

37. OTDK Biológia Szekció

Hódmezővásárhely, Kenyere-ér: Egy
szarmata kori temető teljes archeogenetikai
feldolgozása

Török Virág Anna

Biológus MSc

I. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Török Tibor
egyetemi docens

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Bevezető	4
Az ősi DNS	4
A szarmatákról.....	4
Temetkezési jellegzetességek a szarmatáknál.....	6
A Hódmezővásárhely Kenyere-éri temető leírása	7
Célkitűzés	10
Alkalmazott módszerek, felhasznált anyagok és eszközök	11
A labor kialakítása	11
Egyéb higiéniai óvintézkedések	12
Negatív kontroll	12
DNS állapota	12
Reprodukálhatóság.....	12
Filogenetikai összehasonlítás és értelmezhető eredmények	13
Porítás	13
DNS kivonás	14
Előemésztés.....	14
Emésztés.....	15
DNS kikötése szilika mátrixra (MinElute oszlopokra)	15
Mosás	16
DNS eluálás.....	16
DNS koncentráció ellenőrzés	16
Könyvtár készítés	17
Részleges UDG kezelés	19
Blunt-end repair	19
Adapter ligálás	19
Fill-in.....	20
Előamplifikálás	20
Koncentráció ellenőrzés	20
Indexálás	20
Endogén DNS tartalom meghatározás.....	21
Szekvenálás	22

Eredmények	24
PCA	27
F4 statisztika	28
IBD analízis	31
Diszkusszió	36
Köszönetnyilvánítás	38
Irodalomjegyzék	39

Bevezető

Az ősi DNS

Az archeogenetikai kutatások 1984-ben kezdődtek Higuchi úttörő tanulmányával, melyben egy Quagga (*Quagga quagga*) múzeumi példányából rövid DNS-fragmenteket nyert ki (Higuchi és mtsai. 1984). Az új generációs szekvenálás felfedezése előtt csak rövidebb DNS fragmentek vizsgálata volt megvalósítható, ezért a kutatók elsősorban a mitokondriális DNS és az igazságügyben rendszeresen vizsgált STR régiók meghatározását helyezték előtérbe, a PCR-hoz kötött munkamenet és különösen az mtDNS esetében adott magas sejtenkénti kópiaszám miatt. A mtDNS uniparentális öröklődése miatt kiemelt célpontjává vált a korai populációgenetikai kutatásoknak, mivel szekvenciája alapján leszármazási vonalak deríthetők fel, ami segít a különböző populációk keveredésének és vándorlásának feltérképezésében.

Azóta a terület jelentős fejlődésen ment keresztül, különösen az új generációs szekvenálási technológia bevezetésével, amely lehetővé tette archaikus teljes genomok leolvasását, ezáltal részletesebb betekintést nyújt a különböző ősi szervezetek közötti genetikai kapcsolatokba. Emiatt az elmúlt években az archeogenetika jelentős népszerűsége tett szert számos publikációnak köszönhetően, amelyek az emberi eredet és a kontinentális települések korábban homályos vonatkozásait világítják meg. Ez az interdiszciplináris terület, amely eredetileg az evolúció biológia és a genetika metszéspontjában volt, ma már döntő szerepet játszik a régészeti tanulmányokat kiegészítő megbízható adatforrásként is.

A szarmatákról

A szarmata egy összefoglaló név, mely az eurázsiai sztyeppén a Kr.e. V. századtól a Kr.u. IV. századig élt, változatos összetételű, nomád törzseket foglalt magába. A szkítákkal rokonnépekről beszélhetünk, így feltehetően a középíráni nyelvekkel rokon nyelvet beszéltek. Etnogenezisük legnagyobb valószínűséggel az Urál, illetve a Don és Volga folyók közti füves pusztára tehető, két bronzkori régészeti kultúra a szrubnaja és az andronovo határterületére. Köztük éles határ nem húzható, mindkettő hagyatékában megtalálhatóak a másokra jellemző elemek. Közös jellegzetességeik közé tartozott a nomád életmód, de voltak közöttük letelepedett földművesek is. A szarmaták néppé válása igen nagy területet foglalt magába, melyen számos törzs és népcsoport élt abban az időben (pl. szirak, jazing, roxolan, alan, királyi szarmata). A nagy területi kiterjedés és a számos fennmaradt törzsnév miatt az etnikai meghatározás ezen népek esetében rendkívül nehéz. Ezen ismeretek tudatában nem meglepő,

hogy a szarmata elnevezést az antik szerzők az „Europai Sarmatia” lakosainak összefoglaló megjelölésére használták (Istvánovits és Kulcsár 2018).

A szarmata társadalmat a harcos elit jellemezte, képzett lovasságukról voltak ismertek és félelmetes harcosoknak tartották őket (Khussainova és mtsai. 2022). Ezért gyakran előfordult, hogy más népek is segítségül hívták őket háborúikhoz. A nők gyakran vettek részt a hadviselésben és vezetői szerepeket is betölthettek, erre utalnak a feltárt sírokban nők mellett nagy számban megtalálható szakrális tárgyak és fegyverek (legtöbbször nyíl, ritkábban kard vagy tör) (Istvánovits és Kulcsár 2018).

Régészeti és nyelvészeti adatok arra utalnak, hogy félnomád életmódot folytattak, és a pásztorkodásra és a szezonális vándorlásra támaszkodva biztosították maguknak az élelmet. Ezek a jellegzetességek stratégiai szempontból is kifizetődőnek bizonyultak más népekkel való konfliktusaik során (Istvánovits és Kulcsár 2018).

Régészeti és történeti adatok is megerősítik, hogy a szarmaták szállásterülete a Kr.e. 3-4 századtól kezdődően az Urál nyugati oldalától dél és nyugat felé kezdett eltolódni, majd rendszeres konfliktusok során fokozatosan meghódították a pontuszi sztyeppe szkíták által korábban uralt területeit. A szkíták azonban nem tűntek el nyomtalanul, kultúrájuk jelentős hatást gyakorolt a szarmatákra.

A Kr. u. 1. század kezdetén a szarmata törzsek a Kárpát-medencébe is behatoltak, melyről római források tudósítanak. A bevándorló nomádok nagyszámban telepedtek meg a Duna-Tisza közének ritkán lakott területein. Számuk az elkövetkező évtizedekben tovább növekedett, élénk kereskedelmi kapcsolatban álltak a Római Birodalom hódításai nyomán a régióban létrejött új provinciákkal. Politikai befolyásuk a 2. század végi Markomann háborúk pusztítása nyomán megcsappant a régióban, ám a szarmata lakosság lélekszáma a régészeti nyomok alapján továbbra is magas maradt a Római Birodalom a 3. század során súlytó zűrzavaros idők alatt is. A sztyeppe szarmata uralmának a hunok érkezése és a népvándorlás kora vetett véget. A történeti források egy ponton felhagynak a szarmaták említésével így azt gondolhatnánk, hogy őket is elmosta a népek áradata. Régészeti adatok azonban arra utalnak, hogy a szarmaták leszármazottjai a későbbi korokban is a Kárpát-medencében maradtak és betagozódtak a népvándorlások lezárultával újra megszilárduló államok alaplakosságába (Istvánovits és Kulcsár 2018).

Összefoglalva, a szarmaták jelentős befolyással rendelkeztek az eurázsiai sztyeppén, különösen az Alsó-Don és Alsó-Volga régiókban, de a Kr.u. 1. század elején a Kárpát-medencébe is

bevándoroltak. Számuk az elkövetkező évszázadokban folyamatosan gyarapodott és a népvándorlás koráig (~i. sz. 450-ig) a régió belül is meghatározó politikai erőként léptek fel. A Kárpát-medencei szarmaták genetikai vizsgálata segíthet megérteni a származásukat és kapcsolatrendszerüket a környező népekkel, valamint a sztyeppén maradt társaikkal. Mivel népességük populációgenetikai szempontból hosszú ideig meghatározó volt a Kárpát-medencében, genetikai adataik ismerete a későbbi korszakok vizsgálata szempontjából is fontos a Kárpát-medence népesség történetének rekonstrukciójában.

Temetkezési jellegzetességek a szarmatáknál

Az Urál vidéki szarmaták temetkezési szokásaikban a megelőző bronzkori és szkíta kultúrákkal sok hasonlóságot mutatnak, így például gyakran kurgánba temetkeztek. Ennek több fajtája is elkülöníthető: sokszor egy korábbi kurgánba ásták bele a sírgödört, de újonnan létrehozott sírdombok is megtalálhatóak, melyek gyakran egy kisebb közösségi temetkezés jeleit mutatják. Maga a sírgödör legtöbbször téglalap, mintsem ovális alaprajzú, bár előfordulnak kivételek.

Legtöbbször tájolásuk Ny-K-i, ritkábban K-Ny-i, ettől a tájolástól csak a családi kurgánok kialakításakor tértek el, ahol a család vagy nemzetség fő köré temették a többi rokont.

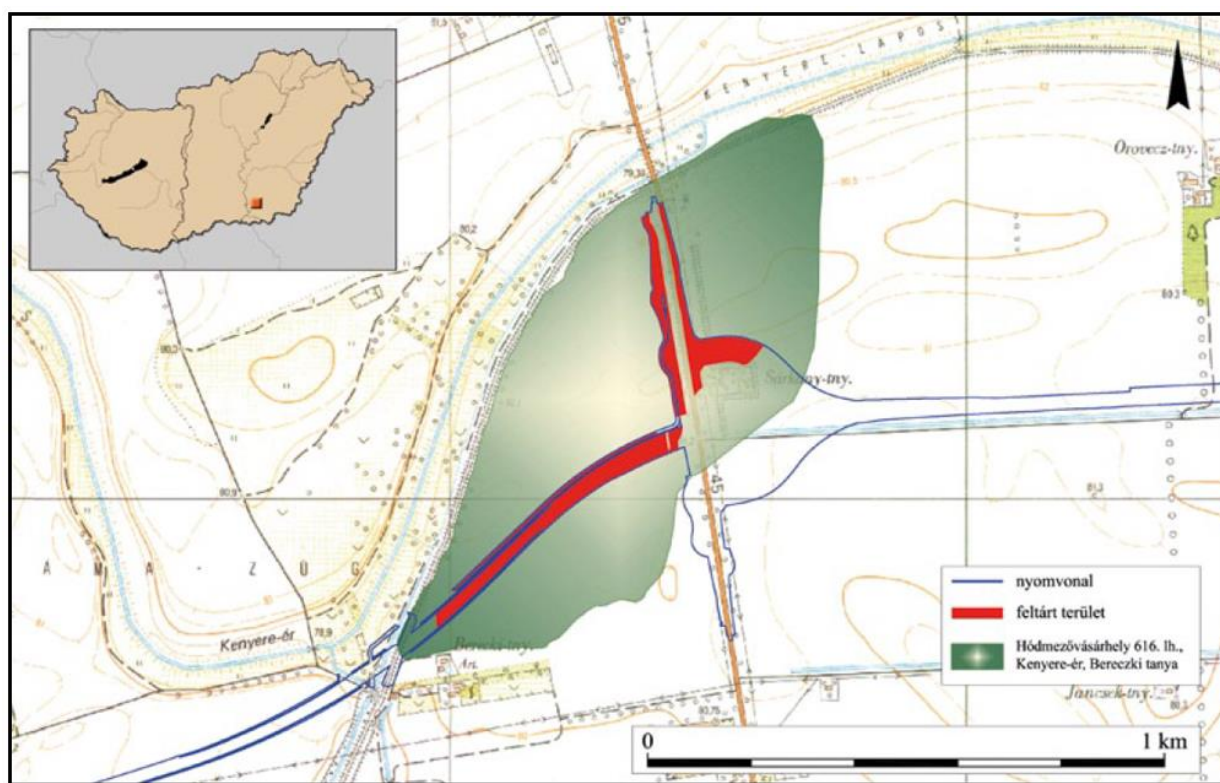
Később, a Kr. e. VI-V századtól megjelennek a D-É-i tájolású sírok is. Gyakran temettek a halottak mellé fegyvereket, kardokat, töröket, nyíllal megtöltött tegezeket. Egyedi módon a női sírok 1/5-énél is találtak efféle fegyvereket. Ez utalhat arra, hogy a nők is gyakran részt vettek a harcokban, sőt, akár vallási szerepeket is betölthettek, melyekre a sírokban talált szakrális tárgyak engednek következtetni. Üstök, kőoltárok, tükrök gazdagították még a sírtárgyak sorát az arra érdemes nők és férfiak sírkamráiban. (A későbbiekben a tükrök eltörése és a fegyverek megrongálása figyelhető meg a temetési szertartás részeként.) Ételmellékletként gyakran megtalálható a juh mellső láb, további sírtárgyként pedig zoomorf nyelű kanalak, toalett tárgyak is előkerültek a feltárások során. A szarmaták temetési szertartásain a tűzkultusz jellegzetes elemei mutatkoznak. Oltárokon megfigyelhető faszénrel és hamuval szegélyezett égésnyomok, füstölő edények, valamint a sírokban talált ló csontok arra utalnak, hogy az uráli szarmaták kultúrájában a ló volt a fő áldozati állat (Istvánovits és Kulcsár 2018).

Az Urál vidéki temetkezésektől eltérően – noha sok közös jellemzőjük akad – a Kárpát-medencei sírokra már a D-É-i tájolás a jellemző, melyet gyakran árokkal vettek körül. A gyakori sírrablások megnehezítik a sírtárgyak elemzését, ennek ellenére számos aranyékszerrel (pl. fülbevalók, gyöngyök, csüngők) való temetkezés maradt ránk. Ezen ékszerek gyakran

granuláltak (ötvösművészeti eljárás, melynek során fém tárgyak felületét aranyozzák be), vagy azt imitáló díszítésekkel vannak ékesítve (Istvánovits és Kulcsár 2018).

A Hódmezővásárhely Kenyere-éri temető leírása

Hódmezővásárhely és a Kenyere-ér közt terül el ez a régészeti lelőhely, melyről nevét is kapta (lelőhelyazonosító: 56669). A lelőhely felfedezésére 2015 és 2017 között került sor, amikor is a 47-es számú országút hódmezővásárhelyi elkerülő szakaszának építési munkálatai megkezdése előtt a szegedi Móra Ferenc Múzeum munkatársai megelőző feltárást hajtottak végre a helyszínen (**1. ábra**). A közel 43000 m² területű lelőhelyről 330 régészeti objektum került elő a két év alatt (ezek elhelyezkedését hivatott szemléltetni a **2A ábra**), köztük egy szarmata kori település maradványaival és három egymástól és a településtől elválasztott temető résszel. Ezen temető részek feltártsága nem teljes, mivel azok egy része kívül esik az ásatás határain.



1.ábra: A lelőhely elhelyezkedése Hódmezővásárhelytől északra.

Forrás: (Varga 2020)

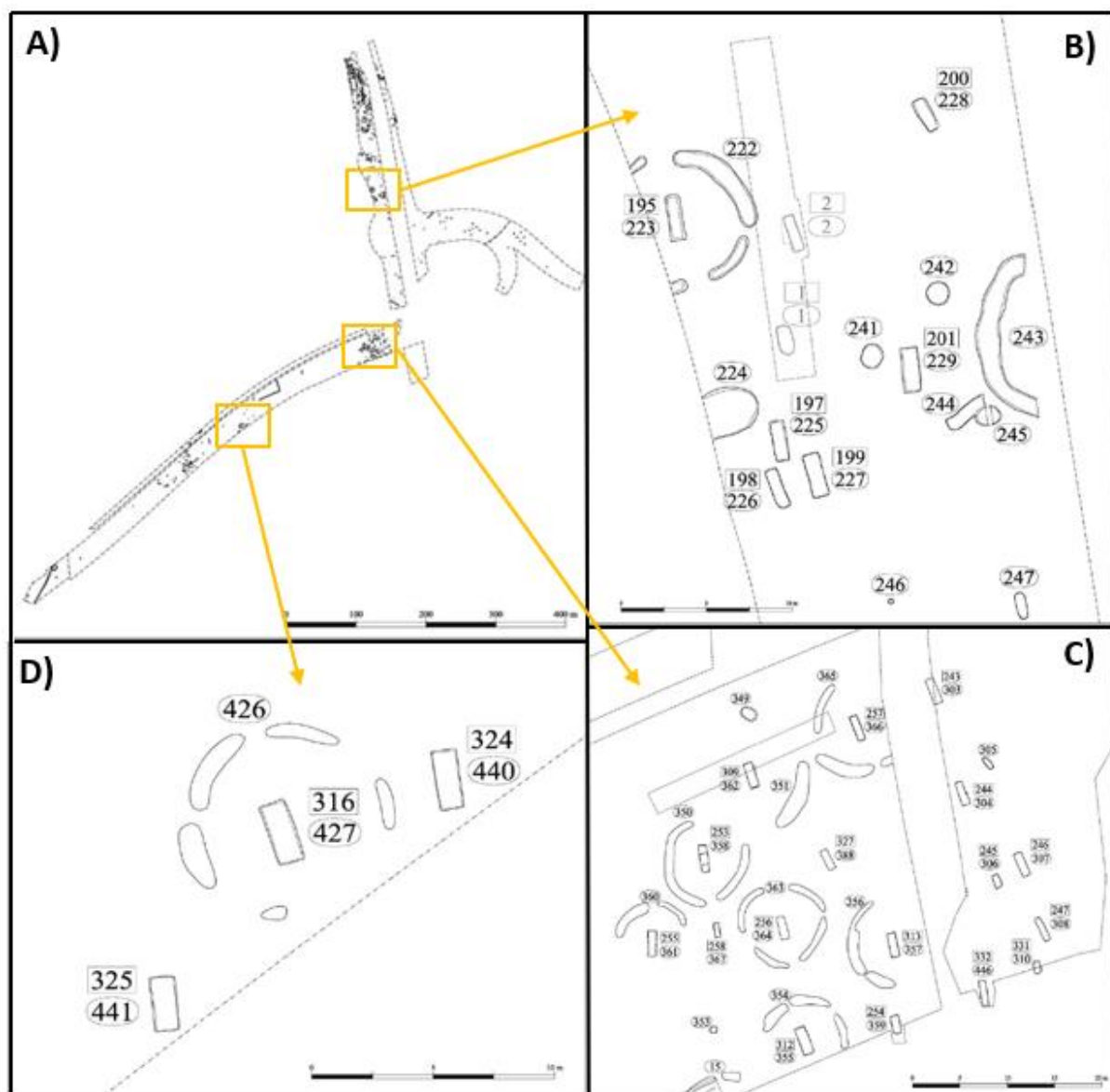
Az első temetőből kilenc, dél-észak tájolású sír lett feltárva (**2B. ábra**). Ezek a sírgödrök elszórtan, kisebb csoportokra szeparálódva helyezkednek el, alakjukat tekintve lekerekített sarkú téglalap alaprajzúak. Ezen temetkezésekből kettőt (195. és 204. számú sírok)

megszakított árkok szegélyeztek, egy másik sír (201. számú objektum) esetében is felmerült ennek a jellegzetességnek a megléte, bár az erre utaló jelek nem egyértelműek.

Az első temetőtől délre található a második temető (**2C. ábra**), melyben négy sorban voltak egyenletesen elrendezve a sírok. E temetkezésekre is a dél-észak tájolás és a téglalap alakú sírgödör volt a jellemző. Az itt lokalizált 18 temetkezés közül hét (253., 255., 256., 257., 309., 312. és 313. számú objektum) volt körülvéve megszakított árkokkal, emellett a 244. számú sírnál is látszottak ennek nyomai. A hét árokkal körülvett sír esetében korabeli sírrablás nyomai is megfigyelhetők.

A második temetőtől nyugatra 150 méterrel helyezkedik el a harmadik temető (**2D. ábra**), melyből három sír került elő. A 316. számú sírt megszakított árkokkal körülkerítették és későbbi rablás nyomait mutatta.

A Hódmezővásárhely–Kenyere-ér, Bereczki tanya szarmata kori régészeti lelőhelyéről összesen 28 emberi csontváz került elő a feltárások során, 27 a három temetőből és 1-re (225. számú objektum) a település maradványai közt bukkantak rá a régészek. A három temetőből feltárt sírtárgyak közül a leggyakoribbak az ékszerek (pl. karkötők, fülbevalók, gyöngyök), vastárgyak (pl. kések, csatok), kerámiaedények és római kori érmék voltak. Utóbbi leletek keltezéséből megállapítható volt, hogy ezt a három temetőt valószínűleg a közép-késői szarmata korszakban (a Markomann háborúk idejében) használhatták (Spekker és mtsai. 2024).



2.ábra: A) A lelőhely rajzos ábrája B) Az első temető rajzos ábrázolása C) A második temető alaprajza D) A harmadik temető alaprajza a (Varga 2020) könyvfejezet alapján

Célkitűzés

Az archeogenetikai tudományág meghatározó fejlődési lépésein a Szegedi Tudomány Egyetem Archeogenetikai Kutatócsoportja is keresztülment megalakulásának kezdete óta. E csoport a magyarság eredetének kutatása kapcsán a Kárpát-medence populáció történetét is próbálja rekonstruálni. Ennek az irányvonalnak szerves részét képezi az Alföld római kori népességének vizsgálata, melyről e dolgozat is szól. A történeti források alapján az Alföldet ebben az időben a nyugati steppéről érkező nomád szarmaták foglalták el, akik gyorsan alkalmazkodtak új szállásterületük adottságaihoz. A régészeti adatok arra utalnak, hogy népességük igen jelentős lehetett, így a szarmaták genetikai összetételének megismerése fontos űrt töltene be a Kárpát-medence populációtörténetének megismerésében. A továbbiakban ismertetett munka a Hódmezővásárhely Kenyere-ér menti szarmata kori lelőhely archeogenetikai feldolgozását tűzte ki célul.

Alkalmazott módszerek, felhasznált anyagok és eszközök

A labor kialakítása

A külső DNS-szennyeződés kezelése már a kezdetektől az ősi DNS (aDNS) kutatás egyik legnagyobb kihívása. A terület korai kudarcokkal szembesült a megkövesedett dinoszauruszmaradványokból és a borostyánban megőrzött ízeltlábúakból származó figyelemre méltó leletekkel, a belőlük kinyert DNS-szekvenciákról később sorra kiderült, hogy azok külső DNS-szennyeződésből származtak. Következésképpen a tudományos közösségben sürgető igény merült fel a laboratóriumi eljárások és a mintakezelést szabályozó protollok létrehozására.

Humán eredetű DNS szennyeződés a mintába sokféle forrásból bekerülhet a régéztől az antropológuson keresztül a DNS-labor személyzetéig. Ez különösen nagy gondot jelent az emberi maradványok esetében, mivel a maradványokból származó szekvenciákat nehéz elkülöníteni a modern egyénekétől. Ennek megelőzéséhez szigorú intézkedésekre van szükség a minta tárolása, kezelése és a DNS munkák során.

2000-ben Cooper és Poinar, majd 2013-ban Barnes és Shapiro iránymutatásokat vázolt fel az aDNS-laboratóriumok számára, amelyek célja a szennyeződés kockázatának minimalizálása volt (Cooper és Poinar 2000; Barnes, Barnett, és Shapiro 2013). Mivel kutatócsoportunk az emberi DNS-feldolgozásra specializálódott, a következő rész az elsősorban erre a célra szabott protokollt ismerteti:

A DNS-kivonás és -feldolgozás helyének kiválasztása kulcsfontosságú a külső emberi DNS-szennyeződés kockázatának minimalizálása érdekében. Míg elsősorban a gondosan lebonyolított extrakciós eljárások segíthetnek csökkenteni ezt a kockázatot, a kutatók hozzáférhetnek olyan kiváló módszerekhez is, amelyek segítségével az adatok kiértékelése során meg lehet különböztetni az ősi DNS-t (aDNS) a modern szennyeződésektől. Ezenkívül szigorúan tilos modern emberi DNS-sel dolgozni az aDNS-labor közelében, a steril laboratóriumnak külön, jól zárt területen kell elhelyezkednie, és az aDNS mindenféle amplifikációját egy ettől elkülönített molekuláris laborban kell végrehajtani.

Ezenkívül az egyéneknek tilos azonnal visszatérniük az aDNS-laborba, miután a molekuláris laboratóriumban dolgoztak, hogy megelőzzék az esetleges szennyeződések átvitelét.

Egyéb higiéniai óvintézkedések

A DNS-kivonási hely sterilen tartása érdekében a kutatóknak megfelelő védőruházatot kell viselniük, dupla gumikesztyű viselése javasolt, azok rendszeres cseréjével. A maximális sterilitás biztosítása érdekében különféle intézkedéseket alkalmaznak, beleértve az eszközök és minták UV-kezelését, és az eszközök használat utáni hipós, majd hidrogén-peroxidos tisztítását. Ezen óvintézkedések segítségével nem csak a modern DNS szennyeződést, de az archaikus DNS minták keresztszennyeződését is meg tudjuk akadályozni. Ezen felül az enyhe pozitív túlnyomás fenntartása a laborban megakadályozza a külső levegő bejutását az ajtók kinyitásakor.

Negatív kontroll

Az extrakciós folyamat minden szakaszában feltétlenül szerepelnie kell egy negatív kontrollnak, amelyet a mintákhoz hasonlóan kezelnek minden anyaggal, de hiányzik belőle az ősi DNS. A DNS hiánya a negatív kontrollban azt jelzi, hogy az adott munkafázisban és az alkalmazott oldatokban nincs idegen szennyeződés. (Tilos azonban a pozitív kontroll alkalmazása, amely célzott idegen emberi DNS szándékos bejuttatásával jár.)

DNS állapota

A DNS megőrződése, fragmentáltságának mértéke nagyban függ a minta korától és a környezet különböző paramétereitől, amelyből feltárták azt, például hőmérséklet, páratartalom, pH, stb. A DNS-minták elemzése során figyelembe kell venni, hogy a jó állapotban lévő, hosszabb szekvenciák potenciálisan szennyeződésből származhatnak.

Reprodukálhatóság

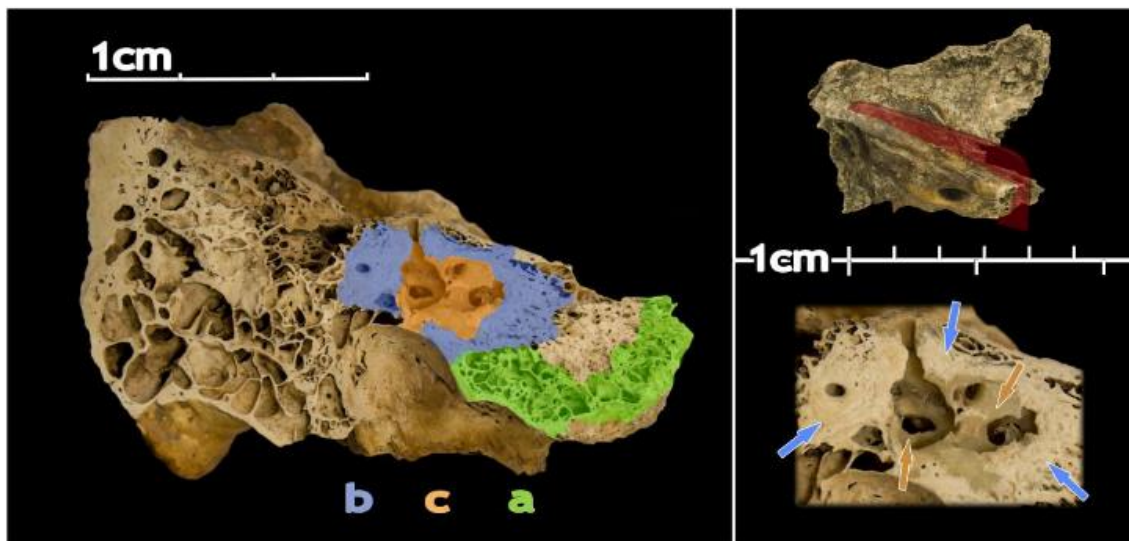
Az eredményeknek független laboratóriumban reprodukálhatónak kell lenniük annak igazolására, hogy az aDNS-szekvencia ténylegesen az adott mintából származik, nem pedig más szennyező forrásból. Míg ez a követelmény a hagyományos módszerekben elengedhetetlen volt, az új generációs szekvenálási technológiával kevésbé kritikus, mivel a minta archaikus eredete szekvenciaanalízissel igazolható.

Filogenetikai összehasonlítás és értelmezhető eredmények

A szennyeződésmentes szekvenciáknak ellentmondások nélkül meg kell felelniük a mitokondriális DNS és Y kromoszóma filogenetikai besorolásának, az archaikus minták várhatóan a filogenetikai fa ősből ágaihoz tartoznak, mint a fiatalabbakba. Továbbá az adatgyűjtési eredményekkel való összhang is elvárható; jelentős eltérések szennyeződésre utalhatnak, vagy további vizsgálatokat tehetnek szükségessé.

Porítás

A sűrű szövetek, mint például a csont, kiváló megőrzési képességet mutatnak, ellentétben a lágy szövetekkel, melyek igen gyorsan lebomlanak a halál beállta után. Míg a csöves csontok végein lévő sűrű szövetekből és a fogak cementrétegéből származó DNS-kivonatok viszonylag kielégítő eredményeket adnak, ezeket is felülmúlja a halántéki koponyacsonton belül elhelyezkedő sziklacsont kivételes DNS-megőrző képessége (**3. ábra**). Ez a csont a belsőfül csontos merevítéséért felel, így végső szilárdságát már korán, a csecsemőkorban eléri, és egész életében megőrzi, emiatt a legmagasabb endogén DNS-tartalommal büszkélkedhet még sokáig a halál beállta után is. Következésképpen a sziklacsont ezen figyelemre méltó tulajdonsága miatt a modern aDNS-kutatás elsődleges célpontjává vált.



3. ábra: Az emberi sziklacsont helye a temporális koponyacsontban

Forrás: <https://journals.plos.org/plosone/article/figures?id=10.1371/journal.pone.0129102>

Megtekintve: 2024.11.07 14:40

Az alapos tisztítást követően a mintavételre kijelölt csontszakaszt egy elszívó fülke alatt dolgozzuk fel, hogy a keletkező csontport a beépített szívóberendezés eltávolíthassa. A legnagyobb endogén tartalommal rendelkező, sűrű belső állomány egy kevésbé sűrű külső csontmátrixba van beágyazva, ezért a külső szennyeződés minimalizálása érdekében el kell távolítani ezt a réteget. A Dremel kézi marószerszám segítségével a csontfelületet aprólékosan megtisztítjuk, majd leválasztjuk a halántékcsontról többi részéről. Ezt követően a csont porítása rázómalomban történik acél golyók segítségével. A legnagyobb védelem érdekében javasolt ezt a munkafázist a steril laboratórium erre kijelölt helyiségében, biztonságosan zárt ajtó mellett elvégezni.

Vannak azonban olyan szerencsés esetek, mikor a teljes koponya rendelkezésre áll, nem csak egy halántéki koponyalemez. Ilyenkor nagyon kell vigyázni a leletre, hogy további mérésekre, akár arcreekonstrukcióra is alkalmas maradjon a koponya, ezért a (Sirak és mtsai. 2017) által felvázolt módszer szerint a sziklacsontot vékony fúróval közelítjük meg a koponya alapjától. Kezdetben a felületi csontmátrixot eltávolítjuk a maróberendezés volfrám-karbid vágófejével, majd a tömör állományt egy szívótölcsérben elhelyezett szűrőbe porítjuk, keményfém kötéseeltávolító hegyű fúrással. Miután a rázómalom finom porrá őrölte a mintánkat, az elszívófülke alatt 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe gyűjtjük azokat és állandó hőmérsékleten tároljuk a DNS kivonásig.

DNS kivonás

Az ősi DNS-t tartalmazó mintákból történő DNS extrakció során a minták humán eredete és alacsony endogén DNS tartalma miatt fontos a precíz és steril munkavégzés. A szegedi laborban (Rohland és Hofreiter 2007)-ben publikált módszere alapján végezzük a kivonást, ennek a módszernek a lényege a szilika mátrixon történő DNS megkötés. A továbbiakban a DNS kivonás egyes lépéseit fogom ismertetni.

Előemésztés

Az első lépésként a mintákat előemésztetni kell, hogy a csontpor szemcsék felszínét „meghámozzuk”, ami hatékonyan eltávolítja az esetleges maradék külső DNS szennyeződést. Ehhez 250-300mg csontport mérünk ki egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe, majd hozzáadunk etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA-t) és Proteináz-K-t.

Az EDTA képes bontani a csont szerves alkotóit fém-kelátor tulajdonsága miatt, míg a Proteináz-K a kollagént és más fehérjéket képes bontani, így a csontmátrix szerves állományának bontását végzi. Ezt az elegyet 30 percig inkubáljuk, így csak a felszínhez közeli rétegeken tudja kifejteni hatását, ahol a potenciális szennyeződések is találhatóak, de a mélyebb rétegekből később még ki tudunk majd vonni elegendő endogén DNS-t.

Emésztés

Az előemésztést követően centrifugáljuk a mintákat, majd az exogén DNS-t tartalmazó felülúszót eltávolítjuk. Ezt követően a csontporra rámerjük az extrakciós puffert, ami EDTA-n és Proteináz-K-n kívül még Triton-X 100-at (polietilén-glikol-p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenilétert) tartalmaz, melynek feladata a DNS és a csont szemcsék eloszlása. A mintákat vortex-keverővel történő felfuszpendálás után parafilmmel lezárjuk a párolgás elkerülése végett, majd 72 órán át 48 °C-on ráztatásnak tesszük ki őket, melynek köszönhetően az endogén DNS-nek lesz ideje kioldódni a csont szemcsékből a felülúszóba.

DNS kikötése szilika mátrixra (MinElute oszlopokra)

Az emésztési idő leteltével a mintákat lecentrifugáljuk majd 15 ml-es Falcon csövekbe öntjük a DNS-t tartalmazó felülúszót, vigyázva, hogy a csapadék ne jusson át. (A csapadékot képező csontport hűtőben tárolva még fel lehet használni DNS kivonásra a későbbiekben, ha az első alkalommal kevés örökítőanyagot sikerült kivonunk.) Ezt követően kötő puffert adunk a mintáinkhoz, amely guanídium-hidrokloridot (GuHCl), nátrium-acetátot (NaOAc), izopropanolt és Tween-20-at tartalmaz. A NaOAc egyértékű kationokat, savas közeget biztosít. A GuHCl egy kaotróp só, jelenléte segít a DNS és a szilika mátrix közötti szelektív kötés kialakításában. Az izopropanol a DNS oldatból való kiválását segíti elő és a Tween-20 egy nem ionikus, nagy viszkozitású detergens, amely az emulzió fenntartásában segít. Ezen alkotókból összeállított puffer adja a megfelelő reakcióközeget a DNS szilika mátrixra való felkötődéséhez, innen ered a neve is. A kötődéshez legmegfelelőbb pH 4 és 6 közé esik, melyet indikátor papírral ellenőrizhetünk, és ha szükséges, HCl vagy ecetsav adagolásával állíthatuk be a megfelelő tartományba. A DNS megkötésére a Qiagen Minelute™ DNS kötő kitjét használjuk. A kit két részletből álló, összeilleszthető oszlopokat tartalmaz. Az oszlopok felső részében egy vízáteresztő membrán felszínére szilika mátrixot rögzítettek, míg az alsó része az átfolyó frakció tárolására szolgál és a tisztítás fázisai között az átfolyó frakció eltávolítható belőle.

Az extrakció során a MinElute oszlopokra előzetesen parafilmmel rögzített infúziós harangokba töltjük a mintáinkat majd az oszlopokat egy vákuum-álványra helyezzük, amely elszívja a folyadékot a harangokból a szilika membránon át, miközben a DNS-t a szilikához kötődik.

Mosás

Miután a harangok aljában megrekedt folyadékot is az oszlopokra öntöttük, mosó pufferrel kezeljük az oszlopokat. A mosó puffer összetételét tekintve rendkívül egyszerű, csak etanolt és DNS mentesített vizet tartalmaz. Ennek a puffernek csak annyi a feladata, hogy eltávolítson minden olyan anyagot, ami nem kötődött fel a szilikára. Amint a mosó puffer is átfolyt a rendszeren, az oszlopokat kupakjaikkal ellátva behelyezzük a gyűjtőcsövekbe, majd maximális fordulatszámon lecentrifugáljuk őket, ezzel a maradék mosó puffert is eltávolítjuk róluk.

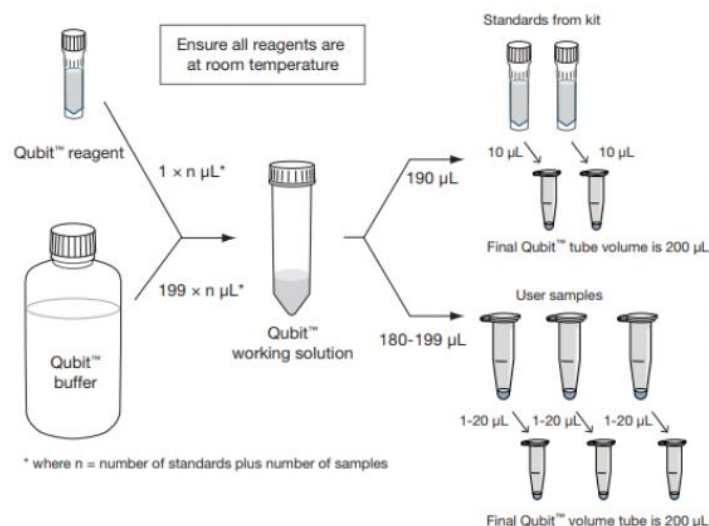
DNS eluálás

Ezt követően új Eppendorf csövekbe állítjuk az oszlopainkat és eluáló pufferrel (EB pufferrel) kezeljük, majd centrifugáljuk őket. Ezzel a DNS-t leoldva az oszlopról az Eppendorf csövekbe. A DNS veszteség minimalizálása érdekében ezt a lépést kétszer is elvégezzük a mintákkal.

DNS koncentráció ellenőrzés

Minden mintából kiveszünk 1 μ l-t és 0,5 ml-es PCR csövekben átvisszük őket a molekuláris laborba megmérni a DNS koncentrációjukat. Ez a lépés igen fontos, mert ilyenkor derül ki, hogyha valamelyik mintában nincs DNS, így azokból a leletekből megkísérlünk még egyszer DNS-t kivonni. Ilyenkor a negatív kontroll koncentrációját is megmérjük, ha sterilen dolgoztunk, akkor nem kapunk kimutatható eredményt. Mindezen méréseket Qubit® Fluorometerrel végezzük. Ehhez a gyártó által forgalmazott Qubit® dsDNS HS (nagy szenzitivitású) Assay Kit-et használunk, amely tartalmaz mérési reagenst, reakció puffert és két DNS koncentráció standard-et. A mérési reagens fluoreszcens festék, amely igen nagy affinitással kötődik a dsDNS-hez, vele való interkaláció esetén fluoreszkál, emiatt fluorometriás koncentráció meghatározással rendkívül pontosan megállapítható akár 1 μ l térfogatú minta DNS tartalma is. Fontos, hogy a reagenseket fénytől elzárt helyen tároljuk, ez történhet hűtőben is, de ebben az esetben használat előtt meg kell várni, amíg szobahőmérsékletűre melegsznek.

A munkaelegy összeállításának módja: **(4. ábra)**



4. ábra: Qubit® mérési reakció összeállításának módja

Forrás: Qubit 4 quick reference guide,

<https://www.thermofisher.com/hu/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-fluorometer.html>

Megtekintve: 2024.11.07 14:43

A mérés során általában 1 µl DNS oldattal dolgozunk, ami a megengedett 1-20 µl-es tartomány alsó határa. Master mixet készítünk a reakció pufferből és a mérési reagensből 1:200 arányban, mintánként 200 µl végtérfogatban. Két új 0,5 ml-es PCR csőbe kimérjük a protokollban előírt 10-10 µl-t a standard-ekből, ezt a lehető legpontosabban kell kimérni, mert az eszköz ezek segítségével fog kalibrálni, emiatt ennek pontatlan kimérése a kalibrációs görbe eltolódását eredményezi. Ezt követően már csak a minták kiindulási térfogatát kell megadni, melynek segítségével a gép a kiindulási DNS oldatok koncentrációját fogja ng/µl mértékegységben meghatározni.

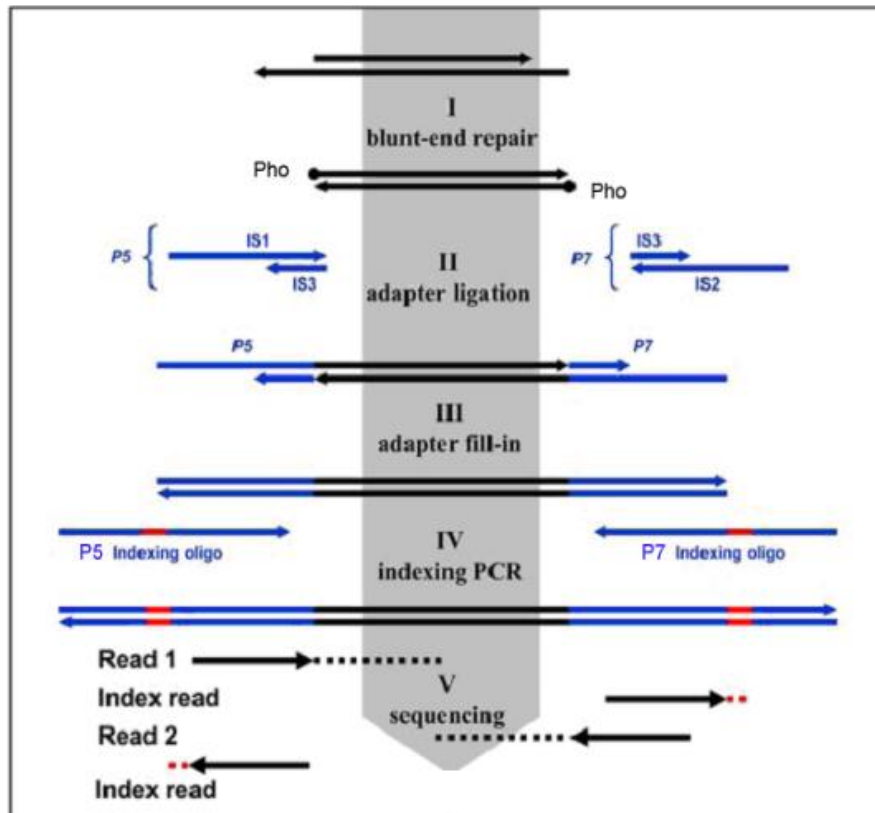
Könyvtár készítés

Az újgenerációs szekvenálás (NGS) kifejlesztése előtt PCR segítségével csak rövid szekvenciák meghatározására volt lehetőség, ezért minél nagyobb mutációs rátával rendelkező DNS szakaszokat (mitokondriális DNS hipervariábilis szakasza; STR-ek) igyekeztek a kutatók kiválasztani, hogy növeljék a munka hatékonyságát.

Az NGS megjelenésével lehetőség nyílt teljes genomok megszekvenálására, amely komoly előrelépést jelentett többek között az archaikus DNS kutatásokban is.

Ehhez az eljáráshoz azonban először enzimek segítségével elő kell készíteni a mintákat, ezt a folyamatot nevezzük könyvtárkészítésnek. A művelet lényege, hogy specifikus DNS fragmentumokat, más néven adaptereket ligálunk az aDNS molekuláink mindkét végéhez. Erre jól használható eljárást dolgozott ki (Meyer és Kircher 2010), melyet mi is alkalmazunk a labor-munka során. Az általunk vizsgált mintákon dsDNS molekulák blunt-end ligálásának módszerét alkalmaztuk, mivel a mi mintáink nem annyira erősen degradáltak és elég magas endogén DNS tartalmúak így nincs szükség a költségesebb, ám sokkal kevesebb endogén DNS vesztéssel járó ssDNS módszer alkalmazására. A DNS fragmentekhez először univerzális IS adaptereket ligálunk, majd PCR reakcióval ezekhez kapcsoljuk az indexeket tartalmazó Illumina specifikus P5-P7 adaptereket (**5. ábra**). Az újgenerációs szekvenátor (esetünkben az Illumina® NovaSeq szekvenátora) egyszerre több egyénből származó könyvtárat is képes megszekvenálni, az egyes mintákhoz tartozó szekvenciák elkülönítése érdekében mindet el kell látni egy egyedi index szekvencia azonosítóval (piros szakaszok az **5. ábrán**). Ezek rövid oligo szekvenciák, melyeknek ismerjük a pontos bázis sorrendjét és előzetesen feljegyeztük, hogy melyik mintához melyik index kombináció tartozik.

A könyvtárkészítés pontos menetét az **5. ábra** alapján szeretném ismertetni:



5. ábra: Adapter ligálás menete (sematikus ábra)

Forrás: (Meyer és Kircher 2010)

Részleges UDG kezelés

Az idő előrehaladtával az archaikus DNS különböző környezeti behatások miatt jellegzetes degradációkat szenved el. Ilyen például a DNS végek egyesszálu roncsolódása és a citozin-uracil tranzíció, amely a citozin deaminációja által valósul meg. Ez utóbbit szokták kezelni uracil-DNS glikoziláz (UDG) enzimmel, mely lehasítja az uracil bázisokat. Ennek az enzimnek egy számunkra fontos tulajdonsága az, hogy nagyobb affinitással működik a fragmentált DNS belső, kettős szálu régiójában, mint a végeken található egyes szálu szakaszokon. Ezt kihasználva, ha megfelelő időben állítjuk le a reakciót, akkor az enzimnek csak a belső régiókon található uracilokat lesz ideje hasítani, a DNS végeken megmaradnak ezek a jelzés értékű tranzíciók, melyekkel később visszamenően is igazolni lehet majd a DNS archaikus mivoltát. Ehhez 37 °C-on 30 percig inkubáljuk a mintákat, majd a folyamat leállításához uracil glikoziláz inhibitor alkalmazunk és még egyszer inkubáljuk. Az így keletkező abázikus helyeken a DNS később hasítható lesz Endonukleáz VIII enzimmel és a komplementer szálról az eredeti szekvencia visszaállítható a repair reakciók során.

Habár ez a lépés nagyon hasznos lehet, alacsony endogén DNS tartalom esetén nem ajánlott a kivitelezése, mert az egymáshoz közeli nick-ek miatt a DNS könnyen eltörhet, mely hatására DNS fragmenteket veszíthetünk el (Rohland és mtsai. 2015).

Blunt-end repair

Az egyes szálu, túlnyúló végeket módosítanunk kell, mert az adapterek csak tompa, foszforilált végekhez képesek ligálódni. Ez történhet a végek lehasításával vagy éppen kiegészítésével is. A laborban is használt T4 DNS polimeráz 3'-5' exonukleáz képes az 5'-túlnyúló végeket kettős száluvá kiegészíteni és a 3'-túlnyúlókat leemésztetni, ezzel tompa végeket hagyva maga után. Ahhoz, hogy ezek a végek foszforiláltak is legyenek, T4 polinukleotid kinázt és ATP-t is adunk a reakcióhoz, ezt követően már ligálhatók a DNS molekuláink.

Adapter ligálás

Miután MinElute oszlopokon tisztítottuk a DNS mintáinkat, azok 5'-foszfát csoportjához IS1-IS3 és IS2-IS3 részlegesen kettős szálu adaptereket ligálunk T4 DNS ligáz segítségével. A 30 perces inkubációs idő lejárta után ismét MinElute oszlopokon tisztítjuk a DNS fragmenseinket.

Fill-in

Ennek a lépésnek a célja az abázikus helyek feltöltése és az adapterek duplaszállúvá egészítése. Ehhez mindössze egy enzimre van szükségünk, a Bst-polimerázra, mely az ép szálát templátként használva felnyitja a nick-ek mentén a DNS molekulát, 5'-3' irányban leemészt maga előtt a bázisokat, majd feltölti azokat. Az inkubációs idő leteltével újabb DNS tisztítási folyamat szükséges.

Előamplifikálás

Ebben a lépésben egy alacsony ciklusszámú PCR reakcióban felsokszorozzuk a mintáink DNS tartalmát, hogy elegendő endogén DNS molekulánk legyen a szekvenáláshoz. Csak azok a molekulák szekvenálhatók a gép számára, melyek rendelkeznek két különböző adapter kombinációval. Az aDNS kutatásban elengedhetetlen olyan polimerázzal dolgozni, amely hőstabil, illetve nagy hatékonysággal képes átírni a fragmentumok végein, jelzés értékkel bíró uracil bázisokat is. Ilyen polimeráz a G2GOTaq, amellyel ebben a laborban is dolgozunk.

Koncentráció ellenőrzés

A munkafolyamat végén kapott mintaoldatok koncentrációját Qubit® Fluorometer műszer segítségével ellenőrizzük. Azokkal a mintákkal, amelyek nem megfelelő töménységűek mind az amplifikációs lépések, mind a DNS kivonás megismételhető.

Indexálás

A mintáink szekvenálásához hosszabb, Illumina specifikus P5-P7 adaptereket kell a molekulák végeire kapcsolni, melyek a mintára specifikus indexeket is tartalmazzák. Ezeket az ábrán (5. **ábra**) feltüntetett módon egy újabb lineáris PCR reakcióval ligáljuk a molekuláink végére. A P5-P7 primereket úgy adtuk hozzá a mintáinkhoz, hogy mintánként egyedi index kombinációt adjanak (az ábrán pirossal jelzett, körülbelül 7-8 nukleotid hosszúságú szekvencia), így ezután bármilyen körülmények között elkülöníthetők lesznek a különböző leletekből származó DNS molekulák.

Endogén DNS tartalom meghatározás

A szekvenálás előtti utolsó lépés során meg kell határozni a könyvtárak endogén DNS tartalmát, mivel minden leletnek különböző a DNS megőrződése (ez 0%-tól akár 80%-os endogén DNS tartalomig változhat). Ezt a vizsgálatot alacsony lefedettségű shotgun szekvenálással végezzük, majd a kapott szekvenciákat referencia genomhoz térképezve vizsgáljuk az illeszthető fragmentek arányát. Ha az derül ki egy mintáról, hogy az endogén tartalma alacsony (10% alatti), akkor a benne található DNS nagy része nem a mintából származik, ezért a költséges, nagy lefedettségű szekvenálást pénzügyi okokból nem érdemes elvégezni rajta. Megoldásként szolgálhat, ha az endogén DNS bizonyos szakaszait (Y kromoszóma; mtDNS), vagy teljes egészét dúsítjuk. Ezzel a módszerrel elválasztható a humán DNS az exogén eredetű DNS-től, miközben többszörösére növeli az endogén aDNS mennyiségét. A folyamat során referencia genomot alapul véve „csali” oligókat készítünk, melyeket biotinált mágnes gyöngyökre rögzítünk. Fontos figyelembe venni a minták endogén DNS tartalmát a dúsításnál, mivel nagyon eltérő koncentrációjú minták együtt dúsítása esetén a nagyobb DNS koncentrációjú túl lesz reprezentálva, magasabb lefedettséget fog mutatni szekvenálást követően, mint az alacsonyabb koncentrációval rendelkező. Ezt úgy lehet kiküszöbölni, ha közel azonos koncentrációval rendelkező mintákat dúsítunk egyszerre.

Az általunk feldolgozott minták endogén DNS tartalmára vonatkozó adatokat az **1.táblázat** tartalmazza.

1.táblázat: A Hódmezővásárhely Kenyere-éri lelőhelyről feltárt egyének endogén DNS tartalom értékei

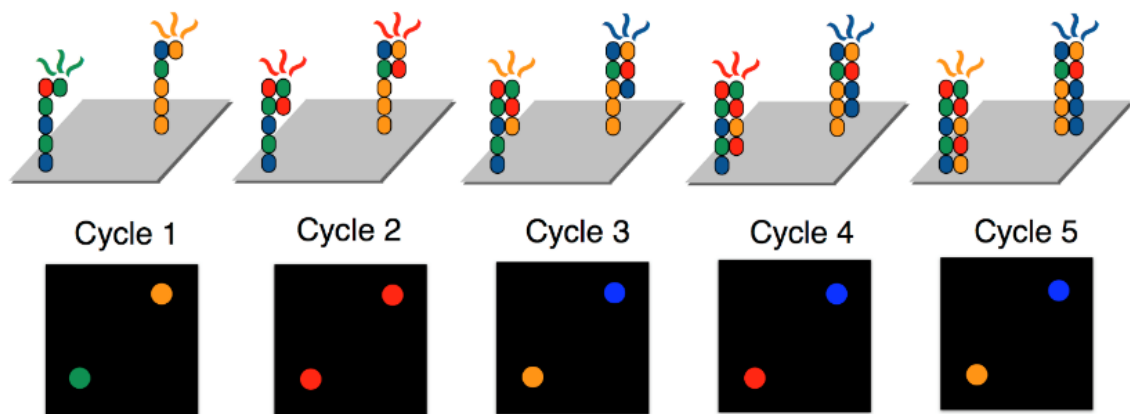
Master_ID	Összes szekvencia olvasat száma	Humán genomhoz térképezhető olvasatok száma	Humán DNS arány	Master_ID	Összes szekvencia olvasat száma	Humán genomhoz térképezhető olvasatok száma	Humán DNS arány
HKB-1	112006	40322,16	0,36	HKB-246	83002	14940,36	0,18
HKB-2	91995	61636,65	0,67	HKB-253	197067	171448,29	0,87
HKB-195	126727	72234,39	0,57	HKB-254	73948	9613,24	0,13
HKB-197	58210	36672,3	0,63	HKB-256	135354	101515,5	0,75
HKB-198	55933	22373,2	0,4	HKB-257a	51713	32579,19	0,63
HKB-199	38749	16274,58	0,42	HKB-257b	17787	5869,71	0,33
HKB-200	157105	125684	0,8	HKB-258	77618	69856,2	0,9
HKB-201	3556	1742,44	0,49	HKB-324	72462	29709,42	0,41
HKB-225	115848	90361,44	0,78	HKB-325	68082	23147,88	0,34
HKB-243	38009	10262,43	0,27	HKB-327	105837	86786,34	0,82
HKB-245	56755	23269,55	0,41	HKB-309	81785	68699,4	0,84

Szekvenálás

A 2000-es évek elejéig a Sanger-féle szekvenálási módszer állt rendelkezésre az archaikus DNS-t kutatók számára, majd az új generációs szekvenálási technikák felfedezésével kitágult a horizont. Ezen módszerek legnagyobb előnye a PCR alapú módszerekhez képest az, hogy a vizsgálható legrövidebb DNS fragmentumok hossza 70 nukleotidról 30 nukleotid hosszúságra csökkent a szükséges 2x20 nukleotid hosszúságú primerek kiiktatásával. Ez nagy előrelépést jelentett az aDNS kutatásban, mivel az archaikus genomok fragmentáltságuk miatt többségében 70 nukleotid hosszúságúnál rövidebb fragmentumokat tartalmaznak. Ezen felül az NGS jóval nagyobb áteresztőképességgel rendelkezik, így párhuzamos mintavizsgálatot is lehetővé tesz.

Az archaikus DNS vizsgálatok alkalmával általában az Illumina® Genom Analyser-rel dolgoznak, ami egy új generációs szekvenátor. Működése során párhuzamosan több millió DNS darabot szekvenál, a szekvenciák pontos nyomon követése fluoreszcens jelölőkkel működik. A folyamat 75-100 nukleotid hosszúságú DNS frangmentekre van optimalizálva, ami az aDNS esetében adott, viszont a modern DNS-t szekvenálás előtt fragmentálni kell. Az előkészített könyvtár oldatot nagy hígításban felvisszük a flowcell-re, (ami egy a könyvtárkészítés során alkalmazott adapterekkel komplementer oligókkal rendelkező, szegmensekre osztott üveglap) ahol komplementer oligókhoz kötődnek ki, majd clastereket képeznek a DNS darabokból egy amplifikációs lépés keretében. A szekvenálási folyamatot ciklusokra lehet bontani. A különböző bázisokkal rendelkező nukleotidokat 4 különböző fluoreszcens festékkel jelölik (fluorofór), majd ezeket hozzáadják a flow cell-hez. Azok bekötődését követően a reakció reverzibilisen megakad a jelölt nukleotidokon található terminátor miatt. Ezt követően egy CCD kamera képet készít, melyen a beépült nukleotidnak megfelelő hullámhosszú fényfelvillanás lesz azonosítható.

Ezt követően eltávolítják a terminátort és a fluorofórt, majd kezdődhet a következő ciklus. A folyamat végeztével a kamera által készített képek sorba rendezésével megállapítható a különböző clusterek bázissorrendje (**6. ábra**).



6.ábra: Illumina szekvenátor működésének sematikus ábrázolása, a különböző színek egy-egy nukleotidot jelölnek

Forrás: <http://data-science-sequencing.github.io/Win2018/lectures/lecture2/>

Megtekintve: 2024.11.07 14:45

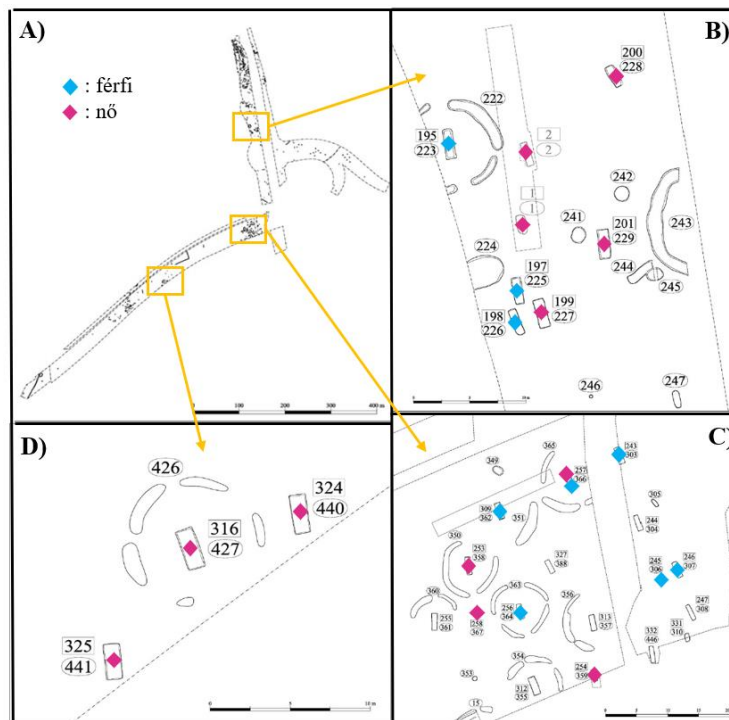
Eredmények

A feltárások során előkerült 28 emberi csontváz közül 24 bizonyult megfelelőnek a genetikai mintavételezéshez. A leletek archeogenetikai feldolgozása után 22 teljes genomot tudtunk előállítani, melyből 19 rendelkezett megfelelő átlagos genom szintű lefedettséggel. (Az alacsony értékeket kiemeltem a táblázatban, a HKB-243-as egyén átlagos genom szintű lefedettségi értékét külön színnel jelöltem, ezt a későbbiekben indoklom meg.)

A megmintázott egyének temetőbeni elhelyezkedését a **7.ábra** szemlélteti.

2.táblázat: A Hódmezővásárhely-Kenyere éri lelőhelyről sikeresen megszekvenált egyének adatai

Master_ID	Nem meghatározás (Skoglund)	Átlagos genom szintű lefedettség	Átlagos mitokondriális lefedettség	Becsült mitokondriális szennyezettség (% , Schmutzi)	Becsült X krom. Szennyezettség (% , ANGSD)	MT Hg (Schmutzi-Haplogroup)	Y Hg (Yleaf)
HKB-1	XX	1,41	154,49	1	N/A	J1c1	N/A
HKB-2	XX	1,26	149,87	1	N/A	I5a	N/A
HKB-195	XY	1,54	204,05	1	0,0086	I5a	R1a1a2~
HKB-197	XY	0,51	47,41	4	0,0099	I5a	R1a1a2~
HKB-198	XY	0,56	44,98	2	0,0238	H2a2b1	R1a1a2~
HKB-199	XX	0,29	73,91	3	N/A	I5a	N/A
HKB-200	XX	1,94	170,56	1	N/A	U8b1a1	N/A
HKB-201	XX	0,04	4,38	5	N/A	I5a	N/A
HKB-225	XY	1,62	203,39	1	0,0135	D5a2a1+@16172	R1a1a2~
HKB-243	XY	0,16	14,92	1	0,0512	H59a	NA
HKB-245	XY	0,44	73,47	3	0,0363	U8a1a1b1	Q1b1b1~
HKB-246	XY	0,91	287,34	1	0,0193	HV+16311	Q1b1b1~
HKB-253	XX	1,99	200,73	1	N/A	H1q	N/A
HKB-254	XX	0,49	34,38	9	N/A	HV+16311	N/A
HKB-256	XY	1,71	155,87	1	0,0114	H1at	R1b1a1a2
HKB-257a	XX	0,41	44,82	1	N/A	J1b1a3	N/A
HKB-257b	XY	0,15	15,85	4	0,1305	H1af	R1b1a1a2
HKB-258	XX	0,98	108,12	1	N/A	T2c1f	N/A
HKB-324	XX	0,62	68,34	1	N/A	U5a1a1+152	N/A
HKB-325	XX	1,03	88,75	2	N/A	U3c	N/A
HKB-327	XX	1,89	246,92	1	N/A	J1c3k	N/A
HKB-309	XY	1,93	137,08	1	0,0031	U5a1a1	R1b1a1a2



7.ábra: A megmintázott egyének temetőben való elhelyezkedése

A DNS kivonások 16 esetben fog, 6 esetben pedig sziklacsontból történtek. Az egyének nemének meghatározásához Skoglund módszerét használtuk (Skoglund és mtsai. 2013), mely az X és Y-kromoszómára illeszthető fragmentek számarányából következtet a nemre. Ha az így kapott arány nagyobb, mint 0,077, akkor az egyén férfinak, ha 0,077 és 0,016 közötti az érték akkor nem meghatározhatónak és ha 0,016 alatti értéket kapunk akkor az illető nőnek nyilvánítható genetikailag. Ennek a módszernek az az előnye, hogy alacsony lefedettségű genom adatoknál is használható, így alkalmas több ezer éves leletek nemének meghatározására is.

A minták átlagos lefedettsége 0,04 és 2 között változott, ahogy azt a táblázat harmadik oszlopa is mutatja. Sajnos az endogén becslés ellenére is akadtak olyan minták, melyeknél kevesebb, mint 0,2-szeres lefedettséget sikerült csak elérni. Ez az alacsony markerszám alkalmatlan a statisztikai analízisekre, így e mintákat kizártuk a további vizsgálatokból. Ennek megfelelően a **2.táblázatban** sötétkék színnel lettek kiemelve azok a minták, melyeket lefedettségi értékeik alapján kénytelenek voltunk kizárni a további analízisekből.

Az átlag mitokondriális DNS lefedettséget tekintve az százszorosa is lehet a genoménak, ami nem meglepő, tudván, hogy egy élő sejtben több 100 mitokondrium is lehet, mind önálló haploid örökítőanyaggal, míg a diploid genom csak egy példányban található meg a sejtekben.

Emiatt a 30x-os lefedettség mitokondriális DNS esetében már igen jónak mondható, de ez alatti értékek sem mondhatók egyértelműen alacsonynak, mivel haplocsoport besorolás szempontjából csak a filogenetikai elágazásokért felelős SNP-k nukleotidjainak lefedettsége számít, ami az örökítőanyag fragmentáltsága miatt lehet bizonyos szakaszokon magasabb míg máshol alacsonyabb. Ezt figyelembe véve mintáink esetében a táblázatban szereplő számok többsége igen jónak mondható, pár érték alacsonynak tűnhet első ránézésre, de a táblázat hetedik oszlopában jól látszik, hogy a fent említett kritikus DNS szakaszokon mégis elegendő lefedettséget adott mindegyik minta az uniparentális haplocsoportjuk megállapításához.

A becsült mitokondriális szennyezettséget Schmutzi módszerével számoltuk és százalékban adtuk meg (Renaud és mtsai. 2015). Ennél a módszernél az endogén DNS és a modern szennyező molekulák dezamináltságában jelentkező különbséget használjuk ki a becslés során. A program csak az aDNS molekulákra jellemző, azok végein felhalmozódó uracilok jelenlétével azonosítja az archaikus molekulákat. Az eljárás működési elve miatt az nem alkalmazható uracil-DNS glikozilázsal kezelt mintákon, csak ha a kezelés részleges, így marad elegendő uracil a molekulák végein az azonosításhoz. A módszer előnye, hogy mind lefedettség mind szennyezettség terén igen széles spektrumon képes megbízható eredményt adni. A táblázat 5. oszlopában jelzett értékek egy kivételével mind a szakirodalomban bevett 0,05-ös határérték alá esnek, a mintáink tehát nem mondhatók szennyezettnek.

Az X ivari kromoszómán számított becsült szennyezést ANGSD módszerrel számítjuk ki (Korneliussen, Albrechtsen, és Nielsen 2014), az értéket szintén százalékban megadva (a **2.táblázat** 6. oszlopában). A módszer azon alapul, hogy a férfiakban csak egyetlen X kromoszóma található, ezért az X-re térképeződő olvasatok nem lehetnek heterozigóták az ő esetükben, emiatt a heterozigóta variánsok nagy valószínűséggel külső forrásból származnak, így információt szolgáltatnak a minta szennyezettségét illetően. A mintáinkra kapott értékek a 0,05-ös határérték alatt vannak.

A táblázat utolsó két oszlopában a mitokondriális és az Y kromoszóma haplocsoport meghatározásokat tüntettem fel, melyek a fent említett SNP szekvenciák leolvasásával deríthetők ki.

A következő bekezdésekben a mintákon elvégzett analízisek menetét és eredményeit szeretném ismertetni.

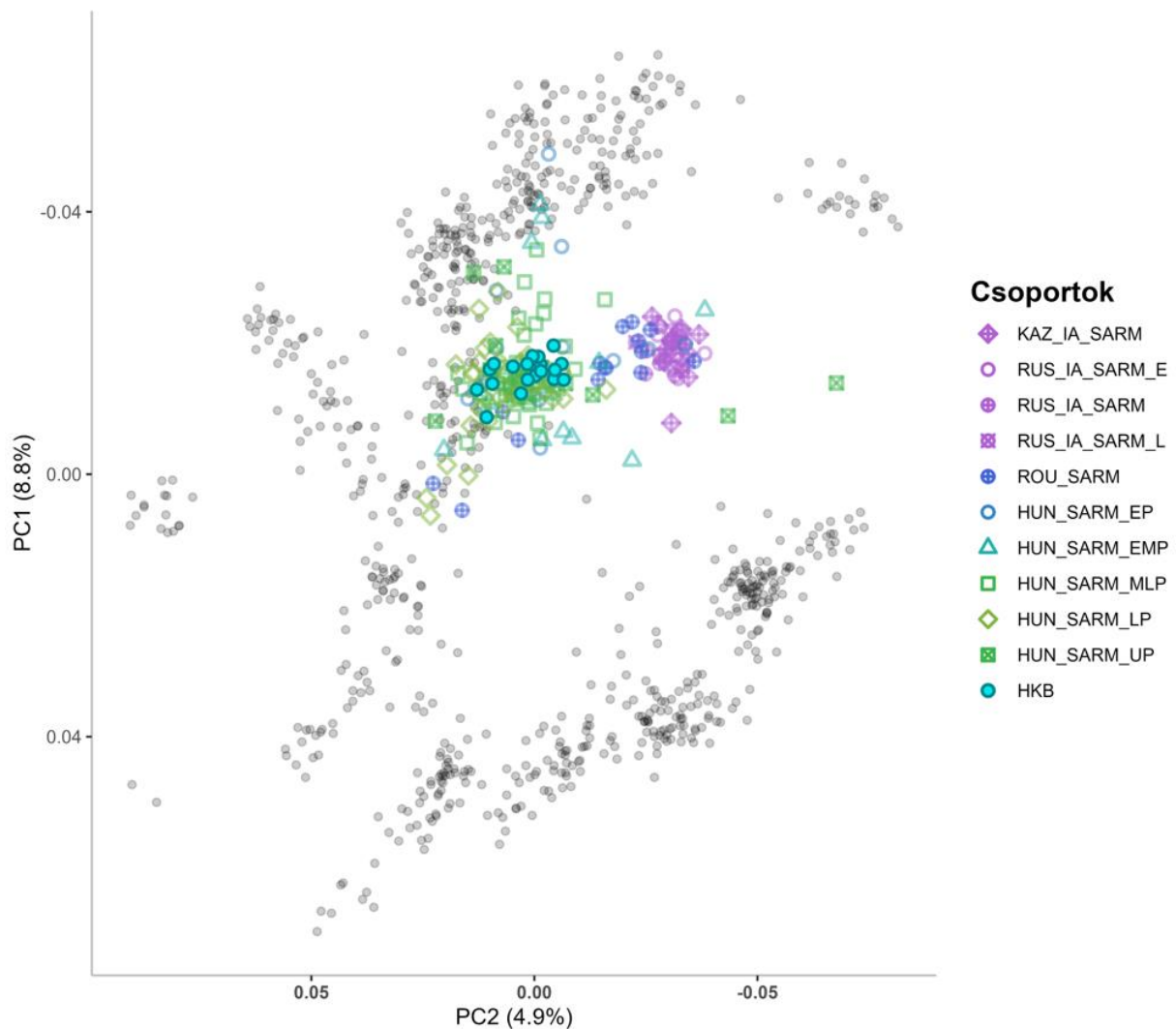
PCA

Elsőként a PCA elemzésről (Principal Component Analysis), magyarul főkomponens-elemzésről ejtenék pár szót. A genomi PCA egy olyan statisztikai eljárás, melynek célja a vizsgált egyének genom összehasonlítása a szekvenciáik legnagyobb varianciája alapján. Ezt úgy érjük el, hogy a genomi szekvenciákat jellemző eredeti változókat új, szintetikus változókra cseréljük, melyeket főkomponenseknek nevezünk. Az első főkomponens (PC1) a genom szekvenciák közötti legnagyobb varianciát jeleníti meg, a második tengely a szekvenciák közötti maradék legnagyobb varianciát jeleníti meg amely matematikailag független, így merőleges az első főkomponensre és így tovább.

Ennek megfelelően a főkomponensek egy valódi koordináta-rendszerben ábrázolható pontok olyan projekciói lesznek, melyeken a pontok egymáshoz viszonyított távolsága a lehető legnagyobb és a $(k-1)$ -edik főkomponens mindig merőleges a k -adik főkomponensre. A módszer előnye abban rejlik, hogy a minták közötti legnagyobb genetikai távolság túlnyomó részét az első két főkomponens tartalmazza (Patterson, Price, és Reich 2006).

A PCA analízis egy igen érdekes sajátossága, hogy ha egy kontinens különböző populációit megfelelően reprezentálva vizsgáljuk, akkor az egyes egyének PCA koordinátái jól összeegyeztethetők a valós földrajzi koordinátaikkal. Ez abból fakad, hogy az emberek közötti genetikai távolság arányos a földrajzi távolságukkal, mivel a házasságok többsége a közelben lakók között kötődik. Mivel a vizsgált archaikus genomok jellemzően egy kisebb populációt reprezentálnak, a szakirodalomban bevett gyakorlat, hogy először modern genomok felhasználásával számítjuk ki a PC tengelyeket (egy „háttér” készítünk) és erre vetítjük rá az archaikus mintáink adatait. Az így kapott eredmények igen fontos összefüggésekre mutathatnak rá a vizsgált genomok hasonlóságát és földrajzi eredetét illetően, teljesen hipotézis független módon.

A mintánként kapott PC adatokból, R programozással generáltuk az alábbi PCA ábrát (**8.ábra**), mely az egyedek közötti genetikai távolságokat hivatott szemléltetni.



8.ábra: PCA analízis eredménye (a tengelycímek melletti százalékok az adott főkomponensen magyarázott teljes variancia arányát hivatott megadni)

A **8.ábrán** szürke körrel jelzett egyedek modern kori genomok, melyek az analízis háttérét adták. A zöld formák a Kárpát-medencei szarmata populációkat, a lila és kék színekkel ábrázoltak közép-ázsiai szarmata populációkat és a türkiz, telített körök a Hódmezővásárhely Kenyere-éri lelőhelyről feltárt szarmatákat jelölik. A PC1 és PC2 adatok felhasználásával alkotott ábra jól szemlélteti, hogy az általunk mintázott szarmaták genomja a Kárpát-medencei szarmata populációkéhoz áll legközelebb, mert ugyanoda térképeződnek.

F4 statisztika

Az F statisztika módszertana (Patterson és mtsai. 2012; Reich és mtsai. 2009) a genomok allél frekvenciáinak különbségéből számítja ki a „közös genetikai sodródást” (shared genetic drift), melyből következtet a populációk közös evolúciós múltjára. Elméleti alapja azt feltételezi, hogy két populációban a szétválást megelőzően ugyanazon mutáns allélek halmozódtak fel a közös

evolúciós múlt során. A matematikai megközelítésnek van néhány kikötése egyszerűsítési célból: Csak genetikai sodródással számol, nem feltételez szelekciót, kettős mutációt, sem back mutációt. Kimutatták, hogy a humán genom SNP (single nucleotide polymorphism) változatok túlnyomó többségére ezek a feltételek a valóságban is érvényesek (Peter 2016), így az elenyésző számú kivétel az eredményt nem torzítja észrevehetően teljes genom szinten.

Az F4 statisztika egy hipotézis alapú statisztikai analízis, amely négy populáció viszonylatában vizsgálja az allélfrekvenciák kovarianciáját (Reich és mtsai. 2009). Arra a nullhipotézisre ad választ, hogy leírható-e egyszerű módon 4 populáció leszármazási viszonya egy gyökértelen fa segítségével.

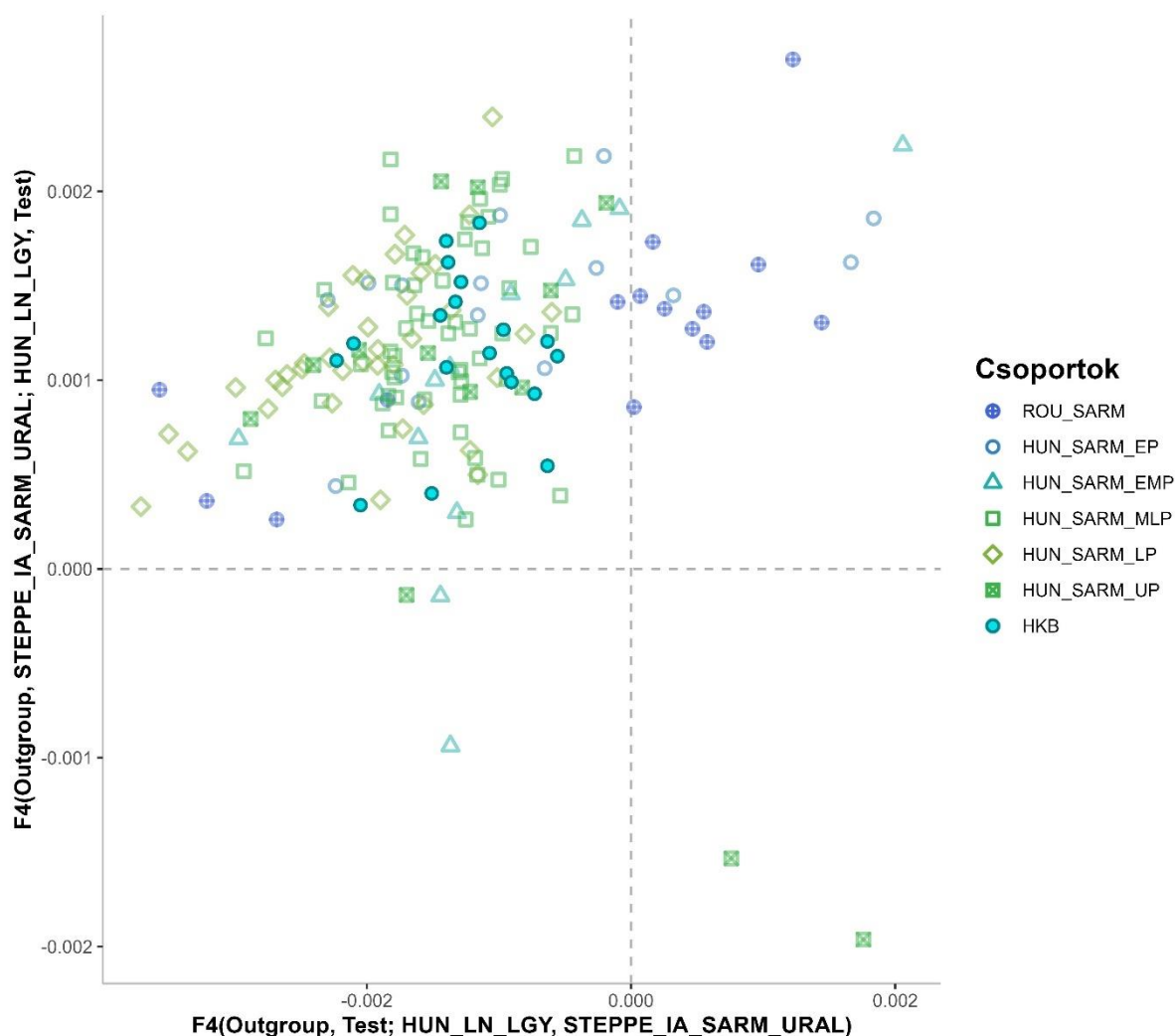
$$F4(A,B;C,D)=E(a-b) \times (c-d)$$

Ahol a , b , c és d nem más, mint A, B, C és D populációk egyedeiben mért allélfrekvenciák ugyanazon lókuszra nézve.

Amennyiben a képletben meghatározott fa topológia helyes, tehát A-B és C-D populációk találhatóak egy ágon, úgy a művelet eredménye megközelítőleg 0 kell, hogy legyen. Ennek az oka, hogy ebben az esetben A-B és C-D populációk közös evolúciós múlttal rendelkeznek és sok olyan pont lesz a genomjukban, ahol azonos allélokat hordoznak, a műveletben meghatározott kivonások eredménye sokszor 0 lesz. Ugyanakkor a statisztika eredménye szignifikánsan eltérhet 0-tól ha a vizsgált populációknak a topológiától eltérő a közös drift-je, így ilyen eredmény esetén elvethetjük a nullhipotézisünket (egyszerű topológia).

A statisztika alkalmazásánál bevett módszer, hogy a fa topológia definiálása során az egyik populációt egy külső csoportként rögzítjük, mely az összes vizsgált populációval szimmetrikus leszármazási viszonyban áll (ez jellemzően egy szubszaharai afrikai populáció). Ez amellet, hogy megkönnyíti az eredmények értelmezését, lehetőséget ad arra, hogy a genetikai affinitások irányának azonosítására. Mivel a külsőcsoporthoz mindenkinek azonos a viszonya, a statisztika eredménye (szignifikánsan pozitív vagy negatív) rámutat a két műveleti egységben szereplő populációk pontos viszonyára.

A módszer segítségével arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a Kenyere-éri származatok hogyan viszonyulnak a közép-ázsiai steppén feltárt származatokhoz. A kérdés megválaszolására két hipotézis tesztet futtattunk le F4 statisztikával.



9.ábra: F4 analízis eredménye

A **9. ábra** X tengelyén azt mértük, hogy a vizsgált szarmata egyéneknek mekkora az abszolút affinitása az Oroszországban feltárt szarmatákhoz (STEPPE_IA_SARM_URAL) vagy a helyi Kárpát-medencei népességet reprezentáló késő neolitikus Lengyel kultúra tagjaihoz (HUN_LN_LGY). Az F4 érték pozitívnak mutatkozik, ha a vizsgált genomban több az olyan SNP-k száma, ahol azonos allél található, mint a steppei szarmata referenciában, míg negatívnak, ha a helyi referenciával azonos allélok dominálnak. Látható, hogy az egyének többsége negatív F4 értéket produkált, tehát elsődleges affinitásuk a „helyi” referencia felé mutatott, és csak kis számú egyén – első sorban a korai szarmata korszakból – rendelkezett domináns steppei szarmata affinitással.

Az Y tengelyen ellenben azt vizsgáltuk, hogy változik-e a Kárpát-medencei szarmata egyének steppei szarmata affinitása, ha csak olyan lókuszokat vizsgálunk, ahol a „helyi” referenciától különböző allélokat hordoznak. Meglepő módon az egyének többsége a pozitív tartományba

esett, tehát a domináns „helyi” affinitásán kívül majdnem mindenki rendelkezik legalább marginális steppei szarmata örökséggel.

A Kenyere-éri temetőben feltárt egyének a rendelkezésünkre álló Kárpát-medencei szarmaták többségéhez hasonló képet mutatnak. Domináns affinitásuk a „helyi” referencia felé mutat, azonban egyértelműen detektálható bennük egy marginális, de szignifikáns steppei szarmata genomi affinitás.

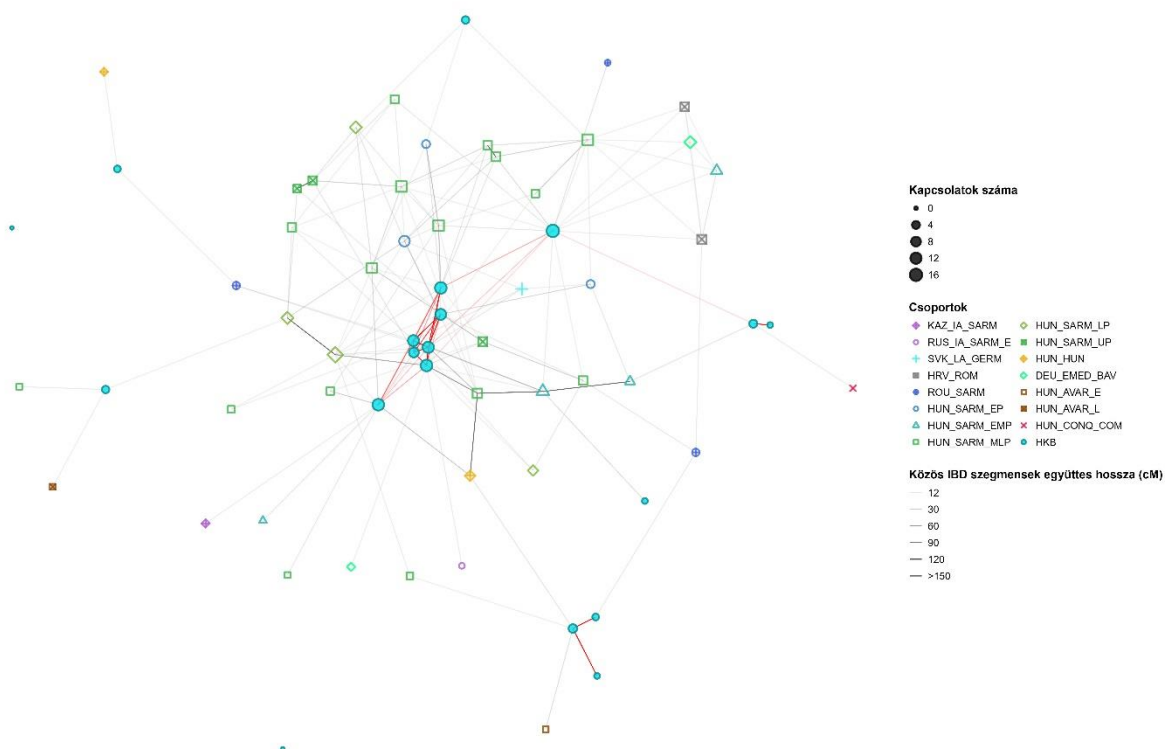
Az egyes egyedek közötti kapcsolatokat részletesebben az IBD elemzések eredményeiből készített ábra szemlélteti, előtte viszont a vizsgálati módszer alapjait foglalnám össze pár szóban.

IBD analízis

Az IBD (Identity by Descent) analízis a közös eredetű genom darabok azonosításával és méretének vizsgálatával foglalkozik. A módszer azon a tényen alapszik, hogy az örökítőanyag generációról generációra haladva rekombinálódik, egy közös őstől örökölt eredeti kromoszómák egyre kisebb darabokra törve öröklődnek a leszármazottakban. A rövidülés sebességét meg lehet becsülni, így az IBD-k méretéből nagy valószínűséggel megállapítható, hogy hányszor rekombinálódott, vagyis mikor élhetett a közös ő. A módszer sajátossága, hogy igen távoli rokonok azonosítására is alkalmas, bár a pontos generációs távolság 7 generáció felett már nem állapítható meg (Ringbauer és mtsai. 2024). Az archaikus minták esetén azonban gyakori, hogy az alacsony lefedettségéből adódóan hézagok találhatók a genomban, melyek az IBD fragmensek azonosítását igencsak megnehezítik. Ebben az esetben a szekvenciák kiegészítésre szorulnak, melyre lehetőséget ad a genomi imputáció. A folyamat során az 1000 genom projekt jól jellemzett, modern genomjait használják referenciaként. A nagyszámú referencia genom darabkából (haplotípusból) az archaikus szekvenciából hiányzó szakaszok szekvenciája kikövetkeztethető és pótolható (Rubinacci és mtsai. 2021). Az imputálást követően az igen alacsony (>0,5-szörös) lefedettségű genomokból diploid genomokat kapunk, melyek már alkalmasak az IBD analízisre. Az IBD vizsgálat képes azonosítani a két ember között fennálló geneológiai kapcsolatot, a közös IBD-k számát, valamint az IBD fragmensek hosszának összegét (jellemzően centiMorganban (cM)) szokták megadni.

Az IBD analízissel kimutatott rokoni kapcsolatokat gráf segítségével lehet ábrázolni. A gráfon pontok jelölik az egyes egyéneket, míg két egyén között fennálló kapcsolatot egy vonal

szimbolizálja. A megfelelő matematikai algoritmus segítségével egy gráf elrendezhető úgy, hogy a vonalak által reprezentált össz-IBD hosszok határozzák meg a pontok egymáshoz viszonyított távolságát, így a rokonsági viszonyok a pontok távolságából könnyen leolvashatók.



10.ábra: A Hódmezővásárhely Kenyere-ér mentén feltárt egyének IBD kapcsolati hálója.

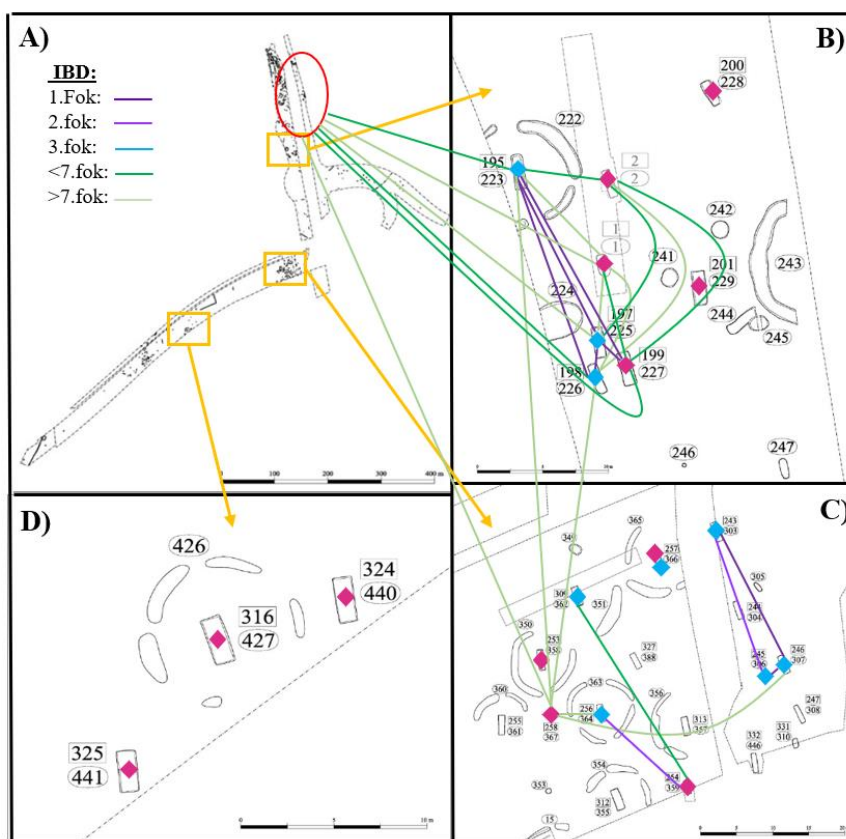
A **10.ábra** a Hódmezővásárhely Kenyere-ér mentén feltárt egyének IBD kapcsolati hálóját mutatja. Az ábrán minden forma egy embert jelöl, alakjuk aszerint változik, hogy melyik populációba sorolható (avar; honfoglaló; római, stb). A Kenyere-éri szarmaták és köztük húzható rokonságot jelölő egyenesek piros színt kaptak, a külső kapcsolatokat pedig feketével jelöltünk. Az egyenesek színerőssége arányos a két végpontban lévő egyén közös IBD fragmenseinek cM-ben mért hosszával. A formák mérete a rokonsági kapcsolataik számával arányos, emiatt a legtöbb rokonsági kapcsolattal rendelkező egyének formái a legnagyobbak, míg a legkevesebbel rendelkezőké a legkisebbek. A képen olyan egyének vannak feltüntetve, akik legalább egy 12cM hosszú közös IBD szegmensen osztoztak valamely Kenyere-éri egyénnel. A referenciák egy nagyobb, vaskori mintákat tartalmazó adatbázisból lettek kiválogatva.

A temetőben feltárt egyének (világoskék, teli pontok) 3 nagyobb családi kötelékben csoportosultak. Melyből kettő közvetlen összeköttetésben is állt a HKB-258-as egyénnel keresztül. A temető belső kapcsolati hálóját jóval sűrűbbnek mutatkozott, mint a korszakból rendelkezésünkre álló más nagyobb temetőké.

A legtöbb külső kapcsolatot az azonos közép szarmata korszakból származó egyénnel mutatták, ugyanakkor egészen távolra mutató kapcsolatok is detektálhatók voltak. Különösen igaz ez a HKB-258-as egyénre, aki amellet, hogy a temető legkiterjedtebb kapcsolati hálójával rendelkezik, része egy teljes gráfnak is, mely többek között tartalmaz a Népvándorlás korában, Bajorországban feltárt germán és két Illíriából származó római provinciális egyént is.

Emellet találtunk olyan egyéneket is, akik csak közvetett módon kapcsolódtak a temetőben feltárt más egyénekhez (HKB-200-p, HKB-257a, HKB-325, HKB-327), sőt olyanokat is, akik egyáltalán nem rendelkeztek IBD kapcsolattal a Kárpát-medencéből rendelkezésünkre álló teljes szarmata adatbázist tekintve (HKB-253-p, HKB-325-p).

Különös figyelmet érdemel a HKB-309-es egyén, akit a régészek – feltűnő, germán jegyeket hordozó mellékletei miatt – egyértelműen bevándorlóként határoztak meg. A genetikai adatok ezzel ellentétben azt mutatták, hogy a közelében eltemetett HKB-254-p egyénnel 171 cM hosszú IBD szakaszon osztoztak, mely egy <7. fokú rokonsági kapcsolattal azonosítható. Ez nem meglepő, mivel bár a sírgödöréből előkerült sírtárgyak (pl. pajzsdudor; sarkantyú) alapján, egy germán stílusban harcoló katona lehetett (Varga 2020), ugyanakkor maga a temetkezés szarmata jellegzeteségekkal rendelkezett (pl. D-É-i tájolású sírgödör; körárok jelenléte), amely azt jelzi, hogy a közösség befogadta őt, sőt akár eredetileg is a településről származhatott.



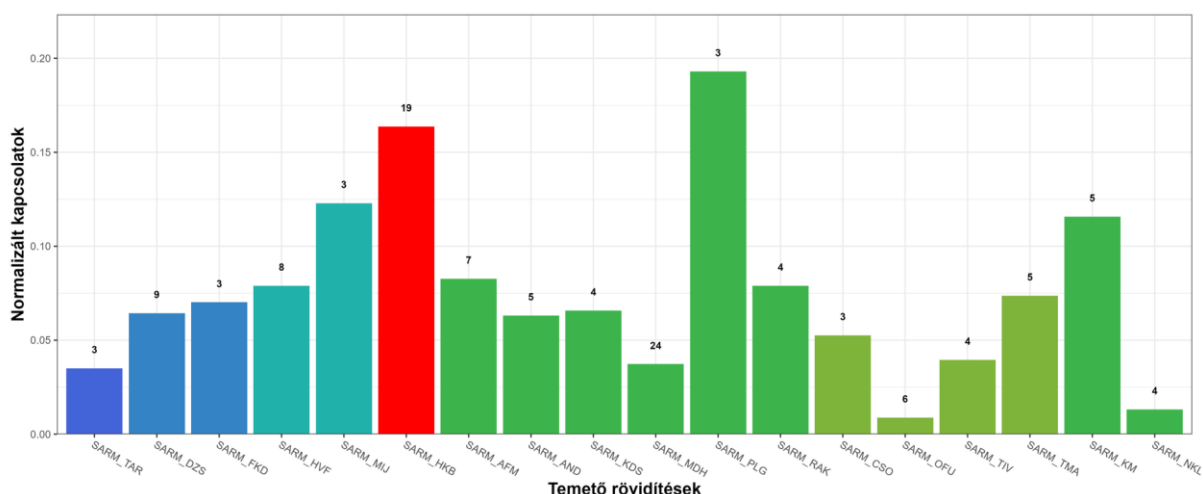
11.ábra: IBD módszerrel felderített rokonsági kapcsolatok a megmintázott egyének között

A **11. ábrán** különböző színű egyenesek jelölik az egyes sírokban eltemetett egyének rokonsági viszonyait, lila színekkel az első és a másodfokú kapcsolatok, késsel a harmadfokú, zölddel a heted foknál kisebb (4-6) és a heted fok feletti kapcsolatok vannak megjelenítve. Az így kirajzolódó kapcsolati hálóban igen érdekes jelenségek mutatkoznak.

A **10. ábrán** is látott 3 családi kötelék egyértelműen elkülönül a temetőrészek között. A B) jelű temetőrészletben található egy négy tagú családmag, két szülővel (HKB-198 apa és HKB-199 anya), a gyerekeikkel (HKB-195-p; HKB-197) valamint több körjük temetkezett távolabbi rokonnal (HKB-1-p, HKB-2-p, HKB-225-p). A másik két család ugyanakkor a C) jelű temetőrészletben található és csak marginálisan, több áttétellel kapcsolódik a B) temetőrész nagyobb családjához. Ezek közül az egyik egy három tagú család (HKB-243; HKB-245 és HKB-246) nagybácsi, apa és fiú. A másik pedig egy kéttagú (HKB-254-p, HKB-256-p) család másodfokú kapcsolattal, melybe a korábban említett HKB-309-es egyén is betagozódik egy távolabbi rokoni kapcsolattal. A HKB-243-as egyén lefedettsége nem volt alkalmas az IBD analízisre, de egy másik rokonsági fok meghatározására alkalmas módszer (Nyerki és mtsai. 2023) egyértelműen kimutatta kapcsolatát a HKB-245 és HKB-246-os egyénekkel.

Igen érdekes a HKB-225 egyén helyzete, akit nem tudtunk feltüntetni az ábrán, mivel maradványait a település részlet egy szemét tárolására használt objektumában találták meg. A település maradványait, ahol az objektum valószínűleg megtalálható, piros ellipszissel jelöltem az ábrán. Ezen egyén végső nyughelye igen különös tekintve, hogy 7. fok alatti rokonsági kapcsolatban állt a HKB-195, HKB-198 és HKB-199-es egyénekkal és 7. fok fölötti a kapcsolata volt a HKB-1, HKB-197 és HKB-258-as mintákkal. Ez azt mutatja, hogy a B) temető családjának nagyobb családi körébe tartozhatott, valamilyen okból azonban mégsem egy rendes sírgödörbe került a teste.

A Kenyere-éri szarmaták belső kapcsolati hálójá mellett a regionális összeköttetéseikre is kíváncsiak voltunk.



12.ábra: A Kenyere-éri lelőhely más temetőkkel való IBD kapcsolatainak ábrázolása

A **12. ábrán** az látható, hogy mennyi a Kenyere-ér mentén feltárt egyének normalizált kapcsolatainak száma más temetőkből származó egyénekkal. Az oszlopok feletti számok az adott temetőből származó minták számát jelölik, az ábrán csak a 3-nál több egyént tartalmazó temetőket vizsgáltuk.

Látható, hogy a Kenyere-éri szarmaták a legtöbb kapcsolatot a Püspökladány külterületén (SARM_PLG), a Makó közelében (SARM_MIJ), valamint a kecskeméti Mercedes gyár építése során (SARM_KM) feltárt szarmatákkal mutatták. Ez igen érdekes eredmény tekintve, hogy mind Kecskemét, mind Püspökladány relatíve messze található Hódmezővásárhelytől. Ugyanakkor a közeli Hódmezővásárhely – Fehértó (SARM_HVF), Apátfalva (SARM_AND), Kiskundorozsma (SARM_KDS) vagy Csanádpalota (SARM_CSO) jóval alacsonyabb kapcsolat számot mutattak.

Diszkusszió

A genetikai vizsgálatok során az én feladatomban volt a kiválasztott csontok előkészítése és emésztése, amely minden esetben megtörtént, a DNS kivonást pár minta esetében meg kellett ismételni, de végül minden leletből sikerült elegendő DNS-t kivonnom. A könyvtárkészítésben is közreműködtem, amely megfelelő minőségű szekvenáló könyvtárakat eredményezett. Az egyes maradványokból kinyert endogén DNS mennyisége igen változónak bizonyult, ez azonban sokkal inkább a sírok és a csontok változó megőrződésének tudható be, mintsem a munka hanyag minőségének. A temetőben feltárt 28 emberi maradványból 22 esetben sikeresen hajtottunk végre teljes genom szintű szekvenálást. Az átlagos lefedettség ősi szekvenciákhoz mérten igen magasnak mutatkozott, míg a minták szennyezettsége elhanyagolható volt.

A Hódmezővásárhely Kenyere-éri lelőhelyen feltárt sírok tulajdonságai, sírtárgyai egyértelműen mutatják, hogy a települést szarmata kultúrájú emberek lakták. A PCA eredmények alapján a Hódmezővásárhely Kenyere-éri minták jól beilleszthetők voltak a rendelkezésünkre álló Kárpát-medencei szarmaták genetikai képébe (**8. ábra**). Ennek az eloszlásnak is a magjában csoportosultak, közöttük nem találtunk genetikailag nagyon elkülönülő egyéneket (outlier-eket).

Az F4 statisztika eredményei alapján a Kenyere-éri szarmaták hasonló képet mutatnak kortársaikhoz. Domináns affinitásuk a római kort megelőző Kárpát-medencei populációk felé mutatott, azonban még mindig kimutatható bennük egy kicsi, de szignifikáns steppei örökség. Ennek megfelelően a genetikai adatok megerősítették a régészeti feltételezéseket, miszerint a vizsgált mintáink - korszak többi szarmatájához hasonlóan - leszármaztathatók az I. század elején a közép-ázsiai steppéről az Alföldre érkező szarmata nomádoktól.

Az IBD adatok alapján a temetőben 3 nagyobb családi hálózat volt megfigyelhető. A lelőhely belső kapcsolati hálóját sűrűnek mutatkozott, majdnem minden egyén rendelkezett legalább egy IBD kapcsolattal a temető egy másik egyénével. Ez azt mutatja, hogy a Kenyere-ér mentén feltárt település valóban egy szorosan kapcsolt, kis közösség tagjait rejtette. A temető kiterjedtebb kapcsolati hálóját tekintve jól beágyazható a Kárpát-medence szarmata népességébe. A legtöbb kapcsolatot az azonos korszakból származó közép szarmata egyénnel mutatták.

A temetőnként kapcsolati számok kiemelik a Kárpát-medencében a szarmata korszakban jelenlévő nagy mobilitást, tekintve, hogy a Kenyere-éri egyének több kapcsolatot mutattak egészen távoli szarmata települések felé, mint a közvetlenül szomszédos települések irányába.

Ezen lelőhely archeogenetikai feldolgozásával a Kárpát-medencei szarmaták genetikai adatbázisa nagy mértékben bővült, mely fontos azok származásának és rokonsági viszonyaiknak, továbbá a Kárpát-medence különböző korú népeivel való kapcsolatuk kimutatásához.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Török Tibor egyetemi docensnek, aki segítőkészségével és szakmai tudásával lehetővé tette e dolgozat elkészültét.

Köszönöm Varga Gergely István tudományos munkatársnak a szakmai segítségnyújtást a labormunka során.

Köszönöm Schütz Oszkár Ph. D. hallgatónak, hogy rendületlen türelemmel segítette a labormunka és analitika terén szakmai fejlődésemet.

Irodalomjegyzék

- Barnes, I., R. Barnett, és B. Shapiro. 2013. „VERTEBRATE STUDIES | Ancient DNA”. In *Encyclopedia of Quaternary Science*, 719–22. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53643-3.00255-7>.
- Cooper, Alan, és Hendrik N. Poinar. 2000. „Ancient DNA: Do It Right or Not at All”. *Science* 289 (5482): 1139–1139. <https://doi.org/10.1126/science.289.5482.1139b>.
- Higuchi, Russell, Barbara Bowman, Mary Freiberger, Oliver A. Ryder, és Allan C. Wilson. 1984. „DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family”. *Nature* 312 (5991): 282–84. <https://doi.org/10.1038/312282a0>.
- Istvánovits Eszter, és Kulcsár Valéria. 2018. *Egy elfelejtett nép, a szarmaták: „...aligha állhat nekik bármely csatarend ellent”*. Nyíregyháza, Szeged: Jósa András Múzeum : SZTE Régészeti Tanszék.
- Khussainova, Elmira, Ilya Kisselev, Olzhas Iksan, Bakhytzhan Bekmanov, Liliya Skvortsova, Alexander Garshin, Elena Kuzovleva, és mtsai. 2022. „Genetic Relationship Among the Kazakh People Based on Y-STR Markers Reveals Evidence of Genetic Variation Among Tribes and Zhuz”. *Frontiers in Genetics* 12 (január):801295. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.801295>.
- Korneliussen, Thorfinn S., Anders Albrechtsen, és Rasmus Nielsen. 2014. „ANGSD: Analysis of Next Generation Sequencing Data”. *BMC Bioinformatics* 15 (1): 356. <https://doi.org/10.1186/s12859-014-0356-4>.
- Meyer, Matthias, és Martin Kircher. 2010. „Illumina Sequencing Library Preparation for Highly Multiplexed Target Capture and Sequencing”. *Cold Spring Harbor Protocols* 2010 (6): pdb.prot5448. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5448>.
- Nyerki, Emil, Tibor Kalmár, Oszkár Schütz, Rui M. Lima, Endre Neparáczki, Tibor Török, és Zoltán Maróti. 2023. „correctKin: an optimized method to infer relatedness up to the 4th degree from low-coverage ancient human genomes”. *Genome Biology* 24 (1): 38. <https://doi.org/10.1186/s13059-023-02882-4>.
- Patterson, Nick, Priya Moorjani, Yontao Luo, Swapan Mallick, Nadin Rohland, Yiping Zhan, Teri Genschoreck, Teresa Webster, és David Reich. 2012. „Ancient Admixture in Human History”. *Genetics* 192 (3): 1065–93. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.145037>.
- Patterson, Nick, Alkes L Price, és David Reich. 2006. „Population Structure and Eigenanalysis”. *PLOS Genetics* 2 (12): e190. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020190>.
- Peter, Benjamin M. 2016. „Admixture, Population Structure, and F-Statistics”. *Genetics* 202 (4): 1485–1501. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.183913>.
- Reich, David, Kumarasamy Thangaraj, Nick Patterson, Alkes L. Price, és Lalji Singh. 2009. „Reconstructing Indian population history”. *Nature* 461 (7263): 489–94. <https://doi.org/10.1038/nature08365>.
- Renaud, Gabriel, Viviane Slon, Ana T. Duggan, és Janet Kelso. 2015. „Schmutzi: estimation of contamination and endogenous mitochondrial consensus calling for ancient DNA”. *Genome Biology* 16 (1): 224. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0776-0>.
- Ringbauer, Harald, Yilei Huang, Ali Akbari, Swapan Mallick, Iñigo Olalde, Nick Patterson, és David Reich. 2024. „Accurate Detection of Identity-by-Descent Segments in Human Ancient DNA”. *Nature Genetics* 56 (1): 143–51. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01582-w>.
- Rohland, Nadin, Eadaoin Harney, Swapan Mallick, Susanne Nordenfelt, és David Reich. 2015. „Partial Uracil–DNA–Glycosylase Treatment for Screening of Ancient DNA”.

- Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370 (1660): 20130624. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0624>.
- Rohland, Nadin, és Michael Hofreiter. 2007. „Ancient DNA Extraction from Bones and Teeth”. *Nature Protocols* 2 (7): 1756–62. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.247>.
- Rubinacci, Simone, Diogo M. Ribeiro, Robin J. Hofmeister, és Olivier Delaneau. 2021. „Efficient phasing and imputation of low-coverage sequencing data using large reference panels”. *Nature Genetics* 53 (1): 120–26. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00756-0>.
- Sirak, Kendra A., Daniel M. Fernandes, Olivia Cheronet, Mario Novak, Beatriz Gamarra, Tímea Balassa, Zsolt Bernert, és mtsai. 2017. „A Minimally-Invasive Method for Sampling Human Petrous Bones from the Cranial Base for Ancient DNA Analysis”. *BioTechniques* 62 (6): 283–89. <https://doi.org/10.2144/000114558>.
- Skoglund, Pontus, Jan Storå, Anders Götherström, és Mattias Jakobsson. 2013. „Accurate sex identification of ancient human remains using DNA shotgun sequencing”. *Journal of Archaeological Science* 40 (12): 4477–82. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2013.07.004>.
- Spekker, Olga, Attila Kiss P., Luca Kis, Kitty Király, Sándor Varga, Antónia Marcsik, Oszkár Schütz, Tibor Török, David R. Hunt, és Balázs Tihanyi. 2024. „White Plague among the “Forgotten People” from the Barbaricum of the Carpathian Basin—Cases with Tuberculosis from the Sarmatian-Period (3rd–4th Centuries CE) Archaeological Site of Hódmezővásárhely–Kenyere-Ér, Bereczki-Tanya (Hungary)”. Szerkesztette Dario Piombino-Mascali. *PLOS ONE* 19 (1): e0294762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294762>.
- Varga, Sándor. 2020. „Ásatások a Kenyere-ér partján Egy 3. századi germán harcos sírja a szarmaták között”. In *Korok, kultúrák, lelőhelyek*. Köt. A Tornyai János Múzeum 2019/2020. évi régészeti előadásainak kiadványa. Hódmezővásárhely: Tornyai János Múzeum és Közművelődési Központ.