

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

katedra biologických a biochemických věd

Starodávná DNA

(bakalářská práce)

Lucie Radová

Pardubice, 2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie Radová**
Osobní číslo: **C10746**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Starodávná DNA**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte literární rešerši na téma lidská starodávná DNA. Věnujte se výběru archeologického materiálu, ze kterého je možné úspěšně extrahovat DNA, metodám extrakce, purifikace a sekvence.
2. Věnujte se rovněž možnostem kontaminace vzorků DNA při odběru a zpracování.
3. Popište vybrané archeologické nálezy, kdy byla úspěšně analyzovaná starodávná DNA.
4. Materiály čerpejte z databází WOS a SCOPUS.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

13. prosince 2012

Termín odevzdání bakalářské práce:

19. července 2013



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2013

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27. 2. 2013

Lucie Radová

Poděkování: Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí bakalářské práce Ing. Marcele Pejchalové, Ph.D., za vstřícnost a konzultace, které mi poskytla v průběhu vzniku této práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu, bez které by tato práce nebyla dokončena.

Anotace

V bakalářské práci je popsána a vysvětlena podstata starobylé DNA, mechanismy její degradace a její zdroje. Dále jsou uvedeny možnosti dekontaminace starodávné DNA. Při práci se starodávnou DNA je potřeba dodržovat mnoho specifických postupů a dbát na přísná opatření při její izolaci a následné analýze. V druhé části práce jsou vypsány některé metody a nastíněny konkrétní případy identifikace osob pomocí starodávné DNA.

Klíčová slova: Starodávná DNA, aDNA, kosterní pozůstatky, extrakce DNA, kontaminace, izolace DNA

Annotation

The bachelor's work described and explained the substance of ancient DNA, mechanisms of its degradation and its resources. Then the possibilities of decontamination of ancient DNA are introduced. It is necessary to observe many of specific procedures at work with ancient DNA and abide strict measures in its isolation and subsequent analysis. There are some of the methods written in the second part of the bachelor's work and specific examples of identification people by ancient DNA are outlined.

Key words: Ancient DNA, aDNA, skeletal remains, DNA extraction, contamination, DNA isolation

OBSAH

Úvod.....	- 10 -
1 DNA.....	- 11 -
1.1 Jaderná DNA.....	- 13 -
1.2 Mitochondriální (mt)DNA.....	- 13 -
1.3 Genetické genealogie.....	- 14 -
2 Začátky analýzy aDNA.....	- 14 -
3 Poruchy při analýze DNA.....	- 15 -
3.1 Degradace DNA.....	- 16 -
3.2 Kontaminace – znehodnocení vzorku.....	- 19 -
3.3 Přítomnost inhibitorů PCR.....	- 21 -
4 Analýza DNA.....	- 22 -
4.1 Zdroje a DNA.....	- 22 -
4.2 Vlastní analýza DNA.....	- 23 -
5 Extrakce a izolace.....	- 26 -
5.1 Extrakce směsí fenol-chloroform.....	- 27 -
5.2 Purifikace - přečištění.....	- 27 -
5.3 Extrakce pomocí cetyltrimethylamoniumbromidového (CTAB) pufru a isoamylalkohol-chloroformu.....	- 28 -
5.4 Izolační kity.....	- 29 -
5.5 Detekce.....	- 30 -
5.6 Ověření pravdivosti výsledků.....	- 30 -
6 Co se stanovuje?.....	- 31 -
6.1 Kompetitivní sekvence.....	- 31 -
6.2 Polymorfismy.....	- 32 -

6.3	Analýza HVR mtDNA.....	- 33 -
6.4	Analýza SNP lokusů.....	- 33 -
7	Techniky a metody používané při analýze.....	- 34 -
7.1	PCR (polymerázová řetězová reakce, Polymerase Chain Reaction).....	- 34 -
7.3	Elektroforéza DNA.....	- 36 -
7.3.1	Gelová elektroforéza	- 36 -
7.3.2	Kapilární elektroforéza.....	- 37 -
7.4	Mikrofluidní metoda	- 38 -
7.5	Next generation sequencing - sekvenování nové generace	- 38 -
8	Zajímavosti při analyzování DNA.....	- 39 -
8.1	Naleziště ostatků v Darwen ve Velké Británii a analýza 3 vzorků.....	- 39 -
8.2	Srovnání DNA neandertálce a moderního člověka.....	- 40 -
8.3	Identifikace ostatků Mikuláše Koperníka	- 42 -
8.4	Nález v Denisově jeskyni na Sibiři.....	- 44 -
8.5	Identifikace neznámých osob	- 45 -
8.6	Kosterní pozůstatky z pohřebiště ve Znojmě-Hradišti.....	- 47 -
8.7	Pohřebiště novorozenců v Izraeli	- 51 -
8.8	Analýza pohřebiště v Ergoldingu ze 7. století.....	- 52 -
9	Závěr	- 54 -
10	Použitá literatura	- 56 -

Úvod

Starodávnou DNA (ancient DNA, paleoDNA, starobylá DNA, aDNA) můžeme definovat jako deoxyribonukleovou kyselinu z rostlin, zvířat či lidí. Je to biologický materiál vyskytující se v archeologických vykopávkách, mumiích, muzejních exponátech a v trvale zmrzlé půdě, tzv. permafrostu. Díky analýze DNA se sledují prehistorické migrace obyvatel, zjišťuje se složení lidské stravy v dávné minulosti pomocí analýzy paleostolice, sleduje se systém pohřbívání, identifikace jednotlivých osob, popřípadě posuzování příbuzenských vztahů a zjišťují se choroby u vymřelých populací.

K posuzování příbuzenských vztahů se užívá čtyř skupin DNA lokusů:

- Lokusy autozomální (dědičné z matky i z otce na děti)
- X-chromozolální haplotyp (děděný z matky na všechny děti a z otce pouze na dcery)
- Y-chromozomální haplotyp (dědičný výhradně z otce na syna)
- Mitotyp - lokusy mtDNA (dědičný z matky na všechny děti)

„Žádný člověk nemůže poznat cíl své životní pouti, pokud se nedozví,
odkud přesně pochází a jak se dostal na své současné místo.“

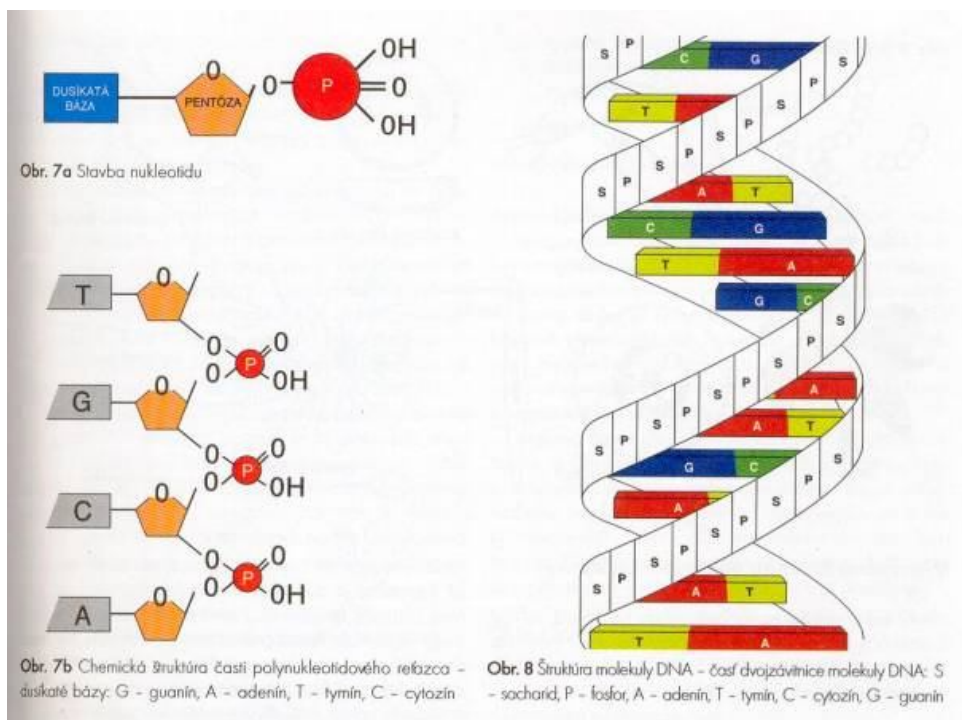
Maya Angelou (americká básnířka) (Vaněk, 2009)

1 DNA

Chemicky je to makromolekula, která se vyskytuje v buňce (Šimková, 2012). Její struktura a princip přepisu informace do proteinů byly odhaleny v polovině minulého století anglickými vědci Crickem a Watsonem, kteří za svůj objev obdrželi Nobelovu cenu (Pížová a spol., 2011). Je tvořena cukrem (deoxyribózou), zbytkem kyseliny fosforečné (fosfátem) a dusíkatými bázemi (adenin, guanin, thymin, cytozin). Je to komplex dvou protisměrných (antiparalelních) vláken spojených vodíkovými můstky, které tvoří dvoušroubovici (Urban a Vyhnálek, 2002). Ve specifickém pořadí nukleotidů je zakódována dědičná informace (Borková a spol., 2011).

- Purinové báze: adenin (A) a guanin (G)
- Pyrimidinové báze: thymin (T) a cytozin (C) (Urban a Vyhnálek, 2002)

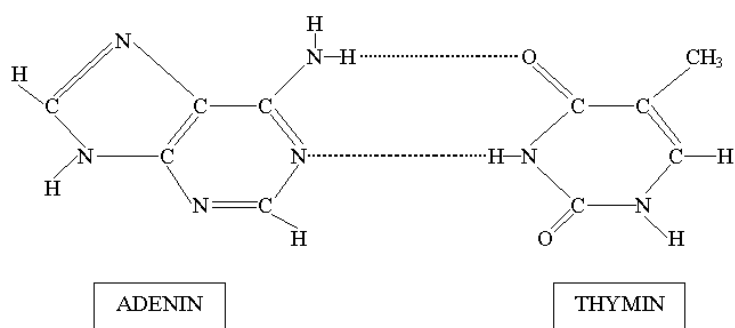
Obrázek 1: Nukleotid - <http://www.gjar-po.sk/heureka/ucastnici/vykopavky/dna/nukleo.htm> (11. 3. 2013).



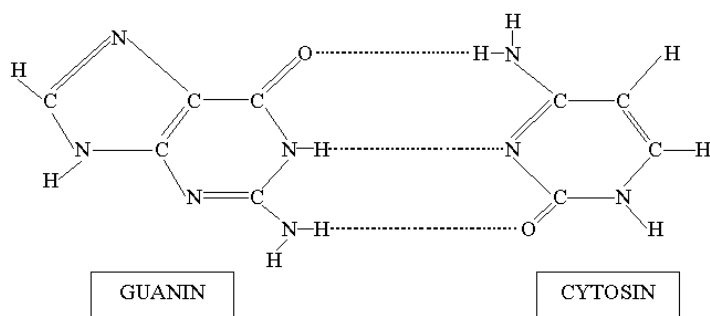
Základní struktura DNA. DNA je polymer nukleotidů, každý nukleotid je složený z trifosfátu, cukru deoxyribózy a báze.

Při vzniku dvoušroubovice DNA se uplatňuje základní pravidlo komplementarity, což je chemická afinita mezi dusíkatými bázemi. Kdy adenin se váže na thymin (viz Obrázek 2) a guanin na cytozin (viz Obrázek 3) (Urban a Vyhnálek, 2002). DNA se u lidských živých buněk vyskytuje jednak v jádře (jaderná DNA) a v mitochondriích (mitochondriální DNA - mtDNA) (Šimková, 2012).

Obrázek 2: Vazba adeninu a thyminu v DNA - <http://genetika.wz.cz/images/at.gif> (1. 7. 2013).



Obrázek 3: Vazba guaninu a cytosinu v DNA - <http://genetika.wz.cz/images/cg.gif> (1. 7. 2013).



1.1 Jaderná DNA

Genom člověka je tvořen genetickým materiálem, který je uložený v jádře buňky (Borková a spol., 2011). V každé jaderné lidské buňce se normálně nachází 23 párů chromosomů tvořených 22 páry tzv. autosomů (tedy chromosomů neurčujících pohlaví) a jedním párem pohlavních chromosomů (XX u žen a XY u mužů). Jaderný genom člověka obsahuje asi 3×10^9 bp (Bezděk a Těthalová, 2010).

1.2 Mitochondriální (mt)DNA

Mitochondrie jsou organely, jež se nachází v cytoplazmě buňky a slouží k produkci energie ve formě ATP (Šimková, 2012). Mitochondrie mají vlastní jednoduchou kruhovou molekulu DNA o velikosti 16 569 párů bází.

MtDNA je obvykle přítomna v archeologických vzorcích v mnohem větším množství než nukleární DNA (Gilbert a spol., 2003). V lidské mtDNA rozlišujeme hypervariabilní oblasti: dvě hlavní (HV1 – má 341 nukleotidů; HV2 – má 267 nukleotidů) a jednu vedlejší (HV3 – má 136 nukleotidů). Mutace v těchto oblastech nemají vliv na životaschopnost organismu. Frekvence vzniku jedné mutace je přibližně 2 000 let (Vaněk 2010). Analýza mtDNA je zaměřena na první a druhou oblast (HVR1 a HVR2). Tato oblast je veliká 1 050 bází (přibližně 7 % genomu mtDNA) (Šimková, 2012).

Při zkoumání mitochondriální aDNA (roku 1987) byla objevena teorie společného předka, tzv. „Mitochondriální Evy“. Její původ je z Afriky a žila před asi 150 000 lety. DNA této „Africké pramatky“ se zachovala v mateřské linii a dodnes se předává z matky na dceru. Teorie je spojována se 7 nejhojněji se vyskytujícími haploskupinami mtDNA (tzv. sedmi dcerami Evinými). Jedná se o haploskupiny U, X, H, V, T, K a J. Původní teorie byla postavena na výzkumu zmapování mtDNA u 147 jedinců. Na základě shodností a odlišností v polymorfních oblastech mtDNA byl vytvořen evoluční strom (Cann a spol., 1987).

1.3 Genetické genealogie

Obor, který vznikl na začátku 90. let 20. století, využívá se ke sledování mužských linií. Chromozom Y představuje pouze 0,38 % celkové DNA obsažené v lidské buňce a je nejmenším ze všech chromozomů. Obsahuje největší nerekombinující blok DNA v lidském genomu (přibližně 58 milionů párů bází). Je proto vhodným „záznamovým zařízením“ genetických změn. Analýza DNA mužských linií je zaměřena na nerekombinující část chromozomu Y (NRY, Non-re-combining region of the human Y chromosome).

Genetický „praotec Adam“ žil asi před 60 tisíci lety v Africe v oblasti Čadu. Všichni muži v sobě mají kousek jeho DNA. Genetická informace některých mužů uložená na chromozomu Y nemusí být předána dál. Tito muži v průběhu generací buď nemají potomky, nebo mají jen dcery, které od otce nemohou přijmout Y chromozom (Vaněk, 2009).

2 Začátky analýzy aDNA

První práce o aDNA byla objevena v polovině 90. let, kdy Higuchi a spol. (1984) provedli sekvenování fragmentů mtDNA ze 150 let starého muzejního exempláře. Krátce na to Pääbo a spol. (1985) uveřejnili část sekvence mtDNA z 2430 let staré egyptské mumie. Tyto studie měly velký vliv, protože dokázaly, že molekula aDNA byla schopná přežít dlouhé období a mohla být použita k analýze (Ho a Gilbert, 2010).

Tyto první studie používaly bakteriální klonování, tj. vložení fragmentu DNA do bakteriálního plazmidu pro analýzu malých sekvencí aDNA. Jimi dosažené výsledky poukazovaly na to, že genetický materiál ve vzorcích z vyhynulých organismů byl často hlavně mikrobiálního a plísňového původu. Endogenní DNA byla obvykle obsažena ve vzorcích ve formě krátkých poškozených fragmentů. Bylo tedy velmi obtížné získat pozitivní výsledek. Proto mnoho zpráv

z této doby nebylo úspěšných a nepřikládá se jim velký význam (Willerslev a Cooper, 2005).

3 Poruchy při analýze DNA

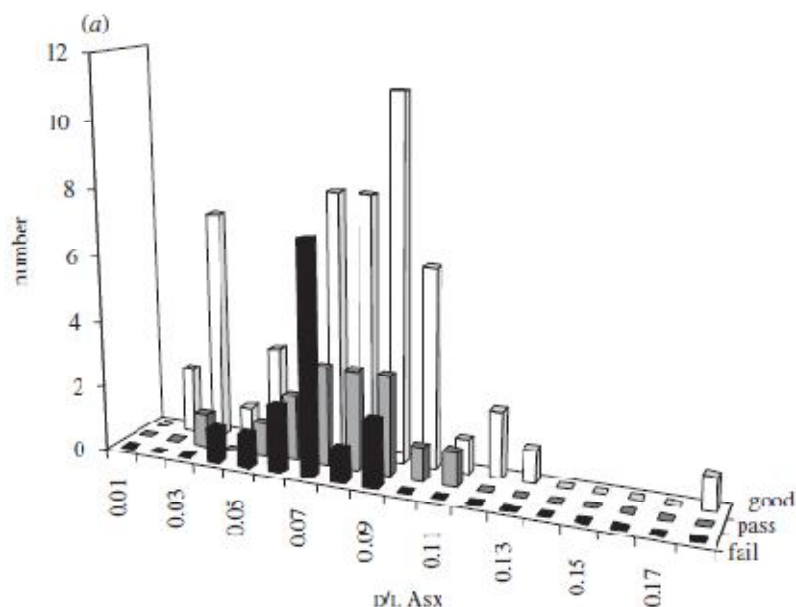
Zpracování kosterních pozůstatků při analýze aDNA má mnoho specifík a s nimi se pojíká problémů. Prvním problémem je nebezpečí kontaminace soudobou (recentní) DNA, která se do následných enzymatických procesů zapojuje snadněji. Dále hrozí nebezpečí kontaminace jednotlivými vzorky mezi sebou. Další nevýhodou aDNA je vysoká míra její degradace, která může probíhat mnoha způsoby. Prvním z nich je roztrhání řetězce DNA na velmi krátké úseky. Dalším je „vypadávání“, čili delece jednotlivých písmen genetického kódu tak, že se mění jeho smysl. Pokud se nějaká DNA vůbec uchová, pak jen ve velice mizivém množství – řádově pikogramy DNA na mikrolitr izolátu. Posledním větším problémem spojeným s aDNA je přítomnost inhibitorů, zejména huminových kyselin, které způsobují problémy při amplifikaci (Pířová a spol., 2011).

V ostatcích po čase dochází k chemickým změnám. Jednou z těchto změn je tzv. racemizace aminokyselin. Racemizací se obecně nazývá jev, při kterém dochází k přetváření opticky aktivních látek. Stupeň fragmentace (kvalitu aDNA) lze ověřit na základě koncentrace aminokyselin v kosti. Poměr racemizace kyseliny asparagové se využívá pro zjištění zachovalosti aDNA, čímž zjistíme, zda je ve vzorku ještě nějaká amplifikovatelná DNA. Čím větší je pak zastoupení L-formy kyseliny asparagové, tím pravděpodobnější je výskyt amplifikovatelné DNA. Ve vzorku starých tkání, v nichž je poměr D/L kyseliny asparagové vyšší než 0,08 nelze úspěšně amplifikovat sekvence (Poinar a spol., 1996).

V roce 1993 byla provedena srovnávací analýza racemizace aminokyselin u 91 zvířecích vzorků - kostí a zubů, se kterými pracovaly dřívější studie. Poměr D/L aminokyselin byl v rozmezí 0,02 - 0,17. Šest kostí mělo D/L poměr racemizace vyšší než 0,1. U těchto kostí není amplifikace aDNA možná. Přesto

bylo všech 6 kostí aDNA úspěšně amplifikována, z toho 5 kostí mělo velmi dobré výsledky (viz Graf 1) (Lindahl, 1993).

Graf 1: Srovnání racemizace aminokyselin a úspěšnost DNA amplifikace. (Lindahl, 1993).



Černá barva představuje neúspěšnou amplifikaci, šedá barva slabou úspěšnou amplifikaci a bílá barva ukazuje dobrou kvalitu.

3.1 Degradace DNA

Degradace lidského těla začíná 4 minuty po smrti organismu (Lindahl, 1993). Reparace DNA se okamžitě zastaví a buňky rychle projdou autolýzou. Tento rozklad je doplněn působením vnějších mikroorganismů spolu s bakteriemi střevní mikroflóry (Ho a Gilbert, 2010). Čím menší je mikrobiální aktivita, tím je větší naděje, že se DNA zachová (Drozdová a spol., 2012). Rozklad aDNA je charakterizován jednořetězcovými či dvouřetězcovými zlomy vláken (Lindahl, 1993). K degradaci DNA hrozí i tehdy, vystavíme-li ji nevhodným fyzikálním, chemickým či biologickým vlivům (tj. vysoká teplota, UV záření, vlhkost, chemikálie, bakterie, plísně). Následkem toho může dojít k fragmentaci, tj. rozštěpení DNA na kratší úseky, k narušení struktury nebo ke změně jednotlivých bází (Šimková, 2012). Především dva typy poškození

mají vliv na DNA. Za prvé může dojít k hydrolýze, která má za následek depurinaci a depyrimidinaci. Druhým způsobem poškození je oxidace způsobená ionizujícím zářením. Probíhající buď v přímém kontaktu s DNA nebo v reakci s vodou, při které vznikají volné radikály. Mezi jiné méně pravděpodobné mechanismy poškození patří alkylace nebo UV záření (Höss a spol., 1996).

Existuje významný rozdíl v kvalitě DNA získané z kostí a zubů. Například kostní vzorky z míst nacházejících se ve vysokých zeměpisných šířkách, obvykle přináší lepší kvalitu než vzorky z míst s mírným podnebím (Campos a spol., 2012). Například vzorky z Egypta, Evropy nebo Ameriky mívají velké poškození aDNA a neposkytují po amplifikaci žádné sekvenční DNA. Proto má rozhodující vliv pro dlouhodobé uchování aDNA chladné prostředí. Klesne-li teplota o 20 °C, dojde k deseti až dvacetinásobnému snížení rychlosti chemických reakcí působících na degradaci aDNA (Höss a spol., 1996).

Také pH prostředí, ve kterém se tkáně nacházejí, má vliv na jejich degradaci. Neutrální nebo mírně zásadité prostředí je pro zachování aDNA nejlepší (Lindahl, 1993).

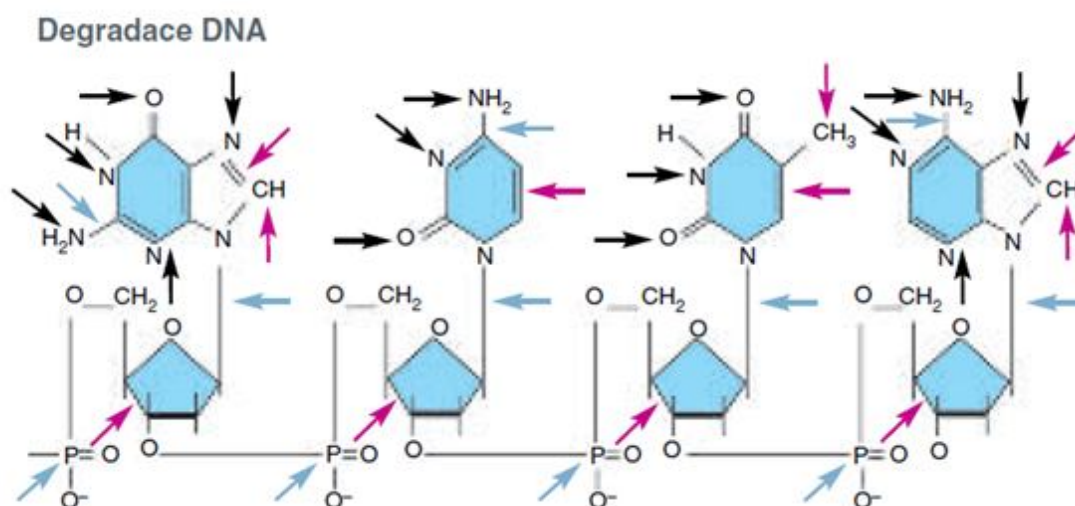
Enzymatickou degradaci DNA způsobují nukleázy, které štěpí nukleové kyseliny buď od konce (exonukleázy, DNázy) nebo uvnitř sekvence (endonukleázy, např. restriktázy) (Borková a spol., 2011). Naštěstí vysušení, nízká teplota či vysoká koncentrace solí mohou tyto procesy zastavit (Hofreiter a spol., 2001). DNA se rozkládá také při vyšší teplotě, kdy dochází k denaturaci, zániku vodíkových můstků (kdy se nejdříve rozpojí dvojná vazba A–T, pak trojná C–G). Molekula tak postupně ztrácí svůj přirozený tvar. Množství DNA očekávané z 1 g starobylého kostního materiálu dosahuje jen 1 ng, což je o několik řádů méně než v případě čerstvých vzorků (Borková a spol., 2011).

Odbourávání DNA je složitý proces, proto je obtížné jeho přesné modelování. Opakovaně však bylo pozorováno, že výsledkem odbourávání aDNA je inverzní vztah mezi velikostí a počtem zbylých templátových molekul. V důsledku toho se při použití PCR musí ustanovit kompromis mezi délkou cílových sekvencí aDNA a počtem PCR cyklů, které jsou potřebné pro odpovídající amplifikaci aDNA. Kratší fragmenty způsobují menší výskyt chyb, jelikož je

pravděpodobné, že poškozením bude ovlivněno méně molekul aDNA. Další funkcí PCR je schopnost templátů na sebe navázat primery (metoda PCR má limit přibližně 40 bází). Řešením tohoto problému je navázání aDNA k další DNA před provedením PCR. V takovém případě PCR primery mohou být navázány mimo cílovou sekvenci, takže lze informaci získat i z menších templátů. Tato metoda tvoří základ dalších metod k tvorbě genomu např. Roche/454 nebo Illumina analyzátor.

Základní chyby u poškozené aDNA mohou být detekovány klonováním PCR produktů nebo sekvenováním mnohonásobných PCR kopií (Ho a Gilbert, 2010).

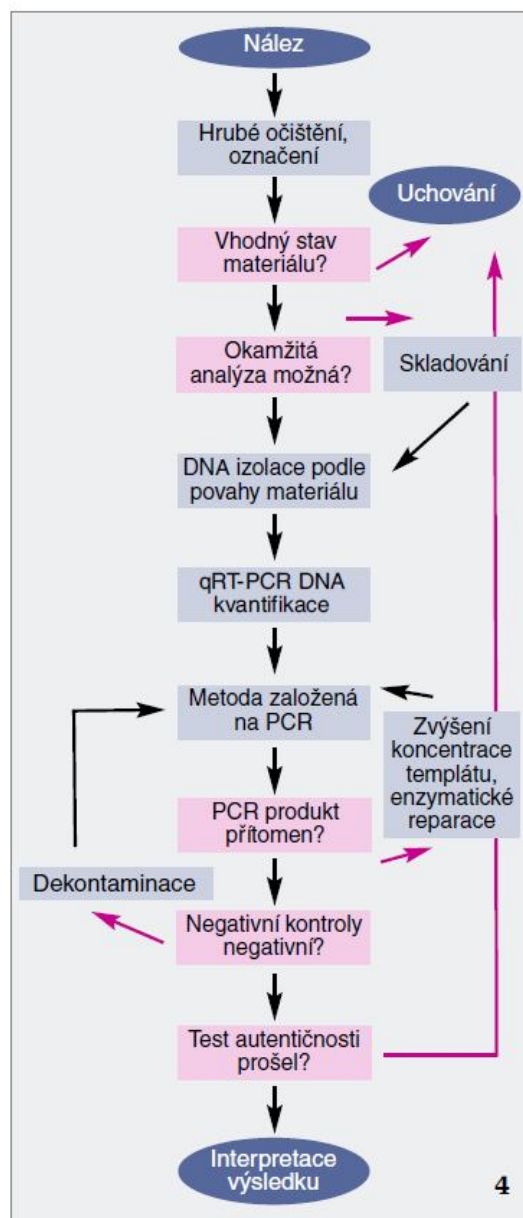
Obrázek 4: Spontánní degradace DNA řetězce (Borková a spol., 2011).



DNA podléhá degradačním procesům jako je hydrolýza, oxidace, neenzymatická metylace, tvorba mezimolekulárních křížových vazeb (Maillardovy produkty), působení volných kyslíkových radikálů, vyšší teplota a UV záření. Místa modifikovaná oxidativními (červené šipky), hydrolytickými (modré šipky) a metylačními (černé šipky) procesy, které mohou vést k jednořetězcovým zlomům, dvou-řetězcovým zlomům, odstranění bází z řetězce (depurinace a depyrimidinace), deaminaci (odstranění aminoskupiny) nebo metylační (GC–AT) změně genetické informace nebo blokování posunu polymerázy po řetězci DNA během polymerázové řetězové reakce (PCR).

Obrázek 5: Jedno ze schémat práce se starodávnou DNA (Borková a spol., 2011).

Znázorněny jsou vstupní a výstupní body (ovály), procesy (obdélníky) a rozhodovací body (ovály), procesy (obdélníky) a rozhodovací body (červené obdélníky). Černé šipky znamenají postup při splnění podmínky, červené alternativní postup.



3.2 Kontaminace – znehodnocení vzorku

Kontaminací se rozumí jakýkoli nechtěný přenos biologického materiálu do vzorku (Šimková, 2012). Především jde o kontaminaci historických kosterních pozůstatků současnou DNA, kterou každý člověk šíří neustále kolem sebe. Pracoviště pracující se starodávnou DNA se skládá ze 3 oddělených místností, aby se zabránilo kontaminaci vzorků recentní DNA a kontaktu amplifikačních produktů se vzorky. V pre-PCR místnosti probíhá zpracování vzorků a extrakce DNA. V PCR místnosti amplifikace vybraných úseků DNA a v post-PCR místnosti detekce amplifikátů. Musí být používán jednorázový

sterilní spotřební materiál. Někteří autoři uvádějí, že právě při preparaci a vyzvedávání kosterních pozůstatků dochází k největší kontaminaci recentní DNA, a tím ke znehodnocení kosterních vzorků pro genetické analýzy (Drozdová a spol., 2012). Proto je důležité dodržovat řadu pravidel:

- ✓ Použití ochranných pomůcek jako jsou sterilní rukavice, roušky, ochranná kombinéza, pokrývka hlavy.
- ✓ Exkavační nářadí mezi skrýváním jednotlivých skeletů by mělo být omýváno oxidačním prostředkem a ethanolem.
- ✓ Co nejrychlejší odběr vzorku vhodného pro izolaci DNA (zub, dlouhá kost) a jeho uložení v suchu a chladu.
- ✓ Zamezení pohybu dalších osob v okolí místa práce.
- ✓ Ochrana nálezů před přímým sluncem.
- ✓ Kosti neumývat, nechat obalené zeminou.
- ✓ Stanovení genetického profilu lidí, kteří přišli do styku s materiálem.
- ✓ Mít oddělené laboratoře pro izolaci, amplifikaci a postamplifikační analýzy.
- ✓ Pipetovat ve flow boxu.
- ✓ Před prací veškeré pracovní plochy očistit Savem a etanolem.
- ✓ Místnost vysvítit UV zářivkou.
- ✓ Uzavřená cirkulace vzduchu v laboratoři (Pížová a spol., 2011).

Obrázek 6: Laboratoř pro izolaci DNA (Pížová a spol., 2011).



Lidská a mikrobiální DNA je všudypřítomná. Je rozumné předpokládat, že všechna laboratorní činidla i nástroje budou kontaminovány při příjezdu od výrobce. Proto je nutné důsledné čištění (např. ultrafiltrace, vystavení UV záření - 45 W na dobu 72 hodin, zahřátí na více než 180°C na dobu 12 hodin, ponoření do 2,5 M HCl na dobu 48 hodin) (Willerslev a Cooper, 2005).

Předtím, než může začít extrakce, musí být veškerá exogenní DNA odstraněna. Dekontaminační opatření zahrnují tři základní kroky: mechanickou dekontaminaci, chemickou dekontaminaci a dekontaminaci pomocí UV záření. Každá z těchto metod má své výhody a nevýhody. Při mechanické dekontaminaci dochází k odstranění části povrchu ze zkoumaných vzorků, například za použití smirkového papíru nebo jiného obrušovacího nástroje. Tato metoda je velice účinná a z povrchu by měla být odstraněna většina nežádoucího materiálu. Nicméně, tato metoda vytváří značné množství prachu, který může vyvolat další kontaminaci. Chemickou dekontaminací se rozumí mytí povrchů nejčastěji látkami označovanými jako bělidla. U vzorků, kde došlo k proniknutí kontaminujících látek hlouběji do pórů, pouhé povrchové ošetření nestačí. Dekontaminace UV světlem je účinná metoda, kterou je však obtížné provést u vzorků s nepravidelnými tvary. Právě kombinace všech 3 dekontaminačních postupů je v literatuře doporučovaná jako nejefektivnější (Kaestle a Horsburgh, 2002).

3.3 Přítomnost inhibitorů PCR

Inhibitory PCR jsou chemické látky, které snižují účinnost reakce nebo ji zcela znemožní. Můžou se vyskytovat již ve vzorku (např. vápenaté ionty, kolagen, fosfát v kosti) nebo do něj proniknou z okolního prostředí (huminové kyseliny, polysacharidy, těžké kovy, fenolické látky, alkoholy).

Některé inhibitory PCR lze odstranit extrakčně-purifikačními technikami, což je přečištěním izolátu DNA (např. agarózou s nízkou teplotou tání, promýváním v hydroxidu sodném). Mezi inhibitory PCR patří i Maillardovy produkty (sloučeniny vzniklé reakcí aminokyselin s cukry, způsobující hnědnutí cukru

podobné karamelizaci), které působí i jako mezimolekulární zábrany amplifikace DNA (Borková a spol., 2011).

4 Analýza DNA

4.1 Zdroje a DNA

Zdrojem starodávné DNA může být jakýkoli biologický vzorek (kost, zub, vlas, chlup, nehet, stolice, dokonce i zadřená kůže na historických předmětech) (Borková a spol., 2011). Nejčastějším materiálem pro analýzu se používá kost, protože má tendenci si udržovat nejvyšší koncentraci DNA a nejdelší fragmenty ve srovnání s jinými materiály. Její pórovitost má však za následek vysoké riziko kontaminace (Ho a Gilbert, 2010). Po pohřbu dochází na kosti k absorpci cirkulujících kationtů a organických látek, výměně některých iontů, ke zlomům, vyplavování kolagenu a minerálů a k mikrobiálním změnám. Intenzita mikrobiálních vlivů je pozorovatelná až za 4000 a více let (Hedges, 2002).

Základní tkání kosti je kostní tkáň, kterou tvoří kostní buňky (osteocyty, osteoklasty a neaktivní osteoblasty) (Campos a spol., 2012) a kostní hmota, která má organickou (kolagen, prolin, hydroxyprolin, tuky a mukopolysacharidy) a anorganickou složku (hydroxyapatit, vyskytující se v několika formách) (viz Obrázek 7) (Eliášová a spol., 2009).

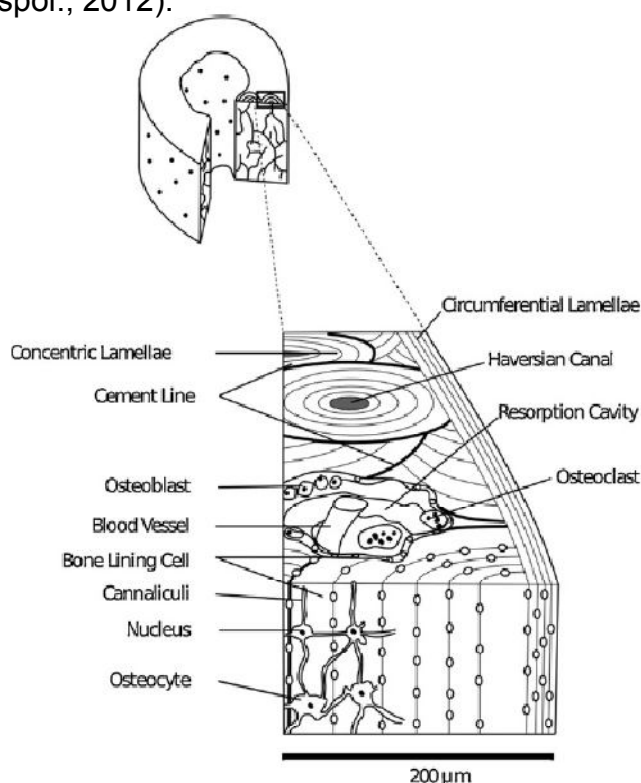
Jádra následujících typů buněk jsou hlavním zdrojem DNA:

- Osteocyty - mají tvar hvězdy, jsou to zralé kostní buňky, které jsou uloženy v dutinách zvaných lakuny (Campos a spol., 2012). Udržují metabolismus a kontrolují aktivitu osteoblastů (Eliášová a spol., 2009).
- Osteoblasty - jsou na povrchu (Campos a spol., 2012). Jsou to nezralé kostní buňky zodpovědné za tvorku kosti. Produkují také hormony (prostaglandiny a alkalickou fosfatázu) podílející se na mineralizaci (Eliášová a spol., 2009).

- Osteoklasty - jsou velké buňky na povrchu kosti zodpovědné za resorpci (Campos a spol., 2012).

Kostní tkáň je složena z bílkovin a minerálních látek. Mezi nejčastěji se vyskytující bílkoviny patří kolagen a osteokalcin. Přibližně 70% minerální složky kosti tvoří hydroxyapatit, který obsahuje vápník, fosforečnan vápenatý, uhličitán vápenatý, fluorid, hydroxid vápenatý a citrát. Molekula DNA má velmi silnou afinitu k hydroxyapatitu, chrání tak molekulu DNA před degradací. Vnitřním faktorem přežití kostní tkáně je její hustota. Bylo zjištěno, že existuje rozdíl v hustotě kostní tkáně u mužů a žen, přičemž u žen vykazuje hustota kostní tkáně nižší hodnoty. Rozdíl hustoty je také v různých částech kosti. Nejvyšší hustota tkáně je v oblasti diafýzy (Campos a spol., 2012).

Obrázek 7: Struktura kosti (Campos a spol., 2012).



4.2 Vlastní analýza DNA

Proces analýzy starodávné DNA je podobný jako u novodobé DNA (Borková a spol., 2011). V biologickém materiálu je kromě DNA přítomno velké množství dalších látek, např. bílkoviny, lipidy, polysacharidy, inhibitory, enzymy atd., které je potřeba od DNA oddělit (Šimková, 2012).

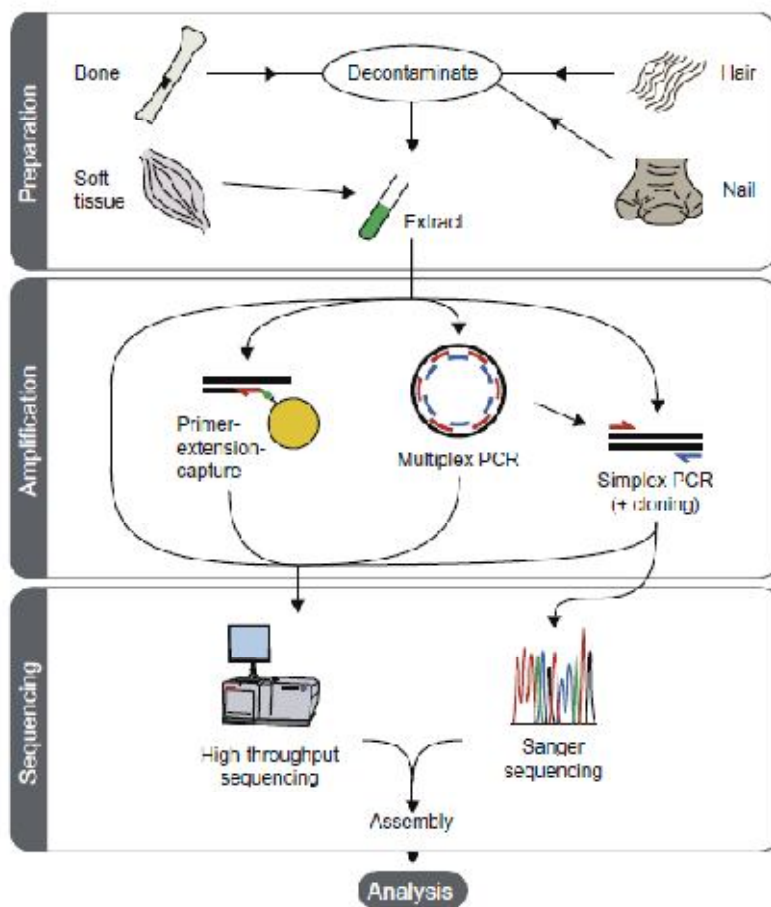
Obrázek 8: Sterilní exkavace na pohřebišti ve Znojmě-Hradišti (Pížová a spol., 2011).



DNA je vždy degradována na velikosti menší než 200 párů bází (bp) s obsahem malého množství endogenní DNA (Green a spol., 2010). Výsledkem extrakce je izolát, což je zkumavka s čirou tekutinou, kde se bude nalézat jen pár stovek pikogramů DNA (Šimková, 2012).

Při odhadu, zda je kostní materiál vhodný k analýze starodávné DNA, se sleduje celkový stav tělesných pozůstatků, stupeň mikrobiální a plísňové degradace, která je odhadována podle velikosti pórů v kostech (nadějně jsou póry do průměru 50 μm), hloubky uložení v zemi, druhu, pH a vlhkost okolní zeminy a v neposlední řadě také teploty zeminy. Všechna tato pozorování nám však poskytnou pouze orientační údaje (Borková a spol., 2011).

Obrázek 9: Techniky používané před vlastní analýzou (Ho a Gilbert, 2010).



Úspěšnost analýzy je do značné míry podmíněna i stavem zachovalosti lidských kosterních pozůstatků. Vzorky pro genetickou analýzu se nejčastěji odebírají z hrudního koše, stehenní kosti, zubů, popřípadě z kostí ruky nebo nohy (Borková a spol., 2011).

Aplikace informací získaných z výzkumů aDNA s sebou nese velký příslib. Nicméně, stejně jako v případě jakéhokoli studia člověka, je důležité vzít v úvahu etické, právní a sociální (ELSI) důsledky v oblasti výzkumu.

Vědci by si měli před začátkem každé analýzy aDNA položit tyto otázky:

- 1) Povede zvolená metoda k získání antropologických informací?
- 2) Existují nedestruktivní metody, kterými je možné získat výsledek?
- 3) Jsou pozůstatky nebo jiný materiál dostatečně zachovány, aby obsahovaly s největší pravděpodobností aDNA?
- 4) Souhlasí ostatní s použitím destruktivních metod?

- 5) Jaké dopady bude mít výzkum v etické, právní a sociální rovině na živé příbuzné?
- 6) Je důležité informovat a získat souhlas od zainteresovaných jedinců?
(Kaestle a Horsburgh, 2002)

5 Extrakce a izolace

Získání DNA z kostí obvykle vyžaduje individuální přístup izolačního procesu. Kost je tvrdá pojivová tkáň s vysokým obsahem vápníku, který spolu s hořčíkem fungují jako kofaktory intrabuněčných nukleáz. Dalším problémem extrakčního procesu je vazba DNA s hydroxyapatitem ve strukturu zvanou bioapatit, která vzniká *post mortem* během mineralizace a rozkladu proteinů.

Prvním krokem je lýza buněk, ze kterých jsou získávány nukleové kyseliny. U běžných buněk stačí obvykle rozpuštění biomembrán a denaturace proteinů detergentem, např. dodecylsulfát sodný (SDS). Pro lýzu buněk tvrdých tkání je výhodné použití mechanického rozrušení kostní tkáně, např. drcení tkáně zmrazené tekutým dusíkem. Pro odstranění proteinů z izolované DNA se k lyzačnímu roztoku přidává enzym proteináza K, který štěpí bílkoviny včetně histonů vázaných na strukturu DNA.

Buněčný obsah včetně nukleových kyselin se z lyzovaných buněk uvolní do pufovaného roztoku, který kromě detergentů obsahuje etylendiaminotetraoctovou kyselinu (EDTA). Ta chelatuje ionty vápníku fungující jako kofaktor nukleáz. Nukleázy bez vápníku nejsou funkční, takže vychytáním vápníku se zabrání fragmentaci čerstvě uvolněné DNA. Jako inhibitor nukleáz fungují také některé detergenty. Tyto detergenty se používají při lýze buněk zejména dodecylsulfát sodný a N-larylsarkosin.

Pro izolaci DNA se dnes používá celá řada různých protokolů nebo komerčně vyráběných souprav kitů (Eliášová a spol., 2009).

5.1 Extrakce směsí fenol-chloroform

Je postup pro odstranění proteinů za použití pufru ekvilibrovaným fenolem nebo směsí fenolu a chloroformu. Tyto organické látky se nemísí s vodou, a proto po přidání do vodného prostředí způsobí tvorbu dvou vrstev (fází). Jakmile se směs důkladně promíchá, dojde k denaturaci proteinů a jejich vysrážení. Sraženinu proteinů lze centrifugací koncentrovat do fázového rozhraní, oddělujícího těžší organickou fází od lehčí vodné fáze. Pokud se používá fenol ekvilibrovaný neutrálním nebo alkalickým puftrem, nukleové kyseliny (DNA i RNA) zůstávají ve vodné fázi. Jestliže se k extrakci použije kyselý fenol, přechází DNA do organické fáze a ve vodné fázi zůstává pouze RNA. Této skutečnosti se využívá při izolaci RNA (Šmarda a spol., 2005).

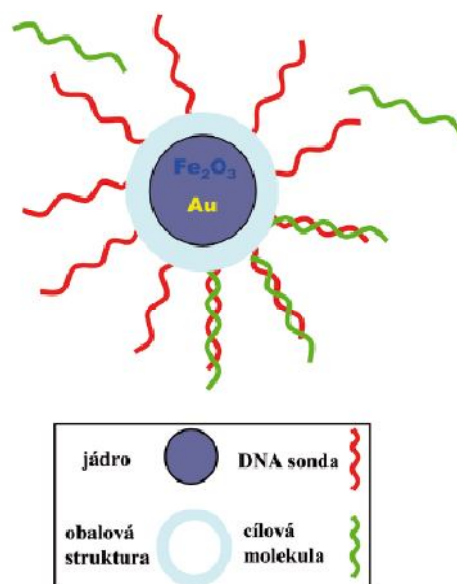
5.2 Purifikace - přečištění

Po extrakci fenolem je k dispozici vodný roztok nukleové kyseliny zbavený proteinů, který je však příliš naředěný a obsahuje stopy fenolu a chloroformu. Obzvláště fenol má určitý stupeň rozpustnosti ve vodě a mohl by způsobit nežádoucí denaturaci enzymů při další práci s purifikovanou nukleovou kyselinou. Nukleové kyseliny je nutné převést na malý objem a přečistit, a to lze zajistit srážením (precipitací) alkoholem, obvykle etanolem nebo izopropanolem. Za přítomnosti jednomocných iontů (Na^+ , K^+ nebo NH_4^+) je možné nukleové kyseliny srážet do podoby agregátu. Ten se při centrifugaci sedimentuje na dno zkumavky. Po odpaření etanolových par se DNA rozpustí ve vodném roztoku, který obvykle obsahuje pufr Tris-HCl (pH 7,5-8), inhibitor nukleáz a EDTA (Šmarda a spol., 2005).

Jedna z dalších technologií používaná pro purifikaci je metoda založená na (para)magnetických částicích (MPs). MPs jsou částice velké 5 nm – 100 μm . Tvořené z kovového jádra, kterým bývá nejčastěji $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit) nebo Fe_3O_4 (magnetit), ale i například Au. Jádro obaluje vrstva, která má připravený specifický povrch. Ten lze upravit podle toho, jaké molekuly chceme izolovat (viz Obrázek 10). Princip izolace je založen na fyzikálně-chemických

vlastnostech MPs. Ty reagují na vnější magnetické pole a jsou schopny navázat různé bioreaktivní molekuly. Samotná izolace probíhá tak, že se ke vzorku přidají MPs. Modifikované MPs se následně přitáhnou magnetem ke stěně zkumavky a zbylý roztok se odstraní. Následuje promývání a uvolnění MPs i s navázanými molekulami. Jednou z výhod MPs je, že se vzorek nemusí složitě upravovat odstředováním nebo dialýzou. Vynecháním těchto kroků se podstatně zkracuje čas a navíc se zmenší riziko jejich případného fyzikálního nebo biologického poškození (Húska a spol., 2008).

Obrázek 10: Schematicky znázorněné (para)magnetické částice určené pro izolaci nukleových kyselin (Húska a spol., 2008)



5.3 Extrakce pomocí cetyltrimethylamoniumbromidového (CTAB) pufru a isoamylalkohol-chloroformu

Tato metoda umožňuje snadný, rychlý a efektivní způsob, jak získat vysoce kvalitní DNA. Do kostního prášku byly přidány 2 ml směsi CTAB pufru složeného z 2% CTAB; 100 mmol/l Tris-HCl o pH 8,0; 20 mmol/l EDTA, 1,4 mmol/l NaCl a 0,2% 2-merkптоethanolu (Ye a spol., 2004).

5.4 Izolační kity

QIAquick PCR Purification Kit

Tento kit je původně určený pro zachycení PCR produktů, které jsou větší než 100 bp a menší než 10 kb. Je schopen zachytit zbytky nukleotidů, proteinů a solí (Yang a spol., 1998). Obsahuje oxid křemičitý na bázi membrány (Ye a spol., 2004). Je ideální pro práci se starodávnou DNA, která je často velmi degradovaná a sekvence pro amplifikaci jsou velmi malé (150 - 250 bp) (Yang a spol., 1998).

Stejně objemy roztoku DNA a lyzačního pufru jsou dobře promíchány. Poté je přidána resuspendovaná pryskyřice, vše je inkubováno 5 minut. Následně je vzorek ihned přenesen na magnetický stojan. Pryskyřice je promyta lyzačním pufrům a umístěna znovu na magnetický stojan. Stejný postup promývání je opakován celkem třikrát. Po posledním promytí je ponechána zkumavka se vzorkem vyschnout a nakonec přidána deionizovaná voda (Ye a spol., 2004).

IQ™ Systém (Promega)

Metoda DNA IQ™ Systém je alternativní metodou QIAquick™ Systému. Komerčně dostupný IQ™ Systém má však několik výhod. Například u něj není potřeba centrifugace ani oplachování vzorku. Tato metoda je schopna izolovat maximálně 100 ng DNA. Starodávná DNA obsahuje ještě menší objemy, takže je tato metoda velmi vhodná pro izolaci tohoto typu. DNA IQ™ System (Promega) je při izolaci DNA rychlejší a snadnější (Ye a spol., 2004).

Mezi další používané kity například patří: QIAquick™ spin columns (Qiagen) a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Komerční soupravy jsou optimalizovány pro použití na konkrétní typ a množství vzorku a poskytují standardizované výsledky. Po srovnání všech izolací má nejvyšší výtěžek DNA fenol-chloroformová extrakce (Eliášová a Mazura, 2009).

5.5 Detekce

Pokud je purifikovaná DNA dostatečně čistá, tj. zbavená všech látek, které absorbují ultrafialové záření (např. RNA, volných nukleotidů, proteinů), lze odhadnout její koncentraci spektrofotometrickým měřením absorpance roztoku při vlnové délce 260 nm. Tento způsob stanovení koncentrace DNA je jednoduchý, ale ne příliš selektivní. Roztok dvouřetězové DNA o koncentraci 50 µg/ml má absorpaci 1. Tuto hodnotu pozmění přítomnost proteinů nebo fenolů v roztoku DNA. Pro detekci a kvantifikaci nukleových kyselin se běžně používají barviva typu ethidiumbromidu. Ethidiumbromid je fenantridinové barvivo, které má plochou kruhovou strukturu umožňující jeho vmezeření mezi báze nukleových kyselin. Komplex DNA s navázaným barvivem pak může být detekován po ozáření ultrafialovým světlem (Šmarda a spol., 2005).

5.6 Ověření pravdivosti výsledků

I přesto, že dodržíme všechna protikontaminační opatření, stále není zaručeno, že nedošlo k přenosu soudobé DNA do některého ze vzorků. V posledních letech byla zavedena jednoduchá pravidla sloužící k vyloučení laboratorní kontaminace (Pížová a spol., 2011).

- ✓ Slepé vzorky pro PCR (vzorky pro amplifikaci bez templátu – bez přídavku aDNA).
- ✓ Provedení nezávislé analýzy v jiné laboratoři.
- ✓ Dekontaminace reagentů a vybavení – oxidační prostředek, UV světlo, ethanol, sterilizace v autoklávu.
- ✓ Opakování všech reakcí.
- ✓ Kvantifikace DNA vstupující do reakce (zajištění dostatečné koncentrace aDNA pro PCR).
- ✓ Stanovení koncentrace jiných makromolekul.
- ✓ Je-li to možné, izolace DNA z kostry jiného živočišného druhu nalezeného v téže lokalitě, avšak s primery specifickými pro lidskou DNA (Pížová a spol., 2011).

6 Co se stanovuje?

6.1 Kompetitivní sekvence

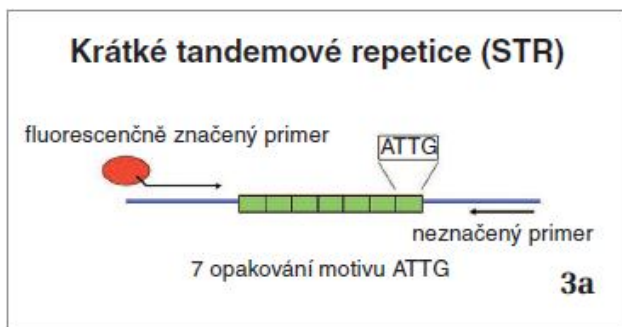
Jsou nejpolymorfnější lokusy DNA, které se v genomu vyskytují opakovaně. Pokud jsou jednotlivé motivy v DNA zařazeny těsně za sebou v tandemu, nazýváme takový úsek DNA tandemová repetice. Pokud se vyskytují rozptýleně na různých místech genomu, mluvíme o repetici rozptýlené. Dříve se k analýze užívaly tzv. dlouhé tandemové repetice s variabilním počtem opakování (VNTR - Variable Number of Tandem Repeats, minisatelity). Jejich délka je 10 – 100 nukleotidů opakujících se v jednotkách až stovkách těsně za sebou (Šimková, 2012). Délkový polymorfismus vzniká např. při inzerci, delecii jednoho či více nukleotidů nebo jde o rozdíl v počtu tandemových opakování nukleotidové sekvence (Borková a spol., 2011).

V současné době jsou nejužívanějšími lokusy tzv. krátké tandemové repetice (STR - Short Tandem Repeats, mikrosatelity, SSR – Simple Sequence Repeat) (viz Obrázek 11). Jejich délka je 2 - 9 nukleotidů opakujících se v jednotkách až desítkách těsně za sebou. Podle délky klasifikujeme mikrosatelity na di-, tri-, tetra-, penta-, okta- a nonanukleotidové. Pro analýzu lidské DNA se využívají výhradně STR lokusy tetra- nebo pentanukleotidové. STR lokusy se vyskytují ve všech chromozomech (i v pohlavních), nevyskytují se pouze v mtDNA.

Při analýze DNA je potřeba vybírat tedy takové lokusy, které:

- jsou tetra- nebo pentanukleotidové
- mají dostatečnou variabilitu, tj. co největší počet alel
- mají vyvážené frekvence alel
- nejsou v genetické vazbě, tj. aby lokusy v DNA nebyly příliš blízko sebe (Šimková, 2012).

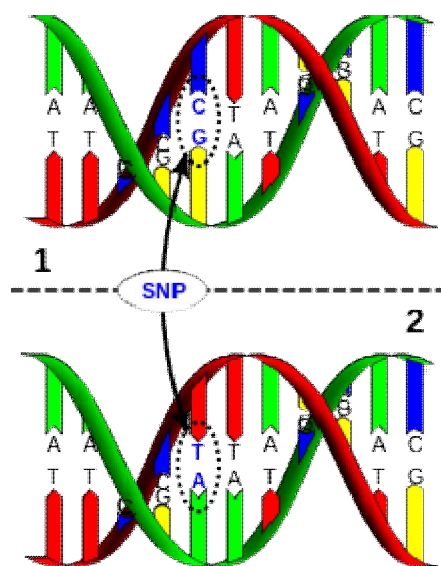
Obrázek 11: STR (Vaněk, 2009).



6.2 Polymorfismy

Další lokusy, které lze využít pro identifikaci DNA, jsou tzv. jednonukleotidové polymorfismy (SNP – Single Nucleotide Polymorphisms) (viz Obrázek 12) nebo ve specifických případech hypervariabilní oblast mitochondriální DNA (HVR – Hypervariable Region of mitochondrial DNA). (Šimková, 2012) Analýza polymorfismů se používá pro stanovení příbuzenských vztahů. (Bezděk a Těthalová, 2010).

Obrázek 12: Struktura jednonukleotidového polymorfismu - http://cs.wikipedia.org/wiki/Jednonukleotidov%C3%BD_polymorfismus (11. 3. 2013).



6.3 Analýza HVR mtDNA

a) Sekvence DNA

Pro analýzu vlastní mtDNA můžeme použít jakékoli buňky lidského těla. Trendem dnešní doby je stěr ze sliznice dutiny ústní. Průměrně můžeme z jednoho stěru získat až tisícinásobek množství oblasti (HVR1 a HVR2) (Vaněk, 2010).

Sekvenací rozumíme stanovení pořadí nukleotidů k analyzování HVR oblasti mtDNA. Nejužívanější metodou je metoda sekvence pomocí asymetrické PCR s tzv. terminátory. Nejprve je HVR oblast namnožena pomocí jednoho páru primerů klasickou PCR. Poté následuje přečištění amplifikátu a kontrola úspěšnosti (detekce namnoženého fragmentu). Ten pak dále poslouží jako templát do asymetrické PCR reakce. Při sekvenční reakci je v reakční směsi přítomen pouze jeden z páru primerů. Nové fragmenty vznikají pouze podle jednoho z obou komplementárních řetězců sekvenovaného fragmentu. Reakční směs obsahuje kromě deoxyribonukleotidů (dNTP) též fluorescenčně značené dideoxyribonukleotidy (ddNTP), nazývané pro svou úlohu v reakci terminátory. Poměr dNTP a ddNTP by měl být cca 100:1, aby došlo ke vzniku různých délek fragmentů. Na konci fragmentu se nachází fluorescenčně značený terminátor (mohou být přítomny 4 druhy: ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP).

b) Hybridizace s SSO

Představuje rychlejší, levnější možnost analýzy HVR mtDNA. Tato metoda slouží pouze ke zjištění informací o několika nejpolymorfnějších nukleotidů v úsecích HVR jako celku. Podstatou je použití SSO sondy a navázání sondy na příslušný úsek HVR mtDNA, které spolu musí být komplementární.

6.4 Analýza SNP lokusů

K zjištění genotypu jednonukleotidových polymorfismů slouží minisekvenování. Při minisekvenování je nejprve namnožen úsek obsahující SNP pomocí klasické PCR reakce. Poté je reakční směs vystavena působení enzymů, které rozloží zbytky nespotřebovaných primerů a zbylé volné dNTP.

Následuje krok označovaný jako prodloužení primerů. Do reakce je přidán extenzní primer nasedající těsně před testovaný SNP. Polymeráza poté připojí k primeru jediný ddNTP. Vzniklý produkt je posléze analyzován pomocí kapilární elektroforézy (Šimková, 2012).

7 Techniky a metody používané při analýze

7.1 PCR (polymerázová řetězová reakce, Polymerase Chain Reaction).

Je technika, za niž vděčíme nositeli Nobelovy ceny K. B. Mullisovi. PCR je cyklická enzymatická metoda, umožňující namnožení určitého úseku DNA opakováním 3 kroků (Borková a spol., 2011). V reakční směsi je přítomen templát. Na tento templát nasedají primery, které značí místo pro polymerázu. Celá reakce je řízena změnami teplot. (McPherson a Møller, 2006). PCR se provádí v zařízení zvaném termocykler. Opakování probíhá 20 - 40x (Šimková, 2012).

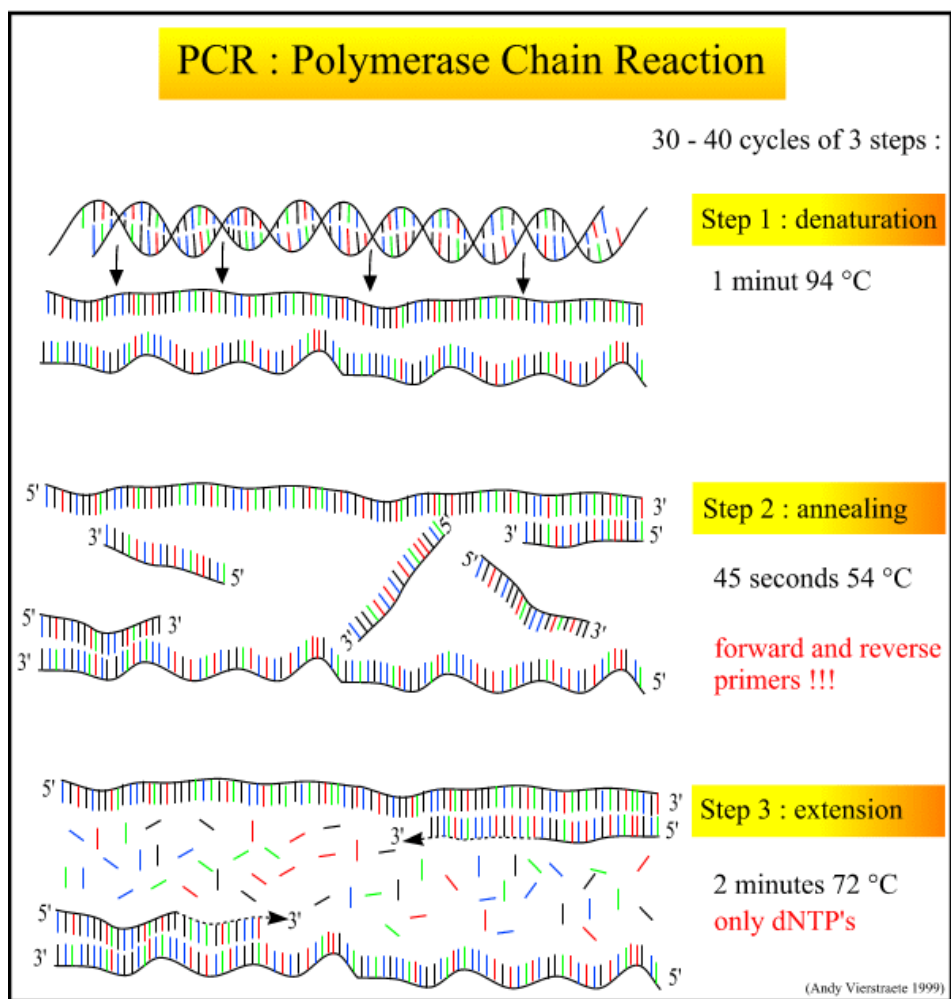
- Fáze denaturační – při této fázi se reakční směs zahřeje na teplotu 95 °C (McPherson a Møller, 2006) a dochází k rozrušení vodíkových vazeb nukleotidového řetězce a vytvoření jednovláknové DNA (Šimková, 2012).
- Fáze hybridizační (annealing) – po denaturaci následuje ochlazení reakční směsi o několik desítek stupňů. Jestliže je teplota příliš nízká, dochází k nespecifickému navázání primerů. Při vysoké teplotě se primery špatně vážou, což má za následek nízkou výtěžnost. Za primery se hned váže polymeráza (McPherson a Møller, 2006).
- Fáze prodlužovací – dochází k prodlužování primerů enzymem polymerázou a ke vzniku dvoušroubovice (Šimková, 2012).

Vstupní reakční směs obsahuje:

- PCR pufr, tj. voda s Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+ apod.
- Volné nukleotidy, označené jako dNTP (pro PCR užíváme směs 4 základních dNTP – dATP, dCTP, dGTP a dTTP) (Šimková, 2012) Musí být v ekvimolárních koncentracích, jinak by mohla být ovlivněna přesnost PCR (McPherson a Møller, 2006).
- Primery – krátké úseky DNA o délce 20-30 nukleotidů, od nichž kopírování začíná.
- DNA polymerázu – enzym, který provádí vlastní kopírování.
- Templátovou DNA – předloha pro kopírování (Šimková, 2012).

Pomocí PCR nyní můžeme izolovat v podstatě jakýkoli gen z jakéhokoli organismu (McPherson a Møller, 2006).

Obrázek 13: Průběh PCR - <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrsteps.gif> (4. 7. 2013)



7.2 Elektroforéza DNA

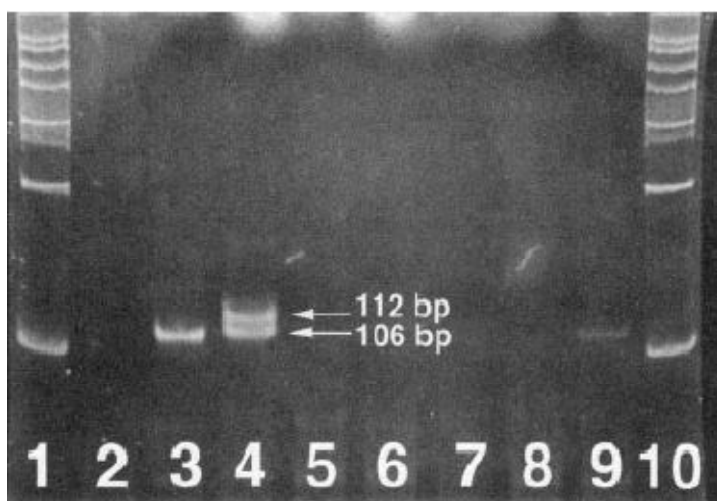
Výsledek PCR lze tzv. detekovat na gelu. To znamená, že se vzorek reakční směsi nanese na start agarózového nebo polyakrylamidového gelu a podrobí se elektroforéze (Kaestle a Horsburgh, 2002). Elektroforéza je separační metoda založená na pohybu částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Na základě různé pohyblivosti dojde elektroforézou k separaci jednotlivých typů částic.

DNA je za běžných podmínek díky fosfátu ve své struktuře záporně nabitá molekula a ve stejnosměrném elektrickém poli se tedy pohybuje směrem ke kladné elektrodě (anodě). Čím delší fragment DNA je, tím pomaleji se pohybuje (s počtem bází mobilita klesá). Mobilitu ovlivňuje také podíl C a G nukleotidů ve fragmentu (C a G nukleotidy jsou těžší než A a T nukleotidy) (Šimková, 2012).

7.2.1 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza se provádí ve vhodném nosiči, tzv. gelu. Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou, které vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry. Agarózové gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od 100 bp až po 50 kb. Polyakrylamidové gely se používají pro separaci menších molekul (10 až 1000 bp). Podle polohy gelu v elektroforetické aparatuře rozlišujeme horizontální a vertikální gelovou elektroforézu (Šmarda a spol., 2005).

Obrázek 14: Gelová elektroforéza pro Amelogenin (Kaestle a Horsburgh, 2002).



Řada 1 a 10 ukazují velikost markerů. Řada 2 negativní kontrolu amplifikace. Řada 3 vzorek současné ženy. Řada 4 vzorek současného muže. V řady 5–8 lze vidět negativní kontroly extrakce. Řada 9 představuje historický vzorek, morfometricky identifikovaný jako žena. DNA fragment amplifikovaný z X chromozomu je dlouhý 106 bp, DNA fragment z Y chromozomu je dlouhý 112 bp (viz Obrázek 14) (Kaestle a Horsburgh, 2002).

7.2.2 Kapilární elektroforéza

Při kapilární elektroforéze je vzorek elektrickým pulzem nabrán na začátek tenké skleněné kapiláry naplněné polymerem lineárního akrylamidu nebo polydimethylamidu. Na kapiláru je pomocí elektrod, zanořených do pufru, přivedeno napětí (120V) a dochází tak k separaci fragmentů na základě rozdílné mobility. Každý fragment je před analýzou označen fluorescenční barvou (ethidiumbromid). V koncové části kapiláry se nachází okénko, kterým je prosvěcován laserový paprsek. Ten v okamžiku průchodu okénkem vybudí silnou fluorescenci (světelné záření), které je zaznamenáno CCD detektorem (stejným jako u digitálních fotoaparátů) (Šimková, 2012).

7.3 Mikrofluidní metoda

Tato mikrofluidní metoda je spojena s efektivní hmotnostní a tepelnou energií zajištěnou díky mikrofluidní plošině s potenciálem. Výhodou této metody je snížení spotřeby vzorku a činidla, zvýšená rychlost analýzy, snížení nákladů a schopnost propojit více technik. K pohybu činidel mikrofluidním zařízením slouží hydrodynamická a elektrokinetická čerpadla.

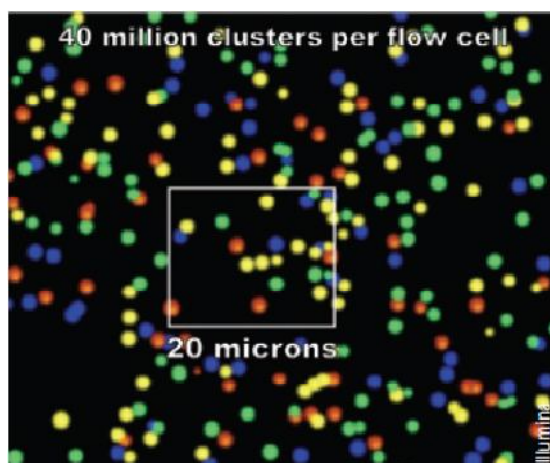
U hydrodynamických čerpadel je k přístroji napojena mikrofluidní hadice a konektory, kterými prochází parabolický tok, což znamená, že je tok rychlejší ve středu kanálu v důsledku třecích sil. Elektrokinetickými čerpadly prochází elektroosmotický tok (EOF) (Parton, 2013). Vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difuzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalné fáze u vnitřní stěny kapiláry. Vznik elektrické dvojvrstvy je důsledkem selektivní adsorpce jednoho druhu iontů na stěnu kapiláry a/nebo disociace ionogenních skupin na vnitřním povrchu kapiláry (např. silanolových skupin v případě nejčastěji používaných křemenných kapilár). Adsorbované nebo disociací vzniklé ionty vytváří na stěně imobilizovanou část elektrické dvojvrstvy, zatímco v její difuzní části směrem do roztoku zůstává přebytek volného náboje. Tím se v blízkosti stěny vytváří potenciální rozdíl, jehož část vyskytující se v difuzní oblasti elektrické dvojvrstvy se nazývá elektrokinetický potenciál nebo též zeta potenciál. Elektroosmotický tok unáší všechny přítomné ionty stejnou rychlostí, tj. z hlediska separace působí jako neselektivní síla (Kašička, 1997).

7.4 Next generation sequencing - sekvenování nové generace

V poslední době se objevily zcela nové technologie, které posunuly sekvenování do úplně jiné dimenze. Díky těmto novým metodám potřebujeme na osekvenování celého lidského genomu pouze jeden přístroj, jednoho člověka a dobu 3 týdny. Během jediné sekvenační reakce přístroj dokáže přečíst až stovky miliónů bazí a zachytit milión signálů na ploše několika centrimetrového čipu.

Nejprve se uchytlí na skleněnou destičku - čip - milióny krátkých fragmentů DNA. Rozmístění jednotlivých fragmentů je zcela náhodné. Každý fragment je na svém místě namnožen, a poté je čip promýván fluorescenčně značenými nukleotidy. Po navázání nukleotidů detektor vytvoří obrázek a počítač ví, jaký konkrétní nukleotid ze 4 možných byl v kterém konkrétním místě navázán. Pak pokračuje syntéza a po každém kroku je vytvořen obrázek (viz Obrázek 15). Počítač pak z těchto obrazů získá najednou sekvence miliónů fragmentů z jednoho malého čipu (Doležal, 2012).

Obrázek 15: Obrázek z detektoru po navázání nukleotidu (Doležal, 2012).



8 Zajímavosti při analyzování DNA

8.1 Naleziště ostatků v Darwen ve Velké Británii a analýza 3 vzorků

Toto místo bylo pohřebišťem v polovině 19. století. Ostatky byly nalezeny v roce 2008 skupinou archeologů z Oxfordu (Parton, 2013). Genetické určení pohlaví člověka je založeno na přítomnosti dvou odlišných chromozómů XY u mužských a dvou stejných chromozómů XX u ženských buněk. Vždy dochází ke zkoumání určitého lokusu, nikoli celého chromozómu. Funkční oblast

u X chromozómu má délku 977 párů bází, Y chromozóm má délku 788 bp (Bezděk a Těthalová, 2010).

Vnější povrch kostí byl ozářen UV zářením. Rozemleté kostní vzorky byly postupně přidávány do pufrů, inkubovány a centrifugovány. Amplifikace DNA byla provedena za použití PCR a následné elektroforézy, sloužící pro analýzu produktů PCR.

Pro vyhodnocení tří různých kostních vzorků (SK095, SK091 a SK116) byl použit mikrofluidní systém. Vzorky SK091 a SK116 patřily ženskému pohlaví. Vzorek SK095 však nepředložil žádné zjiřitelné výsledky po opakované analýze (Parton, 2013).

Spolehlivost určení pohlaví je ovlivněna:

- stářím kostry – pohlaví lze s jistotou určit pouze u dospělých jedinců, neboť u dětských koster nejsou pohlavně diferencující znaky vyvinuty.
- zachovalostí kostry – musí být dostatečně zachovalá oblast pánve a lebky (Bezděk a Těthalová, 2010).

8.2 Srovnání DNA neandertálce a moderního člověka

Neandrtálci jsou členové zaniklé skupiny žijící před 350 000 - 30 000 lety (Lacan a spol., 2013) na území Evropy a západní Asii, od jižního Sibíře až po Blízký východ (Green a spol., 2010). Byli to naši nejbližší evoluční příbuzní (Lacan a spol., 2013). Z analýzy jaderného genomu neandertálců a moderních lidí vyplývá, že eurasijské populace moderního člověka sdílí s neandertálci více genetických variant úseků genomu než s populacemi v subsaharské Africe (Green a spol., 2010). První kosterní pozůstatky připsané neandertálskému člověku byly nalezeny ve vápencové jeskyni Feldhof v Neandrově údolí roku 1856 (Tůma a spol., 2012).

Svante Paabo z Max Planckova institutu pro evoluční antropologii v Lipsku určil na základě DNA analýzy kosterních pozůstatků neandertálců, že

Homo neanderthalensis a *Homo sapiens* mají shodných více než 98,5 % DNA (Vaněk, 2010). A že tyto dvě skupiny mají společné předky žijící před 500 000 lety (Green a spol., 2010). Pokud porovnáme jejich mtDNA, zjistíme 206 rozdílů (195 tranzicí a 11 transverzí). Tranzicí nazýváme takovou mutaci, při níž dochází v DNA k záměně nukleotidu s purinovou dusíkatou bází za nukleotid s jinou purinovou bází nebo k záměně pyrimidinové báze za jinou pyrimidinovou. Při transverzi se zamění nukleotid s purinovou bází za nukleotid s pyrimidinovou nebo naopak (Vaněk, 2010).

V jeskyni Vindija v Chorvatsku bylo analyzováno 21 kostí neandertálců. Z pod povrchu každé z těchto kostí bylo získáno 50 až 100 mg prášku pomocí kostní sterilní vrtačky. Vzorky byly testovány na přítomnost neandertálské mtDNA pomocí PCR. 3 kosti byly vybrány pro další analýzu (viz Obrázek 16). Všechny 3 kosti pocházejí z různých žen. Sekvence mtDNA u kosti Vi33-26 byla k nerozeznání od kosti Vi33-16, což poukazovalo na jejich příbuzenský vztah (Green a spol., 2010).

Obrázek 16: 3 kosti z jeskyně Vindija, z kterých se získala aDNA (Green a spol., 2010).



Celkem devět DNA extraktů připravených ze 3 kostí bylo využito k sestavení knihovny. Kontaminace mtDNA byla odhadnuta pomocí 6 prodloužených biotinylovaných primerů, které se zaměřují na rozdíly mezi mtDNA člověka a neandertálce (Green a spol., 2010).

Otázku ohledně způsobu získávání stravy nám zodpoví rekonstrukce přímo z nalezených kosterních pozůstatků nebo z archeologických nálezů s nimi

asociovaných. Přímou z kosterních pozůstatků lze získat organický materiál (nejčastěji kolagen) a provést analýzu stabilních izotopů uhlíku ($\delta^{13}\text{C}$) a dusíku ($\delta^{15}\text{N}$). Tímto způsobem je možné rekonstruovat původ bílkovin z rostlinných či zvířecích zdrojů, přičemž provedené studie naznačují, že neandertálci získávali většinu proteinů z masa ulovených zvířat (Tůma, 2012).

8.3 Identifikace ostatků Mikuláše Koperníka

Světově nejznámější astronom Mikuláš Koperník, autor *De Revolutionibus Orbium Coelestium*, se narodil v roce 1473 v Toruni (Polsko) v rodině bohatého obchodníka. Jeho otec se také jmenoval Mikuláš. Matka se jmenovala Barbara Watzenrode a Mikuláš byl jejich nejmladší syn. Studoval nejprve na Univerzitě v Krakově, poté v italské Bologni a Padově. Mikuláš Koperník zemřel v 70 let v roce 1543 a byl pohřben v Fromborské katedrále, kde působil jako kněz.

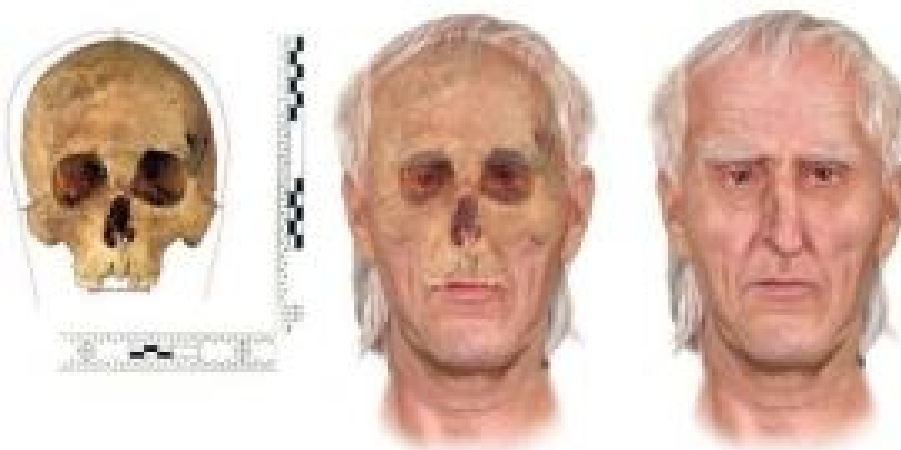
V roce 2005 byly ve Fromborské katedrále v blízkosti oltáře sv. Kříže exhumovány kosterní pozůstatky pravděpodobně patřící Koperníkovi. Na porovnání byla použita DNA získaná ze vzorků vlasů. Vlasy byly nalezeny v knize *Calendarium Romanum Magnum* od Johannese Stoefflera, kterou používal mnoho let. Pomocí 6 markerů z 15 krátkých tandemových repetitiv (STR) za použití Identifiler kit (Applied Biosystems) byly prokázány tyto výsledky genotypizace:

Marker	Alela
D8S1179	11, 14
D3S1358	16, 18
TH01	9.3
D19S433	13
VWA	14, 15
D5S818	12

Díky těmto získaným datům může být ukončeno hledání ostatků Mikuláše Koperníka, které trvalo nejméně 2 staletí, neboť došlo ke shodě DNA s nalezenými vlasy.

Analýza DNA přinesla ještě jeden zajímavý výsledek, a to že Koperník měl mít světlou (modrou) barvu očí. Protože se při analýze SNP odhalil C/C genotyp na genu HERC2, který převládá u modrookých lidí. Tento fakt je v rozporu s dobovými podobiznami astronoma, na nichž je obvykle zachycen s tmavými očima (Bogdanowicz a spol., 2009).

Obrázek 17: Rekonstrukce lebky Mikuláše Koperníka - http://www.tyden.cz/obrazek/kopernik-rekonstrukce-49259b9ccb0a0_275x183.jpg (16.6.2013)



Díky nalezené lebce byl sestaven portrét Mikuláše Koperníka.

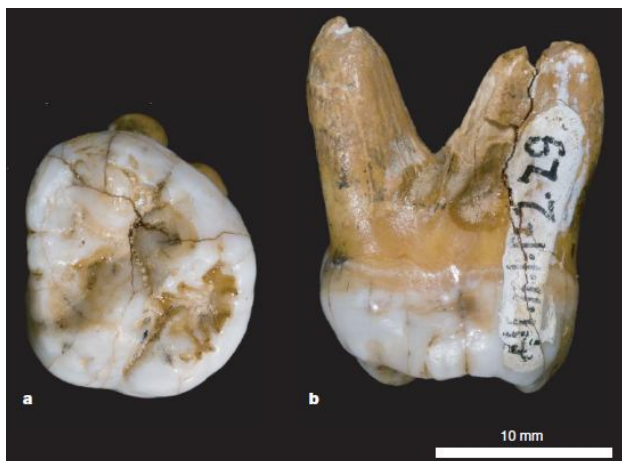
Metody rekonstrukce podoby člověka podle lebky lze rozdělit na kresebné (2D) a plastické (3D), ty se z technického hlediska dělí na sochařské a počítačové. Plastickou rekonstrukci lze dále rozdělit na několik dalších metod. První z nich je metoda anatomická (ruská metoda), při níž se podle charakteru přípojových míst na lebce rekonstruuji žvýkací svaly, které nejvíce formují tvar obličeje. Jiným postupem je metoda hloubky měkkých tkání (metoda americká), při níž se využívá průměrných rozměrů tloušťky měkkých tkání

v antropometrických bodech. Kombinovaná (britská) metoda slučuje výhody obou předchozích (Vaníčková, 2011).

8.4 Nález v Denisově jeskyni na Sibiři

Před více než 40 000 lety žil v jižní Sibiři člověk, který se lišil od předků moderního člověka, tak i od neandertálců (Petr, 2012). Zatím se našel pouze jeden článek prstu a dva zuby (viz Obrázek 18). Genetická analýza však potvrdila jedinečnost fosilních ostatků. Ostatky patřící mladé dívce objevili ruští archeologové v Denisově jeskyni v pohoří Altaj v roce 2008 (Gibbons, 2012). V blízkosti ostatků byly nalezeny ozdoby a nástroje z kamene (Reich a spol., 2010). V Denisově jeskyni se průměrná roční teplota pohybuje kolem 0 °C. Což bylo velmi příznivé pro uchování genetického materiálu (Gibbons, 2012). Fosilie získala přezdívku „žena X“ (Petr, 2012).

Obrázek 18: Nalezený zub (Reich a spol., 2010).



Na obrázku je vyobrazen téměř kompletní zub (třetí nebo druhá horní stolička). Kořeny byly krátké, ale silné. Celkově lze říci, že zub byl velmi velký (průměr 13,1 mm).

Vědci pod vedením Svanteho Pääba z Max Planck institutu pro evoluční antropologii v Lipsku přečetli prakticky celý genom, přičemž každý nukleotid v průměru třicetkrát (Gibbons, 2012). Při analýze DNA byly použity 2 enzymy:

uracil-DNA-glykosyláza a endonukleáza VIII (Reich a spol., 2010). Problémem u starověké DNA je, že se rozkládá na části hned po extrahování z kosti. Průlomem bylo vyvinutí sekvenční metody s použitím pouze jednovláknové DNA místo dvouvláknové. Díky tomu dnes například víme o denisovanech, že měli tmavou kůži, hnědé vlasy a hnědé oči (Petr, 2012). Poněkud překvapivé je, že DNA denisovanů lze vystopovat v genomu dnešních obyvatel Melanésie a Austrálie (Gibbons, 2012). Odhaduje se, že $4,8 \pm 0,5\%$ z genomů obyvatel Melanésie pochází od denisovanů (Reich a spol., 2010).

8.5 Identifikace neznámých osob

V letech 1991 – 1995 proběhla na území Chorvatska válka za nezávislost. Bylo zde objeveno 135 masových hrobů. Pozůstatky 674 osob byly vykopány z více než 30 hrobů na území Chorvatska a následně byly převezeny na Oddělení patologie a forenzní medicíny do Fakultní nemocnice ve Splitu. Pro identifikaci byl k dispozici seznam lidí, kteří byli po roce 1995 nezvěstní. Tento seznam zahrnoval také údaje od příbuzných a lékařský i stomatologický záznam.

Nejprve však musel být povrch kostí očištěn od zbytků půdy a měkkých tkání a vzorky byly obroušeny ve vodě šetrným čisticím prostředkem. Poté byly omyty destilovanou vodou a volně sušeny na vzduchu. Následně znovu omyty třikrát destilovanou vodou, dvakrát v 70 % etanolu a sušeny na vzduchu po dobu 24 hodin. Vzorky byly zmrazeny a nadrceny na jemný prášek. K 2 g prášku byl přidán extrakční pufr (3 ml), který byl složen z 10 $\mu\text{mol/l}$ Tris o pH 8,0; 100 $\mu\text{mol/l}$ NaCl; 50 $\mu\text{mol/l}$ EDTA o pH 8,0 a 0,5% SDS. Ke směsi bylo přidáno ještě 100 μl proteinkinazy K (20mg/ml). Roztok se inkuboval při 56 °C 48 hodin a následovala extrakce pomocí fenol-chloroformisoamylalkoholu.

Modifikací této metody je izolace DNA systémem IQ (Promega, Madison, WI, USA). K 2 g rozdrčené kosti byly přidány 3 ml extrakčního pufru a 200 ml proteinkinazy K (20 mg/ml). Inkubace pak probíhala jen 15 minut při 56 °C. Roztok byl centrifugován 4 minuty při 4000 rpm. Dva díly připraveného

lyzačního pufru a 15 µl pryskyřice byly přidány k čistému supernatantu a vše bylo inkubováno 10 minut při pokojové teplotě. Zkumavky byly umístěné do magnetického pole a po oddělení roztoku a pryskyřice, byl odstraněn veškerý roztok. 100 µl lyzačního roztoku bylo přidáno k pryskyřici. Zkumavky byly vloženy do magnetického stojanu a po oddělení pryskyřice a pufru byl veškerý lyzační pufr odstraněn. Stejný postup byl proveden dvakrát s promývacím roztokem. Získaná pryskyřice s rozpuštěnou DNA byla ponechána otevřená na 5 až 15 minut mezi magnetickými stojany, aby mohla volně vyschnout. Nakonec bylo ke směsi vloženo 30 µl elučního pufru a vše bylo 5 minut inkubováno při 65 °C. Zkumavky byly okamžitě umístěny do magnetického pole k oddělení pryskyřice a roztoku DNA.

Jiná modifikace, popsána Andelinovičem a spol., zahrnuje dekalifikaci (odvápnění) pomocí EDTA. Kdy bylo do 2 g rozdrčené kosti přidáno 16 ml 0,5 M EDTA o pH 7,5. Vše bylo ponecháno na třepačce při pokojové teplotě na 24 hodin. Roztok byl centrifugován 15 minut při 2000 otáčkách za minutu a následně byl supernatant odstraněn. Opět bylo přidáno 16 ml EDTA. Postup byl opakován v rozmezí 3 – 5 dní. Získané pelety byly opláchnuty v 16 ml destilované vody a znovu centrifugovány 15 minut při 2000 rpm. Supernatant byl slit a tato procedura proběhla ještě dvakrát. Následná extrakce a inkubace byla popsána v předchozím odstavci.

Těmito metodami bylo analyzováno 1155 kostních vzorků za účelem identifikace osob v období 1993-2005. Úspěšná identifikace byla dosažena u 703 osob. Z toho identita 577 osob (85,6%) byla potvrzena klasickou forenzní analýzou. Zbytek ostatků (14,4%) zůstal neznámý a nebyl identifikován (Andelinovič a spol., 2005).

Tabulka 1: Úspěšné DNA amplifikace z různých typů kosterních ostatků v letech 2000-2004 (Andelinović a spol., 2005).

Počet extrakcí za rok							Procento úspěšných amplifikací za rok					
Typ kosti	2000	2001	2002	2003	2004	suma	2000	2001	2002	2003	2004	suma
stehenní	15	69	46	76	13	219	80	91	87	97	100	92
zub	6	63	6	11	0	86	67	89	100	100	-	90
lebka	2	5	5	0	1	13	100	60	60	-	100	69
pažní	1	6	6	0	3	16	100	67	100	-	67	81
loketní	1	3	1	1	0	6	0	100	100	0	-	67
vřetenní	1	1	1	0	0	3	100	100	100	-	-	100
Dolní čelist	0	1	0	0	0	1	-	0	-	-	-	0
žebra	0	2	0	0	0	2	-	0	-	-	-	0
patní	0	0	1	0	0	1	-	-	0	-	-	0
pánev	0	0	4	0	0	4	-	-	75	-	-	75
holenní	0	0	9	1	8	18	-	-	89	100	100	94
křížová	0	0	1	0	0	1	-	-	100	-	-	100
lýtková	0	0	2	0	0	2	-	-	100	-	-	100
Neznámé	21	2	17	0	0	40	100	50	88	-	-	93
Všechny vzorky	47	152	99	89	25	412	87	86	87	97	96	89

DNA byla nejvíce získávána z kosti stehenní a ze zubu. 100% úspěšnost amplifikace byla u kosti vřetenní, křížové a lýtkové.

8.6 Kosterní pozůstatky z pohřebiště ve Znojmě-Hradišti

V roce 2007 bylo ve Znojmě-Hradišti objeveno při záchranném výzkumu doc. PhDr. Bohuslavem Klímou rozsáhlé slovanské pohřebiště datované do středohradištního období (Drozdová, 2011).

K preparaci kosterních pozůstatků v terénu byly užity běžné preparační nástroje: kovová lopatka a motyčka s dřevěnou rukojetí, dřevěné špachtle,

štetce ze syntetického vlákna, igelitový sedák. Ochranný oděv se skládal z kombinézy s kapucí, respirátoru, igelitových návleků, brýlí a latexových rukavic. Před preparací každého hrobu byly pomůcky ošetřeny 5% NaClO a 96% etanolem a následně sterilizovány spolu s ochranným oděvem a uzavíratelnými plastovými sáčky 20 minut UV zářením. Vzhledem k tomu, že pro analýzu DNA jsou nejvhodnější zuby nebo kompakta dlouhých kostí, bylo rozhodnuto o sterilním odběru lýtkových kostí (Drozdová a spol., 2012).

Obrázek 19: Kosterní pozůstatky nalezené v letech 2007 a 2008 byly velmi dobře zachovalé (Drozdová, 2011).



Ukázka kosterních pozůstatků z pohřebiště ve Znojmě-Hradišti: Lebka muže (hrob č. 432), lebka ženy (hrob č. 539) a lebka dítěte (hrob č. 509).

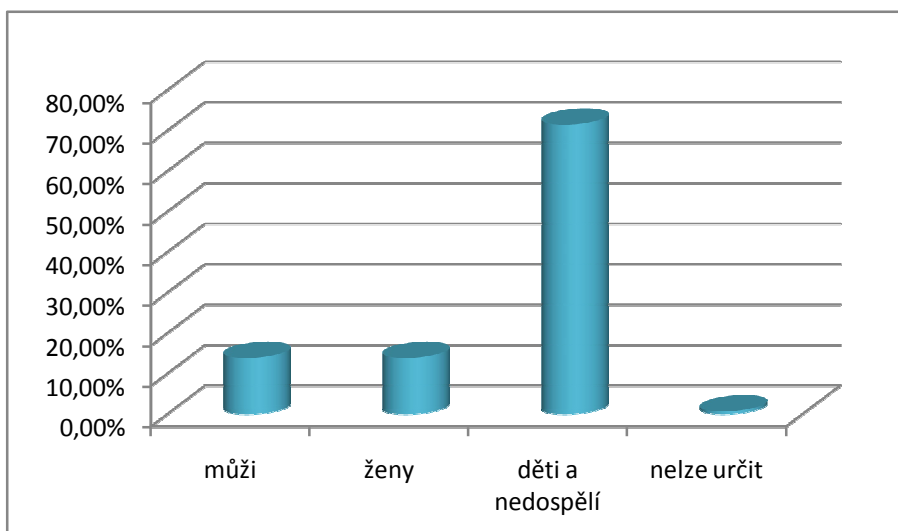
Z odebraných vzorků bylo pomocí vrtačky a sterilních brusných pásů odstraněno přibližně 1 - 2 mm povrchové kostní tkáň. Mechanicky ošetřené vzorky byly poté očištěny 5% NaClO a 96% etanolem a krátce sterilizovány UV zářením (10 minut z každé strany). Pomocí oscilačního kulového mlýnu byly vzorky rozemlety na prášek. Vzorky rozemleté na jemný prášek, byly dekalifikovány působením 0,5 M EDTA (pH 8,0) při teplotě 4 °C. K izolaci DNA byl použit izolační kit QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen). Pro genetické určení pohlaví byla užita metoda analýzy genu SRY a genu pro amelogenin (viz Obrázek 14).

První metoda umožňuje přímou identifikaci pouze jedinců mužského pohlaví. Je dána amplifikací úseku genu SRY, dlouhého 93 bp. Gen SRY (Sex determining Region Y) se nachází na krátkém raménku chromozomu Y. Jedinci ženského pohlaví jsou určeni nepřímou, nepřítomností amplifikačního produktu.

Amelogenin je gen kódující protein zubní skloviny (Drozdová a spol., 2012). Patří mezi geny nacházející se jak na chromozomu X (AMELX), tak na chromozomu Y (AMELY). Lidský AMELX gen má velikost 2872 bp a je lokalizován v oblasti Xp22.1-22.3, zatímco AMELY je dlouhý 3272 bp v oblasti 11p12.2 (Eliášová a Mazura, 2009).

Celkem bylo hodnoceno 137 skeletů mužů, žen a dětí. Z toho patřilo 19 koster mužům, 19 ženám a 98 koster patřilo dětem a nedospělým juvenilním jedincům (Drozdová, 2011).

Graf 2: Grafické vyjádření složení části populace ze Znojma-Hradiště podle pohlaví (upraveno dle Drozdová, 2011).

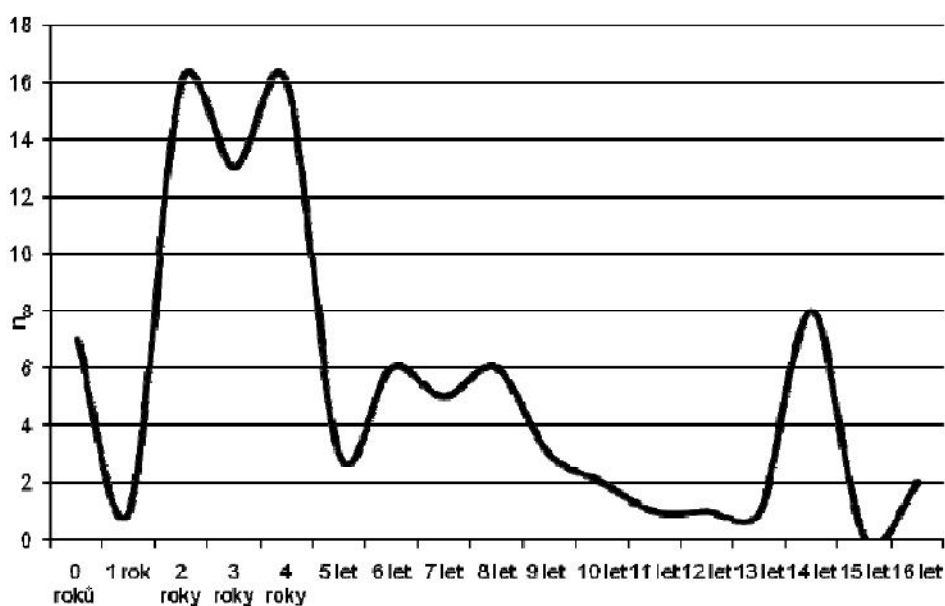


Uvedená čísla ukazují na vysoké procento (71,5 %) jedinců zemřelých v dětském věku.

Věk byl u dětských jedinců určen metodou podle stupně prořezání chrupu a podle délek dlouhých kostí. Vzhledem k velmi dobrému stavu zachovalosti kosterního materiálu se podařilo určit věk téměř u všech zkoumaných jedinců. Věk nebyl přesně stanoven pouze u dvou dospělých. Stáří bylo tedy určeno u 135 osob.

Analýza úmrtnosti ukázala poměrně velké množství novorozenců a kojenců do půl roku života v této části pohřebiště, kde jich bylo objeveno sedm. Jak je obvyklé, nejvíce dětí umíralo v období kojeneckém mezi 2. až 4. rokem života (49,4 %), což činí téměř polovinu dětské populace do 16 let. Dále vidíme zvýšenou úmrtnost u dětí mezi 6. až 8. rokem, kdy zemřelo asi 18,7 % dětí. Poslední zvýšení je možno vysledovat ve 14 letech, kdy zemřelo téměř 9 % dětí (Drozdová, 2011).

Graf 3: Úmrtnost dětské hradištské populace (Drozdová, 2011).



Výška postavy byla vypočítána na základě délky kosti stehenní. Výška postavy byla zjištěna u 14 mužů a 16 žen. Výška postavy mužů se pohybovala v intervalu 158 až 176 cm, s průměrem 168 cm. Nejmenší žena měřila 144 cm, nejvyšší žena pak byla 165 cm vysoká. Průměrná výška žen dosahovala 156 cm.

Popisovaný kosterní materiál byl vyzvednut v prvních dvou letech výzkumu (2007 a 2008) na dnes již velmi rozsáhlém pohřebišti v lokalitě Znojmo-Hradištské. Jedná se pouze o malou část (137 mužů, žen a dětí) populace pohřbené na tomto pohřebišti, která má v současnosti přes 300 hrobů. Proto jsou uváděné výsledky pouze dílčí (Drozdová, 2011).

8.7 Pohřebiště novorozenců v Izraeli

Ashkelon byl osídlen před více než 5000 lety a patřil mezi hlavní mořské přístavy. V Ashkelonu byly ve stoce objeveny kosterní pozůstatky stovky novorozených dětí spolu se zvířecími kostmi a střepey. Podle vývoje zubů bylo stáří novorozenců odhadnuto na 1-2 dny.

K určení pohlaví byla použita DNA analýza. Vzorky byly odebrány ze 43 levých femurů, aby se zabránilo testování téhož jedince dvakrát. Kosti byly čištěny měkkým kartáčkem. Pro extrakci DNA bylo použito 0,5 - 1 mg kostního prášku. DNA byla získána purifikační metodou Chelex. K amplifikaci byla použita metoda PCR a pohlaví bylo určeno amelogeninovým testem. Amplifikace byla úspěšná u 19 vzorků ze 43. Mužské pohlaví bylo určeno u 14 vzorků a zbylých 5 vzorků byly ženy (Faerman a spol., 1998).

Obrázek 20: Jedna z dětských koster nalezených ve stoce - http://i.dailymail.co.uk/i/pix/2010/06/25/article-1289603-0A33A745000005DC-870_468x348.jpg



Předpokládá se, že stoka sloužila jako veřejné místo pro likvidaci kojenců, kteří zemřeli přirozeně nebo byli úmyslně usmrceni. Pohřební obřad se prováděl až u dětí starých nejméně 6 měsíce (Faerman a spol., 1998).

Takto vysoká frekvence úmrtí mužského pohlaví (74%) je překvapivá, vzhledem k tomu, že dcery byly obecně v této společnosti méně hodnotné. Autoři se domnívají, že novorozenci byli potomci kurtizán, pracující nedaleko stoky v lázeňském domě. Narozené dívky se ponechávaly, aby pokračovaly v profesi svých matek (Kaestle a Horsburgh, 2002).

8.8 Analýza pohřebiště v Ergoldingu ze 7. století

Ve městě Ergolding ležící v Bavorsku (Německo) byly nalezeno pohřebiště s ostatky datované do 7. století. V letech 1997 – 2002 zde němečtí archeologové zkoumali více než 440 hrobů. Nález artefaktů učinil z Ergoldingu jedno z nejbohatších bavorských pohřebišť z pozdně merovejského období. Proto se usuzovalo, že zde musely být pohřbeny velmi významné osoby. V centrální části byl objeven významný hrob číslo 244 s 6 nalezenými muži. Proto bylo rozhodnuto provést DNA analýzu všech 6 pohřbených jedinců (označených 244A až 244F). Jedinci nalezeni v západní části leželi na rovných zádech a byli pohřbeni jako bojovníci s meči, kopími a štíty. Jedinci ve východní části byli okradeni, takže nebyly nalezeny žádné cenné artefakty.

Pro genetickou analýzu byly použity jednotlivé kosti stehenní. U vzorků 244A, B, C, D, F byly kosti hodně pórovité v důsledku demineralizace (viz Obrázek 21). Stehenní kost 244E neměla žádné známky poškození a měla slonovitý bílý vzhled.

Obrázek 21: Vzhled povrchu kosti (Vaněk, Sasková a Koch, 2009)-



Na základě genetické analýzy se podařilo zjistit, že jediný příbuzenský vztah byl u jedinců 244A a 244B. Byli to bratři s pravděpodobností 99,99979 %. Měli totiž shodný Y haplotyp. Kostra jedince 244C s nimi měla velmi podobným haplotyp, což značí, že se jednalo o jejich vzdáleného příbuzného. U zbývajících kosterních pozůstatků už žádná podobnost nebyla. (Vaněk, Sasková a Koch, 2009).

9 Závěr

Ve své bakalářské práci se zabývám analýzou DNA, která zkoumá deoxyribonukleové kyseliny (DNA), které se nachází v buňkách každého organismu. Molekula DNA v něm může za optimálních podmínek zůstat a uchovat se až tisíce let po smrti organismu. První studie zabývající se starodávnou DNA (aDNA) proběhly v polovině 90. let. Tehdy byl analyzován 150 starý muzejní exemplář a 2430 let stará egyptská mumie.

Zdrojem starodávné DNA může být jakýkoli biologický vzorek, například kosti, zuby, vlasy, chlupy, nehty. Nejčastějším zdrojem nukleových kyselin je kostní tkáň. Je to nejčastější materiál pro analýzu DNA, s kterým se při výzkumu setkáváme.

Objev metody polymerázové řetězové reakce (PCR) měl zásadní význam pro celou molekulární biologii a genetiku. PCR je cyklická enzymatická metoda, umožňující namnožení určitého úseku DNA. Je především důležitá pro starodávnou DNA, která bývá vlivem času poškozena a degradována. V důsledku toho není k dispozici dostatečné množství vzorku pro vlastní analýzu. Dalším velkým problémem při analýze aDNA je kontaminace. Především jde o kontaminaci historických kosterních pozůstatků současnou DNA, kterou každý člověk šíří neustále kolem sebe.

Samotný proces genetické analýzy se skládá z několika základních kroků. Prvním krokem je odběr vzorku, následuje extrakce DNA ve specializované laboratoři určené k práci se starodávnou DNA. Po extrakci dochází k namnožení úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce. Nakonec je provedena detekce produktů pomocí elektroforézy.

Na začátku své bakalářské práci se snažím vysvětlit podstatu a funkci DNA. Věnuji se počátkům genetické analýzy a problematice, která ji doprovází. Poté jsem se snažila shrnout techniky, které se využívají při vlastní analýze DNA. Druhá část mé práce ukazuje konkrétní příklady, při kterých byla využita starodávná DNA. Například při určování pohlaví u ostatků v Darwenu či příbuzenských vztahů u mužů nalezených v jednom z nejbohatších bavorských

pohřebišť z pozdně merovejského období. Dále se využívá při identifikaci jedinců, kteří zemřeli ve válce v Chorvatsku i při jiných katastrofických událostech. Nebo slouží pro odlišení lidských ostatků od zvířecích nalezených v Izraeli ve stoce. Důležitou roli také hraje při ověřování totožnosti kosterních pozůstatků Mikuláše Koperníka a jiných významných historických osobností. Slouží také ke studiu evoluce či objevu nového jedince nalezeného v Denisově jeskyni na Sibiři.

10 Použitá literatura

- 1) ANDELINOVIĆ, Šimun, Davorka SUTLOVIĆ, Ivana Erceg IVKOSIĆ, Vedrana ŠKARO, Ante IVKOSIĆ, Frane PAIĆ, Boja REZIĆ, Marija DEFINIS-GOJANOVIĆ a Dragan PRIMORAC. Twelve-year experience in identification of skeletal remains from mass graves. *Forensic science*. 2005, 46 (4), 530-539.
- 2) BEZDĚK, Pavel a Helena TĚTHALOVÁ. „Molekulární archeologie“. In: *Archeology* [online]. 2010 [cit. 2013-04-28]. Dostupné z: <http://archeology.cz/?p=217>.
- 3) BOGDANOWICZ, W., ALLEN, M., BRANICKI, W., LEMBRING, M., GAJEWSKA, M. a KUPIEC, T. 2009. Genetic identification of putative remains of the famous astronomer Nicolaus Copernicus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106 (30), 12279-12282.
- 4) BORKOVÁ, Petra, Tomáš JURČEK a Jiří DRÁBEK. Analýza starobylé DNA. *Živa*. 2011, 1 (1), 3 – 6.
- 5) CAMPOS, Paula F., Oliver E. CRAIG, Gordon TURNER-WALKER, Elizabeth PEACOCK, Eske WILLERSLEV a M. Thomas P. GILBERT. DNA in ancient bone – Where is it located and how should we extract it?. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. 2012, 194 (1), 7-16.
- 6) CANN, Rebecca L., Mark STONEKING a Allan C. WILSON. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*. 1987, 325 (6099), 31-36.
- 7) DOLEŽAL, Tomáš. Sekvenování, přečtení genetické informace, éra genomiky. In: *Základy moderní biologie* [online]. 2012 [cit. 2013-04-28]. Dostupné z: <http://zmb.prf.jcu.cz/index.php/5-sekvenovani-genomika>
- 8) DROZDOVÁ, Eva, Kateřina BOBEROVÁ, Kristýna PÍŽOVÁ, Josef UNGER, Josef DUDA, Lukáš ŠÍN a Bohuslav KLÍMA. Pokus o intaktní vyzvednutí kosterních pozůstatků pro účely genetických analýz (An attempt of excavation of human skeletal remains for palaeogenetic purposes). *Česká antropologie*, Olomouc, 2012, 62 (1), 10-16.
- 9) ELIÁŠOVÁ, Irena a Ivan MAZURA. Určení pohlaví kosterního materiálu pomocí amelogeninu. *Česká antropologie*, 2009, 59 (1-2), 14-15.

- 10) ELIÁŠOVÁ, Irena, Ivan MAZURA a Blanka Vacková. Komparace čtyř DNA extrakčních protokolů pro genetickou analýzu kosterního materiálu. *Česká antropologie*, 2009, 59 (1-2), 16-19.
- 11) FAERMAN, Marina, Gila Kahila BAR-GAL, Dvora FILON, Charles L. GREENBLATT, Lawrence STAGER, Ariella OPPENHEIM a Patricia SMITH. Determining the Sex of Infanticide Victims from the Late Roman Era through Ancient DNA Analysis. *Journal of Archaeological Science*. 1998, 25 (9), 861-865.
- 12) GIBBONS, Ann. A Crystal-Clear View of an Extinct Girl's Genome. *Science* [online]. 2012, 337 (6098), 1028-1029. [cit. 2013-04-24]. ISSN 0036-8075. DOI: 10.1126/science.337.6098.1028. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.337.6098.1028>
- 13) GILBERT, M. Thomas P., Eske WILLERSLEV, Anders J. HANSEN, Ian BARNES, Lars RUDBECK, Niels LYNNERUP a Alan COOPER. Distribution Patterns of Postmortem Damage in Human Mitochondrial DNA. *The American Journal of Human Genetics*. 2003, 72 (1), 32-47.
- 14) GREEN, R. E., J. KRAUSE, A. W. BRIGGS, T. MARICIC, U. STENZEL, M. KIRCHER, N. PATTERSON, H. LI, W. ZHAI, M. H. Y. FRITZ, N. F. HANSEN, E. Y. DURAND, A. S. MALASPINAS, J. D. JENSEN, T. MARQUES-BONET, C. ALKAN, K. PRUFER, M. MEYER, H. A. BURBANO, J. M. GOOD, R. SCHULTZ, A. AXIMU-PETRI, A. BUTTHOF, B. HOBER, B. HOFFNER, M. SIEGEMUND, A. WEIHMANN, C. NUSBAUM, E. S. LANDER, C. RUSS, N. NOVOD, J. AFFOURTIT, M. EGHOLM, C. VERNA, P. RUDAN, D. BRAJKOVIC, Z. KUCAN, I. GUSIC, V. B. DORONICHEV, L. V. GOLOVANOVA, C. LALUEZA-FOX, M. DE LA RASILLA, J. FORTEA, A. ROSAS, R. W. SCHMITZ, P. L. F. JOHNSON, E. E. EICHLER, D. FALUSH, E. BIRNEY, J. C. MULLIKIN, M. SLATKIN, R. NIELSEN, J. KELSO, M. LACHMANN, D. REICH a S. PAABO. A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science*. 2010, 328 (5979), 710-722.
- 15) GREEN, Richard E., Johannes KRAUSE, Susan E. PTAK, Adrian W. BRIGGS, Michael T. RONAN, Jan F. SIMONS, Lei DU, Michael EGHOLM,

Jonathan M. ROTHBERG, Maja PAUNOVIC a Svante PÄÄBO. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature*. 2006, 444 (7117), 330-336.

16) HEDGES, R. E. M. Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry*. 2002, 44 (3), 319-328.

17) HO, Simon Y.W. a M. Thomas P. GILBERT. Ancient mitogenomics. *Mitochondrion*. 2010, 10 (1), 1-11.

18) HOFREITER, Michael, David SERRE, Hendrik N. POINAR, Melanie KUCH a Svante PÄÄBO. Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics*. 2001, 2 (5), 353-359.

19) HÖSS, M., P. JARUGA, T. H. ZASTAWNY, M. DIZDAROGLU a S. PAABO. DNA Damage and DNA Sequence Retrieval from Ancient Tissues. *Nucleic Acids Research*. 1996, 24 (7), 1304-1307.

20) HÚSKA, D., BALOUN, J., TRNKOVÁ, L., ADAM, V. a KIZEK, R. 2008. Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA. *CHEMagazín*. 18 (3), 14-15.

21) KAESTLE, Frederika A. a K. Ann HORSBURGH. Ancient DNA in anthropology: Methods, applications, and ethics. *American Journal of Physical Anthropology*. 2002, 119 (S35), 92-130.

22) KAŠIČKA, Václav. Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 1997, 91 (5), 320 – 329.

23) LACAN, Marie, Christine KEYSER, Eric CRUBÉZY a Bertrand LUDES. Ancestry of modern Europeans: contributions of ancient DNA. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013, 70 (14), 2473-2487.

24) LINDAHL, Tomas. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993, 362 (6422), 709-715.

25) MCPHERSON, Michael J. and a Simon Geir MØLLER. *PCR the Basics* [online]. 2nd ed. Hoboken: Taylor, 2006 [cit. 2013-07-04]. ISBN 02-030-0267-9.

Dostupné

z:

http://download.bioon.com.cn/view/upload/201201/18181845_7261.pdf

26) PARTON, Joseph, Naglaa Abu-Mandil HASSAN, Terence A. BROWN, Stephen J. HASWELL, Keri A. BROWN a Kirsty J. SHAW. Sex identification of ancient DNA samples using a microfluidic device. *Journal of Archaeological Science*. 2013, 40 (1), 705-711.

27) PETR, Jaroslav. Záhadná „žena X“ odhalena pomocí DNA. *VTM Science* [online]. Praha: VTM Science, 2012 [cit. 2013-04-24]. ISSN 1214-4754. Dostupné z: <http://vtm.e15.cz/zahadna-zena-x-odhalena-pomoci-dna>

28) POINAR, H. N., M. HOSS, J. L. BADA a S. PAABO. Amino Acid Racemization and the Preservation of Ancient DNA. *Science*. 1996, 272 (5263), 864-866.

29) REICH, David, Richard E. GREEN, Martin KIRCHER, Johannes KRAUSE, Nick PATTERSON, Eric Y. DURAND, Bence VIOLA, Adrian W. BRIGGS, Udo STENZEL, Philip L. F. JOHNSON, Tomislav MARICIC, Jeffrey M. GOOD, Tomas MARQUES-BONET, Can ALKAN, Qiaomei FU, Swapan MALLICK, Heng LI, Matthias MEYER, Evan E. EICHLER, Mark STONEKING, Michael RICHARDS, Sahra TALAMO, Michael V. SHUNKOV, Anatoli P. DEREVIANKO, Jean-Jacques HUBLIN, Janet KELSO, Montgomery SLATKIN a Svante PÄÄBO. Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature*. 2010, 468 (7327), 1053-1060.

Šestnáct příspěvků k dějinám (Velké) Moravy: sborník k narozeninám Bohuslava F. Klímy. 1. vyd. Editor Libor Bílek, Josef Kováčik. Brno: Masarykova univerzita, 2011, 212 s. ISBN 978-802-1055-759. (Drozdová, Pížová, Vaníčková)

30) - DROZDOVÁ, Eva. *Výsledky základní antropologické analýzy kosterních pozůstatků z pohřebiště ve Znojmě-Hradiště, sonda Šoba, sezóny 2007 a 2008*

31) - PÍŽOVÁ, Kristýna, Eva DROZDOVÁ a Bohuslav František KLÍMA. *Antropogenetický výzkum slovanské populace ze Znojma-Hradiště. První výsledky*.

32) - VANÍČKOVÁ, Eva. Antropologická rekonstrukce podoby člevěka podle lebky z pohřebiště Znojmo-Hradiště

- 33) ŠIMKOVÁ, Halina. *Breviář forenzní genetiky: forenzní analýza DNA v otázkách a odpovědích*. V Tribunu EU vyd. 1. Brno: Tribun EU, 2012, 214 s. ISBN 978-80-263-0247-6.
- 34) ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- 35) TŮMA, P., ŠNEBERGER, J., HOŠEK, R., HAWS, J., BENEDETTI, M., FRIEDL, L. Proměny přístupů studia neandertálců - s příkladem výzkumů v Portugalsku. *AntropoWebzin*, 2012, (3), 209-220.
- 36) URBAN, Tomáš a Tomáš VYHNÁLEK. *Virtuální svět genetiky 1: (tištěná forma multimediálního hypertextu na CD)*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2002, 139 s. ISBN 80-715-7613-1.
- 37) VANĚK, Daniel. Genetická genealogie - sledování rodových linií pomocí analýzy DNA.I - analýza Y-chromozómu. *Živa*. 2009, č. 6. Strana 4 – 6.
- 38) VANĚK, Daniel. Genetická genealogie - sledování rodových linií pomocí analýzy DNA.II - analýza Y-chromozómu. *Živa*. 2010, č. 1. Strana 4–6.
- 39) VANEK, Daniel, Lenka SASKOVA a Hubert KOCH. Kinship and Y-Chromosome Analysis of 7th Century Human Remains: Novel DNA Extraction and Typing Procedure for Ancient Material. *Croatian Medical Journal*. 2009, 50 (3), 286-295.
- 40) WILLERSLEV, E. a A. COOPER. Review Paper. Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2005, 272 (1558), 3-16.
- 41) YANG, D.Y., ENG, B., WAYNE, J.S., DUDAR, J.CH., SAUNDERS, S.R. Technical Note: Improved DNA Extraction From Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns. *American Journal of Physical Anthropology*. 105 (4), 539–543.
- 42) YE, J., Ji, A., PARRA, E. J., ZHENG, X., JIANG, C., ZHAO, X., HU, L., TU, Z. (2004): A Simple and Efficient Method for Extracting DNA From Old and Burned Bone. *Journal of Forensic Sciences*, 49 (4), 754–759.