

УДК 577.112.5

## ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОЛА ЧЕЛОВЕКА ПЕПТИДОМНЫМ АНАЛИЗОМ ЭМАЛИ ЗУБОВ РАЗЛИЧНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ГЕНЕРАЦИИ, АРХЕОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА И ТАФНОМИЧЕСКОЙ СОХРАННОСТИ\*

© 2020 Р.Х. Зиганшин<sup>1\*\*</sup>, Н.Я. Березина<sup>2</sup>, П.Л. Александров<sup>1</sup>,  
В.В. Рябинин<sup>1</sup>, А.П. Бужилова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 Москва, Россия; электронная почта: rustam.ziganshin@gmail.com

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт и музей антропологии,  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 125009 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.02.2020

После доработки 16.03.2020

Принята к публикации 19.03.2020

Пол индивидов, определяемый по человеческим останкам – это наиболее востребованная информация при антропологических, археологических и судебно-медицинских исследованиях. При плохой сохранности скелетов взрослых, а также на детских останках определение пола по морфологическим критериям имеет ряд существенных ограничений, поэтому для успешной реализации этой задачи проводятся регулярные попытки привлечения альтернативных методов анализа. В качестве одного из таких методов может быть использован хромато-масс-спектрометрический анализ пептидов зубной эмали. В ходе оптимизации эксперимента было показано, что кислотное травление участка зубной эмали в течение 10 мин с последующим обессоливанием продуктов травления на SDB-RPS StageTips микроколонках и анализа 1/3 части обессоленного образца методом хромато-масс-спектрометрии позволяет надежно определять пол ископаемых останков в широком диапазоне их археологического и биологического возраста, не подвергая существенному разрушению анализируемый образец. Увеличение длительности травления зубной эмали позволяет в 2–3 раза увеличить общее количество идентифицируемых в образце пептидов и, что самое важное, количество выявляемых специфических фрагментов Y изоформы амелогенина в образцах мужских зубов, что позволяет надежно определять пол ископаемых останков. Предложенный метод анализа был апробирован на 8 образцах постоянных зубов и 15 образцах зубов молочной генерации различного археологического возраста и разной степени сохранности. Были выявлены две специфичные для Y изоформы амелогенина пептидные последовательности, одна из которых (SM(+15.99)IRPPYS) обнаружена во всех без исключения образцах мужского пола, а вторая (IRPPYSS(+79.97)), содержащая фосфорилированный остаток Ser66, встречается только в эмали молочных зубов. Можно предположить, что фосфорилирование этого остатка Ser имеет функциональное значение при формировании эмали именно в зубах молочной генерации.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** зубная эмаль, идентификация пола, амелогенины, пептиды, хромато-масс-спектрометрия.

**DOI:** 10.31857/S0320972520050103

### ВВЕДЕНИЕ

Данные по идентификации пола по останкам человека наиболее востребованы в антропологических, археологических и судебно-медицинских исследованиях. В судебной медицине – это один из ключевых признаков для идентификации личности. В археологии и палеоантропологии анализ пола важен для реконструк-

ции социальной и биологической структуры группы, образа жизни с выявлением гендерных особенностей, моделирования демографических и ростовых процессов в прошлом с учетом полового диморфизма.

Определение пола человеческих останков возможно по морфологическим критериям, когда используются измерительные и описательные признаки. В результате разработан общепринятый стандарт, который в большинстве случаев (до 95%) дает успешное определение пола по костным останкам взрослых индивидуумов [1–3]. Однако определение пола у ископаемых останков неполовозрелых индивидуумов,

\* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 5, 2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

равно как и анализ фрагментарных останков взрослых методами морфологии, имеет ряд существенных ограничений, что на порядок снижает востребованность этого источника в научных исследованиях. Для успешной идентификации пола на ископаемых останках такого рода проводятся регулярные попытки привлечения дополнительных морфологических или молекулярных методов, например, анализ ДНК [4–8]. В большинстве случаев дополнительные морфологические критерии работают с разной долей успешной идентификации. Так, например, исследование полового диморфизма тазовой кости неполовозрелых индивидуумов по метрическим признакам, проведенное на паспортизованных коллекциях, показало, что и логистическая регрессия, и анализ дискриминантной функции дают низкие прогностические оценки, самые высокие из которых (0,68) недостаточны для последовательного прогнозирования пола. Анализ описательных морфологических признаков тазовой кости также показал, что они не могут быть использованы для надежного определения пола [9]. Исследования метрических признаков зубов дают более ясную картину идентификации пола. По размерам постоянных клыков достоверность определения пола в некоторых группах достигает 76,5–100% точности, однако в других группах этот признак работает не так успешно [10, 11]. Молекулярные методы и, в частности, анализ ДНК ископаемых индивидуумов идентифицирует пол с высокой долей достоверности. Этот метод, как правило, используют в судебно-медицинской экспертизе и при анализе уникальных ископаемых останков. Однако для анализа многочисленных палеоантропологических серий этот метод не применяется. Обратим внимание, что успешное выделение ДНК возможно только из образцов с хорошей сохранностью органики, что редко встречается на фрагментарных останках, и тем самым значительно ограничивает использование этого метода.

В качестве альтернативного метода с высокой долей успешной идентификации пола на многочисленной выборке может быть использован пептидомный анализ эмали зубов ископаемых останков. Эмаль зубов представляет собой нанокompозитную биокерамику, защищающую зубы от внешних физических и химических повреждений. Являясь наиболее твердой, плотной и кальцифицированной тканью млекопитающих, она позволяет сохранять содержащиеся в ней вещества под действием времени и окружающей среды в течение многих десятков тысяч лет. Созревание зубной эмали происходит при участии ряда белков, секретлируемых специализированными клетками – амелобластами. Ос-

новными из них являются гетерогенные по структуре амелогенины (AMELX и AMELY), амелобластин (AMBN), энамелин (ENAM), матриксная металлопротеиназа 20 (MMP20) и каллекреин 4 (KLK4). Амелогенины являются мажорными структурными белками органической матрицы зубной эмали, составляющими >90% ее белковой материи. У человека гены амелогенинов локализованы как на X- (ген *AMELX*), так и на Y-хромосоме (*AMELY*), причем структуры белков, кодируемые этими генами диморфны, т.е. имеют отличия в аминокислотных последовательностях, которые позволяют отличить эти белки друг от друга. Оба гена экспрессируют свои продукты, т.е. в состав зубной эмали женщин входит продукт экспрессии гена *AMELX*, а у мужчин – продукты экспрессии генов *AMELX* и *AMELY*, при этом уровень экспрессии гена *AMELY* составляет ~10% от уровня экспрессии *AMELX* [12]. При созревании зубной эмали, одновременно с завершением ее минерализации, происходит массовая протеолитическая деградация белков ее органической матрицы, в результате которой в состав зубной эмали вышеперечисленные белки входят уже в виде пептидных фрагментов. Целью настоящей работы являлась оптимизация условий выделения и идентификации пептидов из зубной эмали человека с использованием хромато-масс-спектрометрии с учетом археологической древности, тафономической сохранности эмали зуба и принадлежности зубов разным биологическим генерациям (молочной и постоянной).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Образцы зубов.** Образцы для исследования были получены из нескольких антропологических коллекций, большая часть которых хранится в фондах НИИ и Музея антропологии МГУ. Они различаются археологической древностью и тафономической сохранностью (табл. 1).

1) Один образец (16) из могильника каменного века Минино I – самый древний в исследованной выборке, относят по результатам радиоуглеродного анализа к эпохе мезолита,  $9435 \pm 55$  лет назад (Вологодская область, Россия) [13]. Это верхний клык постоянной генерации хорошей сохранности без видимых повреждений.

2) Два образца (17 и 18) от разных половозрелых индивидуумов из пещеры Кайлю, предположительно, относят к эпохе неолита, VI–V тыс. до н. э. (Восточный Прикаспий, Туркменистан) [14]. Это 2 постоянных зуба верхней и нижней челюстей плохой сохранности (один – предкоронной и один – резец). Эмаль коронки зубов

сильно эродирована из-за тафономических условий захоронения. В одном случае дегенеративные процессы затронули не только коронку зуба (эмаль), но и дентин. Таким образом, сохранность этих образцов в одном случае средняя, в другом — плохая.

3) 18 образцов (1–14 и 19–22) принадлежат останкам из раннесредневекового могильника Мамисондон, VII–IX вв. н. э. (Республика Северная Осетия — Алания) [15]. Присутствуют как зубы молочной генерации (14 зубов), так и постоянной (4 зуба) от разных индивидуумов. В целом эмаль зубов хорошей сохранности, коронки полностью сформированы и без видимых повреждений. В двух случаях (3 и 8) анализировали зубы детей в возрасте до года, у которых коронки молочной генерации зубов сформировались, а корень зуба находился в начальной стадии развития. Они использовались в эксперименте для сравнительной оценки присутствия амелогенинов в эмали еще не сформированного зуба молочной генерации. В целом толщина эмали на молочной генерации зубов была меньше, что подтверждается другими исследованиями [16–18]. В этом случае все образцы молочной генерации оценивались как условно хорошей сохранности, а зубы постоянной генерации — как хорошей сохранности.

4) Один образец (23) датируется 1812–1813 гг. и относится к половозрелому индивидууму из госпитального кладбища солдат армии Наполеона г. Кенигсберга (ныне г. Калининград) [19]. Это верхний резец постоянной генерации хорошей сохранности без видимых повреждений. Эмаль коронки отличалась исключительно хорошей сохранностью.

5) Один образец молочного зуба (15) принадлежит современному ребенку. Зуб без видимых повреждений, нижний первый коренной зуб. Как и другие зубы молочной генерации, был отнесен к условно хорошей сохранности.

Всего в работе были использованы образцы от 23 индивидуумов, причем 15 молочных зубов отличались условно хорошей сохранностью, 6 постоянных зубов — хорошей сохранностью, 1 постоянный зуб — средней сохранностью, 1 постоянный зуб — плохой сохранностью.

**Методы анализа пола.** Пол всех половозрелых индивидуумов, вошедших в анализ, был определен методами антропологии [1–3]. Для анализа пола детских скелетов (серия Мамисондон) использовали археологический критерий погребального обряда, когда останки женского пола хоронили на боку, а мужского — на спине [15]. В нескольких случаях в серии Мамисондон пол детей (11 индивидов) было невозможно установить по археологическому критерию в связи с

посмертным нарушением положения скелета в погребении (образцы 1–11, табл. 1). Кроме того, в этой серии отмечен случай несогласованности идентификации пола одного взрослого индивида по археологическому (женский пол) и антропологическому (мужской пол) критериям (образец 20, табл. 1) В этих случаях пол определяли только методом пептидного анализа зубной эмали. Определение пола одного взрослого индивида в серии Мамисондон (образец 22, табл. 1), помимо примененных методов, подтверждено методами генетики.

**Травление зубной эмали.** Травление зубной эмали и экстракцию из нее пептидов проводили по модифицированной методике, описанной ранее [20]. Поскольку в предварительных экспериментах, в которых поверхность зубов до основной процедуры травления механически очищали от возможных загрязнений тонким абразивом и протравливали 1,5 М HCl в течение 1 мин, не было обнаружено принципиальных отличий в списках идентифицированных пептидов от тех же образцов, у которых другую часть зубной эмали просто последовательно промывали этиловым спиртом и деионизованной водой, в дальнейшем от этой предварительной обработки зуба было решено отказаться. Для травления зубной эмали использовали 1,5 М HCl. В качестве реакторов для травления использовали крышки микропробирок 0,5 мл. В реактор вносили 80 мкл 1,5 М HCl, зуб фиксировали при помощи пинцета, зажимая его в лапках штатива, и помещали над реактором так, чтобы эмаль была погружена в раствор кислоты. Использовали 3 схемы травления:

1) 3 последовательные инкубации одной и той же части зубной эмали в 1,5 М HCl в течение 4-х мин каждая;

2) инкубация участка зубной эмали в 1,5 М HCl в течение 4-х мин;

3) инкубация участка зубной эмали в 1,5 М HCl 10-ти мин.

Растворы, полученные в результате травления эмали, замораживали в жидком азоте, высушивали на центрифужном вакуумном испарителе SpeedVac («Savant», Франция) и хранили до использования при  $-85^{\circ}\text{C}$ .

**Обессоливание пептидов на SDB-RPS StageTips микроколонках.** Микроколонки для обессоливания пептидов изготавливали из наконечника для автоматических пипеток (200 мкл) и двух кусочков мембраны Empore SDB-RPS («3M», США), вырезанных иглой 14 калибра. Высушенный продукт протравливания зубной эмали растворяли в 100 мкл 1% TFA (трифторуксусная кислота) («Merck», Германия) и наносили на микроколонку, используя цент-

Таблица 1. Список проанализированных образцов зубов

Номер образца	Происхождение образца	Датировка	Класс зуба*	Сохранность зуба	Возраст, лет	Успешность идентификации пола по данным**			Пол
						Археологии	Антропологии	Пептидомики	
1	Мамисондон, ОЧМ, п. 15	раннее средневековье	i	условно хорошая	0,5–1	x	x	+	♂
2	Мамисондон, X-1, п. 21	раннее средневековье	i	условно хорошая	0,75–1	x	x	+	♂
3	Мамисондон, X-1, п. 23	раннее средневековье	i	условно хорошая	0,25–0,75	x	x	+	♂
4	Мамисондон, ОЧМ, п. 40	раннее средневековье	m	условно хорошая	5–7	x	x	+	♂
5	Мамисондон, ОЧМ, п. 41	раннее средневековье	i	условно хорошая	0,75–1,2	x	x	+	♂
6	Мамисондон, X-1, п. 43А	раннее средневековье	i	условно хорошая	1,2–2,6	x	x	+	♂
7	Мамисондон, X-1, п. 51Б	раннее средневековье	i	условно хорошая	1,5–2,5	x	x	+	♂
8	Мамисондон, X-1, п. 51В	раннее средневековье	i	условно хорошая	0,75–1	x	x	+	♂
9	Мамисондон, ОЧМ, п. 52	раннее средневековье	i	условно хорошая	2–3	x	x	+	♂
10	Мамисондон, X-1, п. 65В, ск1	раннее средневековье	m	условно хорошая	1–2	x	x	+	♂
11	Мамисондон, X-1, п. 65В, ск2	раннее средневековье	m	условно хорошая	1,5–2	x	x	+	♀
12	Мамисондон, X-1, п. 48Б	раннее средневековье	m	условно хорошая	9–10	+	x	+	♀
13	Мамисондон, ОЧМ, п.94Б	раннее средневековье	c	условно хорошая	1–1,5	+	x	+	♀
14	Мамисондон, X-1, п. 43Б	раннее средневековье	m	условно хорошая	5–6	+	x	+	♂
15	Москва	XXI в.	m	условно хорошая	8–9	контроль	контроль	+	♂
16	Минино I, п.19, инд 3	мезолит	C	хорошая	20–29	x	+	+	♂
17	Кайлю, п. 1	неолит	P	средняя	20–35	x	x	+	♂
18	Кайлю, п. 2	неолит	I	плохая	30–49	x	x	+	♀
19	Мамисондон, ОЧМ, п. 61	раннее средневековье	P	хорошая	12–14	+	x	+	♂
20	Мамисондон, X-1, п. 53	раннее средневековье	C	хорошая	35–49	–	+	+	♂
21	Мамисондон, ОЧМ, п. 13	раннее средневековье	M	хорошая	35–45	+	+	+	♀
22	Мамисондон, X-1, п.34***	раннее средневековье	C	хорошая	20–29	+	+	+	♂***
23	Кенигсберг, L-32	XIX в.	P	хорошая	18–20	x	+	+	♂

Условные обозначения: \* I – резцы, C – клыки, P – премоляры, M – моляры; строчные буквы – молочные зубы, прописные – постоянная генерация.

\*\* «x» – Идентификация невозможна, «–» – идентификация не совпадает с финальным определением, «+» – идентификация совпадает с финальным определением.

\*\*\* Пол данного индивида подтвержден методами генетики.

рифугу 5418 R («Eppendorf», Германия) при 200 g в течение ~6 мин, промывали 100 мкл 0,2% TFA и элюировали 50 мкл раствора, содержащего 50% ацетонитрила в 0,05% TFA. Элюат высушивали на центрифужном вакуумном испарителе досуха и хранили до хромато-масс-спектрометрического анализа при  $-85^{\circ}\text{C}$ . Перед хромато-масс-спектрометрическим анализом пептиды растворяли либо в 30 мкл (для продуктов травления эмали в течение 4-х мин), либо в 15 мкл (для продуктов травления эмали в течение 10-ти мин) водного раствора, содержащего 2% ацетонитрила и 0,1% TFA.

**Хромато-масс-спектрометрический анализ пептидов.** Разделение пептидов проводили на хроматографической системе Ultimate 3000 Nano LC System («Thermo Fisher Scientific», США), сопряженной с масс-спектрометром Q Exactive Plus («Thermo Fisher Scientific», США), посредством наноэлектроспрейного источника («Thermo Fisher Scientific», США). На предколонку (100 мкм  $\times$  2 см, Reprosil-Pur C18-AQ 1,9  $\mu\text{m}$  («Dr. Maisch GmbH», Германия)) наносили 5 мкл обессоленного раствора пептидов и элюировали их на колонку (100 мкм  $\times$  50 см, Reprosil-Pur C18-AQ 1,9  $\mu\text{m}$  («Dr. Maisch GmbH», Германия)) линейным градиентом раствора Б (0,1% муравьиной кислоты (FA), 19,9% вода, 80% ацетонитрила) в А (0,1% FA) при скорости потока 440 нл/мин. Градиент: 3 $\rightarrow$ 35% Б за 55 мин; 35 $\rightarrow$ 55% Б за 5 мин; 55 $\rightarrow$ 99% Б за 1 мин. Перед каждой новой загрузкой колонку уравнивали при 3% раствора Б в А в течение 5 мин. Масс-спектрометрические данные сохраняли при автоматическом переключении между MS1 сканированием и вплоть до 5 MS/MS-сканирований (метод topN). Целевое значение для MS1-сканирования было выставлено  $3 \times 10^6$  в диапазоне 350–2000  $m/z$  с максимальным временем инжектирования ионов 50 мс и разрешением 70 000. Изолирование ионов-прекурсоров осуществляли при ширине окна 1,4  $m/z$  и фиксированной первой массе 100.0  $m/z$ . Ионы-прекурсоры фрагментировали методом высокоэнергетической диссоциации с нормализованной энергией столкновения 29 эВ. MS/MS-сканы сохраняли с разрешением 17 500 и при значении  $2 \times 10^5$  для целевых ионов с максимальным временем инъекции ионов 80 мс. Полученные масс-спектрометрические данные переданы в консорциум ProteomeXchange через репозиторий PRIDE с идентификатором массива данных PXD017965 [21].

**Анализ хромато-масс-спектрометрических данных.** Анализ MS/MS-данных проводили при помощи компьютерной программы PEAKS Studio 8.0 build 20160908 [22]. Первичные структуры пептидов, генерируемые программой

PEAKS Studio, анализировали против базы данных белковых последовательностей UniProtKB/Swiss-Prot (03.2019) [6], содержащей 20 417 записей для таксона *Homo sapiens*, в которой изоформа 1 гена *AMELX* (Q99217-1) была заменена на изоформу 3 этого белка (Q99217-3), имеющую наибольшую степень гомологии с канонической изоформой белка, кодируемого геном *AMELX* (Q99218-2). Анализ проводили со следующими настройками: окисление Met, дезамидирование Asn/Gln и фосфорилирование Ser/Thr/Tyr – вариабельные модификации; специфичность протеазы не указывали. Допустимый уровень ложноположительных идентификаций (FDR) пептидов был установлен на уровне 0,01 и определялся путем корреляции массива MS/MS-данных с реверсной базой данных белковых последовательностей, которая генерировалась программой PEAKS Studio. Идентификацию пептидов осуществляли при допустимом начальном отклонении массы иона-прекурсора до 10 м.д. (миллионных долей) и допустимом отклонении массы фрагментов 0,05 Да. В финальный список идентифицированных белков включали только те из них, для которых было найдено не менее 2-х уникальных пептидов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день известно, что ген *AMELX* в результате альтернативного сплайсинга продуцирует три изоформы амелогенина, сиквенсы которых приведены в базе данных UniProtKB под идентификаторами Q99217-1, Q99217-2 и Q99217-3. Канонической аминокислотной последовательностью белка, кодируемого у человека геном *AMELX*, считается изоформа Q99217-1. Изоформа Q99217-2 отличается от канонической структуры отсутствием фрагмента 19–34, а изоформа Q99217-3 – вставкой пептида ENSHSQAINVDRTAL вместо 34-го аминокислотного остатка (E). Ген *AMELY* в результате альтернативного сплайсинга продуцирует две изоформы белка (идентификаторы UniProtKB Q99218-1 и Q99218-2). В качестве канонической структуры Y изоформы амелогенина принята последовательность Q99218-2, изоформа Q99218-1 отличается от нее отсутствием фрагмента (35–48), имеющего структуру NSHSQAINVDRIAL. Выравнивание наиболее близких друг другу аминокислотных последовательностей X (Q99217-3) и Y (Q99218-2) изоформ амелогенина приведено на рис. 1. Видно, что отличия между изоформами обусловлены заменой ~20 аминокислотных остатков, более-менее равномерно распределенных по сиквенсу белка.

```

Q99217-3|AMELX_HUMAN MGTWILFACLWGAAFAMPLPPHPGHHPGYINFSYENSHSQAINVDRTALVLTPLKWYQS-I 45
Q99218-2|AMELY_HUMAN MGTWILFACLVGAAFAMPLPPHPGHHPGYINFSYENSHSQAINVDRTALVLTPLKWYQSMI 60
*****:*****:*****
Q99217-3|AMELX_HUMAN RPPYPSYGYEPMGGWLHHQIIPVLSQQHPPTHTLQPHHHIPVVPAQQPVIPQQFMPMPVPG 105
Q99218-2|AMELY_HUMAN RPPYPSYGYEPMGGWLHHQIIPVLSQQHPPTHTLQPHHHIPVVPAQQPVIPQQFMPMPVPG 120
***:*****:*****:***:***
Q99217-3|AMELX_HUMAN QHSMTPIQHNQPNLPPFAQQPYQRPQVPQRPHQRPMPQPPVPVHPMPQLPFPPLPPMPFPMQ 165
Q99218-2|AMELY_HUMAN QHSMTPIQHNQPNLPPFAQQPYQRPQVPQRPHQRPMPQPPVPVHPMPQLPFPPLPPMPFPLR 180
*:***:*****:*****:*****:*****:***
Q99217-3|AMELX_HUMAN PLPPMLPDLTLEAWPSTDKTKREEVD 191
Q99218-2|AMELY_HUMAN PLPPMLPDLTLEAWPSTDKTKQEEVD 206
***:***:*****:*****:***

```

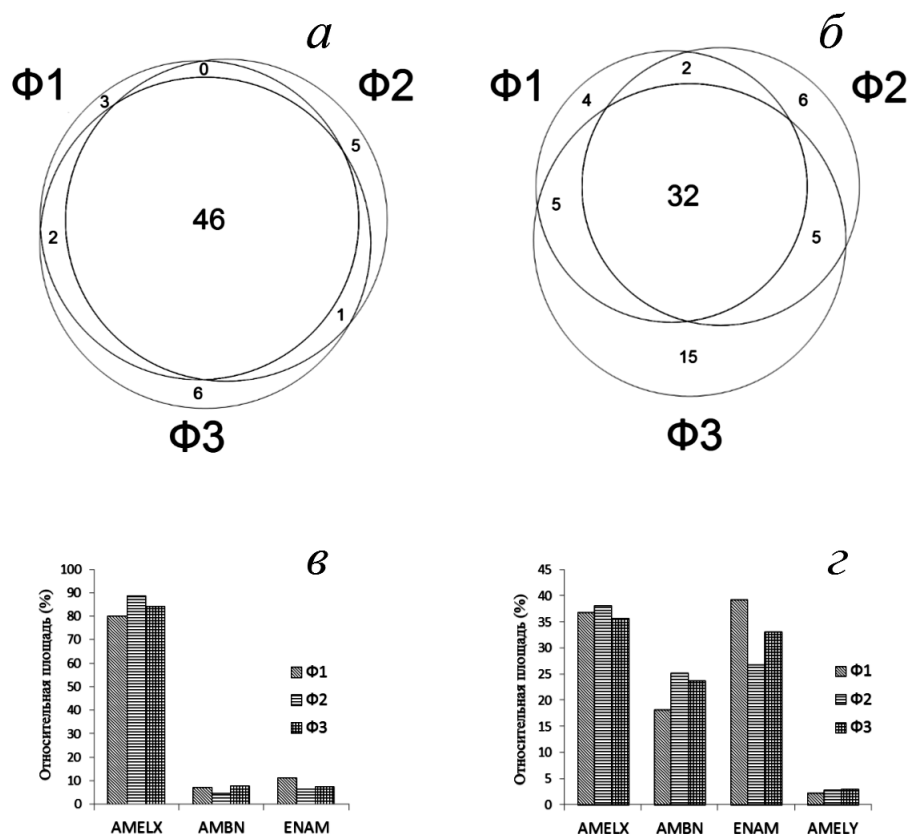
**Рис. 1.** Выравнивание сиквенсов белков, кодируемых генами *AMELX* и *AMELY* (идентификаторы в базе данных UniProtKB Q99217-3 и Q99218-2 соответственно). Отличающиеся в сиквенсах белков аминокислотные остатки выделены на последовательности белка Q99218-2 полужирным шрифтом с подчеркиванием. Курсивом с полужирным шрифтом на сиквенсах белков выделена аминокислотная последовательность сигнального пептида

Предложенный ранее метод хромато-масс-спектрометрического анализа продуктов кислотного травления зубной эмали [20] позволил авторам показать принципиальную возможность установления пола ископаемых останков по пептидным фрагментам X и Y изоформ амелогенина. Для оптимизации условий выделения пептидов из зубной эмали и проверки однородности распределения пептидов в толще зубной эмали нами был проведен эксперимент по последовательному травлению эмали постоянных зубов ископаемых останков женщины и мужчины (образцы 21 и 22 в табл. 1) 1,5 M HCl. От каждого зуба было получено по 3 фракции: 0–4 мин (Ф1); 4–8 мин (Ф2); 8–12 мин (Ф3). После обезсоливания полученных фракций на SDB-RPS StageTips микроколонках и их высушивания на центрифужном вакуумном испарителе образцы растворяли в 30 мкл 0,1% TFA, и 5 мкл полученного раствора анализировали методом хромато-масс-спектрометрии. В результате этого анализа и последующей корреляции полученных массивов MS/MS спектров против белковых последовательностей человека, содержащихся в базе данных Uniprot KB/Swiss-Prot, во фракциях Ф1–Ф3 всего было идентифицировано 80 белков: в образце зубной эмали мужчины 73 белка (49 белковых групп), а в зубной эмали женщины – 63 белка (36 белковых групп) (список идентифицированных белков приведен в табл. S1 в Приложении). Распределение идентифицированных белков по фракциям в каждом образце и сравнение значений нормированных на общий ионный ток суммарных площадей под уникальными для основных белков зубной эмали пептидными фрагментами, идентифицированными в различных фракциях, представлено на рис. 2.

Из диаграмм, представленных на рис. 2, видно, что качественный состав белков и их количественное содержание в толще зубной эмали может быть не однородным.

В результате хромато-масс-спектрометрического анализа фракций Ф1–Ф3 образца 22 было идентифицировано в общей сложности 103 уникальных для Y изоформы амелогенина пептидных фрагментов (табл. S2 в Приложении). Необходимо отметить, что из 103-х пептидных структур, приведенных в табл. S2, только 5 пептидов не содержит в своем составе либо деамидированные остатки Gln, либо окисленные остатки Met. Данный факт говорит о необходимости обязательного включения подобных модификаций в качестве возможных (так называемые переменные модификации) при корреляции MS/MS спектров с базой данных белковых последовательностей.

Для валидации метода выделения и анализа пептидов зубной эмали нами были проанализированы 5 образцов постоянных зубов различного археологического возраста и разной степени сохранности (образцы 16–20 и 23, табл. 1), а также 12 образцов зубов молочной генерации (образцы 1–12, табл. 1). Количественные результаты идентификации пептидных фрагментов основных белков зубной эмали этих образцов сведены в табл. 2. Все образцы молочных зубов относились к одному археологическому периоду (раннее средневековье, VII–IX вв. н.э.), а биологический возраст детей варьировал 0,5–10 лет (табл. 1). Как видно из табл. 2, количественные показатели для всех молочных зубов, за исключением образцов 5 и 9, очень близки и позволяют однозначно установить половую принадлежность индивидов, которым они принадлежали. Контрольный образец молочного зуба (15), при-



**Рис. 2.** Результаты пептидомного анализа фракций  $\Phi 1$ – $\Phi 3$ , полученных от образцов 21 и 22. Распределение белков-предшественников идентифицированных пептидов во фракциях  $\Phi 1$ – $\Phi 3$ , полученных при последовательном травлении зубной эмали образцов 21 (а) и 22 (б) (цифры на диаграмме Венна означают количество идентифицированных белков-предшественников пептидов). Относительное содержание основных белков зубной эмали во фракциях  $\Phi 1$ – $\Phi 3$  образцов 21 (в) и 22 (г). По оси ординат отложена в % относительная площадь под пиками пептидов, уникальных для указанных белков во фракции, нормированная на общий ионный ток. AMELX – изоформ 3 амелогенина X изоформ; AMBN – амелобластин; ENAM – энамелин; AMELY – амелогенин Y изоформ

надлежавший современному мальчику 8,5 лет, также показал близкие результаты. Здесь необходимо отметить, что если для однозначного установления мужского пола достаточно выявить в пептидоме зубной эмали хотя бы один фрагмент, специфичный для Y изоформы амелогенина, то отсутствие таких пептидов в образце не обязательно свидетельствует о том, что этот образец принадлежал индивиду женского пола. Так, например, в образцах 5 и 9 не было выявлено ни одного фрагмента амелогенина, специфичного для Y изоформы этого белка. Однако общее количество идентифицированных пептидных фрагментов основных белков зубной эмали в этих образцах настолько мало, что фрагменты Y изоформы амелогенина, содержание которой в эмали зуба мужчин составляет ~10% от содержания ее X изоформы, могли быть не выявлены просто в силу их содержания в этих образцах ниже порога детекции. Что касается результатов пептидомного анализа постоянных зубов (образцы 16–23, табл. 2), то первое, что

бросается в глаза – количество идентифицированных в них пептидов зависит не столько от археологического возраста образцов, сколько от степени их сохранности. Так, например, в образце 16, археологический возраст которого насчитывает не менее 9,5 тыс. лет, было идентифицировано примерно столько же пептидов, сколько и в образце 20 (археологический возраст не более 1300 лет), и несколько меньше, чем в образце 23 (археологический возраст немногим более 200 лет).

В недавно вышедшей работе американских исследователей для случаев идентификации малого числа пептидных фрагментов X изоформы амелогенина и при отсутствии фрагментов Y изоформы этого белка был предложен вероятностный метод оценки достоверности определения женского пола, как функции логарифма сигнала AMELX\_HUMAN ( $p < 0,0001$ ) с использованием логистической регрессии [23]. В нашем эксперименте был предложен другой, более простой вариант. Из табл. 2 можно увидеть, что

Таблица 2. Основные белки зубной эмали, идентифицированные в образцах зубов при травлении эмали в течение 4 мин

Образцы	Амелобластин (Q9NP70)			Энамелин (Q9NRM1)			Амелогенин X (Q99217-3)			Амелогенин Y (Q99218)		
	площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты		площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты		площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты		площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты	
		всего	уникальные		всего	уникальные		всего	уникальные		всего	уникальные
1	70,01	57	57	4,15	35	35	25,78	51	31	0,06	22	2
2	81,51	42	42	4,93	25	25	13,27	42	24	0,29	20	2
3	85,78	51	51	4,02	33	33	9,97	65	38	0,23	30	3
4	59,85	71	71	16,49	48	48	23,05	85	56	0,61	36	7
5	7,21	21	21	1,54	18	18	91,25	17	17	–	–	–
6	33,69	51	51	35,03	69	69	29,74	78	52	1,54	32	6
7	41,41	52	52	5,64	43	43	49,44	69	42	3,51	33	6
8	66,69	36	36	9,68	35	35	21,31	43	24	2,32	21	2
9	37,00	12	12	1,80	11	11	61,20	9	9	–	–	–
10	20,65	30	30	29,93	56	56	46,72	54	33	2,69	28	7
11	2,77	36	36	3,02	52	52	94,21	61	61	–	–	–
12	11,99	33	33	10,25	26	26	77,77	69	69	–	–	–
16	36,02	74	74	48,41	100	100	15,45	78	39	0,11	43	4
17	27,02	50	50	21,66	61	61	44,95	74	34	6,37	48	8
18	0,96	7	7	0,94	5	5	98,10	34	34	–	–	–
19	51,11	26	26	25,71	28	28	23,07	31	18	0,12	15	2
20	80,85	46	46	11,87	26	26	6,85	73	27	0,43	49	3
21	7,36	146	146	11,43	151	151	81,21	181	181	–	–	–
22	18,81	185	185	40,67	156	156	38,22	241	170	2,30	124	53
23	26,41	178	178	35,87	159	159	35,47	134	84	2,25	65	15

\* При расчете нормированной на общий ионный ток площади учитываются только пептиды, уникальные для данного белка.

для тех образцов зубов индивидов мужского пола, для которых было идентифицировано не менее 31-го пептидного фрагмента X изоформы амелогенина, также было идентифицировано не менее 2-х уникальных фрагментов Y изоформы этого белка. При увеличении длительности травления зубной эмали в 2,5 раза и последующего хромато-масс-спектрометрического анализа третьей части выделенных из зубной эмали пептидов количество идентифицируемых фрагментов X изоформы амелогенина превысило число 31, как минимум в 2 раза, даже в образцах молочных и плохо сохранившихся постоянных зубов (табл. 3). Вместе с этим минимальное количество уникальных для Y изоформы амелогенина пептидов, идентифицированных нами в образцах зубов индивидов мужского пола, по-

высилось от 2-х до 7-ми. В результате этих простых модификаций метода выделения пептидов из зубной эмали образцы 5 и 9, для которых в предыдущем варианте метода пробоподготовки не было идентифицировано ни одного уникального для Y изоформы амелогенина фрагмента, были однозначно определены, как принадлежащие индивидам мужского пола, а принадлежность образца 18 индивиду женского пола была подтверждена. Таким образом, при определении пола человеческих останков по результатам пептидомного анализа зубной эмали важным условием применимости этого метода является степень сохранности образца. Критерием приемлемой для использования этого метода идентификации пола степени сохранности зубной эмали мы предлагаем считать идентифика-



Таблица 3. Основные белки зубной эмали, идентифицированные в образцах зубов при травлении эмали в течение 10 мин

Образцы	Амелобластин (Q9NP70)			Энамелин (Q9NRM1)			Амелогенин X (Q99217-3)			Амелогенин Y (Q99218)		
	площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты		площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты		площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты		площадь под пиками (%)*	идентифицированные пептидные фрагменты	
		всего	уникальные		всего	уникальные		всего	уникальные		всего	уникальные
1	25,40	342	342	3,49	135	135	66,29	124	59	4,82	79	14
2	63,14	288	288	18,47	169	169	15,30	126	55	3,09	84	13
3	10,29	102	102	7,88	67	67	78,62	56	25	3,22	40	9
4	56,49	370	370	24,56	295	295	9,29	208	108	9,66	133	33
5	57,29	183	183	22,57	128	128	19,84	100	45	0,30	65	10
6	66,29	228	227	28,51	166	166	5,12	139	73	0,07	74	9
7	54,11	430	430	34,02	368	368	6,46	224	134	5,41	124	34
8	52,51	144	144	7,23	79	79	37,25	69	26	3,02	50	7
9	65,08	316	316	19,58	167	167	10,93	122	49	4,40	91	18
10	53,85	371	370	31,79	265	265	9,23	151	63	5,13	106	18
11	20,18	327	325	8,28	205	205	71,55	175	175	–	–	–
12	10,84	416	416	9,55	320	320	79,61	273	273	–	–	–
16	42,19	410	410	32,41	325	325	22,29	244	141	3,11	152	49
17	37,82	199	199	52,22	188	188	9,63	96	52	0,32	51	7
18	6,45	35	35	5,43	39	39	88,12	78	78	–	–	–

\* При расчете нормированной на общий ионный ток площади учитываются только пептиды, уникальные для данного белка.

цию в нем не менее 30 пептидных фрагментов X изоформы амелогенина. При идентификации в образце <30 пептидных фрагментов X изоформы амелогенина и отсутствии в нем специфических фрагментов Y изоформы этого белка предлагаем считать качество образца неудовлетворительным для использования этого метода для определения пола. Еще одно важное преимущество предложенного нами метода пробоподготовки – он менее деструктивен, чем использованный американскими коллегами. Их методика требовала измельчение, т.е. полное разрушение коронки зуба [23], в то время как в ходе нашего эксперимента форма и размер коронки визуально не меняются, что сохраняет объект для последующих научных исследований. Кроме того, анализ аминокислотных последовательностей идентифицированных нами пептидов говорит о том, что использование трипсина для гидролиза пептидно-белковой материи, выделяемой из зубной эмали, явно избыточно и не позволяет идентифицировать в образцах дополнительное количество пептидов, специфичных для Y изо-

формы амелогенина. Более того, трипсин гидролизует C-концевой фрагмент Y изоформы амелогенина до коротких пептидов, которые не могут быть идентифицированы в дальнейшем тандемной масс-спектрометрией.

В работе Stewart et al. [24] авторы предложили использовать для определения пола человеческих останков пептидные фрагменты AMELX-(44–52) (SIRPPYPSY) и AMELY-(58–64) (SM<sub>ox</sub>IRPPY), выделяемые из зубной эмали в результате ее 2-х минутного травления. Наличие или отсутствие в образце пептида AMELY-(58–64) предлагалось использовать в качестве однозначного указания на пол. Авторы использовали в своей работе образцы постоянных зубов от 13 человеческих останков взрослых индивидов. Анализ полученных нами массивов масс-спектрометрических данных показал, что далеко не во всех образцах обнаруживаются эти пептиды даже на уровне экстрагированных ионных хроматограмм. В табл. S3 в Приложении приведены аминокислотные последовательности уникальных для Y изоформы амелогенина

пептидных фрагментов, которые были идентифицированы в образцах молочных зубов 1–10. При всем разнообразии структур (табл. S3 в Приложении), только две из них, а именно SM(+15.99)IRPPYS и IRPPYSS(+79.97), содержащие фосфорилированный остаток Ser66, были идентифицированы во всех 10 образцах, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных кандидатов в «маркеры» пола при разработке метода таргетного анализа продуктов травления зубной эмали для определения пола ископаемых останков человека. Интересно, что если пептид SM(+15.99)IRPPYS был идентифицирован также и в эмали постоянных зубов, то пептидные фрагменты Y изоформы амелогенина, содержащие фосфорилированный остаток Ser66, были идентифицированы нами только в молочных зубах. Можно предположить, что фосфорилирование этого остатка Ser имеет функциональное значение при формировании эмали именно в молочных зубах.

Применимость таргетного анализа этих пептидов для идентификации пола человеческих останков требует дополнительной проверки на более обширной выборке образцов.

В результате настоящей работы нами предложен простой и воспроизводимый метод пробоподготовки, хромато-масс-спектрометрического и биоинформатического анализа пептидома зубной эмали, позволяющих надежно и быстро определять пол ископаемых останков в широком диапазоне их археологического и биологического возраста, не подвергая существенному разрушению анализируемый образец. Суть предлагаемого метода заключается в травлении участка зубной эмали 1,5 М HCl в течение 10 мин, обессоливании полученных продуктов травления на SDB-RPS StageTips микроколон-

ках и анализа 1/3 части обессоленного образца методом tandemной хромато-масс-спектрометрии. При условии идентификации в образце не менее 30 пептидных фрагментов X изоформы амелогенина пол образца определяется по наличию или отсутствию в списке идентифицированных пептидов специфических пептидных фрагментов Y изоформы амелогенина. Идентифицированы 2 пептидных фрагмента Y изоформы амелогенина, одна из которых (SM(+15.99)IRPPYS) обнаружена во всех без исключения образцах мужского пола, а вторая (IRPPYSS(+79.97), содержащая фосфорилированный остаток Ser66, встречается только в эмали молочных зубов. Можно предположить, что фосфорилирование этого остатка Ser имеет функциональное значение при формировании эмали именно в зубах молочной генерации.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-29-04125 офм), а также при частичном финансировании Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-39-70020).

**Благодарности.** Авторы приносят благодарность исследовательским группам ARCHCAUCASUS (основной исследователь Svend Hansen) и PALEORIDER (основной исследователь Wolfgang Haak) за предоставление данных об идентификации пола образца 22 методами генетического анализа.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rose, J. C., Anton, S. C., Aufderheide, A. C., Buikstra, J. E., Eisenberg, L., Gregg, J. B., Hunt, E. E., Neiburger, E. J., and Rothschild B. (1991) *Skeletal database committee recommendations*, Paleopathology association, Detroit.
- Ubelaker, D. H. (1978) *Human skeletal remains: excavation, analysis, interpretation*, Aldine Publishing Co. Inc., Chicago, IL.
- Алексеев В. П. (1966) *Остеометрия: методика антропологических исследований*, Наука, Москва.
- Daskalaki, E., Anderung, C., Humphrey, L., and Gotherstrom, A. (2011) Further developments in molecular sex assignment: a blind test of 18th and 19th century human skeletons, *J. Archaeol. Sci.*, **38**, 1326-1330, doi: 10.1016/j.jas.2011.01.009.
- Goncalves, D., Campanacho, V., and Cardoso, H. F. (2011) Reliability of the lateral angle of the internal auditory canal for sex determination of subadult skeletal remains, *J. Forensic Leg. Med.*, **18**, 121-124, doi: 10.1016/j.jflm.2011.01.008.
- Kazzazi, S. M., and Kranioti, E. F. (2017) A novel method for sex estimation using 3D computed tomography models of tooth roots: a volumetric analysis, *Arch. Oral Biol.*, **83**, 202-208, doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.07.024.
- Molleson, T., Cruse, K., and Mays, S. (1998) Some sexually dimorphic features of the human juvenile skull and their value in sex determination in immature skeletal remains, *J. Archaeol. Sci.*, **25**, 719-728, doi: 10.1006/jasc.1997.0215.
- Skoglund, P., Stora, J., Gotherstrom, A., and Jakobsson, M. (2013) Accurate sex identification of ancient human remains using DNA shotgun sequencing, *J. Archaeol. Sci.*, **40**, 4477-4482, doi: 10.1016/j.jas.2013.07.004.
- Blake, K. A. S. (2011) Differences in subadult pubic body widths and the implication for sex determination, *Am. J. Phys. Anthropol.*, **144**, 90-91.
- Khamis, M. F., Taylor, J. A., Malik, S. N., and Townsend, G. C. (2014) Odontometric sex variation in Malaysians with application to sex prediction, *Forensic Sci. Int.*, **234**, 183 e1-e7, doi: 10.1016/j.forsciint.2013.09.019.

11. Viciano, J., Aleman, I., D'Anastasio, R., Capasso, L., and Botella, M. C. (2011) Odontometric sex discrimination in the Herculaneum sample (79 AD, Naples, Italy), with application to juveniles, *Am. J. Phys. Anthropol.*, **145**, 97-106, doi: 10.1002/ajpa.21471.
12. Salido, E. C., Yen, P. H., Koprivnikar, K., Yu, L. C., and Shapiro, L. J. (1992) The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes, *Am. J. Hum. Genet.*, **50**, 303-316.
13. Wood, R. E., Higham, T. F. G., Buzilova, A., Suvorov, A., Heinemeier, J., and Olsen, J. (2013) Freshwater radiocarbon reservoir effects at the burial ground of Minino, north-west Russia, *Radiocarbon*, **55**, 163-177, doi: 10.2458/azu\_js\_rc.v55i1.16448.
14. Шнайдер С. В., Курбанов Р. Н., Алишер кызы С., Ригго, С., Шаньгина М. В., Кривошапкин А. И. (2018) Результаты предварительного изучения памятников Кайло и Куба-Сенгир (Восточный Прикаспий, Туркменистан), *Проблемы археологии, этнографии, антропологии Сибири и сопредельных территорий*, **24**, 184-189, doi: 10.17746/2658-6193.2018.24.184-189.
15. Албегова З. Х., Верещинский-Бабайлов Л. И. (2010) Раннесредневековый могильник Мамисондон. Результаты археологических исследований 2007–2008 гг. в зоне строительства водохранилища Зарамагских ГЭС, *Материалы охранных археологических исследований*, **11**, Таус, Москва, с 492.
16. De Menezes Oliveira, M. A., Torres, C. P., Gomes-Silva, J. M., Chinelatti, M. A., De Menezes, F. C., Palma-Dibb, R. G., and Borsatto, M. C. (2010) Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth, *Microsci. Res. Tech.*, **73**, 572-577.
17. Wilson, P. R., and Beynon, A. D. (1989) Mineralization differences between human deciduous and permanent enamel measured by quantitative microradiography, *Arch. Oral Biol.*, **34**, 85-88, doi: 10.1016/0003-9969(89)90130-1.
18. Бужилова А. П., Потрахов Н. Н., Потрахов Е. Н., Грязнов А. Ю. (2013) Анализ маркеров стресса методом микрофокусной рентгенографии (по антропологическим материалам эпох каменного века), *Биотехносфера*, **2**, 46-51.
19. Хохлов А. Н., Бужилова А. П. (2010) *Братские могилы эпохи Наполеоновских войн в Калининграде*, ИА РАН, Москва.
20. Stewart, N. A., Molina, G. F., Issa, J. P. M., Yates, N. A., Sosovicka, M., Vieira, A. R., Line, S. R. P., Montgomery, J., and Gerlach, R. F. (2016) The identification of peptides by nanoLC-MS/MS from human surface tooth enamel following a simple acid etch extraction, *RSC Adv.*, **6**, 61673-61679, doi: 10.1039/c6ra05120k.
21. Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D. J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Perez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yilmaz, S., Tiwary, S., Cox, J., Audain, E., Walzer, M., Jarnuczak, A. F., Ternent, T., Brazma, A., Vizcaíno, J. A. (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data, *Nucleic Acids Res.*, **47**, D442-D450, doi: 10.1093/nar/gky1106.
22. Ma, B., Zhang, K., Hendrie, C., Liang, C., Li, M., Doherty-Kirby, A., and Lajoie, G. (2003) PEAKS: powerful software for peptide *de novo* sequencing by tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 2337-2342, doi: 10.1002/rcm.1196.
23. Parker, G. J., Yip, J. M., Eerkens, J. W., Salemi, M., Durbin-Johnson, B., Kiesow, C., Haas, R., Buikstra, J. E., Klaus, H., Regan, L. A., Rocke, D. M., and Phinney, B. S. (2019) Sex estimation using sexually dimorphic amelogenin protein fragments in human enamel, *J. Archaeol. Sci.*, **101**, 169-180, doi: 10.1016/j.jas.2018.08.011.
24. Stewart, N. A., Gerlach, R. F., Gowland, R. L., Gron, K. J., and Montgomery, J. (2017) Sex determination of human remains from peptides in tooth enamel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 13649-13654, doi: 10.1073/pnas.1714926115.

## OPTIMIZATION OF THE METHOD OF HUMAN SEX IDENTIFICATION BY PEPTIDOMIC ANALYSIS OF TEETH ENAMEL OF DIFFERENT BIOLOGICAL GENERATION, ARCHAEOLOGICAL AGE AND TAPHONOMIC PRESERVATION OF TEETH\*

R. H. Ziganshin<sup>1\*\*</sup>, N. Ya. Berezina<sup>2</sup>, P. L. Alexandrov<sup>1</sup>, V. V. Ryabinin<sup>1</sup>, and A. P. Buzhilova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry of the Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia; E-mail: rustam.ziganshin@gmail.com*

<sup>2</sup> *Anuchin Research Institute and Museum of Anthropology of Lomonosov Moscow State University, 125009 Moscow, Russia*

Received February 17, 2020

Revised March 16, 2020

Accepted March 19, 2020

Determination of biological sex to human remains is a fundamental requirement in anthropological, archeological, and forensic anthropological studies. Sex determination based on morphological criteria is significantly limited in the cases of juvenile remains and adult skeletons in a poor state of preservation. Regular attempts have been made to use alternative techniques to resolve this issue, including analysis of tooth enamel peptides by liquid chromatography/mass spectrometry. Optimization of this method involving acid etching of tooth enamel for 10 min followed by desalting of the products of etching on SDB-RPS StageTips microcolumns and analysis of desalted sample (1/3) by liquid chromatography/mass spectrometry allowed reliable sex determination to fossil remains within a wide range of archeological and biological ages without destructing analyzed teeth. Increasing the duration of enamel etching ensured a 2 to 3-fold increase in the total number of identified peptides and, more importantly, in the number of identified fragments of amelogenin Y isoform specific for male teeth, which facilitated reliable sex determination of fossil remains. The suggested technique was tested with 8 permanent and 15 deciduous teeth of different archeological age and different degree of preservation. Two amelogenin Y-specific peptide sequences were identified. One of these peptides [SM(+15.99)IRPPYS] was found in all male-derived samples without exception; the other peptide [IRP-PYSS(+79.97)], which contained phosphorylated Ser66 residue, was found only in the enamel from deciduous teeth, which suggests that phosphorylation of Ser66 plays a role in the enamel formation in deciduous teeth.

**Keywords:** tooth enamel, sex determination, amelogenins, peptides, liquid chromatography–mass spectrometry