives of the past. *Mol. Ecol. Resour.* 17(5): 835-853

Gamba, C., Jones, E. R., Teasdale, M. D., ... Pinhasi, R. (2014). Genome flux and stasis in five millennium transect of European prehistory. *Nat. Commun.* 5: 5257.

Gilbert, M. P., Drautz, D. I., Lesk, A. M., ... Schuster, S. C. (2008). Intraspecific phylogenetic analysis of Siberian woolly mammoths using complete mitochondrial genomes. *PNAS* 105(24): 8327-32.

Gilbert, M. P., Menez, L., Janaway, R. C., Tobin, D. J., Cooper, A., Wilson, A. S. (2006). Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA. *Forensic Sci. Int.* 156(2-3): 208-12.

Gilbert, M. P., Tomsho, L. P., Rendulic, S., ... Schuster, S. C. (2007). Whole-Genome Shotgun Sequencing of Mitochondria from Ancient Hair Shafts. *Science* 317(5846): 1927-30.

Gilbert, M. T., Barnes, I., Collins, M. J., Smith, C., Eklund, J., Goudsmit, J., Poinar, H., Cooper, A. (2005). Long-Term Survival of Ancient DNA in Egypt: Response to Zinnk and Nerlich (2003). *Am. J. Phys. Anthropol.* 128(1): 110-4.

- Gilbert, M. T., Kivisild, T., Grønnow, B., ... Willerslev, E. (2008). Paleo-Eskimo mtDNA Genome Reveals Matrilineal Discontinuity in Greenland. *Science* 320(5884): 1787-9.
- Gilbert, M. T., Wilson, A. S., Bunce, M., ... Cooper, A. (2004). Ancient mitochondrial DNA from hair. *Curr. Biol.* 14(12): R463-4.
- Ginolhac, A., Rasmussen, M., Gilbert, M. T., Willerslev, E., Orlando, L. (2011). mapDamage: testing for damage patterns in ancient DNA sequences. *Bioinformatics* 27(15): 2153-5.
- Green, R. E., Briggs, A. W., Krause, J., Prüfer, K., Burbano, H. A., Siebauer, M., Lachmann, M., Pääbo, S. (2009). The Neandertal genome and ancient DNA authenticity. *EMBO. J.* 28(17): 2494-502.
- Handt, O., Richards, M., Trommsdorff, M., ... Pääbo, S. (1994). Molecular Genetic Analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science* 264(5166): 1775-8.
- Hansen, H. B., Damgaard, P. B., Margaryan, A., Stenderup, J., Lynnerup, N., Willerslev, E., Allentoft, M. (2017). Comparing Ancient DNA Preservation in Petrous Bone and Tooth Cementum. *PLoS One* 12(1): e0170940.
- Harving, L., Frei, K. M., Price, T. D., Lynnerup, N. (2014). Strontium Isotope Signals in Cremated Petrous Portions as Indicator for Childhood Origin. *PLoS One* 9(7): e101603.
- Hedges, S. B., Schweitzer, M. H. (1995). Detecting Dinosaur DNA. *Science* 268(5214): 1191-2.
- Herrmann, B., Hummel, S. 1994. Ancient DNA: Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens. P. 1-2, 60. R. C. Garber (ed.), Springer-Verlag, New York.
- Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., von Haeseler, A., Pääbo, S. (2001). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 29(23): 4793-9.
- Ingólfsson, Ó., Wiig, Ø. (2008). Late Pleistocene fossil find in Svalbard: the oldest remains of a polar bear (*Ursus maritimus* Phipps, 1744) ever discovered. *Polar. Res.* 28: 455–462.
- Jaenicke-Despres, V., Buckler, E. S., Smith, B. D., Gilbert, M. T., Cooper, A., Doebley, J., Pääbo, S. (2003). Early Allelic Selection in Maize as Revealed by Ancient DNA. *Science* 302(5648): 1206-8.

- Jeffery, N., Spoor, F. (2004). Prenatal growth and development of the modern human labyrinth. *J. Anat.* 204(2): 71-92.
- Jørkov, M. L., Heinemeier, J., Lynnerup, N. (2009). The Petrous Bone—A New Sampling Site for Identifying Early Dietary Patterns in Stable Isotopic Studies. *Am. J. Phys. Anthropol.* 138(2): 199-209.
- Keller, A., Graefen, A., Ball, M., ... Zink, A. (2012). New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing. *Nat. Commun.* 3: 698.
- Knapp, M., Clarke, A. C., Horsburgh, K. A., Matisoo-Smith, E. A. (2012). Setting the stage - Building and working in an ancient DNA laboratory. *Ann. Anat.* 194(1): 3-6.
- Lindqvist, C., Schuster, S. C., Sun, Y., ... Wiig, Ø. (2010). Complete mitochondrial genome of a Pleistocene jawbone unveils the origin of polar bear. *PNAS* 107(11):5053-7.
- Lynnerup, N. (2015). Bog Bodies. *Anat. Record.* 298(6): 1007-12.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11(1): 31-46.
- Meyer, M., Kircher, M., Gansauge, M.-T., ... Pääbo, S. (2012). A high coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual. *Science* 338(6104): 222-6.
- Miller, W., Drautz, D. I., Ratan, A., ... Schuster, S. C. (2008). Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature* 456(7220): 387-90.
- Orlando, L., Ginolhac, A., Zhang, G., ... Willerslev, E. (2013). Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature* 499(7456): 74-8.
- Pinhasi, R., Fernandes, D., Sirak, K., ... Hofreiter, M. (2015). Optimal Ancient DNA Yields from the Inner Ear Part of the Human Petrous Bone. *PLoS One* 10(6): e0129102.
- Poinar, H. N., Hofreiter, M., Spaulding, W. G., Martin, P. S., Stankiewicz, B. A., Bland, H., Evershed, R. P., Possnert, G., Pääbo, S. (1998). Molecular Coproscopy: Dung and Diet of the Extinct Ground Sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science* 281(5375): 402-6.
- Poinar, H. N., Schwarz, C., Qi, J., ... Schuster, C. (2006). Metagenomics to Paleogenomics: Large-Scale Sequencing of Mammoth DNA. *Science* 311(5759): 392-4.
- Prinz, M., Carracedo, A., Mayr, W. R., Morling, N., Parsons, T. J., Sajantila, A., Scheithauer, R., Schmitter, H., Scheider, P. M. (2007). DNA Commission of the International Society for

- Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci. Int. Gen.* 1(1): 3-12.
- Rasmussen, M., Guo, X., Wang, Y., ... Willerslev, E. (2011). An Aboriginal Australian Genome Reveals Separate Human Dispersals into Asia. *Science* 334(6052): 94-8.
- Rasmussen, M., Li, Y., Lindgreen, S., ... Willerslev, E. (2010). Ancient human genome sequence of an extinct Paleo-Eskimo. *Nature* 463(7282): 757-62.
- Römpler, H., Rohland, N., Lalueza-Fox, C., Willerslev, E., Kuznetsova, T., Rabeder, G., Bertranpetit, J., Schöneberg, T., Hofreiter, M. (2006). Nuclear Gene Indicates Coat-Color Polymorphism in Mammoths. *Science* 313(5783): 62.
- Saag, L., Varul, L., Scheib, C. L., ... Metspalu, M. (2017). Extensive Farming in Estonia Started through a Sex-Biased Migration from the Steppe. *Curr. Biol.* 27(14): 2185-2193.
- Schuenemann, V. J., Peltzer, A., Welte, B., ... Krause, J. (2017). Ancient Egyptian mummy genomes suggest an increase of Sub-Saharan African ancestry in post-Roman periods. *Nat. Commun.* 8: 15694.
- Smith, C. I., Chamberlain, A. T., Riley, M. S., Stringer, C., Collins, M. J. (2003). The ternal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *J. Hum. Evol.* 45(3): 203-17.
- Zink, A., Nerlich, A. G. (2003). Molecular Analyses of the “Pharaos:” Feasibility of Molecular Studies in Ancient Egyptian Material. *Am. J Phys. Anthropol.* 121(2): 109-11.
- Wayne, R. K., Leonard, J. A., Cooper, A. (1999). Full of Sound and Fury: The Recent History of Ancient DNA. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30: 457–477.
- Woodward, S. R., Weyand, N. J., Bunnell, M. (1994). DNA Sequence from Cretaceous Period Bone Fragments. *Science* 266(5188): 1229-32.

Lisad

Lisa 1. Koondtabel

#	ID	Ajaperiood	Riik	Visuaalne hinnang	Endog. DNA	5' C→T
1	OLS11	pronksiaeg	Eesti	-	45,91%	8,64%
2	OLS01	varauusaeg	Eesti	-	7,32%	9,25%
3	OLS07	rauaaeg	Eesti	-	0,18%	9,53%
4	OLS08	rauaaeg	Eesti	-	0,36%	24,15%
5	OLS09	rauaaeg	Eesti	-	2,14%	19,19%
6	OLS10	rauaaeg	Eesti	-	35,78%	9,32%
7	OLS12	rauaaeg	Venemaa	-	86,82%	7,93%
8	OLS13	rauaaeg	Venemaa	-	80,82%	12,48%
9	OLS02	keskaeg	Eesti	-	51,01%	10,77%
10	OLS03	keskaeg	Eesti	-	9,81%	6,50%
11	OLS04	keskaeg	Eesti	-	13,40%	7,29%
12	OLS05	keskaeg	Eesti	-	2,17%	9,62%
13	OLS06	keskaeg	Eesti	-	40,70%	4,64%
14	II12	keskaeg	Valgevene	-	38,61%	7,71%
15	II15	keskaeg	Valgevene	-	30,16%	7,57%
16	II17	keskaeg	Valgevene	-	75,77%	12,84%
17	II24	keskaeg	Valgevene	-	63,83%	8,82%
18	II3	keskaeg	Valgevene	-	35,26%	8,07%
19	Ila	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	88,42%	4,80%
20	Ilb	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	69,47%	4,94%
21	Ilc	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	2,32%	6,33%
22	Ild	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	39,13%	4,20%
23	Ile	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	61,27%	4,17%
24	Ilf	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	50,90%	3,28%
25	Ilg	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	23,64%	7,00%
26	Ilh	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	88,96%	6,77%
27	Ili	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	2,32%	7,06%
28	Ilj	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	1,57%	6,22%
29	III29	pronksiaeg	Valgevene	-	58,17%	7,79%
30	III1	keskaeg	Valgevene	-	48,65%	5,72%
31	III10	keskaeg	Valgevene	-	58,02%	6,74%
32	III18	keskaeg	Valgevene	-	72,65%	6,01%
33	III20	keskaeg	Valgevene	-	0,59%	9,90%
34	III4	keskaeg	Valgevene	-	37,57%	6,46%
35	III6	keskaeg	Valgevene	-	57,84%	5,64%
36	III9	keskaeg	Valgevene	-	0,43%	14,80%
37	IIIk	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	80,56%	6,36%
38	IIIl	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	22,31%	5,57%
39	IIIIn	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	79,25%	3,75%

40	IIIo	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	0,82%	5,28%
41	IIIp	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	34,72%	3,80%
42	IIIr	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	35,45%	4,53%
43	IIIs	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	17,03%	5,15%
44	IIIt	keskaeg	Eesti	<i>ok</i>	8,99%	6,50%
45	III m	keskaeg	Eesti	<i>poor, dry</i>	0,07%	10,44%
46	III30	keskaeg	Valgevene	-	41,98%	4,46%
47	IVLS01KT	keskaeg	Venemaa	-	19,67%	3,25%
48	IVLS02KT	keskaeg	Venemaa	-	73,47%	2,88%
49	IVLS03KT	keskaeg	Venemaa	-	18,99%	8,90%
50	IVLS04KT	keskaeg	Venemaa	-	6,77%	6,77%
51	IVLS05KT	keskaeg	Läti	-	0,32%	4,13%
52	IVLS06KT	keskaeg	Eesti	-	0,93%	6,04%
53	IVLS08KT	keskaeg	Eesti	-	7,94%	5,87%
54	IVLS09KT	keskaeg	Eesti	-	62,65%	5,95%
55	IVLS11KT	keskaeg	Eesti	-	17,46%	7,61%
56	IVLS12KT	keskaeg	Eesti	-	40,55%	3,07%
57	IVLS13KT	keskaeg	Eesti	-	80,49%	3,60%
58	IVLS14KT	keskaeg	Eesti	-	35,61%	6,08%
59	IVLS15KT	keskaeg	Eesti	-	76,26%	6,56%
60	IVLS16KT	keskaeg/ varauusaeg	Eesti	-	96,07%	9,07%
61	V16	pronksiaeg	Eesti	<i>ok</i>	56,90%	9,40%
62	V9	pronksiaeg	Eesti	<i>very good</i>	27,02%	10,98%
63	V14	pronksiaeg	Eesti	<i>white and clean</i>	47,84%	6,53%
64	V4	rauaaeg	Kazakhstan	<i>good</i>	24,39%	11,08%
65	V8	rauaaeg	Estonia	<i>not good, dry</i>	2,26%	9,76%
66	V1	rauaaeg	Kasahstan	<i>ok</i>	26,64%	10,23%
67	V10	rauaaeg	Estonia	<i>ok</i>	38,25%	12,50%
68	V11	rauaaeg	Estonia	<i>ok</i>	66,99%	11,25%
69	V12	rauaaeg	Estonia	<i>ok</i>	72,19%	11,25%
70	V3	rauaaeg	Kasahstan	<i>ok</i>	9,04%	5,94%
71	V5	rauaaeg	Venemaa	<i>ok</i>	17,85%	12,37%
72	V7	rauaaeg	Eesti	<i>ok</i>	4,14%	14,85%
73	V2	rauaaeg	Kasahstan	<i>poor, white and dry root-tips</i>	5,17%	6,19%
74	V15	rauaaeg	Eesti	<i>spongy, bad</i>	0,19%	16,82%
75	V6	rauaaeg	Venemaa	<i>very white</i>	71,71%	8,09%
76	VI9	rauaaeg	Venemaa	<i>dirty, washed</i>	49,60%	14,70%
77	VI7	rauaaeg	Venemaa	<i>not good, dirty, washed</i>	0,12%	14,06%
78	VI5	rauaaeg	Valgevene	<i>not good, powder</i>	0,03%	3,04%
79	VI15	rauaaeg	Venemaa	<i>not good, like fabric, dirty, washed</i>	1,40%	19,89%
80	VI10	rauaaeg	Venemaa	<i>ok</i>	66,06%	11,28%

81	VI11	rauaaeg	Venemaa	<i>ok</i>	24,73%	13,41%
82	VI12	rauaaeg	Venemaa	<i>ok</i>	1,96%	11,63%
83	VI13	rauaaeg	Venemaa	<i>ok</i>	18,39%	9,72%
84	VI14	rauaaeg	Venemaa	<i>ok</i>	32,30%	7,54%
85	VI16	rauaaeg	Venemaa	<i>ok</i>	20,62%	9,02%
86	VI6	rauaaeg	Venemaa	<i>ok</i>	48,49%	11,28%
87	VI8	rauaaeg	Venemaa	<i>ok</i>	84,12%	8,58%
88	VI1	keskaeg	Valgevene	<i>ok</i>	28,48%	4,29%
89	VI2	keskaeg	Valgevene	<i>ok</i>	36,48%	6,45%
90	VI3	keskaeg	Valgevene	<i>ok</i>	17,64%	8,63%
91	VI4	keskaeg	Valgevene	<i>ok</i>	19,22%	11,36%
92	VII1	?	Egiptus	<i>well preserved root with a large root canal</i>	0,14%	5,00%
93	VII7	rauaaeg	Venemaa	<i>enamel broken, grey from inside</i>	47,75%	12,25%
94	VII16	rauaaeg	Venemaa	<i>dry</i>	0,37%	19,02%
95	VII2	rauaaeg	Eesti	<i>dry, poor</i>	0,52%	16,65%
96	VII14	rauaaeg	Venemaa	<i>dry, poor, cracks into pieces very easily</i>	0,03%	19,22%
97	VIII11	rauaaeg	Venemaa	<i>flecks of enamel missing, very strong root, good quality</i>	10,07%	11,18%
98	VIII12	rauaaeg	Venemaa	<i>part of the enamel missing</i>	81,66%	6,39%
99	VII15	rauaaeg	Venemaa	<i>ok</i>	37,91%	13,70%
100	VII3	rauaaeg	Eesti	<i>ok</i>	2,24%	9,40%
101	VII4	rauaaeg	Eesti	<i>ok</i>	44,17%	10,91%
102	VII10	rauaaeg	Venemaa	<i>well preserved</i>	48,52%	6,66%
103	VII5	rauaaeg	Venemaa	<i>well preserved</i>	3,83%	14,01%
104	VII6	rauaaeg	Venemaa	<i>well preserved</i>	6,07%	8,94%
105	VII8	rauaaeg	Venemaa	<i>well preserved</i>	36,05%	9,43%
106	VII9	rauaaeg	Venemaa	<i>well preserved</i>	41,82%	5,93%
107	VIII5	rauaaeg	Venemaa	<i>a bit dry, brickle, calcified</i>	30,79%	9,73%
108	VIII7	rauaaeg	Venemaa	<i>dark, but well preserved</i>	13,67%	16,93%
109	VIII2	rauaaeg	Venemaa	<i>parts of enamel missing, dark from inside</i>	4,03%	18,70%
110	VIII12	rauaaeg	Venemaa	<i>dry roottips, calcified</i>	0,30%	15,57%
111	VIII10	rauaaeg	Venemaa	<i>dry, brickle, calcified</i>	0,25%	17,30%
112	VIII11	rauaaeg	Venemaa	<i>dry, brickle, calcified</i>	0,55%	18,73%
113	VIII13	rauaaeg	Venemaa	<i>ok, a bit dry, calcified roottips</i>	1,71%	12,18%
114	VIII4	rauaaeg	Venemaa	<i>dry, brickle, calcified</i>	0,17%	21,93%

115	VIII14	rauaaeg	Venemaa	<i>well preserved</i>	23,31%	15,30%
116	VIII15	rauaaeg	Venemaa	<i>well preserved</i>	16,23%	14,93%
117	VIII16	rauaaeg	Venemaa	<i>well preserved</i>	43,08%	10,88%
118	VIII3	rauaaeg	Venemaa	<i>well preserved</i>	0,45%	10,12%
119	VIII6	rauaaeg	Venemaa	<i>well preserved</i>	2,49%	12,49%
120	VIII8	rauaaeg	Venemaa	<i>well preserved</i>	12,12%	17,64%
121	VIII9	rauaaeg	Venemaa	<i>well preserved</i>	76,31%	10,54%
122	X04	pronksiaeg	Eesti	<i>dark brown, dirty, good</i>	47,75%	15,20%
123	X02	pronksiaeg	Eesti	<i>dark brown, dirty, strong, good</i>	6,50%	16,95%
124	X16	pronksiaeg	Eesti	<i>dark, dry, dirty, poor</i>	3,17%	13,63%
125	X18	pronksiaeg	Eesti	<i>dirty</i>	0,32%	9,44%
126	X12	pronksiaeg	Eesti	<i>dry, white, briclike</i>	4,30%	13,47%
127	X03	pronksiaeg	Eesti	<i>dry, white, calcified, one broken root</i>	0,51%	16,92%
128	X07	pronksiaeg	Eesti	<i>dry, yellow, well preserved crown</i>	1,11%	11,64%
129	X10	pronksiaeg	Eesti	<i>good roots, degraded grown</i>	40,68%	9,52%
130	X13	pronksiaeg	Eesti	<i>good, well-preserved</i>	3,14%	10,83%
131	X06	pronksiaeg	Eesti	<i>good, yellow</i>	0,79%	11,86%
132	X20	pronksiaeg	Eesti	<i>good, yellow, degraded crown</i>	17,21%	16,50%
133	X11	pronksiaeg	Eesti	<i>missing crown, open root, numbered</i>	37,76%	11,47%
134	X19	pronksiaeg	Eesti	<i>ok, one broken root</i>	2,25%	13,37%
135	X05	pronksiaeg	Eesti	<i>one root, ok</i>	4,60%	12,25%
136	X15	pronksiaeg	Eesti	<i>very dark (black), degraded crown</i>	22,18%	13,56%
137	X01	pronksiaeg	Eesti	<i>white, dry, calcified, poor</i>	0,41%	14,52%
138	X14	pronksiaeg	Eesti	<i>yellow, glass-like</i>	57,41%	9,73%
139	X17	pronksiaeg	Eesti	<i>yellow, glass-like</i>	36,36%	14,76%
140	X08	pronksiaeg	Eesti	<i>yellow, glass-like, well-preserved root</i>	62,28%	12,30%
141	X09	pronksiaeg	Eesti	<i>yellow, ok, roots grown together</i>	3,24%	13,98%

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Kadri Irdt

(sünnikuupäev: 25.11.1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Vana DNA proovi kvaliteedi sõltuvus vanusest ja proovile antud visuaalsest hinnangust“, mille juhendaja on Lehti Saag,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2018