

# Kapitola 16 Klonování genů a analýza DNA ve forenzním lékařství

Analýza DNA při identifikaci osob podezřelých ze spáchání trestného činu . . . . .	346	Určení pohlaví pomocí analýzy DNA . . . . .	353
Vyšetřování příbuzenských vztahů zjišťováním profilu DNA . . . . .	350	Archeogenetika - využití DNA ke studiu evoluce člověka . . . . .	356

Poslední biotechnologickou oblastí, kterou se budeme zabývat, je forenzní věda. Tisk nás prakticky každý týden informuje o nějakém sledovaném kriminálním případě, který se díky analýze DNA podařilo objasnit. Molekulární biologie v soudnictví se týká především analýz DNA využívaných při identifikaci osob z vlasů, skvrn od krve a dalších stop nalezených na místě činu. V médiích se těmito technikám říká **genetický fingerprinting** neboli **genetické otisky**, i když přesnější označení by bylo **zjišťování profilu DNA (DNA profiling)**. V této kapitole se nejdříve zaměříme na metody snímání genetických otisků a zjišťování profilu DNA a na to, jak fungují při identifikaci osob a zjišťování příbuznosti. To nás přivede k aplikaci genetických technik také v jiných oblastech forenzní vědy, především v archeologii.

## 16.1

### Analýza DNA při identifikaci osob podezřelých ze spáchání trestného činu

Je velmi nepravděpodobné, že by osoba, která spáchala trestný čin, nezanechala na místě činu žádnou stopu své DNA. Vlasy, skvrny od krve, a dokonce i obyčejné otisky prstů obsahují dostatečné množství DNA analyzovatelné polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Analýza nemusí proběhnout bezprostředně poté; na základě analýzy DNA odebrané z archivovaného materiálu byla během posledních několika let uzavřena řada starých případů a pachatel postaven před soud. Jak tedy tyto účinné metody fungují?

Metody genetického fingerprintingu a zjišťování profilu DNA vycházejí z toho, že s výjimkou jednovaječných dvojčat nejsou kopie genomu dvou různých jedinců identické. Lidský genom je samozřejmě u všech víceméně stejný - stejné geny jsou uspořádány stejně a obsahují stejné úseky mezigenové DNA. Avšak stejně tak jako genomy jiných organismů také lidský

genom obsahuje četné **polymorfismy**, místa, kde se nukleotidová sekvence liší. S nejdůležitějšími z těchto polymorfních míst jsme se už setkali. Jedná se o variabilní sekvence totožné se sekvencemi používanými jako DNA markery při mapování genomu (str. 261). Patří k nim délkové polymorfizmy restrikčních fragmentů (RFLP), krátké tandemové repetice (STR) a polymorfizmy jednotlivých nukleotidů (SNP). Všechny tři typy se mohou nacházet v genech i v mezigenových oblastech. V lidském genomu se nachází celkem několik milionů polymorfních míst, k nejčastějším patří SNPs.

### 16.1.1

#### **Genetický fingerprinting pomocí hybridizačního screeningu**

Metodu, při níž analýza DNA slouží k identifikaci osob, vyvinul v polovině 80. let 20. století Sir Alec Jeffreys z univerzity v Leicesteru. Jeho technika nepracovala ani s jedním z uvedených polymorfních míst, ale s jiným typem variace lidského genomu zvaným **minisatelity (hypervariable dispersed repetitive sequence)**. Jde o repetitivní sekvenci vyskytující se na různých místech lidského genomu. Pro tyto sekvence jsou charakteristické proměnlivé genomové pozice: v genomech různých lidí se nacházejí na různých místech (Obr. 16.1(a)).

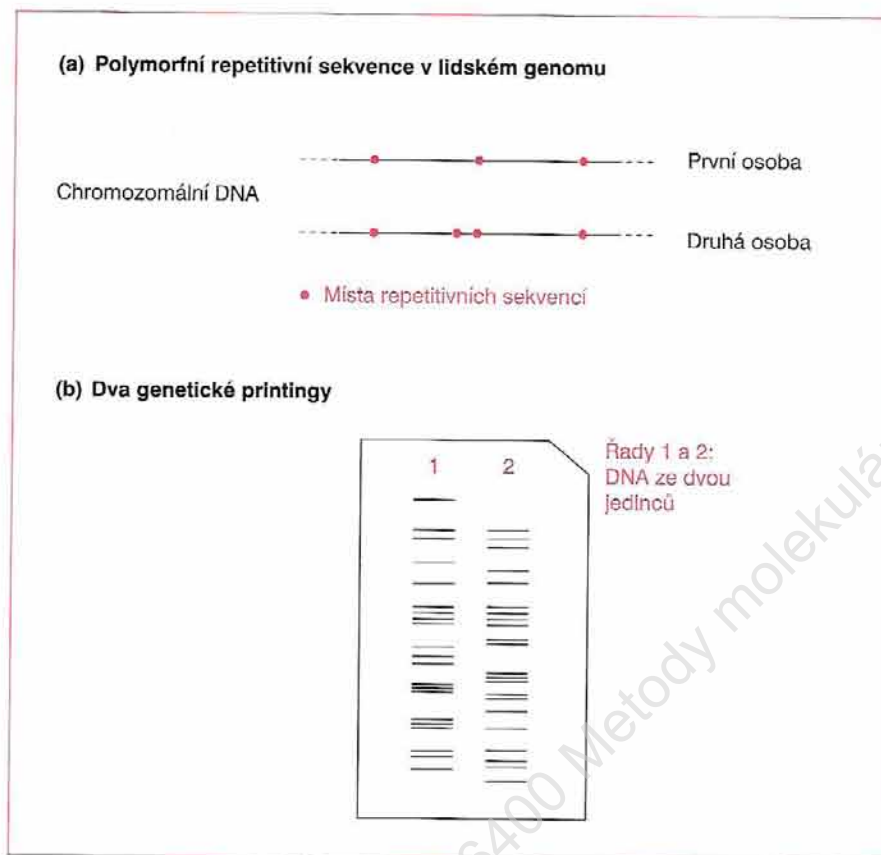
Konkrétní repetici použitou při prvním snímání otisků byla repetice obsahující sekvenci GGCAGGANG (kde N představuje nukleotid). Postup je následující: vzorek DNA rozštěpíme restrikční endonukleázou, separujeme fragmenty pomocí agarózové elektroforézy a připravíme Southernovo blotování (str. 200). Hybridizace blotu s označenou probou obsahující repetitivní sekvenci ukáže sérii proužků. Každý z nich reprezentuje restrikční fragment obsahující tuto repetici (Obr. 16.1(b)). Protože jsou inserční místa repetitivní sekvence variabilní, stejnou procedurou provedenou se vzorkem DNA jiného člověka dostaneme jiné uspořádání proužků. Ty představují genetické otisky daných jedinců.

### 16.1.2

#### **Zjištění profilu DNA pomocí PCR krátkých tandemových repetic**

Máme-li být zcela přesní, genetický fingerprinting se vztahuje pouze na hybridizační analýzu rozptýlených repetitivních sekvencí. V soudní vědě je tato technika velice důležitá, ale má tři nedostatky:

- (1) Vyžaduje poměrně velké množství DNA, protože je odkázána na hybridizační analýzu. Není použitelná pro nepatrná množství DNA z vlasů nebo skvrn od krve.
- (2) Interpretaci otisků komplikuje variabilita intenzity hybridizačních signálů. Sebenepatrnější rozdíly v intenzitě proužků mezi testovanými fingerprinty a otiskem podezřelé osoby soudu stačí, aby podezřelého zprostil viny.



**Obrázek 16.1** Genetický fingerprinting. (a) Místa polymorfických repeticí, např. minisatelity, v genomech dvou jedinců. V segmentech chromozomů ukázaných na obrázku má druhá osoba jednu repetici navíc. (b) Autoradiograf ukazující genetické printinky dvou jedinců.

- (3) Inserční místa repetitivních sekvencí sice jsou hypervariabilní, ale i tato variabilita má své meze. Existuje tedy jistá pravděpodobnost, že dvě úplně cizí osoby budou mít stejné, nebo alespoň velmi podobné otisky. Je-li případ projednáván u soudu, může to vést ke zproštění viny.

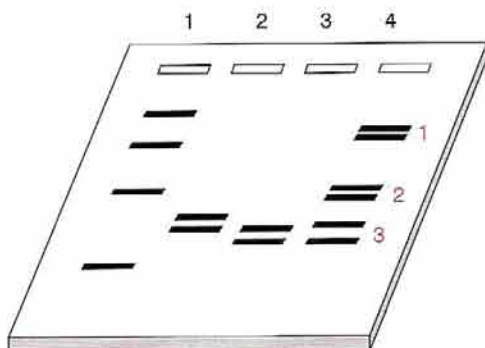
Technika profilu DNA, která je účinnější, na tyto problémy nenarází. Zjišťování profilu využívá polymorfních sekvencí zvaných STR. Jak je popsáno na str. 261, STR je krátká sekvence, od 1 do 13 nukleotidů, která se několikrát opakuje v tandemové sestavě. V lidském genomu je nejběžnějším typem STR dinukleotidová repetice  $[CA]_n$ , kde se „ $n$ “, tj. počet repetic, obvykle pohybuje mezi 5 a 20 (Obr. 16.2(a)).

Množství repetic v určité STR je proměnlivé, protože se zvyšuje nebo – méně často – snižuje v důsledku chyb při replikaci DNA. V lidské populaci se může vyskytovat až deset různých verzí každé STR. Každou alelu charakterizuje jiný počet repetic. Při zjišťování profilu DNA se určují alely určitého počtu různých STR. Toho lze dosáhnout rychle a s velmi malým množstvím DNA pomocí PCR s primery, které se připojují k sekvencím DNA po obou stranách repetice (Obr. 12.11). Po PCR se produkty vyšetří elektroforézou a velikost proužku nebo proužků označuje alelu nebo alely přítomné v tes-

## (a) Dvě alely STR

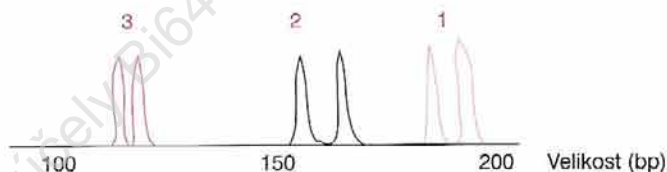
..... CACACACACA ..... n = 5  
 ..... CACACACACACA ..... n = 6

## (b) Výsledky PCR



1. Velikost markerů DNA
- 2., 3. PCR jednotlivých STR u dvou jedinců
4. Mnohonásobná PCR tří STR (1-3)

## (c) Analýza výsledků mnohonásobné PCR na automatizovaném sekvenátoru DNA



**Obrázek 16.2** Zjišťování profilu DNA. (a) Ke zjišťování profilu DNA se používá STR, které obsahují variabilní repetitivní jednotky. (b) Gel získaný po vyšetření profilu DNA. V dráze 2 a 3 byly zjišťovány stejné STR u dvou jedinců. Tyto dvě osoby mají odlišné profily, ale mají společný proužek. Dráha 4 ukazuje výsledky mnohonásobné PCR, ve které byly tři STR zjištěny i jednoduchou PCR. (c) Záznam z automatického sekvenátoru lze využít ke stanovení velikostí produktů PCR.

tovaném vzorku DNA (Obr. 16.2(b)). V jednom vzorku DNA se mohou vyskytovat dvě alely STR, protože jsou zde dvě kopie každé STR, jedna na chromozomu od matky a jedna na chromozomu od otce.

Vzhledem k tomu, že se pracuje s PCR, je zjišťování profilu DNA velice citlivé a přináší výsledky i v případě vlasů a jiných vzorků, které obsahují pouze stopové množství DNA. Výsledky jsou jednoznačné a souhlasné profily DNA soud obvykle považuje za důkaz. Podstatný je fakt, že zjišťování profilu

DNA, pokud je zaměřeno na STR s vysokým počtem alel, poskytne statisticky vysokou pravděpodobnost, že shoda mezi zkušebním profilem a profilem podezřelého o něčem vypovídá, a tedy nejde jen o náhodnou podobnost mezi dvěma lidmi. Potřebnou jistotu získáme prostřednictvím analýzy devíti STR použitých v jedné mnohonásobné PCR (multiplex PCR), při níž je v rámci jedné reakce použito řady primerových párů. Výsledky jsou čitelné díky tomu, že jsou PCR navrženy tak, aby byly produkty každé STR jinak veliké a objevily se na agarózovém gelu na jiném místě. (Obr. 16.2(b)). Lze to provést také tak, že primery označíme různými flurochromy a výsledky vizualizujeme tak, že produkt zpracujeme na automatizovaném DNA sekvenátoru (Obr. 16.2(c)).

## 16.2 Vyšetřování příbuzenských vztahů zjišťováním profilu DNA

Vedle identifikace pachatelů slouží metoda DNA profiling také k určení toho, zda jsou dané osoby členy stejné rodiny. Tento typ studie se nazývá **analýza příbuznosti (kinship analysis)** a nejčastěji se jí používá při určování otcovství.

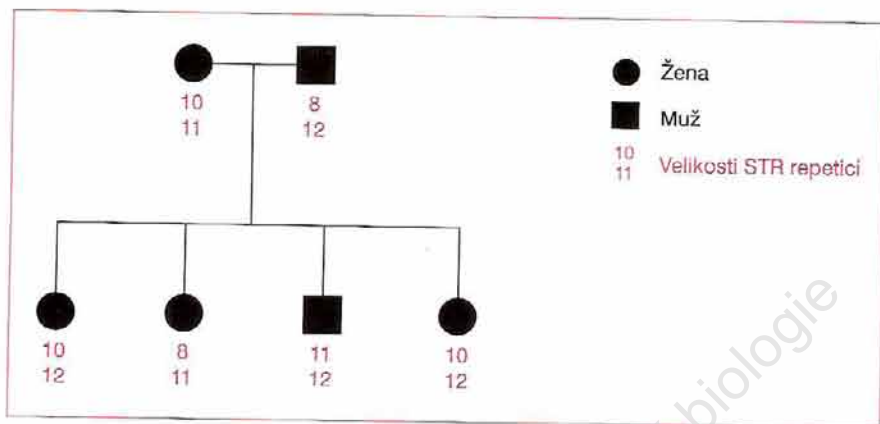
### 16.2.1 Pokrevní příbuzní mají podobné profily DNA

Svůj profil DNA, tak jako všechny ostatní aspekty vašeho genomu, jste částečně zdělili po matce a částečně po otci. Označíme-li v rodinném rodokmenu alely příslušné STR, je spojitost mezi rodinnými příslušníky zřejmá (Obr. 16.3). Z obrázku je patrné, že tři ze čtyř dětí zdělily po otci alelu s 12 repeticemi. Z tohoto zjištění ještě nelze vyvodit, že jsou tyto tři děti sourozenci, i když ze statistického hlediska by to bylo vysoce pravděpodobné za předpokladu, že by se alela s 12 repeticemi vyskytovala v populaci jen zřídka. Abychom si byli jisti, museli bychom testovat více STR. Tak jako v případě identifikace osob ani v tomto nemusí být analýza nekonečná. Porovnání devíti STR zajistí poměrně vysokou pravděpodobnost, že jsou pozorované vztahy skutečné.

### 16.2.2 Zjišťování profilu DNA a ostatky rodu Romanovců

Zajímavým příkladem použití zjišťování profilu DNA v rámci studia příbuzenských vztahů je výzkum kosterních pozůstatků posledních členů ruské panovnické rodiny Romanovců. Tento výzkum proběhl v 90. letech 20. století. Během revoluce byl car Mikuláš II. sesazen a uvězněn spolu s manželkou, carevnou Alexandrou, a jejich pěti dětmi. V roce 1917 byli všichni i s lékařem a služebnictvem zavražděni. V roce 1991, po pádu komunizmu, byla těla ze společného hrobu na okraji silnice vyzvednuta.

**Obrázek 16.3** Dědičnost alel STR v rodině.



### **Analýza STR kosterních pozůstatků rodiny Romanovců**

Z lidských těl zůstaly jen pomíchané kosti dospělých jedinců a dětí. Nebylo možné určit, které patřily členům rodiny a které lékaři a služebnictvu. Dětské kosti však mohly patřit jedině dětem carského páru. Z toho vyplývá, že ostatky cara a carevny bylo možné identifikovat na základě zjištění, které ostatky patřily rodičům těchto dětí.

Z kostí všech nalezených osob byla odebrána DNA a pět STR bylo testováno pomocí PCR. Dvě STR poskytly postačující informace, na základě kterých bylo možné otce a matku dětí jednoznačně identifikovat (Obr. 16.4). Byly to však skutečně kosterní pozůstatky Romanovců, nebo to byly pozůstatky nějakých jiných nešťastníků? Tuto otázku bylo možné zodpovědět tím, že se DNA z nalezených pozůstatků porovnávala se vzorky DNA žijících příbuzných rodiny Romanovců. Komparace zahrnovala studie **mitochondriální DNA**, což jsou malé 16kb kroužky DNA obsažené v buněčných mitochondriích, které vytvářejí energii. Mitochondriální DNA obsahuje polymorfizmy, ze kterých lze usuzovat na příbuzenské vztahy mezi osobami, ale míra variability není tak velká jako u STR. Proto se mitochondriální DNA používá k určování příbuznosti mezi blízkými spřízněnými osobami, jako například členy jedné rodiny, jen velmi zřídka. Podstatný je fakt, že se mitochondriální DNA dědí výhradně v ženské linii, otcova mitochondriální DNA se ztrácí během oplodnění a uspořádání DNA synů nebo dcer nijak neovlivní. Tento vzorec mateřské dědičnosti usnadňuje rozlišení příbuzenských vztahů, nejsou-li porovnávání jedinci tak blízkými příbuznými, jako tomu bylo u (žijících) příbuzných Romanovců. Analýzy mitochondriální DNA potvrdily, že se skutečně jednalo o kosterní pozůstatky cara Mikuláše, carevny Alexandry a jejich tří dcer.

### **Pohřešované děti**

V hrobě Romanovců byla těla pouze tří dětí. Pozůstatky jediného syna, Alexeje, a jedné ze čtyř dcer v hrobě nalezeny nebyly. Někdy v polovině 20. století

## (a) Rodokmen Romanovců



## (b) Analýza STR

	STRs	
	<i>THO1</i>	<i>VW A/31</i>
Dítě 1	8, 10	15, 16
Dítě 2	7, 8	15, 16
Dítě 3	8, 10	15, 16
Dospělá žena 1	8, 8	15, 16
Dospělá žena 2	6, 6	16, 17
Dospělý muž 1	9, 10	14, 20
Dospělý muž 2	6, 10	17, 17
Dospělý muž 3	7, 10	15, 16
Dospělý muž 4	6, 9	15, 17

**Obrázek 16.4**

Analýza krátkých tandemových repetitiv v kostech Romanovců. (a) Rodokmen rodiny Romanovců. (b) Výsledky analýzy STR. *THO1* a *VWA/31* jsou názvy dvou STR lokusů. Čísla ve sloupcích (8, 10 atd.) představují počet repetitiv pro alely zjištěné v každém jedinci. Výsledky *THO1* ukazují, že žena č. 2 nemůže být matkou dětí, protože nese pouze alelu 6, kterou děti nemají. Žena 1 má však alelu 8, kterou mají všechny tři děti, a byla tak identifikována jako carevna. Na základě výsledků analýzy *THO1* lze dále vyloučit muže č. 4 jako možného otce dětí, nelze však rozhodnout mezi dalšími třemi muži – každý z nich by mohl být otcem nejméně dvou dětí. Výsledky analýzy *VWA/31* však vylučují muže č. 1 a 2 z možného otcovství, takže muž č. 3 byl identifikován jako car.

o sobě několik žen tvrdilo, že právě ony jsou princeznou z rodu Romanovců. Už před vyzvednutím kosterních pozůstatků totiž kolovaly zvěsti o tom, že se jedná z dívek, Anastázii, podařilo z bolševického držení uprchnout a utéct na západ. Testy DNA nepotvrdily, že by některá z žen byla dcerou carského páru. Příběh, který se vypráví o Anastázii, je tedy pouhou romantickou smyšlenkou. Tyto děti nebyly pravděpodobně nalezeny proto, že jejich kosti byly

v natolik pokročilém stádiu rozpadu, že je nebylo možné exhumovat, nebo proto, že byly pohřbeny jinde. A skutečně se také nedávno našly pozůstatky chlapce a dívky; dívka byla pohřbena se šperky podobajícími se šperkům, které měla Marie.

## 16.3

## Určení pohlaví pomocí analýzy DNA

Analýza DNA slouží také k identifikaci pohlaví. Genetické rozdíly mezi pohlavími jsou dány tím, že muži nesou chromozom Y. Muže a ženy je tedy možné odlišit na základě zjištění DNA specifické pro chromozom Y. Soudní znalci někdy musí vyšetřovat těla, která jsou velmi poškozená, a pohlaví je možné určit jedině pomocí analýzy DNA.

Pomocí analýzy DNA je také možné zjistit pohlaví nenarozených dětí. Zda je plod chlapec nebo holčička, se obvykle zjišťuje, až když jsou vyvinuty anatomické diferencní znaky a pohlaví je rozpoznatelné ultrazukovým vyšetřením. Za určitých okolností je však žádoucí znát pohlaví plodu dříve. Například pokud z rodinného rodokmenu vyplývá, že by nenarozený chlapec mohl trpět dědičnou chorobou, a rodiče se chtějí rozhodnout v co nejranějším stádiu, zda pokračovat v těhotenství.

Testů DNA lze k identifikaci pohlaví využít také v analýze archeologických nálezů. Pro archeologii znamenala analýza DNA obrovský krok kupředu. Archeologové byli schopni identifikovat kostru muže nebo ženy jedině v případě, že se dochovala nepoškozená např. kost lebeční nebo kost pánevní. Pokud se však dochovaly pouze zbytky těchto kostí a nebo když tyto kosti patřily malým dětem, archeologové neměli dostatek pohlavně specifických anatomických znaků a pohlaví nemohli s jistotou identifikovat. Pokud se v kostech uchovala fosilní DNA, mohou dnes archeologové zjistit pohlaví příslušného jedince na základě některé z metod založených na DNA.

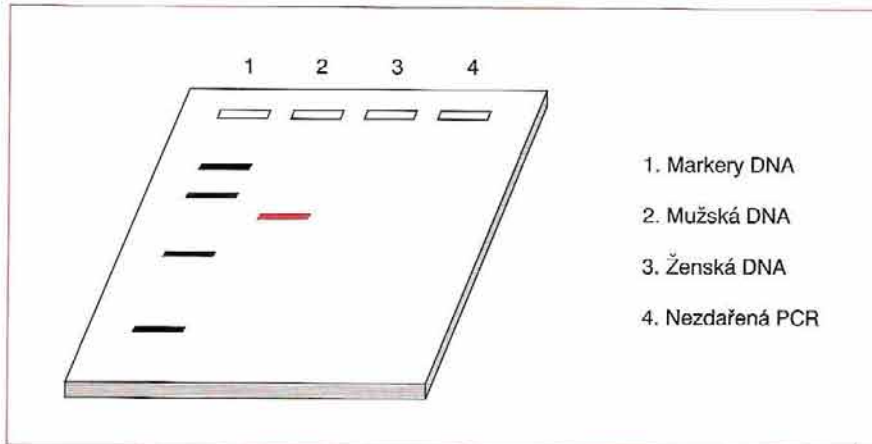
## 16.3.1

### PCR sekvencí specifických pro chromozom Y

Tato nejjednodušší aplikace analýzy DNA sloužící k určení pohlaví je založena na navržení PCR specifické pro nějakou oblast na chromozomu Y. PCR musí být navržena pečlivě, protože chromozomy X a Y nejsou úplně odlišné, některé segmenty jsou oběma chromozomům společné. Na druhé straně je však na chromozomu Y mnoho unikátních oblastí. Především je to několik repetitivních sekvencí nacházejících se jedině na chromozomu Y a sloužících jako mnohačetné cíle pro PCR. Proto jsou mnohem citlivější, což hraje roli především tehdy, je-li vyšetřované tělo vážně poškozené nebo pokud se jedná o nějaký starověký kosterní nález.

Produkt PCR DNA sekvencí specifických pro chromozom Y bude obsahovat mužskou DNA. Pokud bude vzorek pocházet z těla ženy, nebude obsa-





**Obrázek 16.5** Stanovení pohlaví pomocí PCR DNA sekvencí specifických pro chromozom Y. Mužská DNA dává PCR produkt (řada 2), kdežto ženská DNA nikoliv (řada 3). Problémem je, že neúspěšná PCR (řada 4) dává stejný výsledek jako ženská DNA.

1. Markery DNA
2. Mužská DNA
3. Ženská DNA
4. Nezdařená PCR

hovat žádný proužek (Obr. 16.5). Jde o zcela jednoznačné rozlišení a v případě většiny aplikací tedy naprosto vyhovující metodu. Ale co když vzorek DNA obsahovat nebude? Nebo co když bude DNA příliš degradovaná, takže nebude v PCR fungovat? Nebo co když PCR neproběhne, protože vzorek obsahuje inhibitory *Taq* polymerázy? To vše by se v případě archeologických nálezů mohlo stát, zvláště tehdy, byla-li nalezená těla pohřbena v zemi a byla kontaminována huminovými kyselinami a jinými látkami, o nichž je známo, že působí jako inhibitory na řadu enzymů používaných v molekulárněbiologickém výzkumu. Za těchto okolností přestávají být výsledky testu jednoznačné. Nález, u něhož z některého z uvedených důvodů nemůžeme získat produkt PCR, bychom mohli mylně považovat za kosterní pozůstatky patřící ženě. Výsledek by byl totiž stejný: na gelu by se neobjevil žádný proužek.

### 16.3.2

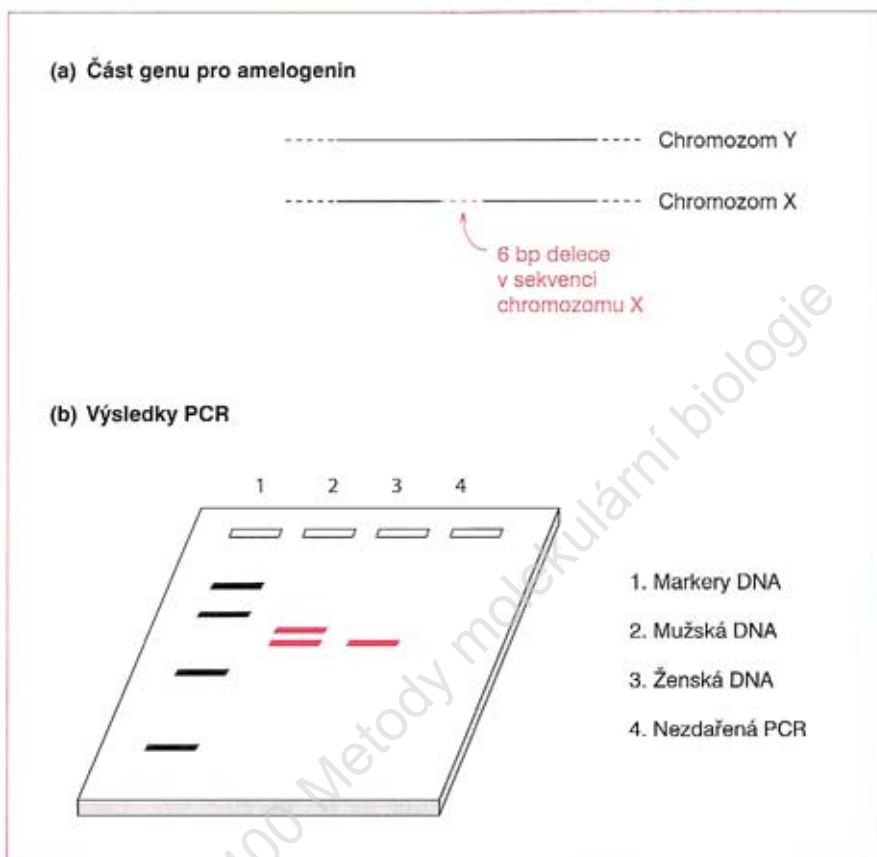
#### PCR genu kódujícího amelogenin

Protože při analýze sekvencí specifických pro chromozom Y nebylo možné zjistit, zda výsledek PCR ukazuje na ženské pohlaví, nebo na to, že PCR řádně neproběhla, byly vyvinuty sofistikovanější testy DNA pro identifikaci pohlaví, které měly dát jednoznačné výsledky u mužů i u žen. Nejčastěji se používá test založený na PCR amplifikující gen pro amelogenin.

Amelogeninový gen kóduje protein nacházející se v zubní sklovině. Jde o jeden z genů ležících na chromozomu Y. Tak jako jiné geny chromozomu Y i tento má kopii na chromozomu X. Kopie však zdaleka nejsou identické. Pokud obě nukleotidové sekvence porovnáme, zjistíme řadu **indelů (indels)**, míst, kde byl buď v jedné sekvenci segment DNA integrován, nebo kde je delece v sekvenci druhé (Obr. 16.6(a)). Pokud se primery navážou na obě strany indelu, budou se produkty PCR chromozomu X a Y lišit velikostí. DNA ženy by při zkoušce produktů dávala jediný proužek, protože ženy mají pouze

**Obrázek 16.6** Stanovení pohlaví pomocí PCR části genu pro amelogenin.

(a) Indel v genu pro amelogenin. (b) Produkty PCR překlenující oblast indelu. Ve standardním systému používaném ve forenzní biomolekulární archeologii dává mužská DNA dva PCR produkty o velikostech 106 a 112 bp. Ženská DNA dává pouze menší z produktů. Neúspěšná PCR nedává žádný produkt, takže je snadno odlišitelná od dvou pozitivních výsledků.



chromozom X, zatímco mužská DNA by dávala proužky dva, jeden z chromozomu X a druhý z chromozomu Y (Obr. 16.6(b)). V případě, že vzorek neobsahuje DNA, nebo PCR z nějakého důvodu selže, neobjeví se proužek žádný: nedochází tedy k záměně neúspěšné reakce a výsledků ukazujících na mužské nebo ženské pohlaví zkoumaného těla.

Vývoj amelogeninového systému k určování pohlaví má pro archeologii velký význam. Archeologové se už nemusí spoléhat na nezřetelné rozdíly ve struktuře kostí. Výsledky analýzy DNA dávají mnohem větší jistotu a mimochodem vedou také k nečekaným závěrům. Konkrétně k tomu, že jsou dnes archeologové nuceni revidovat předchozí domněnky týkající se významu objektů uložených spolu s těly do hrobu. Dříve se archeologové domnívali, že když bylo tělo pohřbeno s mečem, bylo to tělo muže, a pokud byly v hrobu korále, jednalo se o ženu. Testy DNA však ukázaly, že tyto stereotypní závěry nejsou vždy správné. Archeologové tedy musí na spojení mezi předměty nalezenými v hrobě a pohlavím pohřbeného jedince nahlížet z mnohem širší perspektivy.

## 16.4

## Archeogenetika – využití DNA ke studiu evoluce člověka

Identifikace pohlaví a studium příbuzenských vztahů nejsou jedinými oblastmi archeologie, kde lze aplikovat klonování genů a analýzu DNA. Vyšetřováním sekvencí DNA žijících a zemřelých lidí začali archeologové rozumět evolučnímu původu moderního lidstva a tomu, jak lidstvo kolonizovalo tuto planetu. Tato oblast výzkumu se nazývá **archeogenetika**.

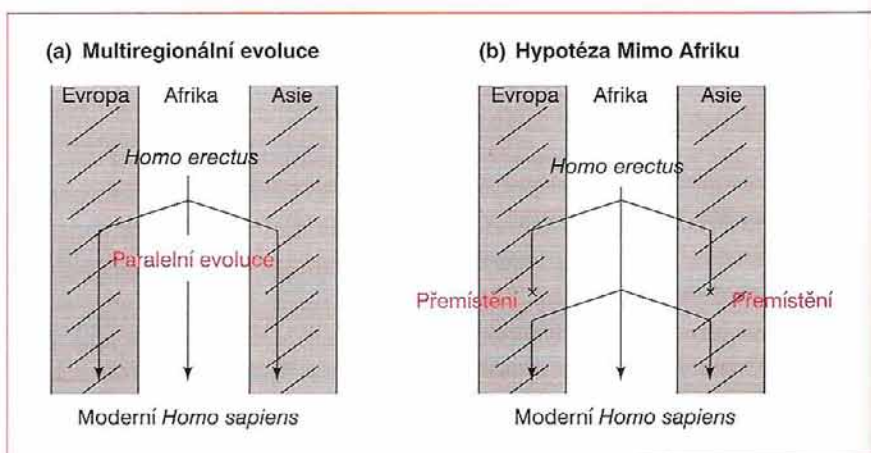
## 16.4.1

### Kořeny moderního člověka

Paleontologové věří, že lidstvo pochází z Afriky, protože zde byly nalezeny všechny nejstarší fosilie tvorů předcházejících člověka. Fosilní důkazy odhalily, že hominidi poprvé migrovali z Afriky zhruba před jedním milionem let, ale nejednalo se o moderní lidi. Byl to dřívější druh zvaný *Homo erectus*, první hominid, který se začal geograficky rozptylovat a nakonec rozšiřovat do všech částí Starého světa.

Události, které následovaly po rozšiřování *H. erectus*, jsou kontroverzní. Ze studií fosilií mnoho paleontologů věří, že populace *H. erectus*, které se začaly usazovat v různých částech Starého světa, daly vznik moderním populacím *Homo sapiens*, které se dnes v těchto oblastech navhážejí (Obr. 16.7(a)). Tento proces se nazývá **multiregionální evoluce**. Mohlo docházet k určitému stupni křížení mezi lidmi z různých geografických oblastí, ve větší míře však tyto populace zůstávaly během jejich evoluční historie separovány.

**Obrázek 16.7** Dvě hypotézy pro vysvětlení původu moderních lidí: (a) multiregionální evoluce; (b) hypotéza Mimo Afriku.



## Analyza DNA zpochybnila multiregionální hypotézu

Pochybnosti o multiregionální hypotéze vznikly v roce 1987, kdy genetici začali poprvé využívat analýzy DNA k zodpovězení otázek evoluce člověka. V jednom z prvních archeogenetických projektů byly měřeny délkové polymorfizmy restrikčních fragmentů (RFLP) ve vzorcích mitochondriální DNA odebraných ze 147 jedinců z různých částí světa. Výsledná data byla použita ke konstrukci fylogenetického stromu ukazujícího evoluční vztahy mezi různými lidskými populacemi. Na základě stromu bylo možné dedukovat:

- (1) Kořen stromu reprezentuje ženu (zapamatujme si, že mitochondriální DNA se dědí pouze v matčině linii), jejíž mitochondriální genom je předchůdcem všech 147 moderních mitochondriálních DNA, které byly testovány. Tato žena byla nazvána **mitochondriální Evou**. Samozřejmě nebyla ekvivalentem k biblické postavě a nebyla v té době v žádném případě živou ženou: jednoduše byla ženou, která nesla mitochondriální DNA zděděnou po předcích, která dala vzniknout všem dnes existujícím mitochondriálním DNA.
- (2) Mitochondriální Eva žila v Africe. Tato skutečnost byla vydedukována z toho, že se strom z původní sekvence rozdělil do dvou segmentů, z nichž jeden byl tvořen výhradně africkými mitochondriálními DNA. Na základě tohoto rozdělení bylo usouzeno, že předek se rovněž vyskytoval v Africe.
- (3) Mitochondriální Eva žila před 140 000 až 290 000 lety. Tento závěr byl učiněn pomocí aplikace **molekulárních hodin** na fylogenetický strom. Molekulární hodiny určují rychlost, s jakou nastane evoluční změna v sekvencích mitochondriální DNA, a jsou kalibrovány na základě rychlosti, se kterou se mutace akumulují v mitochondriální DNA. Srovnáním sekvence dedukované pro Evinu mitochondriální DNA se sekvencemi 147 DNA byl vypočítán počet roků potřebných k tomu, aby nastaly všechny nutné evoluční změny.

Klíčový objev spočívající v tom, že mitochondriální Eva žila v Africe před 290 000 lety či ještě později, se neshoduje s předpokladem, že my všichni pocházíme z populace *H. erectus*, která opustila Afriku před více než milionem let. Byla proto navržena nová hypotéza původu člověka nazvaná **Mimo Afriku (Out of Afrika)**. Podle této hypotézy se moderní člověk *H. sapiens* vyvinul specificky z těch populací *H. erectus*, které zůstaly v Africe. Moderní lidstvo se poté přestěhovalo do zbytku Starého světa před 100 000 až 50 000 lety a vytlačilo potomky *H. erectus*, se kterými se setkalo (Obr. 16.7(b)).

Zpočátku byly výsledky mitochondriální Evy silně kritizovány. Bylo zřejmé, že počítačová analýza použitá pro konstrukci fylogenetického stromu byla špatná hlavně proto, že algoritmy použité pro srovnání výsledků RFLP nebyly dostatečně výkonné, aby si poradily s obrovským množstvím informací. Kritika však ustala, když výsledky extenzivnějších studií mitochondriální

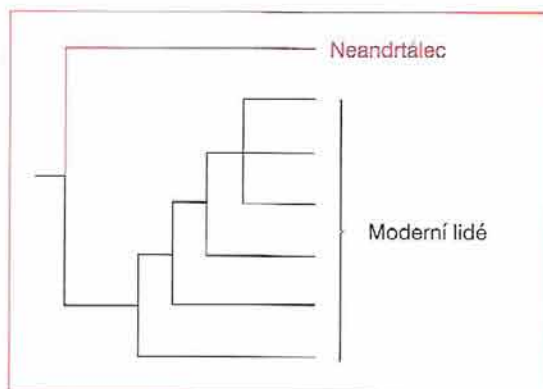
DNA, používající místo RFLP skutečné sekvence DNA a analyzované pomocí moderních výkonných počítačů, potvrdily všechna zjištění prvního projektu. Navíc studie Y chromozomu doplnily mitochondriální Evu, protože naznačily, že „Y chromozom Adam“ žil rovněž v Africe před asi 200 000 lety.

### DNA analýza ukazuje, že neandrtálci nejsou předchůdci moderních Evropanů

Neandrtálci jsou vyhynulí hominidi, kteří žili v Evropě před 300 000 až 30 000 lety. Pocházeli z populací *H. erectus*, které opustily Afriku před jedním milionem let, a podle hypotézy Mímo Afriku se přemístili poté, co moderní lidé přišli do Evropy před 50 000 lety. Z tohoto důvodu hypotéza Mímo Afriku předpovídá, že neandrtálci nejsou předchůdci moderních Evropanů. K otestování této předpovědi bylo použito analýzy starověké DNA z kostí neandrtálců.

Prvním vzorkem neandrtálce, který byl ke studiu vybrán, byl vzorek nalezený v Německu v 19. století. Tato fosilie nebyla přesně datována, ale byla stará asi 30 000 až 100 000 let. Takové stáří ji umísťuje na samou hranici, kdy je starověká DNA schopna v kostech přežít, protože zhruba po 50 000 letech ze vzorků nic nezbyvá, a to ani tehdy, když se nalézají ve velice chladném prostředí, např. když jsou pohřbeny ve věčně zmrzlé půdě. I když tento vzorek neandrtálce nebyl uchovávan v žádném zvláště chladném prostředí, přesto z něj bylo možno získat krátkou sekvenci mitochondriální DNA. Toho bylo dosaženo provedením devíti překrývajících se PCR, každá amplifikující méně než 170 bp DNA, ale dohromady dávající celkovou délku 377 bp.

Ke srovnání sekvencí získaných z neandrtálce se sekvencemi šesti hlavních variant mitochondriální DNA (nazývaných **haploskupiny**, viz str. 361) vyskytujících se u moderních Evropanů byl zkonstruován fylogenetický strom. Sekvence neandrtálce měla na fylogenetickém stromu svou vlastní větev spojenou s kořenem stromu, avšak nebyla přímo spojena ani s jednou sekvencí moderního člověka (Obr. 16.8). Toto byl první důkaz naznačující, že



**Obrázek 16.8**

Fylogenetická analýza fosilní DNA naznačuje, že neandrtálci nejsou přímí příbuzní dnešního člověka.

neandrtálci nejsou předky moderních Evropanů. Sekvence neandrtálce byla dále srovnána s ekvivalentními sekvencemi 994 moderních lidí. Rozdíly byly markantní. Sekvence neandrtálce se lišila od moderních sekvencí v průměru  $27,2 \pm 2,2$  pozicích nukleotidů, kdežto sekvence moderních lidí z celého světa, nejen z Evropy, se od sebe lišily v  $8,8 \pm 3,1$  polohách. Tento stupeň rozdílnosti není v souladu s představou, že moderní Evropané jsou potomci neandrtálců. Výsledky proto poskytují nezávislý důkaz ve prospěch hypotézy Mimo Afriku a ukazují, že přinejmenším pro Evropu je multiregionální model nesprávný.

## 16.4.2

### DNA může být rovněž použito ke studiu prehistorických migrací lidstva

Moderní lidé, kteří vytlačili neandrtálce, přišli do Evropy asi před 40 000 lety. To vyplývá z fosilií a archeologických záznamů. Nebyli však sami tito lidé vytlačeni novějšími populacemi, které migrovaly do Evropy nedávno?

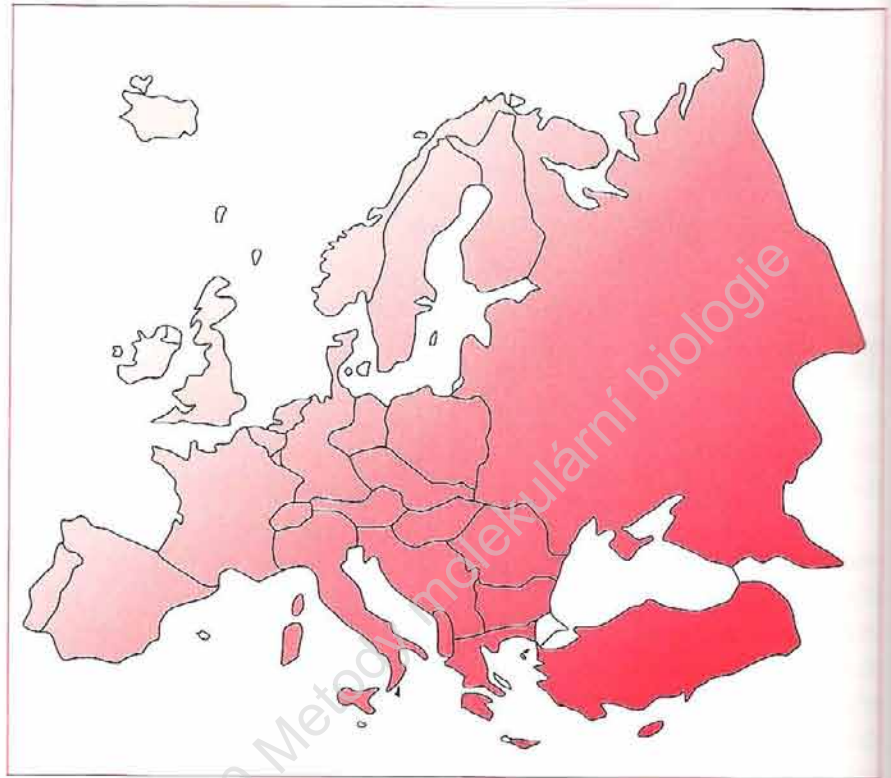
#### Rozšíření zemědělství v Evropě

Někteří archeologové navrhli, že nové populace lidí se mohly stěhovat do Evropy během posledních 10 000 let a že tito lidé s sebou na kontinent přinesli zemědělství. Přechod od lovu a sběru k zemědělství nastal v jihozápadní Asii asi před 10 000 lety, kdy vesničané v raném neolitu začali pěstovat plodiny, jako jsou pšenice a ječmen. Zemědělství se pak rozšířilo do Asie, Evropy a severní Afriky. Při hledání archeologických nalezišť zbytků pěstovaných rostlin nebo nástrojů používaných k zemědělství byly vystopovány dvě cesty, kterými se zemědělství po Evropě rozšířilo. Jedna cesta sledovala pobřeží Středozemního moře do Španělska a eventuálně do Velké Británie a druhá cesta procházela podél dunajským a rýnským údolím do severní Evropy.

Jedním z vysvětlení, proč se zemědělství rozšířilo, je, že se farmáři stěhovali z jednoho místa na druhé, brali si svoje nástroje, zvířata a plodiny s sebou, a vytlačovali původní, předzemědělské komunity, které byly v Evropě v té době přítomny. Tento model **vlny postupu (wave of advance)** byl zpočátku podporován archeogenetikou, protože souhlasil s výsledky velké fylogenetické studie provedené v 90. letech, která se zabývala frekvencemi alel 95 jaderných genů v populaci celé Evropy. Tento soubor dat byl analyzován technikou v populační genetice často používanou, tzv. **analýzou ústřední komponenty (principal component analysis)**, která se snaží identifikovat typy v geografickém rozšíření alel, jež mají být důkazy migrací populací probíhajících v minulosti.

Nejpozoruhodnějším rysem v Evropském souboru dat, vysvětlujícím okolo 28 % všech genetických změn, je gradace frekvencí alel od jihovýchodu k severozápadu kontinentu (Obr. 16.9). Tento profil naznačuje, že migrace lidí nastávala od jihozápadní Asie k severovýchodní Evropě, nebo v opačném směru. Protože dříve uvedený směr migrace se časově shoduje s rozšiřová-

**Obrázek 16.9** Analýza ústřední komponenty odhaluje jihovýchodní a severozápadní gradient frekvencí lidské alely napříč Evropou.



ním zemědělství, jak vyplývá z archeologických nálezů, byla první ústřední komponenta považována za techniku, která významně podporuje model vlny postupu.

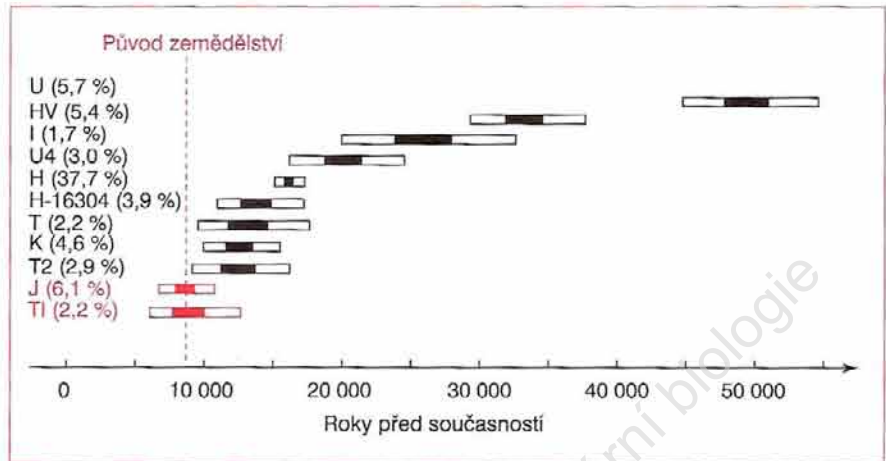
### **Využití mitochondriální DNA ke studiu minulosti lidské migrace do Evropy**

Analýza ústřední komponenty má jednu slabinu v případě její aplikace na minulost lidských migrací. Stanovení doby identifikované migrace je obtížné. Tzn. že spojení mezi první ústřední komponentou a rozšiřováním zemědělství je založeno výhradně na rysu gradace alely, a není doplňující důkaz o spojení s obdobím, kdy zemědělství vzniklo.

Druhá studie evropských lidských populací, která nezahrnuje časovou dimenzi, byla provedena s použitím mitochondriální DNA. Nejprve byla porovnána distribuce variací sekvence mitochondriální DNA u 821 jedinců z populací z celé Evropy. Tyto výsledky neposkytly důkaz gradace frekvencí alely, a místo toho naznačily, že posledních více než 20 000 let evropské populace zůstaly relativně statické. Tento výsledek vyvolal důležité pochybnosti o modelu vlny postupu. Jak se pak do Evropy zemědělství rozšířilo?

**Obrázek 16.10**

Vydedukovaná období příchodu 11 hlavních mitochondriálních DNA haplotypů nalezených v moderních populacích do Evropy. Haplotypy, jejichž příchod se shoduje s rozšířením zemědělství, jsou vyznačeny červeně.



Složitější studie variací mitochondriální DNA v moderních evropských populacích se soustředila na nový model rozšíření zemědělství. Bylo zjištěno, že mitochondriální genomy moderních Evropanů mohou být rozděleny do 11 hlavních skupin sekvencí neboli haploskupin, které vykazují výrazné odchylky v sekvencích nukleotidů. Pro každou z těchto haploskupin lze použít molekulárních hodin k dedukci data vzniku, které by mělo korespondovat s datem, kdy se haploskupina dostala do Evropy (Obr. 16.10). Nejstarobylší haploskupina, nazývaná U, se v Evropě poprvé objevila před asi 50 000 lety, což se časově shoduje s obdobím, kdy se podle archeologických nálezů dostali první moderní lidé na kontinent, tedy kdy se zalednění stáhlo na sever na konci doby ledové. Nejmladší haploskupiny, J a T1, které by při svém stáří 9000 let mohly korespondovat s počátky zemědělství, má jen 8,3 % moderní evropské populace, což potvrzuje, že rozšíření zemědělství do Evropy se neuskutečnilo mohutnou vlnou postupu, jak předpokládala studie ústřední komponenty. Nyní se naopak předpokládá, že zemědělství bylo do Evropy přineseno malou skupinou „pionýrů“, která se zkřížila s existujícími předzemědělskými komunitami, spíše než že by je vytlačila.

Archeogenetické skutečně ilustrovali, jak zásadní vliv mělo klonování genu a analýza DNA na vědu.

## Doplňující literatura

- Cann, R. L., Stoneking, M. & Wilson, A. C. (1987) Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325, 31-6. [První článek navrhuje hypotézu Mitochondriální Evy.]
- Cavalli-Sforza, L. L. (1998) The DNA revolution in population genetics. *Trends in Genetics*, 14, 60-5. [Využití analýzy ústřední komponenty ke studiu frekvencí jaderných alel v Evropě.]



- Gill, P., Ivanov, P. L., Kimpton, C. *et al.* (1994) Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics*, **6**, 130–5.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. & Thein, L. S. (1985) Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature*, **314**, 67–73. [Genetický fingerprinting pomocí minisatelitů.]
- Jobling, M. A. & Gill, P. (2004) Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics*, **5**, 739–51.
- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R. W. *et al.* (1997) Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, **90**, 19–30.
- Nakahori, Y., Hamano, K., Iwaya, M. & Nakagome, Y. (1991) Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer. *American Journal of Medical Genetics*, **39**, 472–3. [Amelogeninová metoda.]
- Richards, M., Macauley, V., Hickey, E. *et al.* (2000) Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *American Journal of Human Genetics*, **67**, 1251–76. [Využití mitochondriální DNA ke studiu migrace lidí do Evropy.]