



# Bi5130 Základy práce s lidskou aDNA

Mgr. et Mgr. Kristýna Pížová

[pizova@sci.muni.cz](mailto:pizova@sci.muni.cz)

Laboratoř biologické a molekulární antropologie,  
ÚEB, PřF, Mu

# Bi5130 Základy práce s lidskou aDNA

- Tafonomie
- Rozklad těla po smrti
- Rozklad tkání
- Rozklad a poškození DNA
  - okolnosti zachování DNA
  - chemické modifikace bází

# Tafonomie

- Zabývá se transportem, akumulací, fosilizací, změnami organických zbytků v průběhu diagenese a jejich případnou destrukcí
- Slovo tafonomie pochází ze dvou řeckých slov, a to „taphos“, což znamená „smrt“, a „nomos“, což lze přeložit jako „princip“

# Tafonomie

- Původ termínu (Efremov 1940) – jako studium „zákonitostí spojených s pohřbíváním“.
- Rozšířeno:
- The term *taphonomy* refers to the biological, physical, and chemical processes that contribute to fossil preservation (Allison and Briggs 1991).
- **Úkoly tafonomie:**
  - Rekonstrukce původního prostředí
  - Určení faktorů, které způsobily destrukce a abraze kostí
  - Určení procesů a příčin, které vedly k danému rozmístění kostí
  - Odlišení lidských/intencionálních od mimolidských/neintencionálních zásahů

# Body farm

- <https://www.youtube.com/watch?v=GCyiczAcRBY>

# Smrt organismu

- Zastavení životních funkcí v organismu spojené s nevratnými změnami, které obnovení životních funkcí znemožňují

# Posloupnost dekompozice

1. Čerstvá – autolýza (algor mortis, livor mortis, rigor mortis)
2. Nafouknutí – putrefakce
3. Rozklad – putrefakce a karnivorie
4. Diageneze

# Dekompozice

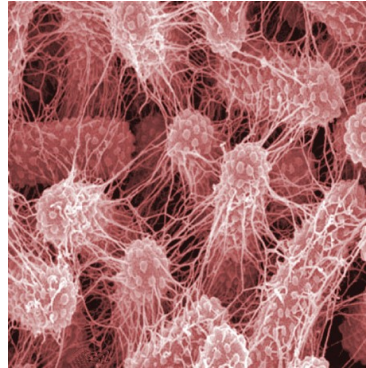
- 4 minuty po smrti organismu
- Začíná autolýza –  $O_2$ ,  $CO_2$ , pH
- Buněčné enzymy: lipázy, proteázy, amylázy...
- Nejrychlejší rozpad v metabolicky nejaktivnějších částech (játra) a v tkáních s nejvyšším obsahem vody (mozek)



# Putrefakce

- Destrukce měkkých tkání mikroorganismy
- Výsledek katabolismu tkání na plyny, tekutiny a jednodušší molekuly
- Anaerobní fermentace

# Karnivorové, dekompozitoři



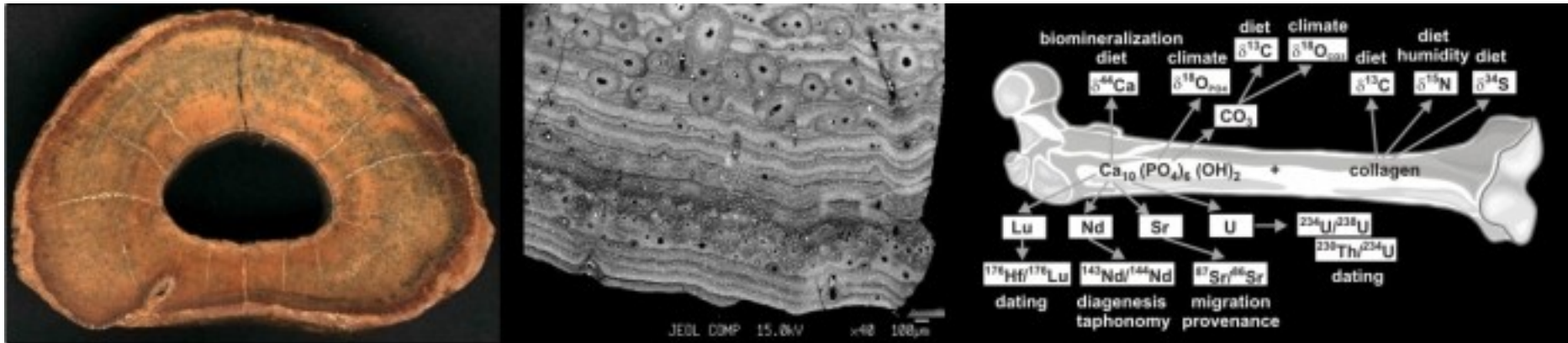
- Hmyz
- Hlodavci
- Šelmy

## Mikroorganismy

- Rané (*např. Staphylococcus, Candida, Malasseria, Baccilus, Strepococcus*)
- Pozdní (*např. Clostridium, Serratia, Klebsidella, Prateus*)
- Enviromentální (*Agrobacterium, houby*)

# Diageneze

- Termín diageneze v antropologii a paleontologii popisuje změny, které se dějí na kosterním materiálu po úmrtí jedince
- Makroskopická
- Na úrovni prvků
- Chemické poškození organické i anorganické fáze
- Fosilizace



# Postmortem degradace DNA

- Endogenní rozklad DNA (nukleázy...)
- Exogenní rozklad DNA (mikroorganismy)
- Hydrolytické procesy
- Oxidativní procesy

# Faktory ovlivňující zachovalost aDNA

- Stáří nálezu
  - dosud není prokázána přímá souvislost
  - spíše než faktor věku má význam „thermal age“:  
kombinace stáří a teploty, které byl vzorek vystaven
  - plató fáze

# Faktory ovlivňující zachovalost aDNA

- Teplota
  - Teplota půdy
  - Teplota při deponování
  - Ideální podmínky: rychle zmrazená tkáň + permafrost
  - Stálá teplota bez prudších výkyvů – PO CELOU DOBU ANALÝZY



YAMOU TE 2008  
BOULGOU/NIANKH

Bi5130 Základy práce s lidskou aDN

# Faktory ovlivňující zachovalost aDNA

- Půdní podmínky
- Obsah anorganické složky
- Obsah organické složky – humus, mikroorganismy
- Vhodné měřit složení půdy jako jeden z faktorů zachovalosti
- Hladina spodní vody a vlhkost půdy



# Faktory ovlivňující zachovalost aDNA

- Hodnota pH
- Ideální je neutrální či lehce alkalické pH, při změně pH dochází k modifikaci hydroxyapatitu



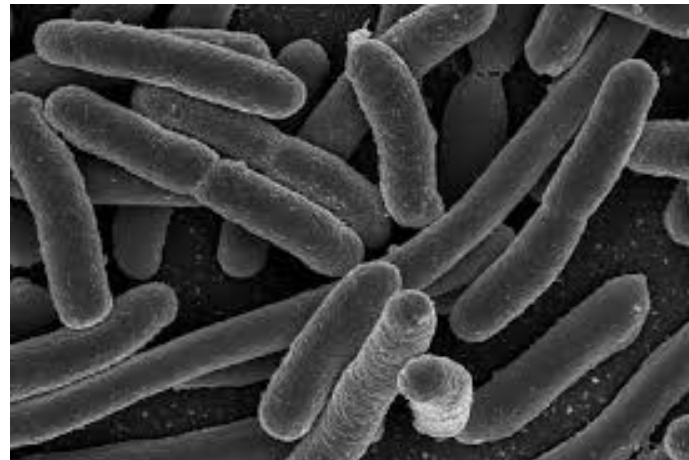
Písečná půda ve Znojmě Hradišti (foto: Kratochvíl)

# Faktory ovlivňující zachovalost aDNA

- Mikroorganismy
- Endogenní – exogenní – přidané činností člověka ( fekálie při hnojení)



*Agrobacterium tumefaciens*



*E. coli*

# Faktory ovlivňující zachovalost aDNA

- Délka skladování
  - v depozitáři probíhá degradace až 70 x rychleji
  - po 60 letech deponování se již nepodaří vyizolovat DNA
  - mytí urychlí degradaci 7x
  - plísně
  - **SPOLUPRÁCE S ARCHEOLOGY!**

# Faktory ovlivňující zachovalost aDNA

- Způsob odběru tkáně
  - v terénu
  - v laboratoři – vrtáky, zubařské vrtačky
  - pulverizace vzorky
  - nutno vzorek silně podchladiť (-80°C hlubokomrazicí box, tekutý dusík...)

# Faktory ovlivňující zachovalost aDNA

- UV záření
- Škodlivé pro kosterní materiál na povrchu
- Dále působí po exkavaci
- Tvorba volných radikálů



Bi5130 Základy práce s lidskou aDNA

# Predikce zachovalosti aDNA

- DNA se v kosti váže
- s organickou složkou (kolagen a další proteiny)
- s anorganickou složkou – hydroxyapatit

Obě vazby prokázány *in vitro*

Nutné zaměřit izolační protokol na obě složky

# Predikce zachovalosti aDNA

- Zachovalost skeletu
- Makroskopická – abraze, změna porozity, fragmentárnost materiálu, místo zdroje vzorku
- Mikroskopická – přítomnost recentních plísni, ubývání krystalické struktury hydroxyapatitu, struktura kostní tkáně



Znojmo Hradiště - Šoba III. 2009

579



K. Konášová 10 cm  
2008

Znojmo Hradiště - Šoba III. 2009  
584



K. Konášová 10 cm  
2008

# Predikce zachovalosti aDNA

- Racemizace aminokyselin
- D a L-forma aminokyselin
- Kys. asparagová (např. serin)
- vyrovnání výskytu obou forem aminokyselin ovlivněna: teplotou, přítomností vody, některými ionty kovů
- poměr racemizace **kyseliny asparagové** koreluje s poměrem depurinace DNA a tedy se zachovalostí aDNA (Poinar et al. 1996)
- Ve vzorcích, kde poměr D/L enantiomerů kys. sparagové **>0,08** se již nenachází žádná amplifikovatelná aDNA

# Predikce zachovalosti aDNA

- Rozpad aminokyselin
- glycin, prolin, hydroxyprolin, alanin
- Rozpad kolagenu
- „thermal age“
- Rozpad hydroxyapatitu
- přímoúměrný rozpadu kolagenu

# Chemické změny aDNA

- Cílem poškození je celá molekula dna
  - fosfát, deoxribóza i nukleotidy
- 100 pb – 500 pb v závislosti na stáří
- 2 základní typy poškození:
  - hydrolytické - voda
  - oxidativní – volné radikály, peroxid vodíku

# Chemické změny aDNA

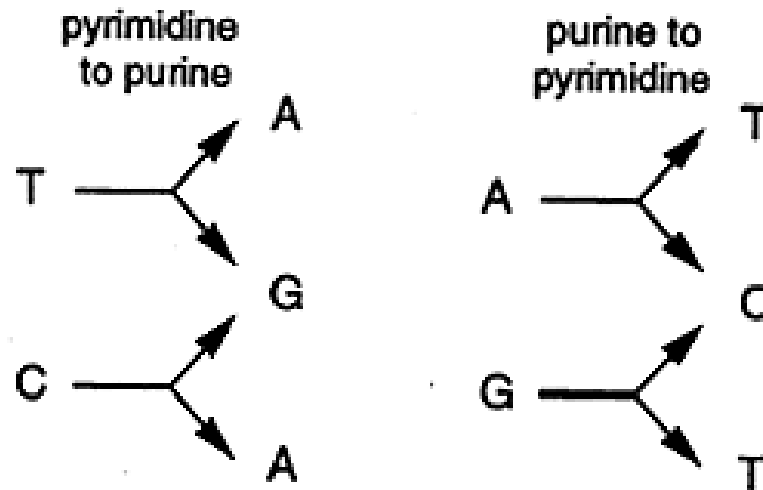
- tranzice - nahrazena purinová báze jinou purinovou bází nebo pyrimidinová pyrimidinovou
- transverze - nahrazena purinová báze pyrimidinovou nebo naopak

# Chemické změny aDNA

Transitions:

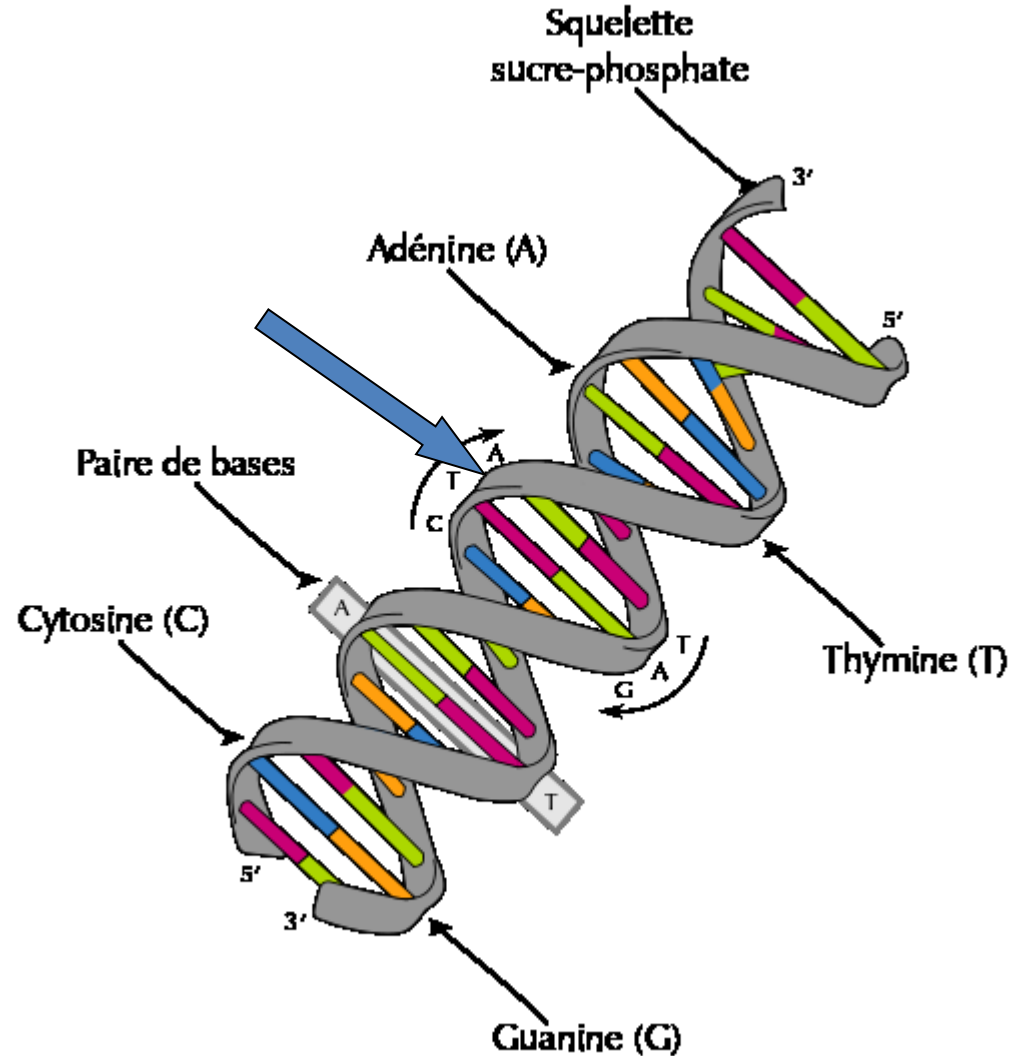


Transversions:



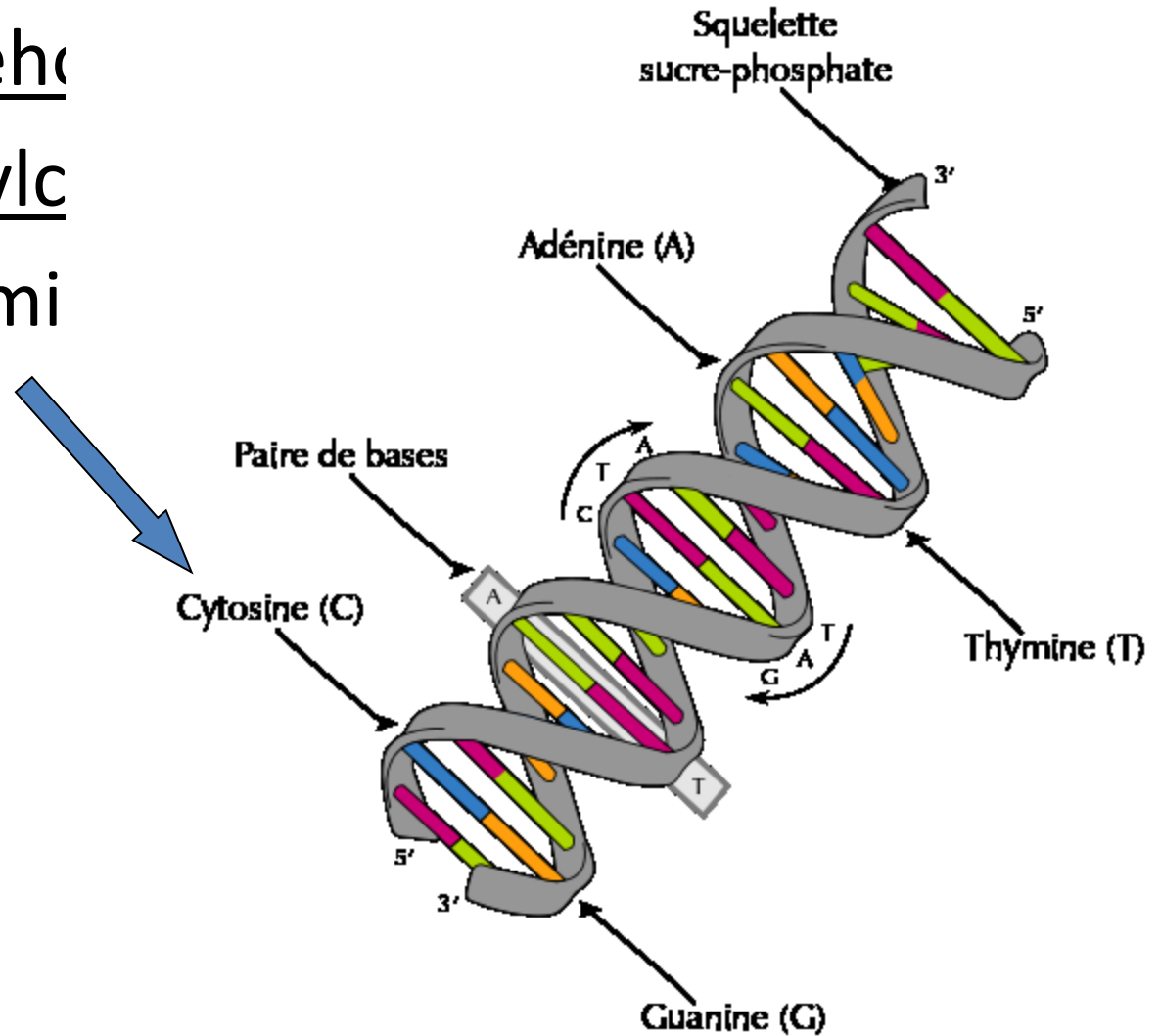
# Hydrolytické rozkladění DNA

- Cíle hydrolytického rozkladění  
Fosfodiesterová vazba  
krátké úseky DNA



# Hydrolytické poškození aDNA

- Cíle hydrolytického  
Cytosin a 5-methylc  
- dochází k deami

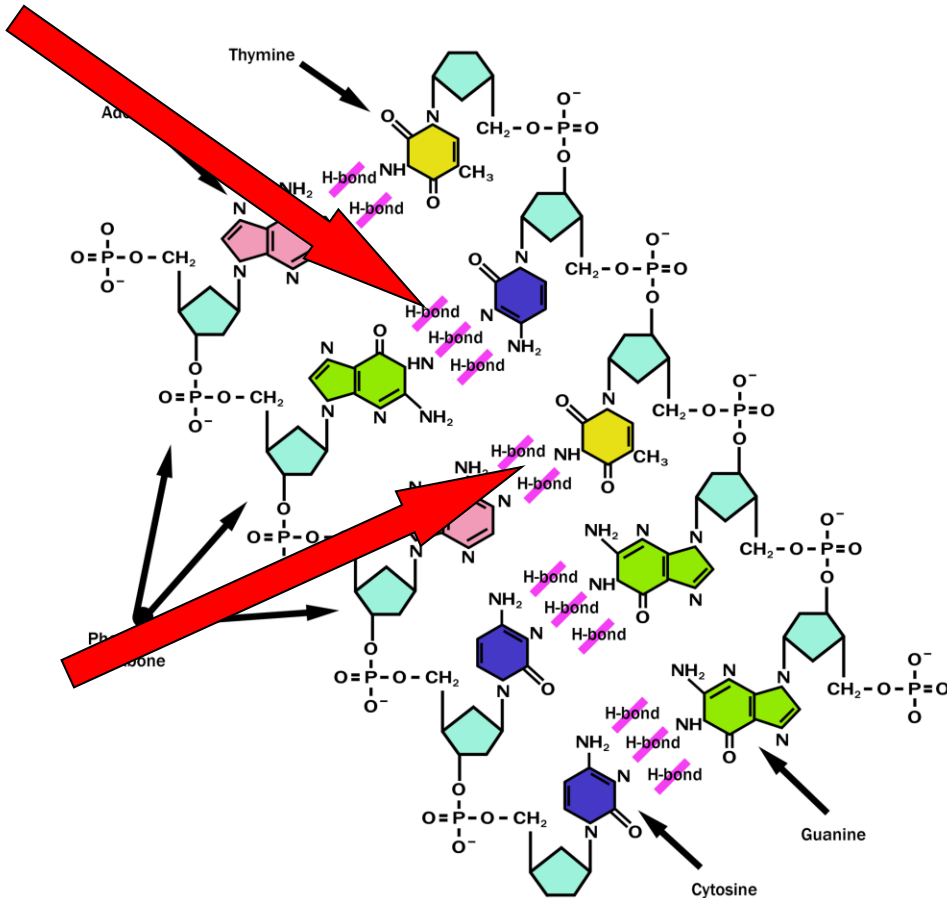




# Oxidativní poškození aDNA

- Cíle oxidativního poškození

- dvojité vazby purinů a pyrimidinů
- tvorba cyklických fragmentárních molekul

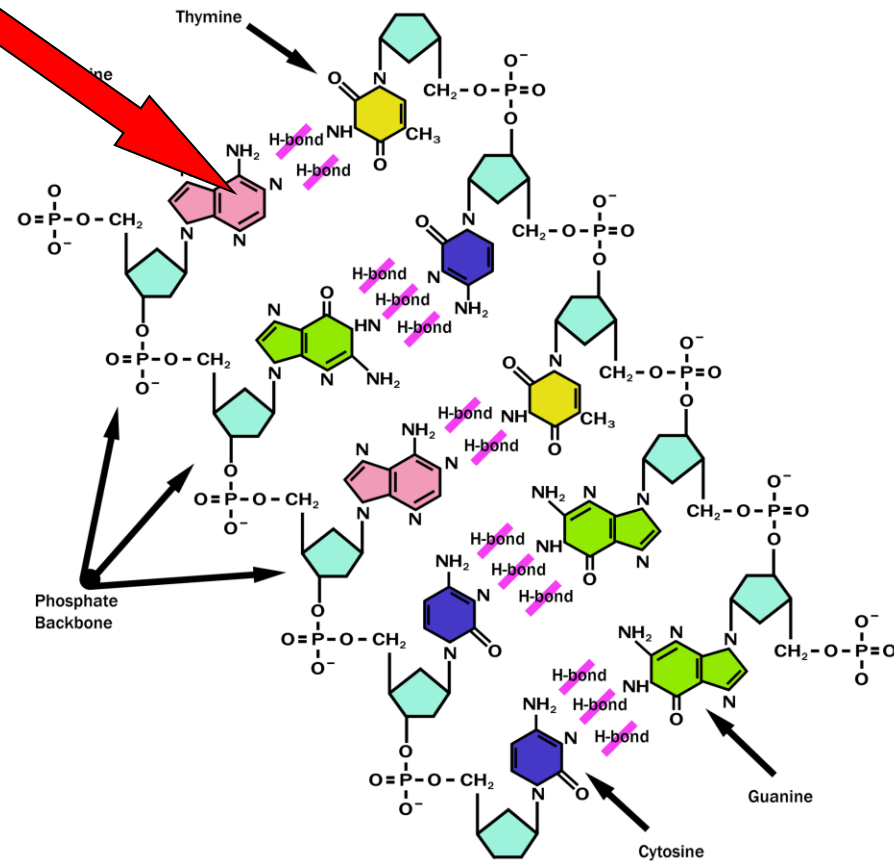


# Oxidativní poškození aDNA

- Cíle oxidativního poškození

Deoxyribóza

blokace polymerázy



# Opatření proti poškození aDNA při analýzách

- Design oligonukleotidů – produkt PCR do 200 pb
- Použití speciální polymeráz – HiFi *Taq* DNA polymerase, *Taq* DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen), Restorase<sup>®</sup> DNA Polymerase (Sigma Aldrich)
- Klonování produktů PCR v bakteriích a až poté následuje sekvenování

# MapDamage

- Software pro autentifikaci sekvence aDNA
- Aplikovatelný pro výsledky NGS
- Vyhledává v sekvencích specifické záměny a délku fragmentů
- Sekvence s aDNA mutacemi klastruje zvlášť od sekvencí bez změn (recentní kontaminantní DNA)
- Zdarma ke stažení (Mac, Linux)