

METODY GENETICKÉHO URČENÍ POHLAVÍ U KOSTERNÍHO MATERIÁLU

Michaela Vaňharová

Abstrakt:

Stanovení pohlaví jedince jako základní antropologická charakteristika je důležitou a mnohdy nezbytnou informací pro navazující antropologické a další studie. Ovšem spolehlivost a možnost této determinace je ovlivněna, případně limitována řadou faktorů. Jednoznačnou odpověď ve sporných, neurčitelných ale i standardních případech může poskytnout genetická analýza pohlavně specifických sekvencí.

Klíčová slova:

aDNA – amelogenin – Hoštice za Hanou – SRY – STR – pohlaví – ZFX – ZFY

Abstract:

Methods of Genetic Sex Determination of Skeletal Material

The determination of sex as a basic anthropological characteristic is an essential piece of knowledge, often highly relevant to subsequent anthropological and other studies. Both reliability and scope of the determination are, however, affected or limited by a number of factors. In debatable, unidentifiable, or even standard cases, a clear answer may be provided by the genetic analysis of specific sequences in the particular sex.

Key words:

aDNA – amelogenin – Hoštice in the Haná region – SRY – STR – gender – ZFX – ZFY

ÚVOD

Determinace pohlaví patří k základním antropologickým charakteristikám. Spolehlivost morfologického a morfometrického určení pohlaví z kosterního materiálu je omezena řadou faktorů. Diskriminační funkce pro určení pohlaví na základě osteometrických znaků byly vypracovány na referenčních souborech koster známého pohlaví, pocházejících z recentních nebo subrecentních populací. Aplikace těchto funkcí na pravěké populace může být tedy do jisté míry zatížena systematickou chybou. Výpovědní hodnota je navíc limitována patologickým stavem jedince a také stupněm zachovalosti kostry, neboť není-li k dispozici skelet pánve a lebky, může být určení pohlaví značně nejisté. Hlavním limitujícím faktorem je potom biologický věk, neboť u nedospělých jedinců nejsou ještě plně formovány pohlavně specifické znaky a s dále postupujícím věkem se sexuální rozdíly opět stírají. Znaky, ve kterých se obě pohlaví liší, nebývají diskrétní, ale vyznačují se plynulými přechody mezi krajními polohami. Stanovení pohlaví je také obtížné v případech, kdy vlivem faktorů vnějšího prostředí, diety a pracovního stresu dochází ke změnám normálního vývoje (Loth – Işcan 2000). Konkrétní odpověď na příslušnost k určitému pohlaví může poskytnout genetická

analýza specifických sekvencí lokalizovaných na pohlavních chromozomech (X, Y).

HISTORIE

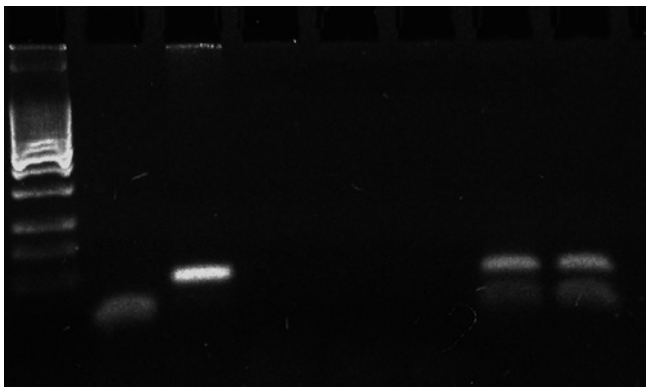
Historie využití informací kódovaných v molekule deoxyribonukleové kyseliny (DNA, deoxyribonucleic acid) se odvíjí od roku 1944, kdy byla Osvaldem Averym objasněna funkce jaderné, neproteinové složky tvořené právě DNA jako nástroje přenosu dědičných znaků. Později, v roce 1953, James Watson a Francis Crick objasnili dvoušroubovicovou strukturu DNA molekuly (Rudin – Inman 2002) čímž byla zahájena éra molekulární genetiky, jejíž využití se promítlo i do oblasti antropologie či forenzních analýz. Otázku, zda je možná konzervace intaktní molekuly DNA včetně genetické informace v ní obsažené u paleontologického nebo archeologického materiálu, vyřešila počátkem 80. let skupina vědců z čínské Hunan Medical School, která prokázala existenci tzv. ancient DNA (aDNA) úspěšnou extrakcí z žeberní chrupavky nálezu „Old Lady of Mawangtui“, staré téměř 2000 let (Herrmann – Hummel 1994).

Zavedení technik molekulárního klonování pak znamenalo průlom ve studiu lidského genomu, konkrétních genetických informací i molekuly DNA obecně. Přetrvávajícím problémem, který znemožňoval analýzu aDNA, bylo limitované množství často degradované DNA. První úspěšnou amplifikaci aDNA z živočišných tkání publikoval v roce 1984 Higuchi et al. Tento úspěch byl brzy následován klonováním aDNA z egyptských mumií (Pääbo, 1984), tato technika však vyžadovala velký objem extrahované aDNA.

Objev polymerázové řetězové reakce (PCR) v druhé polovině 80. let (Mullis – Fallona 1987; Saiki et al. 1985) vedl, kromě Nobelovy ceny pro své objevitele, k rozmachu ve výzkumu aDNA, neboť je postačující pouze stopové množství cílové molekuly aDNA. Práce uveřejněná v roce 1989 Hagelbergem et al., kde popsal úspěšnou amplifikaci DNA z archeologického kosterního nálezu, znamenala průlom v antropologii, neboť skeletární pozůstatky tvoří hlavní podíl nálezů, které v případě jejich fragmentace nebývá možné determinovat.

INFORMACE OBSAŽENÉ V DNA A VYUŽITELNÉ PRO GENETICKOU ANALÝZU POHLAVÍ

Podstatou genetického určení je nalezení sekvencí specifických pro dané pohlaví – ať už přímo genů, které se podílejí na determinaci pohlaví – například SRY nebo genů, u nichž je asociace s pohlavím dána jejich umístěním na pohlavních chromozomech (amelogenin). Kromě kódujících sekvencí lze využít i tzv. repetitivní sekvence, které jsou tvořeny různě dlouhými opakováními určitého sekvenčního motivu. Podle délky tohoto motivu, počtu opakování i struktury repetic (tandemové, roz-



Obr. 1. Amplifikace SRY (1. dráha – hmotnostní standard, 2. dráha – negativní kontrola, 3. dráha – pozitivní kontrola, produkt 93bp, 7. dráha – vzorek 804, pozitivní na SRY, 8. dráha – vzorek 813, pozitivní na SRY).

Abb. 1. SRY – Amplifikation (1. Bahn – Massenstandard, 2. Bahn – negative Kontrolle, 3. Bahn – positive Kontrolle, Produkt 93bp, 7. Bahn – Probe 804, positiv auf SRY, 8. Bahn – Probe 813, positiv auf SRY).

ptýlené) lze rozlišit tzv. satelitní, mini- a mikrosatelitní DNA, jejíž variabilita může být základem nejen genetického určení pohlaví, ale také příbuzenských nebo identifikačních analýz.

MARKERY LOKALIZOVANÉ NA X CHROMOZOMU

Amelogenin

Gen pro amelogenin kóduje protein zubní skloviny a je lokalizován na pohlavních chromozomech X a Y (Lau et al. 1989). Oba lokusy, tedy konkrétní místa na chromozomu, kde se nachází určitá sekvence, vykazují 88,9 % homologii v sekvenci nukleotidů (Nakahori et al. 1991). Jedna kopie se nachází v distální části krátkého raménka X chromozomu na pozici p22.1-p22.3 a druhá v oblasti centromery Y chromozomu (Yp11.2).

Na počátku 90. let byl objeven polymorfismus v délce obou kopií. Později, v roce 1994, popsali Manucci et al. metodu určení pohlaví na základě amplifikace úseku z homologního genu pro amelogenin. První intron tohoto genu nese na X chromozomu delecí o velikosti 6bp, což umožňuje odlišit mužský a ženský genotyp na základě odlišné délky amplifikačních produktů, například pomocí gelové nebo kapilární elektroforézy.

X-STR

Byly objeveny v roce 1982 Hamadou et al. Jedná se o tzv. mikrosatelity, které se nachází se na všech chromozomech včetně pohlavních, a to v nekódujících oblastech. STR (short tandem repeats) tvoří značnou část, až 20 %, lidského genomu a jsou tvořeny motivy o velikosti 2–6 párů bazí (base pairs, bp), které se mnohonásobně za sebou opakují. Tato opakování jsou pravidelně rozšířena v genomu a jsou zdrojem vysoce polymorfních markerů, které mohou být detekovány prostřednictvím polymerázové řetězové reakce. Existuje řada různých STR, z nichž některé jsou umístěny na pohlavních chromozomech. Ženský jedinec tedy potom nese dvě alely s vysokým poměrem heterozygoty, což umožňuje výhodné použití X-vázaných STR polymorfismů jako genetického markeru pro určení ženského pohlaví (Hummel 2003).

ZFX

Jedná se o gen umístěný na krátkém raménku X-chromozomu v pozici Xp22.3-p21.2 kódující protein, regulační transkripční faktor, se specifickými DNA vazebnými motivy – tzv. zinkovými prsty (zinc finger protein). Sekvence kódující vlastní „zinkové prsty“ jsou tvořeny tandemovými repeticemi o 28 až 30 aminokyselinách (OMIM) a lze je využít pro odlišení mužského a ženského genotypu.

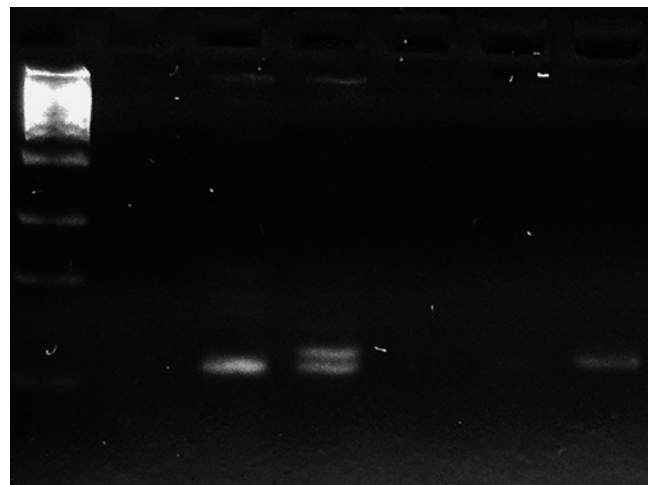
MARKERY LOKALIZOVANÉ NA Y CHROMOZOMU

Amelogenin

Viz. Markery lokalizované na X chromozomu.

SRY

Gen kódující SRY (sex determining region Y) je lokalizován na krátkém raménku Y chromozomu (Yp11.3) a kóduje transkripční faktor regulující vývoj samčích pohlavních znaků u savců. Je tedy přítomen pouze u jedinců mužského pohlaví s výjimkou vzácných translokací. V roce 1998 byla Santosem et al. publikována metoda pro určení jedinců mužského pohlaví, kdy je amplifikován úsek o velikosti 93bp z tohoto genu (Cuhna et al. 2000). Výstupem této analýzy je tedy v případě mužského individua pozitivní signál (sekvence je přítomna) po amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí a negativní signál (sekvence není přítomna) u vzorků pohlaví ženského. Studie E. Cunha et al. (2000) ukázala, že tento region je snázeji amplifikovatelný v porovnání s amelogeninovým lokusem, a tudíž se jeví jako velmi vhodný pro analýzu aDNA.



Obr. 2. Amplifikace amelogenin (1. dráha – hmotnostní standard, 2. dráha – negativní kontrola, 3. dráha – pozitivní kontrola, 106bp, jedinec ženského pohlaví, 4. dráha – pozitivní kontrola, 106/112bp, jedinec mužského pohlaví, 7. dráha – vzorek 812, jedinec ženského pohlaví).

Abb. 2. Amelogenin – Amplifikation (1. Bahn – Massenstandard, 2. Bahn – negative Kontrolle, 3. Bahn – positive Kontrolle, 106bp, Individuum weiblichen Geschlechts, 4. Bahn – positive Kontrolle, 106/112bp, Individuum männlichen Geschlechts, 7. Bahn – Probe 812, Individuum weiblichen Geschlechts).

ZFY

Gen pro ZFY (*Y-encoded zinc finger protein*) byl objeven roku 1987 týmem Page et al. a kóduje transkripční faktor podobný ZFX. Je lokalizován v pozici Yp11.32 a lze jej využít podobně, jako jeho X vázaný protějšek.

Problematika manipulace s aDNA

Jako zásadní problém, který využití aDNA pro antropologické nebo forenzní analýzy přináší, je stále riziko kontaminace recentní DNA, kterou prakticky nelze odlišit od studovaného vzorku. Základním předpokladem pro úspěšné experimenty s aDNA je tedy striktní dodržování pravidel pro klasickou PCR rozšířené o některé specifické nároky zabraňující kontaminaci vzorků. Mezi tyto podmínky patří používání jednorázového laboratorního plastiku, u něhož je výrobem deklarována nepřítomnost DNA i enzymů, které jsou DNA schopné degradovat (DNázy), špiček s filtrem zabraňující tzv. kontaminaci křížem (crosskontaminaci) i například alikvotů nukleotidového poolu, primerů, roztoku $MgCl_2$ a vlastního PCR pufru.

Ideálně navržená laboratoř pro analýzu aDNA je členěna do tří nezávislých jednotek tak, aby bylo možné oddělit izolaci DNA, oddíl pro PCR a další oddíl pro analýzu PCR produktu. Zásadním předpokladem genetických analýz aDNA a samozřejmostí je práce za sterilních podmínek, používání rukavic, laboratorního oblečení nebo overalů a dalších pomůcek eliminující možné kontaminace recentní DNA.

Aplikace

Pro vlastní analýzy kosterního materiálu byla vybrána dvojice markerů – gen pro amelogenin a SRY gen. Využití dvou markerů namísto jednoho odstraňuje nevýhodu tzv. alelického „drop-outu“. Jedná se o tzv. náhodnou neamplifikaci cílového úseku. Tento přístup je aplikován na soubor nedospělých jedinců z eneolitického pohřebiště Hoštice za Hanou, které bylo objeveno v roce 2002 při záchranném archeologickém výzkumu v rámci stavby dálnice D1 z Brna na Kroměříž. Jedná se o pohřebiště lidu kultury zvoncovitých pohárů, které je největší v České republice a patrně i ve střední Evropě. Vzhledem k unikátnosti tohoto nálezu precizní multidisciplinární výzkum může značně obohatit naše znalosti o lidech této kultury. Na obrázcích jsou uvedeny fotografie gelové elektroforézy produktů amplifikace SRY (obr. 1) a amelogeninu (obr. 2).

ZÁVĚR

Determinace pohlaví je nezbytným krokem pro navazující antropologické rozbory a analýzy, demografické studie apod. Zejména u nedospělých jedinců je stanovení pohlaví značně problematické, neboť zde nejsou ještě formovány znaky užívané v morfologických a morfoskopických protokolech. Východiskem se jeví amplifikace specifických sekvencí lokalizovaných na pohlavních chromozomech. Cílem této práce bylo zejména shrnout problematiku genetické determinace pohlaví u kosterního materiálu a informovat o probíhajícím výzkumu.

Grantová podpora: FRVŠ 43/2006 a GAČR 404/04/0962.

LITERATURA

- Cunha, E. – Fily, M. – 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.
- Hagelberg, E. – Sykes, B. – Hedges, R.* 1989: Ancient bone DNA amplified, *Nature* 342, 485–485.
- Hamada, H. – Petrino, M. G. – Kakunaga, T.* 1982: A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryote genomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6465–6469.
- Herrmann, B. – Hummel, S.* 1994: Ancient DNA: Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical, and Forensic Specimens. Berlin – Heidelberg – New York – Hong Kong – London – Milan – Paris – Tokyo.
- Higuchi, R. – Bowman, B. – Freiberger, M. – Ryder, O. A. – Wilson, A. C.* 1984: DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family, *Nature* 312, 282–284.
- Hummel, S.* 2003: Ancient DNA Typing: methods, strategies, and applications. Berlin – Heidelberg – New York – Hong Kong – London – Milan – Paris – Tokyo.
- Lau, E. C. – Mohandas, T. K. – Shapir, L. J. – Slavkin, H. C. – Snead, M. L.* 1989: Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes, *Genomics* 4, 162–168.
- Loth, S. R. – Işcan, M. Y.* 2000: Sex Determination. In: Siegel, J. – Saukko, P. – Knaupfer, G. (eds.): *Encyclopedia of Forensic Sciences*. 252–260. London.
- 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, *Int. J. Legal Med.* 106, 190–193.
- Mullis, K. B. – Faloona, F. A.* 1987: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction, *Meth. Enzymol* 155, 335–350.
- Nakahori, Y. – Takenaka, O. – Nakagome, Y.* 1991: A human X-Y homologous region encodes amelogenin, *Genomics* 9, 264–269.
- OMIM* – Online Mendelian Inheritance in Men, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Page, D. C. – Mosher, R. – Simpson, E. M. – Fisher, E. M. C. – Mardon, G. – Pollack, J. – McGillivray, B. – de la Chapelle, A. – Brown, L. G.* 1987: The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein, *Cell* 51, 1091–1104.
- Pääbo, S.* 1984: Über den Nachweis von DNA in altägyptischen Mumien, *Das Altertum* 30, 213–218.
- Rudin, N. – Inman, K.* 2002: An Introduction to Forensic DNA Analysis. New York, CRC Press Inc. Boca Raton, 1997.
- Santos, F. R. – Pandya, A. – Tyler-Smith, C.* 1998: Reliability of DNA-based sex tests, *Nature genetics* 18, 103.
- Saiki, R. K. – Scharf, S. – Faloona, F. – Mullis, K. B. – Horn, G. T. – Erlich, H. A. – Arnheim, N.* 1985: Enzymatic amplification of P-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* 230, 1350–1354.

Mgr. Michaela Vaňharová, Ph.D., Ústav lékařské etiky
LF MU Brno, Komenského náměstí 2, 662 43 Brno

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

ZUSAMMENFASSUNG

Methoden der genetischen Geschlechtsbestimmung bei Knochenmaterial

Die zu den grundlegenden anthropologischen Charakteristika zählende Geschlechtsdetermination ist ein unerläßlicher Schritt bei der anthropologischen Analyse und den daran anknüpfenden Analysen. Nichtsdestoweniger ist die Zuverlässigkeit der klassischen morphologischen und morphometrischen Methoden durch eine Reihe von Faktoren begrenzt. Eine Lösung für strittige, unbestimmbare Fälle und insbesondere bei nicht erwachsenen Individuen, bei denen die geschlechtsdifferenzierenden Merkmale noch nicht ganz ausgeformt sind, kann die genetische Analyse der an den Geschlechtschromosomen lokalisierten Marker anbieten. Das Problem der begrenzten Menge von aDNA, die aus Knochenüberresten gewonnen werden kann, wurde durch die Entdeckung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gelöst, die eine Vervielfältigung spezieller Zielsequenzen bis zu einer solchen Menge erlaubt, die für die anschließende Analyse ausreichend ist.

Grundlage für die genetische Geschlechtsbestimmung ist die Analyse von Sequenzen, die geschlechtsspezifisch sind oder einen Polymorphismus aufweisen, der es erlaubt, den männlichen und weiblichen Genotyp zu unterscheiden. Von den an den Geschlechtschromosomen lokalisierten Markern können Polymorphismen in STR (short tandem repeats), im ZFX/ZFY, im Amelogenin-Gen und im Y-spezifischen SRY-Gen genutzt werden. Bei der Gruppe nicht erwachsener Individuen aus dem äneolithischen Gräberfeld Hoštice za Hanou wurde eine kombinierte Analyse des SRY-Gens und des Amelogenin-Gens verwendet.

Abschließend muß das Risiko einer Kontamination der rezenten DNA und somit die Notwendigkeit, die Regeln einzuhalten, die eine Kontaminierung der rezenten DNA minimieren, hervorgehoben werden.