

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
Katedra antropologie a genetiky člověka

**STR genotypizace středověké české populace:  
polykulturní lokalita Mlékojedy (okr. Litoměřice)**

Diplomová práce

Autor

Veronika Brynychová

Vedoucí diplomové práce

Mgr. Martin Hájek, Ph.D.

Praha 2010

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím literatury uvedené v seznamu.

V Praze, dne .....

.....

Podpis

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Martinu Hájkovi, Ph.D., za vyčerpávající množství cenných rad a praktických zkušeností, které mi během práce předal, a za jeho trpělivost a ochotu při poskytování odborných konzultací.

Dále děkuji Dr. Kryštofu Dernerovi za inspirující konzultace z oblasti archeologie a poskytnutí všech archeologických a antropologických dat týkajících se pohřebiště Mlékojedy. Nakonec srdečně děkuji RNDr. Broučkovi, RNDr. Štěpánce Hrdé a Mgr. Pavlu Munclingerovi, Ph.D., za teoretickou i technickou podporu, bez které by tato práce vznikala jen velmi obtížně.

Tato práce byla vypracována v Laboratořích archeogenetiky Archeologického ústavu AV ČR, Praha, v. v. i. a částečně v Laboratoři sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty UK v Praze.

## **ABSTRAKT**

Cílem této diplomové práce byla prvotní genetická charakteristika souboru jedinců raně středověkého pohřebiště (polykulturní lokalita Mlékojedy, okr. Litoměřice, Česká republika). Metoda autozomálních STR markerů byla zvolena pro vysokou diskriminační schopnost, zvláště vhodnou pro studie genetické diverzity a příbuzenské analýzy u malých souborů. Nespornou výhodou byla také možnost validace získaných výsledků vzhledem k riziku kontaminací. Za účelem získání co nejširšího rozsahu genotypů byly použity primery pro amplifikaci zkrácených STR lokusů (miniSTR). Opakovatelně se podařilo amplifikovat jadernou DNA z 35 % kostních vzorků a 91 % zubů. Úspěšnost PCR amplifikace se úměrně snižovala s nárůstem délky fragmentů nad 150 bp. Zároveň jsme zaznamenali vysokou míru alelového drop-outu, která svědčí o vysoké degradaci aDNA. Věrohodné genotypy markeru TH01 se podařilo stanovit jen u dvanácti z celkového počtu 23 jedinců. Získané výsledky jsou diskutovány v porovnání s recentními populacemi a dalšími aDNA studii historických pohřebišť.

**Klíčová slova:** ancient DNA, STR markery, miniSTR, raně středověké pohřebiště, česká populace

## **ABSTRAKT**

The aim of this diploma thesis was the initial genetic analysis of early mediaeval burial site from Mlekojedy polycultural locality (Litoměřice District, Czech Republic). Autosomal STR markers were chosen because of the following reasons. The high degree of polymorphism of these markers and the high extent of heterozygosity favor the use of STRs instead of mitochondrial DNA for the structural analysis of small populations. Usefulness of STR typing for validation purposes was demonstrated many times before. We used primers for miniSTRs to obtain the fullest results. Nuclear DNA was extracted from 35 % of bone samples and 91 % of teeth. We detected lower PCR amplification success rate of fragments longer than 150 bp and very high rate of allele drop-out which is sign of degraded DNA. Twelve reliable genotypes were determined for TH01 marker. Observed allele frequency and genetic diversity values were discussed in comparison with recent populations and other aDNA studies of burial sites.

Keywords: ancient DNA, STR markers, miniSTR, early medieval burial site, Czech population

# Obsah

1	ÚVOD.....	8
1.2	Polykulturní lokalita Mlékojedy .....	10
1.2.1	Litoměřicko v mladší době hradištní.....	10
1.2.2	Archeologický a antropologický výzkum .....	10
1.3	Genetické markery aDNA analýz .....	11
1.3.1	Mitochondriální DNA .....	12
1.3.2	Amelogenin .....	13
1.3.3	Jednoduché nukleotidové polymorfizmy .....	14
1.3.4	Krátké tandemové repetice.....	14
1.4	Autozomální STR v oboru aDNA.....	15
1.4.1	Identifikace a příbuznost na úrovni rodiny.....	16
1.4.2	Příbuznost na úrovni skupin.....	16
1.4.3	Genetická diverzita pohřebišť .....	17
1.5	Problematika aDNA studií .....	19
1.5.1	Fragmentárnost biologického materiálu.....	19
1.5.2	Fragmentárnost DNA .....	19
1.5.3	Autenticita výsledků.....	20
2	CÍLE PRÁCE .....	24
3	MATERIÁL A METODY .....	25
3.2	Nálezové místo.....	25
3.3	Výběr jedinců .....	26
3.4	Popis materiálu.....	26
3.5	Výběr vzorků.....	27
3.6	Izolace DNA.....	30
3.6.1	Příprava vzorků .....	31
3.6.2	Dekalcifikace.....	32
3.6.3	Izolace aDNA silika metodou .....	32
3.6.4	Protokol izolace aDNA .....	33
3.7	Amplifikace aDNA .....	34
3.7.1	Amplifikace amelogeninu .....	36
3.7.2	Výběr metodiky STR analýzy .....	36
3.7.3	Optimalizace protokolu a amplifikace STR .....	38
3.8	Detekce PCR produktů.....	39
3.8.1	Agarózová elektroforéza .....	39
3.8.2	Polyacrylamidová elektroforéza.....	40

3.8.3	Kapilární elektroforéza.....	41
3.8.4	Určení alel .....	41
4	AUTENTIZACE VÝSLEDKŮ.....	43
4.1	Obecná preventivní opatření .....	43
4.2	Detekce potenciálních kontaminací .....	44
4.3	“Appropriate molecular behavior“ .....	44
4.4	Zachovalost materiálu .....	45
4.5	Postup u PCR negativních vzorků.....	47
4.6	Autentizace genotypů.....	48
5	VÝSLEDKY.....	49
5.1	Úspěšnost amplifikace aDNA.....	49
5.1.1	Amplifikace amelogeninu .....	50
5.1.2	Amplifikace STR.....	51
5.2	Analýza STR .....	52
5.2.1	Genetická diverzita.....	53
5.2.2	Distribuce alel.....	53
5.2.3	Porovnání STR charakteristik s pohřebišťem Harmony Road.....	55
6	DISKUZE .....	57
6.1	Autenticita výsledků.....	57
6.2	Úspěšnost amplifikace aDNA.....	59
6.3	Analýza STR .....	61
7	ZÁVĚR.....	64
8	SEZNAM ZKRATEK .....	65
9	SEZNAM LITERATURY.....	66
10	SEZNAM PŘÍLOH.....	72

# 1 ÚVOD

Rychle se rozvíjející metodiky ancient DNA (aDNA) analýz umožňují stále rozsáhlejší výzkumy historických lidských pozůstatků přímo z archeologických nalezišť. Genetika v tomto směru ověřuje hypotézy archeologů nebo antropologů a sama přináší nové informace tam, kde jsou archeologické záznamy nedostatečné a antropologické metody méně spolehlivé. Studium původu člověka a celých populací, sledování demografického vývoje a migrací nebo analýzy chování a vlastností historických a prehistorických populací, jsou v propojení s nálezy archeologickými a antropologickými, jen částečným výčtem možných zaměření aDNA výzkumů.

Prosazování kostrového pohřbívání v průběhu 9. století v Čechách (Bubeník et al. 1998) vyplynulo v existenci relativně rozsáhlých kosterních pozůstatků z doby hradištní (raný středověk), která podporuje širší využití metod aDNA. Analýzy pohlaví, například pro demografické rekonstrukce populací, jsou dnes již základními typy výzkumů, jež je možné aplikovat nejen u českých středověkých pohřebišť (Vaňharová & Drozdová 2008). Metodicky a s ohledem na interpretaci výsledků je nepoměrně náročnější odhadování biologické blízkosti jedinců, skupin či populací. Studie genetické příbuznosti na úrovni několika jedinců či menších skupin, v rámci jednoho i více pohřebišť, jsou stěžejní pro pochopení socio-kulturních vlastností historických populací (Haak et al. 2008; Keysertracqui et al. 2003). Analýzy genetické diverzity a výzkumy přímo na populační úrovni pomáhají nejen charakterizovat danou historickou populaci v kontextu archeologickém a antropologickém, ale dovolují též sledovat změny v genetické diverzitě v průběhu minulých let a diskutovat tato zjištění v souladu s konkrétními vlastnostmi a minulým vývojem daných populací (Bramanti et al. 2000a; Bramanti et al. 2000b; Dudar et al. 2003; Gerstenberg 2002). Potenciál podobných výzkumů je velmi široký a jejich úspěšnost přímo závislá na rozsahu dostupného biologického materiálu, zachovalosti aDNA a vhodně zvolené metodice analýz.

Prvotní aDNA studie na souboru lidských skeletálních pozůstatků českého raně středověkého pohřebiště byla předmětem této diplomové práce. Autozomální STR polymorfizmy byly využity z důvodu jejich vysokého diskriminačního potenciálu, který je zvláště vhodný pro studie genetické diverzity nezávislé na pohlaví jedinců a pro analýzy příbuznosti na různých úrovních. Významnou výhodou STR markerů je schopnost



rozlišení dvou jedinců na základě jejich genetických profilů, vzhledem k vysoké potřebě zachycení potenciálně kontaminující DNA.

Následující kapitoly shrnují zatím známé poznatky o lokalitě Mlékojedy a studovaném pohřebišti v archeologickém a antropologickém kontextu. Další kapitoly úvodu se již zabývají genetickými možnostmi výzkumů historických pohřebišť s důrazem na aplikaci autozomálních STR markerů. Poslední část úvodu je věnována problematice ancient DNA studií.

## 1.2 Polykulturní lokalita Mlékojedy

Soubor skeletálních pozůstatků jedinců použitých v této studii pochází z ranně středověkého pohřebiště nacházejícího se v lokalitě, která je rozprostřena okolo dnešní obce Mlékojedy (okr. Litoměřice). Tato obec se nachází přímo na levém břehu Labe ve vzdálenosti necelý kilometr od města Litoměřice. Studované pohřebiště, dále označováno už jen jako pohřebiště Mlékojedy, bylo objeveno při záchranném archeologickém výzkumu, který proběhl v červenci a září 2007 pod vedením Mgr. J. Blažka z Ústavu archeologie a památkové péče severozápadních Čech. Archeologickými metodami bylo odhadnuto, že většina nálezů pohřebiště spadá do doby mladohradištní, přesněji do 10. až 11. století. Na stejné ploše bylo navíc nalezeno několik starších pravěkých kostrových pohřbů a sídelní jámy z doby bronzové.

### 1.2.1 Litoměřicko v mladší době hradištní

Mladší doba hradištní (950–1150) je na území dnešních Čech charakterizována hlavně sjednocením původně samostatných kmenů a samosprávných celků pod vládou Přemyslovců. Zároveň je obdobím pravděpodobného začátku výrazného demografického růstu, který je předpokládán od konce 11. století a vrcholí ve století 12. a 13. (Boháč 1987). Do té doby převládaly na trvale osídleném území spíše rozptýlené drobné osady nebo shluky usedlostí (Žemlička 2006).

Dnešní Litoměřicko, zvláště ústřední část při Ohři a Labi, náleželo k těm českým krajinám s velmi intenzivním osídlením, souvisle už od počátku neolitu (Zápotocký 1965). V okolí litoměřického hradu se v průběhu střední doby hradištní vytvořila v okruhu přibližně 2 km relativně rozsáhlá sídelní aglomerace čítající okolo 20 osad. Celkem 70 míst s nálezy sídlištního charakteru bylo nalezeno na Litoměřicku mimo samotný katastr Litoměřic. Tyto poznatky vypovídají o existenci velké sídelní aglomerace v okolí dnešních Litoměřic už v mladší době hradištní (Zápotocký 1965).

### 1.2.2 Archeologický a antropologický výzkum

Studované pohřebiště je třetím nalezeným pohřebištěm v blízkosti obce Mlékojedy. Jihovýchodně od této obce, asi 0,5 km od současného břehu Labe a necelý 1 km od našeho

pohřebišť, se nacházela další poměrně rozsáhlá pohřební plocha přibližně stejného datování. Podrobný archeologický a antropologický výzkum tohoto pohřebišť je zdokumentován v práci M. Zápotockého (Zápotocký 1965). Na této lokalitě bylo nalezeno 75 hrobů a dalších nálezů sídlištního charakteru, které podporují hypotézy rozsáhlého osídlení této lokality. Třetí pohřebišť není zatím zdokumentováno.

Archeologický a antropologický výzkum nálezového místa pohřebišť Mlékojedy není ještě uzavřen. V zatím odkryté části bylo nalezeno 54 určitelných pohřbů a 5 shluků kostí v neanatomické poloze bez vlastní hrobové jámy, datované do stejné doby raného středověku. Většina pohřbů byla strukturovaná do několika rozeznatelných řad (viz Příloha II, obr. 4 a 5). Na pohřebišti se dále nacházelo několik společných hrobů, většinou nedospělých jedinců, naznačujících možný příbuzenský vztah. Antropologický výzkum zatím identifikoval 52 jedinců, z toho 29 dospělců a 23 jedinců subadultního věku. Doba využívání pohřebišť je předběžně odhadovaná na 100 až 150 let. Počet rodin žijících v dané době byl odhadnut podle vzorce Acsádi – Nemeskériho (Acsádi & Nemeskéri 1970), na jednu až čtyři nukleární rodiny, s vynecháním korelačního koeficientu předpokládajícího nepohřbené děti (Stloukal 1999). Odhad současně žijících obyvatel v konkrétním čase může být do jisté míry skreslený. Vzhledem k mělkému pohřbení dětí se pravděpodobně nedochovaly všechny dětské kostry. Poloha a struktura pohřebišť navíc přispívá k podezření, že celá plocha nebyla ještě odkryta (Dr. Kryštof Derner, osobní komunikace).

### **1.3 Genetické markery aDNA analýz**

Genetických markerů obecně slouží k vyjádření genetické variability jedinců, populací nebo druhů. Jejich existence vyplývá z přítomnosti polymorfizmů na úrovni DNA. Genetickým markerem může být gen, sekvence nebo jednonukleotidový polymorfizmus. Důležitým předpokladem pro testování variability je selektivní neutralita markeru. Praktickou výhodou pak rychlá a jednoduchá testovatelnost. Genetické markery se vyskytují jak v mitochondriální DNA (mtDNA), tak na autozomálních a gonozomálních chromozomech jaderné DNA. K dnes nejčastějším typům markerů aDNA analýz patří hypervariabilní oblast mtDNA, lokusy genů na pohlavních chromozomech, které se využívají pro rozlišení genetického pohlaví, a krátké tandemové repetice (STR). Stále

častěji se v posledních letech využívá jednoduchých nukleotidových polymorfizmů (SNP) Y-chromozomu i autozomálních chromozomů. Výše vypsane metody dominují u většiny nejnovějších aDNA studií zaměřených na výzkumy genetické variability. Ze starších metod je například stále využíván systém krevních skupin AB0 (Vaňharová & Drozdová 2008). Při interpretaci výsledků těchto analýz je ale nutné, zohlednit předpokládaný vliv selekce na frekvence jednotlivých skupin v populacích.

### 1.3.1 Mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA je dvouřetězcová kruhová molekula o délce 16 569 bp, za normálních podmínek výhradně děděná po maternální linii. Lidská mtDNA obsahuje tzv. hypervariabilní oblasti (HVR I, II), jejichž sekvenční polymorfizmy slouží k diferenciaci jednotlivých haplotypů. Pro mtDNA existují rozsáhlé databáze se specifickými polymorfizmy pro jednotlivé populace. Analýzy mtDNA jsou velmi přínosné v evolučních a migračních studiích. Vhodné jsou pro studium recentní i historické (prehistorické) genetické variability populací. Nejvíce se uplatňují při studiu populací, u nichž je vysoká variabilita očekávaná, vzhledem k předpokladům založeným na dostupných informacích o historickém vývoji těchto populací (Casas et al. 2006). MtDNA je ale jen jedním markerem, který je navíc děděný jen od jednoho z rodičů. Efektivní velikost populace je pro mtDNA proto čtvrtinová, oproti jaderným autozomálním sekvencím. Mnohem rychleji tak dochází ke vzniku nových linií a zároveň ztrátě minoritních alel. Studie genetické diverzity jen prostřednictvím mtDNA mohou být z tohoto důvodu podhodnoceny nebo se výrazně měnit v závislosti na výběru vzorků (Williams et al. 2002; Zhang & Hewitt 2003). Jako doplňková metoda slouží mtDNA pro analýzu širších příbuzenských vztahů a samostatně v těch případech, kdy se jaderná DNA nedochová (Adachi et al. 2006).

Vzhledem k tomu, že mtDNA se v buňce vyskytuje ve velkém počtu kopií (několik molekul DNA na mitochondrii a desítky až stovky mitochondrií na buňku), je mnohem více pravděpodobné, že bude detekovatelná u degradovaných vzorků oproti nukleové DNA (jedna kopie v diploidní sestavě) (Von Wurmb-Schwark et al. 2003). Amplifikace nukleové DNA a zároveň neúspěšná analýza mtDNA je situace velmi výjimečná (Chilvers et al. 2008). Hlavní nevýhodou analýz aDNA prostřednictvím mtDNA je jejich vysoká

náročnost na laboratorní vybavení a podmínky, například pro potřeby klonování, které je nezbytnou podmínkou autentizace výsledků (Cooper & Poinar 2000).

### 1.3.2 Amelogenin

Odhad pohlaví historických lidských pozůstatků má vedle odhadu věku stěžejní význam pro demografickou rekonstrukci populací a sledování trendů v jejím vývoji. Současně s analýzou mitochondriální DNA přináší poznatky o migracích a obecně genovém toku pro jednotlivá pohlaví u historických populací. Genetické metody jsou velmi užitečné pro odhad pohlaví nedospělých jedinců (Faerman et al. 1998; Vaňharová & Drozdová 2008), kdy jsou antropologické metody nepřesné (Lassen et al. 1996) a/nebo v případě jen fragmentárně dochovaných pozůstatků skeletu. Amplifikace markerů v genu pro amelogenin je jednou ze základních a nejčastějších metod používaných pro rozlišení genetického pohlaví, ale samozřejmě není jedinou.

Amelogenin je gen lokalizovaný na krátkém raménku chromozomu Y (Yp11.2) a na homologní části chromozomu X (Xp22.31). Tento gen obsahuje v první řadě kódující sekvenci pro protein zubní skloviny. Oba geny jsou z 84 % sekvenčně identické. Delece v prvním intronu genu na X chromozomu se využívá pro rozlišení pohlaví již skoro dvacet let (Sullivan et al. 1993). Amplifikace tohoto úseku u mužského genotypu vyústí v získání dvou délkově rozlišitelných fragmentů (106/112 bp). V případě vysoce degradované DNA je často problematické amplifikovat úseky delší než 100 bp. Proto byly velmi brzy navrženy primery amplifikující kratší segmenty v různých oblastech genu. Jedním z nich je fragment 80/83 bp, který byl také použit v této práci (Haas-Rochholz & Weiler 1997). Výhodou amplifikace lokusů amelogeninu je snadné a rychlé rozlišení obou alel, resp. mužského nebo ženského genotypu, oproti například novějším SNP metodám (Gibbon et al. 2009; Tzvetkov et al. 2010). Nevýhodou této metody je zvýšené riziko alelového drop-outu, které může vyústit v určení mužských genotypů jako ženských (Vaňharová & Drozdová 2008). Amplifikace lokusu amelogeninu se často navíc používá jako první krok pro posouzení přítomnosti jaderné DNA v historických vzorcích (Cipollaro et al. 1999; Cipollaro et al. 1998).

### 1.3.3 Jednoduché nukleotidové polymorfizmy

SNP je souhrnným označením pro sekvenční varianty v rozsahu jednoho bazického páru vyskytující se v populaci s četností nad 1 % (Brookes 1999). Jednoduché nukleotidové polymorfizmy se vyskytují po celém genomu člověka včetně mtDNA. Obvykle se ale jako SNP označují polymorfizmy v jaderné DNA a jejich využití je teoreticky podobné STR markerům. Vzhledem k tomu, že jsou SNP obvykle jen bialelické, jsou samostatně jen velmi málo informativní. Jejich výhodou je možná kombinovatelnost až několika desítek polymorfizmů do jedné multiplexové reakce, která diskriminační potenciál výrazně zvyšuje. Při analýzách vysoce fragmentární DNA jsou SNP snadněji detekovatelné a jejich použití i v rámci jaderných aDNA analýz stále narůstá (Li et al. 2007). Nevýhodou pro aDNA i forenzní výzkumy je menší rozsah populačních databází, které existují pro SNP polymorfizmy, ve srovnání s krátkými tandemovými repeticemi.

### 1.3.4 Krátké tandemové repetice (STR)

Krátké tandemové repetice (short tandem repeats, STR) nebo také mikrosatelity tvoří jednu z podskupin délkových polymorfizmů v jaderné DNA. STR jsou tvořeny opakujícím se motivem zpravidla od 1 do 6 bp a vyskytují se u eukaryotických i prokaryotických organismů. Motiv repetice se může výjimečně lišit, nebo být přerušovaný odlišnou krátkou sekvencí. Některé STR mají složitější stavbu s nepravidelným střídáním různých motivů i sekvenčních polymorfizmů, tzv. složené a komplexní STR lokusy. V lidském jaderném genomu jsou nejčastějším typem dinukleotidové a tetranukleotidové repetice. Hlavními vlastnostmi krátkých tandemových repetic je vysoká mutabilita (průměrně 1 mutace na 1000 gamet), široký rozsah alel a vysoký polymorfizmus (Wang et al. 2000). Obecně se krátké tandemové repetice využívají pro vazebné analýzy a mapování chromozomů, pro identifikaci jedinců v oboru forenzní genetiky a široké uplatnění nacházejí ve studiích populační genetiky. Jejich výhodou je jednoduchá a rychlá metodika analýz oproti SNP metodám a kratší délka amplifikačního fragmentu oproti dříve používaným minisatelitům (VNTR). STR markery se vyskytují na gonozomálních i autozomálních chromozomech.

Na Y-chromozomu se využívají převážně STR markery ležící v nerekombinantní části chromozomu, která je děděna po otcovské linii v nezměněné podobě. Kombinací alel

jednotlivých STR do tzv. haplotypů je možné rekonstruovat genealogické vztahy po paternální linii (Keyser-tracqui et al. 2003). Podobně jako u mtDNA je Y-chromozom používán pro migrační a obecně evoluční studie na moderní i historické DNA (Crubézy et al. 2010; Kayser et al. 2005). Krátké tandemové repetice vázané na chromozom X vytvářejí systém pro identifikaci jedinců, komplexní příbuzenské analýzy (Szibor et al. 2003) i populační studie. Potenciál těchto markerů je zatím snížen nedostatečnými populačními databázemi v porovnání se všemi ostatními typy markerů.

Autozomální STR se vyskytují na všech 22 lidských nepohlavních chromozomech. Kromě již zmíněné vysoké mutability (markery s nejvyšší mutabilitou např. FGA, D18S51, SE33 jsou nejvíce polymorfní a disponují největším počtem alel), platí pro autozomální STR mendelistický typ dědičnosti a kodominance. Protože jsou STR v genomu poměrně rozšířené, je možné kombinovat lokusy z různých chromozomů bez ohledu na potenciální genetickou vazbu. Kombinace více STR v jedné analýze zvyšuje diskriminační potenciál („power of discrimination“) neboli rozlišovací schopnost metody. Už od počátku 90. let se autozomální STR uplatňují jako efektivní nástroj pro lidskou identifikaci (Edwards et al. 1991) a pro příbuzenské analýzy. Využívané jsou rovněž pro celogenomové vazebné analýzy a mapování chromozómů. Jsou nepostradatelným nástrojem populační genetiky při určování genetické diverzity a struktury populací nebo při studiu historie recentních populací (Zhivotovsky 2003). O aplikacích autozomálních STR polymorfizmů v aDNA studiích pojednává podrobněji následující kapitola.

## **1.4 Autozomální STR v oboru aDNA**

Autozomální STR jsou po amelogeninu druhým nejčastěji voleným markerem u aDNA analýz jaderné DNA. Hlavní výhodami jsou vysoký diskriminační potenciál pro rozlišení jedinců a rekonstrukci úzkých příbuzenských vztahů, krátká délka amplifikačních fragmentů a možnost amplifikovat více lokusů v jedné multiplexové reakci. Důležitou výhodou genotypizace autozomálními STR markery je snadná autentizace výsledků ve smyslu ověření přítomnosti laboratorních kontaminací (Hummel et al. 2000).

### 1.4.1 Identifikace a příbuznost na úrovni rodiny

V případě nálezů společných hrobů, několika pohřbů v těsné blízkosti nebo hrobů uložených nad sebou vyvstává otázka, zda jsou daní jedinci biologicky nebo jinak spřízněni. Jedním z přímých výsledků může být samotná identifikace osob v hrobu a rekonstrukce jejich vztahů na základě již určitých předpokladů. Peter Gill s kolegy (Gill et al. 1994) například rekonstruoval příbuzenské vztahy u pozůstatků nalezených v Jekatěrinburgu (Rusko) v roce 1991. Identifikace posledního ruského cara Mikuláše II., carevny a jejich dcer byla prvním případem, kdy byla analýza autozomálních STR s úspěchem použita na historickém skeletálním materiálu.

Častěji řešenou otázkou je vztah jedinců uložených ve společném hrobě, kdy se biologická příbuznost očekává, ale charakter konkrétních vztahů se jen odhaduje (Clisson et al. 2002; Vaněk et al. 2009; Wiechmann & Grupe 2005). Biologická spřízněnost společně pohřbených jedinců je navíc jen jednou z možných hypotéz. Vyloučení některých typů příbuznosti (například matka – syn / dcera, sourozenectví) je možné už stanovením haplotypů mtDNA (Adachi et al. 2006; Clisson et al. 2002). V případě stejných haplotypů je blízká příbuznost odhalitelná hlavně s pomocí autozomálních STR (Wiechmann & Grupe 2005).

### 1.4.2 Příbuznost na úrovni skupin

Objasnění příbuzenských vztahů pomáhá především pochopení socio-kulturních pravidel a norem historických populací. Takovými pravidly jsou například pohřební ritus nebo vzorce sňatkového chování v jednotlivých sociálních a socio-ekonomických skupinách. Rozsáhlá příbuzenská analýza umožňuje například studovat sňatkové modely historických populací na základě příslušenství do jiné sociální třídy. Julia Gerstenberg (Gerstenberg 2002) studovala raně středověké pohřebiště Weingartner (5. až 8. století), Německo, kde byly podle výbavy hrobů a způsobu pohřbení definovány dvě sociální vrstvy. Předmětem výzkumu byla otázka, zda se stratifikace společnosti na sociální úrovni projeví také na úrovni genetické. Opakovatelné výsledky, alespoň u části autozomálních STR, se podařilo získat u 88 jedinců (z celkových 161). V tomto případě se statisticky významně nelišili ani frekvence autozomálních STR ani variabilita haplotypů mezi oběma skupinami. Výsledky naznačují, že mezi skupinami pravděpodobně docházelo ke



genovému toku a podporují hypotézu, že u populací raného středověku nebylo bráněno sňatkům mezi jedinci z odlišných sociálních vrstev (Gerstenberg 2002).

Jedním z dalších socio-kulturních pravidel je uložení jedinců na pohřebišti na základě jejich vzájemného vztahu. Skupinu tu v tomto případě představují pohřby nějakým způsobem oddělené od ostatních (centrální skupina pohřbů oddělená od periferní, řady nebo malé vyčleněné skupiny hrobů). Zatím jen velmi zřídka byla testována biologická příbuznost jedinců uložených v jasně strukturně oddělené skupině či řadě s využitím jaderné DNA (Dudar et al. 2003; Keyser-tracqui et al. 2003).

### **1.4.3 Genetická diverzita pohřebišť**

V německém Goslaru v Dolním Sasku bylo v roce 1993 objeveno pohřebiště z 18. století. Podle záznamů byli na pohřebišti pohřbíváni jen jedinci pracující v přilehlých stříbrných dolech. Předmětem zájmu bylo, zda do Goslaru přicházeli stále noví specializovaní pracovníci z jiných regionů, nebo jestli se práce stala rodinnou tradicí a skupinu jedinců pohřebiště tvořila sociálně i geneticky si blízká skupina. Genetická analýza na úrovni populační genetiky byla provedena s celkem devíti STR markery. Přesvědčivé genotypy se podařilo získat u 30 jedinců a výsledky mohly být teprve podruhé u STR analýz aDNA zpracovány statistickými metodami. Hypotéza nových migrací byla posouzena jako méně pravděpodobná. Navíc rozsah sdílení některých alel mezi jedinci poukázal na pravděpodobné příbuzenské vztahy v rámci pohřebiště (Bramanti et al. 2000b).

U historických a hlavně prehistorických pohřebišť není obvykle jasné, kdo a podle jakých pravidel byl na pohřebišti pohřbíván. Proto je genetická charakterizace pohřebiště jedním z cílů aDNA studií (Bramanti et al. 2000a; Bramanti et al. 2000b; Dudar et al. 2003; Gerstenberg 2002; Zierdt et al. 1996). Dalším důvodem jsou potenciální analýzy příbuznosti. Konvenční způsob odhadování příbuznosti genetickými metodami mezi dvěma jedinci je založen na pravděpodobnosti výskytu dvou daných genotypů za předpokladu určitého příbuzenského vztahu. Zároveň platí, že čím vzácnější alelu jedinci sdílejí, tím je větší pravděpodobnost, že jsou si biologicky blízcí. Přitom frekvence alel, v tomto případě alel autozomálních STR, se u každé populace více či méně liší (Budowle & Chakraborty 2001). Jedinci sdílející stejné alely v jednom nebo více autozomálních STR

mohou být určeni jako blízce příbuzní podle kritérií moderní evropské (kavkazské) populace. Biologická příbuznost při stejné situaci může být ovšem zanedbatelná, pokud se frekvence alel studované populace výrazně liší.

Rozdíly v distribuci alel autozomálních STR markerů mezi dnešními populacemi vypovídají zpravidla o dlouhodobém rozdílném demografickém vývoji těchto populací (Hofer et al. 2009). Omezeně a spíše u jasně definovaných populací lze z moderních dat studovat, jak se vliv nedávné historie projevil na jejich genetické variabilitě. Moderní data navíc podléhají do značné míry zkreslení, které je způsobeno migracemi, expanzemi a celkovým mísením populací v průběhu let. Přesnější záznam o změnách genetické diverzity minulých populací dokáže odhalit jen analýza přímých záznamů uložených přímo v jejich biologických pozůstatcích.

V minulosti se přepokládalo, že historické a zvláště prehistorické populace mají pravděpodobněji nižší biologickou diverzitu z důvodu menší populační velikosti, která mohla vést k inbreedingu a výraznému genetickému driftu (Cavalli-Sforza & Bodmer 1999). Sloan R. Williams (Williams et al. 2002) simuloval stav historických populací na modelu subpopulace Shamatari (populace Yanomamö, Venezuela, Brazílie), která se skládala z přibližně 12 vesnických skupin o 30 až 300 jedincích. Vedle mtDNA byly využity autozomální STR markery pro stanovení genetické diverzity. Přesto, že jednotlivé vesnice byly výrazně endogamní a tedy geneticky skoro uzavřené, byla celková míra pozorované heterozygoty relativně vysoká a genotypové frekvence odpovídaly předpokladům Hardy-Weinbergovy rovnováhy.

Zatím bylo publikováno velmi málo studií, které by porovnávaly diverzitu jaderných autozomálních markerů z archeologických zdrojů (Bramanti et al. 2000a; Dudar et al. 2003; Gerstenberg 2002; Zierdt et al. 1996) nebo alespoň přinesly širší data, která by tato srovnání umožňovala (Keyser-tracqui et al. 2003). Distribuce alel a míra heterozygoty autozomálních STR byly sledovány u raně středověké německé populace. Prostřednictvím markeru vWA se podařilo získat genotyp 76 z 200 náhodně vybraných jedinců pohřebiště Weinegarten (Německo). Porovnání genetické diverzity s recentními populacemi ukázalo na vysokou podobnost v distribuci frekvencí alel. Diskutován byl výrazně zvýšený podíl homozygotů pro lokus vWA. (Zierdt et al. 1996). Pozdější studie na stejném pohřebišti nezaznamenala rozdíl ani ve frekvencích alel ani v genetické diverzitě a poukázaly tak na problematiku aDNA studií na populační úrovni (Gerstenberg 2002).

## 1.5 Problematika aDNA studií

### 1.5.1 Fragmentárnost biologického materiálu

Nevýhodou aDNA studií je často velmi omezený počet vzorků pro analýzu a tedy obtížnost analýz na úrovni skupin nebo populací. V tomto ohledu se problematika aDNA neliší od oboru archeologie. Rozsah materiálu, který je možné analyzovat genetickými metodami, závisí v první řadě na jeho dostupnosti. Pokud zjišťujeme například změny některých genetických charakteristik v čase, je samozřejmě nutné mít k dispozici jedince ze stejného nebo velmi podobného období. Dostatek biologického materiálu nemusí vůbec existovat z důvodu nepříznivých podmínek vnějšího prostředí, nebo může být nepřístupný pro genetické studie. Většina výzkumů je proto prováděna nejčastěji jen v rámci jednoho pohřebiště. Výběr materiálu je potom závislý, jak na zachovalosti biologických tkání, která se může výrazně lišit i mezi různými částmi nálezového místa, tak na míře finanční náročnosti těchto výzkumů.

### 1.5.2 Fragmentárnost DNA

Kromě nedostatku studijního materiálu je rozsah výsledků a jejich interpretace ovlivněna hlavně degradačními změnami v aDNA. Podstatnou roli pro uchování historické genetické informace mají vnitřní vlastnosti daného biologického materiálu a zároveň vnější vlivy prostředí, jako je teplota, chemické a fyzikální vlastnosti půdy, přítomnost spodních vod, činnost biologických činitelů nebo způsob pohřbívání (Bell et al. 1996; Collins et al. 2002; Hagelberg & Clegg 1991; Hedges & Millard 1995). Z dosud publikovaných prací vyplývá, že stáří vzorků není nejdůležitější predispozicí pro úspěch aDNA analýz. Stejným faktorem ovlivňujícím degradaci biologických tkání je nejspíše teplota okolního prostředí (Smith et al. 2003). Tuto hypotézu podporuje řada prací, při kterých se podařilo amplifikovat DNA ze vzorků několik desítek až stovek tisíc let starých, pocházejících například ze Sibiřského permafrostu (Schwarz et al. 2009). Proces degradace DNA zřejmě urychluje i časté střídání teplot v průběhu roku. Lidské pozůstatky pohřbené relativně mělce jsou pravděpodobně vystaveny vyšším rozdílům teplot, které obecně nepodporují zachování nukleových kyselin.

Vlivy vnějšího prostředí vypsané v předchozím odstavci způsobují řadu chemických reakcí v DNA (oxidace, hydrolýza, alkylace, deaminace nebo Maillardovy

reakce), které mohou výrazně ovlivnit úspěšnost analýz a správné vyhodnocení výsledků. K nejčastějším degradačním změnám u aDNA patří fragmentace, jako obvyklý výsledek oxidačních nebo hydrolytických reakcí, které narušují všechny přístupné chemické vazby v DNA řetězci. Například hydrolýzou vzniklé depurinace nebo depyrimidizace způsobují zvýšenou lomivost DNA. Hydrolytické štěpení fosfodiesterových vazeb v primární struktuře zapříčiní přímou fragmentaci řetězce. Obecně se tyto změny projeví možností amplifikovat jen zkrácené úseky DNA, zpravidla do 100–500 bp (Willerslev & Cooper 2005). Amplifikace delších úseků v rozsahu několika stovek bází je pravděpodobně možná (Haack et al. 2000), ale snižuje jistotu autenticity výsledků (viz následující kapitola).

### 1.5.3 Autenticita výsledků

Věrohodnost aDNA výzkumů je v první řadě ovlivněna přítomností degradačních změn v DNA. Degradace nukleových kyselin se kromě fragmentárnosti projevu přítomností nepřírodných intrařetězcových (v rámci jedné molekuly DNA) nebo interřetězcových vazeb (mezi dvěma molekulami DNA nebo mezi DNA a proteiny). Intrařetězcové vazby mohou vznikat jako následek působení ultrafialového záření, které podporuje vytváření pyrimidinových dimerů nebo alkylačními reakcemi. Vazby mezi řetězci DNA a proteiny vznikají Maillardovými reakcemi. Oba dva typy těchto změn způsobí zastavení *Taq* polymerázy a vyústí v amplifikaci jen zkrácených úseků DNA nebo vznikem tzv. jumping PCR artefaktů (Pääbo et al. 1990; Willerslev & Cooper 2005). Stejným způsobem se projevují některá oxidační poškození v DNA. Radikálové produkty peroxidu vodíku nebo hydroxylové radikály derivují pyrimidiny na hydantoin, který je silný blokátorem *Taq* polymerázy. K nejčastěji izolovaným oxidačním produktům, např. thyminu, patří 5-hydroxy-5-methylhydantoin (5-OH-5-Mehyd) a 5-hydroxyhydantoin (5-OH-Hyd) (Höss et al. 1996). U chemických modifikací bází se zvyšuje riziko nesprávného zařazení druhého nukleotidu při PCR amplifikaci, které představuje jeden z největších problémů interpretace výsledků sekvenčních reakcí jak mitochondriální DNA (Gilbert et al. 2003a; Gilbert et al. 2003b; Willerslev & Cooper 2005), tak jaderné (Binladen et al. 2005).

V případě analýz STR markerů jsou nejčastěji detekovány tři typy PCR artefaktů. Za první je to tzv. alelový drop-in, jinak řečeno „alela navíc“, která se v profilu jedince normálně nevyskytuje. Opakem je alelový drop-out, tedy „vypadnutí“ alely při PCR

amplifikaci. Alelový drop-in můžeme zaznamenat jako důsledek sporadických kontaminací. Výskyt a četnost alelového drop-outu závisí na kvantitě a kvalitě analyzované DNA. Posledním PCR artefaktem typickým pro STR markery jsou tzv. stutters. Rozsah těchto artefaktů je závislý na použitém typu STR markeru a běžně se vyskytuje i při PCR amplifikacích moderní DNA. V případě degradované aDNA se jejich množství resp. koncentrace produktu zvyšuje nad obvyklou hranici 5 až 10 % a mohou být mylně zaměněny za pravé alely.

Kromě PCR artefaktů je autenticita výsledků ovlivněna kontaminacemi různého původu. Za kontaminace můžeme pokládat jakoukoli látku ovlivňující PCR amplifikaci nebo interpretaci výsledků. Pokud se podaří izolovat autentickou aDNA následuje vždy její namnožení pomocí PCR reakce. Koncentrace templátové DNA bývá obvykle velmi nízká a tedy jakákoli látka, která by mohla reakci inhibovat, nabývá při aDNA analýzách velkého významu. Projevem PCR inhibice je buď jen velmi slabá amplifikace, nebo úplný negativní výsledek. Inhibice PCR je tedy jednou z možných příčin falešně negativních výsledků. Hlavní skupina inhibitorů vyskytujících se u historických vzorků pochází z vnějšího prostředí. Velmi častým problémem jsou huminové nebo fulviové kyseliny pocházející z půdy. Exogenní původ má i kontaminující moderní DNA, která formou kompetice v podstatě inhibuje amplifikaci autentické DNA (i když neinhibuje vlastní PCR). Část inhibic je přičítána endogenním faktorům pocházejícím z vlastních vzorků biologické tkáně nebo DNA. U extrakcí DNA z kostní tkáně se silně projevuje inhibice kolagenem a pravděpodobně i dalšími proteiny přítomnými v matrix (Scholz et al. 1998). Stejným způsobem mohou působit ionty železa ( $Fe^{2+}$ ), jako pozůstatek prokrvené dřevěné pulpy zubu nebo vápenaté ionty ( $Ca^{2+}$ ). Některé degradační chemické modifikace v DNA jako inter a intra-řetězcové vazby typicky ovlivňují činnost DNA polymerázy (Kalmár et al. 2000). Posledním důležitým zdrojem inhibitorů jsou reagenty, které se vzorky přišly do styku během zpracování. Do této skupiny patří látky používané při extrakci např. NaCl, ionické detergenty, ethanol, isopropanol, fenol nebo silika mikropartikule. Jako PCR inhibitor působí také pudrový prášek laboratorních rukavic. Jejich častá výměna, která se doporučuje jako prevence kontaminací u aDNA analýz, může mít v tomto směru negativní vliv na výsledek amplifikace (Wilson 1997). Charakter působení inhibitorů je různorodý. Modifikace templátové DNA může úplně zabránit navázání DNA polymerázy. Jiný mechanismem je ovlivnění vlastní enzymatické reakce např. snížením koncentrace

hořečnatých iontů ( $Mg^{2+}$ ), které jsou kofaktory *Taq* polymerázy nebo přímou spoluúčastí v reakci (huminové kyseliny) (Sutlović et al. 2005).

Nerozpoznané kontaminace vzorků cizorodou DNA jsou bezpochyby jedním z největších problémů aDNA analýz. Citlivost PCR, která je ještě cíleně zvyšována u problematických vzorků, umožňuje amplifikovat i minimální množství DNA v reakci. Moderní DNA kompetuje při PCR amplifikacích s nízce koncentrovanou a často degradovanou historickou DNA a může zcela její amplifikaci inhibovat. Možná je i implementace moderní DNA do historické sekvence prostřednictvím "jumping PCR". Zvlášť závažným problémem je riziko falešně pozitivních výsledků u analýz lidské DNA nebo při mikrobiologických studiích v souvislosti s nejčastějšími zdroji kontaminací (Pääbo et al. 2004). Rozsáhlé poznatky o zdrojích kontaminující DNA a jejímu šíření umožnily vypracování mnoha preventivních postupů, stejně jako způsobů ověření, zda byla amplifikována skutečně autentická DNA (Cooper & Poinar 2000; Kolman & Tuross 2000).

Než se vzorky dostanou do laboratoře, mohou být kontaminovány jakoukoli DNA, se kterou přijdou přímo do styku. Už několikrát byla publikována přítomnost moderní lidské DNA ve vzorcích, ve kterých by se přirozeně vyskytovat neměla, např. v kostech psů (Malmström et al. 2005), prasat (Richards et al. 1995), vzorků Neandrtálců (Green et al. 2006) a dalších. Nejčastějším zdrojem pre-laboratorních kontaminací jsou všichni lidé, kteří přišli se vzorky přímo do styku (archeologové, antropologové, pracovníci muzeí apod.). Dále jsou to postupy, které zvyšují riziko zanesení cizorodé DNA do vzorku. (omývání). Jiným typem kontaminací může být samotná aDNA z jiného jedince uloženého před exkavací v těsné blízkosti jedince zkoumaného. Vliv spodních vod a celkové podmínky vnějšího prostředí mohou teoreticky umožnit přenos těchto kontaminací. Jedna z několika studií Thomase Gilberta (Gilbert et al. 2006) poukázala na větší důležitost pro riziko kontaminací při manipulaci a mytí kostních vzorků i zubů těsně po exkavaci oproti pozdějším zásahům. Včasné plánování genetických analýz u archeologických výzkumů je tedy předpokladem pro dodržování proti-kontaminačních opatření již v průběhu exkavace a dalšího zpracování vzorků, stejně jako umožňuje včasné zpracování vzorků po exkavaci.

Nesporně nejčastějším zdrojem kontaminací je DNA pracovníků, kteří se vzorky pracují přímo v laboratoři. Podobně rozsáhlým potencionálním zdrojem jsou předchozí DNA analýzy. Zvláštním typem laboratorních kontaminací jsou tzv. cross-contamination, vzájemné kontaminace aDNA přenesené mezi vzorky zpracovávanými v jedné izolační nebo PCR sadě. Nositel podobných kontaminací je většinou aerosol vzniklý při

manipulacích se vzorky nebo nedostatečně očištěné laboratorní pomůcky používané opakovaně. Nutné je samozřejmě počítat s kontaminacemi přenesenými z různých komerčních pufrů a izolačních systémů, pokud nebyly certifikovány jako DNA-free. Sporadické kontaminace mohou mít podobný charakter jako autentická DNA, za kterou mohou být snadno zaměněny.

## 2 CÍLE PRÁCE

Předmětem diplomové práce byla prvotní genetická charakteristika souboru jedinců raně středověkého českého pohřebiště pomocí autozomálních STR markerů. Potenciál metody STR genotypizace je široký a samozřejmě závisí na rozsahu získaných výsledků. V rámci této studie jsme se zaměřili na následující cíle:

- Stanovení genetické diverzity a distribuce alel v porovnání s populacemi recentními a s dosud publikovanými výsledky aDNA analýz dalších historických pohřebišť (Dudar et al. 2003; Gerstenberg 2002; Keysertracqui et al. 2003; Zierdt et al. 1996).
- Analýzu příbuznosti na úrovni skupin podle uložení jedinců v rámci struktury pohřebiště, metodou určení rozsahu sdílení alel mezi jedinci uloženými ve stejných řadách nebo skupinách (Dudar et al. 2003; Keysertracqui et al. 2003).

Výsledky této práce mohou přispět k charakterizaci genetického složení jedinců uložených na pohřebišti. Zároveň tyto výsledky mohou být prvními daty důležitými pro získání představy o genetické diverzitě a distribuci alel raně středověkých populací Čech. Na základě celkové úspěšnosti amplifikace DNA bude možné posouzení vhodnosti dalších genetických analýz u daného pohřebiště.



### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.2 Nálezové místo

Plocha pohřebiště se rozkládala na terénní hraně nad cestou mezi obcemi Mlékojedy a Prosmýky, ve vzdálenosti 270 m od dnešních břehů Labe (147–148 m. n. m.). Podloží nálezového místa tvořily písky, ve svrchních vrstvách jílovitá spraš. Vzhledem k blízkosti Labe nebylo možné vyloučit občasně zaplavení lokality, zejména u nejnižě uložených pohřbů. Bližší informace pravděpodobnosti zaplavení u konkrétních pohřbů v prostoru nebyly k dispozici. Na obrázku 1 je znázorněna poloha pohřebiště vzhledem k blízkosti řeky Labe.

**Obr. 1** Poloha pohřebiště v krajině (plocha 1) vzhledem k vzdálenosti od dnešních břehů řeky Labe



Pozn.: Obec Mlékojedy se na obrázku nachází vpravo nahoře.

### 3.3 Výběr jedinců

Pro studii jsme přednostně vybrali celkem 23 jedinců subadultního věku. Jedním z důvodů byla primární genetická analýza pohlaví. Vybraní jedinci se navíc nacházeli na různých částech pohřebiště. Představovali tedy přibližně vzorek charakterizující celou zatím odkrytou plochu nálezového místa. Přes 50 % tvořili děti do 6 let (infans I) a skoro 40 % jedinci od 7–13 let (infant II). Dva jedinci byli juvenilního věku (41, 63) a jejich věk byl odhadnut na maximálně 16 let (tab. 1). U čtyř případů se jedinci nacházeli ve společných hrobech. Jedinci 10A, B a C byli uloženi vedle sebe ve společném hrobu s adultním jedincem. Jedinci 15A a B, 24 a 25, 38A a B byli pohřbení vždy nad hlouběji uloženým pohřbem staršího jedince. Všech 23 vybraných jedinců je vyznačeno na přiloženém nákresu pohřebiště (Příloha II, obr. 5).

### 3.4 Popis materiálu

Pro genetickou analýzu byly k dispozici od každého jedince soubory kostí a zubů, které byly odděleny od ostatního materiálu před antropologickým zpracováním. Informace o celkové zachovalosti kraniálního a postkraniálního skeletu nebyly k dispozici. Obecně byla u každého jedince k dispozici minimálně jedna dlouhá kost nebo fragmenty dlouhých kostí. Většina kostí byla na povrchu světlá nebo středně až tmavě hnědá a stejné zbarvení se objevovalo na řezu kostí, jen s ojediněle se vyskytujícími a nepatrnými „ostrůvky“ čistě bílé kompaktní tkáně. U pozůstatků šesti jedinců (17, 35, 38A, 38B a 55) byly na kostech rozeznatelné tmavé až černé a/nebo zelené skvrny, které jsou všeobecně přisuzovány vlivu bakterií nebo plísní (Collins et al. 2002).

Ve třech čtvrtinách případů byla součástí poskytnutého materiálu maxilla a/nebo mandibula se zuby různého stupně vývoje a zachovalosti (pro částečný přehled zachovalosti zubních i kostních vzorků odkazují na Příloha III). Ve většině případů byly zuby uložené v alveolách čelistí, výjimečně byly od čelisti odděleny už před zpracováním v laboratoři. Zvláště u novorozenců a mladších jedinců byl zubní materiál velmi omezený, vzhledem k růstu a výměně dentice v průběhu ontogeneze a celkové horší zachovalosti materiálu.

**Tab. 1** Seznam jedinců (hrobů), materiálu a antropologický odhad věku

Označení hrobu	Materiál	Odhadovaný věk
6	F sin, mandibula	8 let ±24 měsíců
7A	F sin, H sin, mandibula, os temporale sin	18 měsíců
8	F dx, T dx	3 roky ±12 měsíců
10A	F dx, os temporale dx, obratle	12 měsíců
10B	T sin, scapula dx, maxilla, mandibula, os temporale dx	7 let
10C	F dx, H sin, mandibula	12–13 let
15A	T dx, scapula dx, maxilla dx, mandibula	4 roky
15B	H dx, sacrum – Sa1, maxilla dx, mandibula	9 let ±24 měsíců
17	F sin, zuby, os zygomaticum sin	7 let ±24 měsíců
24	H sin, T sin, zuby, os temporale	5 let ±24 měsíců
25	H dx, mandibula	7–8 let ±24 měsíců
34	T sin, obratle, mandibula, os temporale dx	18 měsíců
35	H sin, os ilium sin, mandibula	4 roky ±12 měsíců
37	ulna sin, os temporale dx	novorozenec ±2 měsíce
38A	F sin, mandibula sin, os temporale sin	18–24 měsíců ±8 měsíců
38B	F dx, os temporale sin	3 roky ±12 měsíců
41	F sin, H dx, I1 dx sup	12–16 let
43	H dx, H sin, scapula sin, maxilla dx, os temporale	9 let ±24 měsíců
49	F sin, H dx, maxilla, mandibula	9–10 let ±30 měsíců
55	F sin, T dx, obratle, žebra, sacrum, maxilla, zuby	5 let ±16 měsíců
58	F sin, H sin, obratle, mandibula	12 let
60	F sin, H sin, maxilla, mandibula	2–3 roky
63	F sin, H dx, maxilla	14–16 let

F = femur, H = humerus, T = tibie, dx = pravá strana, sin = levá strana

### 3.5 Výběr vzorků

Pro bližší predikci obsahu mitochondriální nebo jaderné DNA u kostních vzorků bylo do dnešního dne navrženo mnoho metod (Bailey et al. 1996; Götherström et al. 2002; Poinar et al. 1996; Smith et al. 2003). Bohužel řada z nich přesahuje náročností na vybavení možnosti běžných laboratoří (Bailey et al. 1996; Poinar et al. 1996). Navíc účinnost některých byla diskutována jako sporná (Stone & Stoneking 1999), stejně jako praktičnost při omezeném množství dostupných vzorků. Jakákoli další manipulace se vzorky samozřejmě navíc zvyšuje riziko kontaminace.

Při výběru vzorků byla uplatněna především dosud publikovaná fakta o zachovalosti DNA u tvrdých tkání. Kosti a zuby jsou obecně nejčastějšími zdroji autentické DNA. Důvodem je v prvé řadě pomalejší degradace tvrdých tkání související s jejich histologickou strukturou. V kostní tkáni je DNA pravděpodobně adsorbována na

krystalky hydroxyapatitu ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), které společně s proteinovou složkou vytváří důležitou bariéru proti degradačním vnějším vlivům (Collins et al. 2002). Větší ochranu tedy vytváří kompaktní tkáň oproti spongióze a kosti s vysokým obsahem kompakty jsou tedy pro genetické analýzy nejvhodnější.

Zuby jsou některými autory považovány za vhodnější zdroj aDNA (Woodward et al. 1994), ačkoli počet buněk obsahujících DNA na jednotku objemu tkáně by měl být podle histologických studií vyšší u kostí než u zubů (Gilbert et al. 2005). Zuby jsou spíše zdrojem kvalitnější DNA. Buňky obsahující DNA pocházejí z vnitřní pulpy (fibroblasty), z rozhraní pulpy a dentinu (odontoblasty) nebo jsou uloženy v lakunách cementu (cementoblasty). Dentin a sklovina na povrchu zubu je mineralizovanější tkáň než kost a chrání tak DNA před degradačními vlivy zevního prostředí. Při dobré zachovalosti tkání, samotné usazení zubu v čelisti prakticky zabraňuje jakémukoli přístupu cizorodé DNA nebo PCR inhibitorům do vnitřní části zubu.

Nejprve byla tedy vybrána první sada vzorků od šesti jedinců s celkově lepší zachovalostí a od dalších šesti jedinců s horší zachovalostí podle následujících pravidel. Od každého jedince byly standardně odebírány 3 vzorky, tak aby alespoň dva vzorky pocházely z různých tkání nebo částí skeletu jedince. Pokud byly k dispozici, byly přednostně vybírány zuby. Ve všech případech byly zuby při odběru stále uloženy v čelistích. V případě špatné zachovalosti zubů (zuby s ulomenými kořeny nebo s výraznými prasklinami ve sklovině) nebo nepřítomnosti zubů u některých jedinců, byly pro analýzu voleny vzorky kostí s vysokým obsahem kompaktní tkáně (femur, humerus, tibie). Přednostně byly odebírány střední části diafýz resp. části, kde byla kompaktní tkáň kosti nejzachovalejší. Po zpracování a vyhodnocení výsledků byla vybrána druhá sada vzorků. Protože DNA byla detekována i u některých vzorků jedinců se špatnou celkovou zachovalostí, byly vzorky odebrány od všech zbylých jedinců bez ohledu na celkovou zachovalost.

Od 23 jedinců bylo dohromady odebráno 62 vzorků. U 18 jedinců bylo možné odebrat alespoň dva vzorky z různých tkání nebo částí kostry. U pěti jedinců byly odebrány jen dva vzorky z různých míst stejné kosti, v jednom případě bylo možné odebrat jen jeden vzorek. Celkem bylo zpracováváno 44 vzorků kostí a 18 zubů. Souhrnný přehled použitých vzorků shrnuje následující tabulka 2.

**Tab. 2** Souhrnný přehled odebraných vzorků a zhodnocení zachovalosti kostí

Označení vzorku	Označení hrobu	Typ vzorku	Zachovalost
1	6	zub	N
2		<i>femur</i>	velmi dobrá
3		<i>femur</i>	
4	7A	<i>femur</i>	velmi dobrá
5		<i>femur</i>	
6		humerus	dobrá
7	8	<i>femur</i>	dobrá
8		<i>femur</i>	
9		tibie	dobrá
10	10A	<i>femur</i>	dobrá
11		<i>femur</i>	
13	10B	<i>tibie</i>	dobrá
14		<i>tibie</i>	
15		zub	N
16	10C	zub	N
17		zub	N
18		<i>femur</i>	velmi dobrá
19	15A	zub	N
20		zub	N
21		zub	N
22	15B	zub	N
23		<i>tibie</i>	velmi dobrá
24		<i>tibie</i>	
25	38A	<i>dlouhá kost DK</i>	dobrá
26		<i>dlouhá kost DK</i>	
28	38B	<i>dlouhá kost</i>	dobrá
29		<i>dlouhá kost</i>	
31	41	zub	N
32		humerus	špatná
33		humerus	
34	60	<i>dlouhá kost DK</i>	dobrá
35		<i>dlouhá kost DK</i>	
36		<i>dlouhá kost HK</i>	dobrá
37	17	<i>femur</i>	dobrá
38		<i>femur</i>	
40	24	humerus	dobrá
41		<i>tibie</i>	dobrá
42		<i>tibie</i>	
43	25	zub	N
44		zub	N
45		humerus	dobrá
46	34	zub	N
47		<i>tibie</i>	velmi dobrá
48		<i>tibie</i>	
49	35	humerus	špatná
50		humerus	

52	37	ulna	dobrá
55	43	<i>humerus</i>	špatná
56		<i>humerus</i>	
57		zub	N
58	49	zub	N
59		<i>femur</i>	dobrá
60		<i>femur</i>	
61	55	<i>femur</i>	dobrá
62		<i>femur</i>	
63		žebro	dobrá
64	58	zub	N
65		zub	N
66		femur	velmi dobrá
67	63	zub	N
68		zub	N
69		femur	velmi dobrá

Pozn.: Kurzívou jsou označené vzorky odebrané z jedné kosti. Rozdělení kostních vzorků podle zachovalosti je obsahem kap. Autentizace výsledků.

N = nehodnoceno

### 3.6 Izolace DNA

Izolace historické DNA z tvrdých tkání se skládá z několika dílčích kroků a každý z nich je pro úspěch celého procesu podstatný. Před vlastní extrakcí je nutné vzorky připravit resp. očistit od všech nečistot, které by mohly ovlivnit průběh a účinnost izolace a následně i amplifikaci DNA. Zároveň je nutné odstranit případnou cizorodou DNA, která mohla kontaminovat vzorky před zpracováním v laboratoři. Vzorky je třeba dostatečně homogenizovat a dekalifikovat, protože vysoký stupeň mineralizace kostní tkáně a tkání zubu (dentin, cement) vytváří silnou bariéru pro extrakční reagentie a brání uvolnění DNA molekul. Vlastní extrakční metoda musí být dostatečně citlivá pro izolaci malého množství DNA a vysoce specifická pro extrakci nukleových kyselin kvůli odstranění potenciálních inhibitorů PCR. S výhodou je, pokud izolační metoda dovolí získaný extrakt ještě zkoncentrovat. Každá laboratoř používá obvykle velmi dlouho optimalizovanou metodu, která je pro zaměření jejich studií neúčinnější a zároveň ekonomicky nepřijatelnější.

### 3.6.1 Příprava vzorků

Na účinnost čistících resp. dekontaminačních postupů je kladen velký důraz, protože pozdější odhalení pre-laboratorních kontaminací je nejsložitější. Zvolená metoda pro čištění vzorků kombinuje neúčinnější způsoby dekontaminací, tedy mechanickou, chemickou (NaOCl) a fyzikální (UV) (Kemp & Smith 2005; Malmström et al. 2005).

Pomocí skalpelu byly odstraněny zbytky půdních nečistot z povrchů vzorků kostí i zubů. U kostních vzorků byla odříznuta co největší část spongiózy. Z povrchové i vnitřní části kostních vzorků byla skleněným papírem obroušena nejméně 2 mm silná vrstva tkáně (v závislosti na míře zabarvení). U vzorků s velmi tenkou vrstvou kompakty bylo odstraněno jen nezbytné minimum. Chemické čištění probíhalo postupným máčením vzorků v pětiprocentním chlornanu sodném (Savo) 2 min, destilované vodě 2 min a acetonu 1 min. Vzorky byly sušeny v laminárním boxu a současně dekontaminovány UV světlem (254 nm) ze vzdálenosti přibližně 20 cm po dobu 30 min z obou stran. Pro rozdrcení vzorků byl použit přístroj Vibrom, využívající principu drcení ocelovou koulí v uzavřené nádobě. Drcení vzorků probíhalo vždy po 5 min u kostí a 1 min u zubů tak dlouho, dokud nedošlo k rozdrcení zubu nebo získání velmi jemného prášku u kostních vzorků. Pokud byl pro rozdrcení vzorku třeba delší čas, byla před každým dalším drcením dodržována pauza (asi 3 min), aby nedošlo k degradaci DNA vlivem tepla vznikajícího při mechanickém zpracování (Alonso et al. 2001).

Získaný kostní prášek byl rovnoměrně rozdělen v množství 0,5 g do zkumavek Eppendorf (1,5 ml). U některých větších vzorků odebraných z kostí, byl prášek rozdělen na dva a více vzorků, které byly označeny jako paralelní izolace původních vzorků. Tyto vzorky byly skladovány při 4 °C a použity později v případě vyčerpání původních vzorků<sup>1</sup>. Zuby byly použity vždy celé v rámci jednoho izolačního vzorku. Poslední část dekontaminačního protokolu probíhala jako součást dekalifikace a je tedy součástí dané kapitoly.

Všechna manipulace se vzorky probíhala v prostředí laminárního boxu aDNA laboratoře. Použit byl celotělový ochranný oblek, rouška, ochranné brýle a dvojí rukavice. Svrchní rukavice byly pravidelně (minimálně po každém vzorku) měněny. Nástroje používané k čištění a manipulaci se vzorky byly po každém vzorku dekontaminovány 5%

---

<sup>1</sup> Paralelní izolační vzorky byly označeny vždy stejným číslem původního vzorku a písmenem abecedy (např. paralelní izolace vzorku 2 – 2b, 2c atd.). V souhrnu všech výsledků jsou tyto izolace u každého vzorku označeny hvězdičkou (Příloha 9).

chlornanem sodným (Savo) a po každé sérii vzorků (6 až 10 vzorků) vystaveny UV záření (254 nm). Mlýnek pro pulverizaci byl po každém vzorku důkladně vyčištěn za pomoci vody a saponátu, 5% chlornanu sodného a dH<sub>2</sub>O a vysušen v laminárním boxu. Po každé sérii vzorků byl povrch koule a vnitřní část mlýnku dekontaminována UV zářením po dobu alespoň 30 min.

### 3.6.2 Dekalcifikace

Protokol zvolený pro dekalifikaci zahrnuje inkubaci vzorků v kyselině ethyldiaminaminooctové (EDTA, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). EDTA demineralizuje a zároveň deaktivuje DNázy chelatací bivalentních kationtů (Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>). Účinnost a rychlost dekalifikace závisí převážně na koncentraci EDTA a velikosti objemu pufru v poměru k hmotnosti prášku, méně na použité teplotě a času (Andelinović et al. 2005; Loreille et al. 2007; Rohland & Hofreiter 2007b).

Přibližně 0,5 g kostního prášku bylo promícháno s 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8). Supernatant získaný po stočení vzorku (12 000 g) byl odstraněn jako poslední krok dekontaminačního protokolu u kostí (viz předchozí kapitola). U zubů byl tento krok vynechán vzhledem k pravděpodobnému výskytu DNA na povrchu vnitřních stěn pulpy. Oba druhy vzorků byly následně promíchány s 0,5 ml 0,5 M EDTA a inkubovány při 4 °C po dobu 7 až 10 dní za stálého míchání.

EDTA byla před použitím autoklávována (121 °C, 30 min) a používána v přibližně 20 ml aliquotech. Negativní izolační kontrola byla vytvořena průměru na každý osmý vzorek.

### 3.6.3 Izolace aDNA silika metodou

Pro aDNA extrakci byla využita metoda založená na specifické adsorpci nukleových kyselin na povrchy oxidu křemičitého SiO<sub>2</sub> (silika) za přítomnosti chaotropních solí. Tyto soli mají destabilizující účinek na vnitřní strukturu různých makromolekul (jako je DNA, RNA nebo proteiny), včetně vody. Narušují vodíkové vazby vody i hydratační obal normálně se vyskytujícího kolem makromolekul a umožňují reverzibilní navázání nukleových kyselin záporně nabitými fosfátovými zbytky na povrch



siliky (Vogelstein & Gillespie 1978). Přesný charakter vzniklé vazby dosud nebyl jasně definován. Adsorpce závisí převážně na pH, které by se mělo pohybovat v rozmezí 4 až 7,5 (optimálně pH 4–5). Jakékoli překročení nad nebo pod vymezenou hranici výrazně ovlivňuje výtěžek extrakce (Rohland & Hofreiter 2007b). Kapacita siliky přesahuje 1 mg navázané DNA na 1 g siliky a plně dostačuje pro extrakci většinou nízké koncentrované DNA v historických vzorcích.

Rozsáhlé srovnávání jednotlivých metod extrakce DNA z tvrdých tkání ukázalo na vysokou účinnost „silika“ metod oproti ostatním např. organickým metodám (Rohland & Hofreiter 2007b). Pro tuto práci byl zvolen postup vycházející z protokolu Booma et al. 1990 (Boom et al. 1990). Metoda využívá digesce proteinových molekul proteinázou K, specifické vazby DNA na siliku za přítomnosti guanidin thiokyanátu (GuSCN) a zároveň možného odstranění všech potencionálně inhibujících látek z roztoku. DNA je nakonec uvolňováno do pH neutrálního pufru nebo vody za zvýšené teploty (Höss & Pääbo 1993). Zvolená metoda nevyžaduje další krok koncentrace vzorku, která je zajištěna vhodnou volbou objemu elučního média. Extrakční a promývací pufrы jsou připravovány přímo v laboratoři a před použitím dekontaminovány. Riziko kontaminací pocházejících z izolační metody je tedy závislé hlavně na správném dodržení postupu metody (Höss & Pääbo 1993; Rohland & Hofreiter 2007a). Metoda je zároveň nesporně levnější než běžné komerční metody a bezpečnější než fenol-chloroformová extrakce.

### **3.6.4 Protokol izolace aDNA**

Silikátová suspenze byla připravena podle původního (Höss & Pääbo 1993) i novější (Rohland & Hofreiter 2007b) protokolu. Oba dva postupy se navzájem liší délkou časových intervalů a jsou s úspěchem používány (Rohland & Hofreiter 2007a). Suspenze byla rozdělena na aliquoty po přibližně 200  $\mu$ l a skladována ve tmě při 4 °C.

Extrakční a promývací pufrы byly připraveny podle původního protokolu (Höss & Pääbo 1993). Po celou dobu přípravy byla striktně dodržována doporučení pro prevenci kontaminace pufrů. Všechny kroky zahrnující otevírání flakonek (přidávání chemikálií apod.) byly prováděny v laminárním boxu. Ověření pH probíhalo pipetováním na lakmusový papírek. Oba typy pufrů byly dekontaminovány 100  $\mu$ l silikátové suspenze (na

přibližně 50 ml objemu pufru), po dobu 3 až 10 h (přes noc) za občasného promíchání. Před použitím byly stočeny na maximum a dále skladovány ve tmě za pokojové teploty.

**Extrakční pufr:** 10 M GuSCN  
0,1 M Tris-HCl pH 6,4  
0,02 M EDTA pH 8  
1,3% Triton X-100

**Promývací pufr:** 10 M GuSCN  
0,1 M Tris-HCl pH 6,4

Proteinová složka byla degradována proteinázou K s výslednou koncentrací 0,4 až 0,5 µg/µl při 56 °C 10 min za stálého míchání. Přibližně 0,4–0,5 ml získaného supernatantu (12 000 g, 1 min) bylo inkubováno v nové 1,5 ml zkumavce s 0,8–0,9 ml extrakčního pufru při 56 °C 3 až 8 h za stálého míchání. Po centrifugaci (24 000 g, 5 min) a přenesení supernatantu opět do nové 1,5 ml zkumavky byl roztok inkubován s 20 µl silikátové suspenze při 56 °C 1 h za stálého mírného míchání. Dále byla silika promývána vždy po stočení (12 000 g, 1 min) a odstranění supernatantu postupně 0,5 ml promývacího pufru, 0,5 ml 70% ethanolu (+ NaCl) a 0,5 ml 70% ethanolu bez chloridu sodného. Nakonec byla silika krátce propláchnuta v 0,5 ml acetonu a sušena v laminárním boxu za přítupu vzduchu 20 min. Silika s navázanou DNA byla skladována při –20 °C. Před amplifikací byla DNA uvolněna do 80 µl sterilní dH<sub>2</sub>O nebo TE pufru inkubací při 56 °C 15 min za stálého míchání. Vzorky byly stočeny na maximum (24 000 g, 5 min) a supernatant byl velmi opatrně odebrán a přenesen do 0,2 µl zkumavky.

### 3.7 Amplifikace aDNA

Metody amplifikace historické DNA jsou specificky přizpůsobené malému množství nukleových kyselin v reakci a potenciálním inhibicím reakce. V tomto ohledu je při amplifikacích aDNA možné vycházet z tzv. metod LCN. Pojem LCN (low copy number) existuje v rámci oboru forenzní genetiky přibližně deset let (Gill et al. 2000) a označuje souhrn všech metod zvyšujících citlivost genetických analýz vzorků s velmi

nízkou koncentrací DNA, LT-DNA (low template DNA). Původní definice LT-DNA resp. LCN analýz vycházela z kvantitativního vyjádření obsahu DNA ve vzorku. Hranice pro LT-DNA byla stanovena na 100 pg/μl DNA (Gill et al. 2000). Dnes se pro kvantitativní rozlišení považuje koncentrace pod 200 pg/μl, která by měla více odpovídat množství, při kterém se začínají objevovat problémy s vyhodnocováním výsledků (Moretti et al. 2001). Vzhledem k často obtížné kvantifikaci vzorků s velmi malým množstvím DNA a odlišnostmi v odhadech koncentrací mezi kvantifikačními metodami se postupně ustálila definice vycházející z kvality získaných výsledků. Metody LCN a aDNA analýz se tedy do jisté míry propojují. V této práci jsme využili hlavně zvýšení počtu cyklů PCR a postupně také redukci celkového objemu PCR reakce (Budowle et al. 2009). Dalšími metodami PCR s výhodou využívanými při amplifikacích obecně degradované DNA jsou například tzv. touch down, hot start, nested PCR nebo dvoukrokové a multiplexové PCR. V této práci jsme pro amplifikaci aDNA využili metody „hot start“. Tento typ PCR slouží k redukci nespecifických produktů, které se vytváří ještě před začátkem prvního cyklu reakce. Pro zabránění vzniku těchto produktů se dříve používalo oddělení jedné z PCR komponent, např. dNTP, které byly do reakce přidávány až po dosažení vyšších teplot. V našem případě jsme použili polymerázu AmpliTaq Gold, jejíž enzymatická činnost se aktivuje až v průběhu iniciační denaturace. Z ostatních vyjmenovaných metod jsme také využili výhod multiplexové reakce, kdy se amplifikuje několik různých lokusů DNA najednou. Tohoto efektu je docíleno kombinací několika párů primerů, mezi nimiž nedochází ke vzájemné interakci.

Amplifikace aDNA probíhala postupně v několika krocích. Nejprve byl u všech vzorků amplifikován lokus amelogeninu. Vzorky, u kterých se opakovaně nepodařilo amplifikovat DNA, byly z dalších analýz vyřazeny nebo reisolovány (viz kap. Autentizace výsledků). Na základě výsledků úspěšnosti amplifikace amelogeninu byla zvolena a optimalizována metoda pro STR analýzu. Metoda byla optimalizována nejdříve na moderní DNA a následně použita a dále optimalizována na aDNA vzorcích. Všechny protokoly nebo příklady protokolů použitých pro optimalizaci a následnou amplifikaci aDNA jsou pro větší přehlednost obsahem přílohy V.

Příprava mastermixu pro amplifikaci aDNA probíhala jen v laboratoři aDNA, samotná amplifikace v laboratoři pro moderní DNA. Příprava mastermixu a amplifikace moderní DNA probíhala jen v „moderní“ laboratoři. V případě použití pozitivní kontroly

amplifikované zároveň se vzorky aDNA byla vždy recentní DNA přidávána do reakce až v laboratoři moderní.

### 3.7.1 Amplifikace amelogeninu

Pro amplifikaci amelogeninu byly zvoleny primery ohraničující fragmenty o délce 80 bp u žen a 80 / 83 bp u mužů (Haas-Rochholz & Weiler 1997). Tento lokus byl vybrán, protože je jedním z nejkratších pro analýzu pohlaví (Sullivan et al. 1993).

**Tab. 3** Sekvence primerů pro amelogenin 80 / 83 bp (Haas-Rochholz & Weiler 1997)

Lokus	Označení	Sekvence primerů (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)
Amelogenin	VIC	F – CCC TTT GAA GTG GTA CCA GAG CA	57,0
80 / 83 bp		R – GCA TGC CTA ATA TTT TCA GGG AAT A	55,0

Pozn.: Fluorescenčně značené primery byly použity až u multiplexové reakce.  
F = forward, R = reverse, T<sub>m</sub> = teplota tání

Amplifikace amelogeninu probíhala v celkovém reakčním objemu 50 µl. Množství templátové DNA přidávané do reakce bylo 5 µl. Každý vzorek byl amplifikován ve třech paralelních reakcích. Amplifikace byly opakovány v případě výskytu silné inhibice s vyšším počtem jednotek polymerázy a/nebo s přidáním bovinního sérového albuminu (BSA, 20 mg/ml, Fermentas) v koncentraci od 0,3–0,8 µg/µl.

### 3.7.2 Výběr metodiky STR analýzy

Jednotlivé STR lokusy byly vybírány ze standardně používaných systémů v oboru forenzní genetiky (tzv. core loci), pro které existuje vysoký počet srovnávacích populačních databází a jsou proto voleny u většiny aDNA analýz (Bouwman et al. 2008; Parsons et al. 2007; Vaněk et al. 2009). Zároveň s ohledem na pravděpodobnou vysokou degradaci DNA ve vzorcích byla zvolena metodika umožňující amplifikaci zkrácených STR markerů tzv. miniSTR (Butler et al. 2003), u kterých již byla několikrát ukázána vyšší

úspěšnost amplifikace aDNA nebo obecně degradované DNA (Catelli et al. 2008; Fondevila et al. 2008; Opel et al. 2006). Nejprve byla zvolena metoda amplifikace jednotlivých lokusů zvlášť, aby bylo možné v případě velmi špatných výsledků optimalizovat metodu jen pro jeden lokus. Multiplexová reakce přesto přináší velkou výhodu amplifikace více lokusů najednou. Proto byly jednotlivé lokusy vybírány s ohledem na podobnost teplot tání jednotlivých primerů a možnostech kombinovatelnosti (Butler et al. 2003; Parsons et al. 2007).

Pro STR analýzu byly tedy vybrány celkem čtyři lokusy – TH01, D8S1179, D2S1338 (v průběhu optimalizace nahrazen markerem vWA) a D21S11. Kromě posledně zmíněného nepřekračují amplifikační produkty délku 150 bp. Lokus D21S11 s průměrnou délkou 200 bp byl vybrán pro posouzení míry degradace aDNA.

**Tab. 4** Přehled pěti použitých STR markerů

Lokus	Rozsah alel	Délka fragmentu
TH01	3–14	51–98 bp
D8S1179	7–19	86–134
D2S1338	15–28	90–142
vWA	10–25	88–148
D21S11	24–38.2	153–211

**Tab. 5** Sekvence primerů a teplota tání pro vybrané STR lokusy (Butler et al. 2003)

STR lokus	Označení	Sekvence primerů (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)
TH01	6-FAM	F – CCT GTT CCT CCC TTA TTT CCC	61,0
		R – <b>GTT TCT TGG</b> GAA CAC AGA CTC CAT GGT G	62,8
D8S1179	NED	F – TTT GTA TTT CAT GTG TAC ATT CGT ATC	58,5
		R – ACC TAT CCT GTA GAT TAT TTT CAC TGT G	59,4
D2S1338	-	F – TGGAAACAGAAATGGCTTGG	61,0
		R – GATTGCAGGAGGGAAGGAAG	61,1
vWA	VIC	F – AATAATCAGTATGTGACTTGGATTGA	58,1
		R – ATAGGATGGATGGATAGATGGA	57,3
D21S11	NED	F – ATT CCC CAA GTG AAT TGC	55,8
		R – GGT AGA TAG ACT GGA TAG ATA GAC GA	56,5

F = forward, R = reverse, T<sub>m</sub> = teplota tání

### 3.7.3 Optimalizace protokolu a amplifikace STR

Pro optimalizaci protokolu STR analýzy byla použita buněčná linie K562. Dále byla použita DNA pracovníka laboratoře s již dříve určeným STR profilem (PowerPlex® 16), která byla izolovaná ze slin<sup>2</sup>. Pro obě pozitivní kontroly byly vytvořeny ředící řady k získání koncentrací od 500 pg/μl do přibližně 50 pg/μl. Výchozí koncentrace DNA před ředěním a následné koncentrace vzorků ředící řady do 0,5 ng/μl byla ověřena na Spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop™). Ostatní uváděné koncentrace (pod 500 pg/μl) jsou přibližné.

Pro STR analýzu byl na základě výsledků amplifikace amelogeninu navržen pozměněný protokol. Vzhledem k vysokému výskytu drop-outu byl čas iniciační denaturace prodloužen z 5 min na 8 min a každá další denaturace z 15 s na 30 s, aby byla zajištěna dostatečná denaturace DNA (Parsons et al. 2007). Doba elongace primerů byla prodloužena z 20 s na 1 min kvůli přítomné inhibici amplifikace. Objem reakce byl snížen z 50 μl na 25 μl (Budowle et al. 2009).

Optimalizace protokolu probíhala následovně. Nový protokol byl nejdříve vyzkoušen u všech použitých primerů (včetně amelogeninu) na moderní DNA. Protože byla zpočátku používána levnější Taq polymeráza, byl čas iniciační denaturace zkrácen na tři minuty. Postupně byla pro každý STR lokus určena nejvhodnější annealingová teplota metodou gradientové PCR, při rozsahu teploty annealingu od 50 do 60 °C. Citlivost amplifikační metody byla vyzkoušena na koncentracích DNA od 500 do přibližně 50 pg/μl. U lokusu D2S1338 byl zaznamenán vysoký podíl nespecifických produktů do 55 °C a samostatné alely se podařilo amplifikovat až při 60 °C. Vzhledem k tomu, že při amplifikaci aDNA se obvykle volí nižší teploty annealingu, byl tento lokus vyřazen a nahrazen markerem vWA. U ostatních lokusů se produkty u jednotlivých teplotních profilů nelišily a dále byla používána už jen teplota annealingu 55 °C.

Pro amplifikaci STR lokusů a amelogeninu byla vytvořena multiplexová reakce. Pro první reakci byla zvolena ekvimolární koncentrace všech primerů (8 pmol na reakci). Dále byly jednotlivé koncentrace přizpůsobovány podle výsledků amplifikace při stejné a měnící se koncentraci templátové DNA v reakci (ukázka výsledku jedné z optimalizačních reakcí je zařazena do přílohy VI, obr. 14).

---

<sup>2</sup> DNA byla izolovaná stejnou metodou použitou pro izolaci aDNA s následujícími rozdíly. Krok dekalifikace byl úplně vynechán a čas inkubace v extrakčním pufru zkrácen na 1 h. Izolace probíhala v moderní laboratoři.

Jednotlivé STR lokusy byly u některých aDNA vzorků nejprve amplifikovány zvlášť v singleplexové reakci. Protože se ve většině případů podařilo získat produkt alespoň u tří z použitých markerů, byla dále využívána pro amplifikaci jen multiplexová reakce.

### **3.8 Detekce PCR produktů**

Přítomnost produktu v amplifikační reakci byla u všech PCR nejprve ověřena na agarózovém gelu. Detekce a rozlišení jednotlivých alel amelogeninu a STR probíhala na vertikální nativní polyakrylamidové elektroforéze (PAGE) a/nebo kapilární elektroforéze.

#### **3.8.1 Agarózová elektroforéza**

Produkty amplifikace byly separovány na 2% agarózovém gelu pomocí horizontální elektroforézy v 0,5× TBE pufru při napětí 80 až 100 V po dobu 45 min. Na gel bylo nanášeno 5 µl produktu s 1 µl nanášecího pufru (6 × DNA Loading Dye, Fermentas). Produkty byly detekovány pomocí ethidium bromidu a UV-transluminátoru. Velikost byla odečtena podle 50 bp DNA žebříčku (Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas) v softwaru GeneTools (Syngene).

#### **Protokol pro přípravu agarózového gelu**

Agaróza	0,8 g
5× TBE	4 ml
dH <sub>2</sub> O	36 ml
- pro celkový objem roztoku 40 ml	

### 3.8.2 Polyakrylamidová elektroforéza

Separace alel amelogeninu a samostatně amplifikovaných STR lokusů probíhala na tzv. nativní polyakrylamidové elektroforéze (PAGE). Polyakrylamidový gel vzniká polymerizací monoakrylamidu v prostředí volných radikálů do dlouhých řetězců. Volné radikály v reakci vznikají redukcí amonium persulfátu (APS) tetramethylendiaminem (*N, N, N', N'*-tetramethylendiamin, TEMED). V přítomnosti *N, N'*-metylenbisakrylamidu vzniká trojrozměrná struktura síťovaného polymeru s pravidelně uspořádanými póry. Rozlišení a průběh separace je ovlivněna koncentrací akrylamidu, tloušťkou gelu a silou elektrického pole (Grosman & Colburn 1992). Nejčastěji používané koncentrace polyakrylamidu jsou 5–15 %, přičemž koncentrace *N, N'*-metylenbisakrylamidu je obvykle 5 % celkového množství akrylamidu. V nativní polyakrylamidové elektroforéze se oproti denaturační PAGE molekuly DNA pohybují ve své přirozené formě.

Pro rozlišení alel amelogeninu byl standardně používán 12% gel. Pro STR byla vyzkoušena rozlišovací schopnost na 12% a 15% gelu. Více koncentrovaný gel prakticky nepřispěl ke zlepšení metodiky a dále byl tedy využíván převážně gel 12%.

#### Protokol pro přípravu polyakrylamidového gelu

<u>Reagencie</u>	<u>12% gel</u>
40% Akrylamid:bisakrylamid (19 : 1)	10, 5 ml
10% APS	400 µl
TEMED	40 µl
10× TBE	3,5 ml
dH <sub>2</sub> O	20,5 ml

- pro celkový objem roztoku 35 ml

Skla aparatury byla vždy před elektroforézou důkladně očištěna saponátem a opláchnuta destilovanou vodou. Případné zbytky nečistot byly odstraněny etanolem (96%). Směs pro gel byla připravena podle protokolu, jako poslední byl přidán amonium persulfát pro aktivaci polymerizační reakce a roztok byl důkladně promíchán. Většina směsi byla pomalu nalita mezi utěsněná skla aparatury, opatrně byl zasunut hřebínek a zbytek roztoku



gelu byl dolit až ke kraji. Případné bublinky byly odstraněny mírným pohybem hřebínku nebo ponechány. Po ztuhnutí gelu (1 h) bylo odstraněno těsnění a skla byla upevněna do aparatury. Hřebínek byl odstraněn po naplnění elektroforézy pufrem (1× TBE).

Pro separaci amplifikačního produktu amelogeninu byl na gel nanášen objem 30  $\mu$ l produktu s 5  $\mu$ l nanášecího pufru (6 × Orange DNA Loading Dye, Fermentas). Produkty STR amplifikace byly nanášeny v objemu 20  $\mu$ l se 4  $\mu$ l nanášejícího pufru (6 × DNA Loading Dye). Elektroforéza probíhala při 90 V prvních 30 min až hodinu pro dokonalejší zaostření DNA bandů, dále pak při 110 V přes noc (asi 15 hod). Po proběhnutí elektroforézy byl gel ponořen na 15 min do roztoku ethidium bromidu (0,5  $\mu$ g/ml) a poté krátce propláchnut ve vodě. Produkty byly detekovány pod UV světlem.

### 3.8.3 Kapilární elektroforéza

Rozlišení alel STR markerů amplifikovaných v multiplexové reakci probíhalo na kapilární elektroforéze. Fragments DNA jsou při této metodě rozděleny v polyakrylamidovém gelu obsaženém v tenké kapiláře. Detekce DNA je zajištěna snímáním fluorescenčního signálu z fluorescenčně značených primerů. Produkt PCR je injektován do kapiláry společně se standardním velikostním markerem, podle kterého je možné odečíst velikost fragmentů.

Separační analýza STR probíhala v Laboratoři sekvence DNA Přf UK na přístroji 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Amplifikační produkt byl injektován v objemu 1  $\mu$ l společně s 9  $\mu$ l Hi-Di™ formamidu (Applied Biosystems) a 0,3  $\mu$ l GS500 LIZ standardního velikostního žebříčku (Applied Biosystems). Elektroforéza probíhala v polymeru POP-6 a kapiláře o délce 50 cm.

### 3.8.4 Určení alel

Alely amelogeninu (80 / 83 bp) byly rozlišeny podle velikosti pomocí 50 bp nebo 20 bp standardního velikostního DNA žebříčku (20 bp DNA Ladder, Fermentas). Alely STR singleplexů byly determinovány podle velikosti odečtené od 20 bp DNA žebříčku a podle alelového žebříčku připraveného reamplifikací naředěného alelového žebříčku PowerPlex® 16 (Promega) dle publikovaného protokolu (Butler et al. 2003)

s následujícími rozdíly. Pro reamplifikaci byly použity vždy primery pro každý lokus zvlášť a v koncentraci 10 pmol na reakci. Taq DNA polymeráza byla použita namísto AmpliTaq Gold a čas denaturačních fází byl zkrácen. Počet cyklů byl zdvojnásoben kvůli získání vyšší koncentrace produktu detekovatelného na polyakrylamidovém gelu. Konečná extenze byla zkrácena vzhledem k tomu, že PAGE nebyla používána pro separaci alel s délkovým rozdílem 1 báze (pro přesný přehled původního a odvozeného protokolu odkazují na Přílohu VI). Výsledné byly vyhodnoceny v softwaru GeneTools.

Determinace alel STR u multiplexových reakcí probíhala určením velikosti podle standardního velikostního žebříčku GS500 LIZ a pomocí alelového žebříčku připraveného podle protokolu (Butler et al. 2003). Pro každý STR marker byl žebříček amplifikován zvlášť (koncentrace každého z primerů byla 10 pmol na reakci) a následně smíchán v poměru 1 : 1 : 2 : 3 (TH01 : D8S1179 : vWA : D21S11). Velikost alel byla determinována v softwaru Genescan 7.3 a typ alely určen porovnáním získaných velikostí s alelovým žebříčkem.

## 4 AUTENTIZACE VÝSLEDKŮ

Stále nová kritéria validace výsledků aDNA analýz jsou publikována a diskutována vzhledem k přibývajícím poznatkům o charakteru kontaminací a možnostech jejich zachycení (Gilbert et al. 2006; Leonard et al. 2007; Malmström et al. 2007). V této práci byla zvolena řada ze standardních preventivních opatření pro snížení rizika kontaminace vzorků cizorodou DNA (Cooper & Poinar 2000). Další metody byly využity pro zhodnocení autenticity výsledků z hlediska výskytu kontaminací, PCR artefaktů a falešně negativních výsledků. Popis jednotlivých metod a částečné shrnutí výsledků je součástí následujících kapitol.

### 4.1 Obecná preventivní opatření

Příprava vzorků pro izolaci, izolace aDNA a příprava mastermixu pro PCR probíhala v laboratoři výhradně určené pro práci s aDNA. PCR a post-PCR práce byly prováděny v laboratoři pro výzkum moderní DNA. Mezi laboratořemi nedocházelo k výměně vybavení, chemikálií nebo ochranných pomůcek a byl dodržován přísně jednosměrný pohyb pracovníků z pre-PCR do post-PCR prostor. Vstup do aDNA laboratoře byl po práci v moderní laboratoři dovolen jen po osprchování a výměně oblečení. Všichni laboratorní pracovníci používali ochranný celotělový oblek (příprava vzorků, izolace) nebo plášť, dále čepice, roušky, dvojí latexové rukavice a ochranné návleky.

Veškeré laboratorní povrchy v aDNA laboratoři včetně laminárního boxu byly pravidelně čištěny lihobenzínem a sterilizovány 5% NaOCl (Savo). Laminární box byl také pravidelně dekontaminován UV zářením (254 nm, přes noc). Drobné kovové nástroje a laboratorní sklo bylo dekontaminováno buď 5 % NaOCl, pomocí UV nebo autoklávováno. Pro vzorky DNA a zásobní roztoky byly využívány jen aerosol rezistentní špičky. Všechny chemikálie, roztoky nebo pufrů byly autoklávovány (kromě PCR reagentů), popřípadě dekontaminovány silika metodou. V případě opakovaného používání byly rozděleny do aliquotů, aby nedošlo ke kontaminaci zásobních roztoků.

Pozitivní kontroly pro ověření účinnosti amplifikace nebyly standardně používány společně s aDNA vzorky kromě prvních amplifikací, kdy byl optimalizován protokol pro

amelogenin a v případě ověření protokolu amplifikace u lokusu D21S11 (Amplifikace aDNA). V takovém případě byla moderní DNA přidávána do reakce až v moderní laboratoři.

Pro přehled konkrétních preventivních opatření vztahujících se k protokolům izolace a amplifikace odkazují na dané kapitoly.

## 4.2 Detekce potenciálních kontaminací

V průběhu izolací byla v průměru na každý osmý vzorek založena negativní izolační kontrola obsahující čistou EDTA bez vzorku. Na každou amplifikaci byla založena minimálně jedna negativní PCR kontrola s přidáním sterilní vody namísto extraktu. V průběhu celé práce nebyla detekována kontaminace v žádné z negativních izolačních kontrol. Ve dvou případech amplifikace aDNA byla kontaminována negativní kontrola PCR. V prvním případě se nepodařilo amplifikovat DNA z žádného jiného vzorku v reakci. Ve druhém případě byl zároveň amplifikován amelogeninový lokus ve dvou ze tří paralelních PCR u vzorku 47 (jedinec 34). Protože tento výsledek nebyl dále opakovatelný, byl tento vzorek z dalších analýz vyřazen a výsledky nebyly použity.

U všech pracovníků laboratoře, kteří měli přístup do aDNA laboratoře byly stanoveny genotypy všech čtyř použitých STR polymorfismů (tab. 10, str. 52) a porovnány s výsledky amplifikací všech vzorků. Žádný z výsledných STR genotypů se jako celek neshodoval s profily pracovníků, kteří měli přístup do aDNA laboratoře. U jedinců 25 a 41 se podařilo určit jen několik alel, které se částečně shodují s profilem jednoho z pracovníků. Protože se ale neshodovaly genotypy amelogeninu, jsou tyto alely součástí výsledků.

## 4.3 “Appropriate molecular behavior“

Ancient DNA je zpravidla velmi degradovaná a umožňuje amplifikaci jen krátkých fragmentů. Pravděpodobnost amplifikace úseků okolo 500 až 1000 bp je velmi nepravděpodobná a je považována za kontaminaci (Bouwman et al. 2008; Cooper & Poinar

2000). Úspěšnost amplifikace a koncentrace produktu se rychleji zvyšuje při amplifikaci kratších lokusů (pod 100 pb) u aDNA oproti dobře zachovalé kontaminující DNA (Malmström et al. 2007). V našem případě byly amplifikovány lokusy s délkou fragmentů od přibližně 60 bp do 250 bp. V této práci se podařilo amplifikovat většinou jen lokusy kratší než 150 bp, což přispívá k důvěryhodnosti získaných výsledků

#### **4.4 Zachovalost material**

U kostních vzorků byla hodnocena zachovalost za prvé z důvodů zpětného posouzení rizika falešně negativních výsledků u relativně dobře zachovaných vzorků. Za druhé pro validaci výsledků na základě zachovalosti materiálu. Pro posouzení obsahu autentické DNA ve vzorcích se obvykle doporučuje použít některou z několika dosud publikovaných biochemických metod (Cooper & Poinar 2000; Poinar et al. 1996). Vzhledem k tomu, že hodnocení zachovalosti kostí nesloužilo pro výběr jednotlivých vzorků k analýze, byl zvolen metodicky jednodušší postup. Protože zachovalost DNA přímo koreluje s histologickou zachovalostí kompaktní tkáně (Götherström et al. 2002), která souvisí s makroskopicky ohodnotitelnou zachovalostí kostí (Haynes & Searle 2002), byly všechny vzorky během zpracování rozděleny do následujících kategorií:

##### *Velmi dobrá zachovalost*

- kost na povrchu hladká, bez odlupujících se vrstev; celkově těžká, při řezu velmi tvrdá, blíží se tvrdosti čerstvé kosti; na řezu bez nebo s minimem makroskopicky rozeznatelných pórů

##### *Dobrá zachovalost*

- kost na povrchu drsná, s trhlinami a odlupujícími se povrchovými vrstvami; při řezu tvrdá; na řezu s makroskopicky rozeznatelnými póry v kompaktní vrstvě

### *Špatná zachovalost*

- hrubá struktura kosti, při běžné manipulaci se rozpadá, velmi křehká kost, původní tvar je těžce rozeznatelný; kost má „křídový“ charakter

Do přehledu úspěšnosti amplifikace na základě zachovalosti byly započteny jen vzorky, u kterých se podařilo amplifikovat DNA alespoň ve dvou nezávislých izolacích. Protože je tento princip totožný s postupem zvoleným pro autentizaci celkových genotypů, který je popsán na konci celé kapitoly, použili jsme i v tomto případě stejného označení (varianta 2, var. 2).

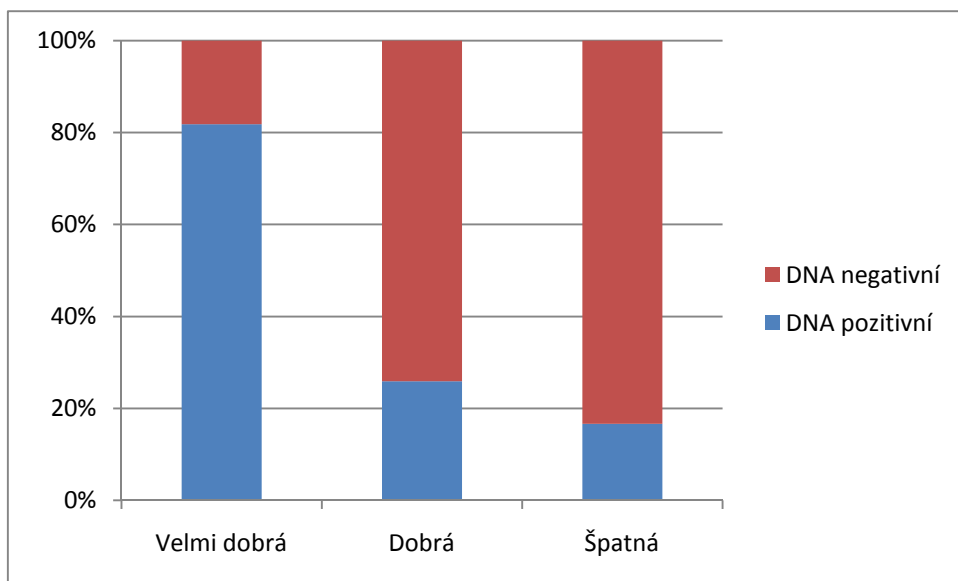
Podle zachovalosti kostních vzorků se častěji podařilo amplifikovat DNA z velmi dobře zachovalých vzorků oproti druhým dvěma kategoriím. Absolutní počet negativních a pozitivních vzorků podle stavu zachovalosti kostí je shrnut v tab. 6. Relativní úspěšnost amplifikace vyjadřuje graf 1. Podle druhé varianty autentizace byla aDNA pozitivní většina z velmi dobře zachovalých vzorků. Výjimkou byly vzorky 47 (tibie, jedinec 34) a 69 (tibie, jedinec 63). Vzorek 47 byl z analýz vyřazen z důvodu pravděpodobné kontaminace a nebyl tedy do souhrnu započítán. Vzorek 69 byl vzhledem k velmi dobré zachovalosti reizolován společně se vzorky 10, 25, 28, 34, 37, 61 a 62 (dobrá zachovalost) a vzorkem 32 (špatná zachovalost). U žádného z těchto vzorků se nepodařilo DNA amplifikovat. Další přehled postupů uplatněných u negativních vzorků obsahuje další kapitola.

**Tab. 6** Počet aDNA pozitivních a negativních kostních vzorků vzhledem k zachovalosti

Zachovalost	Úspěšnost amplifikace		
	DNA pozitivní*	DNA negativní	Celkem
Velmi dobrá	9	2	11
Dobrá	7	20	27
Špatná	1	5	6

\* varianta autentizace 2

**Graf 1** Relativní úspěšnost amplifikace ze všech odebraných kostních vzorků v závislosti na stavu zachovalosti



#### 4.5 Postup u PCR negativních vzorků

Rozsah výsledků je kromě zachovalosti DNA ve vzorcích ovlivněn také vhodně zvolenou izolační a amplifikační metodikou. Dosud publikované práce se odhalení falešně negativních výsledků věnují spíše výjimečně v porovnání s problematikou zachycení případných kontaminací (Chilvers et al. 2008; Kemp et al. 2006).

V této práci byl každý vzorek amplifikován ve třech paralelních amplifikacích. Pokud se DNA nepodařilo detekovat ani v jedné reakci (Amelo) nebo po první úspěšné amplifikaci se již nepodařilo výsledek znovu zopakovat (Amelo, STR) a existovalo podezření na falešně negativní výsledek (velmi dobře zachovalý vzorek, detekce inhibice PCR reakce), byl postup následující. V případě detekce inhibice PCR, byla reakce opakována s přidáním BSA, se zvýšenou koncentrací polymerázy a/nebo s nižším objemem vzorku v reakci. Dalším postupem byla reizolace původního izolačního vzorku nebo využití paralelní izolace (viz kap. Příprava vzorků).

## 4.6 Autentizace genotypů

Výsledky aDNA analýz mohou být zkresleny falešně pozitivními výsledky způsobené přítomnými kontaminacemi a PCR artefakty vzniklými z důvodu vysoké degradace DNA. Opakovatelnost výsledků je jedním z hlavních kritérií pro autentizaci výsledků. V našem případě byly odebírány vzorky materiálu tak, aby bylo možné porovnat výsledky z různých částí skeletu jedince nebo alespoň ze vzorků odebraných z různých míst jedné kosti. V případě, že se podařilo amplifikovat DNA ze vzorku, byla PCR znovu opakována.

Pro vyhodnocení výsledných genotypů u každého jedince byly zvoleny dvě varianty autentizace. V první „přísnější“ variantě (varianta 1, var. 1) byly do profilu započteny jen ty alely, které byly potvrzeny minimálně ve dvou nezávislých amplifikacích ze dvou nezávisle odebraných a zpracovávaných (izolovaných a amplifikovaných) vzorků. U druhé varianty byla do celkového genotypu započtena každá alela, která byla detekována alespoň ve dvou nezávislých PCR (amplifikace vzorků v různých dnech). V řadě případů se podařilo amplifikovat DNA jen jednou a výsledek už nebyl více opakovatelný. Do výsledků tyto alely nebyly započítány vůbec a jsou jen vypsány jako součást celkového přehledu získaných výsledků (Příloha IX).

Pro rozlišení opravdových homozygotů od falešně negativních heterozygotů byl zvolen následující postup. Pokud se stejná alela opakovala v rámci všech analýz jedince alespoň 5krát a žádná jiná alela nebyla detekována, byl jedinec označen jako homozygot pro danou alelu (x/x). V případě detekce jedné odlišné alely, byl jedinec označen jako homozygot jen v tom případě, že byla častější alela určena alespoň desetkrát. V takovém případě byla druhá alela považována za pravděpodobnou kontaminaci nebo PCR artefakt. Pravidlo platilo pro obě varianty autentizace!

Za stuttery byly považovány ty alely, které se amplifikovaly pod 10 % hranicí výšky následného peaku. V případě detekce peaku pod 30% hranicí byl výskyt stutteru ještě ověřen porovnáním výsledných alel z různých amplifikací. Pokud byla tato hypotetická alela detekována jen v přítomnosti následující alely, byla kratší alela považována za stutter. Všechny ostatní alely jsou uvedeny v přehledu všech výsledků a byly započteny při validaci genotypů.

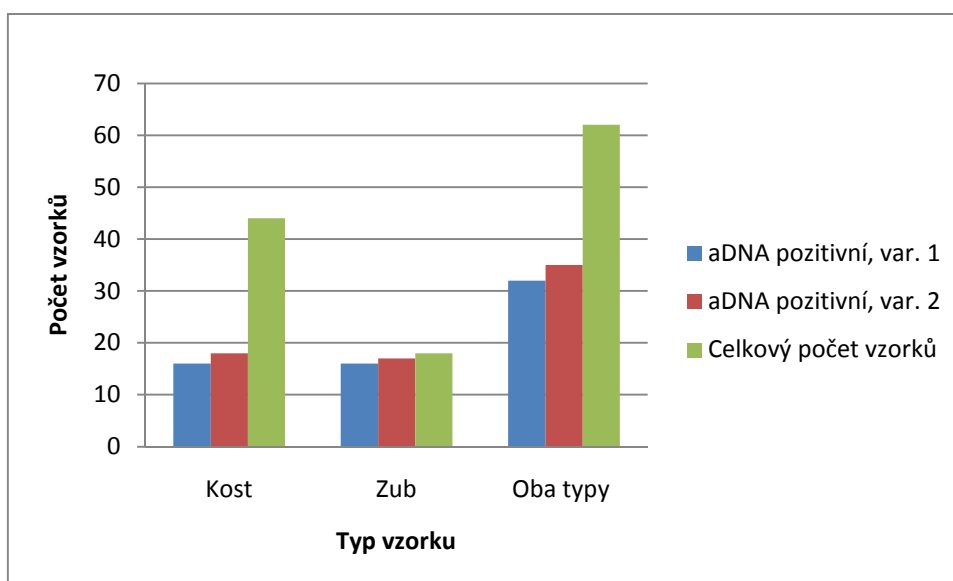


## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Úspěšnost amplifikace aDNA

Do analýz vstoupilo celkem 62 vzorků odpovídající 23 jedincům. DNA byla alespoň jednou detekována u 36 ze všech odebraných vzorků (58% úspěšnost). V souladu s podmínkami autentizace se podařilo amplifikovat aDNA z 52 % (var. 1) resp. 57 % (var. 2) všech odebraných vzorků. Z celkového počtu 44 kostních vzorků jsme získali amplifikovatelnou DNA u 36 % resp. 41 % vzorků. Úspěšnost u vzorků zubů byla 89% resp. 94% (celkový počet 18). Úspěšnost amplifikace DNA (v absolutních číslech) z celkového počtu odebraných vzorků a podle jednotlivých typů tkání při platnosti obou autentizačních variant zobrazuje graf 2.

**Graf 2** Úspěšnost amplifikace aDNA z celkového počtu odebraných vzorků



### 5.1.1 Amplifikace amelogeninu

V souladu s přísnější variantou autentizace se podařilo určit genotyp amelogeninu u 12 z celkového počtu 23 jedinců. V osmi případech byl detekován mužský profil. Pro druhou verzi autentizace mohl být výsledný genotyp pohlaví stanoven u 16 jedinců, z nichž se u 12 (80 %) objevil mužský profil. Souhrn výsledků amplifikace amelogeninu a rozdíly v obou verzích autentizace je obsahem tab. 7.

**Tab. 7** Souhrnný přehled úspěšnosti amplifikace a genotypů amelogeninu v obou variantách autentizace

Označení hrobu	Amelo (var. 1)	Amelo (var. 2)	STR
6	xx	xx	+
7A	xx	xx	+
8	-	-	-
10A	-	-	-
10B	xx	xx	+
10C	xy	xy	+
15A	xy	xy	+
15B	xy	xy	+
17	-	-	-
24	xy	xy	?
25	x/?	<b>xy</b>	+
34	xx	xx	+
35	-	-	-
37	-	<b>xy</b>	-
38A	-	-	-
38B	-	-	-
41	-	<b>xy</b>	+
43	xy	xy	?
49	xy	xy	+
55	-	<b>y</b>	-
58	xy	xy	+
60	-	-	-
63	xy	xy	+

Pozn.: Zvýrazněny jsou odlišnosti od varianty 1. Znaménko plus označuje opakovatelný výsledek STR analýz (var. 2), znaménko mínus negativní výsledek a otazník neopakovatelné výsledky STR. Amelo = amelogenin

### 5.1.2 Amplifikace STR

Z celkového počtu 16 jedinců, kteří vstoupili do STR analýz po úspěšné amplifikaci amelogeninu, se podařilo amplifikovat alely všech čtyř lokusů u dvou (var. 1) resp. tří jedinců (var. 2). Plný profil všech STR se podařilo určit pouze u jednoho jedince (15b), nezávisle na autentizačních variantách. Částečný profil se podařilo získat u devíti resp. osmi jedinců. Dva jedinci (24, 43) vykazovali neopakovatelné výsledky. U jednoho jedince (55) se již nepodařilo amplifikovat žádnou z alel STR markerů. Určené genotypy u každého jedince podle obou variant autentizace jsou obsahem následujících dvou tabulek.

**Tab. 8 a 9** Souhrnný přehled výsledných STR profilů a analýzy amelogeninu, var. 1 a 2

Jedinec	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
6	xx	6/8	13/14	18/?	-
7a	xx	9/9.3	14/14	18/20	-
10b	xx	8/9	10/?	18/?	31.2/?
10c	xy	6/7	-	-	-
15a	xy	9/?	15/?	-	-
15b	xy	6/7	12/13	15/19	28/31.2
24	xy	-	-	-	-
25	x/?	9/?	14/?	-	-
34	xx	-	-	-	-
41	-	9/?	-	-	-
43	xy	-	-	-	-
49	xy	-	10/?	-	-
55	-	-	-	-	-
58	xy	6/?	12/?	-	-
63	xy	9.3/9.3	13/13	14/?	-

Jedinec	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
6	xx	6/8	13/14	18/?	-
7a	xx	9/9.3	14/14	18/20	<b>32.2/?</b>
10b	xx	8/9	10/?	18/?	31.2/?
10c	xy	6/7	-	-	-
15a	xy	9/?	15/?	-	-
15b	xy	6/7	12/13	15/19	28/31.2
24	xy	-	-	-	-
25	<b>xy</b>	9/?	14/?	-	-
34	xx	<b>7/9.3</b>	-	-	-
41	<b>xy</b>	9/?	-	<b>16/?</b>	-
43	xy	-	-	-	-
49	xy	<b>9/9.3</b>	10/?	-	-
55	<b>y</b>	-	-	-	-
58	xy	<b>6/9</b>	12/?	-	-
63	xy	9.3/9.3	13/13	<b>14/18</b>	-

Pozn.: Otazník označuje případy, kdy genotyp nebyl potvrzen ani jako homozygot ani jako heterozygot. Zvýrazněny jsou rozdíly mezi oběma variantami autentizace.

**Tab. 10** STR profily pracovníků laboratoře

	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
P1	xx	8/9	11/14	14/16	30/30,2
P2	xy	6/9.3	13/14	17/17	31,2/31,2

P = pracovník laboratoře

## 5.2 Analýza STR

Vzhledem k celkově malému počtu získaných věrohodných genotypů bylo možné stanovit genetickou diverzitu a distribuci alel jen u markeru TH01. Získané výsledky jsme porovnali s populačními charakteristikami recentních českých populací a obecně populacemi evropskými. Dále bylo možné získaná data porovnat s novověkým pohřebišťem podobného rozsahu a charakteru (Dudar et al. 2003). Kvůli příliš malému počtu jedinců v konečném souboru jsme nevyužili pro srovnání výsledků statistických metod, ale jen přímého srovnání. Bohužel se nepodařilo získat dostatečný rozsah STR genotypů pro analýzu příbuznosti, která by přinesla hodnověrné výsledky.

### 5.2.1 Genetická diverzita

Genetická diverzita byla vyjádřena hodnotou pozorované heterozygoty ( $H_o$ ) a předpokládané heterozygoty při platnosti Hardy-Weinbergovy rovnováhy ( $H_e$ ). Hodnota pozorované heterozygoty byla získána z poměru výskytu heterozygotních jedinců oproti celkovému počtu jedinců. V případech, kdy nebyl potvrzen homozygotní ani heterozygotní genotyp, byli jako heterozygoti počítáni a) pouze potvrzení heterozygoti (8 z 12 jedinců), b) všechny případy genotypů, u kterých nebyl potvrzen homozygotní stav (11 z 12).

Předpokládaná heterozygotita pro jeden lokus byla vypočtena podle vzorce:

$$H_e = 2n (1 - \sum x_i^2) / (2n - 1) \text{ (Nei 1978).}$$

$$\text{a) } H_o = 0,66 \quad H_e = 0,71$$

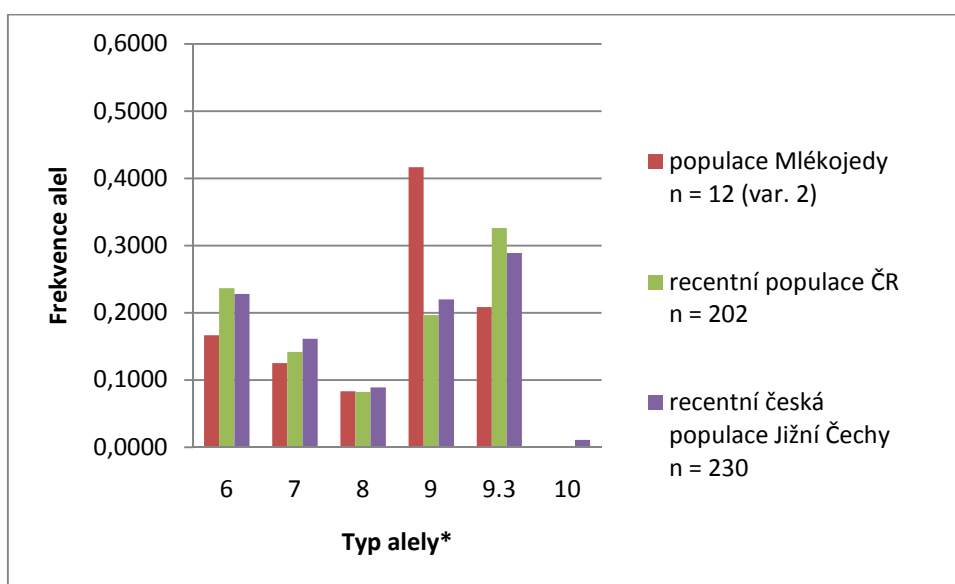
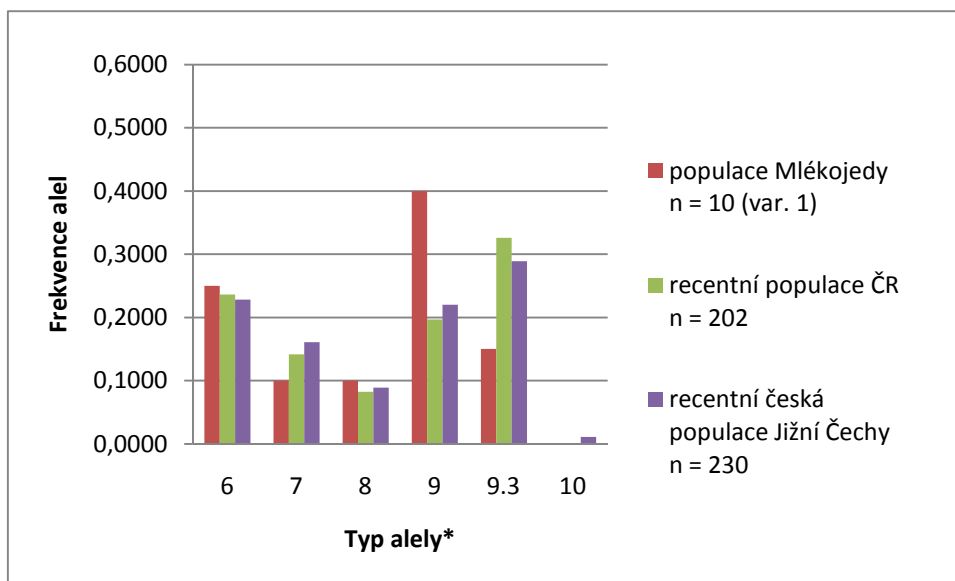
$$\text{b) } H_o = 0,92$$

Hodnota  $H_o$  (a) je mírně snížena oproti stanovené očekávané heterozygotitě. Obě hodnoty (a, b) se zároveň liší od rozsahu heterozygoty lokusu TH01 u populací Evropy, který se pohybuje od 0,76 do 0,80 (Montelius et al. 2008; Santos et al. 1996; Sotak et al. 2008; Šimková et al. 2009; Turowska & Sanak 2000).

### 5.2.2 Distribuce alel

U markeru TH01 se opakovaně podařilo amplifikovat alely 6 až 9.3. U recentní české populace tvoří vyjmenované alely pět nejčastějších alel lokusu TH01, s frekvencemi pohybujícími se od 10 do 32 % (Šimková et al. 2009). Největší podíl detekovaných alel u vzorku populace Mlékojedy tvořily alely 6, 9 a 9.3, nejméně často byla detekována alela 8 resp. 7 a 8 při platnosti přísnější varianty autentizace. Tyto poměry se shodují s distribucí alel u současné české populace (Vaněček et al. 2005; Vaněk et al. 2000). Alely se současnou četností 1 % a méně nebyly detekovány. U obou variant autentizace je patrná mírně zvýšená frekvence alely devět oproti recentním datům (graf 3).

**Graf 3 a 4** Frekvence alel lokusu TH01 u populace Mlékojedy (var. 1 a 2), recentní populace České republiky (Vaněk et al. 2000) a populace Jižní Čech (Vaněček et al. 2005)



\*Uvedeny jsou jen alely s četností rovnou nebo větší 1 % u recentních českých populací  
n = počet jedinců

Pro lokus D8S1179 se podařilo získat výsledky jen u devíti jedinců. Celkem bylo opakovaně detekováno 6 typů alel (alely 10 až 15). Tyto alely představují přibližně 96 % všech alel v recentní populaci, s výskytem od 7 do 33 %. Alely s četností menší než 2 % se nepodařilo opakovaně amplifikovat.

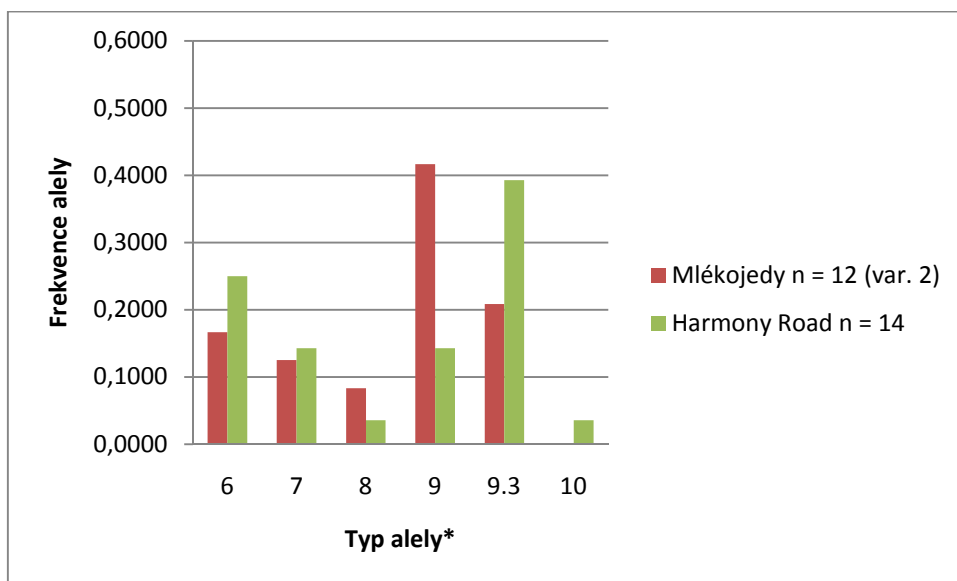
Pro lokusy vWA a D21S11 se nepodařilo získat dostatečný počet profilů pro zhodnocení alelových frekvencí. V prvním případě byly kromě jedné výjimky alespoň

jednou detekovány všechny typy alel, které se v současné populaci vyskytují s frekvencí rovné nebo vyšší 0,01. Nejčastější česká alela lokusu vWA 17 (necelých 27 %) nebyla detekována ani jednou. U systému D21S11 se podařilo opakovaně amplifikovat tři typy dnes průměrně často se vyskytujících alel.

### 5.2.3 Porovnání STR charakteristik s pohřebišťem Harmony Road

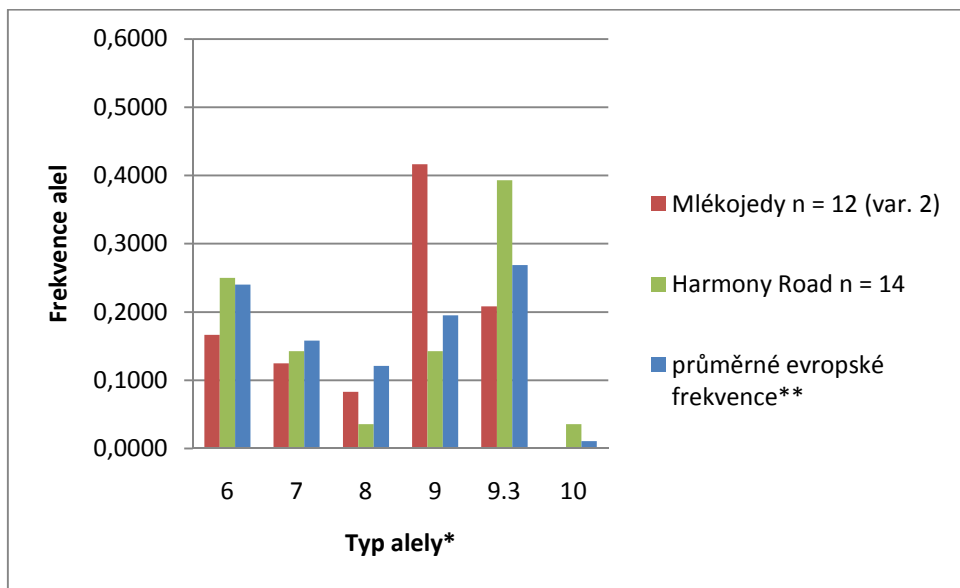
Frekvence alel a míra heterozygoty byla dále porovnána s daty získanými z novověkého pohřebiště (19. st.) Harmony Road (Ontario, Kanada) (Dudar et al. 2003), které bylo založeno rodinami evropského původu. Část tohoto pohřebiště, které bylo zatím odkryto a podrobena genetické analýze bylo využíváno přibližně sto let a zahrnovalo celkem 38 jedinců. Míra pozorované heterozygoty markeru TH01 byla stanovena ze získaných genotypů 14 jedinců na 0,78 a neliší se od hodnoty  $H_e$  (0,77) (Nei 1978). Srovnání frekvencí lokusu TH01 u souboru jedinců pohřebiště Mlékojedy a Harmony Road ukazuje graf 5. Následující graf obsahuje srovnání obou pohřebišť s průměrnou recentní distribucí alel daného lokusu u evropských populací.

**Graf 5** Distribuce alel lokusu TH01 souboru jedinců z pohřebiště Mlékojedy a jedinců pohřebiště Harmony Road (Dudar et al. 2003)



\*Zahrnutý jen detekované alely v obou studiích

**Graf 6** Distribuce alel obou pohřebišť v porovnání s průměrnými evropskými frekvencemi



\*Zahrnutý jen detekované alely v obou studiích

\*\*Zdrojem frekvencí byla databáze programu popSTR



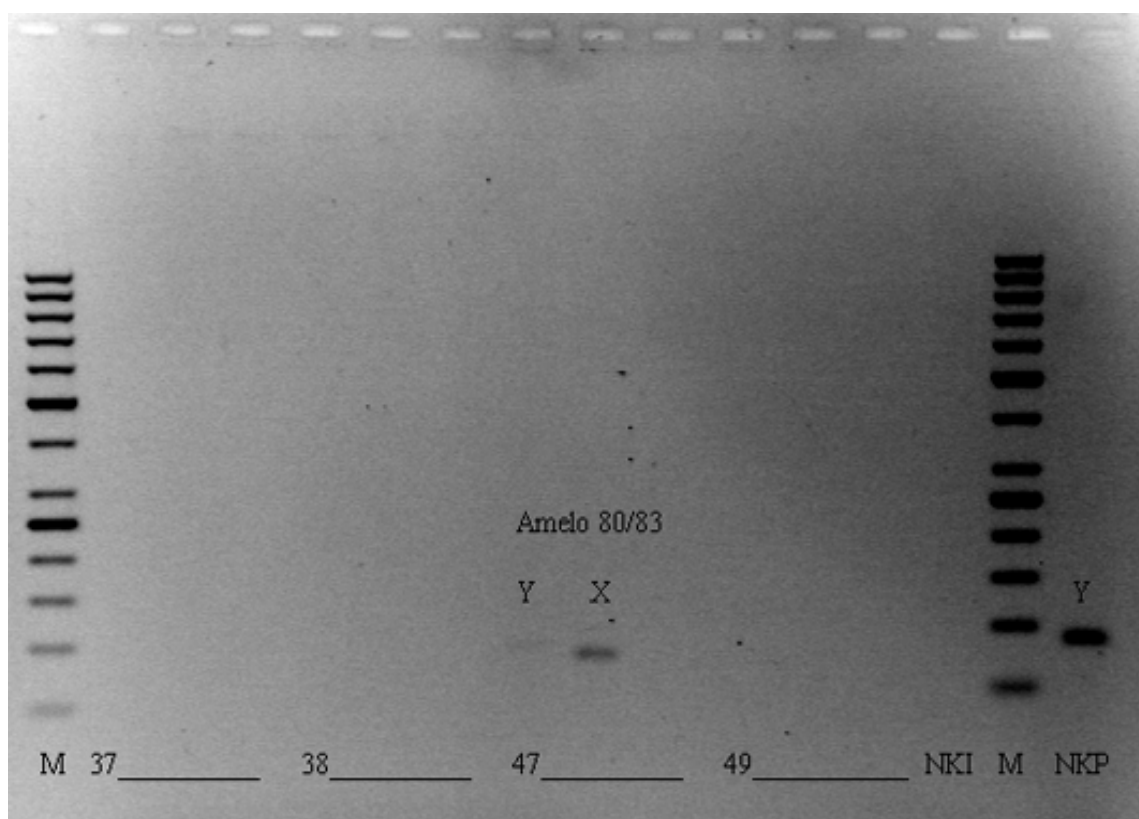
## 6 DISKUZE

### 6.1 Autenticita výsledků

Výsledky aDNA analýz jsou do velké míry ohroženy rizikem zkreslení v důsledku potenciálních kontaminací a PCR artefaktů, typicky se vyskytujících u analýz degradované DNA. Odhalení případných kontaminací, jejich zdrojů a/nebo způsobu přenosu tvoří podstatnou část problematiky aDNA i po skoro čtvrt století existence tohoto oboru. Do dnešního dne byla publikována řada více či méně účinných metod využívaných pro validaci výsledků aDNA analýz. V této práci jsme použili většinu ze standardních opatření pro prevenci amplifikace „neautentické“ DNA. Celková autenticita výsledků v této práci byla posouzena podle výskytu a rozsahu kontaminací v negativních kontrolách, porovnáním získaných genotypů s profily pracovníků laboratoře, rozsahu výsledků na základě délky amplifikovaného fragmentu („appropriate molecular behavior“) a úspěšnosti amplifikace DNA v závislosti na zachovalosti kostí.

Žádná z negativních izolačních kontrol nebyla během celé práce kontaminována a jen dvakrát, byla zachycena kontaminace u PCR negativních kontrol. V obou případech PCR kontrol byla z celé amplifikační série kontaminována buď jen kontrola samostatně, nebo společně s několika PCR vzorky (obr. 2). Tyto výsledky naznačují menší pravděpodobnost výskytu rozsáhlých laboratorních kontaminací (např. zásobních roztoků). Vzhledem k tomu, že u vzorku 47 i u negativní kontroly byl detekován mužský profil amelogeninu, vyvstává otázka, zda se nejednalo v tomto případě o autentickou DNA. Kontaminace PCR kontroly mohla vzniknout vzájemnou kontaminací („cross-contamination“) vycházející z PCR vzorků obsahujících autentickou DNA. U vzorku 47 se již nepodařilo opakovaně DNA amplifikovat a ostatní vzorky jedince s označením 34 vykazovaly ženský genotyp. Předpokládáme tedy, že se v tomto případě jednalo o sporadickou kontaminaci vykazující u aDNA vzorků podobný charakter jako historická DNA. Patrný rozdíl v koncentraci amplifikačních produktů mohl vzniknout přítomností inhibičních faktorů v izolačním extraktu, který se do negativních PCR kontrol nepřidává.

**Obr. 2** Úkazka výskytu kontaminace při amplifikaci lokusu amelogeninu



M = velikostní marker 50 bp, NKI = negativní izolační kontrola, NKP = neg. PCR kontrola

Použití STR markerů pro účely validace bylo nejvíce přínosné u těch vzorků, kde se podařilo získat genetický profil alespoň dvou, lépe však třech markerů. V případě amplifikace jednotlivých STR lokusů samostatně nebo u vysokého alelového drop-outu nebylo možné objektivně vyloučit možnost kontaminací. Věrohodně ověřeny mohly být až výsledné genotypy jednotlivých vzorků nebo jedinců, u kterých jsme shodu nezaznamenali. Tyto výsledky naznačují, že preventivní opatření pro zabránění kontaminací z laboratorních zdrojů byla dostatečná.

Pro výsledné vyhodnocení genotypů amelogeninu a STR jsme použili dvou postupů. V první variantě jsme jako autentické považovali jen genotypy, které se opakovaly u různých vzorků od jednoho jedince. Ve druhé variantě jsme započítali do výsledků alely, které se podařilo amplifikovat alespoň ve dvou nezávislých PCR. První varianta je jedna z přísnějších autentizačních metod, kterou je možné použít jen u rozsáhlého biologického materiálu (Haak et al. 2008). Druhá metoda byla v této práci sice považována za méně věrohodnou, ale umožnila autentizaci i v těch případech, kdy byl

materiál velmi omezený, nebo se z jiných odebraných vzorků DNA izolovat nepodařilo. Výsledky doplňujících validačních metod spíše přispívají k názoru, že izolovaná a amplifikovaná DNA ze vzorků je autentická. DNA se podařilo opakovaně amplifikovat z více jak 80 % vzorků odebraných z velmi dobře zachovalých kostí. U hůře zachovalých kostí byla úspěšnost PCR amplifikace nápadně snížena. Rozsah výsledků se zároveň snižoval s rostoucí délkou amplifikovaného fragmentu, jak u samostatně amplifikovaných lokusů, tak u výsledků multiplexových reakcí. Tyto výsledky samozřejmě nemohou vyloučit možnost sporadických kontaminací, ale podobnost s podobnými studiemi aDNA přispívá k věrohodnosti získaných výsledků (Dudar et al. 2003; Haak et al. 2008). Proto považujeme i druhou variantu autentizace za věrohodnou vzhledem k potenciálním kontaminacím cizorodou DNA.

## 6.2 Úspěšnost amplifikace aDNA

V této práci se podařilo získat opakovaně amplifikovatelnou DNA v průměru u 55 % ze všech 62 odebraných vzorků tvrdých tkání. Nižší úspěšnost jsme zaznamenali u kostních vzorků, která byla přibližně 35%. Naopak vzorky zubů se v tomto případě ukázaly být mnohem častějším zdrojem DNA (~ 91% úspěšnost). Vysoký rozdíl v úspěšnosti amplifikace u obou tkání je pravděpodobně důsledkem více faktorů.

Zuby byly již v minulosti označeny za vhodnější zdroj jaderné DNA (Woodward et al. 1994; Zierdt et al. 1996) a v současné době jsou pro analýzy vybírány mnohem častěji oproti kostním vzorkům (Haak et al. 2008). V případě této studie tvořili značnou část souboru jedinci dětského věku a zuby se u některých případů v dostupném materiálu vůbec nenacházeli nebo byly výrazně hůře zachovalé. Objektivní porovnání zachovalosti zubů a kostí je poměrně složité. Zachovalost kostí byla v této práci hodnocena spíše z důvodů ověření autenticity výsledků. Hodnocena byla hlavně tvrdost resp. křehkost a celková makroskopicky rozeznatelná struktura tkáně související se zachovalostí nukleových kyselin. U zubů je pro zachovalost DNA důležitá spíše celistvost a neporušenost skloviny, která zabraňuje působení vnějších degradačních faktorů, jako je voda nebo mikroflóra. Zachovalost kostních tkání je tedy o něco více ovlivněna například propustností půdy, ve které jsou pozůstatky uloženy. Z ranně středověkého pohřebiště z lokality „Na Pískách“, kde bylo podloží tvořeno převážně různými druhy písků, se u necelých padesáti procent

jedinců dochovaly jen fragmenty lebky se zuby. Dlouhé kosti se zachovaly u přibližně čtyřiceti procent jedinců<sup>3</sup> (Ungerma 2008). V případě našeho pohřebiště byla část podloží tvořena hlavně píský a celé nálezové místo se nacházelo v těsné blízkosti řeky podobně jako u předchozího případu. Nemáme sice k dispozici informaci o celkové zachovalosti skeletů jedinců na pohřebišti, ale rozsah vzorků, který jsme zpracovávali, byl u určitých jedinců obdobný jako u předešlého pohřebiště.

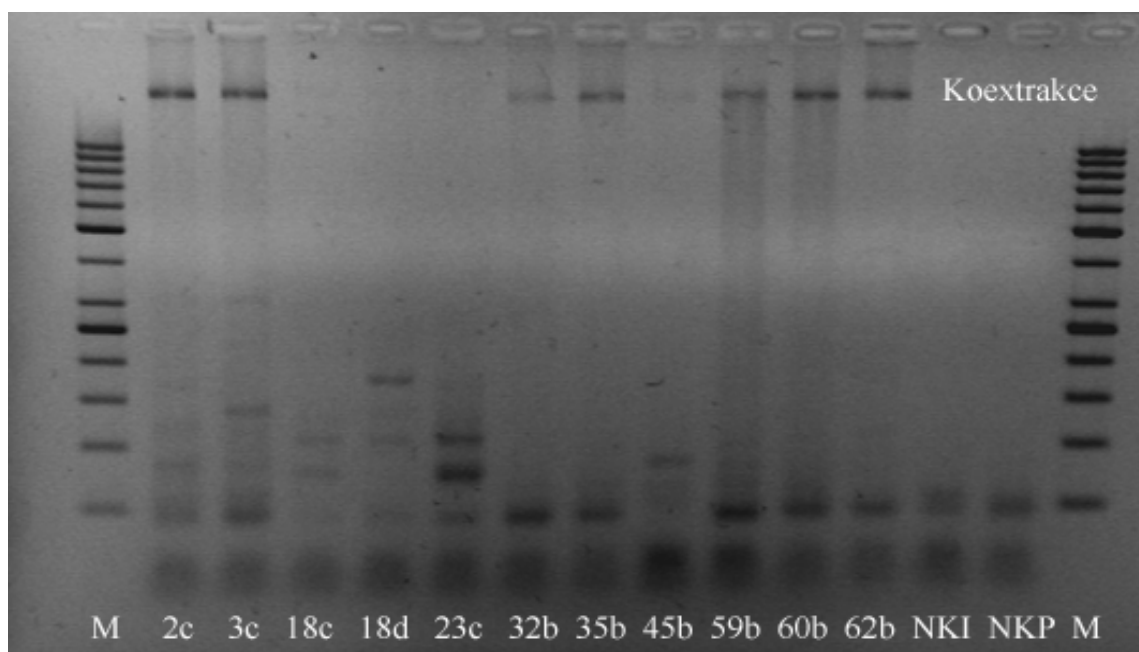
Degradační podmínky vnějšího prostředí mohly mít rozdílný vliv na zachovalost kostí vzhledem k rozdílnému poměru obsahu proteinové a minerální složky u dětských jedinců oproti dospělým. Tato možnost není rozhodně zanedbatelná, vzhledem k tomu, že podstatnou část našeho souboru tvořili děti do 6 let (12 z 23). Rozdíl v zachovalosti kostí u těchto mladších jedinců oproti starším nebyl významný a toto srovnání proto ani není součástí výsledků. Celková zachovalost, například z hlediska mikrostruktury tkáně, ale nebyla hodnocena. Marina Faerman (Faerman et al. 1998) analyzovala pohlaví u novorozenců (4. až 6. století), u nichž předpokládali úmrtí v důsledku infanticidy. Pro studii použili vzorky z celých nebo fragmentárních femurů. Z celkového počtu 43 amplifikovali opakovaně DNA u 44 % vzorků, což je o něco málo více než v případě naší studie, ale přesný popis zachovalosti použitého materiálu nebyl dostatečný. Porovnání obou studií je ale diskutabilní, protože metodika aDNA analýz se za posledních dvanáct let výrazně vylepšila. Naše výsledky také nevyklučují možnost, že u skeletálního materiálu dospělých jedinců, by mohlo být dosaženo většího úspěchu.

Při hodnocení úspěšnosti amplifikace DNA je nutné diskutovat i možný vliv zvolené metodiky. U některých kostních vzorků jsme na agarózovém gelu zaznamenali přítomnost nespecifických produktů (obr. 3). Protože se tyto produkty opakovaly u všech amplifikací a izolací vzorků odebraných vždy z určitých kostí, je pravděpodobnější, že tyto produkty nevznikly při PCR reakci, ale byly koextrahovány zároveň s DNA. Tyto látky tedy mohly zároveň inhibovat PCR reakci a zároveň snižovat množství navázané DNA na siliku při extrakci.

---

<sup>3</sup> Z celkového počtu 1286 jedinců, jejichž celková zachovalost se podařila určit na základě kreseb a fotografií v práci autora.

**Obř. 3** Ukázka detekce nespecifických produktů u kostních vzorků



Pozn.: Nespecifické produkty jsou viditelné u vzorků 2c, 3c, 32b, 35b, 59b, 60b, 62b.

### 6.3 Analýza STR

V této práci se podařilo určit genotypy markeru TH01 u 10 (var. 1) resp. 12 jedinců z celkem dvaceti šesti. Hodnoty pozorované heterozygoty byly stanoveny z celkového počtu 12 genotypů, v případě započtení i diskutabilních homozygotů (0,66) a v případě započtení jen potvrzených homozygotů (0,92). V případě platnosti první hodnoty by se jednalo o mírné snížení pozorované heterozygoty oproti očekávané hodnotě při platnosti H-W rovnováhy. Obě hodnoty jsou v tomto případě stejně tak mírně sníženy oproti rozsahu heterozygoty u evropských populací včetně české (0,76 – 0,80).

U recentních populací je snížení heterozygoty pozorováno v případě příliš malého souboru, přítomnosti příbuzných jedinců ve studovaném souboru, u výrazně endogamních populací nebo nedávném rozsáhlém snížení velikosti populace („bottleneck“). V našem případě se jedná o velmi malý vzorek raně středověké populace a zkreslení hodnot z tohoto důvodu nelze v žádném případě vyloučit. Dosud publikované výzkumy pohřebišť na populační úrovni zaznamenali výraznější snížení diverzity vyjádřené autozomálními STR

polymorfismy jen velmi zřídka a ve většině případů se hodnoty neliší od dnešních populací (Bramanti et al. 2000a; Dudar et al. 2003; Gerstenberg 2002; Keyser-tracqui et al. 2003). V prvotní studii ranně středověkého pohřebiště Weingarten (Německo) byl detekován výrazný rozdíl pozorované heterozygotity STR markeru vWA (41 %, 31 jedinců) oproti hodnotě  $H_e$  (77 %, 58 jedinců). Pohřebiště Weingarten je jedno z nejrozsáhlejších raně středověkých pohřebišť v Německu (kolem tisíce jedinců). Soubor o celkem dvou stech jedincích byl pro studii vybrán náhodně a obě hodnoty genetické diverzity byly stanoveny z relativně velkého vzorku jedinců. V případě snížené heterozygotity a normální distribuce alel se u aDNA studií častěji diskutuje vliv PCR artefaktů. Protože stanovená distribuce alel se podle H. Zierdta podobala recentní německé populaci i dalším populacím Evropy, byla již v původní práci diskutována možnost zkreslení výsledků v důsledku alelového drop-outu. Alelový drop-out je jeden z PCR artefaktů, který je typickým výsledkem aDNA výzkumů v případech, kdy je amplifikován lokus DNA vykazující bialelický charakter. Ztráta jedné alely způsobí, že původní heterozygotní genotyp je mylně vykládán jako homozygotní a zvyšuje se tedy celkový počet homozygotů v souboru. Další rozsáhlá analýza tohoto pohřebiště stejného rozsahu již podobné snížení hodnoty nezaznamenala a podpořila hypotézu vysokého výskytu alelového drop-outu u původní studie (Gerstenberg 2002). V této práci jsme zaznamenali velmi vysoký podíl alelového drop-outu, který je patrný hlavně na výsledcích amplifikace amelogeninu. Z tohoto důvodu byla vypočítána i druhá hodnota  $H_o$ , kdy jsme jedince považovali za homozygotní pro TH01 v případě, že daná alela byla detekována alespoň 5krát<sup>4</sup> a žádná jiná alela nebyla amplifikována. Pozorovaná heterozygotita byla stanovena při platnosti tohoto kritéria na 0,92. Obě stanovené hodnoty se tedy pohybují nad i pod očekávaným rozsahem 0,76–0,80 a proto je velmi pravděpodobné, že hodnota pozorované heterozygotity u studovaného vzorku se spíše neodchyluje od recentních hodnot.

U markerů TH01 a D8S1179 jsme detekovali všechny alely vyskytující se u současné české populace s četností vyšší než 1 % (2 % pro lokus D8S1179). Stanovené frekvence alel lokusu TH01 se významně neliší od recentní české populace. Při platnosti obou variant autentizace je patrné mírné zvýšení frekvence alely devět. Toto vychýlení je opět možné považovat za důsledek malého souboru jedinců a nelze ani vyloučit vliv nesprávně určených homozygotů jako v předešlém případě. Mírně zvýšené sdílení jedné nebo více alel mezi jedinci bylo detekováno i u pohřebiště z Goslaru (18. st.) (Bramanti et

---

<sup>4</sup> Započítány byly všechny výsledky amplifikací ze všech izolací pro daného jedince.

al. 2000b). Zvýšená četnost určitých alel byla přisouzena pravděpodobnému výskytu blízkce příbuzných jedinců v souboru. Tato hypotéza by mohla platit i u pohřebiště Mlékojedy, vzhledem k poměrně malé velikosti pohřebiště. Hypotézu příbuznosti mezi jedinci by mohlo podporovat započítání genotypů jedinců, kteří sdíleli společný hrob (15a, 15b a 24, 25). U obou dvojic ale byly určeny naprosto odlišné genotypy. Sdílení alel mezi jedinci bychom mohli hypoteticky předpokládat i u jedinců pohřbených v těsné blízkosti nebo u oddělených skupin jedinců v rámci prostorové struktury pohřebiště (Dudar et al. 2003). Tato možnost nemohla být v našem případě dostatečně posouzena z důvodu omezeného počtu získaných genotypů.

Srovnání hodnot genetické diverzity našeho souboru s pohřebištěm Harmony road ukázalo na stejné rozdíly, které vyplynuly ze srovnání s recentními populacemi. Distribuce alel čtrnácti jedinců z pohřebiště Harmony Road se výrazně neliší od průměrných evropských frekvencí. Na tomto pohřebišti se očekávala blízká příbuznost mezi jedinci, vzhledem k existujícím záznamům o pohřbívání. Tento předpoklad se projevil spíše sdílením některých alel markeru TH01 a hlavně haplotypů mtDNA u jedinců pohřbených v těsné blízkosti. Zároveň byly frekvence alel pro lokus TH01 vypočítány z podobně malého souboru a mohly tedy být vystaveny podobnému vychýlení hodnot, ke kterému nedošlo. V našem případě bohužel nelze ze získaných výsledků vyhodnotit jasné závěry, ale výše popsaná srovnání spíše ukazují, že zjištěné mírné snížení pozorované heterozygoty a zvýšení frekvence alely devět je pravděpodobněji důsledkem PCR artefaktů spojených s aDNA analýzami.

## 7 ZÁVĚR

Jednoduchá metodika STR analýz nám umožnila studovat rozsáhlý soubor lidských skeletálních pozůstatků z ranně středověkého českého pohřebiště Mlékojedy. Vysoká citlivost metody silikátové extrakce umožnila izolovat aDNA z 35 % kostních vzorků a z 91 % zubů. U většiny PCR amplifikací ze všech izolačních vzorků jsme zaznamenali vysoký podíl alelového drop-outu, který vyústil v nutnost použití přísných validačních opatření, která do značné míry ovlivnila možnosti interpretace získaných výsledků. Početné metody autentizace výsledků a jejich vyhodnocení na druhou stranu přispívá k přesvědčení, že byla izolována a analyzována autentická aDNA. V naší práci se tedy znovu ukázalo, že zuby jsou obecně vhodnějšími zdroji historické DNA. Snížená PCR amplifikace u kostních vzorků byla diskutována i s ohledem na vliv vnějších degradačních vlivů, specifických pro dané pohřebiště, a v propojení s problematikou zachování skeletálních pozůstatků dětských jedinců.

Přesto, že analýza pohlaví na pohřebišti nebyla cílem této práce, podařilo se nám získat opakovatelně amplifikovatelný genotyp amelogeninu u 16 z 23 jedinců. Pro analýzu genetické struktury na pohřebišti jsme aplikovali metodu STR genotypizace pomocí zkrácených STR lokusů. Alely všech čtyř použitých markerů se podařilo amplifikovat jen u tří jedinců. Nejdelší z markerů D21S11 jsme detekovali jen výjimečně. Celkově zvýšená úspěšnost PCR amplifikací u kratších lokusů je znakem vysoce degradované DNA.

Pro lokus TH01 byly stanoveny hodnoty pozorované i předpokládané heterozygoty a distribuce alel. Tyto výsledky byly diskutovány hlavně v porovnání s dalšími historickými pohřebišti většího i menšího rozsahu. Pro nedostatečný počet celkových genotypů nemohl být splněn cíl analýzy příbuznosti. Přesto věříme, že získané výsledky mohou být přínosné, jak pro potenciálně další genetické analýzy studovaného pohřebiště, tak pro ostatní archeogenetická pracoviště, která by v podobných výzkumech chtěla pokračovat.



## 8 SEZNAM ZKRATEK

aDNA	ancientDNA
APS	persulfát amonný
BSA	bovinní sérový albumin
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
GuSCN	guanidinium thiokyanát
LCN	low copy number
LT-DNA	low template DNA
mM	mmol/l
mtDNA	mitochondriální DNA
PCR	polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfát
SNP	single nucleotide polymorphism
STR	short tandem repeat

## 9 SEZNAM LITERATURY

- Acsádi G, and Nemeskéri J. 1970. History of human life span and mortality. Budapest: Akadémiai Kiadó.
- Adachi N, Suzuki T, Sakaue K, Takigawa W, Ohshima N, and Dodo Y. 2006. Kinship analysis of the Jomon skeletons unearthed from a double burial at the Usu-Moshiri site, Hokkaido, Japan. *Anthropological Science* 114(1):29-34.
- Alonso A, Andelinovic S, Martín P, Sutlovic D, Erceg I, Huffine E, Simón LFd, Albarrán C, Definis-Gojanovic M, Fernández-Rodríguez A et al. . 2001. DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croat Med J* 42:260-266.
- Andelinović Š, Sutlović D, Ivkošić IE, Škaro V, Ivkošić A, Paić F, Režić B, Definic-Gojanović M, and Primorac D. 2005. Twelve-year experience in identification of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J* 46:530-539.
- Bailey JF, Richards MB, Macaulay VA, Colson IB, James IT, Bradley DG, Hedges REM, and Sykes BC. 1996. Ancient DNA suggests a recent expansion of European cattle from a diverse wild progenitor species. *Proc R Soc Lond [Biol]* 263(1376):1467-1473.
- Bell LS, Skinnerb MF, and Jonesa SJ. 1996. The speed of post mortem change to the human skeleton and its taphonomic significance. *Forensic Sci Int* 82:129-140.
- Binladen J, Wiuf C, Gilbert TP, Bunce M, Barnett R, Larson G, Greenwood AD, Haile J, Ho SYW, Hansen AJ et al. . 2005. Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes. *Genetics* 172(2):733-741.
- Boháč Z. 1987. Postup osídlení a demografický vývoj českých zemí do 15. století. *Historická demografie* 12:59-87.
- Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim van Dillen PME, and van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28(3):495-503.
- Bouwman A, Brown K, Prag A, and Brown T. 2008. Kinship between burials from Grave Circle B at Mycenae revealed by ancient DNA typing. *J Archaeol Sci* 35(9):2580-2584.
- Bramanti B, Hummel S, Schultes T, and Herrman B. 2000a. STR allelic frequencies in a German skeleton collection. *Anthrop Anz* 58:45-49.
- Bramanti B, Hummel S, Schultes T, and Herrmann B. 2000b. Genetic characterization of an historical human society by means of aDNA analysis of autosomal STRs. Bodzsár, É.B., Susanne, C. (2000, Eds) *Human Population Genetics in Europe. EAA Biennial Books, 1*. Budapest. 147–163: Eötvös University Press.
- Brookes AJ. 1999. Review: The essence of SNPs. *Gene* 234:177-186.
- Bubeník J, Pleinerová I, and Profantová N. 1998. Od počátku hradišť k počátkům přemyslovského státu. *Památky archeologické* 99:104-145.
- Budowle B, Eisenberg AJ, and Daal Av. 2009. Validity of low copy number typing and applications to forensic science. *Croat Med J* 50:207-217.
- Budowle B, and Chakraborty R. 2001. Population variation at the CODIS core short tandem repeat loci in Europeans. *Legal Medicine* 3:29-33.
- Butler JM, Shen Y, and McCord BR. 2003. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci* 48(5):1054-1063.
- Casas MJ, Hagelberg E, Fregel R, Larruga JM, and González AM. 2006. Human mitochondrial DNA diversity in an archaeological site inal-Andalus: Genetic

- impact of migrations from North Africa in medieval Spain. *Am J Phys Anthropol* 131(4):539-551.
- Catelli L, Borosky A, Romanini C, Salado M, Bernardi P, and Vullo C. 2008. Skeletal reassociation from an illegal common grave of Argentina by using STR, miniSTR, and mtDNA analysis. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series* 1(1):408-410.
- Cavalli-Sforza L, and Bodmer W. 1999. *The genetics of human populations*. New York: Dover Publications, Inc.
- Cipollaro M, Bernardo GD, Forte A, Galano G, Masi LD, Galderisi U, Guarino FM, Angelini F, and Cascino A. 1999. Histological analysis and ancient DNA amplification of human bone remains found in Caius Iulius Polybius House in Pompeii. *Croat Med J* 40(3):392-397.
- Cipollaro M, Dibernardo G, Galano G, Galderisi U, Guarino F, Angelini F, and Cascino A. 1998. Ancient DNA in human bone remains from Pompeii archaeological site. *Biochem Biophys Res Commun* 247(3):901-904.
- Clisson I, Keyser C, Francfort HP, Crubezy E, Samashev Z, and Ludes B. 2002. Genetic analysis of human remains from a double inhumation in a frozen kurgan in Kazakhstan (Berel site, Early 3rd Century BC). *Int J Legal Med* 116:304-308.
- Collins MJ, Nielsen-Marsh CM, Hiller J, Smith CI, and Roberts JP. 2002. The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry* 44(3):383-394.
- Cooper A, and Poinar HN. 2000. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 289(5482):1139.
- Crubézy E, Amory S, Keyser C, Bouakaze C, Bodner M, Gibert M, Röck A, Parson W, Alexeev A, and Ludes B. 2010. Human evolution in Siberia: from frozen bodies to ancient DNA. *BMC Evolutionary Biology* 10(1):25.
- Dudar JC, Wayne JS, and Saunders SR. 2003. Determination of a kinship system using ancient DNA, mortuary practice, and historic records in an upper Canadian pioneer cemetery. *Int J Osteoarchol* 13(4):232-246.
- Edwards A, Civitello A, Hammond HA, and Caskey CT. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 49(4):746-756.
- Faerman M, Bar-Gal G, Filon D, Greenblatt C, Stager L, Oppenheim A, and Smith P. 1998. Determining the sex of infanticide victims from the late Roman era through ancient DNA analysis. *J Archaeol Sci* 25:861-865.
- Fondevila M, Phillips C, Naveran N, Fernandez L, Cerezo M, Salas A, Carracedo A, and Lareu M. 2008. Case report: Identification of skeletal remains using short-amplicon marker analysis of severely degraded DNA extracted from a decomposed and charred femur. *Forensic Sci Int Genet* 2(3):212-218.
- Gerstenberg J. 2002. *Analyse alter DNA zur Ermittlung von Heiratsmustern in einer frühmittelalterlichen Bevölkerung*. Göttingen: der Georg-August-Universität
- Gibbon V, Paximadis M, Štrkalj G, Ruff P, and Clem P. 2009. Novel methods of molecular sex identification from skeletal tissue using the amelogenin gene. *Forensic Sci Int Genet* 3:74-79.
- Gilbert MTP, Hansen AJ, Willerslev E, Rudbeck L, Barnes I, Lynnerup N, and Cooper A. 2003a. Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *Am J Hum Genet* 72(1):48-61.
- Gilbert MTP, Hansen AJ, Willerslev E, Turner-Walker G, and Collins M. 2006. Insights into the processes behind the contamination of degraded human teeth and bone samples with exogenous sources of DNA. *Int J Osteoarch* 16(2):156-164.

- Gilbert MTP, Rudbeck L, Willerslev E, Hansen AJ, Smith C, Penkman KEH, Prangenberg K, Nielsen-Marsh CM, Jans ME, and Arthur P. 2005. Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *J Archeol Sci* 32(5):785-793.
- Gilbert MTP, Willerslev E, Hansen AJ, Barnes I, Rudbeck L, Lynnerup N, and Cooper A. 2003b. Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 72(1):32-47.
- Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, and Sullivan K. 1994. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics* 6:130-135.
- Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, and Buckleton J. 2000. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int* 112:17-40.
- Götherström A, Collins MJ, Angebjörn A, and Lidén K. 2002. Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry* 3:395-404.
- Green RE, Krause J, Ptak SE, Briggs AW, Ronan MT, Simons JF, Du L, Egholm M, Rothberg JM, Paunovic M et al. . 2006. Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* 444(7117):330-336.
- Grosman PD, and Colburn JC. 1992. *Capillary electrophoresis: Theory and practice*. San Diego: Academic Press.
- Haack K, Hummel S, and Hummel B. 2000. Ancient DNA fragments longer than 300 bp. *Anthropol Anz* 58(1):51-56.
- Haak W, Brandt G, Jong HNd, Meyer C, Ganslmeier R, Heyd V, Hawkesworth C, Pike AWG, Meller H, and Alt KW. 2008. Ancient DNA, Strontium isotopes, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the Later Stone Age. *PNAS* 105(47):18226-18231.
- Haas-Rochholz H, and Weiler G. 1997. Additional primer sets for an amelogenin gene PCR-based DNA-sex test. *Int J Legal Med* 110(6):312-315.
- Hagelberg E, and Clegg JB. 1991. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc R Soc Lond [Biol]* 244:45-50.
- Haynes S, and Searle JB. 2002. Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometry* 44:395-404.
- Hedges REM, and Millard AR. 1995. Bones and groundwater: towards the modelling of diagenetic processes. *J Archeol Sci* 22:155-164.
- Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, and Pääbo S. 1996. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res* 24(7):1304-1307.
- Höss M, and Pääbo S. 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res* 21(16):3913-3914.
- Hummel S, Bramanti B, Schultes T, Kahle M, Haffner S, and B H. 2000. Megaplex DNA typing can provide a strong indication of the authenticity of ancient DNA amplifications by clearly recognizing any possible type of modern contamination. *Anthrop Anz* 58(1):15-21.
- Chilvers ER, Bouwman AS, Brown KA, Arnott RG, Prag AJNW, and Brown TA. 2008. Ancient DNA in human bones from Neolithic and Bronze Age sites in Greece and Crete. *J Archaeol Sci* 35(10):2707-2714.
- Kalmár T, Bachrati CZ, Marcsik A, and Raskó I. 2000. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Res* 28(12):e67.

- Kayser M, Lao O, Anslinger K, Augustin C, Bargel G, Edelmann J, Elias S, Heinrich M, Henke J, Henke L et al. . 2005. Significant genetic differentiation between Poland and Germany follows present-day political borders, as revealed by Y-chromosome analysis. *Human Genetics* 117(5):428-443.
- Kemp B, Monroe C, and Smith D. 2006. Repeat silica extraction: a simple technique for the removal of PCR inhibitors from DNA extracts. *J Archaeol Sci* 33(12):1680-1689.
- Kemp BM, and Smith DG. 2005. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int* 154:53-61.
- Keyser-tracqui C, Crubezy E, and Ludes B. 2003. Nuclear and Mitochondrial DNA Analysis of a 2,000-Year-Old Necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia. *Am J Hum Genet* 73(2):247-260.
- Kolman CJ, and Tuross N. 2000. Ancient DNA analysis of human populations. *Am J Phys Anthropol* 111:5-23.
- Lassen C, Hummel S, and Hermann B. 1996. PCR based sex identification of ancient human bones by amplification of X- and Y-chromosomal sequences: a comparison. *Ancient Biomolecules* 1:25-33.
- Leonard J, Shanks O, Hofreiter M, Kreuz E, Hodges L, Ream W, Wayne R, and Fleischer R. 2007. Animal DNA in PCR reagents plagues ancient DNA research. *J Archaeol Sci* 34(9):1361-1366.
- Li H, Huang Y, Mustavich LF, Zhang F, Tan J-Z, Wang L-E, Qian J, Gao M-H, and Jin L. 2007. Y chromosomes of prehistoric people along the Yangtze River. *Human Genetics* 122(3-4):383-388.
- Loreille OM, Diegolia TM, Irwina JA, Coblea MD, and Parsons TJ. 2007. High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Sci Int Genet* 1(2):191-195.
- Malmström H, Stora J, Dalén I, Holmlund G, and Götherström A. 2005. Extensive human DNA contamination in extracts from ancient dog bones and teeth. *Mol Biol Evol* 22(10):2040-2047.
- Malmström H, Svensson EM, Gilbert MTP, Willerslev E, Götherström A, and Holmlund G. 2007. More on contamination: the use of asymmetric molecular behavior to identify authentic ancient human DNA. *Mol Biol Evol* 24:998-1004.
- Montelius K, Karlsson A, and Holmlund G. 2008. STR data for the AmpF $\ell$ STR Identifier loci from Swedish population in comparison to European, as well as with non-European population. *Forensic Sci Int Genet* 2(3):e49-e52.
- Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM, Smerick JB, and Budowle B. 2001. Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J Forensic Sci* 46(3):647-660.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Opel KL, Chung DT, Drabek J, Tatarek NE, Jantz LM, and McCord BR. 2006. The application of Miniplex primer sets in the analysis of degraded DNA from human skeletal remains. *J Forensic Sci* 51(2):351-356.
- Pääbo S, M. ID, and C. WA. 1990. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J Biol Chem* 265(8):4718-4721.
- Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, and Hofreiter M. 2004. Genetic Analyses from Ancient DNA. *Annu Rev Genet* 38(1):645-679.

- Parsons T, Huel R, Davoren J, Katzmarzyk C, Milos A, Selmanovic A, Smajlovic L, Coble M, and Rizvic A. 2007. Application of novel “mini-amplicon” STR multiplexes to high volume casework on degraded skeletal remains. *Forensic Sci Int Genet* 1(2):175-179.
- Poinar HN, Höss M, Bada JL, and Pääbo S. 1996. Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA *Science* 272(5263):864-866.
- Richards MB, Sykes BC, and Hedges REM. 1995. Authenticating DNA extracted from ancient skeletal remains. *J Archeol Sci* 22:291-299.
- Rohland N, and Hofreiter M. 2007a. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols* 2(7):1756-1762.
- Rohland N, and Hofreiter M. 2007b. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques* 42:343-352.
- Santos SMM, Budowle B, Smerick JB, Keys KM, and Moretti TR. 1996. Portuguese population data on the six short tandem repeat loci - CSF1PO, TPOX, TH01, D3S1358, VWA and FGA. *Forensic Sci Int* 83(3):229-235.
- Scholz M, Giddings I, and Pusch CM. 1998. A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I. *Anal Biochem* 259(2):283-286.
- Schwarz C, Debruyne R, Kuch M, McNally E, Schwarcz H, Aubrey AD, Bada J, and Poinar H. 2009. New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Res* 37(10):3215-3229.
- Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, Stringer C, and Collins MJ. 2003. The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *J Hum Evol* 45(3):203-217.
- Sotak M, Petrejčikova E, Bernasovska J, Bernasovsky I, Sovicova A, Boronova I, Svickova P, Bozikova A, and Gabrikova D. 2008. Genetic variation analysis of 15 autosomal STR loci in Eastern Slovak Caucasian and Romany (Gypsy) population. *Forensic Sci Int Genet* 3(1):e21-e25.
- Stloukal M. 1999. Paleodemografie. In: *Antropologie, Příručka pro studium kostry*. Praha: Národní muzeum, Praha. 359-373 p.
- Stone AC, and Stoneking M. 1999. Analysis of ancient DNA from a prehistoric Amerindian cemetery. *Proc R Soc Lond [Biol]* 354:153-159.
- Sullivan KM, Mannuci A, Kimpton CP, and Gill P. 1993. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques* 15:636-641.
- Sutlović D, Gojanović MD, Anđelinović Š, Gugić D, and Primorac D. 2005. Taq polymerase reverses Inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. *Croat Med J* 46(4):556-562.
- Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, and Krause D. 2003. Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med* 117(67-74).
- Šimková H, Faltus V, Marvan R, Pexa T, Stenzl V, Brouček J, Hořínek A, Mazura I, and Zvárová J. 2009. Allele frequency data for 17 short tandem repeats in a Czech population sample. *Forensic Sci Int Genet* 4(1):e15-e17.
- Turowska B, and Sanak M. 2000. Frequency data on the loci vWA, FES/FPS, F13A01, TH01, TPOX and CSF1PO in a population from South Poland. *Int J Legal Med* 113(123-125).
- Tzvetkov MV, Meineke I, Sehr D, Vormfelde SV, and Brockmüller J. 2010. Amelogenin-based sex identification as a strategy to control the identity of DNA samples in genetic association studies. *Pharmacogenomics* 11(3):449-457.

- Ungermaň Š. 2008. Raně středověké pohřebiště v Dolních Věstonicích - Na Pískách Brno: Masarykova univerzita.
- Vaněček T, Trubač P, Vorel F, and Šíp M. 2005. Population genetics of 11 nuclear and 1 mitochondrial short tandem repeat loci in a population of South Bohemia, Czech Republic. *J Appl Biomed* 3:129-131.
- Vaněk D, Hradil R, and Budowle B. 2000. Czech population data on 10 short tandem repeat loci of SGM Plus STR system kit using DNA purified in FTA™ cards. *Forensic Sci Int* 119:107-108.
- Vaněk D, Sasková L, and Koch H. 2009. Kinship and Y-Chromosome Analysis of 7th Century Human Remains: Novel DNA Extraction and Typing Procedure for Ancient Material. *Croat Med J* 50(3):286-295.
- Vaňharová M, and Drozdová E. 2008. Sex determination of skeletal remains of 4000 year old children and juveniles from Hořtice 1 za Hanou (Czech Republic) by ancient DNA analysis. *Anthropological Review* 71(1):63-70.
- Vogelstein B, and Gillespie D. 1978. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci* 76(2):615-619.
- Von Wurmb-Schwark N, Harbeck M, Wiesbrock U, Schroeder I, Ritz-Timme S, and Oehmichen M. 2003. Extraction and amplification of nuclear and mitochondrial DNA from ancient and artificially aged bones. *Legal Medicine* 5:S169-S172.
- Wang L, Oota H, Saitou N, Jin F, Matsushita T, and Ueda S. 2000. Genetic structure of a 2,500-year-old human population in China and its spatiotemporal changes. *Mol Biol Evol* 17:1396-1400.
- Wiechmann I, and Grupe G. 2005. Detection of *Yersinia pestis* DNA in two early medieval skeletal finds from Aschheim (Upper Bavaria, 6th century A.D.). *Am J Phys Anthropol* 126(1):48-55.
- Willerslev E, and Cooper A. 2005. Review Paper. Ancient DNA. *Proc R Soc Lond [Biol]* 272(1558):3-16.
- Williams SR, Chagnon NA, and Spielman RS. 2002. Nuclear and mitochondrial genetic variation in the Yanomam: A test case for ancient DNA studies of prehistoric populations. *Am J Phys Anthropol* 117(3):246-259.
- Wilson IG. 1997. Minireview. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl Environ Microbiol* 63(10):3741-3751.
- Woodward SR, King MJ, Chiu NM, Kuchar MJ, and Griggs CW. 1994. Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *CSHL Press* 94:1054-9803.
- Zápotocký M. 1965. Slovanské osídlení na Litoměřicku. *Památky archeologické* 56(2):205-391.
- Zhang D-X, and Hewitt GM. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Review. *Molecular Ecology* 12:563-584.
- Zhivotovsky L. 2003. Features of evolution and expansion of modern humans, Inferred from genomewide microsatellite markers. *Am J Hum Genet* 72(5):1171-1186.
- Zierdt H, Hummel S, and Hermann B. 1996. Amplification of human short tandem repeats from medieval teeth and bone samples. *Hum Biol* 68:185-199.
- Žemlička J. 2006. Sídlní geografie přemyslovských Čech. In: *České země v raném středověku*. Praha: NLN. 74-84 p.

## **10 SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha I Seznam chemikálií a roztoků

Příloha II Nákresy pohřebiště Mlékojedy

Příloha III Ukázky obrázků použitých skeletálních vzorků

Příloha IV Příklady rozdělení kostních vzorků podle stavu zachovalosti

Příloha V Protokoly použité při optimalizaci PCR a amplifikaci aDNA

Příloha VI Protokoly pro přípravu alelového žebříčku

Příloha VII Ukázky výsledků optimalizace

Příloha VIII Ukázky primárních výsledků STR analýz

Příloha IX Kompletní výsledky amplifikace amelogeninu a STR markerů



## Příloha I Seznam chemikálií a roztoků

Aceton	P-Lab
Agaróza	Roth
AmpliTaq® Gold DNA polymerase	Applied Biosystems
+ GeneAmp 10 x PCR Buffer	Applied Biosystems
+ GeneAmp 10 x PCR Buffer II	Applied Biosystems
Bovinní sérový albumin (BSA), 20 mg/ml	Fermentas
Bromthymolová modř	Sigma Aldrich
DNA Ladder 20 bp	Fermentas
DNA Ladder GeneRuler™ 50 bp	Fermentas
6 × DNA Loading Dye	Fermentas
6 × Orange DNA Loading Dye	Fermentas
dNTP Mix, 10 mM každý z nukleotidů	Fermentas
Ethanol	P-Lab
Ethidium bromid	Sigma
GeneScan 500 LIZ	Applied Biosystems
Guanidinium thiokyanát (GuSCN)	Roth
Hi-Di™ formamid	Applied Biosystems
Chlorid sodný (NaCl)	Roth
Kyselina boritá	P-Lab
Kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA)	Roth
K562	Fermentas
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	Applied Biosystems
Proteináza K, 18,7 mg/ml	Fermentas
Rotiphorese® Gel 40 (19 : 1)	Roth
Silica (SiO <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich
Sodium dodecyl sulfát (SDS)	Roth
Taq DNA polymerase, Recombinant, 5 U/μl	Fermentas
TEMED p.a.	Roth
Persulfát amonný (APS)	Roth
Tris	Roth
Tris-hydrochlorid	Roth

### **0,5 M EDTA pH 8**

186,1g EDTA

800 ml dH<sub>2</sub>O

- upravit pH (NaOH) a doplnit do 1 litru

### **TBE pufr**

54 g Tris

27,5 g kyselina boritá

20 ml 0,5 EDTA pH 8,0

- doplnit do 1 litru

### **TE pufr**

1 ml 1 M Tris-HCl

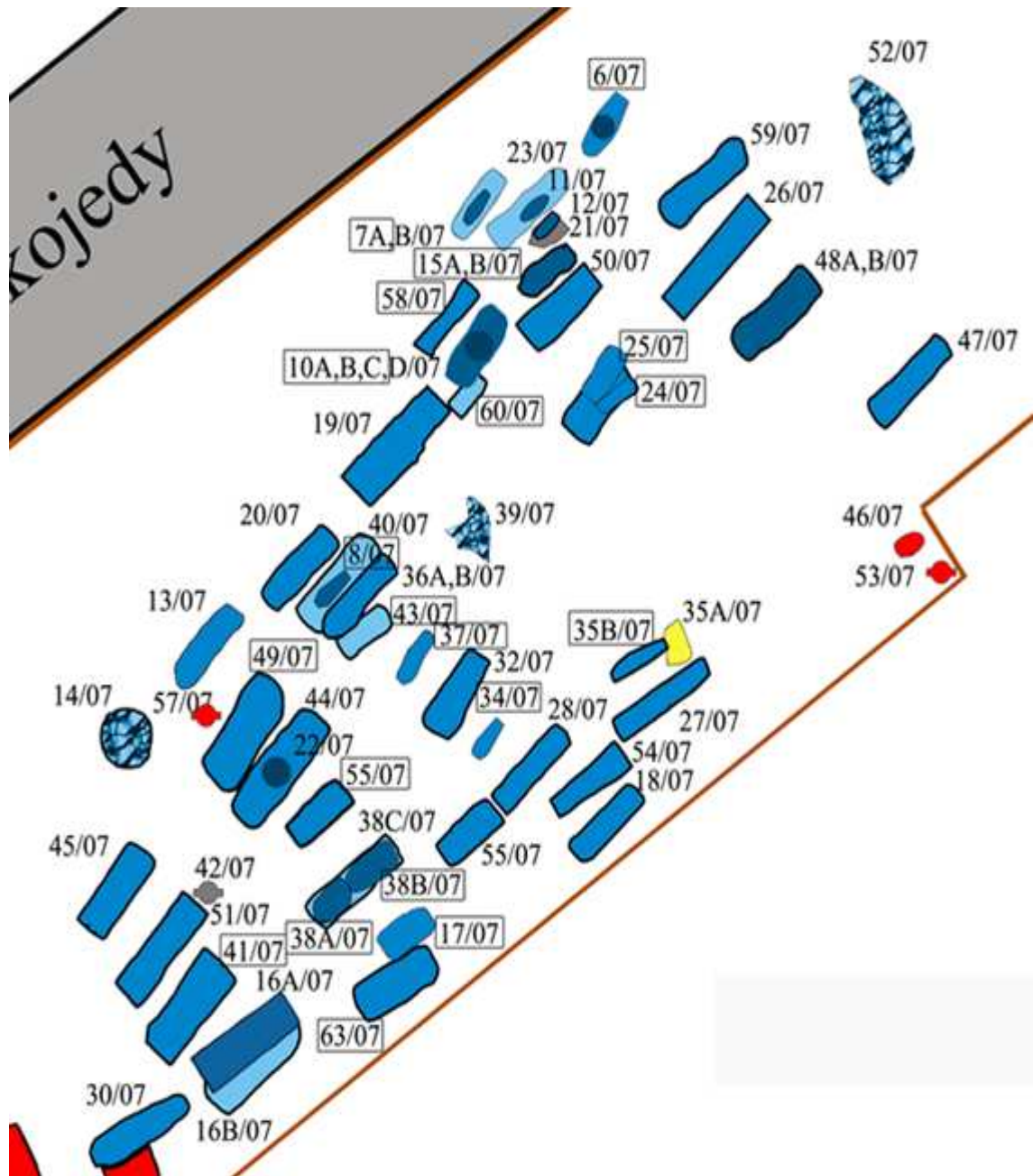
0,2 ml 0.5 M EDTA

- doplnit do 100 ml

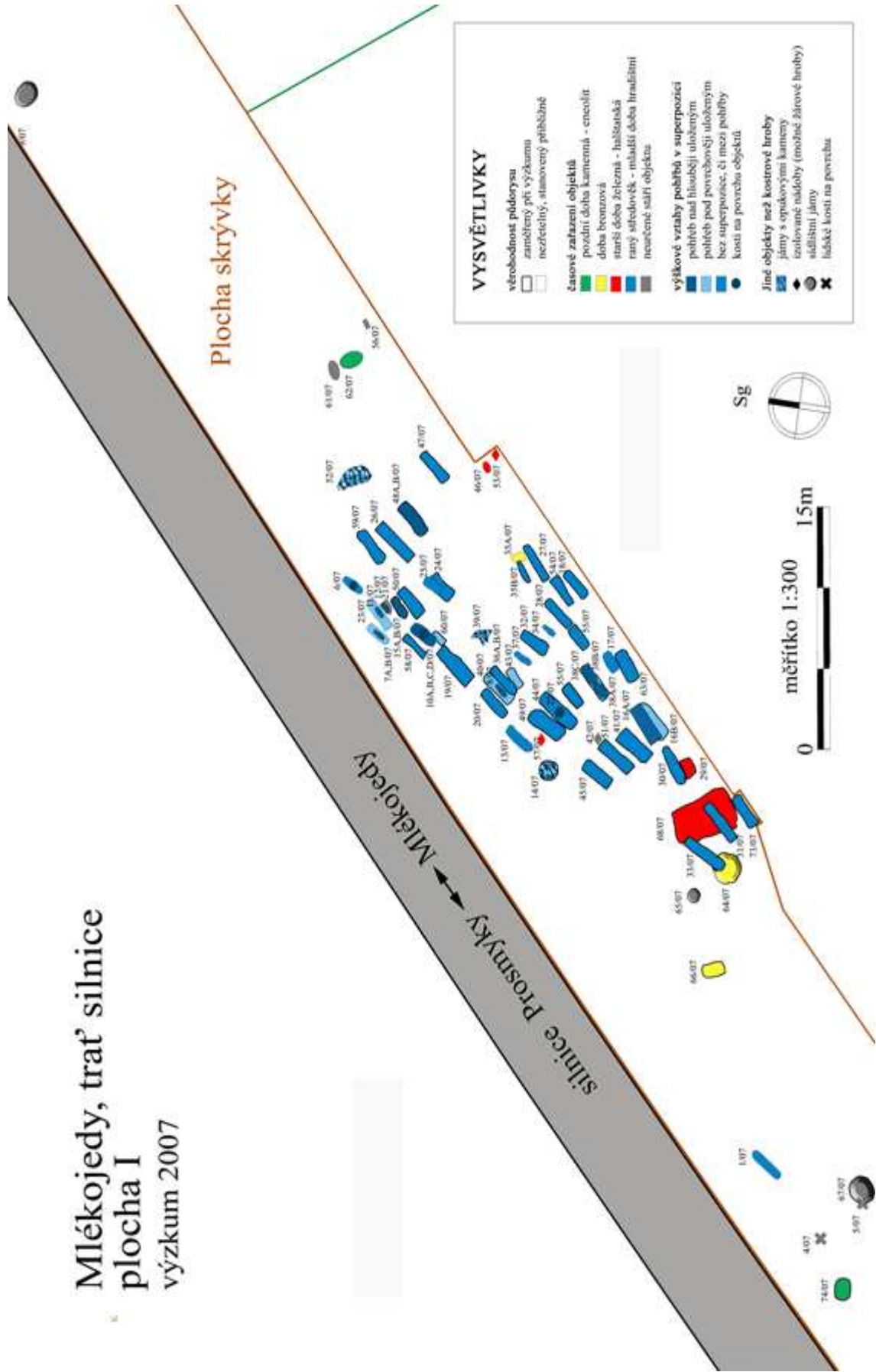
## Příloha II Nákresy pohřebiště Mlékojedy

Obr. 4 Detailní plánec pohřebiště s vyznačenými jedinci vybranými do studie

Obr. 5 Celková plocha pohřebiště (na následující stránce)



# Mlékojedy, trať silnice plocha I výzkum 2007



### Příloha III Ukázky obrázků použitých skeletálních vzorků

Obr. 6 a 7 Ukázka zubů odebraných pro analýzu DNA



Obr. 8 a 9 Ukázka kostních vzorků odebraných pro analýzu DNA



## Příloha IV Příklady rozdělení kostních vzorků podle stavu zachovalosti

Obr. 10 a 11 Velmi dobrá a dobrá zachovalost



**Obr. 12** Špatná zchovalost





## Příloha V Příklady protokolů použitých při optimalizaci PCR a amplifikaci aDNA

### A) Protokol pro amplifikaci moderní DNA – singleplex

<u>Reagencie</u>	<u>Zásobní koncentrace</u>	<u>Výsledná koncentrace</u>
PCR Pufr Gold	10×	1×
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 mM
dNTP mix	10 mM	0,2 mM
Primery	10 μM každý	8 pmol na reakci
BSA	20 mg/ml	3,2 μg na reakci
Taq DNA pol.	5 U/μl	0,5 U na reakci
Templátová DNA		<b>500–63 pg na reakci</b>

- celkový reakční objem 25 μl

### PCR protokol

Iničiační denaturace:	95 °C	<b>3 min</b>
Denaturace:	95 °C	30 s
Annealing:	50–60 °C	30 s
Elongace:	72 °C	1 min 45×
Konečná extenze:	72 °C	7 min

## B) Protokol pro amplifikaci aDNA – singleplex

<u>Reagencie</u>	<u>Zásobní koncentrace</u>	<u>Výsledná koncentrace</u>
PCR Pufr Gold	10×	1×
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 mM
dNTP mix	10 mM	0,2 mM
Primery	10 μM každý z primerů	8–10 pmol na reakci
BSA	20 mg/ml	0,3–0,8 μg/μl
AmpliTaq Gold pol.	5 U/μl	1–2 U na reakci
Templátová DNA		3–10 μl na reakci

- celkový reakční objem 25 μl

### PCR protokol

Iniciační denaturace:	95 °C	8–10 min
Denaturace:	95 °C	30 s
Annealing:	55 °C	30 s
Elongace:	72 °C	1 min 45×
Konečná extenze:	72 °C	7 min

C) Optimalizovaný protokol pro amplifikaci aDNA – multiplex

<u>Reagencie</u>	<u>Zásobní koncentrace</u>	<u>Výsledná koncentrace</u>
PCR Pufr Gold	10×	1×
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 mM
dNTP mix	10 mM	0,2 mM
Amelo	10 μM každý z primerů	3 pmol na reakci
TH01	10 μM každý z primerů	3 pmol na reakci
D8S1179	10 μM každý z primerů	10 pmol na reakci
vWA	10 μM každý z primerů	6 pmol na reakci
D21S11	10 μM každý z primerů	25 pmol na reakci
BSA	20 mg/ml	0,3–0,8 μg/μl
AmpliTaq Gold pol.	5 U/μl	1–2 U na reakci
Templátová DNA		3–10 μl na reakci

- celkový reakční objem 25 μl

PCR protokol

Iniciační denaturace:	95 °C	8 min
<b>Denaturace:</b>	<b>95 °C</b>	<b>30 s</b>
Annealing:	55 °C	30 s
Elongace:	72 °C	1 min 10×
<b>Denaturace:</b>	<b>90 °C</b>	<b>30 s</b>
Annealing:	55 °C	30 s
Elongace:	72 °C	1 min 35×
Konečná extenze:	60 °C	60 min

## Příloha VI Protokoly pro přípravu alelového žebříčku

A) Původní protokol (Butler et al. 2003)

<u>Reagencie</u>	<u>Zásobní koncentrace</u>	<u>Výsledná koncentrace</u>
PCR Pufr Gold	10×	1×
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM
dNTP mix	10 mM	0,25 mM
Primery Mix	(NC01, SGM+ apod.)	—
BSA	3,2 mg/ml	3,2 μg na reakci
AmpliTaq Gold pol.	5 U/μl	2 U na reakci
PowerPlex 16	ředěno 1 : 1000	2 μl na reakci

- celkový reakční objem 20 μl

### PCR protokol

Iniciační denaturace:	95 °C 10 min
Denaturace:	94 °C 1 min
Annealing:	55 °C 1 min
Elongace:	72 °C 1 min 15×
Konečná extenze:	60 °C 240 min

B) Úpravený protokol – PAGE (stejný reakční objem)

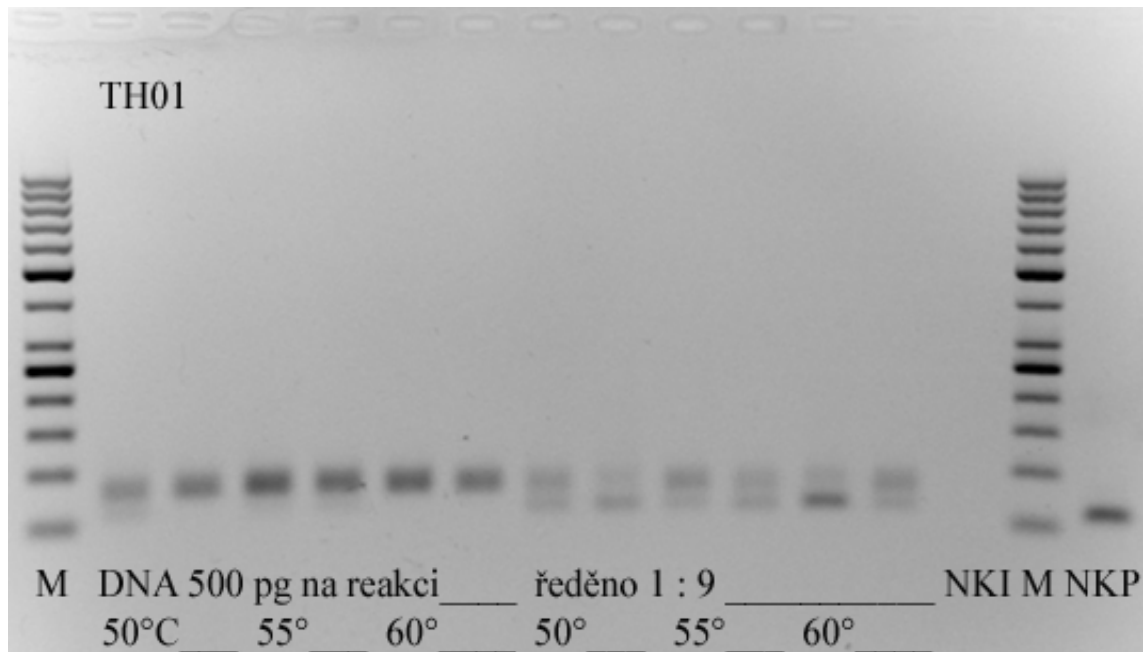
<u>Reagencie</u>	<u>Zásobní koncentrace</u>	<u>Výsledná koncentrace</u>
PCR Pufr Gold	10×	1×
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM
dNTP mix	10 mM	0,25 mM
Primery	10 μM každý	10 pmol na reakci
BSA	20 mg/ml	3,2 μg na reakci
AmpliTaq Gold pol.	5 U/μl	2 U na reakci
PowerPlex 16	ředěno 1 : 1000	2 μl na reakci

PCR protokol

Iniciační denaturace:	95 °C 3 min
Denaturace:	94 °C 30 s
Annealing:	55 °C 1 min
Elongace:	72 °C 1 min 30x
Konečná extenze:	60 °C 10 min

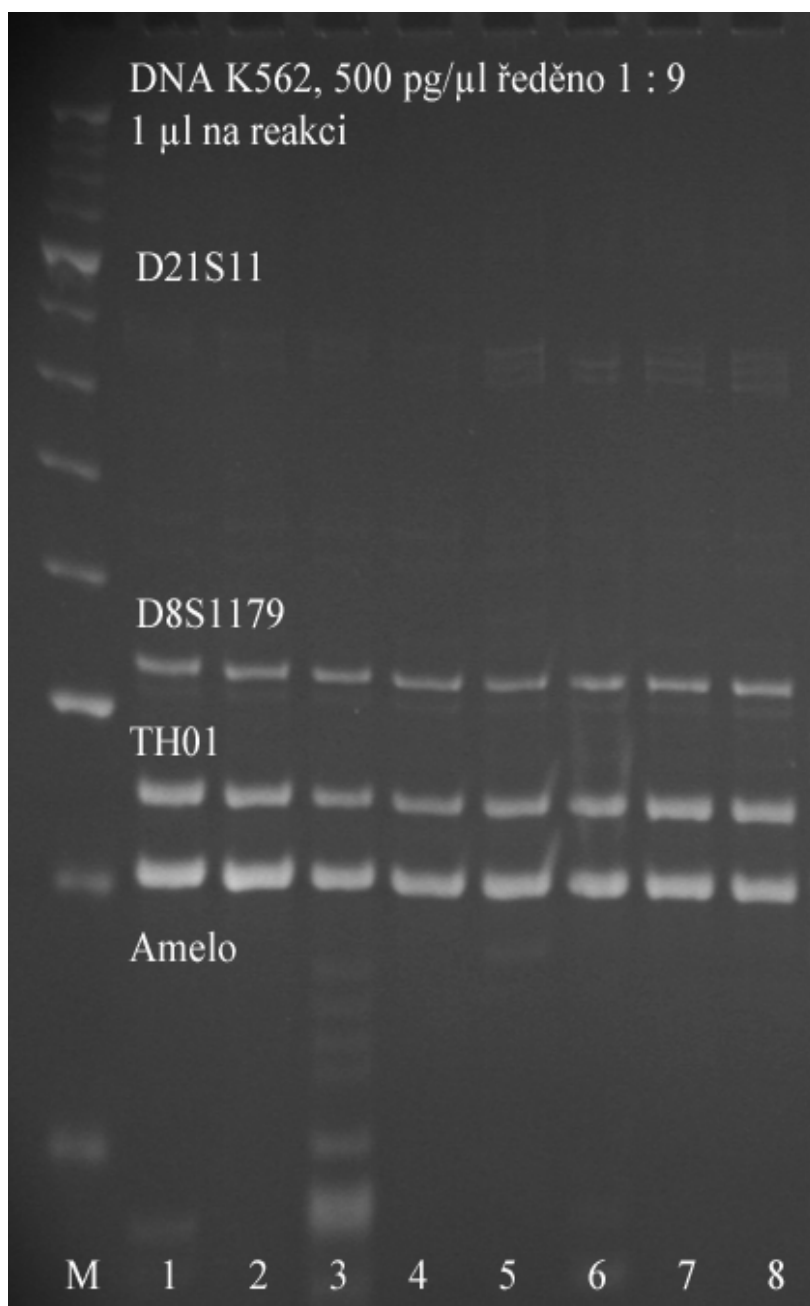
## Příloha VII Ukázky výsledků optimalizace

**Obr. 13** Amplifikace lokusu TH01 při gradientu teploty annealingu a dvou různých koncentrací templátové DNA



M = velikostní standard 50 bp, NKI = negativní izolační kontrola, NKP = negativní PCR kontrola

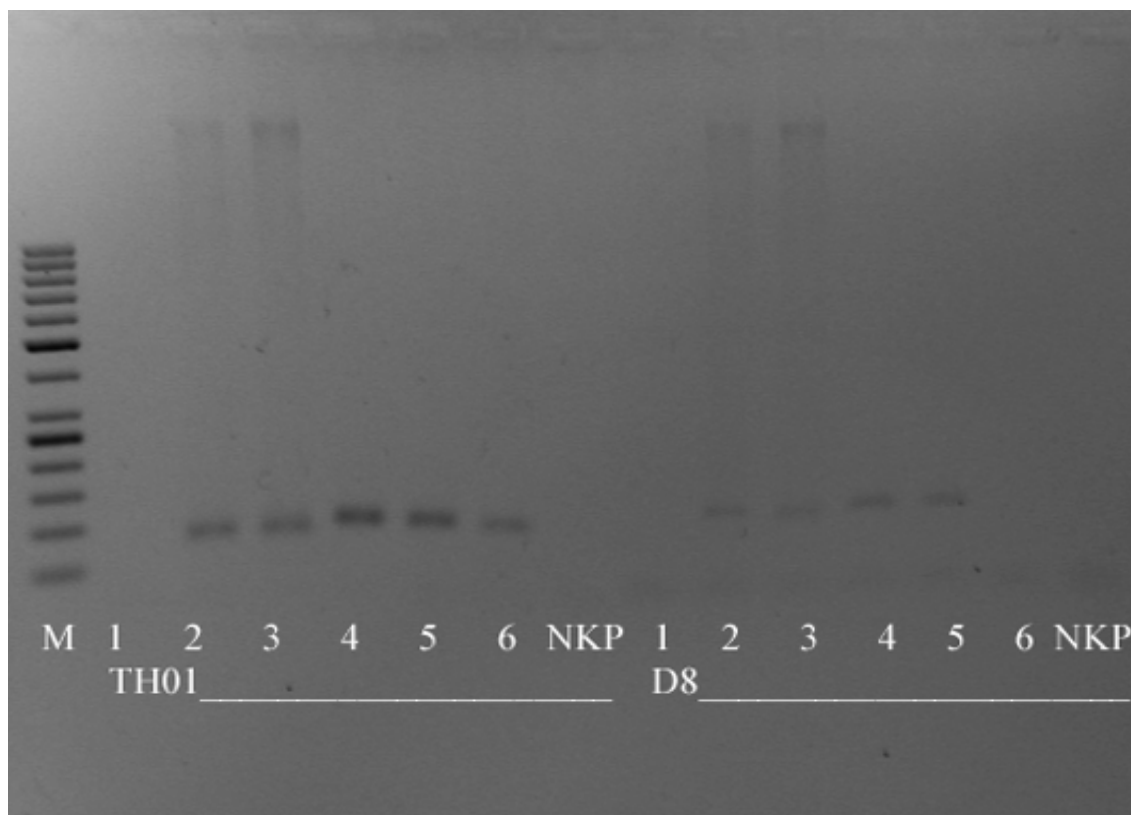
**Obr. 14** Ukázka výsledku jedné z optimalizačních reakcí multiplexu



Koncentrace primerů: 1 – 4 (8 pmol na reakci pro všechny STR lokusy), 5 – 8 (6, 6, 8 a 10 pmol na reakci, v pořadí od nejkratšího lokusu k nejdelšímu), ve 25 μl celkového objemu reakce.  
M = velikostní standard 20 bp

## Příloha VIII Ukázky primárních výsledků STR analýz

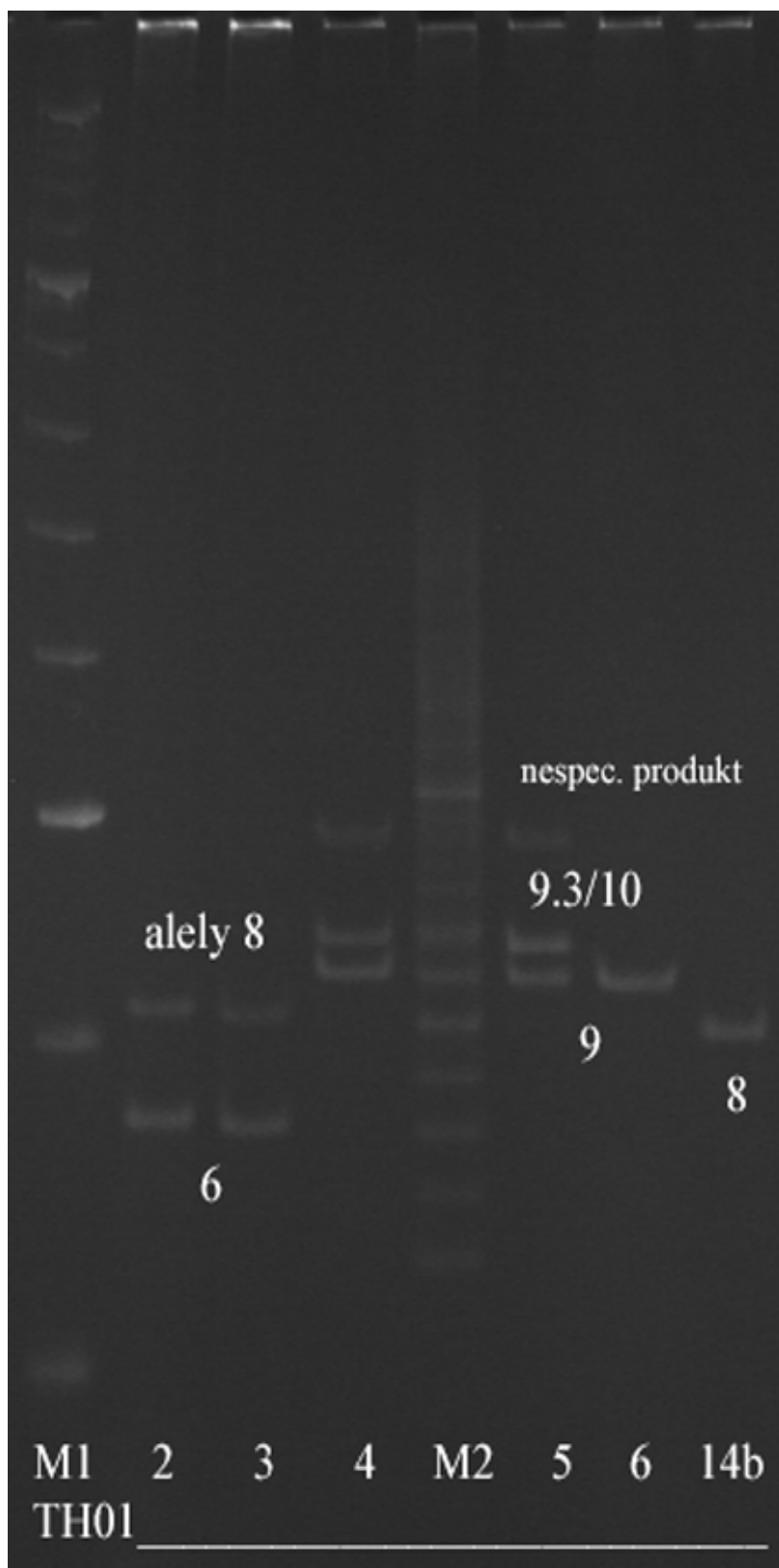
**Obr. 15** Amplifikace lokusu TH01 a D8S1179 u vzorků 1 až 6



M = velikostní marker 50 bp, NKI = negativní izolační kontrola, NKP = negativní PCR kontrola

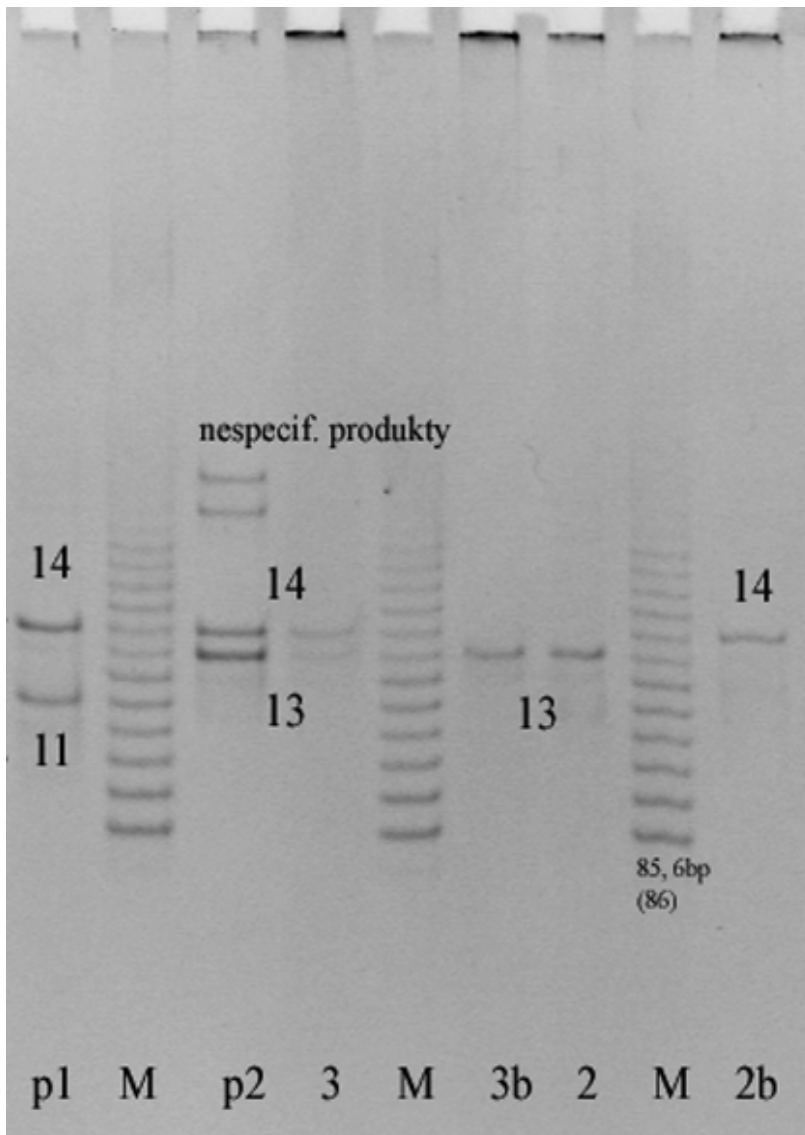


**Obr. 16** Ukázka rozlišení alel lokusu TH01 na polyacrylamidovém gelu



M1 = velikostní standard 20 bp, M2 = reamplifikovaný alelový žebříček

**Obr. 17** Ukázka rozlišení alel lokusu D8S1179 na polyacrylamidovém gelu



Pozn.: U třetího markeru je vyznačena přesnost rozlišení na 12% polyacrylamidovém gelu (85,6 bp u fragmentu s délkou 86 bp), velikost byla odečtená od 20 bp velikostního standardu.  
M = reamplifikovaný alelový žebříček

## Příloha IX Kompletní výsledky amplifikace amelogeninu a STR markerů

Pozn.: Nezávislé izolace v rámci jedince jsou rozlišeny římskými číslicemi, nezávislé PCR pro jednotlivé vzorky běžnými čísly.

Ex = extrakce, re = reizolace, \* značí postupně jednotlivé paralelní izolace

jedinec 6					
vz. 1 (zub)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	x				
I/1	x				
I/1	x				
I/2	x				
I/2	-				
I/2	x				
I/3		-			
I/3			-		
I/4			-		
I/5	-	-	-	-	-
re/6	-	-	-	-	-
vz. 2 (femur)					
II/1	x				
II/1	x				
II/1	x				
II/2			13/14		
II/3					-
II/3					-
II/4			13		
II/4					-
II/5		6/8			
II/5			14		
II/6	-	-	-	-	-
II/7	-	-	-	-	-
III*/8	x				
III*/8	-				
III*/4			14		
III*/4					-
IV**/9	-	6/8	13/14	18	24/28
vz. 3 (femur)					
II/1	x				
II/1	x				
II/1	x				
II/2		6/8			
II/2			13/14		
II/3					-

II/3					-
II/6	x	6/8	-	18	-
II/6	-	-	-	-	-
reiz/8	-	-	-	-	-
III*/9	x				
III*/9	x				
III*/4			13		
III*/5			-		
III*/5					-
III*/7	-	-	-	-	-
III*/10	x	6/8	13/14	18	-
IV*/10	x	6/8	13/14	16	-

---

**jedinec 7a**

---

vz. 4 (femur)

ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	x				
I/1	x				
I/1	x				
I/2		9/9.3(10)			
I/2			14		
I/3	x	9/9.3	14	18	30/32.2
I/4	x	9	14	-	-
III*/5	x	9/9.3	14	18/20	32.2

vz. 5 (femur)

II/1	x				
II/1	x				
II/1	x				
II/2		9/9.3			
II/2			14		
II/3	x	9.3	-	-	-
II/4	x	9/9.3	14	18/20	-
III*/5	-	-	-	-	-
III*/6	-	-	-	-	-

vz. 6 (humerus)

I/1	x				
I/1	-				
I/1	-				
I/2		9			
I/2			-		
I/3	x	9	-	-	-
I/4	-	9	14	16	-
re/5	-	-	-	-	-

<b>jedinec 8</b>					
vz. 7 (femur)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				
III*/2	-	-	-	-	-
III*/2	-	-	-	-	-
vz. 8 (femur)					
II/1	-				
II/1	-				
II/1	-				
vz. 9 (tibia)					
II/1	-				
II/1	-				
II/1	-				
<b>jedinec 10A</b>					
vz. 10 (femur)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				
re/2	-	-	-	-	-
vz. 11 (femur)					
II/1	-				
II/1	-				
II/1	-				

<b>jedinec 10B</b>					
vz. 13 (tibia)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				
vz. 14 (tibia)					
I/1	-				
I/1	-				
I/1	x				
I/8	-	-	-	-	-
II*/2	x				
II*/2	x				
II*/2	x				
II*/3		8			
II*/3			-		
II*/3			10		
II*/4	x	-	10	16	-
II*/5	x	8/9	-	18	31.2
II*/6	-	-	-	-	-
II*/7	-	-	-	-	-
II*/8	-	-	-	-	-
vz. 15 (zub)					
III/1	x				
III/1	x				
III/1	x				
III/2		8/9			
III/3			-		
III/4			10/14		
III/5	x	8	10	18	-
III/6	x	8/9	-	-	31.2
III/7	-	8	-	-	31.2
III/8	x	-	10	18	-

<b>jedinec 10C</b>					
vz. 16 (zub)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				
vz. 17 (zub)					
I/1	x				
I/1	-				
I/1	x				
I/2		7			
I/2			-		
I/3			-		
I/4	-	-	-	-	-
I/5	-	-	-	-	-
I/6	y	-	-	-	-
I/7	-	6/7	13/15	16	-
re/8	-	-	-	-	-
vz. 18 (femur)					
II/1	y				
II/1	-				
II/1	-				
II/2	-				
II/2	-				
II/2	y				
II/3		6			
II/4			-		
II/5			-		
II/7	-	6/7	-	-	-
II/8	-	-	-	-	-
II/9	-	-	-	-	-
II/10	-	-	-	-	-
re/11	-	-	-	-	-
III*/6	-				
III*/6	y				
III*/6	-				
III*/9	-	7	14	18	-
III*/10	-	-	-	-	-
IV**/10	x	6	-	14	-
IV**/10	-	6	12	-	30

<b>jedinec 15A</b>					
vz. 19 (zub)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	xy				
I/1	x				
I/1	y				
I/2		-			
I/2			-		
I/3			-		
I/4	-	-	-	-	-
re/5	x	-	15	-	-
re/6	-	-	-	-	-
re/7	-	-	-	-	-
re/8	-	-	-	-	-
vz. 20 (zub)					
II/1	y				
II/1	-				
II/1	x				
II/2	-				
II/2	-				
II/2	-				
II/3		9			
II/3			-		
II/4			13/15		
II/5	x	9	-	-	-
II/6	-	-	-	-	-
vz. 21 (zub)					
I/1	y				
I/1	x				
I/1	-				
I/2	-				
I/2	-				
I/2	y				
I/3		-			
I/3			-		
I/4			-		
I/5	x	7/9	-	14	-
re/6	-	-	-	-	-
re/7	-	-	-	-	-



jedinec 15B					
vz. 22 (zub)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	x				
I/1	x				
I/1	x				
I/2		-			
I/2			-		
I/3			-		
I/4	-	-	-	-	-
I/5	x	6	-	15	28/31.2
re/6	xy	6/7	12/13	15/19	28
vz. 23 (tibia)					
II/1	x				
II/1	x				
II/1	x				
II/2	x				
II/2	-				
II/2	xy				
III*/4	x				
III*/4	x				
III*/4	x				
III*/5		6			
III*/5			12/13		
III*/6			13		
III*/7	x	5/6	13	15/19	-
III*/8	x	6/7	12/13	15	-
IV**/8	x	7	12/13	15/19	28
vz. 24 (tibia)					
II/1	x				
II/1	x				
II/1	x				
II/3	-				
II/3	x				
II/3	x				
II/4	y	6/7	12	15	-
II/5	xy	-	12/13	15	28/30/31.2
III*/2	-				
III*/2	-				
III*/2	-				

<b>jedinec 17</b>					
vz. 37 (femur)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				
re/2	-	-	-	-	-
vz. 38 (femur)					
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				

<b>jedinec 24</b>					
vz. 40 (humerus)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	-				
I/1	y				
I/1	-				
I/2		-			
I/2			-		
I/3			-		
re/4	-	-	-	-	-
vz. 41 (tibia)					
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				
vz. 42 (tibia)					
II/1	-				
II/1	-				
II/1	-				
II/2	x				
II/2	-				
II/5	-	-	-	-	-
II/6	-	-	-	-	-
re/3	-				
re/3	-				
re/3	x				
re/4	-	-	-	-	-
re/7	-	-	-	-	-
re2/8	y	-	15	-	31.2
re2/9	-	-	-	-	-
re2/10	-	9.3	-	-	-

<b>jedinec 25</b>					
vz. 43 (zub)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	-				
I/1	x				
I/1	x				
I/2	-				
I/2	-				
I/3	-	-	-	-	-
I/4	-	-	-	-	-
re/5	-	-	-	-	-
vz. 44 (zub)					
II/1	y				
II/1	-				
II/1	y				
II/2	y				
II/2	-				
II/3		-			
II/3			-		
II/4			-		
II/5	-	-	-	-	-
re/6	-	-	-	-	-
re/7	-	-	-	-	-
re/8	-	6	14	-	-
vz. 45 (humerus)					
III/1	x				
III/1	x				
III/1	-				
III/2			-		
III/3			-		
III/4		-			
re/5	-	9	11/14	-	30
re/6	-	-	-	-	-
IV*/7	x	9	-	-	-

<b>jedinec 34</b>					
vz. 46 (zub)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	x				
I/1	x				
I/1	x				
I/2			-		
I/3			-		
I/4		7			
I/5	-	-	-	-	-
I/6	x	7/9.3	-	-	-
re/7	x	7/9.3	14	18	-
re/8	-	-	-	-	-
re/9	x	7/9.3	-	-	-
vz. 47 (tibia)					
II/1	y				
II/1	x				
II/1	-				
II/2	-				
II/2	-				
vz. 48 (tibia)					
III/1	-				
III/1	x				
III/1	-				
III/4	-	-	-	-	-
III/5	-	-	11	-	-
re/2	-				
re/2	x				
re/2	-				
re/3			-		
re/6		-			
re/7	-	-	-	-	-

<b>jedinec 35</b>					
vz. 49 (humerus)					
ex(re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				
re/3	-	-	-	-	-
vz. 50 (humerus)					
II/2	-				
II/2	-				
II/2	-				

<b>jedinec 37</b>					
vz. 52 (ulna)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	y				
I/1	y				
I/1	x				
I/2	y				
I/2	-				
I/3			-		
I/4			-		
I/5		-			
I/6	-	-	-	-	-
I/7	-	-	-	-	-
re/8	-	-	-	-	-

<b>jedinec 38A</b>					
vz. 25 (dlouhá kost DK)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				
re/2	-	-	-	-	-
vz. 26 (dlouhá kost DK)					
II/1	-				
II/1	-				
II/1	-				

<b>jedinec 38B</b>					
vz. 28 (dlouhá kost DK)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				
re/2	-	-	-	-	-
vz. 29 (dlouhá kost DK)					
II/1	-				
II/1	-				
II/1	-				
<b>jedinec 41</b>					
vz. 31 (zub)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	x				
I/1	x				
I/1	x				
I/2			-		
I/3			-		
I/4		9			
I/5	xy	9	9	-	
I/6	-	-	-	-	-
I/7	x	9	-	16	-
I/8	xy	7/9	10	16	-
vz. 32 (humerus)					
II/2	-				
II/2	-				
II/2	-				
re/3	-				
re/3	-				
re/3	-				
vz. 33 (humerus)					
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				

<b>jedinec 43</b>					
vz. 55 (humerus)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	y				
I/1	y				
I/1	-				
I/2			-		
I/3			-		
I/4		-			
I/5	y	-	14	17	-
re/6	-	-	-	-	-
vz. 56 (humerus)					
II/1	-				
II/1	-				
II/1	-				
vz. 57 (zub)					
III/1	-				
III/1	-				
III/1	xy				
III/2			-		
III/3			-		
III/4		-			
re/5	-	-	-	-	-

<b>jedinec 49</b>					
vz. 58 (zub)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	-				
I/1	x				
I/1	-				
I/2	-				
I/2	x				
I/3			-		
I/4			10		
I/5		9			
I/6	-	-	-	-	-
I/7	x	9	-	-	-
I/8	x	9	-	16	-
re/9	y	9.3	10	-	-
re/10	-	-	-	-	-
re/11	-	9/9.3	-	14	-
vz. 59 (femur)					
II/1	-				
II/1	-				
II/1	-				
re/2	y				
re/2	-				
re/2	-				
re/3	y				
re/3	-				
re/4			-		
re/5		-			
re/6	-	-	-	-	-
IV*/7	x	-	10	-	-
vz. 60 (femur)					
III/1	-				
III/1	-				
III/1	-				
IV*/2	-	-	-	-	-



<b>jedinec 55</b>					
vz. 61 (femur)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				
re/2	-	-	-	-	-
vz. 62 (femur)					
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				
re/2	-				
re/2	-				
re/2	-				
III*/3	-	-	-	-	-
vz. 63 (costa)					
II/1	-				
II/1	-				
II/1	y				
II/2	y				
II/2	-				
II/3			-		
II/4			-		
II/5		-			
II/6	-	-	-	-	-
II/7	-	-	-	-	-
re/8	-	-	-	-	-

<b>jedinec 58</b>					
vz. 64 (zub)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	xy				
I/1	xy				
I/1	xy				
I/2			-		
I/3			12		
I/4		6			
I/5	x	6	-	-	-
I/6	-	-	-	-	-
I/7	-	-	-	-	-
I/8	-	-	-	-	-
vz. 65 (zub)					
II/2	-				
II/2	-				
II/2	xy				
II/3			-		
II/4			-		
II/5		-			
II/6	-	-	-	-	-
vz. 66 (femur)					
III/1	y				
III/1	y				
III/1	-				
III/2			-		
III/3			-		
III/4		9			
III/5	-	6	12	-	-
III/6	-	-	-	-	-
III/7	-	9	-	-	-
III/8	-	-	-	-	-

<b>jedinec 60</b>					
vz. 34 (dlouhá kost DK)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				
re/3	-	-	-	-	-
vz. 35 (dlouhá kost DK)					
II/1	-				
II/1	-				
II/1	-				
II/2	-				
II/2	-				
vz. 36 (dlouhá kost HK)					
I/1	-				
I/1	-				
I/1	-				

<b>jedinec 63</b>					
vz. 67 (zub)					
ex (re)/PCR	Amelo	TH01	D8S1179	vWA	D21S11
I/1	xy				
I/1	xy				
I/1	xy				
I/2			-		
I/3			-		
I/4		9.3 (10)			
I/5	xy	9.3	13	14	-
I/6	xy	9.3	13	14/18	-
I/7	-	-	-	-	-
I/8	x	9.3	13	18	-
vz. 68 (zub)					
II/2	y				
II/2	y				
II/2	y				
II/3			-		
II/4		9.3 (10)			
II/5	-	-	-	-	-
II/6	-	-	-	-	-
II/7	xy	9.3	13	14	-
re/8	-	-	-	-	-
re/9	-	-	-	-	-
re/10	x	-	13	14	35,2
vz. 69 (femur)					
III/1	-				
III/1	-				
III/1	-				
re/2	-	-	-	-	-