



Tiina Väre, Mikko Finnilä & Sanna Palosaari

Hammaskiilteen sukupuolidimorfisten amelogeniinien peptidianalyysi osana osteoarkeologista menetelmäpakettia

Tutkimme kiillettä muodostavan amelogeniinin sukupuolidimorfisten isoformien peptidisekvenssien esiintymistä kahden arkeologisen yksilön hammaskiilteessä happoetsauksen ja nestekromatografia-massaspektrometrian avulla. Morfologisesti, eli rakenteellisesti naiseksi määritetyn vainajan kiilteestä löydettiin ainoastaan X-kromosomissa sijaitsevan geenin koodaaman amelogeniinimuodon peptidejä. Mieheksi määritetyn vainajan kiille sisälsi lisäksi Y-kromosomissa sijaitsevan AMELY-geenin koodaamien amelogeniinien peptidejä. Menetelmä tarjoaa luotettavan vaihtoehdon perinteisten osteologisten sukupuolenmäärittämenetelmien rinnalle.

Analys av peptiderna i emaljens könsdimorfa amelogeniner som del av det osteoarkeologiska metodpaketet

Vi undersökte framträdandet av de könsdimorfa isoformernas peptidsekvenser i det emaljproducerande amelogeninet i två arkeologiska individers emaljer genom etsning med syra och vätskekromatografi-masspektrometri. I det morfologiskt, dvs. strukturmässigt fastställda kvinnliga likets emalj påträffades enbart av den i X-kromosomen belägna genen kodade amelogeninformens peptider. Det till man fastställda likets emalj innehöll även av den i Y-kromosomen belägna AMELY-genen kodade amelogeninernas peptider.

Johdanto

Arkeologiassa aikuisten osteologinen sukupuolenmäärittäminen perustuu perinteisesti kallon ja lantion luiden sukupuolidimorfiaan, eli saman lajin kahta sukupuolta erottaviin piirteisiin (Bass 1987; Buikstra & Uberlaker 1994). Piirteiden havainnointi ja luokittelu tapahtuu pääsääntöisesti laadullisin, subjektiivisin keinoin. Esimerkiksi luiden huono säilymisaste heikentää menetelmien luotettavuutta. Luumateriaalit säilyvät happamassa maaperäsämme varsin kehnosti (Gordon & Buikstra 1981; Lavento 2011). Useimmilla vanhemmilla arkeologisilla kohteillamme – kenties poisluettuna erityisen kalkkipitoiset alueet –

luumateriaalit ovat lähes tyystin kadonneet. Usein parhaiten säilyvät hampaat ja erityisesti niissä oleva epäorgaaninen, mineraalidikeditoinen kiille (vrt. Hillson 1996: 181). Proteomiikan menetelmien kehityksen (kts. Stewart et al. 2016; 2017; Lugli et al. 2019; 2020) ansiosta Suomenkin arkeologisilta kaivauksilta löytyneiden hampaiden kiille on useimmiten riittävän hyvin säilynyttä sukupuolen määrittämiseksi.

Lapsuudessa, amelogeneesin aikana, kiillettä luovat solut, ameloblastit, erittävät amelogeniineiksi kutsuttuja proteiineja. Ne osallistuvat kiilteen kehityksen eli mineralisa-

tioprosessiin ja vaikka niiden tarkkaa tehtävää ei toistaiseksi täysin tunneta, uskotaan niiden toimivan soluväliaineen rakenneproteiineina tukien ja erotellen mineraalikiteiden kasvua ja järjestymistä hammaskudoksessa. Hampaan mineralisoitumisen seurauksena ne kuitenkin pääasiassa häviävät ja kiille saa lopullisen muotonsa. Ihmisen amelogeniinit esiintyvät kahtena erilaisena versiona eli isoformina, joiden synteesiä ohjaavat sukupuolikromosomit. Naisten perimä sisältää tavallisesti kaksi kopiota X-kromosomista; miehen taas yhden X-kromosomikopion lisäksi yhden Y-kromosomin. Niiden sisältämiä amelogeniinin synteesiä ohjaavia geenejä kutsutaan vastaavasti nimillä AMELX ja AMELY. Molemmilta sukupuolilta löytyvät AMELX-geeni on tärkeämpi amelogeneesin kannalta¹. AMELY-geenin amelogeniinin² tuotanto taas ei ole välttämätöntä hammaskiilteen muodostuksen onnistumiselle ja sen toiminta on verraten marginaalista. (Nielsen-Marsh et al. 2009; Porto et al. 2011; Stewart et al. 2016; 2017.)

Kokonaiset proteiinimolekyylit ovat käytännössä kadonneet mineralisoituneesta kiilteestä, joka sisältää hyvin vähän orgaanisia aineita. Kiilteen kiderakenteen sisään kuitenkin jää vähäisiä määriä lyhyitä peptidisekvenssejä lähinnä proteiinin amino- ja karboksiterminaleista, eli proteiiniketjun päistä. Nämä osat ovat erilaiset AMELX- ja AMELY-geenien muodostamissa amelogeniineissa, jolloin ne voidaan massaspektrometrian avulla erottaa toisistaan ja sukupuoli tunnistaa näiden kiilteen ominaisuuksien perusteella (Stewart et al. 2016). Tässä artikkelissa esittelemme lyhyesti kahden yksilön hampaskiilteelle nestekromatografia-massaspektrometrian (LC-MS/MS) avulla suorittamamme amelogeniinin sukupuolidimorfisten isoformien koeluonteisten analyysien tulokset.

Materiaali ja metodi

Tutkimukseen valittujen yksilöiden RH122 (nainen) ja RH166 (mies) luujäännökset ovat

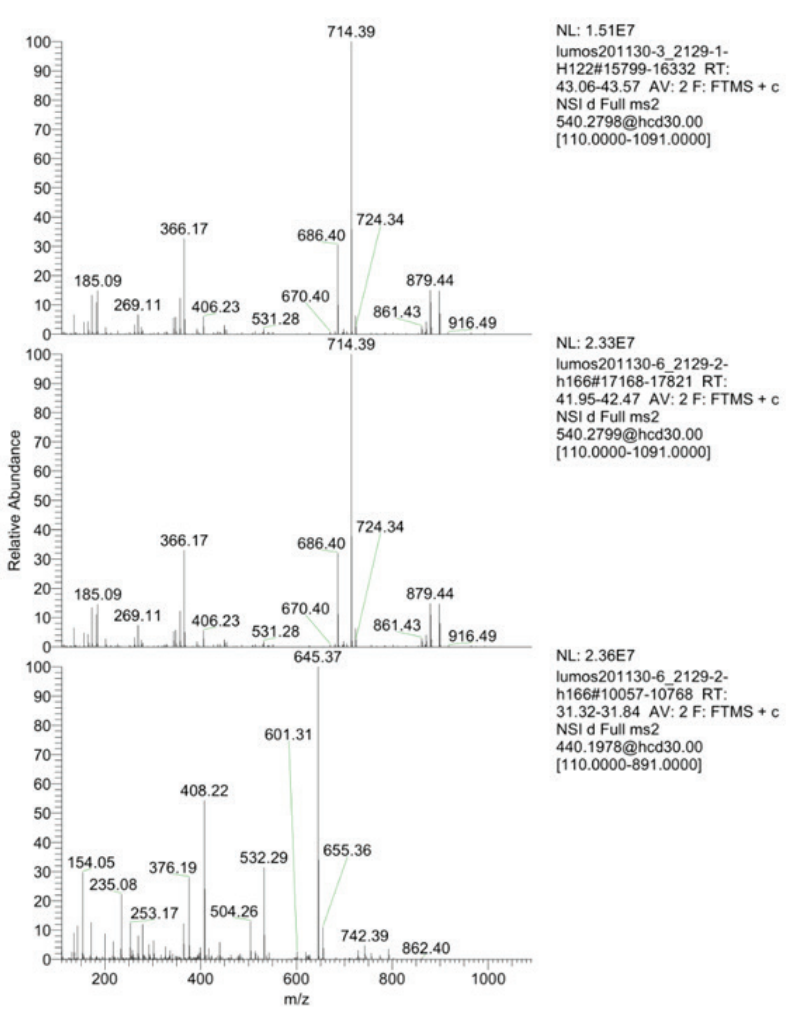
peräisin Rauman Vanhan hautausmaan kaivauksilta (Uotila & Lehto 2016). Molemmat heistä olivat kuolleet nuorina aikuisina oletettavasti 1800-luvun alkupuolella ja heidän sukupuolensa on luustojen perusteella arvioitu sekä tämän artikkelin ensimmäisen kirjoittajan, että kaivauksilla toimineen osteologi Anne-Mari Liiran toimesta (Liira 2017).

Proteiinit eristettiin tutkimuskohdeiden ensimmäisten pysyvien etuhampaiden kiilteestä ainoastaan kiilteen pintaa syövyttävällä, ja sellaisenaan lähes kajoamattomalla, ainoastaan mikroskooppisia vaurioita aiheuttavalla happoetsausmenetelmällä (acid etching), jonka tarkka kuvaus löytyy Stewartin ja kollegoiden (2016) artikkelista. Lyhyesti kuvattuna prosessi on seuraava: hampaita pestiin 3 % vetyperoksidilla 5 minuutin ajan, huuhdeltiin vedellä, pestiin 10 % suolahapolla 1 minuutin ajan ja sen jälkeen annettiin hampaiden kruunuosan seistä 5 minuutin ajan 5 % suolahapossa (100µl) ja kerättiin liuos talteen. Tämän jälkeen hampaiden kruunuosat upotettiin minuutiksi 20 % asetonitriiliä ja 0,1 % trifluorietikkahappoa sisältävään liuokseen (100µl) ja yhdistettiin edellisen kanssa. Näytteitä konzentroititiin alipainehaihduttimella (Speed-vac), kunnes liuosta oli jäljellä noin 100 µl. Näytteet sidottiin kiinteään C18 RP faasiin (Supelco-Tips C18), josta ne pesun jälkeen irrotettiin 2 x 5 µl:lla 70 % asetonitriiliä, jossa oli 0,1 % trifluorietikkahappoa. Käytetyt reagenssit olivat massaspektrometria laatua.

Seuraavaksi amelogeniinin sukupuolidimorfisten isoformien peptidit tunnistettiin näytteistä nanonestekromatografia-massaspektrometrillä (Lumos Orbi trap, Thermo, Biocenter Oulu, Oulun yliopisto) käyttäen käänteisfaasikromatografiaa. 4 ul näytettä injektointiin analysoitavaksi käänteisfaasinanoLC-MS:llä nestekromatografilla (EASY-nLC 1000, Thermo Fisher Scientific), joka oli kytketty ioniloukkumasaspektrometriin (Orbitrap Fusion Lumos, Thermo Fisher Scientific). Peptidit ladattiin ensin esikolonniin (AcclaimPepmap 100, Thermo; 75µm x 2 mm; C18, 3µm 100Å hiukkaskoko) 0,1 %

TFA:lla virtausnopeudella 2 µl/min. Peptidit eroteltiin analyytisessä kolonnissa (PepMa-prSLC; 15 cm × 75 µm;) virtausnopeudella 300 nl/min asetoniitrigradientilla, joka alkoi 3 %:sta, nostettiin 35 %:iin 90 minuutin aikana, sitten 90 %:iin 5 minuutin aikana ja pidettiin vakiona 90 %:ssa 5 minuutin ajan, palattiin 3 %:iin ja tasapainotettiin 6 minuutin ajan. MS-skannaus kerättiin Orbitrapissa (375-1500 m/z; R = 120 000). MS:n koko-

naismittausaika oli 100 minuuttia. Laitteiston kontaminaatio poissuljettiin nollanäytteillä. Toisistaan eroavat peptidit tunnistettiin ja niiden suhteellinen osuus määritettiin tarkkojen massojen perusteella SIC, 5mmu ikkunalla taajuuksilla 440,2233 m/z ja 540,2796 m/z. Koe suoritettiin sokkona, eli aiemmin määritetty sukupuoli ei ollut näytteiden esikäsitteilyn, massaspektrometriaajon tai tulosten tulkinnan suorittaneiden tutkijoiden tiedossa.

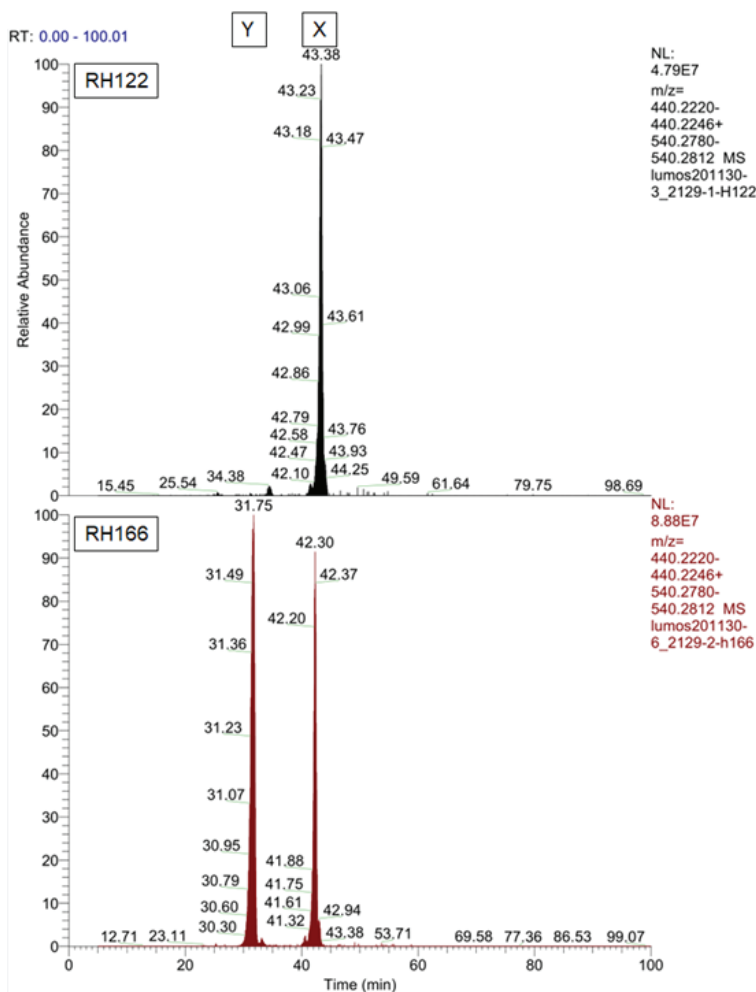


Kuvio 1. RH122 ja RH166 külteistä eristettyjen peptidinäytteiden massaspektrit.

Tulokset ja keskustelu

Massaspektrometrian tulokset vastasivat osteologista sukupuolen arviota. Näytteestä RH122 oli mahdollista havaita ainoastaan AMELX-isoformin peptidiä (SIRPPYPPSY $[(M + 2H)2+ = 540.2796 \text{ m/z}]$) kun näyte RH166 sisälsi näiden lisäksi myös AMELY-isoformin peptidiä (SM[ox]IRPPY $[(M + 2H)2+ = 440.2233 \text{ m/z}]$; Kuviot 1. ja 2.)

Peptidimäärityksen perusteella voidaan kohtuullisella varmuudella olettaa, että osteologin sukupuolen arvio vastasi yksilöiden biologista sukupuolta. On kuitenkin huomioitava, että AMELY-isoformin määrä kiilteessä on alkujaan vähäisempi ja sen on lisäksi todettu voivan hapettua vanhoissa näytteissä, jolloin se on käytännössä voinut hävitä kiilteestä – tai ainakin sen vähäinen osuus näytteessä saattaa estää havainnot siitä. Näissä tapauksissa kiil-



Kuvio 2. Amelogeniinin dimorfisen peptidin Y ja X isoformien SM(ox)IRPPY $[(M + 2H)2+ = 440.2233 \text{ m/z}]$ ja SIRPPYPPSY $[(M + 2H)2+ = 540.2796 \text{ m/z}]$ suhteellinen osuus näytteissä. Näytteessä RH122 havaittiin ainoastaan X-isoformin peptidiä ja näytteessä RH166 sekä Y- että X-isoformien peptidejä.

teestä löytyy ainoastaan AMELX-isoformia, jolloin biologisten miesten sukupuolen määrittäminen epäonnistuu. Menetelmä ei myöskään tavoita sukupuolen biologista moninaisuutta tai sukupuolikromosomien anomaliaita, kuten XO-, XYY- tai XXY-geotyyppejä (Stewart et al. 2017).

Paleoproteomiikan kehityksestä huolimatta, perinteisillä osteologisilla sukupuolen arviomenetelmillä on edelleen paikkansa ja osaaissa käsissä ne ovat yleisesti luotettavia. Etenkin ajallisesti ja maantieteellisesti toisistaan poikkeavien populaatioiden välillä tapahtuva, luuston mittojen vertaamiseen perustuva biologisen sukupuolen arviointi voi kuitenkin johtaa harhaan. Eri väestöille tyypilliset piirteet (vrt. esim. allometria) voivat sekoittaa sukupuolidimorfisiin piirteisiin perustuvaa jakoa (Giles & Elliot 1963), sukupuolten monimuotoisuudesta puhumattakaan (vrt. Moilanen et al. 2021).

Suurin puute perinteisten osteologisten sukupuolenmäärittämenetelmien käytössä on ollut se, että niitä ei voida soveltaa lasten luustojen sukupuolen arvioimisessa. Selkeimmät sukupuolipiirteetän ilmaantuvat vasta murrosiässä tapahtuvien hormonaalisten muutosten myötä (Buikstra & Uberlaker 1994; Lewis 2007). Molekyylibiologian menetelmiä on menestyksekkäästi sovellettu arkeologiseen tutkimukseen. Arkeologiassakin lasten luurankojen sukupuolten määrittäminen on jo muutamien vuosikymmenten ajan ollut mahdollista DNA-tutkimuksella (esim. Sullivan et al. 1993; Faerman et al. 1995). Vaikka muinais-DNA-teknologia on edistynyt aimo harppauksin tehden siitä paitsi varmemman, myös aikaisempaa edullisemmän työkalun, on sen käytölle edelleen rajoituksensa. DNA-molekyylit ovat suhteellisen herkkiä ulkoisten olosuhteiden aiheuttamalle hajoamiselle (esim. Allentoft et al. 2012) ja muutoinkin yksi merkittävimmistä rajoituksista lienee sama kuin erityisesti suomalaiselle osteologiselle tutkimukselle yleensäkin: luuaineistot – kiillettä lukuun ottamatta – säilyvät kehnosti (esim. Lavento 2011). Tähän ongelmaan

kiilteen sukupuolidimorfisten amelogeniinin peptidisekvenssien tutkimuspotentiaali on tuonut merkittävän helpotuksen.

Yhteenveto

Tämän artikkelin tavoitteena oli tarkastella hammaskiilteen muodostumiseen osallistuvan proteiinin, amelogeniinin sukupuolidimorfisista isoformeista jääneiden peptidisekvenssien esiintymistä kahden arkeologisen yksilön hammaskiilteessä. Suoritimme kohdetta minimaalisesti tuhoavan hammaskiilteen happoetsausmenetelmän ja nestekromatografia-massaspektrometrian (LC-MS/MS) avulla amelogeniininanalyysin kahdelle yksilölle, jotka oli aiemmin määritetty naiseksi (RH122) ja mieheksi (RH166). Tulokset olivat yhtenevät aiempien sukupuolimäärittysten kanssa. RH122:n kiilteestä löydettiin ainoastaan X-kromosomin AMELX-geenin koodaaman amelogeniini muodon peptidejä, mutta RH166:n kiille sisälsi niiden lisäksi myös AMELY-geenin koodaamien amelogeniinin peptidejä. Menetelmä tarjoaa luotettavan vaihtoehdon aikuisten yksilöiden tutkimuksiin käytetyille perinteisille osteologisille sukupuolenmäärittämenetelmille ja lasten sukupuolen määrittäksen, joka on aiemmin ollut DNA:n (huonon) säilymisen varassa.

Kiitokset

Kiitämme massaspektrometrianalyyseistä Ulrich Bergmannia, Biocenter Oulu, Oulun yliopisto. Tutkimuksen on rahoittanut Suomen Akatemia (Tiina Väre 323428).

Bibliografia

Painetut lähteet

- Buikstra, J. E. & Ubelaker, D. H. 1994. *Standards for Data Collection From Human Skeletal Remains*. Arkansas Archaeological Survey Report Number 44. Fayetteville, Arkansas.
- Lavento M. 2011. Kalmiston etsiminen ja koon arviointi kajoamattomilla menetelmillä. K. Salo & M. Niukkanen (toim.) *Arkeologisten hautakaivausten tutkimusmenetelmät*: 24–35. Museoviraston rakennushistorian osaston raportteja 22. Helsinki: Museovirasto.
- Liira, A.-M. Vanha kirkkokatu, Rauma. Osteologinen analyysi. Muuritutkimus Oy.
- Uotila, K. & Lehto, H. 2016. Rauma, Vanhankirkonkatu. Historiallisen ajan hautakaivaus 16.5.-25.7.2016. Muuritutkimus Oy.

Tutkimuskirjallisuus

- Allentoft, M. E., Collins, M., Harker, D., Haile, J., Oskam, C. L., Hale, M. L., Campos, P. F., Samaniego, J. A., Gilbert, M. T., Willerslev, E., Zhang, G., Scofield, R. P., Holdaway, R. N. & Bunce, M. 2012. The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. *Proceedings. Biological sciences* 279(1748): 4724–4733. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1745>
- Bass, W. M. 1987. *Human Osteology: a Laboratory and Field Manual*, Third Ed., Special Publication No. 2, 987. Colombia: Missouri Archaeological Society.
- Giles, E. & Elliot, O. 1963. Sex determination by discriminant function analysis of crania. *American Journal of Physical Anthropology* 21(1): 53–68. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330210108>
- Gordon, C. C. & Buikstra, J. E. 1981. Soil pH, Bone Preservation, and Sampling Bias at Mortuary Sites. *American Antiquity* 46: 566–571. <https://doi.org/10.2307/280601>
- Faerman, M., Filon, D., Kahila, G., Greenblatt, C. L. Smith, P. & Oppenheim, A. 1995. Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene* 167(1–2): 327–332. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00697-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00697-4)
- Hillson, S. 1996. *Dental Anthropology*. Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139170697>
- Lewis, M. 2007. *The Bioarchaeology of Children: Perspectives from Biological and Forensic Anthropology*. Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511542473>
- Lugli, F., Figus, C., Silvestrini, S., Costa, V., Bortolini, E., Conti, S., Peripoli, B., Nava, A., Sperduti, A., Lamanna, L., Bondioli, L. & Benazzi, S. 2020. Sex-related morbidity and mortality in non-adult individuals from the Early Medieval site of Valdaro (Italy): the contribution of dental enamel peptide analysis. *Journal of Archaeological Science: Reports* 34(A):102625. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2020.102625>
- Lugli, F., Di Rocco, G., Vazzana, A. Genovese, F., Pinetti, D., Cilli, E., Carile, M. C., Silvestrini, S., Gabanini, G., Arrighi, S., Buti, L., Bortolini, E., Cipriani, A., Figus, C., Marciani, G., Oxilia, G., Romandini, M., Sorrentino, R., Sola, M. & Benazzi, S. 2019. Enamel peptides reveal the sex of the Late Antique ‘Lovers of Modena’. *Scientific Reports* 9: 13130. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49562-7>
- Moilanen, U., Kirkinen, T., Saari, N., Rohrlach, A., Krause, J., Onkamo, P. & Salmela, E. 2022. A Woman with a Sword? – Weapon Grave at Suontaka Vesitorninmäki, Finland. *European Journal of Archaeology* 25(1): 42–60. <https://doi.org/10.1017/eea.2021.30>
- Nielsen-Marsh, C. M., Stegemann, C., Hoffmann, R., Smith, T., Feeney, R., Toussaint, M., Harvati, K., Panagopoulou, E., Hublin, J.-J. & Richards, M. P. 2009. Extraction and sequencing of human and Neanderthal mature enamel proteins using MALDI-TOF/TOF MS. *Journal of Archaeological Science* 36(8): 1758–1763. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2009.04.004>
- Porto, I. M., Laure, H. J., de Sousa, F. B, Rosa, J. C. & Gerlach, R. F. 2011. New techniques for the recovery of small amounts of mature enamel proteins. *Journal of Archaeological Science* 38(12): 3596–3604. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.08.030>

- Stewart, N. A., Gerlach, R. F., Gowland, R. L., Gron, K. J. & Montgomery, J. 2017. Sex determination of human remains from peptides in tooth enamel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(52): 13649–13654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714926115>
- Stewart, N. A., Molina, G. F., Mardegan, J. P., Nathan, I., Yates, A., Sosovicka, M., Vieira, A. R., Roberto, S., Line, P., Montgomery, J. & Gerlach, R. F. 2016. The identification of peptides by nanoLC-MS/MS from human surface tooth enamel following a simple acid etch extraction. *RSC Advances* 6: 61673–61679. <https://doi.org/10.1039/C6RA05120K>
- Sullivan, K. M., Mannucci, A., Kimpton, C. P. & Gill, P. 1993. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques* 15(4): 636–641.
- Tiina Väre (FT, KTM) työskentelee Oulun yliopistossa, Arkeologian oppiaineessa Suomen Akatemian tutkijatohtorina tutkimusaiheenaan varhaismodernit imetystavat Suomen länsirannikolla hammasluun stabiili-isotooppianalyysien perusteella. tiina.vare@oulu.fi
- Mikko Finnilä (FT) toimii akatemiatutkijana Oulun yliopiston Lääketieteen tekniikan ja terveystieteiden tutkimusyksikössä. Hänen tutkimusalaansa ovat etenkin tuki- ja liikuntaelinsairaudet ja biomateriaalit. mikko.finnila@oulu.fi
- Sanna Palosaari (FT) on biokemisti, joka työskentelee Translationaalisen lääketieteen tutkimusyksikössä Oulun yliopiston lääketieteellisessä tiedekunnassa tutkien nivelreuman, tupakan ja metallien soluvaikutuksia. sanna.palosaari@oulu.fi

Loppuviitteet

- 1 Peptidi SIRPPYPPSY (monoisotopic [M + 2H]+2 mass =540.2796 m/z).
- 2 Peptidi SM(ox)IRPPY (monoisotopic [M + 2H]+2 mass 440.2233 m/z).