

GENETICKÁ STUDIE DĚTÍ Z POHŘEBIŠTĚ JIŽNÍ PŘEDHRADÍ – POHANSKO

Kateřina Mertlová

Abstrakt:

Pohřebiště Jižní předhradí je druhé největší pohřebiště objevené na Pohansku. Bylo zde nalezeno 210 kostrových hrobů, z nichž bylo vyzvednuto 189 jedinců. Kosterní nálezy z Jižního předhradí jsou velmi špatně zachovány, ve většině případů naprosto neurčitelné. Ze 189 koster bylo 27 určeno jako mužských a 40 jako ženských. 88 koster je dětských a u 34 koster se pohlaví tradičními morfometrickými a morfologickými metodami nepodařilo určit. Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) je často jedinou možností, jak analyzovat DNA starých kosterních nálezů, ve kterých se DNA nachází jen ve velmi malém množství nebo je částečně degradovaná. Molekulárně biologické postupy nesledují celé chromozomy, ale pouze určitý lokus na jejich DNA. Metoda PCR umožňuje určit pohlaví původce vzorku několika způsoby. Mezi nejčastější postupy patří analýza genu SRY a genu pro amelogenin. Těmito metodami je určováno pohlaví také u dětských kosterních nálezů z Jižního předhradí. Získané informace jsou velice důležité pro doplnění demografie celého pohřebiště.

Klíčová slova:

DNA – PCR – SRY – metoda – hrob – kostra – gen – genetika – dětský hrob – demografie – Pohansko – Jižní předhradí

Abstract:

Genetic Study of Children from the South Ramparts Burial Ground, Pohansko

The South Ramparts burial ground is the second largest burial ground discovered in Pohansko. Some 210 skeletal graves have been excavated there, from which the remains of 189 people have been taken. Unfortunately, the skeletal finds from South Ramparts are rather badly preserved, and in most cases unidentifiable. Of the 189 skeletons, only 27 were determined as adult male, 40 as adult female and 88 as children; the sex of the remaining 34 skeletons was impossible to define by standard morphometric and morphological methods. Polymerase chain reaction (PCR) is often the only way to analyse the DNA from ancient skeletal finds containing only a tiny proportion of DNA, or in which the DNA is partially degraded. Such molecular-biological procedures do not concentrate on complete chromosomes but only on certain loci within the DNA. The PCR method enables the determination of the sex of the sample originator by several means. The most frequent procedures include an analysis of the SRY gene and the amelogenin gene. These methods are also employed to determine the sex of children's skeletal remains from South Ramparts. The information thus acquired is vital to the demography of the entire burial ground.

Key words:

DNA – PCR – SRY – method – grave – skeleton – gene – genetics – children's graves – demography – Pohansko – South Ramparts

ÚVOD

Hradisko Pohansko se nachází nedaleko Břeclavi. Ke kontinuálnímu osídlení Pohanska došlo v průběhu 6. století n. l.

příchodem slovanského lidu (Drozdová 2005, 9). Největšího rozmachu zaznamenalo Pohansko na přelomu 8. a 9. století, kdy zde bylo vybudováno rozsáhlé opevněné velkomoravské hradiště s rozlohou 28 ha. Na této lokalitě bylo odkryto několik pohřebišť. Největší pohřebiště se nachází okolo kostela a je datované do druhé poloviny 9. století až první poloviny 10. století, kde se našlo celkem 395 kosterních nálezů. Z toho 167 koster bylo dětských nebo se jednalo o kostry nezletilých jedinců bez určeného pohlaví (Drozdová 2005, 27). Mezi hrobové celky nalezené na území hradiska patří: Pohřebiště II, Lesní školka a hroby nalezené při sondáži valu a Lesní hrúd. Zde bylo vykopáno dohromady 99 koster dětí a nedospělců. Dalším významným pohřebištem je Severovýchodní předhradí, datované od konce 9. století až poloviny 10. století. Bylo zde objeveno celkem 46 koster, 26 jich bylo dětských (Drozdová 2005, 83).

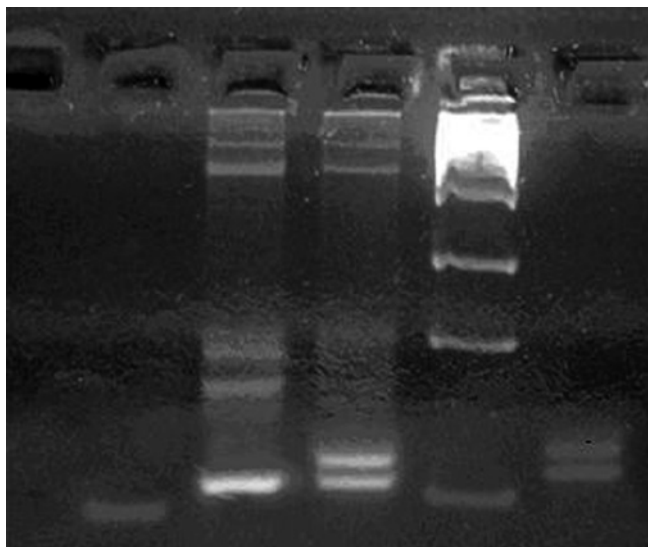
Lokalita Jižní předhradí se nachází mimo opevněné velkomoravské hradiště, jihozápadním směrem od něj. Byla objevena v letech 1960–1962 (Drozdová 2005, 97). Jižní předhradí bylo odkryto v letech 1975–1979 při záchranném archeologickém výzkumu, který předcházela stavbě nového koryta řeky Dyje (Drozdová 2005, 97). Pohřebiště na Jižním předhradí Pohanska je druhé největší pohřebiště objevené na Pohansku. Má rozlohu přibližně 9 ha a je datované od konce 8. století až do počátku 10. století (Drozdová 2005, 11). Jedná se tedy o dobu středohradištní. Podle Jany Vignatiové sloužilo Jižní předhradí příslušníkům družiny velkomoravského panovníka, kteří zde bydleli se svými rodinami a pravděpodobně i se služebnictvem (Vignatiová 1992, 97). Zřejmě si také pěstovali zemědělské plodiny a byli podporováni z centra Velkomoravské říše (Drozdová 2005, 13; Vignatiová 1992, 98).

MATERIÁL

Na Jižním předhradí bylo nalezeno celkem 436 sídlištních objektů a 210 kostrových hrobů, z nichž bylo vyzvednuto 189 jedinců (Drozdová 2005, 12, 97). Kosterní nálezy z Jižního předhradí jsou velmi špatně zachovány, jsou fragmentární a ve většině případů naprosto neurčitelné. Ze 189 koster bylo 27 určeno jako mužských a 40 jako ženských. 88 koster je dětských a u 34 koster se pohlaví tradičními morfometrickými a morfologickými metodami nepodařilo určit. Cílem této práce je určení pohlaví u dětských a neurčených koster pomocí molekulárně-genetické analýzy DNA a doplnění cenných informací k demografii celého pohřebiště.

METODY

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) bývá často jediným mechanismem, který umožňuje analýzu DNA starých kosterních nálezů. Tato metoda byla zavedena v roce 1985 Kary B. Mullisem, který za ni byl vyznamenán Nobelovou cenou (Šmarda



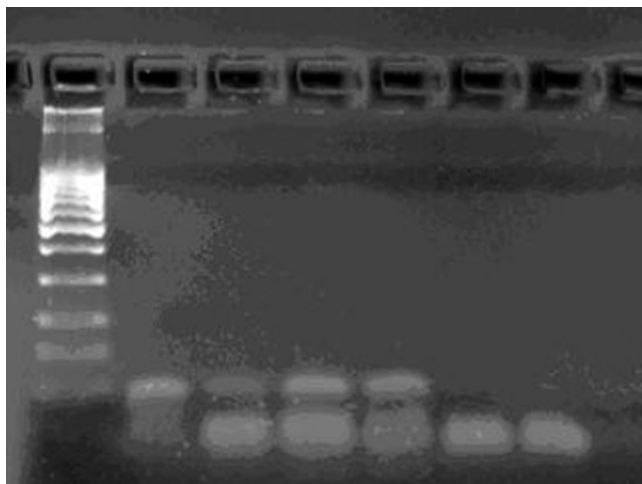
Obr. 1. Analýza genu pro amelogenin. Zleva: negativní kontrola – pozitivní kontrola (recentní DNA ženy) – pozitivní kontrola (recentní DNA muže) – hmotnostní standard – vzorek H 153.

Abb. 1. Analyse des Amelogenin-Gens. Von links: negative Kontrolle – positiv Kontrolle (rezente DNA ♀) – positive Kontrolle (rezente DNA ♂) – Massenstandard – Probe H 153.

a kol. 2005, 73). Podstatou reakce je *in vitro* syntéza vybraného úseku DNA, která probíhá v opakujících se cyklech. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů (např. Taq DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus*), které odolávají teplotám, při nichž DNA denaturuje (Šmarda a kol. 2005, 73). Výsledkem reakce je mnohonásobné zmnožení daného úseku, a je tedy získán dostatek materiálu pro jeho další charakterizaci. Jedná se o ideální metodu při studiu vzorků obsahujících malé množství DNA nebo degradovanou DNA.

Metoda PCR umožňuje určit pohlaví původce vzorku několika způsoby. Molekulárně biologické postupy nesledují celé chromozomy, ale pouze určitý lokus na jejich DNA. Pohlaví kosterních vzorků se určuje například pomocí lokusů specifických pro Y-chromozom (například gen **SRY**). Tato metoda umožňuje přímou identifikaci pouze jedinců mužského pohlaví. Je dána amplifikací úseku genu SRY, dlouhého jen 93 bp (Cunha et al. 2000, 951). Gen SRY (Sex determining Region of the Y chromosome) se nachází na krátkém raménku chromozomu Y. Produkuje transkripční faktor TDF (Testis Determining Factor) regulující vývoj varlat. V případě úspěšné amplifikace je zřejmé, že jedinec je pohlaví mužského. Negativní výsledek však může kromě pohlaví ženského znamenat to, že se hledaný lokus ve vzorku jednoduše nezachoval nebo se jej nepodařilo namnožit.

Z těchto důvodů se k určení pohlaví u kosterního materiálu používá metoda amplifikace úseku sekvence z prvního intronu genu pro amelogenin. **Amelogenin** je gen kódující protein zubní skloviny, nachází se v homologní oblasti na obou pohlavních chromozomech (Yp11.2 a Xp22.31-p22.1); (Hummel 2003, 29). Na počátku 90. let bylo objeveno, že na X chromozomu je



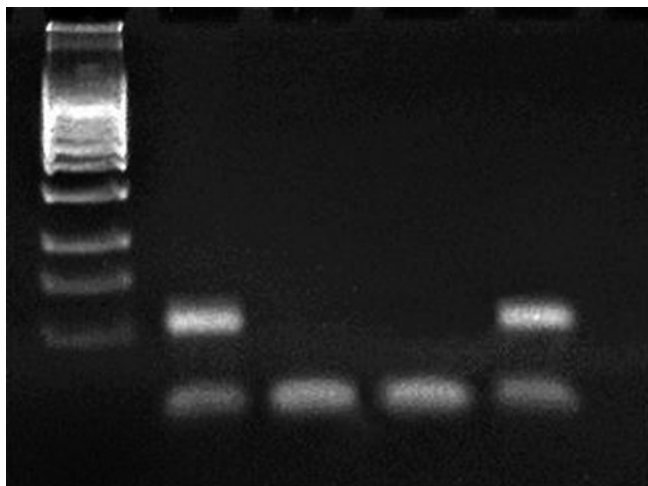
Obr. 2. Analýza genu SRY. Zleva: hmotnostní standard – H 153 – H 24/IV – H 26/IV – H 46 – H 133 – H 124.

Abb. 2. Analyse des SRY-Gens. Von links: Massenstandard – H 153 – H 24/IV – H 26/IV – H 46 – H 133 – H 124.

v prvním intronu amelogeninového genu 6bp delece (Mannucci et al. 1994, 190–193; Sullivan et al. 1993, 636–641). PCR produkty z obou chromozomů se pak liší svou délkou. DNA fragment namnožený z X chromozomu je dlouhý 106 párů bází, kdežto DNA fragment namnožený z Y chromozomu je dlouhý 112 párů bází (Cunha et al. 2000, 951; Kaestle – Horsburgh 2002, 115; Sullivan et al. 1993, 636–641). Z mužské DNA se tedy amplifikují dva produkty (dlouhé 106 a 112 bp), protože muž má chromozomy XY. Žena má chromozomy XX, takže se amplifikují dva produkty o stejné délce 106 bp, které se na gelu projeví jako jeden proužek.

Z kosterních pozůstatků dětí z pohřebiště Jižní předhradí byly odebrány vzorky kostí k analýze DNA. Tyto vzorky byly očištěny 96 % EtOH a 5 % NaClO a rozdrceny v třecí misce a mlýnu Retsch® MM301. Dále byly dekalcičovány působením 0,5 M EDTA (pH 8,0). Izolace se provádí izolačním kitem QIAamp® DNA Mini Kit podle doporučeného protokolu a amplifikace vzorků DNA pomocí modifikovaného protokolu podle Hummelové (amelogenin) a Cunhy (SRY); (Hummel 2003, 235; Cunha et al. 2000, 951). Produkty amplifikace se separují gelovou elektroforézou (3 % agarozový gel, 4,4 % MetaPhor®) a zviditelňují použitím interkalačního činidla EtBr (ethidiumbromid) a pozorují se pod UV světlem na transluminátoru. Všechny výsledky jsou dokumentovány digitálním fotoaparátem. V laboratoři se přísně dbá na dodržení opatření proti kontaminaci vzorků (použití negativních kontrol při každé analýze, častá výměna jednorázových rukavic, autoklávování roztoků, používání UV světla k odstranění exogenních nukleových kyselin na pracovní ploše, přidávání DNA do reakce jako poslední, používání sterilních zkumavek a špiček s filtrem atd.). Při DNA izolaci, PCR amplifikaci a pro analýzu PCR produktů se používají různé sady pipet.

Určování pohlaví pomocí analýzy DNA je významné především u dětských a fragmentárních koster, kde nelze pohlaví určit klasickými morfometrickými a morfologickými metodami. Získáme tak informace důležité pro doplnění demografických údajů pohřebiště, případně informace o pohřebním ritu nedospělých jedinců.



Obr. 3. Analýza genu pro amelogenin. Zleva: hmotnostní standard – H 36 – H 91 – H 47 – H 182.

Abb. 3. Analyse des Amelogenin-Gens. Von links: Massenstandard – H 36 – H 91 – H 47 – H 182.

DOSAVADNÍ VÝSLEDKY A DISKUSE

Při určování pohlaví u dětských koster z pohřebiště Jižní předhradí na Pohansku se setkáváme s několika problémy. Problém představuje především vysoká fragmentárnost a špatná zachovalost kosterních pozůstatků. DNA z těchto vzorků je často degradovaná a dochází k obtížím při její izolaci. Výzkum je teprve v počátcích, přesto se již podařilo určit pohlaví prvních vzorků. Jako příklad je uvedena úspěšná analýza genu pro amelogenin u kosterních pozůstatků z hrobů H 153, H 36, H 91, H 47, H 182. U kosterních pozůstatků z hrobu H 153 bylo pohlaví určené jako mužské (obr. 1), u H 36 a H 182 jako ženské (obr. 3). U vzorků H 91 a H 47 se amplifikace nepodařila (obr. 3). Dalším příkladem je analýza genu SRY u pozůstatků z hrobů H 153, H 24/IV, H 26/IV, H 46, H 133, H 124, kde bylo pohlaví u prvních čtyř vzorků určeno jako mužské a u zbývajících dvou vzorků jako ženské (obr. 2). Tyto první výsledky jsou velice povzbudivé. Věříme, že se takto podaří určit pohlaví u většiny studovaných vzorků.

Tento výzkum probíhá v rámci výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy číslo MSM 0021622427 s názvem: Interdisciplinární centrum výzkumů sociálních struktur pravěku až vrcholného středověku. Archeologický terénní a teoretický výzkum, využití přírodních věd, metodologie a informatika, ochrana kulturního dědictví. Hlavním řešitelem je Zdeněk Měřínský, vedoucí Archeologického ústavu Filozofické fakulty Masarykovy univerzity a spoluřešiteli z Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity jsou Antonín Přichystal z Ústavu geologických věd a Eva Drozdová z Ústavu experimentální biologie.

LITERATURA

Cunha, E. – Fily, M.-L. – Clisson, I. – Santos, A. L. – Silva, A. M. – Umbelino, C. – César, P. – Corte-Real, A. – Crubézy, E. – Ludes, B. 2000: Children at the Convent: Comparing Historical Data, Morphology and DNA Extracted from Ancient Tissues for Sex Diagnosis at Santa Clara-a-Velha

(Coimbra, Portugal), *Journal of Archaeological Science* 27, 949–952.

Drozdová, E. 2005: Břeclav–Pohansko VI. Slovanští obyvatelé velkomoravského hradiska Pohansko u Břeclavi (demografická a antropometrická studie). Brno.

Hummel, S. 2003: *Ancient DNA Typing. Methods, Strategies and Applications*. Berlin – Heidelberg.

Kaestle, F. A. – Horsburgh, K. A. 2002: *Ancient DNA in Anthropology: Methods, Applications, and Ethics*, *Yearbook of Physical Anthropology* 45, 92–130.

Mannucci, A. – Sullivan, K. M. – Ivanov, P. L. – Gill, P. 1994: Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin, *International Journal of Legal Medicine*, 106(4), 190–193.

Sullivan, K. M. – Mannucci, A. – Kimpton, C. P. – Gill, P. 1993: A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin, *Biotechniques* 15(4), 636–641.

Šmarda, J. – Doškař, J. – Pantůček, R. – Růžičková, V. – Koptíková, J. 2005: *Metody molekulární biologie*. Brno.

Vignatiová, J. 1992: Břeclav-Pohansko II. Slovanské osídlení jižního předhradí. Brno.

Mgr. Kateřina Mertlová, Ústav experimentální biologie PřF MU Brno, Kotlářská 2, 611 37 Brno

K tisku doporučila doc. RNDr. Eva Drozdová, Ph.D.

ZUSAMMENFASSUNG

Genetische Studie bei Kindern vom Gräberfeld Südliche Vorbürg – Pohansko

Das Gräberfeld Südliche Vorbürg ist das zweitgrößte in Pohansko entdeckte Gräberfeld. Dort wurden 210 Skelettgräber gefunden, aus denen 189 Individuen gehoben wurden. Die Knochenfunde von der Fundstätte Südliche Vorbürg sind in sehr schlechtem Erhaltungszustand und in den meisten Fällen überhaupt nicht bestimmbar. Von den 189 Skeletten wurden 27 als männliche und 40 als weibliche bestimmt. Bei 88 Skeletten handelt es sich um Kinder und bei 34 konnte mit den traditionellen morphometrischen und morphologischen Methoden das Geschlecht nicht bestimmt werden. Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist häufig die einzige Möglichkeit, die DNA alter Knochenfunde, in denen sich nur eine sehr geringe Menge DNA befindet oder häufig degradiert ist, zu analysieren. Die molekularbiologischen Verfahren beobachten nicht ganze Chromosomen, sondern lediglich einen gewissen Lokus an ihrer DNA. Die PCR-Methode ermöglicht es, das Geschlecht des Urhebers einer Probe auf mehrere Arten zu bestimmen. Zu den häufigsten Verfahren zählt die Analyse des SR Y-Gens und des Amelogenin-Gens. Mit diesen Methoden wurde auch das Geschlecht bei den Kinderknochenfunden an der Fundstätte Südliche Vorbürg bestimmt. Die gewonnenen Informationen sind sehr wichtig zur Ergänzung der Demographie des ganzen Gräberfeldes.