



Bi5130 Základy práce s lidskou aDNA

Mgr. et Mgr. Kristýna Brzobohatá

brzobohata@sci.muni.cz

Laboratoř biologické a molekulární antropologie,
ÚEB, PřF, Mu



Proč je tak těžké analyzovat aDNA?





Proč je tak těžké analyzovat aDNA?

Analýzy aDNA komplikuje a negativně ovlivňuje:

- A) **Postmortem poškození (+faktory** ovlivňující zachovalost)
- B) Inhibitory analýz
- C) Kontaminace recentní DNA



Tafonomie

Zabývá se transportem, akumulací, fosilizací, změnami organických zbytků v průběhu diagenese a jejich případnou destrukcí.

„taphos“ = „smrt“ a „nomos“ = „princip“

Původ termínu (Efremov 1940) – jako studium „zákonitostí spojených s pohřbíváním“.

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>



Vznik aDNA začíná SMRTÍ organismu

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

Následuje dekompozice

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



1. Autolýza

- algor mortis, livor mortis, rigor mortis

4 minuty po smrti organismu začíná autolýza – O_2 , CO_2 , pH

Buněčné enzymy:

- lipázy
- proteázy
- amylázy
- nukleázy**

Nejrychlejší rozpad v metabolicky neaktivnějších částech (játra) a v tkáních s nejvyšším obsahem vody (mozek)



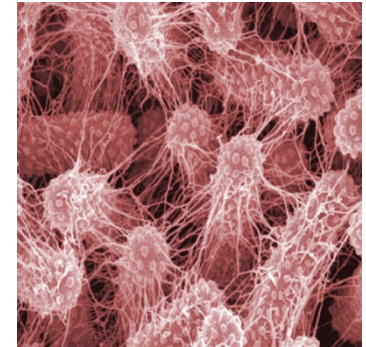
2. Putrefakce

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



3. Rozklad a karnivorové

- Hmyz
- Hlodavci
- Šelmy
- Mikroorganismy



Rané (*např. Staphylococcus, Candida, Malasseria, Baccilus, Strepococcus*)

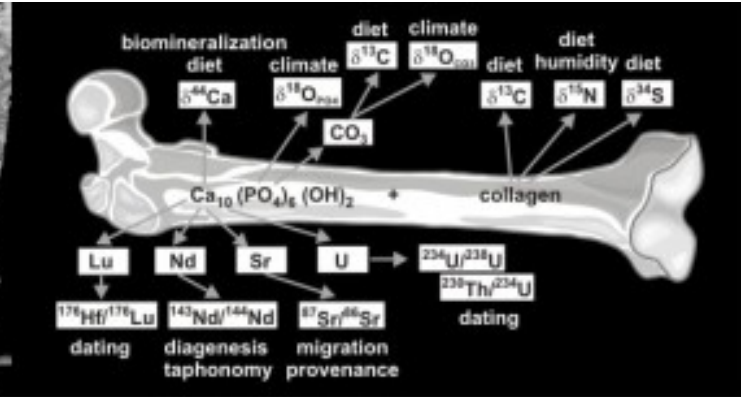
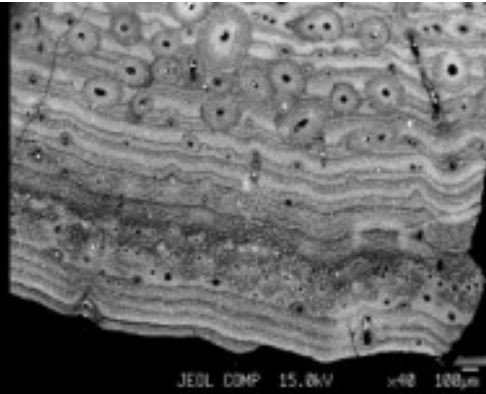
Pozdní (*např. Clostridium, Serratia, Klebsidella, Prateus*)

Enviromentální (*Agrobacterium, houby*)



4. Diagenese

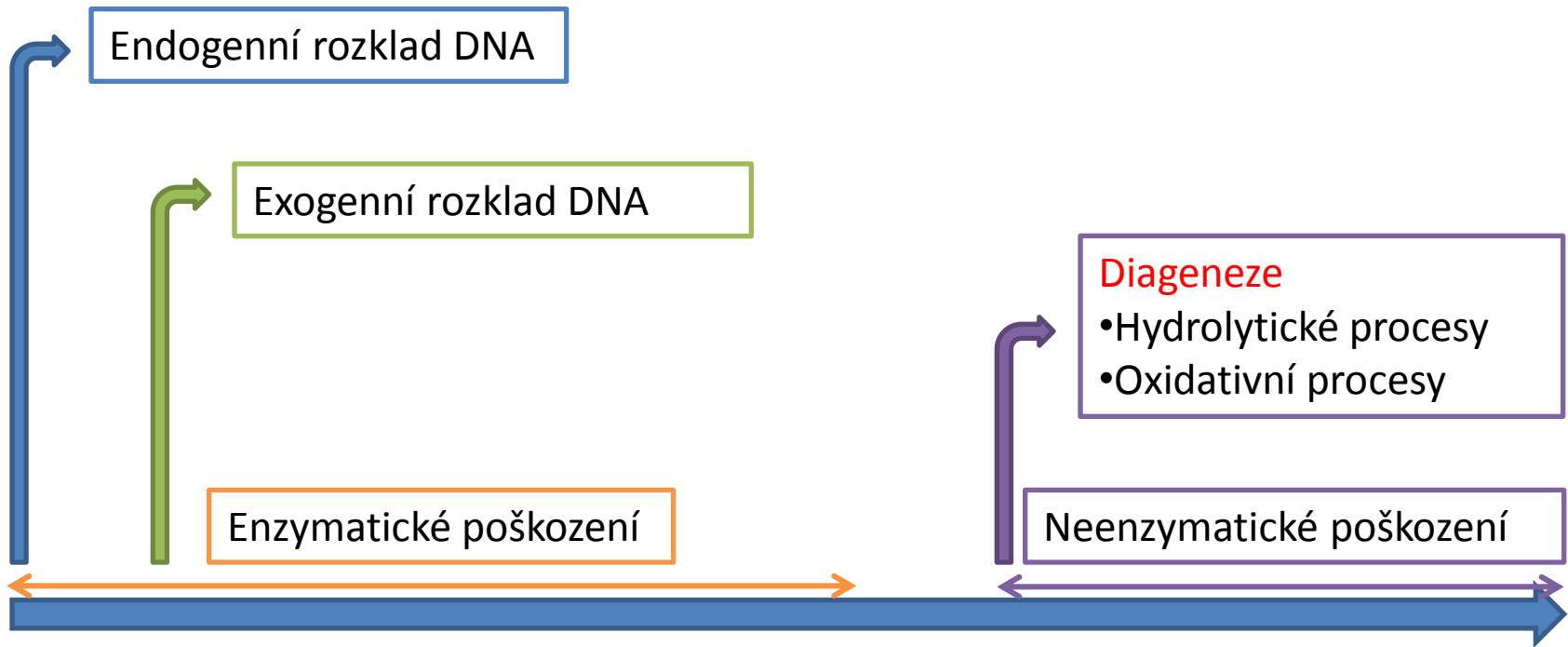
- Termín diagenese v antropologii a paleontologii popisuje změny, které se dějí na kosterním materiálu po úmrtí jedince
- Makroskopická
- Na úrovni prvků
- Chemické poškození organické i anorganické fáze
- Fossilizace



A) Postmortem poškození a faktory ovlivňující zachovalost DNA



Postmortem degradace DNA



A) Postmortem poškození a faktory ovlivňující zachovalost DNA



Postmortem degradace DNA během diagenese

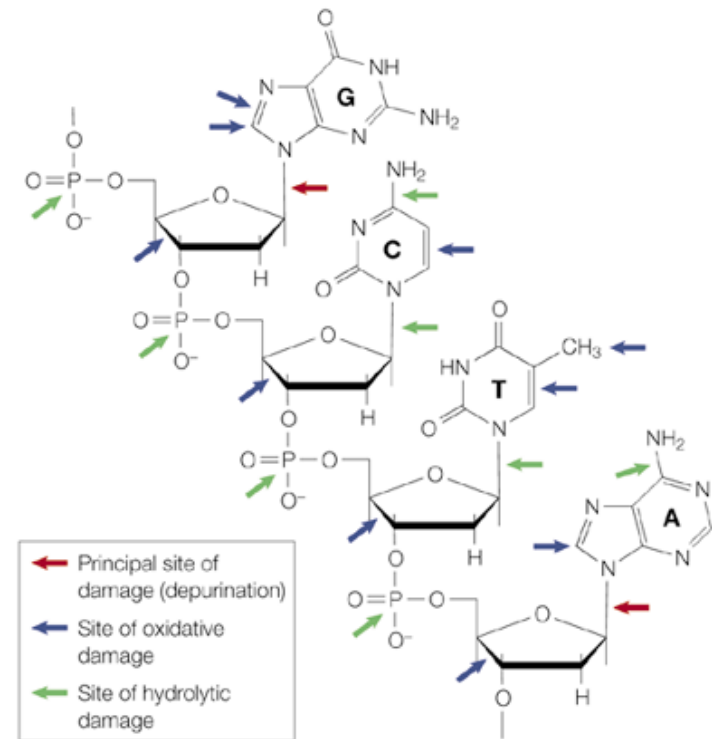
Poškození způsobeno výhradně vnějšími faktory: teplota a její stabilita, vlhkost, pH, expozice slunci...

Jedná se o **fyzikálně chemické** poškození **bez účasti enzymů**

Postihuje všechny části dvoušroubovice - fosfát, deoxribóza i nukleotidy

Nejčastěji se jedná o **hydrolytické** poškození způsobené vodou nebo **oxidativní** poškození následkem účinku volných radikálů.

Kombinací obou faktorů pak dochází k tzv. Maillardově reakci a vzniku cyklických sloučenin.

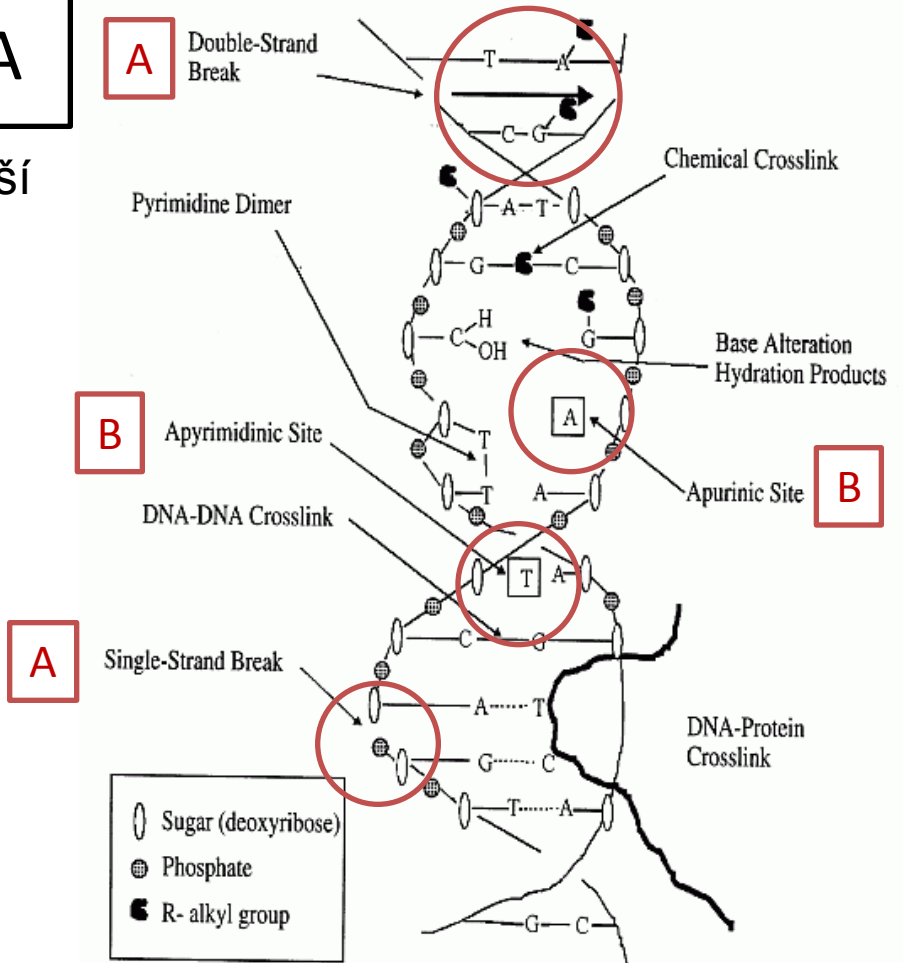


A) Postmortem poškození a faktory ovlivňující zachovalost DNA



Hydrolytické poškození aDNA

- Na tento typ poškození je nejnáchylnější **fosfodiesterová vazba** ve **fosfátové kostře**.
- Při jejím poškození vznikají **jednořetězcové zlomy (A)**, které dále vedou k fragmentaci řetězce aDNA.
- Dále hydrolytické poškození způsobuje rozpad vazby mezi **bází a fosfátovou kostrou**. Tímto způsobem vznikají **abazická místa (B)**, které negativně ovlivňují výslednou sekvenci – **POSTMORTEM MUTACE**



A) Postmortem poškození a faktory ovlivňující zachovalost DNA

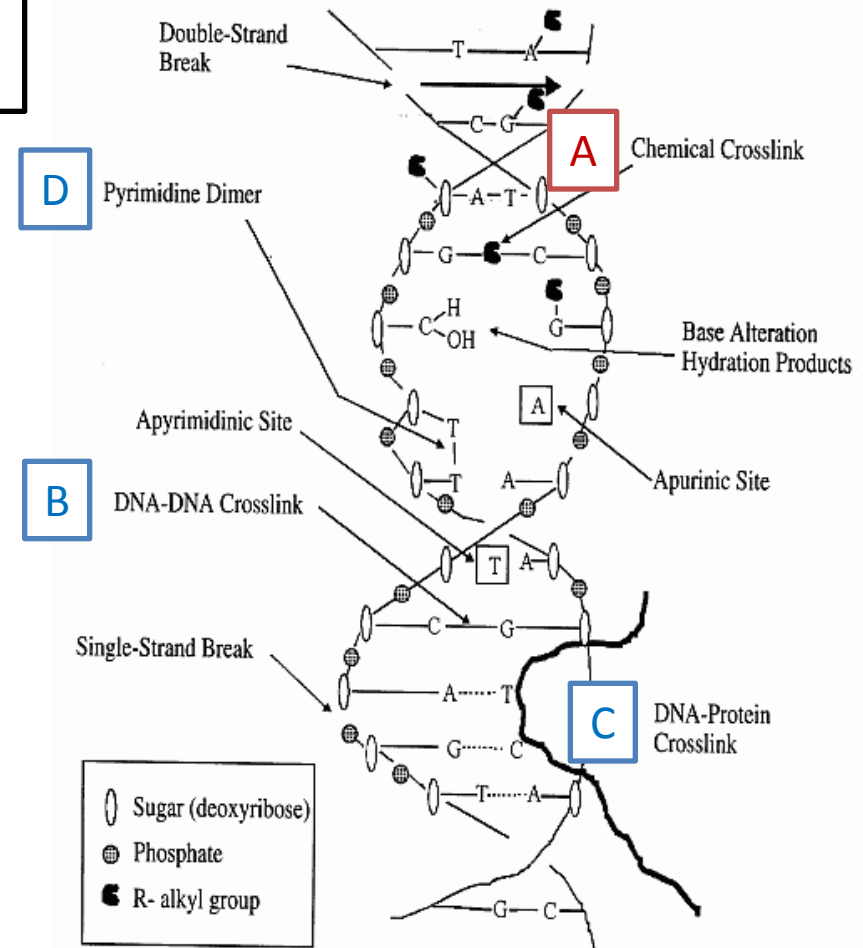


Oxidativní poškození aDNA

- Oxidativní poškození je způsobeno účinky **volných radikálů**, které vznikají zejména při UV záření.
- Cílem volných radikálů jsou puriny i pyrimidiny, což vede k **cyklické fragmentaci (A)**.

Maillardova reakce

- Je reakce mezi cukernou složkou a aminokyselinou v proteinu nebo DNA
- Vede ke tvorbě crosslinků – spojení řetězců DNA –DNA (B); protein – DNA (C), pyrimidinových dimerů (D)





Typy poškození na molekule aDNA

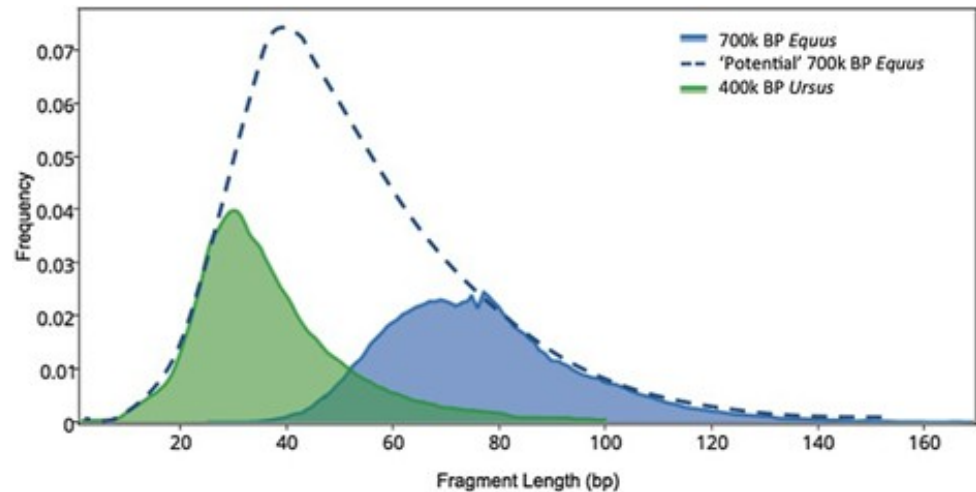
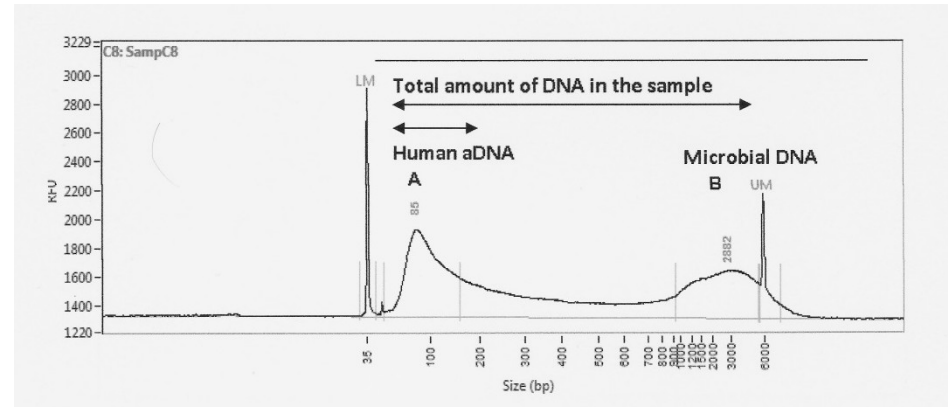
- Fragmentace molekuly DNA
- Blokace či inhibice PCR
- Post mortem mutace

A) Postmortem poškození a faktory ovlivňující zachovalost DNA



Fragmentace molekuly DNA

- Fragmentace DNA začíná již během autolýzy působením enzymů
- Největší vliv má dále hydrolytické poškození
- aDNA se zachovává v krátkých fragmentech – asi 50 až ~ 200 pb



Hofreiter *et al.*, 2015



Postmortem mutace

Při rozkladu a poškození aDNA nejčastěji dochází k deaminaci C > U; 5' methylcytosin > thymin, adenin nebo hypoxantin
Nejčastěji pozorovaná změna je tedy transice, ale dochází i substituci:

Typ 1: A > G

Typ 2: T > C – tento typ dominuje

Vlivem změny nukleotidu dojde při PCR k začlenění špatného nukleotidu a ke generování nepřesných dat.

Principu postmortem mutací ale může být využito i **verifikaci** původu molekuly aDNA, že se **nejedná o současnou DNA**

A) Postmortem poškození a faktory ovlivňující zachovalost DNA



Faktory ovlivňující zachovalost aDNA

- Faktory, které ovlivňují zachovalost aDNA souvisí s podmínkami nálezu a lze podle nich **predikovat zachovalost** molekuly.
- Lze rozdělit na negativní, které rozklad aDNA urychlují a pozitivní, které aDNA konzervují.
- Výrazně lze ovlivnit zachovalost aDNA po vyzvednutí tkáně z půdy, popř. jiného místa nálezu

A) Postmortem poškození a faktory ovlivňující zachovalost DNA



Negativní faktory:

Střídání teplot okolí

Vysoké teploty

Expozice povětrnostním podmínkám

Vysoký obsah organické složky půdy

Voda, vlhkost

Činnost člověka – zemědělská, stavební

Pozitivní faktory:

Nízká teplota prostředí nálezu

Rychlý rozklad těla po smrti

Vhodně zvolený postup exkavace

Skladování tkáně pro analýzu aDNA při nízkých teplotách (v mrazu)

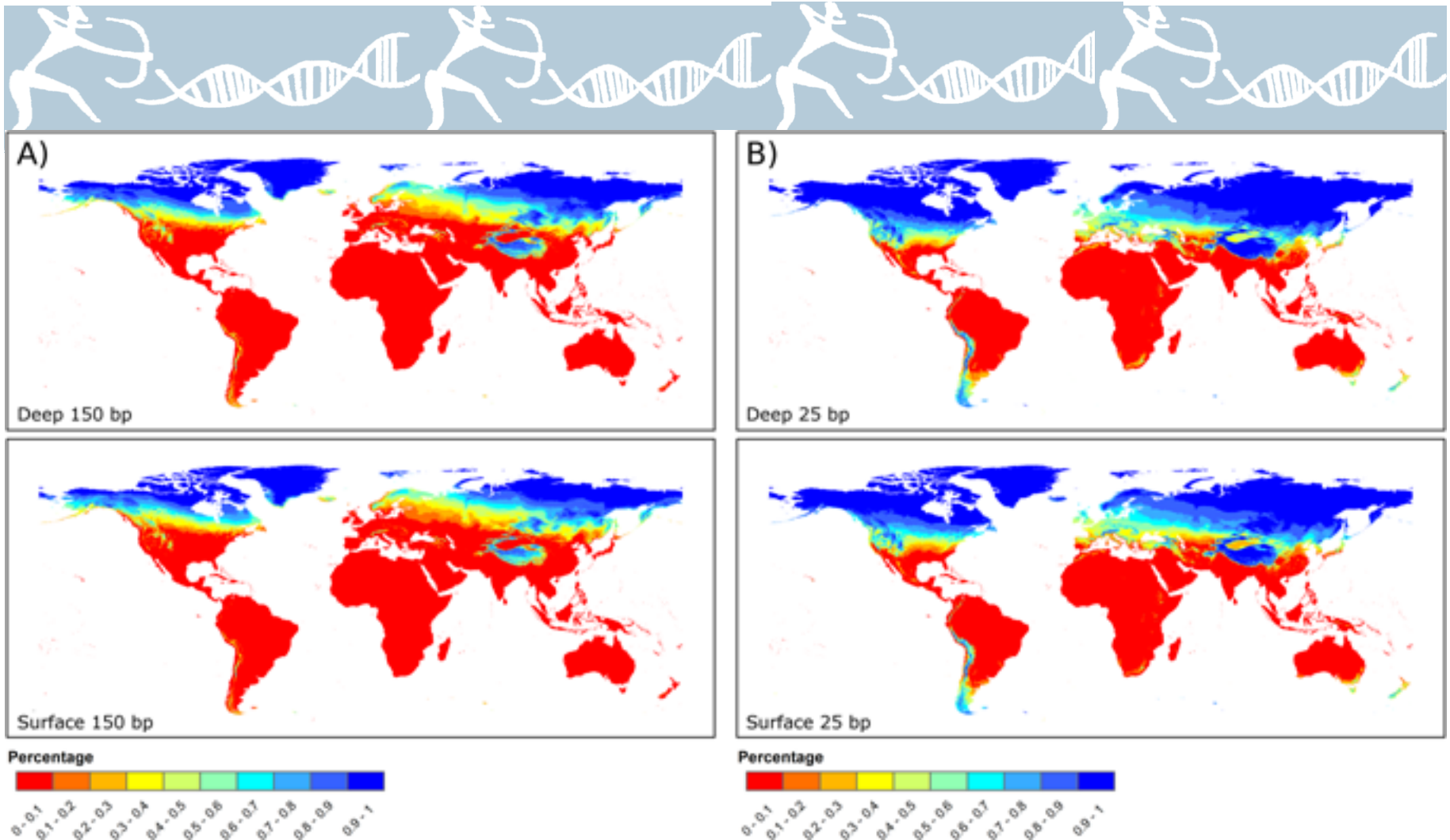
Vhodně zvolený typ tkáně

A) Postmortem poškození a faktory ovlivňující zachovalost DNA



			Autor
Preexkavační	Stáří nálezu		Pruvost <i>et al.</i> , 2007
	Teplota „thermal age“	Stabilní chladné prostředí pomáhá zachování aDNA, tzv. „thermal age“ udává stáří vzorku oproti průměrné teplotě v lokalitě, čím tepleji, tím rychleji DNA degraduje a vzorek stárne.	Burger <i>et al.</i> , 1999; Leonard <i>et al.</i> , 2000; Smith <i>et al.</i> , 2003; Chilvers, 2008; Lindahl <i>et Nyberg</i> , 1972
	Vlhkost	Voda rozpouští hydroxyapatit, na který je navázána DNA a dále způsobuje hydrolytické poškození vazeb v molekule DNA.	Salamon <i>et al.</i> , 2005
	Bakterie a dekompozitoři		Lindahl, 1993
	Typ a pH půdy		
Exkavační	Způsob exkavace		Pruvost <i>et al.</i> , 2007
	Délka exkavace	Kosterní pozůstatky ponechané na slunci jsou vystaveny UV záření, které zvyšuje obsah volných radikálů a ty způsobují oxidativní poškození.	Pruvost <i>et al.</i> , 2007
Postexkavační	Délka deponace	Bylo zjištěno, že kosterní materiál, který byl ihned po exkavaci uložen do mrazu, vykazuje sedmkrát vyšší úspěšnost amplifikace. U kosterního materiálu uloženého v depozitáři po dobu 57 let se nepodařilo získat vůbec žádnou DNA. Z toho vyplývá, že u deponovaných kostí je degradace sedmdesátkrát rychlejší než při perzistenci v půdě.	Pruvost <i>et al.</i> , 2007
	Teplota deponace	Udržovat stálou	Bollongino <i>et al.</i> , 2008
	Vlhkost deponace	Skladovat v suchu	Bollongino <i>et al.</i> , 2008
	Typ tkáně pro izolaci		King <i>et al.</i> , 2009

A) Postmortem poškození a faktory ovlivňující zachovalost DNA



Odhad zachovalosti aDNA po 10.000 letech, pro 150 bp fragmenty (A) a 25 bp fragmenty (B) (Hofreiter *et al.*, 2015)

A) Postmortem poškození a faktory ovlivňující zachovalost DNA



Predikce zachovalosti aDNA

- **Podmínky nálezu! Nutná spolupráce s archeology!**

- Zachovalost skeletu

Makroskopická – abraze, změna porozity, fragmentárnost materiálu, místo zdroje vzorku...

Mikroskopická – plísně, hydroxyapatit, struktura kostní tkáně....

- **Typ tkáně**

Zuby, dlouhé kosti, celková porozita kosti

- Racemizace aminokyselin

D a L-forma aminokyselin

Kys. asparagová (např. serin); vyrovnaní 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)

- **Rozpad aminokyselin**

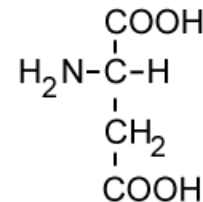
glycin, prolin, hydroxyprolin, alanin

- **Rozpad kolagenu**

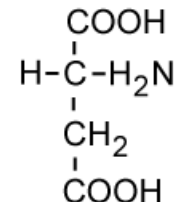
„thermal age“

- **Rozpad hydroxyapatitu**

přímoúměrný rozpadu kolagenu



L- Aspartic Acid



D - Aspartic Acid



Proč je tak těžké analyzovat aDNA?

Analýzy aDNA komplikuje a negativně ovlivňuje:

- A) Postmortem poškození a faktory ovlivňující zachovalost
- B) Inhibitory analýz**
- C) Kontaminace recentní DNA

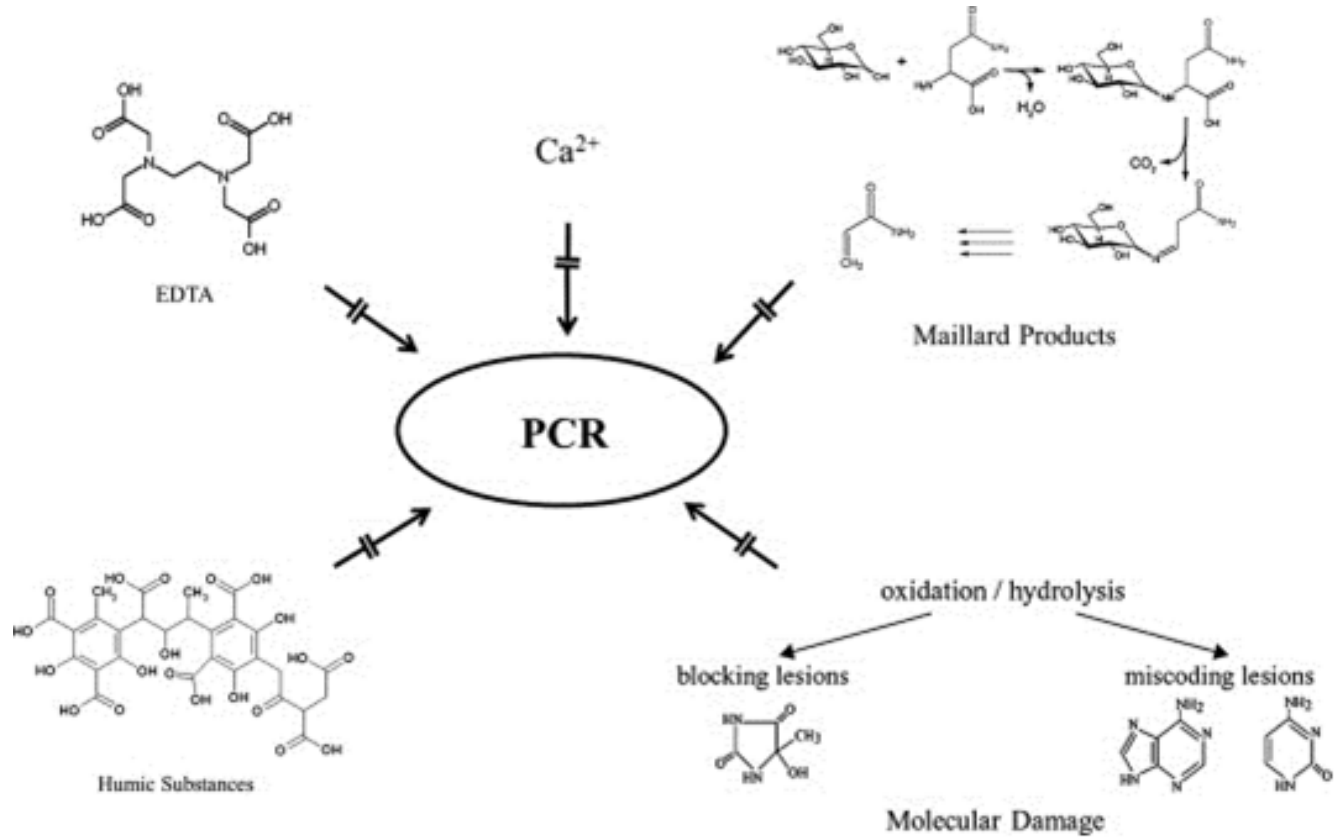
B) Inhibitory analýz



- Během analýzy aDNA dochází nejčastěji k inhibici PCR, ale nečistoty mohou negativně ovlivnit i další analýzy, například sekvenaci.
- Inhibitory na PCR působí tak, že buď zcela zastaví reakci nebo výrazně snižují její účinnost.
- Inhibitory jsou izolovány ze vzorku společně s DNA.
- Mezi hlavní inhibitory patří především **huminové kyseliny, fulvické kyseliny, tannin, hemanin, vápník atd.** (Sutlović *et al.*, 2007)
- Tyto látky se **vážou** buď na **Taq polymerázu** (Sutlović *et al.*, 2007) nebo na **templátovou DNA** či **primery**.
- PCR vůbec neproběhne, či je výrazně snížen výtěžek amplifikace.
- Pokud se inhibitory vážou na aDNA či primery, je průběh reakce závislý na teplotě nasedání primerů.

Inhibice se projeví tak, že PCR neproběhne nebo je přítomno mnoho nespecifických produktů a žádané amplikony jsou zkrácené.

B) Inhibitory analýz



B) Inhibitory analýz



Banotová, 2016

B) Inhibitory analýz



Inhibitor	Zdroj inhibitoru	Princip inhibice	Opatření	
Huminové kyseliny	Půda	Vazba na DNA i Taq polymerázu volnými řetězci	Navýšení množství Taq polymerázy v PCR, použití robustních mastermixů, použití hybridní Taq polymerázy. Ředění vzorků.	Sutlovič <i>et al.</i> , 2005;
Kolagen	Kostní tkáň	Vazba DNA a volnými řetězci	Působení proteinázy před purifikací	
Vápník	Kostní tkáň	Kompetuje s dvojmocnými ionty hořčíku při PCR	Důsledná dekalcifikace	Bickley <i>et al.</i> , 1996
Melanin	pigment přítomný v kůži a vlasech	Váže se na DNA		Giambernardi <i>et al.</i> , 1998
Tannin	V kůži a rostlinách	Tannin se váže přímo na Taq polymerázu		Kontanis <i>et al.</i> , 2006



Proč je tak těžké analyzovat aDNA?

Analýzy aDNA komplikuje a negativně ovlivňuje:

- A) Postmortem poškození a faktory ovlivňující zachovalost
- B) Inhibitory analýz
- C) Kontaminace recentní DNA

C) Kontaminace recentní DNA



- Významným nebezpečím pro věrohodnost analýz aDNA je zanesení **cizorodé DNA** do starobylého vzorku
- DNA může pocházet:
 - z mikroorganismů osídlujících kostní tkáň
 - z půdy (rostliny, houby, spodní voda, hnojiva....)
 - lidská DNA, která byla do vzorku zanesena manipulací se skeletem (technici, archeologové, antropologové...)
- Recentní DNA je lépe zachovalá a proto se do následných reakcí jako je PCR zapojuje mnohem ochotněji než poškozená aDNA (Dongya *et* Watt, 2005).
- **Může dojít k hodnocení falešně pozitivních výsledků a ke špatné interpretaci historických dat!**

Aby se minimalizovalo nebezpečí znehodnocení vzorku, je vypracován systém protikontaminačních opatření.

C) Kontaminace recentní DNA



- Vzorky mohou být zasaženy DNA všech pracovníků, které s nimi přišli do kontaktu (Eshleman *et al.*, 2001; Hummel *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003)
- Důležitý je i vhodný výběr vzorku. Lidské kosti jsou obecně poréznější než zuby a tudíž i náchylnější na zanesení cizorodé DNA (Oota *et al.*, 1995; Drancourt *et al.*, 1998). Také s narůstající mírou rozkladu a porosity kosterní tkáň roste nebezpečí kontaminace (Gilbert *et al.*, 2005).
- Vzhledem k destruktivitě odběru tkáň pro analýzy aDNA by vzorek neměl být určen pro morfologické, metrické či paleopatologické analýzy (DeGusta *et al.*, 1996). Laboratoře určené pro analýzu aDNA musí být speciálně koncipovány.

	Zdroj kontaminace	Opatření	Autor
Preekavační	Hnojení	Výběr vhodného materiálu Analýza kosterního materiálu ze stejné lokality, který není humánního původu	Falková, 2012
	Dlouhodobě intenzivně osídlená plocha	Výběr vhodného materiálu Analýza kosterního materiálu ze stejné lokality, který není humánního původu	Falková, 2012
	Kulturní jáma, septik, apod.	Výběr vhodného materiálu Analýza kosterního materiálu ze stejné lokality, který není humánního původu	Falková, 2012
	Mikroorganismy	Specifické primery	Handt <i>et al.</i> , 1994
Exkavační	Archeologové	Ochranné pomůcky (rukavice, roušky, kombinéza, pokrývka hlavy) Čistě exkavační nářadí pro jednotlivé skelety Zamezení pohybu dalších osob v okolí místa práce Genetický profil pracovníků	Bollongino <i>et al.</i> , 2008.
Postekavační	Antropologové	Kostní materiál neumývat, nechat obalený zeminou, odebrat před omytím segment pro analýzu aDNA Genetický profil pracovníků	Willerslev <i>et al.</i> , 2005
	Molekulární biolog	Genetický profil pracovníků Ochranné pomůcky (rukavice, roušky, kombinéza, pokrývka hlavy) Obrázek 1 Pracovnice LBMA při odběru vzorků kostí určených pro analýzu aDNA	Willerslev <i>et al.</i> , 2005
	Spotřební materiál	Spotřební materiál v DNA-free kvalitě	
	Chemikálie	Rozalíkování reagentů na menší objem	
	Prostředí laboratoře	Oddělené laboratoře pro izolaci, amplifikaci a postamplifikační analýzy Manipulace s aDNA pouze ve flow boxu Místnost dekontaminovat UV zářením Uzavřená cirkulace vzduchu v laboratoři	Willerslev <i>et al.</i> , 2005
	Pracovní prostor	Separované zpracování jednotlivých vzorků Před prací veškeré pracovní plochy očistit	Willerslev <i>et al.</i> , 2005

C) Kontaminace recentní DNA



- Ani při dodržení všech doporučených opatření nelze vyloučit cizorodou kontaminaci recentní DNA!
- Výsledky analýz aDNA je nutno podrobit celé škále [autentifikačních kroků](#):
- Doporučuje se již v terénu odebrat kost z jiného živočišného druhu, analyzovat ji na lidské markery (Hardy *et al.*, 1995; Poinar *et al.*, 2003).
- Během všech kroků analýzy jsou spolu se vzorky DNA z kostí analyzovány i tzv. slepé kontroly (blank controls, no template controls - NTC)
- Opakovat analýzu z anatomicky nezávislých vzorků (Hofreiter *et al.*, 2001).
- Opakovat analýzu na dalším pracovišti.
- Kriticky hodnotit koncentraci aDNA v izolátu a míru její degradace (Handt *et al.*, 1994).
- Stanovit genetický profil všem pracovníkům, kteří s kosterním materiálem pracovali nebo se pohybují v prostoru laboratoří a tyto profily porovnat s výsledky analýz aDNA.
- Výsledky analýz uvést do kontextu s datací pomocí ^{14}C , podmínkami naleziště, možnými zdroji kontaminace a do historických souvislostí (Bollongio *et al.*, 2008).