



Bi5130 Základy práce s lidskou aDNA

Mgr. et Mgr. Kristýna Brzobohatá

brzobohata@sci.muni.cz

Laboratoř biologické a molekulární antropologie,
ÚEB, PřF, Mu



aDNA a fenotypování

- 1) Určení pohlaví ze vzorků aDNA
- 2) Fenotypy zodpovědné za vzhled
- 3) Fenotypy jako nástroj přizpůsobení dietních změn

aDNA a určování příbuzenství

- 1) Stanovení STR profilu z aDNA
- 2) Stanovení Y haplotypu z aDNA



aDNA fenotypování

„**Fenotyp** je soubor všech **pozorovatelných vlastností** a znaků živého organismu. Představuje výsledek spolupůsobení genotypu, epigenetiky a prostředí.

- Určení fenotypu z aDNA má význam pro studii selekce na tyto znaky, které jsou často výsledkem adaptačních procesů.
- Pro studii fenotypu z aDNA jsou vhodné tzv. „externally visible characteristics“ (EVCs) – tedy vzhledové vlastnosti jako je například pigmentace (barva očí, vlasů a pokožky, plešatost...) a metabolické dráhy, které umožnily vyrovnat se s měnící se dietou příslušníků rodu *Homo*.

Fenotypové analýzy aDNA vycházejí především z poznatků, které byly získány z dat tzv. **WGA studií – asociačních studií** (např. multifaktoriální onemocnění s genetickými predispozicemi) a **výzkumů pro forenzní využití**.

- TLR
- SPAG17
- TTF1
- RPTN
- CAN15
- FOXP2
- Microcephalin
- ...



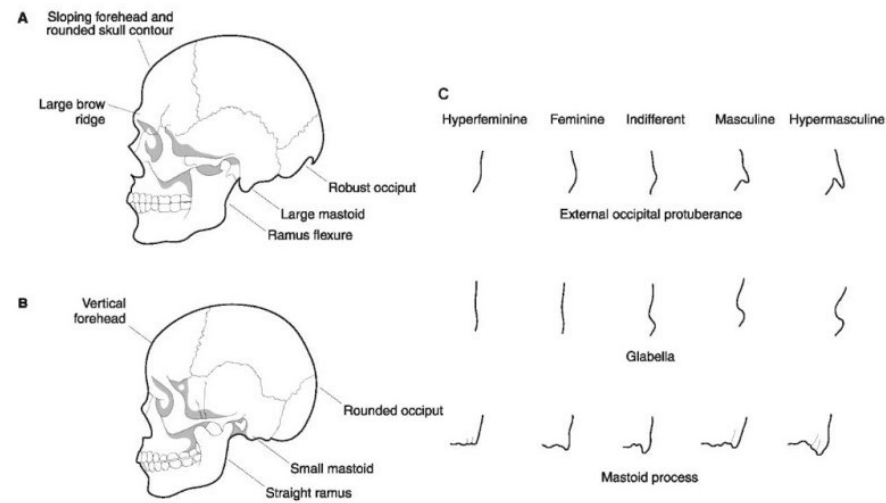
Určení pohlaví u vzorků aDNA - antropologické určení pohlaví – limity

Určování pohlaví patří mezi základní antropologické charakteristiky, nejčastěji se pro tento účel využívají znaky a rozměry na **pánvi a lebce**.

Určení pohlaví použitím klasických antropologických metod u dobře zachovaného skeletu pánve dosahuje přesnosti okolo 95%, u dětských a nedospělých jedinců **50%**.

Přesnost antropologického určení pohlaví **závisí** na:

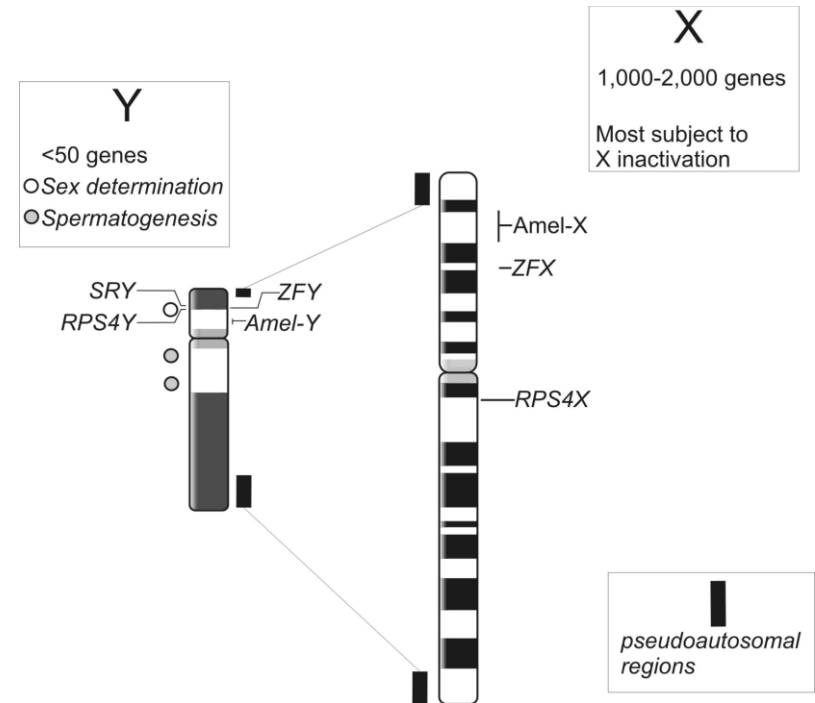
- zachovalosti materiálu
- na věku jedince
- zdravotním stavu daného jedince
- na populační příslušnosti
- individuální míře exprese pohlavních znaků





Určení pohlaví u vzorků aDNA – Gen pro amelogenin

- **Amelogenin** kóduje hlavní protein zubní skloviny.
- Lidský gen pro amelogenin má dvě kopie - jednu na X a druhou na chromozomu Y.
- K určení pohlaví se využívá **rozdíly v délce sekvencí na chromozomech X a Y**, delece 6 bp v prvním intronu genu pro amelogenin na X chromozomu.
- PCR produkty z obou chromozomů se pak liší svou délkou:
- **X chromozomu = 106 bp, Y chromozom = 112 bp.**





Určení pohlaví u vzorků aDNA

– Gen pro amelogenin

Z mužské DNA se získají dva produkty (dlouhé 106 a 112 bp), z ženské DNA dva produkty stejné délky 106 bp, které se po elektroforetické separaci projeví jako jeden proužek.

Tento test je však náchylný na alelový drop out a přednostní amplifikaci kratšího produktu.

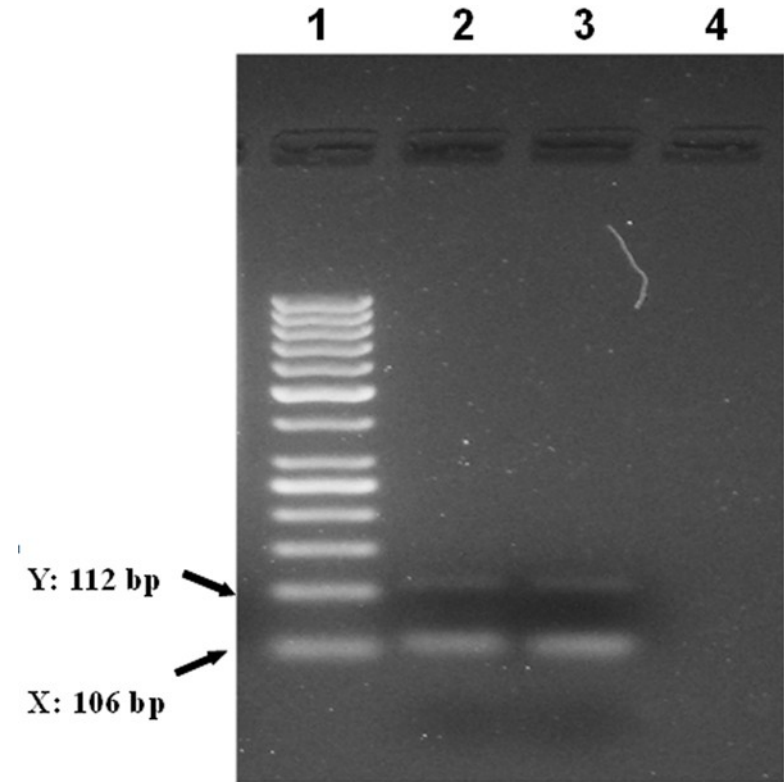


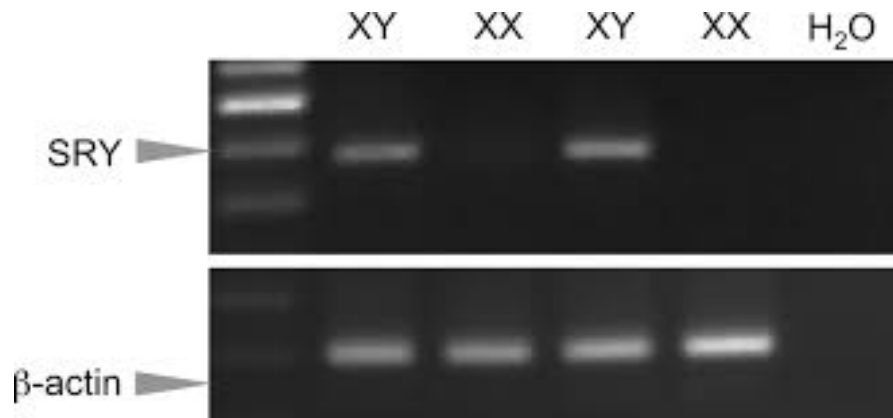
Figure 4 Sex determination based on amelogenin amplification (Amel A/B) in male and female fossil bones. Amel A/B indicate PCR fragments specific to female 106 bp and male 106/112 bp. Agarose gel electrophoresis of PCR products male and female DNA templates. Lanes 1-4, Lane 1, 50 bp ladder size standard marker, Lane 2 male and lane 3 female, Lane 4 negative control water blank



Určení pohlaví u vzorků aDNA – Gen pro SRY

Gen SRY (Sex-determining Region Y; TDF – Testis Determining Factor)

- Leží na krátkém raménku Y chromozomu (Yp 11.3).
- Gen SRY produkuje transkripční faktor regulující vývoj samčích pohlavních znaků (Delbridge, Graves 1999; Hammer, Zegura 1997).
- Mužskou DNA identifikujeme přítomností PCR produktu, u ženské DNA produkt není přítomen.
- Při použití SRY markeru nelze rozlišit, zda se při nepřítomnosti PCR produktu jedná o ženskou DNA nebo zda došlo k selhání PCR.





Určení pohlaví u vzorků aDNA – metodický přístup

1) PCR - singleplex PCR a následná vizualizace pomocí gelové elektroforézy + modifikace PCR, např. nested PCR

2) Real time qPCR

Vhodná pro oba lokusy – SRY i amely, především za využití duálně značených sond specifických pro cílovou sekvenci

3) Komerční kity pro forenzní účely

Kity jsou určeny primárně pro kvantifikaci DNA ze vzorku (stopy) a stanovení poměru mužské a ženské DNA ve směsných vzorcích. Citlivost reakce cca 30 pg, součástí bývá i interní kontrola, která detekuje případnou inhibici.

Při volbě kitu je nutno zohlednit:

- Typ fluoroforů
- Kompatibilitu s dostupným cyklem
- Délku cílové sekvence
- Cenovou dostupnost





EVCs a aDNA

Pigmentace – Původ, příčina a datace vzniku nejsou dosud přesně zjištěny, s nejvyšší pravděpodobností vznikla světlá pigmentace (především pokožka) jako adaptace na menší množství UV záření ve vyšších zeměpisných šířkách, jako reakce na nedostatečnou syntézu vitamínu D.

Světlá pleť u AMČ vznikla před 11 000 – 19 000 lety.

MCR1 – Prvním analyzovaným lokusem v souvislosti s pigmentací byl gen MCR1, který je zodpovědný za světlé zbarvení srsti u savců. Lalueza – Fox *et al.*, 2007 zjistili, že tento gen byl patrně neaktivní u neandrtálců, což vedlo k zrzavým vlasům a světlé pleti.

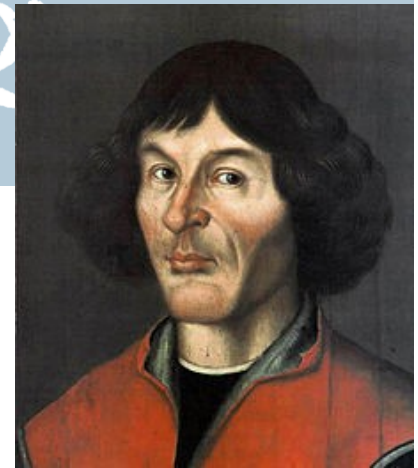
Mezi neandrtálci byla variabilita barvy pleti, například jedinci z Chorvatska měli pleť tmavší než současní Evropané (Beleza *et al.*, 2012)



EVCs a aDNA

Barva očí – Nejjednodušeji určitelný EVC na základě genetické analýzy, barva očí může být s přesností na 0.93 – 0.91 určena analýzou **6 SNP** v genech zapojených do syntézy pigmentu melaninu (Liu *et al.*, 2009):

rs12913832	HECR2
rs1800407	OCA2
rs12896399	SLC24A4
rs16891982	SLC45A2
rs1393350	TYR
rs12203592	IRF4



EVCs a aDNA – metodické přístupy

1) Na principu PCR

Pro získání většího množství výsledků jednotlivých SNP bylo nutné PCR multiplexovat. Následovalo buď štěpení restrikcími enzymy nebo sekvenace. Hojně využívanou modifikací PCR pro detekci SNP u aDNA byla

MULTIPLEX PCR SINGLE BASE EXTENSION – SNsP Shot (Bouakaze et al., 2009).

S multiplex PCR se pojí řada problémů:

- Nespecifická vazba primerů
- Alelový drop out
- Preferenční amplifikace krátkých fragmentů
- **Náročná na optimalizaci!**

Bogdanowitz et al., 2009

KOMERČNĚ DOSTUPNÉ KITY

IrisPlex – 6 SNP zodpovědných za barvu očí

HirisPlex - 24 SNP zodpovědných za barvu očí a vlasů

Table. 1. Genotype frequencies (%) at rs12913832 of *HERC2* vs. iris color

Eye color	rs12913832 genotype		
	C/C	C/T	T/T
Blue/gray	83.5	15.8	10.5
Green	13.5	10.1	5.3
Hazel	3.0	46.8	47.4
Brown/black	0	27.3	36.8

N = 388; data from ref. 8



Komerční kity jsou vhodné zejména pro lépe zachovalé vzorky aDNA:

- Doporučené vstupní množství aDNA je 60 pg
- Produkty PCR mají délku okolo 150 pb – riziko alelového drop outu

IrisPlex a aDNA

HirisPlex a aDNA

Barrini *et al.*, 2013 – analýza SNP u 26 muzejních exponátů, včetně generála Wladyslawa Sikorski (1881 – 1943)

Gene	SNP	Allele	No. of Alleles
<i>HERC2</i>	rs12913832	T	0 1 2 NA
<i>OCA2</i>	rs1800407	A	0 1 2 NA
<i>SLC24A4</i>	rs12896399	T	0 1 2 NA
<i>SLC45A2</i>	rs16891982	C	0 1 2 NA
<i>TYR</i>	rs1393350	T	0 1 2 NA
<i>IRF4</i>	rs12203592	T	0 1 2 NA

Gene	SNP	Allele	No. of Alleles
<i>MC1R</i>	rs86insA	A	0 1 2 NA
<i>MC1R</i>	rs11547464	A	0 1 2 NA
<i>MC1R</i>	rs885479	T	0 1 2 NA
<i>MC1R</i>	rs1805008	T	0 1 2 NA
<i>MC1R</i>	rs1805005	T	0 1 2 NA
<i>MC1R</i>	rs1805006	A	0 1 2 NA
<i>MC1R</i>	rs1805007	T	0 1 2 NA
<i>MC1R</i>	rs1805009	C	0 1 2 NA
<i>MC1R</i>	Y152OCH	A	0 1 2 NA
<i>MC1R</i>	rs2228479	A	0 1 2 NA
<i>MC1R</i>	rs1110400	C	0 1 2 NA
<i>SLC45A2</i>	rs28777	C	0 1 2 NA
<i>SLC45A2</i>	rs16891982	C	0 1 2 NA
<i>KITLG</i>	rs12821256	G	0 1 2 NA
<i>EXOC2</i>	rs4959270	A	0 1 2 NA
<i>IRF4</i>	rs12203592	T	0 1 2 NA
<i>TYR</i>	rs1042602	T	0 1 2 NA
<i>OCA2</i>	rs1800407	A	0 1 2 NA
<i>SLC24A4</i>	rs2402130	G	0 1 2 NA
<i>HERC2</i>	rs12913832	T	0 1 2 NA
<i>ASIP</i>	rs2378249	C	0 1 2 NA
<i>SLC24A4</i>	rs12896399	T	0 1 2 NA
<i>TYR</i>	rs1393350	T	0 1 2 NA
<i>TYRP1</i>	rs683	G	0 1 2 NA



EVCs a aDNA – metodické přístupy

2) Na principu NGS

Pro fenotypování byly použity data jak získána shotgun sekvenováním (Ötzi), tak i enrichment obohacováním (Denisované). Druhý přístup je vhodnější z toho důvodu, že generuje high coverage data.

<http://www.illumina.com/areas-of-interest/forensic-genomics.html>

[Genomics Proteomics Bioinformatics](#). 2014 Oct; 12(5): 190–197.
Published online 2014 Oct 14. doi: [10.1016/j.gpb.2014.09.001](https://doi.org/10.1016/j.gpb.2014.09.001)

PMCID: PMC4411420

Application of Next-generation Sequencing Technology in Forensic Science

[Yaran Yang](#),¹ [Bingbing Xie](#),^{1,2} and [Jiangwei Yan](#)^{1,*}

[Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ►

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

Abstract

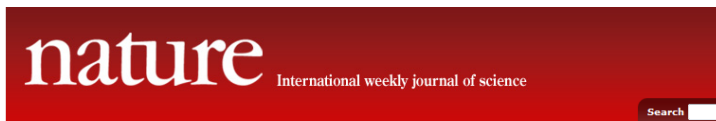
[Go to:](#)

Next-generation sequencing (NGS) technology, with its high-throughput capacity and low cost, has developed rapidly in recent years and become an important analytical tool for many genomics researchers. New opportunities in the research domain of the forensic studies emerge by harnessing the power of NGS technology, which can be applied to simultaneously analyzing multiple loci of forensic interest in different genetic contexts, such as autosomes, mitochondrial and sex chromosomes. Furthermore, NGS technology can also have potential applications in many



Další příklady analýzy EVCs u aDNA

- Plešatost; typ ušního mazu, BMI a hustota minerálů (Rasmussen *et al.*, 2010)
Palaeo - Eskymo – Saaqquq
- Ötzi (Keller *et al.*, 2012)
<https://www.youtube.com/watch?v=t8LccobbMtc>



Journal home > Archive > Article > Full Text

Journal content
• Journal home
• Advance online publication
• Current issue
• Nature News
• Archive
• Supplements
• Web focuses
• Podcasts
• Videos
• News Specials

Journal information
• About the journal

Article

Nature 463, 757-762 (11 February 2010) | doi:10.1038/nature08835 | Received 30 November 2009; Accepted 18 January 2010

Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo

Morten Rasmussen^{1,2,25}, Yingrui Li^{2,25}, Stinus Lindgreen^{1,4,25}, Jakob Skou Pedersen², Anders Albrechtsen², Ida Moltke², Mait Metspalu², Ene Metspalu², Toomas Kivisild^{2,5}, Ramneek Gupta², Marcelo Bertalan², Kasper Nielsen², M. Thomas P. Gilbert^{1,2}, Yong Wang², Maanasa Raghavan^{1,2}, Paula F. Campos¹, Hanne Munkholm Kamp^{1,2}, Andrew S. Wilson¹⁰, Andrew Gledhill¹⁰, Silvana Tridico^{11,12}, Michael Bunce¹², Eline D. Lorenzen², Jonas Binladen¹, Xiaosen Guo^{2,3}, Jing Zhao^{2,3}, Xiuqing Zhang^{2,3}, Hao Zhang^{2,3}, Zhuo Li^{2,3}, Minfeng Chen^{2,3}, Ludovic Orlando¹³, Karsten Kristiansen^{2,3,4}, Mads Bak¹⁴, Niels Tommerup¹⁴, Christian Bendixen¹⁵, Tracey L. Pierre¹⁵, Bjarne Grønnow¹⁷, Morten Meldgaard¹⁸, Claus Andreasen¹², Sardana A. Fedorova^{2,20}, Ludmila P. Osipova²¹, Thomas F. G. Higham², Christopher Bronk Ramsey¹⁰, Thomas v. O. Hansen²², Finn C. Nielsen²², Michael H. Crawford²³, Søren Brunak^{2,24}, Thomas Sicheritz-Pontén², Richard Villems², Rasmus Nielsen^{2,8}, Anders Krogh^{2,4}, Jun Wang^{2,3,4} & Eske Willerslev^{1,2}



ARTICLE

Received 28 Oct 2011 | Accepted 24 Jan 2012 | Published 28 Feb 2012

DOI:10.1038/ncomms1701

New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing

Andreas Keller^{1,2,*}, Angela Graefen^{3,*}, Markus Ball^{4,*}, Mark Matzas⁵, Valesca Boisguerin⁵, Frank Maixner³, Petra Leidinger¹, Christina Backes¹, Rabab Khairat⁴, Michael Forster⁶, Björn Ståde⁶, Andre Franke⁶, Jens Mayer¹, Jessica Spangler⁷, Stephen McLaughlin⁷, Minita Shah⁷, Clarence Lee⁷, Timothy T. Harkins⁷, Alexander Sartori⁷, Andres Moreno-Estrada⁸, Brenna Henn⁸, Martin Sikora⁸, Ornella Semino⁹, Jacques Chaharon¹⁰, Siiri Roots¹¹, Natalie M. Myres¹², Vicente M. Cabrera¹³, Peter A. Underhill¹³, Carlos D. Bustamante⁸, Eduard Egarter Vigli¹⁴, Marco Samadell¹³, Giovanna Cipollini¹³, Jan Haas¹⁵, Hugo Katus¹⁵, Brian D. O'Connor^{16,17}, Marc R.J. Carlson¹⁸, Benjamin Meder¹⁵, Nikolaus Blin^{4,19}, Eckart Meese¹, Carsten M. Pusch⁴ & Albert Zink³



Další příklady analýzy EVCs u aDNA

- BMI a hustota minerálů v kostech (Fromm-Dornieden *et al.*, 2012): *FTO* gen, ovlivňuje obezitu a objem tuku, nejčastěji spojovaný SNP - rs9939609 A, jedna STR a tři SNP byly spojeny s oběma těmito znaky u koster ze 14. století, potenciál pro výzkum genetické predispozice pro přežívání hladomoru
- ABO

Int J Legal Med (2002) 116:327–333
DOI 10.1007/s00414-002-0315-x

ORIGINAL ARTICLE

Susanne Hummel · Diane Schmidt · Melanie Kahle
Bernd Herrmann

ABO blood group genotyping of ancient DNA by PCR-RFLP

Received: 12 September 2001 / Accepted: 7 May 2002 / Published online: 23 October 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract The paper presents a PCR-RFLP-based method to determine ABO blood groups at the genotype level. In order to ensure the applicability of the method to severely degraded DNA, new sets of primers were designed that

Keywords ABO blood group genotyping · PCR-RFLP · Degraded DNA · Ancient DNA · Bone · Teeth



Fenotypy podléhající selekčním a evolučním tlakům vyvolaných změnou prostředí

6 mil. let

65 000 let

10 000 let

První hominidé

Osídlování *Homo erectus*:
Tepelná příprava pokrmů

Osídlování Země AMČ:
Klimatické změny

Neolitizace:
Změna stravy
Usedlý způsob života
Domestikace
Populační exploze

- Výzkum složení stravy a adaptací na ni slouží k rekonstrukci života a prostředí předchůdců člověka
- Před 6 mil lety se začala měnit dieta hominidů vedoucí k hominizaci – nárůst masa a škrobu v potravě, vaření, neolitizace, což vedlo k rozvoji mozku, redukci velikosti stoliček a žvýkacího aparátu, „out of Africa“, ale i společenským změnám – usedlý život, párové soužití.
- Nejlépe jsou hodnotitelné změny mladší než 600 000 - 2 linie: 1) směřující k neandrtálců a Denisovanům a 2) k AMČ.



Vztah fenotypu a změny složení stravy je poměrně jednoduchý – většinou se mění specifická funkce enzymů zapojených do digesce cílových substrátů nebo vnímání chuti.

Ke změně funkce genu může dojít buď jeho umlčením, **změnou aktivity** či **změnou substrátu**:

- Vytvořením STOP nebo alternativního START kodonu
- Exon/Intronovým alternativním sestřihem
- Nonsynonymní mutací
- Změnou čtecího rámce

Vlivem mutací dojde buď ke **zvýhodnění** nebo **znevýhodnění** daného fenotypu v prostředí.

S měnícími se prostředím mohou být rozdílné fenotypy pod rozdílným selekčním tlakem.



MYH 16 – Sarkomerní myosin

Je exprimován zejména ve žvýkacím aparátu primátů, člověk nese delecii 2 pb, která vede k předčasnému stop kodonu (Stedman et al., 2004) a výrazné **redukci** především **temporálních svalů**. Tato adaptace se rozvila patrně s používáním ohně (Wrangham et Coklin, 2003) a je stará cca 1,9 mil roku. Neandrtálec i Denisované již měli humánně specifickou delecii 2 pb v 18. exonu.

Skupina TAS genů

Tas geny kódují receptory pro vnímání hořké chuti. U genů TAS2R62 a TAS2R64 není substrát znám, u TAS2R38 je substrátem PTC. U velkých primátů (kromě orangutana) se nacházejí specifické STOP kodony, které jsou reakcí na změnu stravy. U člověka se pak v genu TAS2R38 nacházejí 3 SNP, kde jejich polymorfismus vyvolává nevnímavost k hořké chuti. Zdá se, že tyto alely jsou pod velmi slabým selekčním tlakem, ale faktor není stále objasněn.

Schopnost štěpení škrobu v potravě slinnou amylázou

Aktivita slinné amylázy koreluje s počtem kopií genu AMY1, který ji kóduje. U recentního člověka počet je kopií u jednotlivých kultur závislý na způsobu obživy. Perry *et al.* 2015 porovnal recentní data s výsledky NGS neandrtálce a Denisovana – oba měli počet opakování AMY1 genu podobný jako současní šimpanzi (1,83 a 1,76 / diploidní genom), což naznačuje, že adaptace se vyvinula nedávno, ale ještě před neolitizací (Lazaridis *et al.*, 2014).



Laktázová perzistence

- Umožňuje trávení laktózy v dospělosti na galaktóza + glukóza.
- Laktáza je enzym laktáza-phlorin hydroláza, je kódována genem LCT, ale na perzistenci mají vliv SNP v regulační oblasti.
- Nejčastějším evropským polymorfismem je C/T(-13910) = rs4988235, T - lak. Tolerance a G/A(-22018) = rs182549 (<https://www.snpedia.com>) G - lak. Intolerance.
- Laktázová perzistence se vyvinula minimálně u 5 populací nezávisle (Krüttli *et al.*, 2014):

například **Haplotyp A** - T(-13910) váže TF Oct-1 (Ingram *et al.*, 2007)

Afrika – G/C(-14010), T/G(-13915), C/G(-13907) (Tishkoff *et al.*, 2007)

Blízký východ – T/G(-13915), T/C(-3712) (Enattah *et al.*, 2008)

Tibet – G/A(-13838), T/A(-13906), C/T(-13908) (Peng *et al.*, 2012)

Selekce - 2 hypotézy

1. Životní styl spjatý s konzumací mléka měl přímý vliv na selekci. (Gerbault *et al.*, 2011)
2. Životní styl spjatý s konzumací mléka měl nepřímý vliv na selekci. (Gerbault *et al.*, 2011)



Laktázová perzistence a DNA

T(-13910)

Neolit (8000-5000 př. n. l.) - obtížná detekce

- zastoupení LP do 30% (Krüttli *et al.*, 2014)

1200 n. l. - LP na území dnešního Německa 72% (71-80% v současném Německu a Rakousku) (Krüttli *et al.*, 2014)

Selekce pravděpodobně proběhla mezi 3000 př. n. l. - 1200 n. l. ještě před epidemií moru (Černá smrt) v 14. století. (Krüttli *et al.*, 2014)

C/G(-13907), C/T(-13910), T/C (-13913), T/G(-13915) - Sanger

Deaminace C – falešně pozitivní výsledky → použití **Phusion** místo **Taq** při PCR (Krüttli *et al.*, 2014)



aDNA a určování příbuzenství

- Rodina je základní sociální jednotka téměř všech lidských společností.
- Její pojetí se v rámci různých kultur i v historii mění.
- Podstata pojetí rodiny zasahuje do sociálních, právních, politických, náboženských i kulturních vztahů a zároveň je jimi i ovlivňována.
- Studium příbuzenských vazeb v historii a jejich interpretace je cílem celé řady vědních oborů, jako je genealogie, lingvistika či antropologie.
- Definice příbuzenství není jednoznačná a její výzkum v historii je často zatížen jeho současným vnímáním rodiny (Johnson *et* Paul, 2006).
- V Západní kultuře se již od 11. století nejvíce uplatňuje genealogický model rodiny, který je založený na sdíleném genetickém základu příbuzných a rozrůstání rodiny se přirovnává ke košatění stromu (Klapish – Zuber, 1991).



Zkoumání příbuzenství ze starobylé DNA se zaměřuje na:

- Individuální identifikaci kosterních pozůstatků (Bogdanowicz et al., 2009; Malmstrom et al., 2012)
- Dohledávání potomků či příbuzných v současnosti (Haas *et al.*, 2009).
- Rekonstrukci procesů pohřbívání a pohřebního ritu (Baca et al., 2012; Haak *et al.*, 2008)
- Formaci pohřebiště (Dudar *et al.*, 2003; Bouwman *et al.*, 2003),
- Identifikace příbuzenské struktury naleziště (Dudar *et al.*, 2003).

Příbuzenství lze určovat mezi skelety ve společném hrobě (Ricaud *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2015) nebo rámci pohřebiště (Dudar *et al.*, 2003).

Použité markery pro stanovení příbuzenství se mezi jednotlivými studiemi liší.

V ideálním případě analýza příbuzenství kombinuje nejvhodnější metodu izolace s analýzou **autozomálních STR lokusů, mitochondriální hypervariabilní smyčky a markerů na chromozomu Y.**



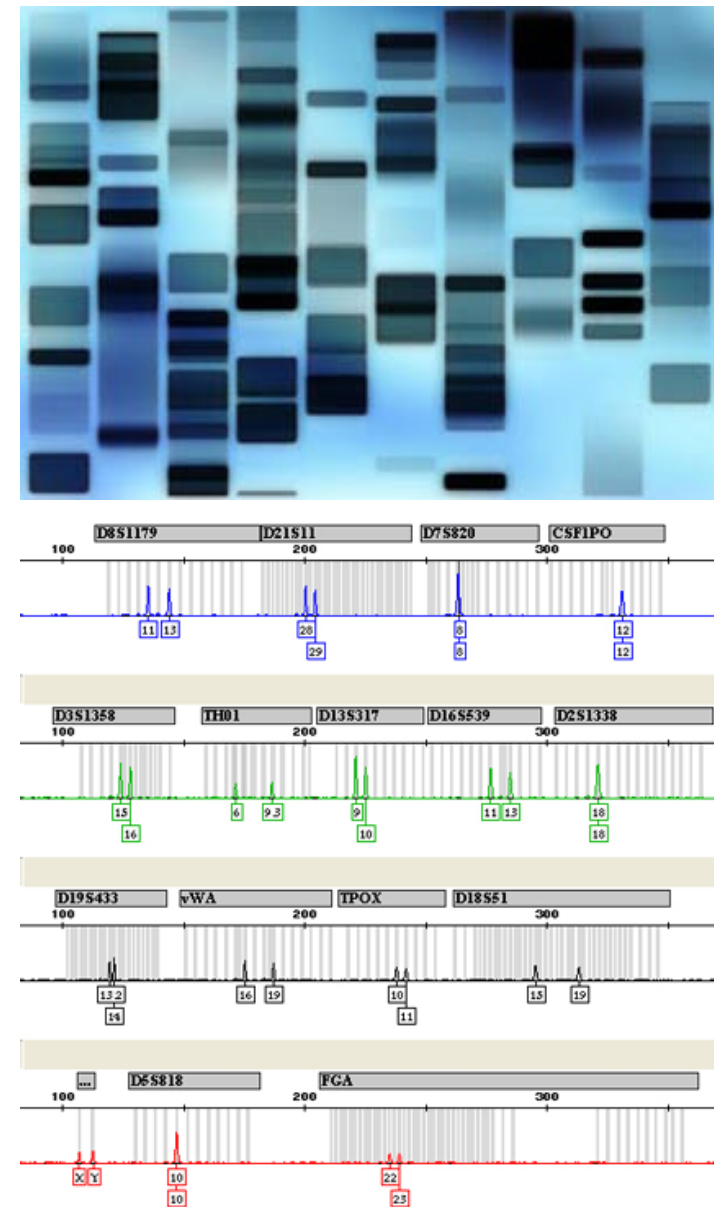
Stanovení genetického profilu a určení příbuznosti na základě porovnání krátkých tandemových repetic (STR)

Krátké tandemové repetice (STR), zvané též mikrosatelity

- délka základního motivu, 2 – 7 párů bází (di-, tri-, terta-, penta-, hexa- a heptanukleotidy)
- počet opakování základního motivu je mezi jednotlivci značně variabilní. některé STR lokusy jsou kompletní - mikrovarianty.
- mutace STR vede k variabilitě délky tandemové repetice
- Pro profilování jsou nejvhodnější:
- Vysoce variabilní markery
- Pozorovaná heterozygotnost v populaci vyšší jak 70%.
- Nízká mutační rychlost

Stanovení genetického profilu a určení příbuznosti na základě porovnání krátkých tandemových repetitivních (STR) - metodika

- Hotové komerční soupravy.
- Proces je optimalizovaný, jednotný, jasně reprodukovatelný a srovnatelný.
- Součástí je robustní reakční směs (nukleotidy, pufr, ionty, polymeráza a fluorescenční barviva, která jsou inkorporována do produktů PCR a následně detekována laserem v sekvenátoru), primery pro jednotlivé STR lokusy, které jsou designovány tak, aby reakci bylo možno multiplexovat, kontrolní DNA (K562), interní velikostní standard a alelový žebřík.
- Alternativou k forezním kitům jsou tzv. mini kity, které amplifikují krátké úseky DNA do 250 pb a jsou tedy vhodné pro starobylé vzorky (Zupanič, 2013). Pomocí tohoto přístupu byl úspěšně analyzován historický kosterní materiál i v případech, kdy standardní forezní soupravy nevyšel žádný nebo jen velmi omezený výsledek (Hughes-Stamm *et al.*, 2001; Marjanovič *et al.*, 2009; Senge *et al.*, 2011).





Pro analýzu výsledků genetického STR profilu je nutné použít specializovaný software, který slouží k interpretaci STR analýz (GeneScan[®], Genotyper[®] software, GeneMapper[®] software, FMBIO[®] Analysis software, STaRCallTM software) pro účely sestavování lidských DNA profilů se používá GeneMapper ID[®] software a GeneMapper X - ID[®] software, které jsou určeny pro forenzní účely.

U analýz aDNA se nejčastěji vyskytují artefakty typu tzv. stuttery a alelový drop out (Schultes et al., 1997; Odelberg et White, 1993).

Stutter - lze přeložit jako koktání. V tomto případě dochází k selhání polymerázové řetězové reakce a produkt PCR není naamplifikován kompletní, je o jeden motiv kratší než původní alela. U lokusu jsou pak detekovány a tři a více alel (Butler *et al.*, 2005).
Alelový drop out - během amplifikace může dojít k situaci, že vlivem náhody jsou alely téhož lokusu amplifikovány rozdílnou měrou. Dále může nastat tzv. alelový drop out, tedy k případu, kdy jedna alela není amplifikována vůbec (Butler *et al.*, 2005).

488A

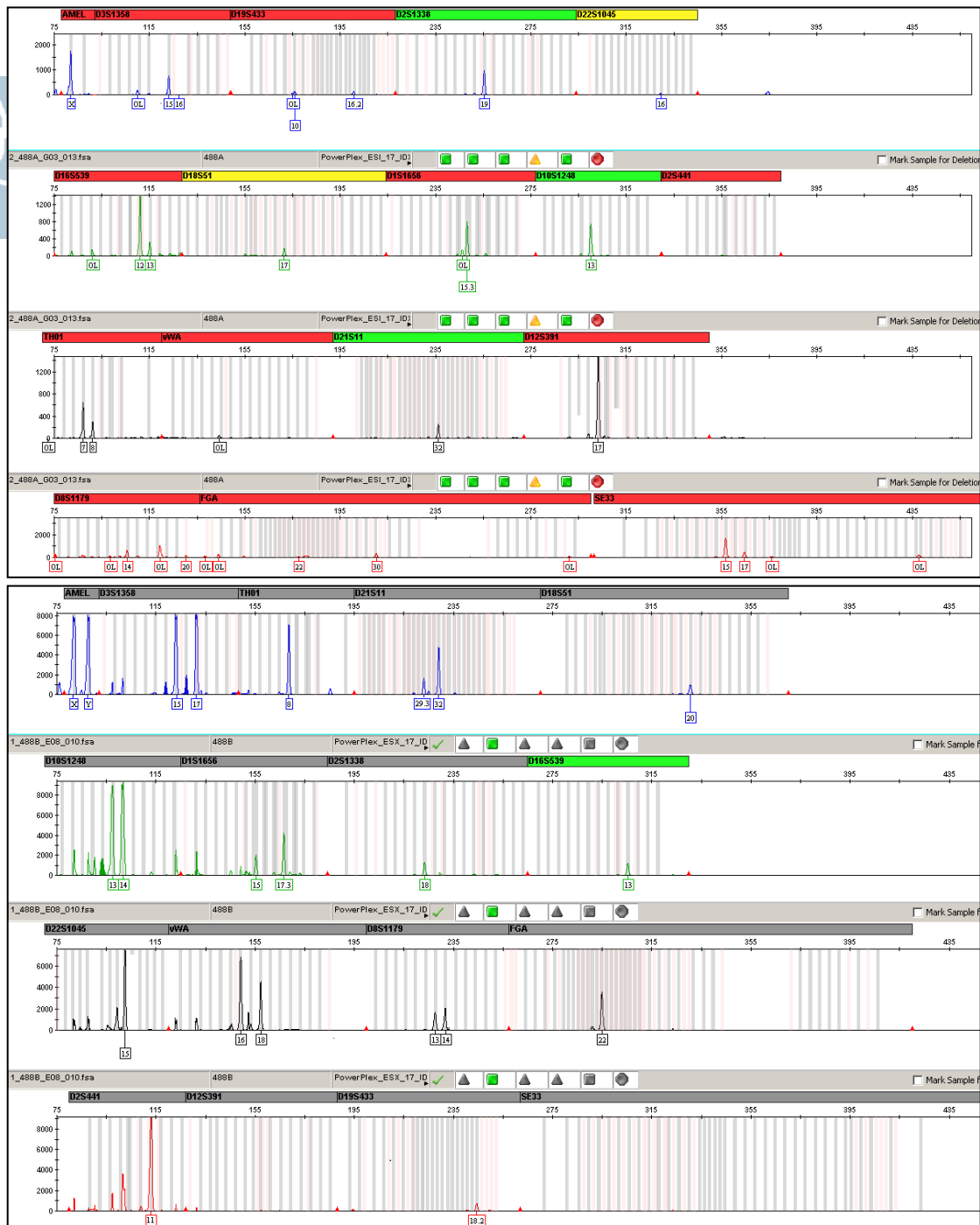
- Rok 2008
- Žena
- 33 let
- $150,2 \pm 4,49$ cm
(Drozdová, 2011)



488B

- Novorozenec
- Hrob bez milodarů
a druhotně
poškozen
- Kostí ve velmi
dobrém stavu
- (Drozdová, 2011)

	488A		488B	
amel	X		X	Y
D3S1358	15		15	17
D19S433	10	16.	18.2	
D2S1338	19		18	
D22S1045	16		16	
D16S539	12	13	13	
D18S51	17		20	
D1S1656	15.3		15	17.3
D10S1248	13		13	14
D2S441			11	
TH01	7	8	8	
vWA			16	18
D21S11	32		29.3	32
D12S391	17			
D8S1179	14	20	13	14
FGA	22	30	22	
SE33	15	17		





Stanovení haplotypu chromozomu Y

Na chromozomu Y se nachází řada markerů, které slouží k:

- Určování příbuzenství po paternální linii (Keyser - Tracqui *et al.*, 2003)
- V genetické genealogii (Gymrek *et al.*, 2013), výzkumu přenosu příjmení (Sykes *et al.*, 2000)
- Při výzkumech historických migrací (Keyser *et al.*, 2009)

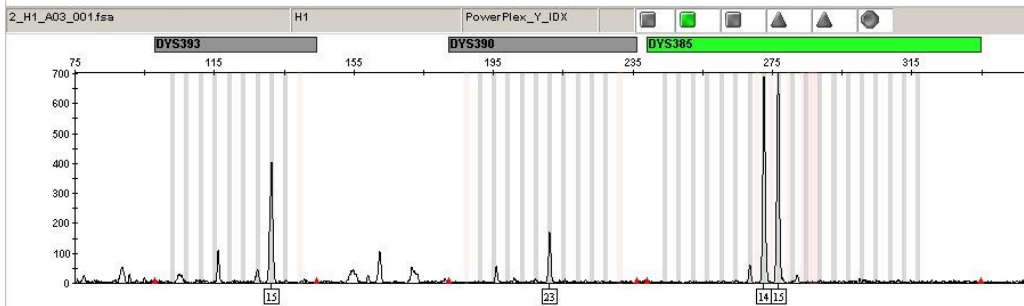
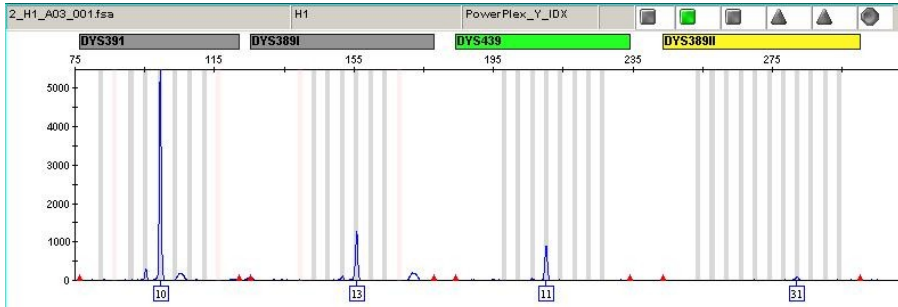
Nejčastěji analyzovanými markery na chromozomu Y jsou **krátké tandemové repetice (STR)** nebo **jednonukleotidové polymorfismy (SNP)**, Alu sekvence (Alu) a inzerční/deleční (in/del) polymorfismy. Bialelické polymorfismy (SNP, Alu in/del) slouží k zařazení do haploskupin a multialelické (STR) – slouží k zařazení do haplotypu.

Pro analýzu Y STR se nejčastěji používají forenzní komerční soupravy, které jsou koncipovány obdobným způsobem jako soupravy pro stanovení genetického profilu. Součástí všech Y STR kitů je vždy tzv. minimální Y STR sestava (minimální Y haplotyp). Její součástí je devět STR markerů, jejichž četnost je prostudována ve většině populací světa a využívá se v databázích Y haplotypů.

<https://yhrd.org/>



Kaple sv. Kateřiny, Předklášteří u Tišnova



- ▶ **East Asian Metapopulation:** Found 0 of 16040 matching haplotypes [≈ 0 (95% CI: 0 – 2.3×10^{-7})] in 0 of 76 populations.
- ▶ **Australian Aboriginal Metapopulation:** Found 0 of 765 matching haplotypes [≈ 0 (95% CI: 0 – 4.834×10^{-7})] in 0 of 1 populations.
- ▶ **African Metapopulation:** Found 0 of 2369 matching haplotypes [≈ 0 (95% CI: 0 – 1.596×10^{-7})] in 0 of 17 populations.
- ▶ **Native American Metapopulation:** Found 0 of 1458 matching haplotypes [≈ 0 (95% CI: 0 – 2.527×10^{-7})] in 0 of 51 populations.
- ▶ **Eskimo Aleut Metapopulation:** Found 0 of 561 matching haplotypes [≈ 0 (95% CI: 0 – 6.554×10^{-7})] in 0 of 9 populations.
- ▶ **Afro-Asiatic Metapopulation:** Found 0 of 3084 matching haplotypes [≈ 0 (95% CI: 0 – 1.195×10^{-7})] in 0 of 30 populations.
- ▶ **Admixed Metapopulation:** Found 0 of 10937 matching haplotypes [≈ 0 (95% CI: 0 – 3.372×10^{-7})] in 0 of 65 populations.

Geographical projection



Matching haplotypes