

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká Fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka

Bakalářská práce

Analýza mitochondriální DNA ze zubů a kosterního materiálu



Dana Kvítková

Školitel: Mgr. Halina Šimková

Praha 2008

Poděkování

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala zejména vedoucí mé práce Mgr. Halině Šimkové z Kriminologického ústavu v Praze za velkou ochotu, trpělivost a cenné rady, které mi poskytovala během zpracovávání mé práce.

Dále bych ještě ráda poděkovala svým nejbližším za pochopení a vytvořené zázemí.

Prohlášení

Prohlašuji, že předkládanou bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s pomocí citované literatury.

V Praze dne 14.8.2008



Dana Kvítková

Abstrakt

Analýza mtDNA používá DNA extrahovanou z buněčné organely nazývané mitochondrie. MtDNA se od jaderné DNA liší svou lokalizací, množstvím v buňce, způsobem dědičnosti a svou sekvencí. Zatímco jádro obsahuje dvě kopie nDNA, buňky mohou obsahovat stovky mitochondrií a každá z nich může obsahovat několik kopií mtDNA. Na rozdíl od nDNA je mtDNA děděna po mateřské linii a nepodléhá rekombinaci. Analýza mtDNA je často používána v případech, kdy je biologický materiál degradovaný nebo v malém množství. Analýza mtDNA je využíváno především pro analýzu zubů, kostí a vlasů, kde by analýza nDNA nevedla k úspěchu.

Úvodní kapitola se zabývá mtDNA, její strukturou a množstvím v buňce. Hlavní část práce je věnována nejdůležitějším krokům její analýzy ze zubů a kosterních ostatků - primární vizuální analýze, přípravě vzorku, extrakci mtDNA z buněk, amplifikaci mtDNA pomocí PCR, postamplifikační purifikaci a kvantifikaci, sekvenaci a vyhodnocování dat. V závěru práce je několik příkladů využití analýzy mtDNA v praxi.

Klíčová slova: analýza, mitochondriální DNA, kost, zub

Abstract

MtDNA analysis uses DNA extracted from cellular organelle called a mitochondrion. Mitochondrial DNA differs from nuclear DNA in its location, its quantity in the cell, its mode of inheritance, and its sequence. While the nucleus of the cell contains two copies of nuclear DNA, cells may contain hundreds of mitochondria, each of which may contain several copies of mtDNA. In contrast to nuclear DNA, mtDNA follows maternal inheritance patterns without recombination. MtDNA sequencing is often used in cases where biological evidence may be degraded or small in quantity. Mitochondrial DNA analysis is especially useful for the analysis of teeth, bones, and hairs that do not lend themselves to successful nuclear DNA analysis.

The first chapter introduces mitochondrial DNA, its structure and its quantity in the cell. Main text deals with main steps of mtDNA analysis of teeth and skeletal remains - primary visual analysis, sample preparation, mtDNA extraction, amplification by PCR, post-amplification purification and quantification, sequencing and data analysis. The last chapter deals with some practical uses of mtDNA analysis.

Key words: analysis, mitochondrial DNA, bone, tooth

Seznam použitých zkratk

A - adenin

AFDIL - Armed Force DNA Identification Laboratory

bp - páry bází

C - cytosin

CRS - Cambridgeská referenční sekvence

ddNTP - dideoxyribonukeotid trifosfát

dNTP - deoxyribonukleotid trifosfát

DTT - dithiotreitol

EDTA - kyselina etylendiaminotetraoctová

EMLB - European Molecular Biology Laboratory

G - guanin

GnSCN - guanidinium thiokyanát

HVI - hypervariabilní region I

HVII - hypervariabilní region II

HVIII - hypervariabilní region III

Mbp - mega páry bází

mtDNA - mitochondriální DNA

nDNA - jaderná DNA

PCR - polymerase chain reaction - polymerázová řetězová reakce

PVP - polyvinyl pyrrolidon

PTB - polypyrimidine tract-binding protein

rCRS - revidovaná Cambridgeská referenční sekvence

STR - short tandem repeat - krátká tandemová repetice

SDS - sodium dodecyl sulfate - laurylsíran sodný

SSB - single strand binding protein

T - tymin

TE pufr - pufr obsahující především Tris a EDTA

Tris - tris(hydroxymethyl)aminometan, 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

Obsah

ÚVOD	4
LITERÁRNÍ PŘEHLED	5
1. MITOCHONDRIE	5
1.1. POČET MITOCHONDRIÍ V LIDSKÉ BUŇCE A ORGANIZACE LIDSKÉHO MITOCHONDRIÁLNÍHO GENOMU	5
1.2. HYPERVARIABILNÍ REGIONY	7
1.3. HAPLOSKUPINY	8
1.4. DĚDIČNOST MITOCHONDRIÁLNÍHO GENOMU	9
2. STRUKTURA KOSTNÍ A ZUBNÍ TKÁŇ	10
2.1. KOST	10
2.1.1. Stavba kosti	10
2.1.2. Typy kostní tkáně a typy kostí	11
2.2. STAVBA ZUBU	13
2.2.1. Sklovina (email)	13
2.2.2. Zubovina (dentin)	13
2.2.3. Cement (cementum)	14
2.2.4. Dřeň zubu	14
2.2.5. Ozubice	15
3. ANALÝZA MTDNA	15
3.1. PRIMÁRNÍ VIZUÁLNÍ ANALÝZA	15
3.2. PŘÍPRAVA VZORKU	16
3.2.1. Příprava zubního vzorku	16
3.2.2. Příprava kosterního vzorku	17
3.2.2.1. Očištění kosti	17
3.2.2.2. Úprava kosti po očištění a množství odebírané kosti pro vzorek	18
3.3. EXTRAKCE DNA	19
3.3.1. Adsorpce na silikát	19
3.3.1.1. Adsorpce na silikát s použitím guanidinium thiokyanátu	20
3.3.1.2. Upravená adsorpce na silikát s použitím guanidinium thiokyanátu	20
3.3.2. Fenol - chloroformová extrakce DNA	21
3.4. AMPLIFIKACE MTDNA POMOCÍ PCR	21
3.4.1. Nested PCR	23
3.4.2. Mini primer sety	23
3.5. POSTAMPLIFIKAČNÍ PURIFIKACE A KVANTIFIKACE DNA	24
3.6. SEKVENACE DNA	24
3.6.1. Sangerova metoda sekvenace	24
3.6.2. Pyrosekvenční analýza	26
3.7. VYHODNOCOVÁNÍ DAT	27
3.7.1. Referenční sekvence	27
3.7.2. Interpretace dat	28
3.7.3. Heteroplasmie	29
3.7.4. C-stretch	30
3.7.5. Zápis mutací v mtDNA	30
3.8. DATABÁZE MTDNA	31
3.9. KVALITA PRÁCE V LABORATOŘI - DŮLEŽITÉ ASPEKTY ANALÝZY	31
4. KAZUISTIKA	33
4.1. ROMANOVCI	33
4.2. JESSE JAMES	34
4.3. MARTIN BORMANN	34
ZÁVĚR	35
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:	36

Úvod

V dnešní době má analýza DNA nepochybně nezastupitelné místo v mnoha biologických oborech. Využití našla například v archeologii, kriminalistice, ale i ve zkoumání původu člověka a jednotlivých živočišných druhů. Samotná analýza mitochondriální DNA (mtDNA) přináší oproti analýze jaderné DNA (nDNA) několik specifíků a omezení daných strukturou mitochondriálního genomu, množstvím mtDNA v buňce a způsobem její dědičnosti. Analýza mtDNA je hojně využívána především v případech nalezení kosterních nebo zubních ostatků. Genetická informace uložená v mitochondrii je v těchto tkáních chráněna vysokým stupněm mineralizace. Možnost zachování mtDNA je tím mnohonásobně zvýšena oproti měkkým tkáním, které podléhají velice rychlé degradaci. K vyšší úspěšnosti analýzy mtDNA oproti analýze nDNA z degradovaných vzorků přispívá i větší množství mtDNA vyskytující se v samotné buňce. Analýza mtDNA nachází uplatnění především při identifikaci nalezených kosterních ostatků, ať lidských či zvířecích, hromadných neštěstích, objasňování příbuzenských vztahů a v neposlední řadě i při objasňování otázek původu a migrace člověka a živočišných druhů. Vzhledem ke způsobu dědičnosti mtDNA je možné využití i v případech, kdy identifikovanou a referenční osobu dělí několik generací.

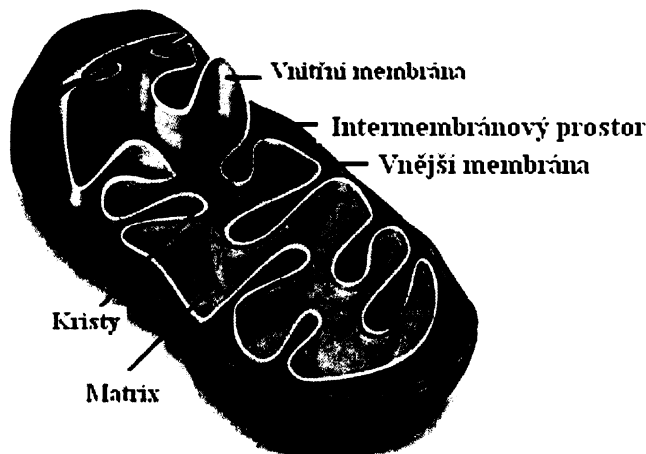
Analýza DNA je velice dynamický obor, který v posledních letech zažívá nebývalý rozvoj. Ve své bakalářské práci bych proto ráda nastínila klasické i novější přístupy k analýze mtDNA. Vzhledem k množství nejrůznějších možností postupu a nepatrných odchylek v nich se zaměřím na popis nejpoužívanějších a tím pádem i nejprověřenějších metod využívaných v tomto oboru během posledních let.

Literární přehled

1. Mitochondrie

Mitochondrie je jednou z cytoplazmatických organel eukaryotické buňky. Je sídlem oxidačního metabolismu eukaryot, nacházejí se v ní enzymy citrátového cyklu, enzymy oxidace mastných kyselin a enzymy a redoxní proteiny podílející se na transportu elektronů a oxidační fosforylaci. Velikost mitochondrií je proměnlivá v závislosti na jejich tkáňovém původu a momentálním metabolickém stavu (Voet and Voet, 2004). Obvykle jsou oválného tvaru o rozměrech v řádu μm .

Mitochondrie je semiautonómni organela s vlastním genomem, jejíž obal tvoří dvě membrány - vnější a vnitřní. Mezi oběma membránami se nachází intermembránový prostor. Vnitřní membrána vyběhá uvnitř mitochondrie ve vchlípeniny, tzv. kristy. Prostor uvnitř mitochondrie ohraničený vnitřní membránou je vyplněn mitochondriální matrix.



Obr. 1 Mitochondrie (zdroj:

<http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/zoology/AnimalPhysiology/Anatomy/AnimalCellStructure/Mitochondria/Mitochondria.htm>, upraveno).

O příčinách a mechanismu vzniku mitochondrií bylo vytvořeno několik teorií, z nichž nejpravděpodobnější je tzv. endosymbiotická teorie, tedy pohlcení cyanobakterie (Tamarin, 2001) jinou buňkou. Pro endosymbiotickou teorii, vytvořenou Lynn Margulisovou během 70. let, svědčí i přítomnost 12S a 16S podjednotky ribozomu a také citlivost mitochondrie na prokaryotická antibiotika, například streptomycin (Tamarin, 2001).

1.1. Počet mitochondrií v lidské buňce a organizace lidského mitochondriálního genomu

Počet mitochondrií v lidské buňce se může velice lišit především podle typu tkáně, ve které se buňka nachází. V různých buněčných typech může buňka obsahovat desítky, stovky až tisíce

mitochondrií (Robin and Wong, 1988). Průměrný počet mitochondrií na jednu buňku byl experimentálně stanoven na 107 (Sato and Kuroiwa, 1991). I samotná mtDNA se v mitochondrii nachází ve více kopiích. Počet kopií mtDNA se variabilně pohybuje od jedné do patnácti, průměrná hodnota byla experimentálně stanovena na 4,6 mtDNA v jedné mitochondrii. Tento počet dává po vynásobení průměrným počtem mitochondrií na jednu buňku přibližný počet kopií mtDNA v jedné buňce 500 (Sato and Kuroiwa, 1991). Tato skutečnost je výhodou při extrakci DNA z poškozených vzorků a ze vzorků obsahujících jen malé množství biologického materiálu.

Při předpokladu, že se mitochondriální genom o délce 16 569 bp (Anderson et al., 1981) vyskytuje v buňce v 500 kopiích (Sato and Kuroiwa, 1991), oproti 3 200 Mbp nacházejícím se v genomu jaderném (Butler, 2005), tvoří mtDNA jen 0.125% (Butler, 2005) celkového množství DNA v lidské buňce.

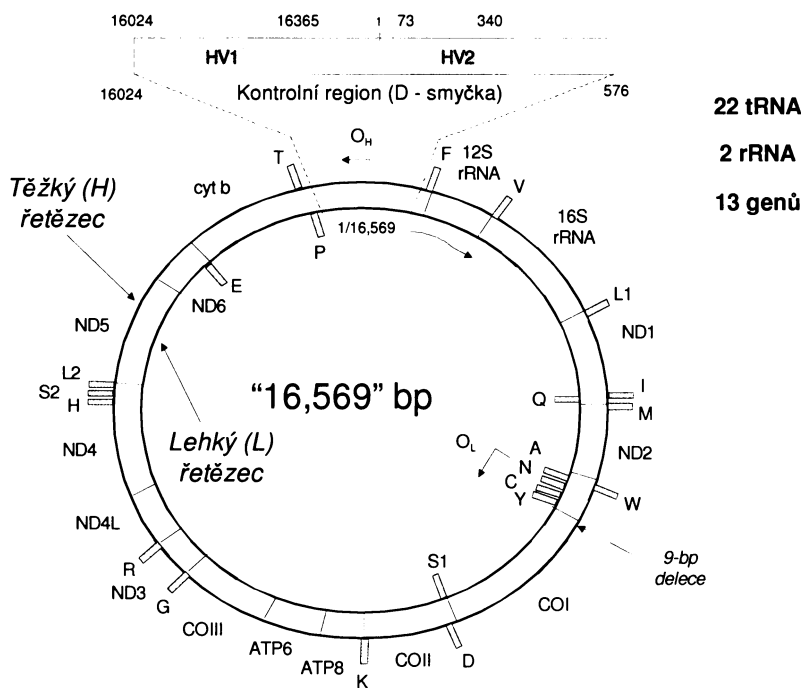
MtDNA se od nDNA liší především svou lokalizací v buňce, strukturou, sekvencí, množstvím obsaženým v buňce a způsobem dědičnosti (Butler, 2005).

Lidská mtDNA má na rozdíl od DNA jaderné, která se vyskytuje ve formě chromozomů, kruhovou strukturu o délce 16 569 bp a kóduje celkem 37 genů - geny pro 12 S a 16S rRNA, 22 tRNA a 13 genů pro proteiny potřebné v oxidativní fosforylaci a energetickou produkci v buňce - cytochrom b, dvě podjednotky ATPázy, tři podjednotky cytochrom c syntázy a sedm podjednotek NADH dehydrogenázy (Anderson et al., 1981). Ostatních 56 proteinů potřebných v procesu oxidativní fosforylace je kódováno nDNA a syntetizováno v cytoplazmě. I velká většina proteinů potřebných pro fungování mitochondrie je kódována jadernou DNA, syntetizována v cytoplazmě a následně transportována do mitochondrie (Anderson et al., 1981). Transport je do mitochondrie směřován pomocí signální sekvence připojené k proteinu (Tamarin, 2001).

Celkový počet nukleotidů se v mtDNA může mírně lišit vlivem mutací jako jsou inserce a delece. Známa je například rozdílná délka dinukleotidové repetice na pozici 514 - 524, která se nejčastěji vyskytuje ve formě (AC)₅, ale byla zaznamenána i variabilita (AC)₃ - (AC)₇ (Szibor et al, 1997).

Kruhová molekula mtDNA je stejně jako jaderné chromozomy tvořena dvoušroubovicí DNA, která obsahuje čtyři typy nukleotidů - A, C, T a G. Molekula mtDNA obsahuje dva typy řetězců - řetězec těžký (H, heavy) a řetězec lehký (L, light). Těžký řetězec nese ve své sekvenci více guaninu (G) než řetězec lehký. Guanin má ze čtyř typů nukleotidů největší molekulární hmotnost, proto se řetězec označuje jako těžký (Butler, 2005). Co do funkce můžeme na mtDNA rozlišit kódující a nekódující oblasti. Okolo 90% nekódující oblasti mtDNA se skládá z tzv. kontrolního

úseku (Displacement loop, D - smyčka, D - klička), což je 1100 bp dlouhý úsek zahrnující replikační počátek těžkého řetězce (Anderson et al., 1981).



Obr. 2 Uspořádání lidského mitochondriálního genomu (Butler, 2005, upraveno).

D-smyčka je hojně využívána pro zkoumání ve forenzní genetice, a to především kvůli své vysoké polymorfnosti. Vznik mutací v této nekódující oblasti nemá totiž následně žádný vliv na fungování mitochondrie, především produkci energie, ani na fungování buňky jako takové (Butler, 2005).

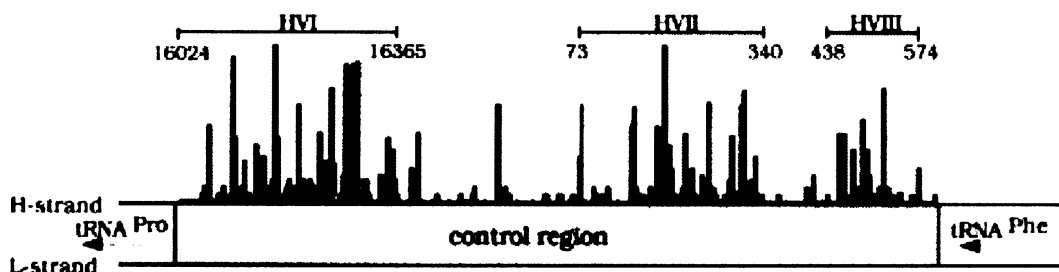
Sekvence lidského mitochondriálního genomu je velice ekonomicky uspořádána - obsah nekódujících oblastí je ve srovnání s genomem jaderným minimální. Jen 55 nukleotidů od pozice 15 447 bp kódující oblasti není využíváno pro transkripci některého z genů (Butler, 2005).

1.2. Hypervariabilní regiony

Jen 610 párů bází z celkového počtu 16 569 bp v lidské mtDNA se obvykle využívá pro samotnou analýzu. Jedná se o tzv. hypervariabilní regiony nacházející se v D - smyčce mtDNA.

Hypervariabilní region I (HVI) je 342 bp dlouhý úsek nacházející se mezi nukleotidy 16 024 - 16 365. V HVI se nachází celkem 88 variabilních pozic, což je asi 26% z celkové délky HVI (Lutz et al., 2000). Hypervariabilní region II (HVII) je 268 bp dlouhý úsek mezi nukleotidy 73 - 340. V HVII se nachází 65 variabilních pozic, tedy cca 24% z celkové délky HVII (Lutz et al., 2000). V některých případech se navíc využívá ještě analýza hypervariabilního

regionu III (HVIII), což je 137 bp dlouhý úsek mezi nukleotidy 438 - 474. V HVIII se nachází 25 variabilních míst, tedy cca 18% z celkové délky HVIII. Ostatní oblasti v D - smyčce mají jen 7% (pozice 16 366 - 16 569) respektive 3 % variabilitu (pozice 341 - 437) (Lutz et al., 2000).



Obr. 3 Hypervariabilní regiony a jejich umístění v kontrolní oblasti mtDNA (Lutz et al., 2000).

1.3. Haploskupiny

Při zkoumání mtDNA u různých populačních skupin bylo zjištěno, že je možné lidskou populaci rozdělit do skupin podle výskytu polymorfních nukleotidů - do tzv. haploskupin (Wallace et al., 1999). Haploskupiny byly poprvé definovány již v 80. letech, kdy šlo o skupiny, které měly společný nebo podobný základní vzorec a byly rozlišovány pomocí analýzy s použitím série restrikčních enzymů. Haploskupiny byly později dány do souvislosti s polymorfismy v HVI a HVII oblasti (Butler, 2005).

Pomocí analýzy mtDNA žen z celého světa byl prokázán africký původ *homo sapiens*, jehož vznik se datuje do období před více než 150 000 lety. Do Asie se člověk rozšířil v době před 60 000 - 70 000 lety a do Evropy v době před 40 000 - 50 000 lety. Do Ameriky člověk migroval z Asie a Evropy v době před 20 000 - 30 000 lety (Wallace et al., 1999).

Haploskupiny A, B, C, D, E, F, G a M jsou typické pro Asiaty, domorodí Američané mají spíše haploskupiny A, B, C, D. Africká haploskupina L charakteristická A → G transicí u nukleotidu 10 398 je tvořena třemi podskupinami - L1, L2 a L3. L1 tvoří 52% haploskupiny L a 29% z celkové mtDNA v Africe a je charakteristická T → C transicí na pozici 10 810. L2 skupina tvoří 48% haploskupiny L a 34% z celkové mtDNA v Africe a je charakteristická transicí G → A na pozici 16 390. Haploskupinu L3 tvoří zbylá mtDNA vyskytující se v Africe (Wallace et al., 1999).

Pro Evropany jsou typické haploskupiny H, I, J, K, T, U, V, W a X. Evropani mohou být rozděleni do dvou skupin podle přítomnosti (cca 25%), nebo nepřítomnosti (cca 75%) Ddel (typ restrikční endonukleázy) vazebného místa na nukleotidové pozici 10 394. Vazebné místo pro

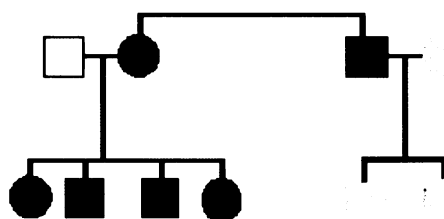
Ddel na pozici 10 394 jsou I, J a K. Naopak, vazebné místo pro Ddel na pozici 10 934 ztratily haploskupiny H, T, U, V, W a X (Wallace et al., 1999).

Haploskupina	H	T	U	V	X	I	J	K
Zastoupení v Evropě (v %)	40,5	15,2	14,7	4,8	6,9	6,7	11,3	9,1

Tab. 1 Procentuální zastoupení jednotlivých haploskupin mtDNA v Evropě (podle Wallace et al., 1999).

1.4. Dědičnost mitochondriálního genomu

Na rozdíl od mendelovské dědičnosti jaderného genomu, který je ve stejné míře děděn od obou rodičů (s výjimkou Y chromozomu), je lidský mitochondriální genom děděn výhradně po matce - jde o tzv. maternální typ dědičnosti (Giles et al., 1980).



Obr. 4 Schéma maternální dědičnosti mitochondriálního genomu.

Po splnutí savčí spermie a vajíčka se přibližně 100 paternálních mitochondrií ze spermie dostane do vajíčka, kde se nachází okolo 100 000 maternálních mitochondrií (Michaels et al., 1982). Mitochondrie pocházející ze spermie jsou aktivně vyhledány a ničeny pomocí mechanismu využívajícího ubiquitinaci, což je označení spermií bílkovinou ubiquitem a jejich následná recyklace (Sutovsky et al., 1999). Proto je veškerá mtDNA v oplodněném vajíčku čistě maternálního původu. Pouze dcery, pokud nedojde k mutaci, mohou tu samou sekvenci mtDNA předat svým dalším potomkům. Vytváření takovýchto maternálních linií je výhodou v těch situacích, kdy pomocí analýzy DNA hledáme souvislost mezi osobami vzdáleně příbuznými, u nichž už je analýza nDNA neinformativní. Naproti tomu nevýhodou bezesporu je, že jednotlivé příslušníky téže maternální linie nelze touto analýzou rozlišit.

V několika případech byla prokázána dědičnost některých úseků mtDNA od otce - tzv. paternální dědičnost. Experimentálně doložena byla např. u myši (Gyllensten et al., 1991) a u ovce (Zhao et al., 2004). U člověka byla paternální dědičnost mtDNA nalezena v souvislosti s případem paternálního přenosu myopatie. Příčinou výskytu tohoto jevu

byla pravděpodobně porucha mechanismu úplného zničení mitochondrií pocházejících ze spermií a následné přežití několika málo mitochondrií otcovského původu ve vajíčku (Schwartz and Vissing, 2002; Bromham et al., 2003).

2. Struktura kostní a zubní tkáně

2.1. Kost

Kost je pevným typem pojiva, který tvoří opornou složku těla a chrání životně důležité orgány (uložené především v lebce a hrudním koši). Kosti slouží jako zásobárna vápníku, fosfátů a mnoha dalších iontů.

2.1.1. Stavba kosti

Kost je specializovaným typem pojiva obsahujícím mezibuněčnou hmotu - matrix - a tři typy kostních buněk - osteocyty, osteoblasty a osteoklasty. Pro efektivní přenos látek ve zvápenaté matrix jsou všechny kostní buňky navzájem propojeny buněčnými výběžky (Jelínek et al.). Kosti jsou na zevním a vnitřním povrchu opatřeny vazivovou vrstvou s osteoprogenitorovými buňkami - periostem (zevní vrstva) a endostem (vnitřní vrstva).

Anorganická hmota tvoří 50% suché hmotnosti kostní matrix. Nejvíce zastoupenými prvky jsou vápník a fosfor. Dalšími ionty mohou být: uhličitany, citráty, hořčík, draslík a sodík. Vápník a fosfor vytvářejí krystaly hydroxyapatitu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Krystaly hydroxyapatitu leží podél kolagenních fibril a jsou obklopeny matrix. V matrix je také značné množství amorfního, nekystalického uhličitanu vápenatého.

Organickou hmotu kostní matrix tvoří z 95 % kolagen I a amorfní matrix s glykosaminoglykany navázanými na proteiny. V kosti se nacházejí různé glykoproteiny - kostní sialoprotein a osteokalcin mocně váží vápník a podporují tak kalcifikaci kostní matrix. Mezi glykosaminoglykany kosti patří především chondroitin 4 - a 6 - sulfát a keratan sulfát. Odvápňená kost obsahuje velké množství kolagenu, a proto si i po dekalifikaci zachovává svůj tvar.

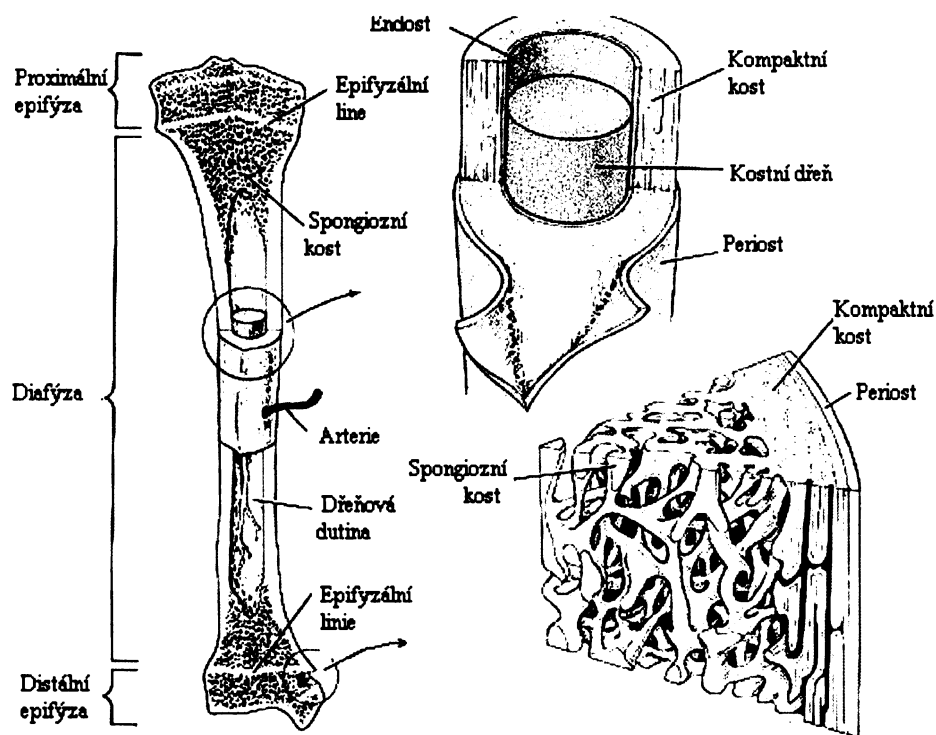
Osteoblasty syntetizují organické součásti kostní matrix (kolagen I, proteoglykany a glykoproteiny). Ukládání anorganických komponent do kosti závisí na přítomnosti životaschopných osteoblastů. Ty jsou uloženy na povrchu kostní tkáně těsně vedle sebe a jsou navzájem propojeny cytoplazmatickými výběžky. Osteoblasty jsou polarizované buňky, jejich produkty jsou uvolňovány pouze na straně přivrácené ke kostní hmotě. Během proteosyntézy mají osteoblasty velké jádro, velký Golgiho aparát a rozsáhlé granulozní endoplazmatické retikulum. Osteoblasty se po zalití do nově vytvořené matrix přemění v osteocyty.

Osteocyty vznikají z osteoblastů, které se postupně zalily do kostní matrix. Jsou umístěny v lakunách vzniklých ukládáním kostní matrix okolo osteoblastů a jejich výběžků. V jedné lakuně je vždy jen jeden osteocyt. Osteocyty jsou se sousedními buňkami propojeny pomocí cytoplasmatických výběžků. Ve srovnání s osteoblasty mají více zahuštěný chromatin v jádře, menší Golgiho aparát a granulozní endoplazmatické retikulum. Po odumření osteocytu dojde k následné resorpci kostní matrix osteoklasty.

Osteoklasty jsou velké, mnohjaderné, bohatě rozvětvené a pohyblivé buňky. Osteoklasty průběžně resorbují kostní hmotu. Vývojově osteoklasty nepatří k osteoklastům a osteocytům, ale do monocytomakrofágního systému (Jelínek et al.). Povrch osteoklastů přivrácený ke kosti je zvlněný do nepravidelných, často členitých výběžků, které tvoří žíhaný lem zvětšující resorpční povrch buňky. V cytoplasmě osteoklastů se nacházejí četné mitochondrie, velké množství lysozomů a méně cisteren granulozního endoplazmatického retikula.

2.1.2. Typy kostní tkáně a typy kostí

Makroskopicky lze kostní tkáň rozdělit na kompaktní a spongiózní (houbovitou). Kompaktní tkáň je pevná a tvrdá, tvoří souvislou hmotu. Spongiózní kostní tkáň je tvořena sítí kolagenních trámčků. Při mikroskopickém pozorování je však patrné, že oba typy mají stejnou základní histologickou stavbu.



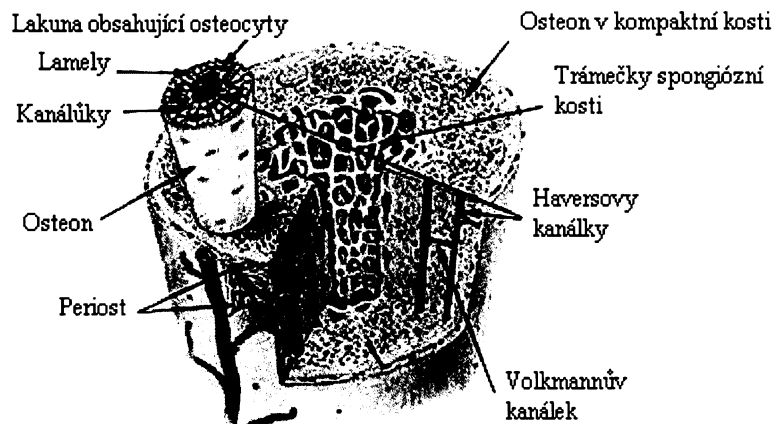
Obr. 5 Stavba kosti (zdroj: <http://homepage.mac.com/myers/misc/bonefiles/bonestruct.gif>, upraveno).

Histologicky lze kostní tkáň rozlišit na primární nezralou vláknitou kost a sekundární zralou lamelózní kost. Ačkoliv oba typy obsahují stejné stavební jednotky, v nezralé vláknité kosti probíhají kolagenní vlákna náhodně, neuspořádaně, ve zralé kosti jsou uspořádána do lamel.

Při tvorbě každé kosti, stejně jako při jejím hojení, je vytvořena nejprve nezralá vláknitá kost. Je pouze dočasná a je postupně nahrazena zralou kostí sekundární. Vláknitá kost zůstává pouze v blízkosti švů plochých kostí lebky a v kostních alveolech. Kromě neuspořádaných kolagenních vláken je tato kost méně kalcifikována a má více osteocytů než kost lamelózní.

Sekundární kostní tkáň má kolagenní vlákna charakteristicky uspořádaná do lamel, které jsou uloženy paralelně jedna vedle druhé nebo koncentricky kolem kanálku s cévami. Celý komplex koncentrických lamel, obklopujících kanálek s krevními cévami a nervy v řídkém vazivu, se nazývá Haversův systém neboli osteon. Lakuny s osteocyty jsou uloženy mezi lamelami. V každé lamele probíhají kolagenní vlákna paralelně.

V kompaktní kosti jsou lamely typicky uspořádané a tvoří osteony, zevní a vnitřní plášťové lamely a intersticiální lamely. Každý osteon je dlouhý, často rozdvojený cylindrický útvar, jehož dlouhá osa probíhá souběžně s osou diafýzy. Haversův kanálek komunikuje s kostní dření. S periostem komunikují prostřednictvím příčných či šikmých Volkmannových kanálků, které přivádějí cévy z periostu.



Obr. 6 Kompaktní a spongiózní kost (zdroj:

http://training.seer.cancer.gov/module_anatomy/unit3_2_bone_tissue.html, upraveno).

Na těle člověka rozlišujeme několik typů kostí - kosti dlouhé, krátké a ploché. U dlouhých kostí jsou epifýzy tvořeny spongiózní (s kompaktní vrstvičkou na povrchu) a diafýzy kompaktní kostí (s malou oblastí spongiózy sousedící s kostní dření). Krátké kosti jsou většinou vyplněny spongiózou a kryty kompaktní. Ploché kosti mají dvě vrstvy kompakty a mezi nimi jednu vrstvu spongiózy. Dutinky spongiózních kostí a dutiny dlouhých kostí jsou vyplněny hematopoetickou

kostní dření. Dlouhé kosti je možné anatomicky rozdělit na proximální epifýzu, diafýzu a distální epifýzu.

2.2. Stavba zubu

Zubní tkáň obsahuje různé typy buněk a zubní hmotu - zubovinu (dentin). Spodní část zubu je kryta cementem, horní část sklovinou (email). Dutina uvnitř zubu je vyplněna dření. Zub je upevněn závěsným aparátem v alveolárním výběžku čelisti a je také poután k dásni. Nad dáseň vyčnívající část se označuje jako zubní korunka a část zanořená do alveolárního výběžku čelisti se označuje jako kořen. Úzký pás mezi korunkou a kořenem se označuje jako zubní krček.

Chrup zdravého dospělého člověka tvoří 32 zubů (8 řezáků, 4 špičáky, 8 zubů třenových, a 12 stoliček). Dětský (mléčný) chrup obsahuje jen 20 zubů. Základní stavba všech typů zubů se neliší.

2.2.1. Sklovina (email)

Sklovina pokrývá zubní korunku a je nejtvrďší tkáň v lidském organismu. Její tvrdost je vyšší na kousacích hrbolcích a hranách, směrem k zubnímu krčku se snižuje. Nejpodstatnější složkou skloviny jsou vápenaté soli (přes 95%), z nichž podstatná část připadá na hydroxyapatit. Organické látky tvoří jen asi 0,5% a představují je hlavně dva glykoproteiny (amelogenin a enamelin). Při odvápnění se sklovina rozpadne, protože na rozdíl od kosti neobsahuje kolagen.

Sklovina zubu je tvořena činností vnitřních buněk ameloblastů. Ameloblasty jsou nově tvořenou sklovinou posouvány směrem k povrchu zubu. Období sekrece ameloblastů je omezeno: poté, co sklovina dosáhne patřičné tloušťky, přestávají produkovat sklovinu a mění se v buňky tvořící tzv. dentální kutikulu. Při prořezávání zubů se ameloblasty z povrchu zubu samovolně odstraní.

2.2.2 Zubovina (dentin)

Zubovina vytváří základní tvar zubu. V korunce dosahuje až ke sklovině a v kořenu až k hranici s cementem. Dentin má mezenchymální původ a je produktem odontoblastů, které jsou uloženy na rozhraní dentinu a dřene zubu. Jejich protáhlé jádro je uloženo spíše v bazální části cytoplazmy. Cytoplazma odontoblastu obsahuje četné mitochondrie, granulозní endoplazmatické retikulum a silně rozvinutý Golgiho aparát. Mezi odontoblasty jsou četná mezibuněčná spojení.

Dentin je měkčí než sklovina, obsahuje asi 80% anorganických a přibližně 20% organických látek. Anorganické látky jsou opět představovány převážně hydroxyapatitem. Hlavní část

organických látek představuje kolagen I (přibližně 8%). Zbytek připadá na základní amorfni hmotu.

Tvorba dentinu pokračuje i po ukončení vývoje zubu. Do té doby vzniklý dentin je označován jako primární. Dále pokračuje tvorba dentinu pomaleji. Tento dentin, označovaný jako sekundární, se ukládá na dentin primární. Výsledkem tohoto procesu je postupné zmenšování dřeňové dutiny zubu a jeho kořenového kanálku. Na rozhraní primárního a sekundárního dentinu bývá zřetelná přírůstová linie, jenž je často využívána pro stanovení biologického věku jedince.

2.2.3. Cement (cementum)

Kořen zubu je kryt zubním cementem. Svou strukturou se zubní cement nejvíce podobá stavbě kosti. Je možné odlišit dva typy cementu: primární a sekundární.

Primární, také označovaný jako acelulární cement, se ukládá jako první vrstva na dentin a pokrývá zub od krčku až k vrcholu kořene. Někdy může v apikální části kořene chybět. Do tohoto primárního cementu jsou zakotvena kolagenní vlákna závěsného zubního aparátu. Cement, obvykle na úzkém pruhu, v krajině zubního krčku překrývá ukončení skloviny, řidčeji končí právě na její hranici.

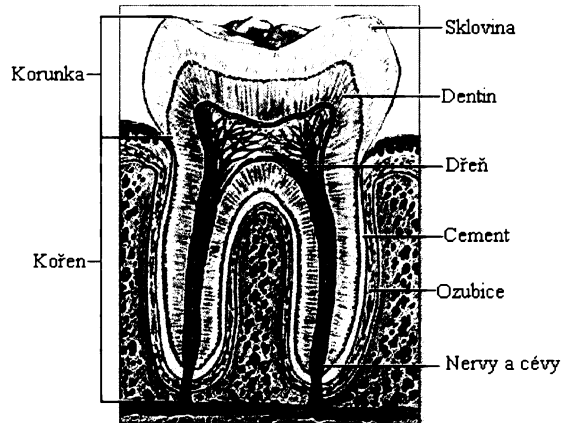
Sekundární cement, také označovaný jako celulární, se ukládá na vrstvičku primárního cementu a je výrazně tvořen hlavně v dolní třetině zubního kořene a na apexu. Tento sekundární cement je tvořen lamelami, mezi kterými se nalézají dutinky, v nichž jsou uloženy buňky cementu - cementocyty. Cementocyty - podobně jako osteocyty v kosti - jsou hvězdicovité buňky. Na rozdíl od osteocytů však mají méně výběžků, které jsou navíc kratší a méně pravidelné. Výběžky cementocytů jsou rovněž uloženy v jemných kanálcích v základní hmotě cementu a vzájemně mezi sebou komunikují.

2.2.4. Dřeň zubu

Dřeň je tvořena jemným vazivem, které vedle charakteristických buněk, vláken a základní amorfni hmoty obsahuje bohaté cévní a nervové pleteně. Dřeň vyplňuje dutinu zubu a kořenového kanálku. Buňkami zubní dřeně, vedle charakteristicky uspořádaných odontoblastů, jsou především fibroblasty. Jejich tvar je buď hvězdicovitý nebo vřetenovitý. Jiné typy buněk se ve zdravé zubní dřeni vyskytují jen velice sporadicky. Dřeňová dutina obsahuje krevní cévy, které vstupují kořenovým kanálkem. Tenkostěnné arterioly se v zubní dřeni rozvětvují na bohatou kapilární síť, jejíž větve pronikají až mezi odontoblasty. Zubní dřeň obsahuje také četná nervová vlákna.

2.2.5. Ozubice

Ozubice (peridont) je vrstvička vazivové tkáně obklopující zubní kořen a poutající zub do zubního alveolu. Peridont současně obsahuje svazky kolagenních vláken, které se upínají do zubního cementu a druhým koncem do alveolárního výběžku čelisti. Jejich soubor je nazýván závěsný aparát zubu.



Obr.7 Stavba zubu (zdroj: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/images/ency/fullsize/1121.jpg>, upraveno).

3. Analýza mtDNA

Analýza mtDNA se stejně jako analýza jaderné DNA provádí v několika po sobě jdoucích krocích. Analýza mtDNA je využívána především tehdy, je-li vzorek nalezen ve velice malém množství, případně téměř zničený. Hlavní oblastí použití jsou případy, kdy jsou nalezeny jen kosterní nebo zubní pozůstatky, vlasy bez kořínků, případně silně degradovaná krev. Důvodem preference analýzy mtDNA je velice malé množství nDNA v těchto typech vzorků a tudíž malá pravděpodobnost úspěšného provedení analýzy jaderných DNA lokusů.

Jednotlivými kroky analýzy mtDNA jsou: primární vizuální analýza materiálu, příprava vzorku, extrakce DNA, amplifikace DNA pomocí PCR, purifikace a kvantifikace DNA, sekvenace DNA a vyhodnocování dat.

3.1. Primární vizuální analýza

Prvním krokem při analýze mtDNA je primární vizuální analýza, během které jsou nejprve kosti a zuby předány do rukou forenzních antropologů, případně odontologů, kteří určí, zda jsou lidského původu (Isenberg and Moore, 1999).

Nalezené ostatky jsou poté zdokumentovány například pomocí fotografií a rentgenových snímků pro pořízení záznamu, který je možný využít později (Shimora et al., 2004). Pokud je to možné, určí se ze vzorků přibližný věk a pohlaví oběti.

3.2. Příprava vzorku

Pro přípravu vzorků je důležité očištění od jakéhokoliv kontaminujícího materiálu, aby bylo zajištěno, že získaná DNA pochází skutečně ze vzorku a nikoliv z jiného zdroje. Pokud byly ostatky uloženy v zemi, je tato hlína oškrabána skalpelem (Hagelberg and Clegg, 1991).

Základním principem přípravy každého vzorku je odstranění materiálu na povrchu a odebrání vlastního vzorku z kosti, případně zubu. Z odebraného vzorku se vytvoří prášek, který je umístěn do extrakčního roztoku.

3.2.1. Příprava zubního vzorku

Jelikož je zubní tkáň jednou z nejtvrdějších na lidském těle, je vzhledem k vysoké rezistenci k degradaci nepříznivými přírodními podmínkami velká pravděpodobnost zachování zubu jako potencionálního zdroje DNA. Ve většině případů působením přírodních podmínek dochází ke zničení dřene a extrakce je možná pouze z dentinu (Shimora et al., 2004). Bylo popsáno několik postupů pro přípravu zubních vzorků. Vzorek může být odebírán z dentinu (zuboviny) nebo dřene.

Zuby jsou v případě odebrání přímo zubním lékařem uchovávány při -20°C (Pfeiffer et al., 1998; Mörnstad et al., 1999). Po mechanickém očištění povrchu (nejčastěji skalpelem) je zub omyt ve sterilní, destilované vodě. Po omytí následuje ponoření do 10% bělicího roztoku na dobu 15 sec (Mörnstad et al., 1999; Stone et al., 2001) a na stejnou dobu do 95% ethanolu (Pfeiffer et al., 1998) nebo jen 70% ethanolu (Stone et al., 1998).

Dřeň je odebírána ze dřevné dutiny uvnitř zubu. Na oddělení korunky a kořene se může použít diamantový řezací kotouč. Kořen je poté diamantovým kotoučem ještě rozříznut skrz střední linii. Tkáň dřene je možné odebrat pomocí tzv. spoon excavator a přenést do zkumavky. Vrtáním je možné oddělení cementu a dřevné dutiny (Pfeiffer et al., 1998; Mörnstad et al., 1999).

Dentin je většinou odebírán odontology, aby odběrem nedošlo k poškození důležitých morfologických znaků zubu (Edson et al., 2004). Dentin je pro vzorky odebírán především z kořene zubu. Vzorky po odebrání váží okolo 0,1 - 0,5 g (Sampietro et al., 2005). Odebraný dentin se omyje 10% bělicím roztokem, vysuší a pomocí speciálního mlýnku rozdrtí na pudr (jemný prášek) (Pfeiffer et al., 1998; Stone et al., 2001). Rozdrcený dentin se poté používá k extrakci DNA v množství okolo 10 mg (Mörnstad et al., 1999).

3.2.2. Příprava kosterního vzorku

V optimálním případě se vzorek pro analýzu odebírá z dlouhých kostí - kosti stehenní (femuru) (Anslinger et al., 2001), kosti pažní (humeru), kosti holenní (tibiae) (Anslinger et al., 2001), případně žeber (Stone and Stoneking, 1998). Ve většině případů se odebírá kousek kosti z jejího středu, kde je kost kompaktní a obsahuje více buněk. Pro odběr se vybírá takové místo, aby nedošlo k celkovému poškození kosti a ta mohla být následně využívána k dalším analýzám.

V případě, že je větší časová prodleva mezi očištěním a zpracováním kosti, bývají vzorky uchovávány při teplotě -80°C (Edson et al., 2004). Pokud je na odebraném vzorku prasklina, vyřízne se okolo ní kousek kosti pro dokonalé očištění vzorku (Edson et al., 2004).

3.2.2.1. Očištění kosti

Prvním a velice důležitým krokem v přípravě kosterního vzorku pro extrakci mtDNA je mechanické očištění povrchu kosti od nečistot - zbytků tkání, hlíny a především cizorodé DNA - například bakteriální. Čištění má nezastupitelnou funkci v prevenci kontaminace vzorku. Mechanické čištění je možné provádět několika způsoby, používají se nejrůznější brusky, skalpely, nebo i smirkový papír (Steadman et al., 2006; Davoren et al., 2007; Edson et al., 2004). Při čištění bývá odstraněna horní vrstva kosti o šířce přibližně 2 - 3 mm (Davoren et al., 2007). Množství odstraněné kosti samozřejmě závisí na zachovalosti a dostupném množství kostní tkáně.

Existuje i několik chemických a maceračních postupů pro očištění kosti. Steadman (Steadman et al., 2006) testoval vliv různých maceračních a chemických technik na zachování DNA ve vzorku kosti. Jako vzorky byla ve studii použita prasečí žebra. Techniky lze rozdělit do šesti základních skupin: bakteriální macerace ve studené vodě (voda má pokojovou teplotu), bakteriální macerace v teplé vodě (teplota okolo 37°C), macerace varem (voda projde přes 100°C , případně zahrnuje použití mikrovln), chemická macerace (bělení hypochloridem sodným, nebo peroxidem vodíku), enzymatická macerace (zahrnuje především papain, pepsin a trypsin, někdy se používá i prací prášek) a macerace s bezobratlými živočichy. Každá z výše uvedených technik je jinak časově náročná a má jiné účinky na kost (více viz Steadman et al., 2006). Studie ukázala, že nejšetrnější macerační metody pro extrakci DNA z kosti a následnou amplifikaci jsou ty, při kterých se pouze na nutnou dobu zvýší teplota, tedy macerace horkou vodou (90°C), macerace varem, použití mikrovln a použití detergentu/uhličitanu sodného. Výsledky viz tabulka č. 2 a č. 3.

Experiment	Sample Size	Start Weight Range (g) (Average)	End Weight Range (g) (Average)	Average Time	No. of Observations	Average Odor	Average Texture	Average Ease	Average Bone Quality
Room temperature (22°C)	4	363–522 (441)	14–49 (29)	14-34d (23.9 d)	90	2.4	2.4	1.4	5
Hot water (90°C)	5	434–716 (548)	13–66 (36)	5.1-27h (14 h)	23	3.0	2.1	1.8	4.8
Boiling (100°C)	7	402–670 (499)	13–44 (27)	2-5h (3 h)	22	3.0	2.8	2.7	5
Microwave (high)	5	246–725 (442)	14–38 (25)	5-2m (14 m)	72	2.3	2.2	1.8	4.6
Bleach (22°C)	4	222–562 (442)	4–50 (31)	12-70d (33 d)	171	2.4	2.0	1.3	1.25
Hydrogen peroxide (22°C)	4	293–580 (440)	20–54 (30)	23.5-34d (30.7 d)	88	2.1	2.6	1.5	4.25
EDTA/Papain (45°C)	5	383–690 (561)	25–49 (32)	3.9-2 d (10 d)	146	2.86	2.4	2.1	4.8
Adolph's/Palmolive (90°C)	6	211–740 (447)	5–44 (23)	3-27h (9.2 h)	15	2.7	2.9	4.0	5
Biz/Na ₂ CO ₃ (90°C)	3	382–592 (480)	18–26 (21)	3-4.2h (3.7 h)	11	3.0	2.9	1.3	3.7
Biz/Na ₂ CO ₃ degreased (90°C)	2	306–317 (311)	7–10 (8.5)	6.5-7.4h (7 h)	7	3.0	2.4	1.7	2

d, days; h, hours; m, minutes.

Tab. 2 Výsledky experimentální macerace (Steadman et al., 2006).

Maceration Condition	Yield $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ *	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ Ratio*
Mechanical	0.82±0.09	1.846±0.13
Room temperature water	0.00±0.00	NA
Hot water	1.87±0.08	1.786±0.09
Boiling water	1.22±0.28	1.705±0.03
Microwave	0.95±0.50	1.733±0.12
Bleach	0.10±0.00	NA
Hydrogen peroxide	0.00±0.00	NA
EDTA/Papain	0.06±0.05	NA
Adolph's®/Palmolive®	1.17±0.19	1.776±0.08
Detergent/sodium carbonate	1.60±0.14	1.743±0.11
Detergent/sodium carbonate followed by degreasing	0.23±0.08	1.899±0.09

* Results are presented as the mean±standard deviation from two experiments. NA, not applicable.

Tab. 3 Výnos a kvalita DNA izolované po různých typech macerace (Steadman et al., 2006).

3.2.2.2. Úprava kosti po očištění a množství odebírané kosti pro vzorek

Poté, co je kost očištěna (mechanicky, nebo macerací), je promyta ve sterilní destilované vodě a následně v ethanolu, jehož koncentrace se pohybuje mezi 70 - 100%. (Nelson and Melton, 2007; Edson et al., 2004; Davoren et al., 2007). V některých případech je možno mezi tyto dva kroky vložit promytí v 10% ultrazvukové bělicí lázni (Nelson and Melton, 2007), případně v 10% bělicím roztoku (0,5% hypochlorid sodný) (Davoren et al., 2007). Vysušení kosti se může provádět přirozeně vzduchem (Edson et al., 2004) nebo při zvýšené teplotě okolo 50°C (Davoren et al., 2007).

Z očištěné části kosti se odebírá krychlový vzorek 1 - 2 mm silný (Bender et al., 2000). Pokud je kost větší než cca 2cm², odebírá se vzorek s pomocí malé cirkulární pilky (Nelson et al., 2007).

Ze vzorku se pomocí kostního nebo mineralogického mlýnku dělá kostní pudr (prach), nebo se používá třecí vibrační zařízení (Stone and Stoneking, 1998). Na rozdrčení kosti je také možné použít třecí misku s těrku (Steadman et al., 2006). V některých případech je kost před rozemletím v mineralogickém mlýnku nejprve zmrazena pomocí tekutého dusíku (Bender et al., 2000; Edson et al., 2004)

V případě převážného obsahu houbovité neboli spongiózní kosti, dlouhodobého vystavení kosti nepřiměřené teplotě, popřípadě spálení vzorku na bod kalcinace (odstranění vody) není možné vzorky dále zpracovávat (Edson et al., 2004).

Průměrně je pro inkubaci v extrakčním roztoku použito okolo 0,25 - 0,4 g rozdrčeného vzorku (Nelson et al., 2007). Vzorek houbovité spongiózní kosti mívá okolo 0,7 g (Steadman et al., 2006). V houbovitém typu kostní tkáně je kvůli menšímu obsahu buněk a tudíž i DNA potřeba větší množství vzorku.

3.3. Extrakce DNA

Dalším krokem analýzy mtDNA je její extrakce z buněk. Základním principem extrakce je, že se buněčný homogenát z připraveného vzorku vystaví směsi organických činidel, která separují DNA od jiného biologického materiálu, např. proteinů. Směs se poté stočí na centrifuze a DNA zůstane rozptýlena v horní vodné vrstvě. Ostatní biologický materiál zůstane ve spodní organické vrstvě nebo na rozhraní obou vrstev. Horní vrstva se poté odfiltruje a zkoncentruje. DNA se pročistí a připraví k následné amplifikaci (Isenberg and Moore, 1999).

V dnešní době je nejpoužívanější metodou extrakce DNA z buněk **adsorpce na silikát**. Další z hojně využívaných metod je pak **fenol - chloroformová extrakce**.

3.3.1. Adsorpce na silikát

Základním principem metody je, že DNA v přítomnosti tzv. chaotropních solí adhezuje na silikátový povrch. K roztoku, obsahujícímu zlyzovaný buněčný obsah, se přidává chaotropní sůl a suspenze silikátových částic (dioxid křemíku). Protřepáváním směsi se usnadňuje ulpívání DNA na částice. Ostatní sloučeniny zůstávají v roztoku a lze je pak jednoduše odstranit – částice se nechají usadit nebo se usazení urychlí odstředěním, odsaje se roztok nad částicemi a částice se propláchnou novou dávkou pufru s chaotropními solemi. Po opětovném odstředění a odsátí roztoku zůstane na částicích adhezerovaná čistá DNA. Tu pak lze z povrchu částic snadno uvolnit přidáním vody nebo vhodného pufru, který neobsahuje chaotropní soli. Po odstředění zůstanou na dně jen samotné částice, nad nimiž je čistý roztok DNA.

Pro aplikaci základního principu adsorpce DNA na silikát existuje více postupů.

3.3.1.1. Adsorpce na silikát s použitím guanidinium thiokyanátu

První z nich byl popsán Hössem (Höss and Pääbo, 1993). K rozdrčenému kostnímu vzorku se přidá extrakční pufr složený z 10 M 0.1 M Tris - HCl pH 6.4, 0.02 M EDTA pH 8.0 a 1.3% Triton X - 100 obohacený o guanidinium thiokyanát (GnSCN). GnSCN působí jako chaotropní činidlo, které napomáhá denaturaci proteinů a zároveň zprostředkovává vysoce specifickou vazbu DNA na silikátové mikropartikelule. Po inkubaci při 60°C po dobu jedné až několika hodin a centrifugaci se odebraný supernatant nechá znovu inkubovat v extrakčním pufru se suspenzí silikátových částic, a to po dobu 10 min při pokojové teplotě. Poté se silikátový pelet dvakrát promyje pufrům složeným z 10 M GnSCN a 0,1 M Tris - HCl, pH 6,4, dvakrát v 70% ethanolu a jedenkrát v acetonu. Po vysušení peletu při 56°C se DNA vymyje pomocí 65 µl vody nebo TE pufru. V případě delší časové prodlevy mezi extrakcí a následnou amplifikací se DNA skladuje při -20°C (Höss, 1933). Metoda byla úspěšně použita v případě extrakce DNA z kostí 25 000 let starých. Metoda má kromě nesporných výhod v podobě vysoké extrakční výnosnosti, snadnosti a rychlosti i několik nevýhod. Jednou z možných nevýhod je především to, že silikátové mikropartikelule mohou být inhibitory následné PCR, proto je nutné dokonalé vyčištění extraktu.

3.3.1.2. Upravená adsorpce na silikát s použitím guanidinium thiokyanátu

V roce 2007 se objevila práce Rohlanda (Rohland and Hofreiter, 2007) upravující původní Hössovu metodu: kostní prášek se přidá do extrakčního pufru obsahujícího 0,45 M EDTA, pH 8,0, 0,5% A - lauroylsacrosin, 1% PVP, 50 mM DTT, 2,5 mM PTB a 0,25 mg/ml proteinázy K. Po inkubaci přes noc při teplotě 37°C ve tmě a centrifugaci se odebere supernatant a přidá se k vazebnému pufru obsahujícímu 5 M GnSCN, 25 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8,0 a 15 µl suspenze silikátových mikropartikelulí. Inkubace probíhá po dobu jedné hodiny při pokojové teplotě. Po centrifugaci se supernatant odstraní a pelet se promyje jedenkrát vazebným pufrům (bez silikátových mikropartikelulí) a jedenkrát pomocí NewWASH roztoku (složení viz Rohland and Hofreiter, 2007). Následně se pelet vysuší při 56°C po dobu 7 minut a DNA se vymyje pomocí 50 µl TE pufru při teplotě 56°C po dobu 10 minut. Po centrifugaci se vodný roztok přemístí do nové zkumavky.

Další metody využívající adsorpci na silikát byly popsány např. Yangem (Yang et al., 1998), nebo Davorenem (Davoren et al., 2007). Více viz příslušná literatura.

3.3.2. Fenol - chloroformová extrakce DNA

Pro uvolnění DNA z kosterního vzorku se využívá účinků extrakčního pufru. Jeho složení se mírně liší podle různých protokolů. Nejobvyklejší složení extrakčního pufru obsahuje 10 mM Tris, pH 8,0, 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 8,0, 0,5% SDS (Foran, 2006; Edson et al., 2004; Davoren et al., 2007) a proteinázu K (20 mg/ml). Stejné složení extrakčního pufru bylo popsáno i pro extrakci DNA ze zubních vzorků (Pfeiffer et al., 1998). Proteináza K se používá především pro rozštěpení proteinů pocházejících převážně z kostní matrix. Množství extrakčního pufru se pohybuje od 400 μ l (Foran, 2006) až po 3 ml (Edson et al., 2004) a je samozřejmě závislé na množství vzorku. Vyskytují se i různé modifikace složení extrakčního pufru: Rennick (Rennick et al., 2005) ve své práci použil 20 mM Tris o pH 8,0, Anslinger (Anslinger et al., 2001) popsal extrakční pufr složený z 1 M Tris, 1 M KCL, 10% SDS a 0,5 M EDTA, obsahující navíc 0,4 M DTT a proteinázu K. Na 0,5 g kosti bylo použito 2 ml extrakčního pufru a 2 mg proteinázy K a inkubováno po dobu 2 dnů při teplotě 56°C.

Blank neboli negativní izolační kontrola pro detekci případné kontaminace, obsahující všechna činidla mimo vzorek, se připravuje spolu se vzorky.

Vzorek se v extrakčním pufru nechává inkubovat nejčastěji přes noc při zvýšené teplotě 56°C (Pfeiffer et al., 1998; Rennick et al., 2005; Foran, 2006; Edson et al., 2004). Po inkubaci přichází vlastní extrakce uvolněné DNA. Ke vzorku se přidá směs fenol + chloroform + isoamylalkohol v poměru 25:24:1. Po promytí vznikne horní vodná a dolní chloroformová vrstva. Isoamylalkohol napomáhá zvyšovat rozpustnost fenolu v chloroformu, takže po protřepání přejde fenol volně do chloroformové fáze. Mezi oběma vrstvami dojde k vytvoření prstence sražených proteinů. K dokonalému oddělení fází dojde až po centrifugaci. Postup je nutné opakovat až do úplného vyčištění vzorku od proteinů, poté následuje promytí n - butanolem (Pfeiffer et al., 1998; Edson et al., 2004), nebo promytí jen chloroformem a isoamylalkoholem v poměru 24:1 pro odstranění veškerého chloroformu ze vzorku (Davoren et al., 2007).

Konečné přečištění vzorku může probíhat pomocí TE pufru (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5). Po zakoncentrování pomocí mikrokoncentrátoru (např. Centricon - 100®) se koncentrát obsahující DNA přenesou do mikrocentrifugační zkumavky a zředí na konečný objem 50 - 100 μ l pomocí TE pufru (Edson et al., 2004; Rennick et al., 2005; Foran, 2006).

3.4. Amplifikace mtDNA pomocí PCR

Pro amplifikaci DNA je využívána PCR, díky které je možné z malého množství DNA vytvořit mnoho kopií. PCR je in vitro replikace určitého úseku DNA pomocí polymerázy. Daný

úsek DNA, který se má namnožit, musí být na počátku a na konci označen primerem (úsekem DNA dlouhým několik bp důležitým pro nasednutí polymerázy) a v roztoku musí být přítomny všechny čtyři typy nukleotidů pro prodlužování nově vznikajícího řetězce.

V prvním kroku je DNA denaturována, tj. řetězce dvoušroubovice DNA se zahřátím oddělí. Templáty, oddělené řetězce, poté slouží k výrobě nových DNA řetězců. Nové řetězce se tvoří působením enzymů - polymeráz, které kopírují stávající řetězce. Při PCR se využívá Taq polymeráza. Proces je mnohokrát opakován a teoreticky se během každého cyklu počet kopií zdvojnásobí. V konečné fázi je vytvořeno i několik milionů kopií (Isenberg and Moore, 1999).

Optimální množství DNA pro amplifikaci pomocí PCR je 10 - 1000 pg, ale jelikož je DNA v extraktu v nestanovitelném množství, používá se pro iniciační PCR reakci 1 - 10 µl extraktu DNA. Používané množství je přizpůsobitelné podle následujících reakcí (Edson et al., 2004). Obvykle se používá 10% extraktu z 0,5 g vzorku kosti (Anslinger et al., 2001).

Tzv. amplifikační negativní kontrola neboli blank s 0% DNA se používá pro každou reakci pro vyloučení případné kontaminace.

Samotná PCR má několik fází:

- 1) Denaturace - DNA se po dobu průměrně 20 - 30 sekund zahřívá na teplotu 94 - 98°C. Při této teplotě se díky rozrušení vodíkových můstků rozvolňuje dvoušroubovice a odděluje se od navázaných primerů. Vzniká tak jednořetězcová DNA.
- 2) Nasednutí primerů - teplota se sníží na 50 - 65°C, což umožní nasednutí primerů na specifická místa DNA (viz obrázek č. 8). Na primery se poté naváže polymeráza.
- 3) Prodlužovací fáze - teplota použitá při této fázi závisí na použitém typu DNA polymerázy. Nejběžnější Taq polymeráza má optimum aktivity okolo 75 - 80°C. Při tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' ke 3' konci přirůstá vlákno komplementární k původní molekule DNA.

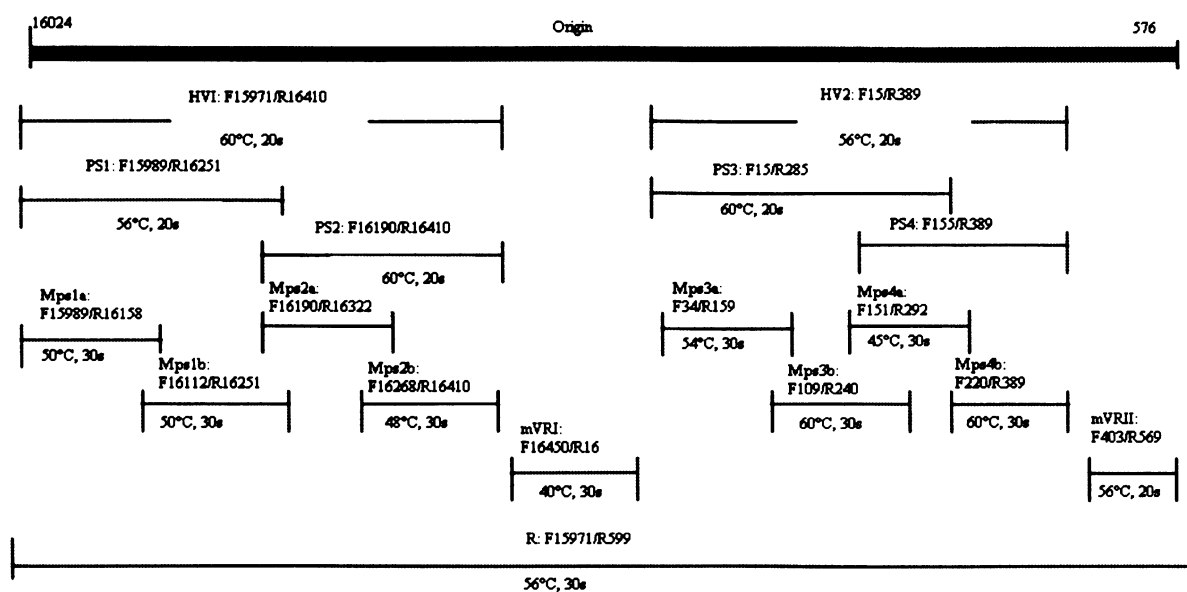
Jak již bylo zmíněno výše, je pro PCR možné určité rozpětí teplot, při kterých se jednotlivé kroky provádějí. Stejná variabilita platí i v rozsahu doby trvání jednotlivých kroků. Pro ilustraci uvádím tři postupy.

Postup při PCR podle Anslingera (Anslinger et al., 2001): pre - inkubace vzorku se provádí při 95°C po dobu 12 min, poté následuje 35 cyklů PCR (pro kost) při 95°C po dobu 30 s, 57°C nebo 60°C (podle typu používaného primeru) po dobu 40 s, 72°C po dobu 20 s a po proběhnutí všech cyklů ještě závěrečný prodlužovací krok 72°C po dobu 10 min.

Postup při PCR podle Bendera (Bender et al., 2000): pro amplifikaci HVI i HVII se použije Perkin Elmer TC1 thermocycleru, 50 µl PCR reakční směsi se vystaví následujícím podmínkám: 94°C po dobu 45 s na denuraci dvoušroubovice DNA, zchlazení na 52°C na dobu 30 s, zvýšení na 72°C po dobu 3 min a závěrečný prodlužovací krok 72°C na dobu 10 min.

Postup při PCR podle Hagelbergové (Hagelberg et al., 1991): provádí se 35 cyklů denaturace při 94°C po dobu 1 min, poté se sníží teplota na 55°C na dobu 1 min a následuje extenze na 74°C po dobu 1 min, PCR se provádí v Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler.

Výnos amplifikace se posléze obvykle kontroluje pomocí gelové elektroforézy prováděné na 1,5% agarózovém gelu a zobrazené pomocí ethidium bromidu (Anslinger et al., 2001; Bender et al., 2000). Pro vizualizaci výsledku je možné použít UV světla (Hagelberg et al., 1991). V některých případech je možné použít i 2% agarózový gel (napětí 90V na dobu přibližně 30 min), gel se po ukončení elektroforézy fotograficky zdokumentuje (Pfeiffer et al., 1998).



Obr. 8 Primery pro PCR používané AFDIL, jejich lokalizace vzhledem k sekvenci kontrolního úseku mtDNA, optimální teplota a čas. Pořadí bází je podle rCRS (Edson et al., 2004, upraveno).

3.4.1. Nested PCR

Jednou z možných variant vycházejících z PCR je tzv. nested PCR, která by měla snížit riziko nechtěné nescifické amplifikace nečekané vazebné sekvence pro primer. Jako častý problém klasické PCR se vyskytuje navázání primerů na chybné sekvence a následná amplifikace jiných úseků DNA. Nested PCR tedy obsahuje dvě sady primerů pro dvě po sobě následující PCR reakce. Nejprve se amplifikuje úsek, ve kterém je templátem genomická DNA. Při následné PCR (nested reakce) se jako templát použije produkt z předcházející reakce.

3.4.2. Mini primer sety

Další z používaných možností je tzv. AFDIL mini - primer set, nebo modifikovaný mini-primer set.

Tyto sety se využívají například v případech velmi zničených kosterních pozůstatků, kdy pomáhají zvýšit možnost úspěchu PCR amplifikace.

AFDIL mini - primer set obsahuje několik primerů, jejichž 3' konec je umístěn na nukleotidové pozici s vysokým výskytem polymorfismu (například primer F16 190 nasedá na polymorfismus na nukleotidové pozici 16 209 a R16 322 na nukleotidovou pozici 16 304). Tato místa výskytu polymorfismu mohou snížit úspěšnost PCR amplifikace a jsou nalézána s velkou frekvencí u různých rasových skupin (Monson et al., 2002). Pro modifikovaný mini-primer set byly primery vylepšeny s ohledem k délkové heteroplasmii v HVI a nukleotidové variabilitě kontrolního regionu (Lee et al., 2008).

Mini-primer sety byly vyvinuty především pro amplifikaci krátkých úseků DNA, například okolo 150 bp (Edson et al., 2004). Využity byly například při analýze mtDNA Neandrtálce (Krings et al., 1997).

3.5. Postamplifikační purifikace a kvantifikace DNA

Postamplifikační purifikace i kvantifikace DNA jsou přípravné kroky na následující sekvenaci DNA.

Purifikace se provádí ve filtračním zařízení, které odstraní přebytečná chemická činidla použitá pro PCR od samotného vzorku DNA.

Kvantifikace se provádí pomocí kapilární elektroforézy (CE). Při kapilární elektroforéze je porovnáváno množství DNA v produktu PCR se známým množstvím DNA, tzv. standardem pro stanovení koncentrace DNA ve vzorku amplifikovaném pomocí PCR. Při kvantifikaci se využívají negativní - blank i pozitivní kontroly - známá DNA, pro vyloučení možnosti kontaminace vzorku cizorodou DNA. (Isenberg and Moore, 1999).

3.6. Sekvence DNA

3.6.1. Sangerova metoda sekvenace

Pro sekvenaci DNA je v dnešní době možné použít několik metod. Jednou z nich je tzv. Sangerova metoda, neboli dideoxyterminační metoda (Sanger et al., 1977).

Cyklické sekvenování (Murray, 1989) má obdobný princip jako klasická PCR, ale jsou používány odlišné typy reagensií. Kromě normálních - deoxyribonukleotidových bází, které prodlužují rostoucí řetězec DNA, se používá i set terminačních - dideoxyribonukleotidových bází, které rostoucí řetězec ukončují (Sanger et al., 1977).

Principem metody je použití dideoxyribonukleotid trifosfátů - například ddTTP (2',3' - dideoxythymidin trifosfát), které mají inhibiční vliv na DNA polymerázu I. Tento inhibiční vliv je vyvolán navázáním ddT místo odpovídajícího dT (Thymidylic acid) do prodlužujícího se oligonukleotidového řetězce. Terminační báze neobsahují 3' - hydroxylovou skupinu, která je nutná pro navázání dalšího nukleotidu (Atkinson et al., 1969). Zvolíme-li vhodný poměr ddNTP ku dNTP (např. 1:100), získáme při sekvenaci fragmenty různé délky.

Čtyři specifické reakce běží vždy paralelně vedle sebe. Reakce jsou rozlišeny podle typu použitých dNTP a ddNTP. Normální deoxyribonukleotidové báze soutěží s alternativními dideoxyribonukleotidovými o začlenění do rostoucího řetězce DNA, což vede ke vzniku různých dlouhých fragmentů DNA lišících se v konečné podobě vždy o 1 bázi. Nově vzniklý řetězec ukončený terminátorovou bází má na svém konci značku, která je rozpoznána při později prováděné detekci. V minulosti se pro detekci používalo radioizotopové značení. V dnešní době se využívá fluorescence (Andréasson, 2005), a to fluorescenčně značených primerů nebo ddNTPs. Jestliže se použijí 4 odlišné barvy pro jednotlivé nukleotidy a neoznačí se primer, je možné reakci provádět v jedné zkumavce místo paralelního průběhu pro jednotlivé nukleotidy. Detekce probíhá pomocí laserového paprsku, který vyvolá emisi světla a pomocí aparátu je zachycena vlnová délka vyzářená fluoroforem.

Produkty sekvenace jsou rozdělovány podle své délky za použití gelové či kapilární elektroforézy. Při gelové elektroforéze putují fragmenty gelem pod vlivem elektrického napětí. Napětí musí být zvoleno tak, aby byl průběh elektroforézy dostatečně rychlý, ale nedocházelo k přehřívání gelu. Kratší produkty procházejí gelem rychleji, zatímco delší jsou bržděny omezenou velikostí pórů gelu (závisí na hustotě gelu). Všechny vzorky mají stejnou výchozí pozici a podle rychlosti jejich průchodu póry gelu je možné určit jejich délku. Při kapilární elektroforéze probíhá separace fragmentů ve velmi tenké skleněné kapiláře obsahující hydrofilní polymer. Kapilární elektroforéza se provádí při výrazně vyšším napětí než elektroforéza gelová. Detekce se provádí speciálním detektorem, např. CCD detektorem (Isenberg and Moore, 1999). Fragmenty jsou tak rozděleny podle délky lišící se na 3' konci vždy o jeden nukleotid (Sanger et al., 1977).

Při Sangerově sekvenaci je možné využít dvou typů terminačních trifosfátů - dideoxy derivátů nebo arabinonukleotidů. Arabinoza je stereoizomer ribozy, ve kterém je 3' - hydroxylová skupina orientována v trans pozici s respektováním 2' - hydroxylové skupiny. Pro úspěšnou sekvenaci je potřeba určitého poměru terminačních trifosfátů a klasických trifosfátů, protože jen část z terminačních bází se inkorporuje do konečného řetězce (Sanger et al., 1977). Pokud je koncentrace ddNTPs výrazně nižší než odpovídajících dNTP analogů, terminace syntézy se vyskytuje nepravidelně na všech pozicích templátu obsahující požadované báze

(Andréasson, 2005). Optimální poměr pro dideoxy deriváty je okolo 1:100 a pro arabinosylové deriváty okolo 1:5000 (Sanger et al., 1977).

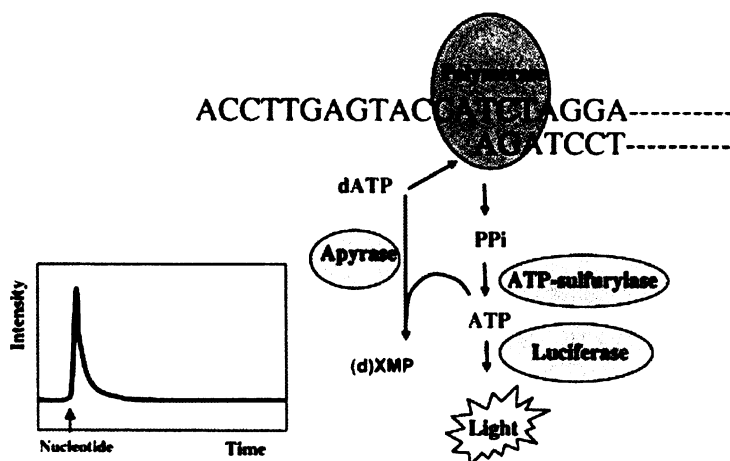
3.6.2. Pyrosekvenční analýza

Pyrosekvenční analýza (technologie) je další z možností sekvenace mtDNA. Je založená na principu sekvenace během syntézy a nevyužívá elektroforézu ani fluorescenční značky. Výhodou pyrosekvenční technologie je její jednoduchost a rychlost - výsledky mohou být během několika dní nebo častěji týdnů.

Pyrosekvenční analýza je prováděna v jednozkumavkovém formátu, ve kterém kaskáda enzymatických reakcí umožní inkorporaci nukleotidu a uvolněný pyrofosfát (PPi) způsobí vyzáření detekovatelného světla (Andréasson, 2005). Světlo se produkuje po enzymatické konverzi PPi, který je vyloučen po připojení nukleotidu do řetězce.

Nukleotidy se přidávají jednou za čas ve známém pořadí cyklicky nebo řízeně. Pokud se nukleotid nezapojí do řetězce, dojde k jeho degradaci pomocí enzymu apyrázy.

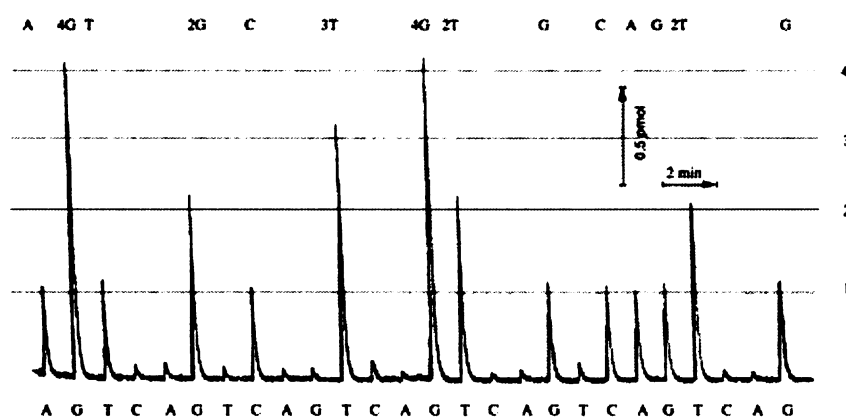
Produkované světlo je okamžitě detekováno pomocí CCD detektoru a množství uvolněného PPi a následně světelná intenzita je proporcí k počtu inkorporovaných nukleotidů. Světelná emise se znázorní jako pík v pyrogramu - píky reprezentují jednotlivé nukleotidy v templátovém řetězci. Pokud se za sebou vyskytnou dva nebo více stejných nukleotidů, znázorní se jako dvojitý pík případně proporcí větší pík - podle počtu nukleotidů (Andréasson, 2005).



Obr. 9 Schéma průběhu pyrosekvenční analýzy (Ronaghi, 2001).

Čtecí délka fragmentů je u pyrosekvenční technologie mnohem více limitována než u klasické Sangerovy sekvenace. V kontrastu se Sangerovou metodou sekvenace je možné pomocí pyrosekvenční technologie obržet i data z prvního nukleotidu těsně za primerem. Délka čteného fragmentu může být u pyrosekvenční technologie prodloužena pomocí různých strategií.

Například lze pro zvýšení čtecí délky a pro redukci signálů na pozadí k základnímu templátu přidat SSB (Ronaghi, 2000). Maximální délka přečtená pomocí pyrosekvenční technologie byla 100 nukleotidů (Andréasson, 2005).



Obr. 10 Pyrogram vyjadřující sekvenci mtDNA. V horním řádku je uvedena sekvence analyzované mtDNA, ve spodním řádku je uvedeno pořadí přidávaných nukleotidů (Ronaghi, 2001).

Využívají se také ještě další metody jako např. minisekvenování (Morley et al., 1999) a použití sekvenčně specifické hybridizace (Reynolds, 2000). Pro detekci sekvenčních variant v HVII se používá 17 sekvenčně specifických oligonukleotidů navázaných na proučcích nylonové membrány. Tyto metody jsou jednodušší na provedení, ale mají menší diskriminační možnosti než Sangerova sekvenace.

3.7. Vyhodnocování dat

7.1. Referenční sekvence

Lidský mitochondriální genom byl poprvé plně osekvenován v roce 1981 v laboratoři Fredericka Sangera v Cambridge v Anglii (Anderson et al., 1981). Během mnoha let byla tato sekvence používána jako referenční a vžilo se pro ni označení Cambridge Reference Sequence (CRS). Laboratoře prováděly porovnávání hlavně s L - řetězcem CRS.

V roce 1999 došlo k resekvenaci stejného materiálu, jaký použil i Anderson - placenty. Původní CRS obsahovala údaje o několika HeLa a hovězích sekvencích, které byly použity na vyplnění mezer způsobených nedokonalostí sekvenačních metod (Anderson et al., 1981). V nově resekvenované sekvenci bylo nalezeno celkem 11 chyb (viz tabulka č. 4). Jedna z nich byla ztráta cytosinu na pozici 3 106. Naštěstí nebyla nalezena žádná chyba v oblasti kontrolního regionu, takže CRS (Anderson, 1981) a revidovaná CRS (rCRS) (Andrews et al., 1999) byly uznány

shodnými v oblastech HVI a HVII, které jsou hojně využívány pro forenzní účely. rCRS se nyní používá jako referenční pro srovnávání vzorků. Samozřejmě zjištění jednoduchého nukleotidu v rCRS na pozici 3 105 (namísto CC v CRS) znamená zkrácení délky lidského mitochondriálního genomu na 16 568 bp (Andrews et al., 1999) namísto 16 569 bp v CRS (Anderson et al., 1981).

Nucleotide position	Previous sequence	Reanalysed sequence	Remarks
263	A	A	rare polymorphism
311-315	CCCCC	CCCCC	rare polymorphism
750	A	A	rare polymorphism
1,438	A	A	rare polymorphism
3,106-3,107	CC	C	error
3,423	G	T	error
4,769	A	A	rare polymorphism
4,985	G	A	error
8,860	A	A	rare polymorphism
9,559	G	C	error
11,335	T	C	error
13,702	G	C	error
14,199	G	T	error
14,272	G	C	error (bovine)
14,365	G	C	error (bovine)
14,368	G	C	error
14,766	T	C	error (HeLa)
15,326	A	A	rare polymorphism

Tab. 4 Chyby nalezené v CRS (Andrews et al., 1999).

Další z používaných referenčních sekvencí může být sekvence vytvořená Ingmanem, která má 16 571 bp a je sekvencí člověka afrického původu (Yoruba) (Ingman et al., 2000). Podle místa využití analýzy mtDNA tedy mohou být užity různé referenční sekvence (Butler, 2005).

3.7.2. Interpretace dat

Pro verifikaci dat ze sekvenovaného úseku se používá několik opakování analýzy toho samého templátu.

Po získání konečných dat se sekvence porovná se známou, nebo referenční sekvencí (viz 3.7.1.) pro zjištění rozdílů. Za shodu sekvencí je považován výskyt stejné báze (nebo obvyklé - nejčastější báze) na všech analyzovaných pozicích daného úseku DNA.

Výsledkem analýzy mohou být následující závěry:

- 1) vyloučení - pokud se našly dvě a více pozic s odlišnými nukleotidy mezi zkoumaným a referenčním vzorkem, je možné vyloučit původ z jedné společné maternální linie (Butler, 2005).
- 2) neprůkaznost - pokud se objeví pouze jeden odlišný nukleotid, není možné společný původ vyloučit, neboť je vždy potřeba počítat s případnou de - novo mutací (Parsons et al., 1997).
- 3) nevyloučení - pokud mají oba vzorky stejné báze v obvyklých pozicích nebo obvyklou délku v C - stretch (více viz 3.7.4.) v HVII, není možné vyloučení příbuznosti (Butler, 2005).

3.7.3. Heteroplasmie

Lidské tělo obsahuje triliony buněk (Isenberg and Moore, 1999) a každá z nich může obsahovat tisíce kopií mtDNA. Kompletní shoda v sekvenci mtDNA ve všech buňkách - tzv. homoplasmie - je tak velice nepravděpodobná. Nepravděpodobnost výskytu se zvyšuje i vzhledem k vyšší mutační rychlosti a horším opravným mechanismům mtDNA v porovnání s nDNA (Wallace et al., 1987).

U mtDNA je proto častý výskyt heteroplasmie - přítomnosti více variant nukleotidů na některých pozicích v rámci mtDNA. Můžeme najít dva typy heteroplasmie vyskytující se v mtDNA. Prvním typem je sekvenční (bodová) heteroplasmie, která znamená přítomnost více než jedné báze na určité pozici v sekvenci mtDNA. Druhým typem je délková heteroplasmie, tedy přítomnost více než jedné délky pásu stejné báze v sekvenci mtDNA (viz 3.7.4).

Heteroplasmie se může vyskytovat mezi buňkami, v rámci jedné buňky nebo dokonce i v rámci jedné mitochondrie (Wallace et al., 1987).

Heteroplasmie se v organismu může vyskytovat v několika formách:

- 1) jedinec může mít více než jeden typ mtDNA v rámci jedné tkáně
- 2) jedinec může vykazovat rozdílný typ mtDNA v jedné tkáni a jiný typ ve druhé tkáni
- 3) jedinec může být v jednom typu tkáně heteroplasmický jinak než v jiném typu tkáně

(Carracedo et al., 2000).

Sekvenční i délková heteroplasmie byly publikovány v literatuře (Bendall and Sykes, 1995; Melton, 2004). Délková heteroplasmie se často vyskytuje v okolí homopolymerních C - řetězců (více 7.3.4.) v HVI (Stewart et al., 2001). Sekvenční heteroplasmie je typicky detekována pomocí přítomnosti dvou nukleotidů na jediném místě, které se ukáže jako překrývající se píky na sekvenačním elektroforetogramu.

Hotspots pro vznik heteroplasmie zahrnují především tyto pozice: 16 093, 16 129, 16 153, 16 189, 16 192, 16 293, 16 309 a 16 337 v HVI (Stoneking, 2000) a 72, 152, 189, 207 a 279 v HVII (Calloway et al., 2000).

V případě výskytu heteroplasmie na stejné pozici jak ve vzorku tak ve známé sekvenci dojde k tzv. umlčení heteroplasmie. Stupeň heteroplasmie se také může lišit podle různých buněčných typů. Tento jev je možné vysvětlit díky různému vzniku buněk v rámci organismu. Pokud rozdílné buněčné typy (tkáně) vykazují heteroplasmii s přítomností běžných bází na všech pozicích, jedná se o shodu sekvencí a nemůže být vyloučen původ od stejného zdroje z mateřské linie. Pokud se ve vzorku vyskytne heteroplasmie, může být dodatečně odebrán ještě nový referenční vzorek pro zjištění výskytu heteroplasmie i v jiných buněčných typech (Isenberg and Moore, 1999).

Podle některých výzkumů se procentuální výskyt heteroplasmie v rámci jedince může lišit podle typu tkáně, například ve svazech je procento výskytu nejvyšší. Některými výzkumy byla prokázána i pozitivní korelace mezi procentuálním výskytem heteroplasmie a věkem jedince (Calloway et al., 2000). Naproti tomu v jiné studii bylo prokázáno, že heteroplasmie v lidském mtDNA kontrolním regionu zůstává konstantní během celého života, dědí se od matky a není výsledkem somatické, na věku závislé akumulace (Lagerstrom - Fermér et al., 2001).

3.7.4. C - stretch

C - stretch - jsou pásy nukleotidů cytosinu, nacházející se jak v HVI tak v HVII. K nejdelším patří úsek 16184 - 16193 v HVI s vmezeřeným T na pozici 16189 (podle CRS), který je někdy nahrazen C a vyniká tak řada 10C. V HVII se obdobný úsek nachází na pozici 303 - 315, s vmezeřeným T na pozici 310 (CRS), který může být po transici C a poté vzniká homopolymerní C - řetězec (Bendal and Sykes, 1995) .

Přítomnost homopolymerního řetězce způsobuje problémy při nasednutí polymerázy a následné syntéze nového řetězce podle daného templátu. Tato skutečnost vede k tvorbě délkové heteroplasmie po transici T → C v oblasti HVI s 8 - 14 C.

Viditelné je i zhoršení sekvenace a jejích výsledků za dlouhým C pásem. Pokud se pás ve vzorku vyskytuje, používají se odlišné primery pro úspěšnou sekvenaci této oblasti, případně mohou být prováděny dvě na sobě nezávislé reakce pro získání dvojitých výsledků pro tu samou nukleotidovou sekvenci (Butler, 2005).

3.7.5. Zápis mutací v mtDNA

Inzerce, tady vepsání jednoho nebo více nukleotidů vzhledem k rCRS, se vyjadřují od 5' konce nejbližší oblasti, kde se inzerce vyskytla, pomocí tečky a čísla 1 pro první inzerci, 2 pro druhou, pokud se vyskytne, atd., a písmene označující přidaný nukleotid (Carracedo et al., 2000). Například označení 315.1C znamená, že po sekvenci v oblasti 310 - 315, kde je podle obvyklé sekvence v rCRS pětkrát za sebou C (Andrews et al., 1999), se vyskytuje ještě jeden C (.1C), vepsaný na pozici 316 (Carracedo et al., 2000).

Delece neboli ztráta jednoho nebo více nukleotidů se naopak může značit různými způsoby - pomocí minus (-), D, d nebo del s pozicí nukleotidu, kde k deleci došlo, vzhledem k rCRS. Například 309 -, 309 D nebo 309 del (Butler, 2005).

Kromě inzercí a delecí se ještě v mtDNA vyskytují nukleotidové substituce, mezi které patří transice a transverze. Transice je záměna stejného typu nukleotidu, tzn. purinu za purin (A, G) nebo pyrimidinu za pyrimidin (T, C). Transverze je naopak záměna jednoho typu nukleotidu za

druhý. Zápis substitučních mutací může být různý. Nejčastěji se za nukleotidovou pozici napíše značka nového nukleotidu, například 16 429 T, nebo se změna označí šipkou, například 16 438 G → A (Carracedo et al., 2000).

3.8. Databáze mtDNA

Údaje o nukleotidové sekvenci mtDNA mohou být ukládány a porovnávány v databázích. Tato data bývají v laboratorních databázích rozdělena do dvou sekcí - forenzní a veřejné (Miller and Budowle, 2001). V každé ze sekcí jsou profily zaznamenávány jako odlišnosti od CRS (Anderson et al., 1981). Všechny profily zařazené do databáze musí jako minimum obsahovat sekvence HVI a HVII (Monson et al., 2002). Forenzní skupina se skládá z anonymních populačních profilů vytvořených spolupracujícími laboratořemi, přičemž každá laboratoř musí provést množství kontrol, než je možné zařadit sekvenci do databáze. Veřejná sekce databází se skládá především z dat publikovaných ve vědecké literatuře, v genetické databázi můžeme najít data z GenBank a EMLB. Všechna takto získaná data jsou zkatalogizována do jednotné formy - jsou přezkoumána po jednotné stránce zápisu a porovnávána s ostatní literaturou, aby se vyloučila možnost chyby nebo duplikace dané sekvence. I přesto nejsou veřejná data podrobována stejným kvalitativním standardům jako data forenzní. Veřejná data slouží především pro informace o rozšíření populačních skupin, které nejsou obsaženy ve forenzní části, a k výzkumným účelům.

Tzv. nukleotidové profily jsou v obou částech vždy unikátně označeny podle systematického schématu. Každý profil je označen identifikátorem a příslušnou citací literatury. Pokud je to možné, každý profil je indexován označením populační skupiny původu vzorku, stejně jako kontinentem, zemí původu, regionem nebo druhovým původem. Miller a Budowle ve své práci doporučují pro určení daného profilu používání standardního čtrnáctimístného kódu. Základní podoba kódu je XXX.YYY.ZZZZZZ. První tři písmena (XXX) označují zemi původu. Pro označení se používají mezinárodní kódy pro danou zemi, například CZE. Druhá tři písmena (YYY) vyjadřují skupinu nebo etnikum, ze které profil pochází. Pro označení se používají písmena nebo číselné kódy. Posledních šest písmen (ZZZZZZ) je sekvenční číslo daného profilu. (Miller and Budowle, 2001).

3.9. Kvalita práce v laboratoři - důležité aspekty analýzy

Forenzní mtDNA analýza používá několik vysoce citlivých technologií. Díky tomu může dojít k úspěšné analýze i při obdržení jen několika kopií mtDNA ze vzorku - pokud je vzorek

extrémně zničený. Přítomnost vnější kontaminující DNA může být proto naprosto zničující pro celý proces. I jakékoliv minimální množství zanesené DNA může znamenat chybnou interpretaci pozdějších výsledků analýzy a sekvenace vzorku. Z těchto důvodů je potřeba provádět taková opatření, aby ke kontaminaci nedošlo (Isenberg, 2000)

Během analýzy mtDNA se provádí mnoho kroků, které by měly zajistit ochranu před případnou kontaminací cizorodou DNA. Jedním z kroků pro zajištění nekontaminovaného prostředí je analýza DNA všech pracovníků v laboratoři. Tento krok se provádí pro případ určení zdroje případné kontaminace. Samozřejmostí je použití ochranných prostředků, jako jsou rukavice, laboratorní plášť a aerosol - resistantní pipetové špičky (Handt et al., 1996).

Během analýzy se vždy pracuje pouze s jednou položkou. Zjišťovaný vzorek je vždy zkoumán mimo známý referenční vzorek, aby se zabránilo přenesení DNA (tzv. cross - kontaminaci) a znehodnocení získaných výsledků. Preamplifikační a postamplifikační místa bývají fyzicky oddělena. Zabrání se tak přenesení amplifikované DNA do neamplifikovaného vzorku. Instrumenty, jako jsou např. pipety, a pracovní prostředí se dekontaminují pomocí isopropanolu, 10% bělicí lázně, UV záření (Handt, et al., 1996) nebo kombinací uvedených možností. Tyto dekontaminační kroky mají největší význam v době před extrakcí a amplifikací DNA.

Při extrakci i amplifikaci vzorku se využívá již dříve zmíněný blank, neboli negativní kontrola - směs všech použitých reagensů bez přítomnosti DNA ze vzorku. Negativní kontrola projde všemi kroky jako analyzovaný vzorek. Pokud je ve výsledcích v negativní kontrole přítomna jakákoliv sekvence, je zřejmé, že došlo k zanesení cizorodé DNA do vzorků a že analýzu je třeba opakovat.

Kvůli velké citlivosti amplifikačního procesu analýzy mtDNA může dojít k amplifikaci i minimálního množství mtDNA obsažené v blanku na detekovatelnou hranici. Většina této DNA není dostatečně kvalitní pro analýzu, ale i přesto projde dvojnásobným nezávislým zkoumáním, než je určena jako neanalyzovatelná.

Pozitivní kontroly obsahující známou DNA se využívají během amplifikačního a sekvenačního kroku pro monitorování správného průběhu těchto kroků. Není možné pokračovat v analýze mtDNA, pokud pozitivní kontrola selže během amplifikace, při sekvenaci nebo v obou případech.

Pokud se povedou všechny kroky analýzy, je při sekvenačním kroku prováděna sekvenace ve dvou směrech - za použití obou dvou řetězců DNA molekuly. V případě shody jsou oba řetězce analyzovány nezávisle nejméně dvěma vědci a všechny výsledky jsou zaznamenávány (Isenberg and Moore, 1999).

4. Kazuistika

4.1. Romanovci

Ruský car Nikolaj II. s rodinou byli zabiti v průběhu Bolševické revoluce v roce 1918. Po smrti byla jejich těla zohavena pomocí kyseliny sírové, aby nemohlo dojít k jejich identifikaci a zakopána do mělké jámy pod silnici.

V roce 1991 bylo blízko města Jekatěrinburg v Rusku nalezeno celkem 9 koster. Díky zničení faciálních částí lebky nebyla možná identifikace klasickými technikami pomocí rekonstrukce obličeje nebo komparací odontologických záznamů. K identifikaci byla nakonec využita analýza nDNA a některých STR lokusů.

Pro analýzu bylo použito okolo 1g kosti, což zahrnovalo přibližně 50pg DNA - množství dostačující pro provedení PCR. Byly potvrzeny příbuzenské svazky - muž, žena a jejich tři děti, což odpovídalo vzorci carské rodiny. Pohřbeni byli pravděpodobně se třemi sluhy a rodinným doktorem - u dalších čtyř koster nalezených v masovém hrobě nebyla zjištěna žádná shoda s ostatními.

I když byla podle shodnosti alel potvrzena příbuznost pěti kosterních pozůstatků, nebylo stále prokázáno, zda se jedná o Romanovce. Na řadu proto přišla analýza mtDNA. Pro analýzu byly využity vzorky z kosti stehenní všech srovnávaných koster a byla provedena sekvenace. Jako srovnávací vzorek sloužil krevní vzorek příbuzného po mateřské linii, kterým byla Jeho královská výsost Princ Filip, vévoda Edinburský a manžel královny Alžběty, jenž je prasnynovcem carevny Alexandry v nepřerušené mateřské linii.

Testováním prošlo celkem 740 nukleotidů z mtDNA kontrolní oblasti a všechny testované nukleotidy byly shodné mezi Princem Filipem, domnělou carevnou a jejími třemi dětmi.

MtDNA domnělého cara Nikolaje II. byla porovnávána s krevním vzorkem jeho dvou příbuzných po nepřerušené mateřské linii. Sekvence mtDNA domnělého cara Nikolaje II a dvou příbuzných byly shodné až na nukleotidovou pozici 16 196. Ostatky měly na této pozici směs dvou nukleotidů (C a T), tedy výše zmíněnou heteroplasmii, zatímco vzorky příbuzných obsahovaly na dané pozici pouze T.

Pro srovnání byly proto ještě exhumovány ostatky carova bratra velkovévody Ruského Gregorije Romanova. I u něj byla nalezena přítomnost směsi nukleotidů C a T na pozici 16 196. (Ivanov et al., 1996). Protože pravděpodobnost výskytu heteroplasmie na stejném místě u dvou nepřibuzných jedinců je vysoce nepravděpodobná, nalezené ostatky byly prohlášeny za autentické ostatky cara a jeho rodiny (Ivanov et al., 1996; Stone, 2004).

4.2. Jesse James

Jesse James, legendární americký psanec, který bojoval během Občanské války v Americe a po jejím skončení pokračoval v přepadávání vlaků a bank, byl zabit 3. dubna 1882 členem bratrova gangu. Jeho ostatky byly pod jménem Thomas Howard pohřbeny v rodném městě na pozemku farmy jeho rodiny, aby nemohlo dojít k jejich znesvěcení. V roce 1902 byly ostatky exhumovány, uloženy do nové rakve a pohřbeny na hřbitově.

V roce 1978 původní hrob na rodinné farmě znovu otevřen a byly nalezeny vlasy a další artefakty. V roce 1995 byly exhumovány ostatky umístěné na hřbitově. Jak rakev, tak ostatky byly ve velmi špatném, fragmentárním stavu.

Pro testy byly využity i vlasy nalezené v původním umístění ostatků. Jako srovnávací vzorky sloužily krevní vzorky od příbuzných po mateřské linii - pravnuka a prapranuka sestry Jesseho Susan.

Pro analýzu byly využity vzorky kosterních pozůstatků pocházející z kosti holenní, stehenní a čtyř zubů - tří stoliček a jednoho špičáku. Analýza z kosterních vzorků však nebyla úspěšná, nebyly získány žádné detekovatelné produkty PCR a výsledek se neobjevil ani na agarózovém gelu barveném ethidium bromidem. Neúspěch analýzy mohlo mít hned několik příčin, některými z nich mohlo být vlhko a nepatrně kyselá půda na hřbitově, ve které byly ostatky uloženy více než 90 let.

Jelikož mtDNA se lépe dochovává v zubech než kostech, není překvapením, že analýza byla úspěšná právě ze zubů a to u dvou stoliček. Špičák nebyl dostatečně zachovalý, z jeho povrchu se olupovaly jednotlivé vrstvy dentinu.

Celkem byla analýzou získána sekvence 302 nukleotidů, odpovídající pozici 16 055 -16 356 v referenční sekvenci (Anderson et al., 1981). Odlišnosti od CRS byly nalezeny celkem v pěti nukleotidech. Obdržená sekvence byla porovnána se sekvencí z krevních vzorků dvou příbuzných po mateřské linii a shodovala se, čímž se potvrdila domněnka, že nalezené ostatky náleží Jessemu Jamesovi. Samozřejmě nelze vyloučit možnost, že šlo o jiného příbuzného po mateřské linii nebo o nepříbuzného jedince, který měl stejnou sekvenci mtDNA, nicméně je to velice nepravděpodobné (Stone et al., 2000).

4.3. Martin Bormann

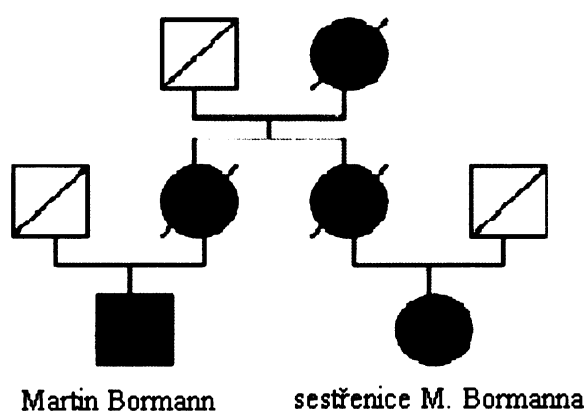
Martin Bormann byl jako osobní sekretář Adolfa Hitlera druhým nejmocnějším mužem Třetí říše. Na konci Druhé světové války v květnu 1945 se rozhodl uprchnout z Německa. Po jeho útěku s několika spolupracovníky z Hitlerova bunkru v Berlíně již nebyl nikým spatřen. Podle

svědků spáchal sebevraždu v blízkosti železniční stanice blízko města Lehrter, a to pravděpodobně požitím jedu.

V roce 1972 byly v blízkosti Lehrterské železniční stanice nalezeny ostatky dvou mužů. Podle zubních a kosterních záznamů bylo určeno, že jeden z nich by mohl být Martin Bormann.

V roce 1996 byla provedena i genetická analýza. Jako srovnávací vzorek byl použit krevní vzorek 83 leté sestřenice Bormanna z matčiny strany.

Vzorky byly odebrány ze střední části pravé kosti stehenní (femuru) a levé kosti holenní (tibiae). Po provedení analýzy a srovnání se vzorkem poskytnutým příbuznou po mateřské linii byla nalezena v obou vzorcích shoda, což potvrzuje hypotézu, že nalezené ostatky patří Martinu Bormannovi (Anslinger et al., 2001).



Obr. 11 Genealogické schéma rodiny Martina Bormanna (Anslinger et al., 2001, upraveno).

Závěr

Analýza mitochondriální DNA ze zubní a kosterní tkáně může být užitečná v mnoha oborech. Vzhledem k vlastnostem obou tkání je vysoce pravděpodobné zachování mtDNA a možnost její následné analýzy. Pro samotnou analýzu je důležitý nejen stav analyzované tkáně, ale velkou měrou i vhodně zvolená metoda, která by neměla poškodit obsaženou mtDNA. Je proto nutné vždy posuzovat situaci podle konkrétního případu a pečlivě zvažovat všechna pro a proti námi zvolené metody. V dnešní době se zdokonalují i metody amplifikace a je tak možné amplifikovat i části velice poničené mtDNA. Všechny tyto skutečnosti napomáhají objasnit mnoho téměř promlčených zločinů, příbuzenských vztahů i dávný původ člověka. Jako velká výhoda mtDNA se v těchto případech projevuje maternální dědičnost mitochondriálního genomu, která nepodléhá rekombinaci a umožňuje tak srovnání i vzdálenějších příbuzných po mateřské linii.

Seznam použité literatury:

- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R. and Young, I. G.** (1981). Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.
- Andréasson, H.** (2005). Sensitive Forensic DNA analysis, Application of Pyrosequencing and Real-time PCR Quantification. Acta Universitatis Upsaliensis.
- Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M. and Howell N.** (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23, 147.
- Anslinger, K., Weichhold, G., Keil, W. and Bayer, B.** (2001). Identification of the skeletal remains of Martin Bormann by mtDNA analysis. *Int J Legal Med* 114, 194-196.
- Atkinson, M. R., Deutscher, M. P., Kornberg, A., Russell, A. F. and Moffatt, J. G.** (1969). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. XXXIV. Termination of Chain Growth by a 2', 3' -ideoxyribonucleotide. *Biochemistry* 8, 4897-4904.
- Bendall, K. E. and Sykes, B. C.** (1995). Length Heteroplasmy in the First Hypervariable Segment of the Human mtDNA Control Region. *Am J Hum Genet* 57, 248-256
- Bender, K., Schneider, P. M. and Rittner, Ch.** (2000). Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *For Sci Int* 113, 103-107.
- Bromham, L., Eyre-Walker, A., Smith, N. H. and Smith, J. M.** (2003). Mitochondrial Steve: paternal inheritance of mitochondrial in humans. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 2-4.
- Butler, J. M.** (2005) Forensic DNA typing - biology, technology and genetics of STR markers, 2nd edition. Elsevier Academic Press, 241-299.
- Calloway, C. D., Reynolds, R. L., Herrin, G. L. Jr., and Anderson, W. W.** (2000). The Frequency of Heteroplasmy in the HVII Region of mtDNA Differs across Tissue Types and Increases with Age. *Am J Hum Genet* 66, 1384–1397.
- Carracedo, A., Bär, W., Lincoln, P., Mayr, W., Morling, N., Olaisen, B., Schneider, P., Budowle, B., Brinkmann, B., Gill, P., Holland, M., Tully, G. and Wilson, M.** (2000). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNATyping. *For Sci Int* 110, 79-85.
- Davoren J., Vaněk D., Konjhodzic R., Crews J., Huffine E., Parsons TJ.** (2007). Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J* 48, 478-485.

- Edson, S. M., Ross, J. P., Coble, M. D., Parsons, T. J. and Barritt, S. M.** (2004) Naming the dead - conforming the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. *Forensic Sci Rev*
- Foran, D. R.** (2006). Relative degradation of nuclear and mitochondrial DNA: an experimental approach. *J Forensic Sci* 51, 766-770.
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M. and Wallace, D. C.** (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Genetics, Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 6715-6719.
- Gyllensten, U., Wharton, D., Josefsson, A. and Wilson, A. C.** (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352, 255-257.
- Hagelberg, E., Bell, L. S., Allen, T., Boyde, A., Jones, S. J., Clegg, J. B., Hummel, S., Brown, T. A. and Ambler, R. P.** (1991) Analysis of ancient bone DNA: Techniques and applications. *Philosophical Transaction: Biological Sciences* 333, 399-407.
- Hagelberg, E. Clegg, J. B.** (1991). Isolation and characterization of DNA from archeological bone. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 244, 45-50.
- Handt, O., Krings, M., Ward, R. H. and Pääbo, S.** (1996) The retrieval of ancient human DNA sequence. *Am J Hum Genet* 59, 368-376.
- Höss M., and Pääbo S.** (1993). DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res.* 21, 3913-3914.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S. and Gyllensten, U.** (2000). Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 408, 708-713.
- Isenberg, A. R. and Moore, J. M.** (1999). Mitochondrial DNA analysis at the FBI Laboratory. *Forensic Sci Commun* 1.
- Isenberg, A. R.** (2002). Forensic mitochondrial DNA analysis: A different crime-solving tool. *FBI Law Enforcement Bulletin*
- Ivanov, P. L., Wadhams, M. J., Roby, R. K., Holland, M. M., Weedn, V. W. and Parsons, T. J.** (1996). Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat Genet* 12, 417 - 420.
- Jelínek, R., Dostál, M., Likovský, Z., Halašková, M., Maňáková, E., Peterka, M., Peterková, R., Titlbach, M., Velický, J. a Zemanová, Z.** Histologie a embryologie. 75-81, 170-172. Nevydaná skripta, dostupná na http://old.lf3.cuni.cz/ustavy/histologie/doc/Skripta_00.pdf
- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R. W., Krainitzki, H., Stoneking, M. and Pääbo, S.** (1997). Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans. *Cell* 90, 19-30.
- Lagerström-Fermér, M., Olsson, C., Forsgren, L. and Syvänen, A.** (2001). Heteroplasmy of the Human mtDNA Control Region Remains Constant during Life. *Am J Hum Genet* 68, 1299-1301.

- Lee, H. Y., Kim, N. Y., Park, M. J., Yang, W. I. and Shin, K.-J.** (2008). A modified mini-primer set for analyzing mitochondrial DNA control region sequence from highly degraded forensic samples. *Biotechniques* 44, 555-558.
- Lutz, S., Wittig, H., Weisser, H.-J., Heizmann, J., Junge, A., Dimo-Simonin, N., Parson, W., Edelmann, J., Anslinger, K., Jung, S. and Augustin, C.** (2000). Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *For Sci Int* 113, 97-101.
- Melton, T.** (2004). Mitochondrial DNA heteroplasmy. *Forensic Sci Rev* 16, 1-20.
- Michaels, G. S., Hauswirth, W. W. and Laipis, P. J.** (1982). Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. *Dev Biol* 94, 246-251.
- Miller, K. W. P. and Budowle, B.** (2001). A compendium of human mitochondrial DNA control region: Development of an international standard forensic database. *Croat Med J* 42, 315-327.
- Monson, K. L., Miller, K. V. P., Wilson, M. R., DiZinno, J. A. and Budowle, B.** (2002). The mtDNA population database: an integrated software and database resource for forensic comparison. *Forensic Sci Commun* 4.
- Morley, J. M., Bark, J. E., Evans, C. E., Perry, J. G., Hewitt, C. A. and Tully, G.** (1999). Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. *Int J Legal Med* 112, 241-248.
- Mörnstad, H., Pfeiffer, H., Yoon, C. and Teivens, A.** (1999). Demonstration and semi-quantification of mtDNA from human dentine and its relation to age. *Int J Legal Med* 112, 98-100.
- Murray, V.** (1989). Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 14, 8889.
- Nelson, K. and Melton, T.** (2007). Forensic mitochondrial DNA analysis of 116 casework skeletal samples. *J Forensic Sci* 52, 557-561.
- Parsons, T. J., Muniec, D. S., Sullivan, K., Woodyatt, N., Alliston-Greiner, R., Wilson, M. R., Berry, D. L., Holland, K. A., Weedn, V. W., Gill, P. and Holland, M. M.** (1997). A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat Genet* 15, 363-368.
- Pfeiffer, H., Steighner, R., Fischer, R., Mörnstad, Yoon, C.-L. and Holland, M. M.** (1998) Mitochondrial DNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in a Korean population. *Int J Legal Med* 111, 309-313.
- Rennick, S. L., Fenton, T. W. and Foran, D. R.** (2005). The effects of skeletal preparation techniques on DNA from human and non-human bone. *J Forensic Sci* 50, 1016-1019.

- Reynolds, R., Walker, K., Varlaro, J., Allen, M., Clark, E., Alavaren, M. and Erlich, H.** (2000). Detection of sequence variation in the HVII region of the human mitochondrial genome in 689 individuals using immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *J Forensic Sci* 45, 1210-1231.
- Robin, E. D. and Wong, R.** (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology* 136, 507-513.
- Rohland, N. and Hofreiter, M.** (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Biotechniques* 42, 343-352 .
- Ronaghi, M.** (2000). Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein. *Anal Biochem* 268, 282-288.
- Ronaghi, M.** (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 11, 3-11.
- Sampietro, M. L., Caramelli, D., Lao, O., Callafell, F., Comas, D., Lari, M., Agustí, B., Bertranpetit, J. and Lalueya/Fox, C.** (2005). The genetics of the Pre-Roman Iberian Peninsula: a mtDNA study of ancient Iberians. *Annals of Human Genetics* 69, 535-548.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry, Proc. Natal. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Satoh, M. and Kuroiwa, T.** (1991) Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* 196, 137-140.
- Shimora, C. Y., Fielding, Ch. G., Lewis, J. A., Gleisner, M. R. and Dunn, K. N.** (2004). A minimally destructive technique for sampling dentin powder for mitochondrial DNA testing. *J Forensic Sci* 49, 791-795.
- Schwartz, M. and Vissing, J.** (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *A Engl J Med* 347, 576-580.
- Steadman, D. W., DiAntonio, L. L., Wilson, J. J., Sheridan, K. E. and Tammariello, S. P.** (2006). The effects of chemical and heat maceration techniques on the recovery of nuclear and mitochondrial DNA from bone. *J Forensic Sci.* 51, 11-17.
- Stewart, J. E., Fisher, C. L., Aagaard, P. J., Wilson, M. R., Isenberg, A. R., Polanskey, D., Pokorak, E., DiZinno, J. A. and Budowle, B.** (2001). Length variation in HV2 of the human mitochondrial DNA control region. *J Forensic Sci* 46, 862-870.
- Stone, A. C., Starrs, J. E. and Stoneking, M.** (2001) Mitochondrial DNA analysis of the presumptive remains of Jesse James. *J Forensic Sci* 46, 173-176.
- Stone, A. C. and Stoneking, M.** (1998). MtDNA analysis of prehistoric Oneota population: Implications of the peopling of the New World. *Am J Hum Genet* 62, 1153-1170.
- Stone, R.** (2004). Buried, Recovered, Lost Again? The Romanov May Never Rest. *Science* 303, 753.

- Stoneking, M.** (2000). Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. *Am J Hum Genet* 67, 1029-1032.
- Sutovsky, P., Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. and Schatten, G.** (1999). Development: Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402, 371-372.
- Szibor, R., Michael, M., Spitsyn, V. A., Plate, I., Ginter, E. K. and Krause, D.** (1997). Mitochondrial D-loop 3' (CA)_n repeat polymorphism: optimization of analysis and population data. *Electrophoresis* 18, 2857-2860.
- Tamarin, R. H.** (2001). Principles of genetics, 7th edition. The McGraw–Hill Companies, 51-515.
- Voet D. and Voet J.** (1995) Biochemie. Victoria, Praha, 592-595.
- Wallace. D. C., Brown, M. D. and Lott, M. T.** (1999). Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238, 211-230.
- Wallace, D. C., Ye, J., Neckelmann, S. N., Singh, G., Webster, K. A. and Greenberg, B. D.** (1987). Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase β subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Current Genetics* 12, 81-90.
- Yang, D. Y., Eng, B., Wayne, J. S., Dudar, J. Ch. and Saundres, S. R.** (1998) Technical Note: Improved DNA Extraction From Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns. *Am J Phys Antropol* 105, 53-543.
- Zhao, X., Li, N., Guo, W., Hu, X., Liu, Z., Gong, G., Wang, A., Feng, J. and Wu, C.** (2004) Further evidence paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). *Heredity* 93, 399-403.

Internetové zdroje:

- <http://www.cartage.org.lb/en/themes/sciences/zoology/AnimalPhysiology/Anatomy/AnimalCellStructure/Mitochondria/Mitochondria.htm>
- <http://homepage.mac.com/myers/misc/bonefiles/bonestruct.gif>
- http://training.seer.cancer.gov/module_anatomy/unit3_2_bone_tissue.html
- <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/images/ency/fullsize/1121.jpg>