

Förekomsten av den genetiska varianten laktapersistens hos neolitiska grupper från Öland

The contribution of the genetic variant Lactase persistence among Neolithic people from the Baltic island Öland in Sweden

Kandidatuppsats i laborativ arkeologi
Stockhoms Universitet
Arkeologiska forskningslaboratoriet
HT 2013
Av: Loey Alrawi
Handledare: Gunilla Eriksson & Anders Götherström

Abstract

This study deals with the contribution of the genetic variant lactase persistence among Neolithic people from the Baltic Island Öland. Skeletal remains from twelve individuals went through DNA sequencing in order to find the mutation that allows adult individuals to digest milk sugar. The twelve individuals were chosen from two different Neolithic sites, where the archaeological and isotopic data suggest that the individuals from Köpingsvik were hunters and gatherers and the individuals from Resmo were early farmers. The individuals with the genetic variant lactase persistence can be described with selection and genetic flow. Only five individuals produced results and the mutation was found in two of the subjects. All the individuals who were successfully sequenced came from Resmo, whereas no individuals from Köpingsvik yielded any results.

Innehållsförteckning

1. Inledning	4
2. Syfte och frågeställningar	4
3. Forskningsbakgrund	5
3.1 Kulturer i Norden under neolitiseringsprocessen	5
3.2 Laktaspersistens	5
3.3 Laktaspersistens och jordbruket	6
3.4 Selektion	6
3.5 Genflöde	7
3.6 Urval	7
3.6.1 Köpingsvik	7
3.6.2 Resmo	7
4. Material	8
4.1 Benmaterial från Köpingsvik	9
4.2 Benmaterial från Resmo	9
4.3 Kontamination	11
5. Metod	11
5.1 DNA extraktion	12
5.2 PCR	12
5.3 Binladen taggning, FLX-sekvensering	12
5.4 Autentiska data	12
6. Resultat	12
7. Analys och diskussion	13
7.1 Fortsatta studier	15
8. Sammanfattning	16
9. Litteraturförteckning	17

1. Inledning

Övergången från ett jägar-och samlarsamhälle till ett samhälle som försörjer sig på jordbruk har varit ett hett diskussionsämne bland arkeologer i många år. Den australienska arkeologen Gordon Childe (1925) kallade denna process för *den neolitiska revolutionen*, som innebar en tydlig förändring i både materiell kultur och ekonomi. Frågan som varit debatterad i många olika forum är hur spridningen av jordbruket gick till. Har denna process skett i form av idéutbyte eller har spridningen av jordbruket skett i samband med att nya människor immigrerat och fört med sig jordbruket. De tidigaste jordbrukarna i Skandinavien har kopplats samman med trattbägarkulturen (TRB) som karakteriseras av en typisk keramik med en trattformad botten, varav namnet trattbägarkulturen kommer ifrån och som gravlägger sina döda i gånggrifter. Under mellaneneolitikum förekommer en annan kultur i Skandinavien som är karakteristisk för en jägar-och samlarkultur av marin jakt och fiske. Denna kultur kallas den gropkeramiska kulturen (GRK) och påträffas i de östliga delarna av Sverige. Kulturen har en utmärkande ornamentik på keramiken i form av gropar, där av namnet den gropkeramiska kulturen. I och med införandet av jordbruket i Skandinavien sprids även en genetisk variant som kodar för att människor kan bryta ned mjölksocker i vuxen ålder. Denna genetiska variant kallas *-13910*T* och resulterar i laktaspersistens. Mutationen går att spåra via DNA-analys (Itan et al. 2009).

Uppsatsen behandlar benmaterial som daterats till neolitikum från Öland där platsen anses vara bra därför att (1) ön själv avgränsar det område som ska studeras, en gräns som var av betydelse även för människor under stenåldern (se figur 1). (2) Bevaringsförhållandena för ben från Öland är gynnsamma på grund av de kalkrika jordarna. (3) Öland är en plats där både TRB och GRK påträffats i det arkeologiska materialet med en överlappande datering (Eriksson et al. 2008).

I denna uppsats undersöks förekomsten av genen som kodar för laktaspersistens från två olika lokaler på Öland. Köpingsvik, Öland, tolkas som en GRK plats av de arkeologiska utgrävningar som utfördes år 1929 till 2003 (Papmehl-Dufay 2006:77). Gånggriften i Resmo, Öland, är ett typiskt monument för TRB men har brukats under tre faser där den första och andra fasen överlappar i tid med gravarna som påträffats i Köpingsvik (GRK) och den tredje och sista fasen dateras till äldre bronsåldern (Eriksson et al. 2008). Skelettmaterialet från Köpingsvik respektive Resmo har genomgått isotopanalys och en tydlig skillnad i diet går att konstatera. Där av intresset att undersöka förekomsten av den genetiska varianten laktaspersistens hos neolitiska grupper från Öland

2. Syfte och frågeställningar

Syftet med denna studie är att undersöka förekomsten av den genetiska variant som medförde att människan kunde bryta ned mjölksocker i vuxen ålder hos individer från Öland daterade till neolitikum. Denna genetiska variant kommer att användas som markör för att besvara följande frågeställningar:

1. Finns mutationen som kodar för laktaspersistens i vuxen ålder på Öland under neolitikum, och avviker den i så fall i frekvens ifrån vad vi vet om övriga världen vid den här tiden?
2. Kan spridningen av denna genetiska variant förklaras med hjälp av selektion eller genflöde?

3. Forskningsbakgrund

3.1 Kulturer i Norden under neolitiseringsprocessen

Under neolitiseringsprocessen sker en kulturell och social förändring då människan blir allt mer bofast och domesticeringen av djur och växer gör att en ny ekonomi växer fram. Det sker även en förändring i den materiella kulturen i form av ny keramik och redskapsutveckling. Startpunkten för neolitiseringsprocessen dateras till ca 9500 f. Kr då växter domesticerades, ca 8500 f. Kr domesticerades djur (Price & Bar-Yosef 2011) och sker någonstans i området främre Asien (nuvarande Turkiet) och runt 6600 f.kr når jordbruket Europa. Ca 4000 f. Kr når jordbruket de nordligaste delarna av Europa och förändringen som sker under neolitiseringsprocessen i Norden kopplas ihop med Trättbägarkulturen (Leonardi et al. 2011).

Det går att se tydliga skillnader i de materiella fynd som gjorts vid arkeologiska undersökningar som dateras till neolitikum i Norden. Dessa materiella skillnader har tolkats som två olika kulturer (TRB och GRK) med en överlappande datering och det som debatterats är om det är samma människor som har olika typer av materiell kultur eller om det är två olika grupper. Kerstin Lidén och Gunilla Eriksson (2007) utförde stabila isotopanalyser på 100 individer från sex olika gropkeramiska platser och tjugoåtta individer från trättbägarkontexter samt elva individer som bedöms tillhöra stridsyxekulturen. Resultatet från isotopanalyserna är att det går att se en tydlig skillnad i diet mellan individerna från den gropkeramiska kontexten och de individer som bedöms komma från trättbägar- och stridsyxekultur. De gropkeramiska individerna visar tydligt att deras diet är baserad på marina resurser medan resterande visade sig ha ett terrestriskt födointag (Lidén & Eriksson 2007).

GRK och TRB visar också upp två olika typer av genetik. Det blev först tydligt i Malmström et al. (2009), där mtDNA ifrån 19 GRK individer avvek kraftigt ifrån den moderna mtDNA-poolen i Skandinavien. GRK individerna visade sig även avvika genetiskt från tre TRB-individer som ingick i samma studie. Pontus Skoglund (2012) utförde DNA analyser på 4 individer där tre stycken bedöms tillhöra den gropkeramiska kulturen och den fjärde individen påträffas i en megalitgrav, vilket är specifikt för trättbägarkulturen. Resultatet av analyserna visar en tydlig genetisk skillnad mellan individen från megalitgraven och de gropkeramiska jägarna och samlarna (Skoglund et al. 2012). En uppföljningsstudie på elva individer (publicerad 2014 av samma grupp) bekräftar de här resultaten (Skoglund et al. 2014) och även att GRK har betydligt starkare genetiska band till kronologiskt äldre jägare och samlare än till samtida bönder, och att det har funnits ett genflöde ifrån jägare och samlare in i tidiga bönder, men inte åt andra hållet. Om detta genflöde sker i Skandinavien mellan individer ifrån GRK kontext och individer ifrån TRB kontext, eller tidigare och i en annan del av Europa, är inte möjligt att säga.

Det råder alltså en tydligt materiell skillnad mellan trättbägarkulturen och den gropkeramiska kulturen men kanske ännu viktigare så går det även att se en skillnad i både matkulturen och till en viss del en genetisk skillnad (då Skoglunds undersökning endast berör elva individer) mellan trättbägarkulturen och den gropkeramiska kulturen.

3.2 Laktaspersistens

Laktaspersistens är fenotypen av mutationen $-13,910^*T$ som medför tillverkningen av enzymet laktas och som bidrar till att kroppen kan bryta ner mjölksocker (laktos) i vuxen ålder. Denna genetiska variant förekommer i norra/västra Europa, södra Asien, Mellanöstern och Afrika och ca 68 % av jordens vuxna befolkning saknar denna mutation (Sverrisdóttir et al. 2013). Det är dock inte samma typ av mutation som förekommer i Afrika som i Europa

och södra Asien. Mutationen från Afrika förkommer inte på samma plats i genomet men på samma genetiska region och detta ger ett bra stöd för att det skett en konvergent evolutionär process, då mutationerna från Afrika och Europa/Asien kodar för samma sak. Mutationen i de Europeiska/Asiatiska populationerna är att i *MCM6* genen har ett C byts ut mot ett T och mutationens plats ligger 13910 baspar från laktasgenen (Itan et al. 2009). Yuval Itan et al. (2009) utförde en studie på denna genetiska variant med hjälp av en datasimulation och försökte besvara frågor som när utvecklades denna mutation i Europa och vad gjorde att den spred sig? Genom att inkludera saker som mjölkproduktion, spridningen av laktaspersistens, jordbruket expansion i Europa, genetiska data och arkeologisk data i simulationen. Resultatet blev att för ca 7,500 år sedan utvecklades denna genetiska variant och någonstans mellan centrala Balkan och central Europa. Dateringen av denna genetiska variant ger stöd för att *-13,910*T* genomgått ett positivt selektionstryck och spridits i samband med mjölkproduktion i Europa (Itan et al. 2009).

3.3 Laktaspersistens och jordbruket

Konsumtionen av mjölkprodukter i vuxen ålder kunde endast ha skett efter, eller i samband med domesticeringen av djur. Domesticeringen av getter och får började för ca 11000 år sedan i främre Asien och för ca 10500 år sedan domesticerades nötkreatur och gris. För ca 8600 år sedan nådde domesticeringen av djur Europa till området runt nuvarande Grekland och Balkan. Spridningen av domesticeringen hade sedan den introducerades till Europa tagit två separata vägar, en kustrutt längst Medelhavet och en rutt igenom Balkan in i central Europa. När domesticeringen introducerades till Europa så har det genom genetiska studier gått att se att det framför allt var får och getter som domesticerades. Denna process påbörjades i främre Asien och spred sig sedan in i Europa. Detta gör att får och getter kan ha varit de första djuren vars mjölk processades och konsumerades av människan (Leonardi et al. 2011).

Lipidanalyser av keramik skärvor har visat att mjölkproduktion kan dateras till ca 8000 år sedan i främre Asien. Inom arkeologin så går det även att studera djurbenen för att bedöma vad djuren används till genom att bestämma åldern på djuret när de dog och vilken kön de kan ha haft (Leonardi et al. 2011). Dock hade mutationen någon form av spridning för 5500 år sedan, då Helena Malmström et al. (2010) hittade den i låg frekvens bland tio mellanneolitiska jägare/samlare från Skandinavien där nio individer visade sig sakna *-13,910*T* och en individ hade en heterozygot uppsättning av allelen T

Med hjälp av genetiska studier (DNA analyser) och arkeologiska laborativa metoder (lipidanalyser) så går det att se att laktaspersistens har en tydlig koppling till domesticering av djur och utvecklas antingen i samband med djurhållning eller efter. Det positiva selektionstryck som *-13,910*T* genomgått går att studera genom frekvenser av laktaspersistens i moderna populationer.

Vuorisalo et al (2012) menar att det positiva selektionstrycket som *-13,910*T* tolkas genomgått kan inte ha orsakats från konsumtionen av färskmjölk, därför att konsumtionen av färskmjölk inte tillhörde den traditionella matkulturen i Skandinavien utan är ett senare beteende och att det under stenåldern inte fanns tillräckligt med resurser för att konsumera färskmjölk i vuxen ålder (Vuorisalo et al. 2012). Det är alltså frågan om en annan form av mjölkprodukt/produkter som bör ha höga frekvenser av mjölsockret laktos och vara orsaken till det positiva selektionstrycket av laktaspersistens i Skandinavien (Isaksson et al. MS).

3.4 Selektion

Selektion eller naturligt urval är när en yttrepåverkan förändrar olika individer genetiskt (i detta fall nedbrytningen av mjölsocker). Selektion påverkar de fysiska särdragen i en

organism. Selektionen arbetar på fenotypen, och fenotypen har en bas i genotypen, vilken i sin tur är baserad på hur genomet ser ut, vilka mutationer som finns där, och vilken genetisk variation. Överlevnaden av den nya fenotypen i t.ex. en population beror på hur mycket den bidrar och fortplantar sig till den kommande generationen i relation till andra fenotyper och inom evolutionärbiologin kallas detta för fitness (Life 2009:443). $-13,910 * T$ är ett exempel på en gen som utsatts för positiv selektion. Vad som har selekterats för har diskuterats, men med resultat som indikerade att mutationen var mycket ovanlig på Iberiska halvön för 5500 år sedan, så förefaller den troligaste hypotesen att selektionen hänger samman med konsumtion av processade laktosprodukter (Sverrisdottir et al. 2014).

3.5 Genflöde

Migration mellan populationer kan bidra till en förändring i allelfrekvenser hos en population om de nya individerna överlever och bidrar med avkomma till nästa generation. De nya individerna kan antingen bidra med nya allelfrekvenser till en population eller så kan de förändra hela populationens uppsättning av allelfrekvenser, detta kallas i biologiska termer för genflöde. Genflöde kan ha en kraftig påverkan på kompositionen av genpoolen, speciellt om populationerna är små (Life 2009:449).

3.6 Urval

Undersökningen i denna studie är genomförd av benmaterial från Resmo och Köpingsvik på Öland. Tolv individer valdes ut för sekvensering 1) sex stycken individer tolkas tillhöra TRB eller stridsyxekulturen samt resterande individer tolkas tillhöra GRK 2) Materialet har genomgått stabila isotopanalyser av Eriksson et al. (2008) och de tolv individer som valdes för denna undersökning har bra utbyte av kollagen, vilket tyder på att även DNA sekvensering bör ge goda resultat 3) DNA-analyser har tidigare utförts på material från Öland av Anna Linderholm (MS) och individerna Resmo 1, 2, 3 och 29 som valdes ut till denna studie har visat sig ge goda resultat 4) Individerna från Resmo valdes ut från fas 1 och fas 2 då de överlappar med stenåldersplatsen i Köpingsvik.

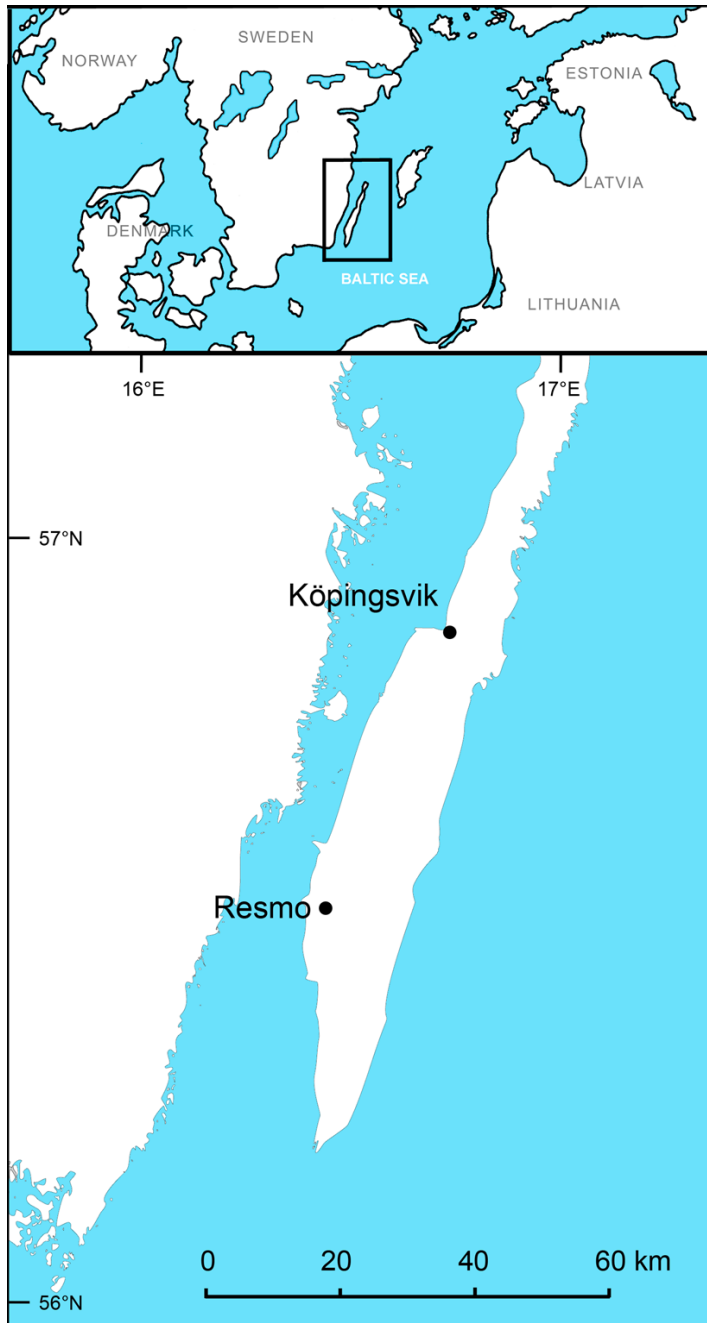
3.6.1 Köpingsvik

År 1929 påträffades de första fynden av den gropkeramiska kulturen på Öland, åtta stycken krukskärvor som grävdes fram från kyrkogården i Köpingsvik. Köpingsvik (se figur1) har en central position på ön och ligger intill en vik på den västra kusten av Öland. Platsen har genomgått flera utgrävningar och det har visat sig att Köpingsvik har varit i bruk ända från stenålder fram till nutid. Utgrävningarna av stenåldermaterialet har pågått mellan åren 1929 till 2003 och har i stort sett skett i form av exploateringsutgrävningar (Papmehl-Dufay 2006:84ff). Resultatet av utgrävningarna är tjugo stycken gravar som alla har tolkas tillhöra GKR och sjutton individer som påträffats utspridda i kulturlagret. ^{14}C -datering och stabila isotopanalyser har utförts på det funna materialet där en av individerna har den näst äldsta dateringen någonsin från Öland (sen mesolitisk). De stabila isotopanalyser som utförts på materialet från Köpingsvik visar tydligt att individerna har haft ett marint födointag (Eriksson et al. 2008).

3.6.2 Resmo

Ca 45 km sydsydväst om Köpingsvik ligger socknen Resmo (se figur1) där tre kända gånggrifter och en dös återfinns. Alla tre gånggrifter verkar ha sina öppningar österut, bort från havet och dösen samt två av gånggrifterna är idag i dåligt skick. 1908 utförde Ture J. Arne den första utgrävningen av Raä 85 Mysinge och fynden som påträffades i gånggriften var bärnstenspärlor, en flintyxa, pilspetsar av flinta, kniv av flinta, keramikfragment och människoben från ca 70-80 individer (Papmehl-Dufay 2006:72). ^{14}C -dateringar och stabila isotopanalyser har utfört på 31 av individerna från gånggriften (Raä 85 Mysinge) som visar att

graven brukats under tre faser (Eriksson et al. 2008). Fas ett infaller under tidig neolitikum och första halvan av mellanneolitikum och isotopanalyserna visar att individerna har haft en blandning av marin föda och terrestrisk föda. Den andra fasen ligger mellan den andra hälften av mellan neolitikum och början av sen neolitikum. Isotopanalyser visar att individerna från den andra fasen har haft ett liknade mönster som den första fasen när det gäller födointag. Den tredje fasen faller in under bronsåldern och här visar de stabila isotoperna att individerna har uteslutande konsumerat terrestrisk föda (Eriksson et al. 2008).



Figur 1: En karta över Öland i relation till östersjöområdet samt en karta över Öland för att visa avståndet mellan Resmo och Köpingsvik (Eriksson et al. 2013).

4. Material

Tolv individer valdes ut för DNA sekvensering i denna studie i ett försök att identifiera genen som kodar för laktaspersistens, sex stycken från Köpingsvik och sex stycken från Resmo.

Individerna från gånggriften i Resmo har en datering som ligger under fas 1 och fas 2 och hade ett blandat födointag av marina/terrestriska resurser. Individerna från Köpingsvik faller in under fas 1 & fas 2 och levde av övervägande marint protein med begränsad eller måttlig förändring över livstiden. ¹⁴C-datering för varje individ presenteras i tabell 1. Nedan följer en presentation av de individer som valdes ut i denna studie.

4.1 Benmaterial från Köpingsvik

Under vintern 1948-1949 upptäcktes fler gravar från stenåldern i Köpingsvik i samband med en byggnation av en ny skola ca 400 m nordöst om kyrkogården. Grav 1 Klinta 5:20, som den kom att kallas, var en individ som gravlagts i en utsträckt position på rygg med huvudet riktat österut och graven var ca 0,3-0,4 m då lårbenen och fötterna saknades. I samband med utgrävningen av Grav 1 påträffades krukskärvor, obrända djurben, fiskekrokar och en sältand. (Papmehl-Dufay 2006:93).

Individ P Klinta 5:20 påträffades utspridd i kulturlagret och inte i en grav (Eriksson et al. 2008).

I samband med utvidgande av en väg år 1970 påbörjades nya utgrävningar i fastigheterna Klinta 2:11/5:20 Köpingsvik. Två gravar påträffades (A5 och A7) i samband med utgrävningen och kulturlagret var rikt på utspridda ben runt om gravarna. Till denna studie valdes grav Klinta A5 ut för DNA sekvensering. Vid skelettet påträffades 2,2 kg gropkeramik, skärvor och fiskekrokar. Osteologiska analyser tyder på att individen var 23-25 år gammal och ca 173 cm lång (Papmehl-Dufay 2006:100).

När skolan i Köpingsvik skulle bygga en ny klätterställning år 1975 öppnades tre testgropar i samband med byggnationen. En av groparna visade sig innehålla den mest unika graven med tre individer därav namnet trippelgraven. Två vuxna, en man och en kvinna och ett barn tolkades som ca sex år gammalt av osteologiska analyser. Alla individer i trippelgraven har placerats utsträckta bredvid varandra på rygg. Barnet placerades mellan de vuxna individerna och kvinnan i graven hade placerats med huvudet på mannens bröst. Vid graven påträffades även en del fynd bland annat ben harpuner, två stycken sälskallar, benpärlor, en flintakniv, fragment av keramik, fiskekrok och pilspetsar av ben (Papmehl-Dufay 2006:107). I denna studie valdes skelett 1 och skelett 2 (de två vuxna individerna) ut för DNA sekvensering.

Åren 1975-1979 utfördes en del utgrävningar i fastigheten Solberga 5:11 Köpingsvik i samband med nya byggnationer. Två gravar påträffades (A7 och A11) och båda individerna tolkas som vuxna män. Grav A11 var täckt med stenar och valdes ut för DNA sekvensering (Papmehl-Dufay 2006:108f).

4.2 Benmaterial från Resmo

Som tidigare nämnt så utfördes utgrävningen av Raä 85 Mysinge av Ture J. Arne och var den första stenåldersplatsen på Öland som utsattes för arkeologiska utgrävningar. Utgrävningen innefattade gånggriften och ett smalt dike i anslutning till monumentet år 1908 (Papmehl-Dufay 2006:71ff). Ur de 70-80 individer som påträffades i samband med utgrävningen 1908 så valdes sex stycke ut för DNA sekvensering och nedan följer en presentation av en del av de fynd som grävdes fram vid utgrävningen.

En rät yxa av flinta, spjutspets av flinta, ben platta med två hål, avsågat hjorthorn, bennål, bärnstenspärlor och lerkärl (Arne 1909). Alla individer som valdes ut i denna studie har genomgått ¹⁴C-datering och stabila isotopanalyser (Eriksson et al. 2008)(tabell 1).

Individ 1 tolkas som en vuxen individ och faller in under fas 1 med en begränsad förändring i födointaget över livstiden (tabell 1).

Individ 2 bedöms som vuxen och faller in under fas 1 och även denna individ har en begränsad förändring i proteinintag över livstiden (tabell 1).

Individ 3 faller in under fas 2 och bedöms av osteologiska analyser som ett barn och har utöver avvänjning från amning en begränsad förändring i födointaget (tabell 1).

Individ 15 bedöms som en ungdom och faller in under fas 2. Individen har en uttalad förändring i proteinintag över livstiden (tabell 1).

Individ 20 bedöms som en vuxen människa och faller in under fas 2 med en begränsad förändring (tabell 1).

Individ 29 faller in under fas 1 och bedöms som vuxen med en måttlig förändring över livstiden (tabell 1) (Eriksson et al. 2008). Tre individer valdes ut från fas 1 och tre individer från fas 2 för att överlappa i tid med individerna från Köpingsvik och då gånggriften i Mysinge, Resmo var i bruk.

Tabell 1: Visar stabila isotopanalyser från kollagen och ^{14}C -datering, samt under vilken fas varje individ faller in under, huvudsakliga proteinintag och om det går att se eventuella förändringar av dieten för varje individ (Eriksson et al. 2008).

Lokal	Individ	Ålders- kategor i	^{14}C -datering (BP)	Fas	Huvudsakligt proteinintag	Förändring över livstiden	Element	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
Köpingsvik	Grav 1	Vuxen	4645 ± 45	fas 1	marint	begränsad	M1	-13,9	17
Köpingsvik	Grav 1	Vuxen	4645 ± 45	fas 1	marint	begränsad	M2	-13,8	16,7
Köpingsvik	Grav 1	Vuxen	4645 ± 45	fas 1	marint	begränsad	Mandibula	-13,8	16,4
Köpingsvik	Individ P	Vuxen	4420 ± 50	fas 1-2	marint	måttlig	M1	-13,2	17
Köpingsvik	Individ P	Vuxen	4420 ± 50	fas 1-2	marint	måttlig	P2	-13,3	17,4
Köpingsvik	Individ P	Vuxen	4420 ± 50	fas 1-2	marint	måttlig	Maxilla	-14,3	17
Köpingsvik	Grav Klinta A5	Vuxen	4395 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	M1	-13,1	17,1
Köpingsvik	Grav Klinta A5	Vuxen	4395 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	M2	-14	17,2
Köpingsvik	Grav Klinta A5	Vuxen	4395 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	M3	-13,7	17,3
Köpingsvik	Grav Klinta A5	Vuxen	4395 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	Ulna	-13,8	17,1
Köpingsvik	Trippelgrav sk 1	Vuxen	4385 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	M2	-14	16,1
Köpingsvik	Trippelgrav sk 1	Vuxen	4385 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	M3	-14,8	15,9
Köpingsvik	Trippelgrav sk 1	Vuxen	4385 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	Ulna	-14,7	15,2
Köpingsvik	Trippelgrav sk 2	Vuxen	4290 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	M1	-14,2	16
Köpingsvik	Trippelgrav sk 2	Vuxen	4290 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	M2	-14,3	15,7
Köpingsvik	Trippelgrav sk 2	Vuxen	4290 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	M3	-14,1	16
Köpingsvik	Trippelgrav sk 2	Vuxen	4290 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	Ulna	-14,4	15,5
Köpingsvik	Trippelgrav sk 2	Vuxen	4290 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	Kranium	-14,8	16,2
Köpingsvik	Grav A11 Solberga	Vuxen	4370 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	M1	-15,1	16,8
Köpingsvik	Grav A11 Solberga	Vuxen	4370 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	M2	-14,5	16,5
Köpingsvik	Grav A11 Solberga	Vuxen	4370 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	M3	-14,5	16,7
Köpingsvik	Grav A11 Solberga	Vuxen	4370 ± 40	fas 1-2	marint	begränsad	Mandibula	-14,9	16,8

Lokal	Individ	Ålders- kategor i	¹⁴ C-datering (BP)	Fas	Huvudsakligt proteinintag	Förändring över livstiden	Element	δ ¹³ C (‰)	δ ¹⁵ N (‰)
Resmo	Individ 1	Vuxen	4460 ± 45	fas 1	marint/terrestriskt	begränsad	M1	-18,6	12,6
Resmo	Individ 1	Vuxen	4460 ± 45	fas 1	marint/terrestriskt	begränsad	M2	-18,1	12,5
Resmo	Individ 1	Vuxen	4460 ± 45	fas 1	marint/terrestriskt	begränsad	Mandibula	-18,3	12,4
Resmo	Individ 2	Vuxen	4500 ± 45	fas 1	marint/terrestriskt	begränsad	M1	-19	11,8
Resmo	Individ 2	Vuxen	4500 ± 45	fas 1	marint/terrestriskt	begränsad	M2	-18,8	12,3
Resmo	Individ 2	Vuxen	4500 ± 45	fas 1	marint/terrestriskt	begränsad	Mandibula	-18,9	12,3
Resmo	Individ 3	Barn	4030 ± 45	fas 2	marint/terrestriskt	begränsad	dm1	-19,3	12,5
Resmo	Individ 3	Barn	4030 ± 45	fas 2	marint/terrestriskt	begränsad	dm2	-19,4	11,8
Resmo	Individ 3	Barn	4030 ± 45	fas 2	marint/terrestriskt	begränsad	M1	-19,6	11,3
Resmo	Individ 3	Barn	4030 ± 45	fas 2	marint/terrestriskt	begränsad	Mandibula	-19,6	11,3
Resmo	Individ 15	Ungdom	4055 ± 35	fas 2	marint/terrestriskt	uttalad	M1	-18,1	14,7
Resmo	Individ 15	Ungdom	4055 ± 35	fas 2	marint/terrestriskt	uttalad	M2	-18,5	12,3
Resmo	Individ 15	Ungdom	4055 ± 35	fas 2	marint/terrestriskt	uttalad	M3 tandanlag	-18,9	12,5
Resmo	Individ 15	Ungdom	4055 ± 35	fas 2	marint/terrestriskt	uttalad	Mandibula	-18,6	12
Resmo	Individ 20	Vuxen	3870 ± 35	fas 2	marint/terrestriskt	begränsad	M1	-18	13,2
Resmo	Individ 20	Vuxen	3870 ± 35	fas 2	marint/terrestriskt	begränsad	M2	-18,2	14
Resmo	Individ 20	Vuxen	3870 ± 35	fas 2	marint/terrestriskt	begränsad	Mandibula	-18	14
Resmo	Individ 29	Vuxen	4325 ± 40	fas 1	marint/terrestriskt	måttlig	M1	-17,1	14,9
Resmo	Individ 29	Vuxen	4325 ± 40	fas 1	marint/terrestriskt	måttlig	M2	-17,4	14
Resmo	Individ 29	Vuxen	4325 ± 40	fas 1	marint/terrestriskt	måttlig	M3	-18,1	13,5
Resmo	Individ 29	Vuxen	4325 ± 40	fas 1	marint/terrestriskt	måttlig	Mandibula	-18,3	13

4.3 Kontamination

Kontamination har alltid varit ett problem när man arbetar med aDNA och det finns olika typer av kontamination och steg för att undvika eller upptäcka kontamination. Kontamination av modernt DNA kan ske från arkeologerna som gräver upp ben materialet, individer som behandlar materialet till laboranten som borrar i benen för att extrahera DNA är också möjliga kontaminatorer. Det kan handla om upp mot över 10 individer som möjliga kontaminatörer av materialet och i den laborativa miljön så finns det även en risk för korskontaminationer (*cross-contaminations*) då ett prov kontamineras av ett annat prov t.ex. när ben från olika individer förvarats tillsammans. Kontamination kan även ske i steget då man ska amplifiera upp sina prover i PCR och prover från en tidigare körning finns kvar i maskinen, denna typ av kontamination kallas *carry-over*. Mikroorganismer som levt i benen kan även vara en källa för kontaminationer (Lidén & Götherström 1998) och i denna studie användes UV-strålning av ben materialet och redskapen, rengöring av arbetsytan med klorin efter varje borring, latexhandskar byttes ut efter varje prov och sterila dräkter och munskydd användes för att undvika kontamination.

5. Metod

Prover från ben och tänder extraherades med hjälp av en tandläkarbör i sterila förhållanden och utförandet av extraktionen skedde på Arkeologiska forskningslaboratoriet Stockholms universitet. Metoden som användes var silica-based spin columns av Yang et al. (1998).

5.1 DNA-extraktion

Under arbetet med att extrahera DNA från proverna så användes latexhandskar och skyddskläder för att minimalisera kontaminationsrisken (Yang et al. 1998). EDTA användes för att bryta ner hydroxiapatiten (kalk) och proteinas användes för att bryta ner proteinerna, framför allt kollagenet. Fettsyror och lipider bröts ned med hjälp av Triton X100. Kiseldioxid partiklar tillsätts för att binda till DNA och sedan centrifugeras blandningen för att separera kiselbunden DNA från resten av blandningen. I slutfasen av denna metod tvättas kiseldioxiden bort med hjälp av etanol från DNA för att få fram rent och koncentrerat DNA (Yang et al. 1998).

5.2 PCR

PCR är en förkortning på Polymerase chain reaction och har till uppgift att amplifiera upp DNA med hjälp av enzymer. Metoden kopierar det som händer vid celledelning, när genomen skall dupliceras. Processen genomförs genom att utsätta DNA-proverna för hastiga temperaturskillnader. Denna process sker i tre steg: denaturering, hybridisering och förlängning (Hummel 2003:81ff). Under denatureringsfasen separeras den dubbeltrådiga DNA strängen genom att värma upp DNA till 95°C under 15 min för att sedan köra 43 cykler med en temperatur på 94°C där varje cykel är 30 s lång. I hybridiseringsfasen sänks temperaturen till 54,6°C så att primers kan binda till de separerade DNA-strängarna och i förlängningsfasen så höjs temperaturen till 72°C i 30 sekunder för att påbörja uppbyggnaden av nukleotider (Malmström et al. 2010). Alla prover i denna studie genomgick en PCR-körning.

5.3 Binladen-taggning, FLX-sekvensering

Syftet med denna metod i denna studie är att på ett enkelt och effektivt sätt sekvensera upp DNA för att lokalisera den genetiska variant som kodar för laktaperistens. Denna metod tillåter stora mängder DNA sekvensering på kort tid och kan sekvensera upp till 25 miljoner nukleotider på bara fyra timmar. Detta görs genom att varje PCR primer får en unik tagg som sedan appliceras till den rätta DNA sekvensen (Binladen et al. 2007). Därefter skapas ett DNA bibliotek av hela genomet eller endast specifika platser på genomet (Homeister 2012:11). I denna studie så sekvenseras en specifik plats på genomet för att försöka lokalisera den genetiska variant som kodar för laktapersistens. Alla DNA prover läggs in i en pool tillsammans med PCR-primers och taggarna för att binda till den rätta DNA sekvensen.

5.4 Autentiska data

Allan Cooper och Henrik Poinar (2000) framställde en checklista med nio kriterier för att uppnå ett autentiskt resultat vid arbetet med aDNA. De föreslår t.ex. isolerade arbetsplatser, negativkontroll prover (för att upptäcka när kontamination uppstår) och lämpligt molekylärt beteende (inte för långa PCR produkter) (Cooper et al. 2000). Checklistan ger dock inga garantier på autentisk data (då proverna kan ha varit kontaminerade innan extraktion). I denna studie så användes negativkontroll prover samt isolerade arbetsplatser (Gilbert et al. 2005).

6. Resultat

Nedan presenteras resultatet av DNA analyserna från varje individ i Tabell 2.

Tabell 2: Sekvenseringsdata för de analyserade individerna. Kvalitetsindex är det fluorometriskt koncentrationsresultatet i µg/µl för DNA av samma storlek som mina PCR-produkter. Antal läsningar motsvarar den mängden sekvenser som genererades för just den här PCR-produkten, och i status kolumnen betyder Na att inget resultat genererades. Na= "not applicable" och översätts till inte tillämplig. C betyder att individen identifierats med en homozygot uppsättning av allelerna och saknar mutationen -13,910*T och C/T innebär att mutationen identifierats i en heterozygot uppsättning av allelerna.

Lokal	Individer	Kvalitetsindex	Antal läsningar	Status
Köpingsvik	Grav 1	<1	0	Na
Köpingsvik	Individ P	<1	0	Na
Köpingsvik	Grav Klinta A5	<1	0	Na
Köpingsvik	Trippelgrav 1	Na	0	Na
Köpingsvik	Trippelgrav 2	Na	0	Na
Köpingsvik	Grav A11 Solberga	Na	0	Na
Resmo	Individ 1	<1	0	Na
Resmo	Individ 2	18,3	7	C
Resmo	Individ 3	6,3	3	C
Resmo	Individ 15	9,5	82	C/T
Resmo	Individ 20	5,4	1	C
Resmo	Individ 29	11,1	14	C/T

I den här studien sekvenserades 12 individer där endast 5 individer gav resultat, dvs 42%. Resultatet av denna studie kan jämföras med andra studier som arbetar med liknande data och har ett förväntat resultat på ca 30% (Götherström muntl medd). Nyligen publicerade Wilde et al. (2014) SNP resultat ifrån 150 individer daterade till neolitikum och mesolitikum där positiva resultat redovisades för 32 % av de 150 individerna. Malmström et al. (2010) redovisar en högre frekvens med positiva resultat på 71% av datasetet, men notera att den studien baseras på material som redan kvalitets analyserats med Q-PCR och där allt med små DNA mängder diskvalificerats redan innan SNP typningen.

-13,910*T hittades hos individ 15 och individ 29 med en heterozygot uppsättning. Båda individerna kommer från Resmo och tolkas som tidiga jordbrukare. Individerna 2, 3 och 20 från Resmo saknade mutationen men hade en homozygot uppsättning av -13,910*C. DNA-analyserna av Individ 1 från Resmo och av Grav 1, Individ P, Grav Klinta A5, Trippelgrav 1 & 2 och Grav Solberga A11 från Köpingsvik gav inget resultat (se tabell 2).

7. Analys och diskussion

Materialet från denna studie bör genomgå fler PCR-körningar för att undersöka om det finns mer data som inte noterats i körningarna från denna studie. Men i tabell 2 kan man notera att mutationen påträffas hos individ 15 och individ 29 och att flest läsningar utförts hos dessa individer för att identifiera mutationen -13,910*T. Enligt analysen är individerna 2, 3 och 20 alla homozygota för C och saknar därför mutationen, men här skall det även påpekas att resultatet från denna studie inte genomgått tillräckligt med PCR-körningar för att utesluta ytterligare förekomst av mutationen. I något fall kan det vara så att antal läsningar är lågt (det blir ju till exempel omöjligt att identifiera en heterozygot med endast en läsning), men framför allt behövs fler PCR-körningar på materialet. Vanligtvis brukar det räcka med 3-4 PCR-körningar per prov (Gagneuz et al.1997), men i vissa fall kan det behövas upp till sju PCR-körningar (Daskalaki et al. 2011). De resterande individerna från denna studie gav inte något resultat överhuvudtaget och detta kan mycket väl bero på att det inte fanns tillräckligt med

DNA i proverna, om detta är fallet så bör processen att borra och extrahera DNA från benen till sekvensering repeteras för dessa individer.

Ett problem som kan ha uppstått med proverna är *allelic-dropout*. *Allelic-dropout* är när endast en av de två allelerna har sekvenserats och identifierats, även om metoden är till för att identifiera båda allelerna. Det finns två anledningar till att *allelic-dropout* sker i större utsträckning i gammalt DNA än i modernt DNA. Det första är om DNAt är så förstört så att endast ett fåtal eller kanske till och med bara en kopia återstår; då är risken stor för att bara en av de två allelerna sekvenseras. Det andra är om det finns ämnen som hämmar enzymet och gör det mindre effektivt, eller kanske om DNA till viss del modifieras så den blockerar förlängningsfasen i PCR och gör amplifieringen av DNA mindre effektivt, som i sin tur kan leda till att bara en av de två allelerna sekvenseras. Utav dessa två processer så anses det att den första är den mest allvarliga, men i båda fallen kan det leda till en situation där huvuddelen av resultatet påverkas av *allelic-dropout* (Daskalaki et al. 2011). Därför är det aldrig tillräckligt att endast sekvensera gammalt DNA en gång, utan flera läsningar bör göras för att uppnå så autentiska resultat som möjligt och som även kan upprepas av andra forskare.

Som tidigare nämnts så har redan en del av materialet genomgått denna typ av analyser av Malmström et al. (MS). Individerna 1,2,3 och 29 sekvenserades i ett försöka att identifiera om mutationen $-13,910*T$ förekom hos individerna. Individerna 1 och 29 hade en homozygot uppsättning av allelerna med C medan hos individerna 2 och 3 identifierades mutationen i en heterozygot uppsättning av allelerna med T (Malmström et al. MS). Detta stämmer alltså inte med resultaten från denna studie där individerna 2 och 3 var homozygota för C och saknade mutationen och individ 29 kunde identifieras med mutationen T i en heterozygot uppsättning. Individ 1 gav inget resultat i denna studie men identifierades med en homozygot uppsättning av C i Malmström et al. (MS). I denna studie så kan individerna 2 och 3 utsatts för *allelic-dropout* medan i Malmströms et al. (MS) studie så kan *allelic-dropout* ha påverkat resultatet för individ 29, och om så är fallet så går det inte att säga om det var för lite DNA i proverna eller om ämnen påverkat enzymet.

När data från denna studie jämförs direkt med data från Malmströms et al. (2010) moderna population där 97 individer genomgått DNA sekvensering (n=97 vilket betyder 194 observationer) så blir skillnaden signifikant vid ett test med Fishers exakta test ($p < 0.05$). Detta gäller när dataset behandlas som komplett (8/2) så väl som när största möjliga problem med *allelic-dropout* förutsätts för datasetet (5/2). Således syns samma mönster som Malmström et al. (2010) ser i sitt material ifrån en GRK kontext. När samma test används för att hitta en skillnad mellan Malmströms et al. (2010) GRK dataset och dataset från denna studie, så blir det inget signifikant resultat. Varken om man förutsätter att ingen *allelic-dropout* har skett ($p=0.25$) eller om man förutsätter att alla resultat är utsatta för *allelic-dropout* ($p=0.15$) (Gagneux et al. 1997).

Resultatet i denna studie visar tydligt att mutationen $-13,910*T$ förekommer på Öland under neolitikum. Resultatet indikerar också att frekvensen av mutationen inte avviker från övriga världen från samma tid. Resultatet från denna studie kan jämföras med Malmström et al. (2010) där $-13,910*T$ endast upptäcktes hos en individ från tio neolitiska jägare och samlare från Gotland (se tabell 3). Resultatet från Malmströms studie är att den låga frekvensen av $-13,910*T$ (endast 5 %) bland jägare och samlare i jämförelse med den nuvarande frekvensen (74 %) i den skandinaviska populationen kan förklaras med antingen selektion eller mer sannolikt att jägare och samlare populationer ersatts av neolitiska jordbrukare, detta för att laktaspersistens kopplats ihop med jordburket (Leonardi et al. 2011) men att det även finns en

genetisk skillnad mellan jägare och samlar populationerna och de neolitiska jordbrukarna (Skoglund et al. 2014). I Malmström et al. (MS) studie så observerades mutationen $-13,910*T$ flest gånger hos de neolitiska jordbrukarna, men endast hos en individ ifrån jägare och samlar kontext från Gotland (Malmström et al. 2010), vilket skulle kunna förklara den nuvarande höga frekvensen av mutationen i Skandinavien. $-13,910*T$ hittades endast hos två individer i denna studie (se tabell 3), men båda individerna kommer från Resmo.

Tabell 3: En jämförelse av förekomsten av allelerna C resp. T mellan det neolitiska Resmo och gotländska gropkeramikerna enligt Malmström et al. (2010).

Resultatet från denna studie (neolitiska jordbrukare)		Malmström et al.(2010) (GRK)	
C	T	C	T
8	2	19	1

Förhållandet mellan Resmo och Köpingsvik i just den här mutationen ($-13910*T$) är omöjlig att jämföra eftersom inget användbart resultat från Köpingsvik materialet gick att få fram. Malmströms et al. dataset ifrån 2010 användes som en proxyvariabel istället för Köpingsvik materialet, det är samma typ av fyndplats fast ifrån en annan geografisk plats. Vid en sådan jämförelse kan jag inte utesluta att mitt material och Malmströms material kommer ifrån samma population, eller ifrån två populationer med väldigt likvärdiga frekvenser för den här mutationen. Ingen skillnad går att tyda mellan Resmo och GRK-kontexten i frekvensen för mutationen som gör det möjligt att konsumera oprocessad mjölk i vuxen ålder. Vad som däremot visas, är att det finns samma brott mellan data från denna studie och den moderna populationen i Skandinavien, som det även gör mellan Helena Malmströms et al. (2010) GRK-data och den moderna populationen i Skandinavien. Slutsatsen kan dras att något har hänt med frekvensen för mutationen mellan nu och den tiden som dessa båda dataset representerar. Den skillnaden kan ha drivits av antingen selektion eller genflöde.

Att föra diskussionen vidare blir spekulativt, men det kan ändå noteras att datorsimuleringar indikerar att selektion är bästa förklaringsmodellen (Itan et al. 2009). Vidare kan även noteras att en liknande studie, fast med ABC simuleringar som analysverktyg, kommer fram till att en post-neolitisk selektion för att kunna konsumera oprocessad mjölk i vuxen ålder är den bästa förklaringsmodellen för skeendet på Iberien (Sverrisdottir et al. 2014). Det finns inga sådana data för Skandinavien, men selektion förefaller vara en hypotes som är värd att undersöka vidare.

På frågan om detta resultat kan förklaras med hjälp av selektion eller genflöde så går det att anta det för de två individer som visa sig bära på mutationen. Att mutationen skulle ha uppstått på Öland under stenålder och är anledningen till att individ 15 och individ 29 bär på $-13,910*T$ är högst osannolikt. Ett positivt selektionstryck och migration är anledningen till att $-13,910*T$ hittas under stenålder på Öland. Men är även anledningen till att 74 % av Skandinavien befolkning idag bär på mutationen.

7.1 Fortsatta studier

Ett sätt att testa om mutationen $-13,910*T$ utsatts för ett positivt selektionstryck är att undersöka förekomsten av mutationen i materialet som daterats till fas 3 (äldre bronsåldern) i Erikssons et al. (2008) studie. Skulle frekvensen av $-13,910*T$ vara högre än materialet från fas 1 och 2 så har mutationen utsatts för ett positivt selektionstryck.

Eriksson et al. (2008) utförde isotopanalyser och ^{14}C -dateringar på 123 individer från nio olika platser från Öland. Ett möjligt sätt att gå vidare med denna studie är att utföra DNA analyser på samma material, för bl.a. lokalisering av mutationen $-13,910^*T$. En annan studie som skulle kunna appliceras på materialet är att undersöka genetiska variationer eller likheter på de neolitiska Ölandsmaterialet.

En eventuell förstudie som skulle kunna vara mer aktuell är att sekvensera alla individer från Köpingsvik (30 individer) samt Resmo (31 individer) som ingick i Eriksson et al.(2008). En sådan typ av studie skulle kunna komplettera denna uppsats och eventuellt kunna ge oss mer kunskap om platserna och hur de förhåller sig tillvarandra.

I denna studie användes endas en markör ($-13,910^*T$) för sekvensering. Det skulle även vara av intresse att applicera fler markörer på materialet som t.ex. genen CCR5 (skyddar mot HIV) (Lidén et al. 2006). Vid underökningen av eventuellt släktskap mellan stenåldersindivider från Öland så jämförs mellan 40 till 50 gener (markörer) från varje individ och där eventuella likheter i sekvenserna skulle tyda på släktskap. Detta skulle innebära att man sekvenserade hela genom från varje individ.

8. Sammanfattning

DNA analyser har utförts på 12 neolitiska individer från Öland, i ett försök att lokalisera mutationen laktapersistens. Mutationen gör det möjligt för vuxna människor att bryta ned mjölksocker. De 12 individer som valdes ut för sekvensering kommer från två olika neolitiska platser som har en tydlig skillnad i materiell kultur. Stabila isotopanalyser visar att det även finns en skillnad i vilken typ av föda som konsumerades på platserna. Individerna har genomgått ^{14}C -datering där det visar sig att platserna överlappar i tid med varandra. Endast 5 individer från Resmo gav resultat och där mutationen påträffades hos två av individerna. Inga individer från Köpingsvik gav resultat. Orsaken till att mutationen finns på Öland under neolitikum kan förklaras men genflöde eller det positiva selektionstryck som mutationen genomgått i Skandinavien.

9. Litteraturförteckning

- Arne, T. J.** 1909. Stenåldersundersökningar. *Fornvännen* 4, s. 86-108.
- Cooper, A. & Poinar, H.N.** 2000. Ancient DNA: Do It Right or Not at All . *Science* 289, s. 1139.
- Daskalaki, E., Anderung, C., Humphrey, L. & Götherström, A.** 2011. Further developments in molecular sex assignment: a blind test of 18th and 19th century human skeletons. *Journal of Archaeological Science* 38, s. 1326-1330
- Eriksson, G., Linderholm, A., Fornander, E., Kanstrup, M., Schoultz, P., Olofsson, H. & Lidén, K.** 2008. Same island, different diet: Cultural evolution of food practice on Öland, Sweden, from the Mesolithic to the Roman Period. *Journal of Anthropological Archaeology* 27, s. 520-543.
- Gagneux, P., Boesch, C & Woodruff, D.S.** 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology* 6, s. 861-868
- Gilbert, T P., Bandelt, H., Hofreiter, M. & Barnes, I.** 2005. Assessing ancient DNA studies. *Trends in Ecology and Evolution* 20, s. 541-544.
- Homeister, A.** 2012. Ancient DNA studies of the Asiatic Eskimo site Ekven. Kandidatuppsats. Arkeologiska forskningslaboratoriet, Stockholms universitet.
- Hummel, S.** 2003. Ancient DNA Typing: Methods, strategies and applications. Berlin .
- Isaksson, S., Eriksson, G., Andersson, P., Enmyren, C., Carlsson, O., Schweda, E., Howcroft, R., Dyreng, P. & Lidén, K. (MS).** Whey to go - first identification of lactose in prehistoric pottery.
- Itan, Y., Powell, A., Beaumont, M. A., Burger, J. & Gilbert, T P.** 2009. The Origins of Lactase Persistence in Europe. *PLoS Computational Biology* 5, s. 1-13.
- Leonardi, M., Gerbault, P., Gilbet, T P & Burger, J.** 2011. The evolution of lactase persistence in Europe. A synthesis of archaeological and genetic evidence. *International Dairy Journal* 22, s. 88-97.
- Lidén, K. & Eriksson, G.** 2007. Walking on the wild side: on cultural diversity and the Pitted Ware Culture along the Swedish east coast during the Middle Neolithic. Larsson, M. & Parker Pearson, M. (Eds) *From Stonehenge to the Baltic. Living with cultural diversity in the third millennium BC.* BAR International Series 1692, s. 1-9.
- Lidén, K., Linderholm, A. & Götherström, A.** 2006. Pushing it back. Dating the CCR₅-Δ32 bp deletion to the Mesolithic in Sweden and its implications for the Meso/Neo transition. *Documenta Paehistorica XXXIII.*, s. 29-37
- Lidén, K. & Götherström, A.** 1998. Guidelines for work with ancient DNA developed at the Archaeological Research Laboratory: *Laborativ arkeologi* 10-11, s. 55-57

- Malmström, H., Linderholm, A., Dalén, L., Lidén, K., Storå, J., Molnar, P., Gilbert, T P., Willerslev, E., Holmlund, G & Götherström, A. (MS) 2008.** Allele frequencies of the lactase gene in Scandinavian Neolithic populations, hunters-gatherers vs. Farmers. Paper IV. *Migration in Prehistory: DNA and stable isotope analyses of Swedish skeletal material*. Theses and Papers in Scientific Archaeology 10. Stockholm.
- Malmström, H., Gilbert, TP., Thomas, M., Brandström, M., Storå, J., Molnar, P., Andresen, P., Bendix, C., Holmlund, G., Götherström, A & Willerslev, E. 2009.** Ancient DNA Reveals Lack of Continuity between Neolithic Hunter-Gatherers and Contemporary Scandinavians. *Current Biology* 19, s. 1758–1762.
- Malmström, H., Linderholm, A., Lidén, K., Storå, J., Molnar, P., Holmlund, G., Jakobsson, M & Götherström, A. 2010.** High frequency of lactose intolerance in a prehistoric hunter-gatherer population in northern Europe Research article. *BMC Evolutionary Biology* 10, s. 1-8.
- Papmehl-Dufay, L. 2006.** *Shaping an identity. Archaeological Research Laboratory: Pitted Ware pottery and potters in southeast Sweden*. Stockholm Universitet.
- Price, T. D. & Bar-Yosef, O. 2011.** The Origins of Agriculture: New Data, New Ideas: An Introduction to Supplement 4. *Current Anthropology* 52, s. 163-174.
- Skoglund, P., Malmström, H., Raghavan, M., Storå, J., Hall, P., Willerslev, E., Gilbert, T P., Götherström, A & Jakobsson, M. 2012.** Origins and Genetic Legacy of Neolithic Farmers and Hunter-Gatherers in Europe. *Science* 336, s. 466-469.
- Skoglund, P., Malmström, H., Omrak, A., Raghavan, M., Valdiosera, C., Günther, T., Hall, P., Tambets, K., Sjögren, K., Apel, J., Willerslev, E., Storå, J., Götherström, A., Jakobsson, M. 2014.** Genomic Diversity and Admixture Differs for Stone-Age Scandinavian Foragers and Farmers. *Science* 344, s. 747-750.
- Sverrisdóttir, O.O., Timpson, A., Toombs, J., Lecoeur, C., Froguel, P., Carretero, J.M., Ferreras, J.L.A., Götherström, A. & Thomas, M.G. 2014.** Direct Estimates of Natural Selection in Iberia Indicate Calcium Absorption Was Not the Only Driver of Lactase Persistence in Europe. *Molecular Biology and Evolution* 31, s. 975-983.
- Vuorisalo, T., Arjamaa, O., Vasemägi, A., Taavitsainen, J., Tourunen, A., Saloniemi, I. 2012.** High Lactose Tolerance in North Europeans: A Result of Migration, Not In Situ Milk Consumption. *Perspectives in Biology and Medicine* 55, s. 163-174.
- Wildea, S., Timpson, A., Kirsanowa, K., Kaiser, E., Kaysere, M., Unterländer, M., Hoffelder, N., Potekhina, I., Schier, W., Thomas, M.G. & Burger, J. 2014.** Direct evidence for positive selection of skin, hair, and eye pigmentation in Europeans during the last 5,000 y. *PNAS* 111, s. 4832-4837.
- Yang, D.Y., Eng, B., Wayne, J.S., Dудар, J.C. & Saunders, S.R. 1998.** Improved DNA Extraction From Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns. *American Journal of Physical Anthropology* 105, s. 539-543.



Stockholms
universitet