



**MASARYKOVA UNIVERZITA**



**Přírodovědecká fakulta**

**Ústav experimentální biologie**

**Oddělení genetiky a molekulární biologie**

## **LIDSKÝ ZUB JAKO KONZERVÁTOR aDNA**

**(Příčiny větších výtěžků aDNA z lidských zubů oproti jiným lidským tkáním)**

**Bakalářská práce**

**Zuzana Pawlasová**

**VEDOUCÍ PRÁCE: Mgr. Dana Fialová**

**BRNO 2015**

## Bibliografický záznam

**Autor:** Zuzana Pawlasová  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Ústav experimentální biologie

**Název práce:** Lidský zub jako konzervátor aDNA  
(Příčiny větších výtěžků aDNA z lidských zubů oproti jiným lidským tkáním)

**Studijní program:** Experimentální biologie

**Studijní obor:** Molekulární biologie a genetika (směr Antropogenetika)

**Vedoucí práce:** Mgr. Dana Fialová

**Akademický rok:** 2014/2015

**Počet stran:** 41

**Klíčová slova:** aDNA; Zub; Kost; Kontaminace; Dřeň; Dentin; Cement

## Bibliographic Entry

**Author:** Zuzana pawlasová  
Faculty of Science, Masaryk University  
Department of Experimental Biology

**Title of Thesis:** Human tooth as a preserver of aDNA  
(instances of receiving higher amounts of aDNA from  
human teeth compared to other human tissues)

**Degree Programme:** Biology

**Field of Study:** Molecular Biology and Genetics (Anthropogenetics)

**Supervisor:** Mgr. Dana Fialová

**Academic Year:** 2014/2015

**Number of Pages:** 41

**Keywords:** aDNA; Tooth; Bone; Contamination; Pulp; Dentin;  
Cementum

## **Abstrakt**

Archeologické nálezy jsou cenným zdrojem informací o evoluci a historii člověka a dalších organismů. Kromě zkoumání samotné fyzické podstaty nálezů je dnes možnost zkoumat tyto vzorky do hloubky, až na úrovni molekul DNA. Ta je nejlépe uchována v podobě krátkých sekvencí v mineralizovaných tkáních – kostech a zubech, které jsou také pro analýzy nejčastěji využívány. V těchto dvou tkáních se ovšem nezachovávají ve stejné míře a kvalitě. Tato práce se snaží o souhrn poznatků o tom, kde se aDNA zachovává nejlépe, a která tkáň je tedy nejvhodnější pro získání aDNA.

## **Abstract**

Archeological findings are a very valuable source of information about human and other organisms' evolution and history. Nowadays it is possible to investigate these sources not only on a physical level but also on a molecular level which means investigation of DNA. DNA is well preserved in mineralised tissues – bones and teeth which are often used for analyses. But it is not preserved in equal amount and quality in these two tissues. This thesis is a compilation of findings about where aDNA is best preserved so which tissue should be the aim for gaining aDNA.



MASARYKOVA UNIVERZITA  
Přírodovědecká fakulta

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2014/2015

**Ústav:** Ústav experimentální biologie  
**Studentka:** Zuzana Pawlasová  
**Program:** Experimentální biologie  
**Obor:** Molekulární biologie a genetika

Ředitel *Ústavu experimentální biologie* PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s tématem:

**Téma práce:** Lidský zub jako konzervátor aDNA (Příčiny větších výtěžků aDNA z lidských zubů oproti jiným lidským tkáním)

**Téma práce anglicky:** Human tooth as a preserver of aDNA (instances of receiving higher amounts of aDNA from human teeth compared to other human tissues)

### Oficiální zadání:

Cílem této práce je formou literární rešerše shromáždit dostupné informace o rozdílech ve stavbě lidského zubu oproti jiným tkáním s přihlédnutím na uchovávání molekul aDNA. Značné množství prací prokázalo, že zub je nejvhodnějším typem tkáně pro izolaci aDNA. Výzkumy ukazují, že v kostech se molekuly DNA váží na hydroxyapatit, což umožňuje jejich dobré uchovávání. To, zda probíhá podobný mechanismus i v lidském zubu, není ještě dostatečně probádáno, z toho důvodu je vhodné se touto tematikou zabývat.

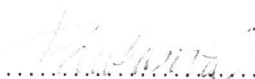
**Jazyk závěrečné práce:** čeština

**Vedoucí práce:** Mgr. Dana Fialová

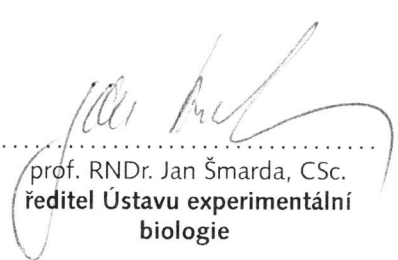
**Datum zadání práce:** 29. 10. 2014

**V Brně dne:** 3. 11. 2014

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

  
.....  
Zuzana Pawlasová  
studentka

  
.....  
Mgr. Dana Fialová  
vedoucí práce

  
.....  
prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.  
ředitel Ústavu experimentální  
biologie

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Daně Fialové za trpělivost, pomoc a čas při zpracování dané problematiky.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně a s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

**Brno 7. května 2015**

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Pawlasová', written over a horizontal dotted line.

Zuzana Pawlasová

# OBSAH

1. Úvod	9
2. Struktura a vývoj kostí a zubů	10
2.1. Kost	10
2.1.1. Vývoj kostí	11
2.1.1.1. Chondrogenní osifikace	11
2.1.1.2. Desmogenní osifikace	12
2.2. Lidský zub	13
2.2.1. Vývoj zubu	13
2.2.2. Zubní tkáň	14
2.2.2.1. Sklovina	14
2.2.2.2. Dentin	15
2.2.2.3. Zubní dřeň	16
2.2.2.4. Zubní cement	16
3. Uchování DNA v kostech a zubech	17
3.1. Kolagen	17
3.2. Hydroxyapatit	18
4. Faktory ovlivňující zachovalost aDNA	20
4.1. Oxidativní poškození	20
4.2. Hydrtolytické poškození	20
4.3. Teplota	21
4.4. pH	21
5. Kontaminace	22
5.1. Vliv kontaminací na amplifikaci	24
6. Výhody zubní tkáň oproti kostní	25
6.1. Pórovitost kostí	26
6.2. Odolnost zubů vůči kontaminaci	26
7. Různé zubní tkáň pro získání aDNA	28
7.1. Dřeň	29
7.2. Dentin	29
7.3. Celulární cement	29
8. Moderní postup odběru vzorku ze zubu	31
9. Závěr	33
10. Seznam citované literatury	35



# 1. ÚVOD

Zachovalé archeologické a paleontologické vzorky obsahují genetickou informaci (archaickou DNA; aDNA), která má potenciál objasnit nedávnou evoluční historii člověka, domestikovaných zvířat a patogenů, kterým sloužili jako hostitelé.

Od první úspěšné izolace aDNA, zažívá toto odvětví velký vzestup různými směry, nicméně potýká se také s mnohými problémy. Nejkritičtější byla nejspíš první polovina 90. let minulého století. Přišlo se totiž na to, že v několika vlivných odborných publikacích oznámili úspěšné amplifikace a analýzy aDNA z milióny let starých vzorků, načež se ukázalo, že byly tyto výsledky velmi ovlivněny kontaminací vzorků moderní DNA. Poté trvalo několik let, než se výzkum aDNA „zotavil“ a byl opět brán vážně, jako vědecký obor. Od roku 2005, s nástupem technologií souhrnně nazývaných „Next generation sequencing (NGS)“, se začal výzkum aDNA velmi zdokonalovat, jelikož tyto technologie umožnily hromadné sekvenování miliónů fragmentů DNA zároveň.

Kosti a zuby často představují jediný – ale také nejlepší – biologický materiál dostupný pro analýzu aDNA v antropologii a může být dodatečně využit ve forezních vědách. Fosílie nám poskytují nejen geologický záznam evoluce, připomínají nám také jak zásadní roli hrají mineralizované tkáně v biologii organismů. Měkké nemineralizované tkáně většinou velmi brzy podlehnou degradačním procesům a nedochovají se (jen v případě, že dojde k jejich mumifikaci). Proto cílem této bakalářské práce je srovnání pouze kostí a zubů jakožto zdrojů aDNA.

Vlastní text práce je členěn do několika kapitol. Nejprve je popsána struktura kostí a zubů a pro lepší pohled na tuto strukturu také jejich vývoj. Dále je věnována pozornost molekule aDNA – tomu kde se v mineralizovaných tkáních nachází, jaké faktory ji ovlivňují a také možné kontaminace. Následně je zdůvodněno, proč jsou zuby lepším zdrojem aDNA, a které části samotného zubu jsou nejvhodnější pro odběr vzorku. Na závěr jsou popsány nejvhodnější postupy pro dosažení maximálního výtěžku bez úplné destrukce zubu.

## 2. STRUKTURA A VÝVOJ KOSTÍ A ZUBŮ

### 2.1. Kost

Kosti a zuby chrání vnitřní orgány, umožňují pohyb a rozmělnění potravy a poskytují další mechanické funkce. Zároveň jsou také pro tělo klíčovými regulátory anorganických iontů, jako kalcium, magnesium a fosfáty. Uchovávají také nesčetné množství buněk a růstových faktorů, které pro změnu kontrolují tkáňové vlastnosti. Velikost a tvar kostí odpovídá jejich funkci (Boskey, 2007). Podle tvaru je rozdělujeme do šesti skupin:

kosti dlouhé (např. stehenní, holenní, pažní kost), kosti krátké (zápěstní kůstky), ploché kosti (kosti lebeční klenby), kosti nepravidelné (např. obratle), kosti pneumatizované (např. kost čelní) a sezamské kosti (např. čéška) (Čihák, 2001)

V podstatě jsou kosti dynamickou tkání skládající se z minerální složky (67-70% hmotnosti sušiny), organické složky (25% hm. sušiny) a vody a jsou během života neustále remodelovány (Bell a spol., 2001).

Kost je tvořena a přetvářena aktivitou 3 typů buněk: osteoblasty, osteocyty a osteoklasty (Lerner, 2012):

1. **Osteoblasty** jsou buňky, které produkují extracelulární matrix a jsou zodpovědné za její mineralizaci (Lerner, 2012). Ještě nemineralizovaná matrix v okolí osteoblastu se nazývá osteoid (Ortner a Putschar, 1981). Organická složka osteoidu je tvořena hlavně kolagenem typu I (22% hm. sušiny) a nekolagenními proteiny (3% hm. sušiny) (Bell a spol., 2001)

2. **Osteocyty** jsou osteoblasty, které se obklopí mineralizovanou kostní matrix. Jsou málo metabolicky aktivní (nedělí se) a mají četné dendritické výběžky, pomocí kterých komunikují s okolními osteocyty a osteoblasty (Boskey, 2007). Tvoří více než 90% všech kostních buněk. (Lerner, 2012). Po resorpci tkáně buď degenerují, nebo se mohou přeměnit zpět na osteoblasty.

3. **Osteoklasty** jsou mnohobuněčné útvary vzniklé splynutím jednojaderných progenitorových buněk pocházejících z myeloidních hematopoetických kmenových buněk. Osteoklasty jsou jediné buňky v přírodě, které dokáží rozkládat mineralizovanou kostní tkáň. Jsou nezbytné pro modelaci i remodelaci kosti, udržení vápníkové homeostázy, prořezávání a pohyb zubů. (Lerner, 2012).

### 2.1.1. Vývoj kostí

Kosti mohou vznikat dvojitým způsobem, a to chondrogenní nebo desmogenní osifikací. (Ortner a Putschar, 1981).

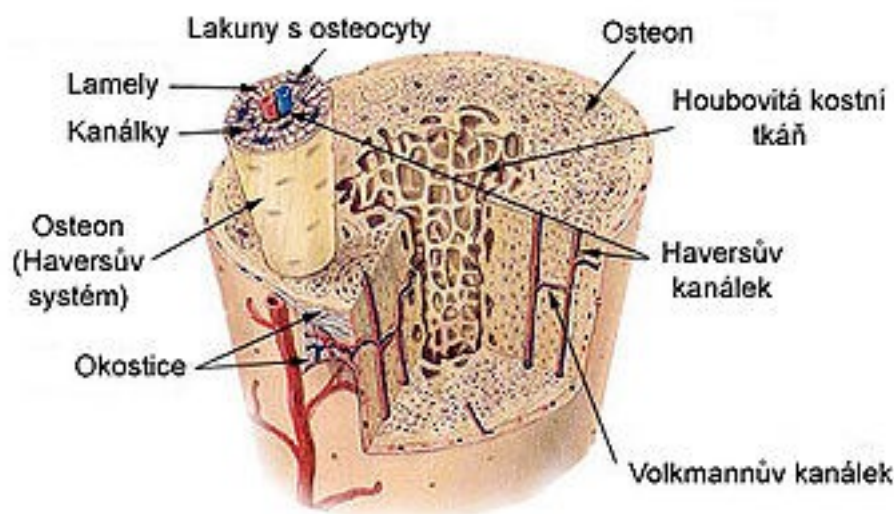
#### 2.1.1.1. Chondrogenní osifikace:

Takto vzniklé kosti, což jsou všechny kosti vyjma kostí lebeční klenby, kostí obličejové části lebky a klíční kosti, se začínají vyvíjet z chrupavčitého modelu kosti (Arnold a spol., 2007). U buněk v centrální oblasti dojde k diferenciaci na hypertrofické chondrocyty. Buňky perichondria obklopující tuto hypertrofickou oblast diferencují na osteoblasty, aby zformovaly „kostní manžetu“, prozatímní kostní kortex (Maes a spol., 2010). Hypertrofie chondrocytů, započatá uprostřed chrupavky, zapříčiňuje růst kosti do délky (Arnold a spol., 2007). Zároveň s tím nastane rozvoj cévního zásobení v těchto oblastech, který spolu s krví přináší také pericyty, osteoklasty a progenitorové buňky (Zhou a spol., 2014). Osteoblasty po stranách vlásečnic produkují a ukládají osteoid na povrch tzv. směrových trámců. Poté dochází k sekundární osifikaci – přestavbě, která probíhá za aktivní účasti osteoklastů, jejichž činností se na povrchu pláště periostální kosti tvoří resorpční dutinky (tzv. Howshipovy lakuny). Do nich vrůstají cévy s vazivem, které jsou následovány osteoblasty (Ortner a Putschar, 1981). Z nich se následně stávají osteocyty, když kolem sebe nasyntetizují mezibuněčnou hmotu, která postupně zmineralizuje (Campos a spol., 2012). Mineralizovaná kolagenová vlákna se seskupují do rovinných útvarů nazývaných lamely (3–7  $\mu\text{m}$  široké). Někdy jsou tyto vrstvy (lamely) mineralizovaných kolagenních vláken uspořádány do koncentrických vrstev (3-8 lamel) kolem centrálního kanálku a vytváří tak osteon nebo také Haversův systém (Rho a spol., 1998).

Na průřezu diafýzou dlouhých kostí tedy můžeme vidět dřevovou dutinu, která obsahuje podpěry tvořené spongiózní kostí, obklopenou válcovitou kompaktní kostí (Boskey, 2007) (tvořenou Haversovým systémem lamel) a na povrchu kryje kost okostice (periost) (viz. Obr. 1).

Osifikace probíhá od středu dlouhé kosti (diafýzy) směrem k oběma koncům (epifýzám). Mezi diafýzou a epifýzami jsou růstové chrupavky (pro růst kosti do délky), které v dospělosti také osifikují (Čihák, 2001). Místům kde se nalézaly se říká metafýzy. Epifýzy jsou tvořené spongiózní tkání (sítí kalcifikovaných trámců) obklopenou tenkou vrstvou kompakty (Houck a Siegel, 2010).

## Kompaktní a spongiosní tkáň



**Obrázek 1:** Schéma průřezu diafýzou dlouhé kosti.

<[http://www.wikiskripta.eu/images/thumb/5/5e/Lamelosn%C3%AD\\_kost\\_\(schema\).jpg/400px-Lamelosn%C3%AD\\_kost\\_\(schema\).jpg](http://www.wikiskripta.eu/images/thumb/5/5e/Lamelosn%C3%AD_kost_(schema).jpg/400px-Lamelosn%C3%AD_kost_(schema).jpg)> (Datum přístupu: 6.5.2015)

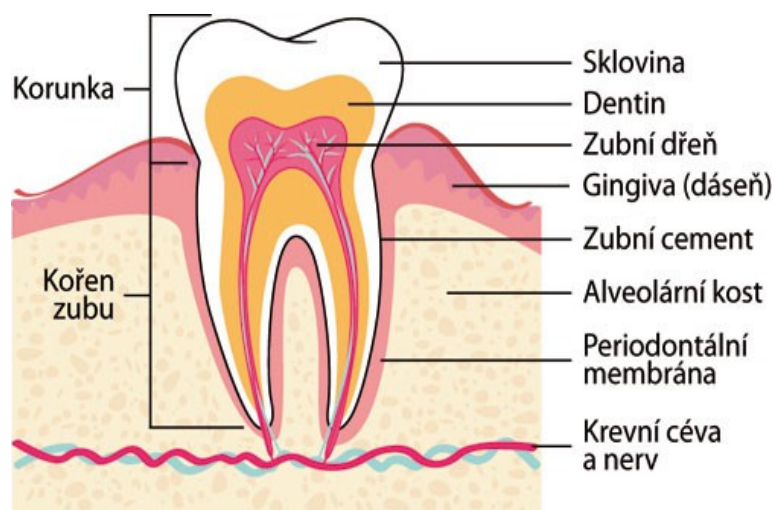
### 2.1.1.2. Desmogenní osifikace:

Uplatňuje se během embryonálního vývoje lebeční klenby, ale také na mnoha jiných místech, kde není vytvořen chrupavčitý model a nová kost je formována přímo diferenciací osteoblastů (Yasui a spol., 1997). Ty se formují do hladkých blánovitých plátů. Dochází k primární osifikaci vazivového základu, na který se ukládá kostní matrix produkovaná osteoblasty a vzniká síť trámčů. Díky činnosti osteocytů trámce mohutní a ukládáním hydroxyapatitu a kolagenních fibril mineralizují (Ortner a Putschar, 1981). Výsledkem primární osifikace je kostěná plotna tvořená sítí anorganických jehlic, krystalů a trámčů vláknité kosti. Následuje sekundární osifikace kdy oba povrchy kostěné plotny zůstávají stejné, ale střední vrstva je postupně resorbována a nahrazena spongiózní kostí – vytváří se tzv. diploe (Čihák, 2001).

Klasická dlouhá kost se skládá z diafýzy, metafýz a epifýz na koncích (Ortner a Putschar, 1981). Ploché kosti mají variabilní strukturu. Například lebka má menší podíl spongiózní tkáně zatímco páteř je tvořená hlavně jí (Boskey, 2007).

## 2.2. Lidský zub

Člověk má chrup heterodontní – skládá se ze čtyř druhů zubů (řezáků, špičáků, třenových zubů a stoliček). Dále chrup dělíme na mléčný a trvalý. Mléčný chrup je všeobecně bělejší, měkčí, menší a slabší v porovnání s trvalým (Low a spol., 2008). U zubu popisujeme tři základní části – korunka (*corona*), krček (*colum*) a kořen (*radix*). Hlavní hmotou, která tvoří objem zubu, je dentin (Nanci, 2003). Nad úrovní dásně je krytý sklovinou a vytváří tak korunku. V zubním alveolu je krytý zubním cementem a tvoří kořen. Uvnitř je dřeňová dutina vyplněná zubní dřeň, ve které vedou cévy a nervy (Liebgott, 2011) (Obr. 2).



**Obrázek 2:** Schéma stavby zubu. <<http://lidsketelo.webnode.cz/travici-soustava/>>  
(Datum přístupu: 6.5.2015)

### 2.2.1. Vývoj zubů

Vývoj zubu začíná v zubní liště vzniklé z ekto- a mezodermy. Nejprve se v zubní liště vytvoří sklovinný orgán mléčného zubu seskupením ektodermálních epiteliálních buněk – ameloblastů – do tvaru zvonečku. Část této laminy vytvoří později stejným postupem i sklovinu pro trvalý zub. Proliferující mezenchymální (mezodermální) buňky, tzv. dentální papila tvořená odontoblasty vyplní sklovinový pohárek. Kolem těchto struktur se vytvoří pochva z pojivové tkáně. Takto vznikne zárodek zubu. Následně začnou ameloblasty produkovat samotnou sklovinu. Odontoblasty začnou produkovat dentin (Ortner a Putschar, 1981; Sicher, 1966). Ameloblasty, pokrývají celý povrch během tvorby zubu a mizí při prořezávání zubu do dutiny ústní (Nanci, 2003). Odontoblasty perzistují v zubu celý život

jako tenká vrstvička pokrývající vnitřní povrch zubu. Zbytek mezodermálních buněk dentální papily začne být silně vaskularizován a vytvoří zubní dřeň. Se začátkem erupce je spojen začátek vývinu kořenového dentinu. Ten vzniká tak, že se v místě krčku přikládá k základu korunky. Přiložením buněk zevního sklovinného epitelu a ameloblastů vzniká dvojvrstevná Hertwigova epitelová kořenová pochva, která má tvar horizontální přepážky. Vlivem buněk Hertwigovy pochvy se diferencují další odontoblasty produkující predentin, který dá vzniknout kořenovému dentinu. Celý proces postupuje apikálním směrem. Rozdíl v prekurzorech a také ve složení některých komponent matrix se odráží v odlišnosti mezi korunkovým a kořenovým dentinem (Linde a Goldberg, 1993). Povrch kořene je tvořen specializovanou tkání – cementem – který zajišťuje ukotvení pro pojivové tkáně, která připojuje zub k čelisti (Ortner a Putschar, 1981; Nanci, 2003). Po rozrušení Hertwigovy pochvy se může cement usadit na kořen zubu. Nejprve jako nefibrilární, poté jako fibrilární acelulární struktura. Později, když už je zformována alespoň polovina kořene, se vytváří celulární cement (Linde a Goldberg, 1993).

## **2.2.2. Zubní tkáně**

### **2.2.2.1. Sklovina**

Sklovina (*enamelum*) je nebuněčná substance bílé až naředěné barvy, která na řezacích hranách a okluzálních plochách dosahuje tloušťky až 2,5 mm, zatímco v oblasti zubního krčku jen kolem 100  $\mu\text{m}$ . Ztrátou ameloblastů představuje sklovina neživou a necitlivou matrix, která nemůže být nahrazena nebo regenerována, pokud se poškodí. Obsahuje více než 96% anorganického minerálu ve formě apatitových krystalů a jen stopy organického materiálu (Nanci, 2003). Anorganickou složkou je hydroxyapatit, ale vnitřními substančními reakcemi může dojít k tvorbě fluorapatitu nebo hydroxyfluorapatitu, které jsou stabilnější (Minčík a spol., 2014). Vysoký obsah minerální složky podmiňuje její mikrostrukturu. Hydroxyapatitové krystaly ve sklovině jsou velmi nahuštěné. Svým způsobem uložení vytvářejí strukturu sklovinových hranolů a prizmat. Ty jsou oddělené od substance, která tyto hranoly obklopuje a je také tvořena apatitovými krystaly, ale uloženými v jiném směru (Nanci, 2003). Krystaly jsou 40-70 nm široké a 160 nm dlouhé. Druhou největší složkou je voda (1,5 – 4% hmotnosti). Vyskytuje se buď navázaná na krystalech nebo volně. Organickou složku tvoří proteiny a lipidy. Sklovinová prizmata jsou obalena tenkou vrstvou afibrilních heterogenních proteinů, nazývaných amelogeniny a enameliny (Minčík a spol., 2014). U mléčného chrupu je

sklovina mnohem tenčí, má vyšší obsah organické složky a větší krystaly hydroxyapatitu (Low a spol., 2008).

#### 2.2.2.2. Dentin

Dentin (*dentinum*, zubovina) V porovnání se sklovinou je dentin považován za elastický a měkký (Zheng a spol., 2003). Je to podpůrná struktura, která nese sklovinu a kompenzuje její křehkost (Nanci, 2003). Na rozdíl od skloviny, tvoří 20% hmotnosti dentinu organická složka (to je 30% objemu, versus 0,4% hmotnosti nebo 2% objemu organické složky u skloviny), složená hlavně z kolagenu (90%) (Goldberg a spol., 2004). Tato méně mineralizovaná tkáň poskytuje zubu pevnost potřebnou k odolání zlomům při vystavení tlaku při žvýkání (Low a spol., 2008). Obsah minerální složky (hydroxyapatitu) v dentinu je o něco vyšší než v kostech – tvoří asi 50% objemu. Zbylá procenta objemu tvoří voda. Složení dentinu je podobné jiným mineralizovaným tkáním jako jsou kosti a celulární cement (Linde a Goldberg, 1993), ale je jasné, že ačkoliv je dentin podobný kostní tkáni a měkkým pojivovým tkáním, složení jeho organické mezibuněčné hmoty je svým způsobem unikátní. Dentin postrádá fibronektin a kolagen typu III, což jsou dvě látky všudypřítomné v měkkých pojivových tkáních. Stejně jako kosti dentin obsahuje makromolekuly typické pro mineralizované tkáně jako kolagen typu I, proteoglykany, Gla-proteiny a MGP (matrix Gla-protein) (Linde a Goldberg, 1993), ale jsou dva proteiny (sialoprotein a dentinový fosfoprotein), které jsou produkovány pouze odontoblasty (MacDougall a spol., 1997). Dentinové krystaly nejsou tak velké jako sklovinové a také nejsou uspořádány do prizmat (Minčík a spol., 2014).

V kontrastu s kostí, není dentin běžně remodelován; neprobíhají v něm žádné resorpční procesy. Jediná příčina, kdy je možné pozorovat resorpci dentinu, je vstřebávání kořene mléčného zubu. Další z odlišností dentinu a kostí je, že dentin se nepodílí na regulaci vápníkové homeostázy v organismu (Linde a Goldberg, 1993).

Typy dentinu:

**Primární dentin** představuje hlavní část dentinové hmoty a je produkován ve velké míře při formování zubu.

Jakmile je zformován kořen natolik, že umožní zubu stát se funkčním, odontoblasty pokračují ve formování **sekundárního dentinu** na dřevné straně primárního dentinu, ovšem v mnohem menší míře.

Jako odpověď na vnější stimuly (jako chemické podráždění, zubní kazy, obnovující

procedury, opotřebení nebo jiné traumata) se může zformovat **terciální dentin**.

Primární dentin je obvykle uváděn jako cirkumpulpální dentin. Ten může být ještě dělen na intertubulární a peritubulární dentin.

Dentin je vysoce propustná tkáň jak pro tekutiny a pohyb molekul, tak pro mikrobiální poškození, díky početným dentinovým kanálkům (Linde a Goldberg, 1993). Ty vychází ze zubní dřene a prostupují celou jeho hmotou. Obsahují cytoplasmatické výběžky odontoblastů, které ho formovaly a vyživují ho (Nanci, 2003). Kanálky mají 1-3 $\mu$ m v průměru a jsou esovitého tvaru (Linde a Goldberg, 1993).

Dentin je bezcévnatá tkáň (Nanci, 2003). Tepénky vstupující skrz kořenovou špičku prostupují centrální dření směrem ke korunce a dělí se na terminální tepénky což vede k vytvoření kapilární sítě pod vrstvou odontoblastů (Linde a Goldberg, 1993).

#### **2.2.2.3. Zubní dřeň**

Zubní dřeň (*pulpa dentis*) vyplňuje dřeňovou dutinu (*cavum pulpae*) (Minčík a spol., 2014). Je to měkká pojivová tkáň, jejíž hlavní funkcí je produkce dentinu a udržování jeho biologické a fyziologické aktivity (Barachini a spol., 2014). Buňky tvořící zubní dřeň jsou hlavně fibroblasty, imunitní buňky a tzv. rezervní buňky (nediferencované, pluripotentní buňky) (Minčík a spol., 2014). Mezibuněčnou hmotu tvoří síťovité uspořádání kolagenních fibril a retikulárních vláken a amorfní hmota. Ta je tvořena hlavně kyselinou hyaluronovou a kyselinou chondroitinsírovou; je to bílkovinovo-sacharidový komplex schopný vázat vodu (Minčík a spol., 2014). Hranici mezi zubní dřeni a dentinem vytváří odontoblasty, které jsou navzájem spojeny četnými dezmosomy. Každý z nich vysílá směrem k vnějšímu povrchu zuboviny jeden cytoplazmatický výběžek (Tomesovo vlákno), který je uložen v dentinovém kanálku. Odontoblasty v dřeňové dutině jsou větší než v kořenovém kanálku. Zubní dřeň a dentin jsou vývojově i funkčně propojené. Tato jednotnost vyplývá i z funkcí dřene: 1) formuje a vytváří dentin, který ji pak obklopuje, 2) vyživuje bezcévnatý dentin, 3) chrání dentin tím, že obsahuje nervy a tím mu dodává senzitivitu, 4) opravuje – je schopná tvořit nový dentin, pokud je to potřeba (Nanci, 2003).

#### **2.2.2.4. Zubní cement**

Zubní cement (*cementum*) pokrývá kořeny zubů a je pevně spojen s kořenovým dentinem (Nanci, 2003). Je kostní tkáň vláknitého typu na povrchu kořenu zubu, která ale na



rozdíl od běžné kostní tkáně nemá schopnost remodelace, tzn. že opotřebovaný a odumřelý cement na kořeni zůstává, neresorbuje se a během života je nahrazován novými vrstvami vitální tkáně. Hraje rozhodující roli při ochraně kořene před resorpčními procesy (Minčík a spol., 2014). Buňky tvořící cement se nazývají cementoblasty (Nanci, 2003). Obsahuje přibližně 50 % anorganických solí a 50 % organické složky a vody (Minčík a spol., 2014). Skládá z cementocytů a mezibuněčné hmoty (cementová matrix), kterou tvoří kolagenní vlákna a zvápenatělá amorfni substance. Jsou známy dva typy cementu: buněčný a nebuněčný. Cement, který je nejbliž dentinu a který kryje oblast krčku je nebuněčný, někdy nazýván primární cement. Jeho funkcí je ukotvení periodontálních ligament (PDL). Dolní (apikální) část kořene je krytá buněčným, nebo také sekundárním, cementem. V tomto případě jsou cementoblasty usazeny v lakunách uvnitř jejich vlastní matrix, stejně jako osteocyty v kostech. A stejně tak se z nich stanou cementocyty. Celulární cement má adaptivní funkci – udržuje zub na svém místě a navíc má schopnost opravovat resorpční poškození zubu. PDL jsou tvořeny kolagenními vlákny. Připojují zuby k čelisti a dodávají tomuto spojení dostatečnou pevnost, aby odolalo tlakům při žvýkání (Bosshardt a Selvig, 1997; Nanci, 2003).

### **3. UCHOVÁNÍ DNA V KOSTECH A ZUBECH**

Kosti a zuby se skládají z anorganických kalcium-fosfátových minerálů, zastoupených hydroxyapatitem, a z proteinů mezibuněčné hmoty.

#### **3.1. Kolagen**

Hlavní organickou složkou kostí a zubů je kolagen. Je to nerozpustný fibrilární protein a je jedním z nejvíce zastoupených proteinů v těle. Z více než 27 typů kolagenu je kolagen *typu I* nejvíce rozšířený a je spojený s kostmi, dentinem, cementem, kůží, vazy a šlachami (Boskey, 2007). Je také nejstabilnějším proteinem, který je schopný přetrvat po miliony let v mineralizovaných tkáních (Buckley a Wadsworth, 2014). Kolagenní vlákna jsou složená z kolagenních fibril. Ty jsou tvořené molekulami tropokolagenu a vmezeřenými krystaly hydroxyapatitu (Rho a spol., 1998).

### 3.2. Hydroxyapatit

Anorganickou složkou zubů a kostí je hydroxyapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ ), který obsahuje substituce různých jiných iontů (Nanci, 2003). Fyzikální a chemické vlastnosti těchto „bioapatitových“ krystalů jsou odlišné od geologických hydroxyapatitů. Je to dáno způsobem jejich vzniku. Tyto jedinečné vlastnosti jsou potřebné pro naplnění biologických funkcí kostí a zubů. Zvláště u kostí a dentinu, se liší v tom, že mají vysoce nepravidelnou, nestechiometrickou strukturu s početnými bodovými nedostatky a uhličitanovými substitucemi. Dále mají menší velikost krystalů, značný úbytek OH skupin a jsou u nich přítomná volná místa v krystalových mřížkách. Malá velikost krystalů znamená, že velké procento atomů je na povrchu krystalu, poskytující tak velkou specifickou povrchovou oblast pro adsorpci iontů, proteinů a podobně (Boskey, 2007). Hydroxyapatit patří do 5. třídy Mohsovy stupnice tvrdosti (Rabenold a Pearson, 2014). Mnoho biologických materiálů má hierarchicky uspořádanou strukturu (viz Tab. 1). Znamená to, že jsou sestaveny od nano- po makro-strukturu, někdy i navzájem velmi podobným způsobem (Bechtle a spol., 2010).

Materiál	Obsah minerální složky [obj%]	Struktura	Stupeň hierarchie
Sklovina	85	Hydroxyapatitová nano-vlákna (1) jsou spojena do mikrovláken (hranoly;2), které jsou uspořádány do síťovité struktury (3)	3
Dentin	45	Kolagenová vlákna jsou vyztužená hydroxyapatitovými nano-destičkami (1) a vytváří síťovitou strukturu (2) okolo dentinových kanálků, které mají válcovitý tvar a jsou obklopené vysoce mineralizovanou manžetou (3)	3
Kompaktní kost	40	Kolagenová vlákna jsou vyztužená hydroxyapatitovými nano-destičkami (1) jsou seskupená do vláken (2), které jsou uspořádané do lamelárních vrstev (3), které jsou uspořádány koncentricky do Haversova systému (4), který je orientován podél osy kosti (5)	5

**Tabulka 1:** Přehled vybraných biologických materiálů s popisem jejich hierarchické struktury.

V závorce je uveden vždy příslušný stupeň hierarchie (Bechtle a spol., 2010) (upraveno)

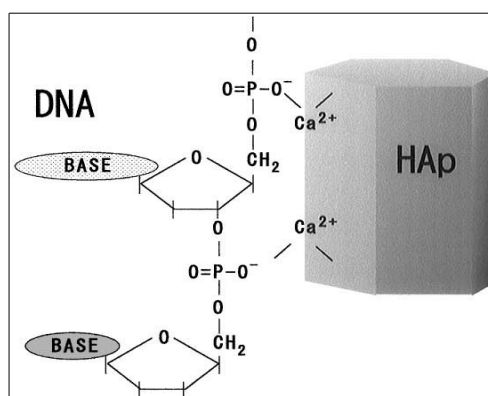
Právě tyto dvě látky, kolagen a hydroxyapatit, hrají významnou roli v uchování DNA ve vzorku. Několik autorů se zabývalo právě otázkou mechanismu uchování a ochrany DNA proti vlivům prostředí po tak dlouhou dobu.

Götherström a spol. (2002) ve svém experimentu popisují důležitost hydroxyapatitu a kolagenu pro zachování DNA v kostních tkáních. Porovnávali současné a historické vzorky

(jednu sadu současných experimentálně degradovaných hovězích kostí a druhou sadu historických koňských kostí a zubů) a také to, jestli byly vystaveny vodě či nikoliv. Měřili krystalinitu, přítomnost DNA a množství extrahovaného kolagenu. Výsledky potvrdily, že přítomnost DNA je velmi silně spojena s krystalinitou hydroxyapatitu a s objemem kolagenu. Což potvrzuje hypotézu, že hydroxyapatit je zásadní pro uchování DNA v kostních tkáních. Jak se předpokládalo, krystalinita a obsah kolagenu byl ovlivněn přítomností vody. Vzorky ze suchých podmínek měly větší podíl kolagenu, větší výtěžky DNA a méně mineralogických změn.

Další z experimentů provedli Grunenwald a spol. (2014). Ve snaze osvětlit uchování DNA během času v kosterních pozůstatcích z chemicko-fyzikálního hlediska, studovali adsorpci a desorpci DNA na dobře charakterizovaný syntetický apatit napodobující kostní a dentinové biominerály. Svým experimentem rovněž potvrdili, že vlákna DNA mohou interagovat s apatity nacházejícími se v pevných lidských tkáních, což významně omezuje jejich degradaci s časem a tyto interakce jsou poměrně silné.

Tyto vlastnosti vyplývají ze struktur DNA a hydroxyapatitu (HAP). Základní prvek struktury DNA je uložení bází uvnitř dvoušroubovice, zatímco cukr-fosfátová páteř je zvenku. Jelikož jsou tyto fosfátové zbytky negativně nabitě, může vznikat silná afinita mezi nimi a vápníkovými ionty hydroxyapatitu a může tak být důvodem navázání DNA na HAP (viz Obr. 3). HAP má v podstatě značnou schopnost lehce adsorbovat různé ionty, organické molekuly a polymery (Okazaki a spol., 2001).



**Obrázek.3:** Schéma navázání DNA na hydroxyapatit (Okazaki a spol., 2001)

Autoři těchto a mnohých jiných prací se tedy shodují, že zatímco na makrostrukturní úrovni je důležitým krokem odstranění mikrobů a jiných kontaminant, na úrovni ultrastruktury je důležitá adsorpce DNA na hydroxyapatit a/nebo navázání DNA na kolagen I. typu, což může DNA stabilizovat (Campos a spol., 2012; Geigl, 2002; Nielsen-Marsh a spol.,

2000; Okazaki a spol. 2001; Van Klinken a Hedges, 1995). Tyto dva navržené mechanismy uchování DNA mají velký vliv na to, jak je DNA získávána. Většina postupů však zahrnuje získání DNA z minerální fáze (Campos a spol., 2012).

## **4. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ZACHOVANOST aDNA**

Ačkoliv je DNA nositelkou genetické informace, její chemická stabilita je limitovaná. Všechny biologické makromolekuly podléhají spontánnímu rozpadu. Ten je pravděpodobně hlavním faktorem při mutagenезi, karcinogenезi a stárnutí a také limitující při získávání DNA z fosilních materiálů (Lindahl, 1993). Při normálních tafonomických podmínkách jsou organismy po smrti rychle a účinně rozkládány (Geigl, 2002). Za určitých podmínek, například, když se tělo po smrti rychle vysuší, nebo se DNA absorbuje na minerální matrix, může uniknout enzymatické a bakteriální degradaci. I přes to ale na DNA působí různé chemické procesy. Mnoho z těchto procesů je stejných nebo podobných těm, které působí i v živé buňce. Ovšem už bez opravných pochodů, takže se poškození kumulují, až DNA ztratí svou soudržnost a rozpadne se na malé úseky, většinou mezi 100 až 500 bp. Zároveň s tím dojde k nenávratné ztrátě informací uložených v sekvencích nukleotidů (Pääbo a spol., 2004). Bollongino a spol. (2008) provedli výzkum na 291 dobytčích ostatcích z Evropy, Blízkého východu, Severní Afriky, ze kterého jasně vyplynulo, že zachovalost DNA je velmi ovlivněna geografickými a klimatickými podmínkami.

### **4.1. Oxidativní poškození:**

Sluneční svit (jeho UV složka) zvyšuje počet volných radikálů (Bollongino a spol., 2008). Vystavení UV záření způsobuje rozsáhlé poškození DNA. Molekulární kyslík nemá na DNA vliv, ale jeho radikálová forma útočí na dusíkaté báze (Cano, 1996). Oxidace makromolekul se jeví jako jeden z největších zdrojů modifikací (Rogan a Salvo, 1990). Zatímco dvouvlákno nabízí jistou ochranu bází před útokem volných radikálů, 3-4' uhlíková vazba deoxyribózy je citlivá na oxidaci, což vede ke štěpení řetězce (Poinar, 2003).

### **4.2. Hydrolytické poškození:**

Ačkoliv jsou fosfodiesterové vazby relativně stabilní, glykosidické vazby mezi bázemi

a cukry jsou hlavním cílovým místem hydrolytického rozkladu. To vede ke ztrátě bází, většinou depurinaci, a krátce na to k rozpadu fosfodiesterové vazby jednořetězce v místě chybějící báze v průběhu vysychání (Poinar, 2003). Záměny bází během hydrolytické deaminace (guanin se mění na xanthin, cytosin se mění na uracil nebo jeho deriváty) a depurinace (ostranění guaninu a adeninu z cukr-fosfátové páteře) narušují informační obsah molekuly (Cano, 1996).

Kromě toho, že přítomnost vody vede k hydrolytickým a oxidativním poškozením DNA, ovlivňuje degradaci tím, že rozkládá kostní apatit a umožňuje růst mikroorganismů. Mikroorganismy (bakterie a houby) metabolizují organické složky kosti, jako je kolagen a DNA (Bollongino a spol., 2008).

Stabilita DNA ve fyziologických roztocích naznačuje, že by DNA měla být degradována v průběhu 50 000 až 100 000 let. Geigl (2002) testoval množství paleogeneticky určených kostí z různých archeologických nalezišť na přítomnost aDNA jak v rozpustné tak nerozpustné frakci. Stáří těchto kostí bylo určeno na 60 až 5000 let. Asi ve 40% z nich detekoval obě frakce. Ve většině případů čím byla kost starší, tím menší byl obsah aDNA v rozpustné frakci. V mnohem starších kostech (200 000-500 000 let) nebyla detekována vůbec žádná DNA. Z toho vyplývá: aby byla DNA zachována během dlouhého časového období, je nutné, aby byla uchována za velmi specifických chemicko-fyzikálních podmínek – v „molekulárních sklípcích“, kde není vystavena vodným roztokům.

### **4.3. Teplota:**

Teplota prostředí může ovlivňovat zchovalost pevných tkání a DNA více než čas (Poinar, 2003). Zvýšení teploty ještě více přispívá k chemickým změnám a proliferaci mikroorganismů. Zvláště v teplých klimatech je zchovalost vzorků velice špatná a tyto vzorky mají velký sklon k další degradaci a kontaminaci během a po vyzvednutí (Bollongino, 2008). Vzorky z chladných a suchých míst mají tendenci uchovat makromolekuly déle díky pomalejším rychlostem reakcí (Poinar, 2003).

### **4.4. pH:**

Další výrazný vliv na dlouhodobé uchování DNA má pH prostředí. Kyselé prostředí zvyšuje degradaci těchto molekul tím, že  $H^+$  ionty atakují OH skupiny na cukerných složkách a dusíkatých bázích, což vede k rozpadu řetězce (Cano, 1996). Dále kyselé půdy rozkládají kalciumfosfát a tím ničí kostní apatit. Zásadité podmínky (např. vápenec nebo krasové útvary) tlumí degradativní efekt kyselin a stabilizují apatit. Na druhou stranu se při velmi zásaditých

podmínkách a přítomnosti CO<sub>2</sub> vyplavuje hydrogenuhličitan, což vede k degradaci apatitu. Nejstabilnější forma hydroxyapatitu byla pozorována při pH 7,8 (Nielsen-Marsh a Hedges, 2000a; Nielsen-Marsh a Hedges, 2000b). Bollongino a spol. (2008) experimentálně ověřili korelaci mezi úspěchem amplifikace a typem půdy. U vzorků z vápenitých půd byla úspěšnost více než 80%. Naopak z míst s nízkým pH se nezachovala téměř žádná DNA.

## 5. KONTAMINACE

Kosti, zuby a vlasy jsou často jediným fyzickým záznamem lidské nebo zvířecí existence na archeologickém nalezišti; jsou proto velmi často využívány jako zdroje aDNA pro vědecké analýzy (Gilbert a spol., 2005, Pilli a spol., 2013). Naneštěstí, DNA extrahovaná z těchto vzorků, již tak v omezeném množství a silně degradovaná, je vysoce náchylná na exogenní kontaminaci, čímž může ohrozit věrohodnost aDNA výzkumů (Pilli a spol., 2013). V pravém smyslu slova termíny „kontaminantní DNA“ a „kontaminace“ v souvislosti s výzkumem aDNA neodpovídají příměsím chemických nečistot ve vzorku. Kontaminantní DNA odpovídá DNA, která je identická nebo podobná cílové aDNA a která může být spolu s ní amplifikována během PCR. Například DNA pocházející z hub, plísní a bakterií obsažená ve vzorku by neměla být považována za kontaminantní, pokud je cílem získání lidské aDNA (Yang a Watt, 2004). Kontaminace pramenící z manipulace se vzorky historických kalcifikovaných tkání je málo probádaná, ačkoliv je to jeden z největších problémů, který má vliv na spolehlivost všech výzkumů aDNA (Sampietro a spol., 2006). Mohou totiž velmi lehce způsobit zkreslení výsledků (Yang a Watt, 2004). Velikost rizika kontaminace v analýzách aDNA může být dobře ilustrováno následujícím příkladem: zatímco je v jednom vzorku obsaženo jen několik stovek až tisíc kopií mitochondriální DNA (mtDNA), jediný lidský dotyk může na vzorku zanechat mnoho kožních buněk, z nichž každá obsahuje 1000 kopií mtDNA. V takovém případě lidská kontaminantní mtDNA lehce „přebije“ autentickou aDNA; během PCR se s větším úspěchem naamplifikuje právě ona kontaminantní DNA, což povede k nepřesným výsledkům (Yang a Watt, 2004).

V podstatě jakýkoliv kontakt s vnějším prostředím může vnést lidské kontaminantní molekuly do vzorku, ale různé zdroje vykazují rozdílnou míru nebezpečí:

(i) Antropologické vyšetření vzorku: zjevně velmi intenzivní kontakt mezi dotyčnou osobou a kostrou.

(ii) Vrtání a odebrání vzorku z kosti nebo zubu: doposud uzavřená a nekontaminovaná oblast je vystavena kontaminacím, ačkoliv jim byly uchráněny při pobytu v zemi.

(iii) Vybavení a chemikálie v laboratoři: jsou zvláště nebezpečné, protože mohou být v kontaktu s celým vzorkem respektive s extrahovanou DNA v roztoku.

(iv) Paleogenetik: tento zřejmý zdroj kontaminací se může zdát méně častý než ve skutečnosti je. Proto jsou užívány slepé kontroly ke sledování kontaminant pocházejících od výzkumného pracovníka. A ačkoliv jsou tyto slepé kontroly negativní, může i tak dojít ke kontaminaci buňkami rozšířenými v laboratorním prostředí během pozdější fáze experimentu.

(v) Celkové prostředí: i když bylo možné zajistit ochranu vůči většině kontaminačních zdrojů, je stále nemalé množství kontaminací rozšířených ve všech prostředích. I ve velmi specializovaných zařízeních jsou denně produkovány stovky až tisíce buněk (např. s každým novým vzorkem, nástrojem, chemikálií nebo proudem vzduchu). A i přesto, že anti-kontaminační postupy jsou schopné mechanicky i chemicky odstranit většinu nežádoucích molekul, mohou některé z nich těmto postupům uniknout, rozpadnout se na menší části, akumulovat se a eventuálně degradovat na úroveň, na které se chemicky podobají aDNA. A díky nevyhnutelnému proudění vzduchu při pohybu osob v laboratoři mohou být tyto degradované molekuly přeneseny do zkumavek či přímo na vzorek.

(vi) Předěšlé produkty amplifikace: na laboratorním vybavení mohou ulpět molekuly aDNA z předchozích amplifikačních pokusů (buď produkty PCR archaické DNA, sekvenace či klonování nebo amplifikované aDNA knihovny). V závislosti na počtu přenesených molekul je tento typ kontaminace buď hned vidět na slepých kontrolách, nebo se chová jako buněčná kontaminace a objevuje se pouze sporadicky.

Většinou dochází ke kontaminaci sekvencí aDNA lidskou DNA a to kombinací zdrojů uvedených výše (Kirsanow a Burger, 2011).

Badatelé se často zaměřovali na problémy kontaminace v laboratoři a bylo navrženo mnoho různých pravidel, která by měla pomoci v práci s těmito vzorky (Sampietro a spol., 2006). Například Kirsanow a Burger (2011) navrhuje toto:

(i) Kostní a zubní vzorky, které ještě nebyly podrobeny dekontaminaci by měly být zpracovávány v jiné místnosti, než kde probíhá další fáze postupu – rozměňování dekontaminovaných vzorků na prášek.

(ii) Proces rozměňování/broušení, při kterém se do vzduchu dostává spousta kostního prachu, by měl být fyzicky oddělen od místa extrakce DNA.

(iii) Značení, PCR a příprava knihovny se mohou teoreticky odehrávat ve stejné laboratoři, ale jeden krok od druhého by měl být co nejdál, aby se minimalizoval efekt víření vzduchu.

Klasicky se používají čtyři nejrozšířenější dekontaminační metody: mechanické čištění

pomocí vody a mýdla, chemická degradace použitím bělicího činidla (chlornan sodný), UV světlo a komerčně dostupné DNA degradující roztoky jako DNA-ExitusPlus™ (AppliChem GmbH).

Ovšem studie Sampietrové a spol. (2006) potvrdila, že zubní vzorky jsou nejvíce náchylné ke kontaminaci v prvních fázích odkrývání a vyzvedávání ze země a při mytí. A proto nejlepší způsob, jak se kontaminaci vyhnout, je začít s preventivními opatřeními co nejdřív, ideálně už při shromažďování a preparaci vzorků na archeologickém nalezišti. (Yang a Watt, 2004).

Kontaminanty mohou být přítomné v různých tkáních (např. v mezibuněčném prostoru) a mohou být vystaveny degradačním vlivům během uchování a odběru vzorku, což může znemožnit využití známek fragmentace k rozeznání kontaminant od cílové aDNA (Adler a spol., 2010, Malmstrom a spol., 2007). Kontaminanty z povrchu vzorku mohou být odstraněny v laboratoři, ale ty, které jsou zaneseny dovnitř, budou vždy extrahovány společně s aDNA (Bollongino a spol., 2008).

Někteří autoři předpokládají, že lidský zub může být méně náchylný kontaminaci a/nebo jednodušeji dekontaminován než kosti díky jeho histologické stavbě (Oota a spol., 1995; Drancourt a spol., 1998, Gilbert a spol., 2005).

## **5.1. Vliv kontaminací na amplifikaci**

Ačkoliv jsou nukleové kyseliny často chemicky modifikovány a značně fragmentární, je stále možné získat sekvence aDNA, u kterých nedošlo ke ztrátě všech informací (Rogan a Salvo, 1990).

Téměř všechny dosud publikované studie aDNA byly uskutečněny pomocí velmi senzitivní enzymatické PCR amplifikace, která byla původně navržena pro amplifikaci malých objemů DNA ze současných biologických vzorků (Geigl, 2002). PCR byla upravena tak, aby překonala inhibiční vlastnosti poškozené DNA. Což umožňuje analyzovat archaickou (či „vyhynulou“) DNA a to jak mitochondriální, tak jadernou (Rogan a Salvo, 1990). Extrémně citlivá PCR, které otvírá dveře k přímé analýze aDNA, ovšem skýtá i jistá úskalí. To, že je během této reakce možné amplifikovat tak malý objem DNA, jako je třeba i jedna molekula, znamená, že i minimální obsah kontaminantní DNA (z bakterií, hub, lidské kůže) může být amplifikován. Navíc kontaminantní molekuly současné DNA by se naamplifikovaly v mnohem větší míře než aDNA, kvůli její vysoké míře degradace (Cano, 1996).

Šance na úspěšnou amplifikaci se tím zvětší, čím více kopií dané sekvence bude v



každé z buněk. Často jsou využívány sekvence jaderné DNA z ribozomů (18s a 28s rDNA). Mitochondriální DNA sekvence jsou také velmi dobrými kandidáty pro analýzy, jelikož nejen že může být až několik tisíc mitochondrií v buňce, ale u mnohých druhů byl mitochondriální genom osekvenován a uložen do data banky, takže je možné jej využít pro různé komparativní studie. Všechny tyto informace nám mohou dopomoci k lepšímu porozumění fyziologii vyhynulých organismů a poskytnout nám obraz genetických změn během času a mechanismu „evoluce“ (Cano, 1996). Analýza DNA vyhynulých druhů zvířat a rostlin z muzejních sbírek a archeologických nálezů může umožnit přímé porovnání s současnými příbuznými druhy díky DNA sekvenování. Tento přístup je velmi přínosný pro studium druhů (Lindahl, 1993).

## **6. VÝHODY ZUBNÍ TKÁNĚ OPROTI KOSTNÍ**

Většina studií archaické DNA lidského druhu používá zuby a kosti jako zdroj genetického materiálu (Gilbert a spol., 2005). První z testů, aplikovaných na materiál určený k paleogenetické analýze, jsou zaměřené na stav biomateriálu, ze kterého má být aDNA extrahována. Toto prověřování je prováděno z toho důvodu, že stupeň rozkladu biomateriálu je silně spjat s mírou zachování aDNA. A to proto, že jsou tyto molekuly fyzikálně i chemicky asociaci s proteinovou a minerální mezibuněčnou hmotou (Götherström a spol., 2002). Na výtěžek aDNA nemá ani tak vliv čas, ale zchovalost tkání (Hagelberg a spol., 1991). Pro složité tkáně jako jsou lidské kosti a zuby tyto počáteční testy odhadnou míru zachování jak proteinů tak minerálních složek skrze rozličné chemické, biochemické, histologické a morfologické analýzy. Zchovalost minerální fáze v kostech a zubech může být odhadnuta měřením pórovitosti (pomocí pórometrie, měřením sorpce vody nebo histologickým zkoumáním), analýzou prvkového složení a krystalinity bioapatitu (Gilbert a spol., 2005; Lee-Thorp a Sponheimer, 2003; Hiller a spol., 2004; Wright a Schwarcz, 1996).

Vlivy diagenese na kostní a zubní vzorky jsou podobné ale ne stejné: zuby se jeví více rezistentní vůči některým typům kontaminací a degradace než kost. Nejspíš díky mnohem menší přirozené pórovitosti sklovinového bioapatitu (Gilbert a spol., 2006, 2005; Sampietro a spol., 2006).

## 6.1. Pórovitost kostí

Pórovitost jako součást mikrostruktury zdravé lidské kosti je zapříčiněna početnými kanálky jako jsou Haversovy a Volkmanovy kanálky s průměrem kolem 50 $\mu$ m, osteocytické dutiny (zhruba elipsovitě s několika mikrometry v průměru) a kanálky (*canaliculi*) (průměr asi 200 $\mu$ m) (Mansilla a spol., 2014). Minimální celková pórovitost kosti *in vivo* je alespoň 8% celkového objemu kosti (Turner-Walker a spol., 2002) a tato pórovitost se s degradací zvyšuje. Proto není nic překvapujícího, že se vodou nesená DNA (obsažená v kožních buňkách v potu/ve vodě použité k mytí) může dostat hluboko do kosti (Gilbert a spol., 2006). Voda také přispívá k zvýšenému vyplavování minerálů a degradaci kolagenu (Nielsen-Marsh a Hedges, 1999). Tyto tendence jsou tím větší, čím více je kost degradovaná v důsledku působení vnějšího prostředí: se zvětšujícími se póry a dírami se kost stává více a více náchylná na kontaminaci. Takže špatně zachovalé kosti vykazují pokles v zachování biomolekul a zvýšenou míru kontaminace. Kvalita vzorku se zhoršuje ještě víc, pokud je kost omývána během či po vyzvednutí (Gilbert a spol., 2005).

Zvýšená porozita u archeologických kostí může mít dvě příčiny. Ztrátou kolagenu se vytváří malé póry, zatímco velké póry jsou jasnou známkou mikrobiálního napadení (Turner-Walker a spol., 2002), které, v závislosti na rozsahu, může úplně změnit hustotu a mikrostrukturu tkáně (Bell a spol., 2001). Mechanismus těchto změn je podobný jako u zubního kazu. Do kosti vniknou různé bakterie skrze Haversovy kanálky a začnou produkovat organické kyseliny, proteázy, enzymy a chelatační činidla, které způsobí zároveň rozpuštění a opětovné vysrážení minerálů, spojené s částečnou či úplnou degradací (mimo jiné) kolagenu (Balzer a spol., 1997; Bell a spol., 1996, 2001; Blake a spol., 1998; Grupe, 1995; Schoeninger a spol., 1989). Během těchto procesů mineralizuje bakterie sama sebe, stejně jako u tvorby zubního kamene, takže tím výrazně přispívá ke kontaminaci jak organické, tak anorganické (Bell a spol., 2001).

## 6.2. Odolnost zubů vůči kontaminaci

Zub je nejvíce ceněným zdrojem DNA, jelikož je to uzavřená schránka, chránící DNA před extrémními vlivy prostředí (až na vstup přes kořenovou špičku) (Alakoç a Aka, 2009). Chemicko-fyzikální vlastnosti skloviny velmi připomínají vlastnosti stechiometrického hydroxyapatitu  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  jak v krystalografické struktuře, tak ve složení (Grunenwald a spol., 2014). Tvrdost skloviny se pohybuje mezi 250 až 390 KHN (Knoop

hardness numbers) (Minčík a spol., 2014). Sklovina činí zuby odolné vůči vlhkosti, vysoké teplotě a vůči bakteriím a houbám (Malaver a Yunis, 2003) a také vytváří přirozenou bariéru vůči cizorodé DNA. Navíc se zdá, že DNA získaná ze zubů postrádá některé inhibitory enzymatické amplifikace. Díky tomu, že můžeme z povrchu zubu odstranit kontaminantní DNA, je cílová aDNA amplifikovatelná v mnohem větší míře (Woodward a spol., 1994). Naproti tomu jsou ovšem zuby prostoupené tubulárními dentinovými kanálky (Currey, 2002), které poskytují možnou cestu pro vniknutí kontaminace do zubu díky potu z rukou nebo při mytí zubního kořene (Gilbert a spol., 2005).

Ricaud a spol. (2005) extrahovali aDNA z kostí a zubů 10ti koster z jižní Francie (400-1000 n.l.). Byla analyzována pomocí krátkých autozomálních tandemových repeticí (STRs). aDNA prezentovaná v těchto vzorcích jevila velké známky degradace, nicméně byla lépe zachována v zubech než v kostech. Z každé kostry použili 4 zuby (2 vícekořenné a 2 jednokořenné) a jednu kost (femur). Vybrané zuby byly velmi dobře zachovalé, bez kazů a stále fixované v čelisti. Z kostí se podařilo vyextrahovat jen zanedbatelné množství, ze zubů (zubní dřevě) získali alespoň malé množství aDNA. Vlivy okolního prostředí vyvolávající destruktivní procesy jsou významnější u kostní DNA než u zubní. Tvrdé tkáně zubů jsou nejvíce mineralizované tkáně těla, a tak vytvářejí přirozenou bariéru vůči fyzikálním i chemickým procesům včetně rozkladu zubní dřevě. Proto i zde byla aDNA lépe zachována než kosti.

Touto problematikou se zabývali také Gilbert a spol. (2006), kteří ve svém pokusu použili odpovídající vzorky zub-femur. Ty byly na 10 minut ponořeny do roztoku s komerčně dostupnou  $\phi$ X174 DNA (o jedné z koncentrací  $10^{-9}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-18}$ ,  $10^{-21}$  g/l). Poté byly vysušeny při pokojové teplotě a následně dekontaminovány běžným postupem. Poté byla pomocí metody PCR zjišťována reziduální kontaminantní  $\phi$ X174 DNA. Z výsledků vyplynulo, že pro kontaminaci zubů bylo potřeba koncentrací  $\phi$ X174 DNA alespoň  $10^{-9}$  (či větší) na rozdíl od kostních vzorků, kterým pro účinnou kontaminaci stačila koncentrace  $10^{-12}$ . Navzdory tomu, že byl tento pokus proveden na malém počtu vzorků, výsledky potvrzují hypotézu, že lidský zub je odolnější vůči kontaminaci DNA než kost nebo je jednodušeji dekontaminovatelný.

Na tuto práci navazují Gilbert a spol. (2006) dalším pokusem. Pro vytvoření modelu reálné situace, při které jsou vzorky kontaminovány, zkoumali roli zacházení se vzorky bez ochranných pomůcek při manipulaci a mytí vzorků. Bylo využito 27 párů zubů z různých koster ze stejného archeologického naleziště. Jeden zub z každého páru byl dekontaminován, a poté z nich byla DNA extrahována, amplifikována, klonována a osekvenována. S druhým zubem z každého páru bylo manipulováno bez rukavic – po dobu jedné minuty byl v

intenzivním kontaktu s dlaněmi dobrovolníka (se známým mtDNA haplotypem), a poté byl rovněž jednu minutu očišťován sterilní vodou (bez obsahu jakékoliv DNA), takže došlo ke kontaktu lidské kůže, vody a vzorku. Výsledkem bylo, že v žádném z případů nebyly pozorovány sekvence DNA pocházející od osoby, jenž byla v přímém kontaktu se vzorky. Navíc pozdější studie na deseti párech zubů ze 17. stol., které byly podrobeny stejnému pokusu v jiné laboratoři vykazovaly stejné výsledky (Gilbert a spol., 2006).

K podobným výsledkům dospěli například i Pilli a spol. (2013), kteří rovněž experimentálně potvrdili hypotézu, že zuby jsou méně náchylné ke kontaminaci než jiné části kostry.

Ačkoliv tyto výsledky ukazují, že kost je náchylnější na kontaminaci vodou nesenou DNA než zub, obě tkáně mohou být relativně lehce kontaminovány a těžko dekontaminovány použitím bělicího činidla a/nebo expozicí UV záření (Gilbert a spol., 2006).

Při výběru vzorků, by měly být vybrány ty, které jsou morfologicky dobře zachovalé, a to v následujícím pořadí: zuby, kompaktní kosti a nakonec spongiózní kosti. Kompaktní kost je méně pórovitá, a proto také méně náchylná ke kontaminaci (Yang a Watt, 2004). Diafýzy dlouhých kostí jsou preferovány před pórovitými spongiózními kostmi jako jsou obratle, lopatky, pánev nebo části lebky. Kosti by měly mít co nejméně prasklinek nebo známek mikrobiálního napadení (viditelných jako malé černé dírky nebo čárky). Zvláště u lidských vzorků jsou užitečné zuby s dobře zachovalým kořenem. Spálený nebo ožehnutý materiál není vyhovující (Bollongino a spol., 2008).

## **7. RŮZNÉ ZUBNÍ TKÁNĚ PRO ZISK aDNA**

Je zřejmé, že všeobecná znalost stavby a složení kostí a také jejich rozkladu je základní pro určení, kde se DNA v historické kosti nachází a tudíž odkud vzít vhodný vzorek pro studium (Campos a spol., 2012). V rámci zubu jsou tři možnosti odkud aDNA získat – z dentinu, dřeně nebo cementu. Sklovina neobsahuje žádné buňky a tudíž ani žádnou aDNA. Navíc, pokud je sklovina obsažená ve vzorku (například při využití celého rozdrčeného zubu) s ostatními tkáněmi, může svým vysokým obsahem minerálů, včetně vápníku, komplikovat extrakci a inhibovat PCR amplifikaci (Higgins a Austin, 2013).

## 7.1. Dřeň

Dentin a dřeň vytváří integrovanou strukturu nazývanou dentino-pulpální komplex (Corte-Real a spol., 2006). Tento komplex nejen že tvoří objem zubu, ale oproti sklovině má vysoký obsah buněk (odontoblasty, fibroblasty, makrofágy, plazmatické buňky a další) obsažených ve dřeni (Higgins a Austin, 2013), což z ní činí bohatý zdroj aDNA. Zubní dřeň je velice důležitá při výzkumu jaderné aDNA (Malaver a Yunis, 2003). Využití zubní dřene nabízí praktickou alternativu umožňující získání DNA z přirozeně uzavřené dutiny bez nutnosti dekalifikace. U ještě neprořezaného zubu, který je ještě stále v čelisti, je dřeň ještě více izolována od okolních vlivů (Drancourt a spol., 1998). Studie zabývající se post-mortem zachováním zubní dřene ukazují, že se dřeň rozkládá pomaleji než jiné měkké tělní tkáně (Boy a spol., 2003), pravděpodobně díky ochraně před okolními podmínkami a také díky přirozeným vlastnostem buněk této tkáně. Někdy se ovšem může stát, že se bude vyskytovat pouze v omezeném množství, nebo může úplně chybět u velmi starých nebo napadených zubů (Higgins a Austin, 2013).

## 7.2. Dentin

Obecně dentin neobsahuje jaderné buňky, ovšem může se stát, že některé odontoblasty v něm zůstanou uvězněny během formování terciálního dentinu (Nanci, 2003). Ale jak už bylo dříve zmíněno, dentin je prostoupen četnými kanálky. Tyto kanálky obsahují výběžky odontoblastů a nervová vlákna. Tyto výběžky obsahují četné mitochondrie v průběhu celé své délky. Mitochondrie jsou také přítomné v nervových vláknech. Tento vysoký obsah mitochondrií činí z dentinu velmi dobrý zdroj mitochondriální DNA (mtDNA) (Higgins a Austin, 2013).

## 7.3. Celulární cement

Celulární cement je po chemicko-fyzikální stránce podobný kosti, ale liší se strukturou a funkcí (Bosshardt, 2005). Je pro něj také charakteristická přítomnost početných lakun. Ty jsou zde ale vyplněny cementocyty, které jsou méně vystavené externím poškozením, zvláště pak chemické a bakteriální degradaci (De Leo a spol., 2000), a proto jsou tyto buňky dobrým zdrojem DNA (Yamamoto a spol., 2010). Celulární cement je přítomný zvláště na apikální části kořenů a v místě větvení kořenů u vícekořenových zubů (Štamfelj a spol., 2008).

Další zdroje DNA spojené s cementem jsou inkluze měkkých tkání, zbytky krevních buněk, přilnutá periodontální tkáň a fragmenty kosti zaklíněné mezi kořeny stoliček (Higgins a Austin, 2013). Adler a spol. (2001) zkoumala různé měkké i tvrdé tkáně 42 lidských a kravských ostatků pro zjištění obsahu mtDNA o délce fragmentů 77-235 bp pomocí real-time PCR. Obsah mtDNA v zubním cementu byl až 5x vyšší než v běžně používaném dentinu, což činí na cement bohatou kořenovou špičku nejlepším vzorkem pro lidský historický materiál.

Ačkoliv se cement jeví jako nejlepší zubní tkáň pro extrakci DNA, jeho pozice na povrchu zubního kořene může vést ke zvýšenému riziku kontaminace. Ale tato situace není jen u cementu – dentin je také vystaven vlivům vnějšího prostředí skrze otevřenou strukturu dřeňové dutiny přes kořenovou špičku a skrze praskliny a dutinky (Gilbert a spol., 2005). Cement může být dekontaminován stejně jako kost včetně UV záření (Lindhal, 1993), mechanického očištění a pomocí bělicího činidla (Malmstrom a spol., 2007).

Celkově jsou tedy cement a dřevina nejlepšími zdroji jaderné DNA v rámci zubu a obě tyto tkáně ještě společně s dentinem jsou dobrými zdroji mtDNA (Higgins a Austin, 2013).

Obsah DNA není rozdílný jen v rámci různých zubních tkání, liší se také v rámci různých částí zubu (Adler a spol., 2001). Například v rámci dentinu je 3-4krát více odontoblastických kanálků v těle kořene (65 000-45 000mm<sup>2</sup>) ve srovnání s apikální částí (15 000-20 000mm<sup>2</sup>) (Franquin a spol., 1998).

Již dříve byly zmíněny 4 druhy zubů: řezáky, špičáky, třenové zuby a stoličky, které se liší tvarem a velikostí, ale mají stejnou histologickou stavbu (Malaver a Yunis, 2003). Studie porovnávající obsah DNA mezi jednotlivými druhy ukazují, že zuby s větším objemem dřene jsou lepším zdrojem (De Leo a spol., 2000; Rubio a spol., 2009). Bylo také zjištěno, že z vícekořenových zubů jsou větší výtěžky DNA než z jednokořenových (De Leo a spol., 2000). Většinou díky velké dřeňové dutině a většímu objemu cementu. Zuby s více kořeny mají nejen větší povrch těchto kořenů, ale také větší objem cementu na jednotlivých kořenech, než zuby s jedním kořenem, které mají v některých případech cementu málo nebo i žádný. Z toho plyne, že stoličky jsou nejvhodnějšími vzorky. Pokud stoličky chybí, dají se využít třenové zuby, které mají více cementu než přední zuby, ale na druhou stranu špičáky mají větší objem dřene (Higgins a Austin, 2013).

Kořeny z *in situ* zubů mají výhodu v ochraně vůči okolním vlivům díky alveolům (Adler a spol., 2001). Při výběru vzorku by se mělo zohlednit to, jestli byl dobře ukotven v čelisti. Vícekořenové zuby většinou v čelisti velmi dobře drží na rozdíl od předních, jednokořenových, které jsou často *post-mortem* uvolněny (Higgins a Austin, 2013).

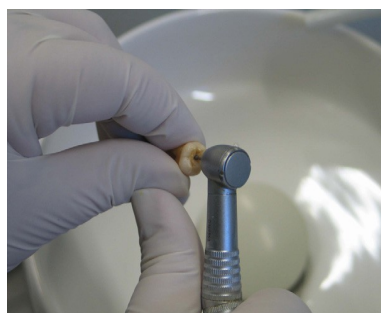
## 8. MODERNÍ POSTUP ODBĚRU VZORKU ZE ZUBU

Metody rozemílání a drcení tvrdých tkání, používané při extrakci aDNA, nenávratně ničí morfologickou strukturu historických zubů, které jsou důležitým materiálem při antropologickém hodnocení, což vědce často odrazuje od provádění DNA analýz a může to vytvářet napjaté vztahy mezi výzkumnými pracovníky zabývajícími se aDNA a dentálními antropology. Je to také jeden z důvodů proč se pro tyto analýzy častěji využívaly kosti než zuby (Sivagami a spol., 2000; Amory a spol., 2006 ).

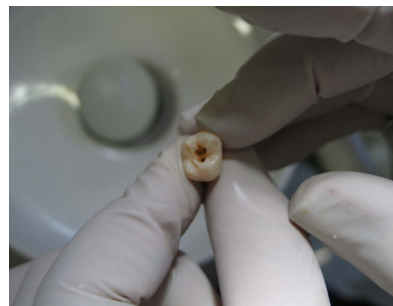
V roce 2002 Cobb a spol. proto navrhli nedestruktivní metodu, kdy se zubní tkáň s aDNA získávala navrtáním zubu od kořene směrem ke korunce, takže nedošlo k destrukci zubu, zvláště jeho korunkové části. Kromě toho, tímto postupem můžeme získat dostatečné množství dentinu.

Ovšem tato metoda má také své nevýhody, jelikož kořeny zkoumaných zubů jsou často velmi křehké, propustné a oslabené (Alakoç a Aka, 2009).

Proto se Alakoç a Aka (2009) zabývali další metodou – tzv. metodou „orthográdního vstupu“. Jde o postup, kdy se zub navrtá zubařskou vrtačkou přes korunku do dřeňové dutiny odkud se získá dentin a dřeň (pokud je zachována) (viz Obr. 4 a 5). Poté se zub vyplní pryskyřicí do původního tvaru, což je dnes možné provést natolik precizně, že jen oko zkušeného dentisty pozná rozdíl.



Obrázek 4



Obrázek 5

Metoda „orthográdního vstupu – navrtání zubu přes zubní korunku. ( Alakoç a Aka, 2009)

Tato metoda má hned několik významných výhod. Oproti Cobbovu postupu dosáhneme vnitřní tkáň přes odolnější část zubu, čímž se ještě více minimalizuje riziko poškození. Obě metody jsou velmi výhodné z hlediska kontaminace oproti klasickému rozemílání tkání, ale navíc v porovnání těchto dvou metod je metoda orthográdního vstupu výhodnější i z pohledu dekontaminace. U vstupu přes kořenovou špičku je totiž velké riziko,

že se dekontaminační reagentie penetrují do dřevného kanálku a dutiny skrze vrstvy cementu a dentinové kanálky, a to může způsobit poškození aDNA (Katzenberg a spol., 2005; Kemp a Smith, 2005). Nepropustnost skloviny oproti cementu ještě více zvýhodňuje tuto metodu, protože se dá aplikovat více dekontaminačních technik. Další z výhod je jednodušší dosažení dřevné dutiny (nejbohatšího zdroje zubní dřevě) – té nemůže být v dostatečné míře dosaženo z dřevného kanálku při vstupu z kořenové strany (Alakoç a Aka, 2009).

Pro testování této metody Alakoç a Aka (2009) použili 72 zubů. Z toho byla amplifikace úspěšná u 58 zubů. Navíc se touto metodou podařilo získat produkty amplifikace jaderné DNA s pozoruhodných 80,1% úspěchem (58 ze 72 zubů) a morfologická stavba všech zubů byla úspěšně zachována.

Vlastnosti „orthográdního vstupu“ tak dávají dentálním antropologům možnost využít velmi vzácné historické vzorky. Také umožňují navrácení vzorku do sbírek, kde budou dostupné pro budoucí, ještě dokonalejší, využití.



## 9. ZÁVĚR

Účelem této práce bylo poukázat na fakt, že jsou zuby lepším zdrojem aDNA než kosti. Mnoho autorů svými výzkumy dokládá, že tomu tak skutečně je. Ovšem jsou i případy, kdy se na první pohled může kost jevit jako lepší zdroj. Například Anđelinović a spol. (2005) ve své studii uvádí, že podle jejich výsledků se kosti jeví jako lepší zdroj aDNA než zuby. Tyto výsledky byly shrnuty do následující tabulky:

Typ tkáně/kosti	Počet izolací DNA za rok						Úspěšné amplifikace DNA za rok (%)					
	2000	2001	2002	2003	2004	Celkem	2000	2001	2002	2003	2004	Celkem
Femur	15	69	46	76	13	<b>219</b>	80	91	87	97	100	<b>92</b>
Zuby	6	63	6	11	0	<b>86</b>	67	89	100	100	/	<b>90</b>
Lebeční kosti	2	5	5	0	1	<b>13</b>	100	60	60	/	100	<b>69</b>
Humerus	1	6	6	0	3	<b>16</b>	100	67	100	/	67	<b>81</b>
Ulna	1	3	1	1	0	<b>6</b>	0	100	100	0	/	<b>67</b>
Radius	1	1	1	0	0	<b>3</b>	100	100	100	/	/	<b>100</b>
Mandibula	0	1	0	0	0	<b>1</b>	/	0	/	/	/	<b>0</b>
Žebro	0	2	0	0	0	<b>2</b>	/	0	/	/	/	<b>0</b>
Patní kost	0	0	1	0	0	<b>1</b>	/	/	0	/	/	<b>0</b>
Pánevní kost	0	0	4	0	0	<b>4</b>	/	/	75	/	/	<b>75</b>
Tibia	0	0	9	1	8	<b>18</b>	/	/	89	100	100	<b>94</b>
Křížová kost	0	0	1	0	0	<b>1</b>	/	/	100	/	/	<b>100</b>
Fibula	0	0	2	0	0	<b>2</b>	/	/	100	/	/	<b>100</b>
Nerozlišené	21	2	17	0	0	<b>40</b>	100	50	88	/	/	<b>93</b>
Všechny vzorky	47	152	99	89	25	<b>412</b>	87	86	87	97	96	<b>89</b>

Tabulka 2: Počet extrakcí a úspěšnost amplifikací aDNA z různých kostí a zubů provedených Anđelinovićem a spol. od roku 2000 do 2004 (upraveno).

Při pohledu pouze na celková procenta úspěšných amplifikací za dané časové období, se skutečně může zdát, že jsou některé kosti lepšími zdroji (zvláště radius, křížová kost a fibula se stoprocentní úspěšností) než zuby. Je ovšem potřeba podívat se také na počet testovaných vzorků. U těchto konkrétních tří příkladů byly použity pouze 3, 1 a 2 vzorky. Je zřejmé, že pokud se jednalo o dobře zachovalé kosti, amplifikace byla úspěšná a tím pádem vykazuje stoprocentní úspěšnost. Zubů bylo použito daleko víc, což mělo vliv na úspěšnost. Například u femuru, který měl největší zastoupení vzorků, byla úspěšnost amplifikace téměř srovnatelná s úspěšností u zubů.

Pokud ovšem nastane situace, kdy zuby u kosterního nálezu chybí nebo jsou poškozené zubním kazem, rozdrčené nebo jinak znehodnocené a tudíž je vnitřní struktura vystavena silné degradaci a kontaminaci mohou být skutečně kosti vhodnějším zdrojem pro odběr aDNA. Vždy je třeba zhodnotit aktuální situaci a rozhodnout se pro vhodný postup.

Zuby mají kromě velkého obsahu aDNA také další výhody. Například to, že zubní tkáň nejsou běžně resorbovány a remodelovány (pouze za určitých podmínek). Díky tomu může studium na věku závislého vývoje dentinu a cementu poskytnout pohled na dynamiku ukládání minerálů (Verdelis a spol. 2007).

Nebo může být v zubech (díky jejich odolnosti a zachování nedotčené dřeňové dutiny) za příznivých podmínek zachována také mikrobiální DNA. Činí tak ze zubní dřeň cílovou tkáň například pro získání aDNA při studiu různých bakterií jakožto původců různých onemocnění, se kterými se lidé v minulosti potýkali (Brundin a spol., 2014). Například *Yersinia pestis* (původce moru ve středověku) (Raoult a spol., 2000; Drancourt a spol., 1998), kde byly využity jak prořezané, tak neprořezané zuby nebo třeba *Bartonella quintana* (původce tzv. zákopové horečky) (Drancourt a spol., 2005). Tyto studie ukazují nejen odolnost DNA, ale také poukazují na vlastnosti dřeňového kanálku a okolního dentinu jako na jedinečné biologické prostředí pro dlouhodobé uchování DNA (Brundin a spol., 2014).

## 10. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Adler C.J., Haak W., Donlon D., Cooper A., and The Genographic Consortium.** 2011. Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *J. Archeol. Sci.* 38: 956-964. DOI:10.1016/j.jas.2010.11.010.
- Alakoç Y. D., Aka P. S.** 2009. “Orthograde entrance technique” to recover DNA from ancient teeth preserving the physical structure. *Forensic Sci Int.* 188: 96-98. DOI:10.1016/j.forsciint.2009.03.020.
- Amory S., Keyser-Tracqui C., Crubezy E., Ludes B.** 2006. Multi-substrata analysis on Siberian mummies: a different way for validation in ancient DNA studies. *Int Cong Ser.* 1288: 834–836.
- Andelinović Š., Sutlović D., Erceg Ivkošić I., Škaro V., Ivkošić A., Paić F., Reić B., Definis-Gojanović M., Primorac D.** 2005. Twelve-year experience in identification of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J.* 46 (4): 530-539.
- Arnold M. A., Kim Y., Czubryt M. P., Phan D., McAnally J., Qi X., Shelton J. M., Richardson J. A., Bassel-Duby R., Olson E. N.** 2007. MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. *Dev Cell.* 12: 377-389. DOI 10.1016/j.devcel.2007.02.004
- Balzer A., Gleixner G., Grupe G., Schmidt H. L., Schramm S., Turban-Just S.** 1997. *In vitro* decomposition of bone collagen by soil bacteria: the implications for stable isotope analysis in archaeometry. *Archeometry.* 39 (2): 415-429.
- Barachini S., Dantib S., Pacinia S., D’Alessandro D., Carnicelli V., Trombia L., Moscatoa S., Mannaria C., Ceib S., Petrini M.** 2014. Plasticity of human dental pulp stromal cells with bioengineeringplatforms: A versatile tool for regenerative medicine. *Micron.* 67: 155-168.
- Bechtle S., Ang S. F., Schneider G. A.** 2010. On the mechanical properties of hierarchically structured biological materials. *Biomaterials.* 31: 6378-6385. DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.05.044
- Bell L. S., Cox G., Sealy J.** 2001. Determining isotopic life history trajectories using bone density fractionation and stable isotope measurements: a new approach. *Am J Phys Anthropol.* 166: 66-79.
- Bell L. S., Skinner M. F., Jones S. J.** 1996. The speed of postmortem change to the human skeleton and its taphonomic significance. *Forensiv Sci Int.* 82: 129-140.

- Blake R. E., O'Neil J. R., Garcia G. A.** 1998. Effects of microbial activity on the  $\delta^{18}\text{O}$  of dissolved inorganic phosphate and textural features of synthetic apatites. *Am Mineral.* 82: 1516-1531.
- Bollongino R., Tresset A., Vigne J. D.** 2008. Environment and excavation: Pre-lab impacts on ancient DNA analyses. *C. R. Palevol.* 7: 91-98. DOI:10.1016/j.crvp.2008.02.002.
- Bosshardt D. D.** 2005. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype?. *J Dent Res.* 84 (5): 390-406.
- Boskey A. L.** 2007. Mineralization of bones and teeth. *Elements.* 3: 387-393.
- Bosshardt D. D., Selvig K. A.** 1997. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol 2000.* 13: 41-75.
- Boy S. C., Bernitz H., Van Heerden W. F. P.** 2003. Flow cytometric evaluation of postmortem pulp DNA degradation. *Am J Forensic Med Pathol.* 24: 123-127. DOI: 10.1097/01.PAF.0000069647.55347.3b.
- Brundin M., Figdor D., Johansson A., Sjögren U.** 2014. Preservation of bacterial DNA by human dentin. *Joe.* 40 (2): 241-245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.025>.
- Buckley M., Wadsworth C.** 2014. Proteome degradation in ancient bone: Diagenesis and phylogenetic potential. *Palaeogeogr Palaeoclimatol.* 416: 69-79. DOI:10.1016/j.palaeo.2014.06.026
- Burger J., Hummel S., Herrmann B., Henke W.** 1999. DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis.* 20: 1722–1728.
- Campos P. F., Craig O. E., Turner-Walker G., Peacock E., Willerslev E., Gilbert M. T. P.** 2012. DNA in ancient bone – Where is it located and how should we extract it?. *Ann Anat.* 194: 7-16. DOI:10.1016/j.aanat.2011.07.003
- Cano R. J.** 1996. Analysing ancient DNA. *Endeavour.* 20 (4): 162-167. DOI:10.1016/S0160-9327(96)10031-4
- Cobb J. C.** 2002. Ancient DNA recovered by a non-destructive method. *Ancient Biomolecules.* 4 (4): 169-172. DOI: 10.1080/1358612021000028461.
- Corte-Real A., Andrade L., Anjos M. J., Carvalho M., Vide M. C., Corte-Real F., Vieira D. N.** 2006. The DNA extraction from the pulp dentine complex of both with and without carious. *Int Congr Ser.* 1288: 710-712. DOI:10.1016/j.ics.2005.11.053
- Currey J.** 2002. *Bones: Structure and Mechanics.* Princeton. Princeton University Press.
- Čihák R.** 2001. *Anatomie 1.* Praha. Grada publishing.
- De Leo D., Turrina S., Marigo M.** 2000. Effects of individual dental factors on genomic dna analysis. *Am J Foren Med Path.* 21 (4): 411-415.
- Dobberstein R. C., Huppertz J., Wurm-Schwark N., Ritz-Timme S.** 2008. Degradation of

- biomolecules in artificially and naturally aged teeth: Implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis. *Forensic Sci Int.* 179: 181-191.
- Drancourt M., Aboudharam G., Signoli M., Dutour O., Raoult D.** 1998. Detection of 400 year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 12637-12640.
- Drancourt M, Tran-Hung L, Courtin J, Lumley H., Raoult D.** 2005. *Bartonella quintana* in a 4000-yearold human tooth. *J Infect Dis.*191:607–611.
- Franquin J-C., Remusat M., Abou Hashieh I., Dejou J.** 1998. Immunocytochemical detection of apoptosis in human odontoblasts. *Eur J Oral Sci.* 106 (1): 384-387.
- Gallon V., Chen L., Yang X., Moradian-Oldak J.** 2013. Localization and quantitative co-localization of enamelin with amelogenin. *J Struct Biol.* 183: 239-249.
- Geigel E. M.** 2002. On the circumstances surrounding the preservation and analysis of very old DNA. *Archeometry.* 44 (3): 337-342.
- Gilbert M. T. P., Rudbeck L., Willerslev E., Hansen A. J., Smithe C., Penkman K. E. H., Prangenberge K., Nielsen-Marshe C. M., Jansg M. E., Arthurh P., Lynnerupi N., Turner-Walker G., Biddlek M., Kjolbye-Biddlek B., Collinse M. J.** 2005. Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *J. Archeol. Sci.* 32: 785-793. DOI:10.1016/j.jas.2004.12.008.
- Gilbert M.T.P., Hansen A.J., Willerslev E., Turner-Walker G., Collins M.** 2006. Insights into the processes behind the contamination of degraded human teeth and bone samples with exogenous sources of DNA. *Int J Osteoarchaeol.* 16: 156–164.
- Goldberg M., Septier D., Bourd K., Menashi S.** 2004. Role of matrix proteins in signalling and in dentin and enamel mineralisation. *C R Palevol.* 3: 573-581. DOI:10.1016/j.crpv.2004.07.005
- Götherström A., Collins M. J., Angerbjörn A., Lidén K.** 2002. Bone preservation and DNA amplification. *Archeometry.* 44 (3): 395-404.
- Grunenwald A., Keyser C., Sautereau A.M., Crubézy E., Ludes B., Drouet C.** 2014. Adsorption of DNA on biomimetic apatites: Toward the understanding of the role of bone and tooth mineral on the preservation of ancient DNA. *Appl Surf Sci.* 292: 867-875.
- Grupe G.** 1995. Preservation of collagen in bone from dry, sandy soil. *J Archeol Sci.* 22: 193-199.
- Hagelberg E., Bell L. S., Allen T., Boyde A., Jones S. J., Clegg J. B., Hummel S., Brown T. A., Ambler R. P.** 1991. Analysis of ancient bone DNA: Techniques and

- applications. *Philos T R Soc B*. 333 (1268): 399-407.
- Higgins D., Austin J. J.** 2013. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review. *Science and Justice*. 53: 433-441.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scijus.2013.06.001>.
- Hiller J.C., Collins M.J., Chamberlain A.T., Wess T.J.** 2004. Small-angle X-ray scattering: a high-throughput technique for investigating archaeological bone preservation. *J Archeol Sci*. 31: 1349-1359. DOI:10.1016/j.jas.2004.02.013
- Houck M. M., Siegel J. A.** 2010. *Fundamentals of forensic science*. Burlington. Elsevier.
- Katzenberg M., Oetelaar G., Oetelaar J., Fitzgerald C., Yang D., Saunders S.R.** 2005. Identification of historical human skeletal remains: a case study using skeletal and dental age, history and DNA. *Int J Osteoarcheol* 15: 61–72.
- Kemp B.M., Smith D.G.** 2005. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Sci Int*. 154: 53–61.
- Kirsanow K., Burger J.** 2012. Ancient human DNA. *Ann. Anat*. 194: 121-132.  
 DOI:10.1016/j.aanat.2011.11.002
- Lerner U.H.** 2012. Osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes: unveiling their intimate associated responses to applied orthodontic forces. *Semin Ortho*. 18 (4): 237-248.
- Lieb Gott B.** 2011. *the anatomical basis of dentistry*. Missouri. Mosby Elsevier.
- Linde A., Goldbeg M.** 1993. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol M*. 4 (5): 679-728.
- Lindahl T.** 1993. Instability and decay of primary structure of DNA. *Nature*. 362: 709-715.
- Lee-Thorp J., Sponheimer M.** 2003. Three case studies used to reassess the reliability of fossil bone and enamel isotope signals for paleodietary studies. *J Anthropol Archeol*. 22: 208-216. DOI:10.1016/S0278-4165(03)00035-7
- Low I.M., Duraman N., Mahmood U.** 2008. Mapping the structure, composition and mechanical properties of human teeth. *Mater Sci Eng*. 28: 243-247.
- MacDougall M., Simmons D., Luan X., Nydegger J., Feng J., Gu T. T.** 1997. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. *J Biol Chem*. 272 (2): 835-842.
- Maes C., Kobayashi T., Selig M. K., Torrekens S., Roth S. I., Mackem S., Carmeliet G., Kronenberg H. M.** 2010. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with Invading blood vessels. *Dev Cell*. 19 (2): 329–344. DOI:10.1016/j.devcel.2010.07.010.
- Malaver P. C., Yunis J. J.** 2003. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. *Croat Med J*. 44 (3): 306-309.
- Malmström H., Svensson E. M., Gilbert M. T. P., Willerslev E., Götherström A.,**

- Holmlund G.** 2007. More on contamination: the use of asymmetric molecular behavior to identify authentic ancient human DNA. *Mol. Biol. Evol.* 24 (4): 998-1004. DOI:10.1093/molbev/msm015.
- Minčík J., Šatanková M., Alexejenko M., Novotný R., Stošek M., Svoboda D.** 2014. *Kariologie. Česká republika. StomaTeam.*
- Murakami H., Yamamoto Y., Yoshitome K., Ono T., Okamoto O., Shigeta Y., Doi Y., Miyaishi S., Ishizu H.** 2000. Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples. *Acta Med Okayama.* 54 (1): 21-32.
- Nanci A.** 2003. *Ten Cate's oral histology: development, structure and function.* 6th ed. St. Louis, Mosby.
- Nielsen-Marsh C. M., Hedges R. E. M.** 1999. Bone porosity and the use of mercury intrusion porosimetry in bone diagenesis studies. *Archeometry.* 41: 165-174.
- Nielsen-Marsh C., Hedges R.** 2000a. Patterns of bone diagenesis in bone I: The effect of site environments. *J Archaeol Sci.* 27: 1139–1150.
- Nielsen-Marsh C., Hedges R.** 2000b. Patterns of bone diagenesis in bone II: The effect of acetic acid treatment and the removal of diagenetic  $\text{CO}_3^{2-}$ , *J Archaeol Sci.* 27: 1151–1159.
- Nielsen-Marsh C. M., Hedges R. E. M., Mann T., Collins M.** 2000. A preliminary investigation of the application of differential scanning calorimetry to the study of collagen degradation in archaeological bone. *Thermochim Acta.* 6369: 1–11.
- Okazaki M., Yoshida Y., Yamaguchi S., Kaneno M., Elliott J. C.** 2001. Affinity binding phenomena of DNA onto apatite crystals. *Biomaterials.* 22: 2459-2464. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhevol.2014.02.001>.
- Oota H., Saitou N., Matsushita T., Ueda S.** 1995. A genetic study of 2000-years-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences. *Am. J. Phys. Anthropol.* 98: 133-145.
- Ortner D. J. a Putschar W. G. J.** 1981. *Identification of pathological conditions in human skeletal remains.* City of Washington. Smithsonian institution press.
- Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Després V., Hebler J., Rohland N., Kuch M., Krause J., Vigilant L., Hofreiter M.** 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet.* 38: 645-679. DOI:10.1146/annurev.genet.37.110801.143214
- Pilli E., Modi A., Serpico C., Achilli A., Lancioni H., Lippi B., Bertoldi F., Gelichi S., Lari M., Caramelli D.** 2013. Monitoring DNA contamination in handled vs. directly excavated ancient human skeletal remains. *PloS ONE* 8 (1): e52524 [online] DOI:10.1371/journal.pone.0052524.

- Poinar H. N.** 2003. The top 10 list: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples. *Int Congr Ser.* 1239: 575-579.
- Rabenold D., Pearson O. M.** 2014. Scratching the surface: A critique of Lucas et al. (2013)'s conclusion that phytoliths do not abrade enamel. *J Hum Evol.* 74: 130-133.
- Raoult D., Aboudharam G., Crubézy E., Larrouy G., Ludes B., Drancourt M.** 2000. Molecular identification by "suicide PCR" of *Yersinia pestis* as the agent of medieval black death. *Proc Natl Acad Sci.* 97: 12800–12803.
- Rho J. Y., Kuhn-Spearing L., Zioupos P.** 1998. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys.* 20: 92-102.
- Ricaud F. X., Keyser-Tracqui Ch., Crubézy E., Ludes B.** 2005. STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples. *Forensic Sci Int.* 151: 31-35. DOI:10.1016/j.forsciint.2004.07.001
- Rogan P. K., Salvo J. J.** 1990. Study of nucleic acids isolated from ancient remains. *Yearb Phys Anthropol.* 33: 195-214.
- Rubio L., Martinez L. J., Martinez E., Martin de las Heras S.** 2009. Study of short- and long-term storage of teeth and its influence on DNA. *J Forensic Sci.* 54 (6): 1411-1413. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2009.01159.x.
- Rudbeck L., Gilbert M. T. P., Willerslev E., Hansen A.J., Lynnerup N., Christensen T., Dissing J.** 2005. mtDNA analysis of human remains from an early Danish christian cemetery. *Am J Phys Anthropol.* 128: 424-429.
- Sampietro M. L., Gilbert M. T. P., Lao O., Caramelli D., Lari M., Bertranpetit J., Lalueza-Fox C.** 2006. Tracking down human contamination in ancient human teeth. *Mol. Biol. Evol.* 23 (9): 1801–1807. DOI:10.1093/molbev/msl047.
- Schoeninger M. J., Moore K. M., Murray M. L., Kingston J. D.** 1989. Detection of bone preservation in archeological and fossil samples. *Appl Geochem.* 4: 281-292.
- Sicher H.** 1966. *Orban's oral histology and embryology.* Saint Louis. C.V. Mosby Company.
- Sivagami A., Rao A., Varshney U.** 2000. A simple and cost-effective method for preparing DNA from the hard tooth tissue, and its use in polymerase chain reaction amplification of amelogenin gene segment for sex determination in an Indian population. *Forensic Sci Int.* 110 (2): 107–115.
- Štampfelj I., Vidmar G., Cvetko E., Gašperšič D.** 2008. Cementum thickness in multirouted human molars: A histometric study by light microscopy. *Ann Anat.* 190: 129-139. DOI:10.1016/j.aanat.2007.10.006.
- Turner-Walker G., Nielsen-Marsh C. M., Syversen U., Kars H., Collins M. J.** 2002. Sub-micron spongiform porosity is the major ultra-structural alteration occurring in



- archaeological bone. *Int J Osteoarchaeol.* 12: 407-414. DOI: 10.1002/oa.642
- Van Klinken G. J., Hedges R. E. M.** 1995. Experiments on collagen–humic interactions: speed of humic uptake, and effects of diverse chemical treatments. *J Archaeol Sci.* 22: 263–70.
- Verdelis K., Lukashova L. Wright J. T., Mendelsohn R., Peterson M. G. E., Doty S., Boskey A. L.** 2007. Maturation changes in dentin mineral properties. *Bone.* 40: 1399-1407. DOI:10.1016/j.bone.2006.12.061.
- Wandeler P., Smith S., Morin P. A., Pettifor A., Funk S. M.** 2003. Patterns of nuclear DNA degradation over time – a case study in historic teeth samples. *Mol Ecol.* 12: 1087-1093.
- Woodward S. R., King M. J., Chiu N. M., Kuchar M. J., Griggs C. W.** 1994. Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *Pcr Meth Appl.* 3: 244-247.
- Wright L. E., Schwarcz H. P.** 1996. Infrared and isotopic evidence for diagenesis of bone apatite at Dos Pilas, Guatemala: palaeodietary implications. *J Archeol Sci.* 23: 933-944.
- Yamamoto T., Li M., Liu Z., Guo Y., Hasegawa T., Masuki H., Suzuki R., Amizuka N.** 2010. Histological review of the human cellular cementum with special reference to an alternating lamellar pattern. *Odontology.* 98: 102-109. DOI 10.1007/s10266-010-0134-3.
- Yang D.Y., Eng B., Wayne J.S., Dudar J.C., Saunders S.R.** 2008. Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am J Phys Anthropol.* 136: 114-121.
- Yang D. Y., Watt K.** 2005. Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis. *J. Archeol. Sci.* 32: 331-336. DOI:10.1016/j.jas.2004.09.008.
- Yasui N., Sato M., Ochi T., Kimura T., Kawahata H., Kitamura Y., Nomura S.** 1997. Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *J Bone Joint Surg.* 79-B (5): 824-830.
- Zheng, J., Zhou, Z.R., Zhang, J., Li, H., Yu H.Y.** 2003. On the friction and wear behaviour of human tooth enamel and dentin. *Wear.* 255: 967-974.
- Zhou X., von der Mark K., Henry S., Norton W., Adams H., de Crombrughe B.** 2014. Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS Genet* 10 (12): e1004820. DOI:10.1371/journal.pgen.1004820