A close-up photograph of a Neanderthal face, showing its characteristic features like a large nose, heavy brow, and thick skin. The face is rendered in a realistic, textured style. A bright blue rectangular box is overlaid on the center of the face, containing white text. The background is slightly blurred, showing some greenery and a wooden pole.

**ANALÝZA
NEANDRTÁLSKÝCH
DNA**

Analýza archaické DNA



1) Analýza aDNA člověka

2) Analýza první neandrtálské DNA

3) Analýza druhé neandrtálské DNA

4) Interpretace nalezených výsledků

- Byli Neandrtálci odděleným druhem nebo byli odlišným poddruhem a jsou součástí naší vlastní historie?

5) Křížili jsme se s Neandrtálci?

6) Další nálezy a izolace neandrtálské DNA

7) Analýza jaderných sekvencí a sekvenování genomu Neandrtálce

8) Proč Neandrtálci vyhynuli?

8) Děnisované – co o nich víme

1) Analýza aDNA člověka

- **doposud** byla řeč o **analýze DNA** současných, žijících lidí a populací
- nyní se budeme zabývat analýzou tzv. **ancient DNA (aDNA)**
- nejčastěji se získává **z kostí nebo zubů**



problémy:

- často velmi **degradovaná**, zachovány jen fragmenty – používá se proto hlavně mtDNA (velké množství kopií, relativně malá molekula)
 - při nálezu a odběru potřeba **zamezit kontaminaci moderní** (současnou) **DNA**
 - největší úspěšnost u nálezu několik až desítek tisíc let starých
 - používá se řada více či méně účinných izolačních metod, v poslední době především komerčně dostupných izolačních sad (tzv. kitů)
- **analýza je možná díky PCR** – zvýšení velmi nízké koncentrace DNA získané po izolaci do analyzovatelného množství, amplifikace jen konkrétního úseku

příčinou problémů jsou nejčastěji:

- oxidativní poškození, modifikace bazí, křížové vazby
- kontaminace současnou DNA

- **izolace a analýza** je vzhledem k uvedeným problémům **mnohem obtížnější než v případě** analýzy **současné DNA** (její použití je ve studiích běžnější)



Co ovlivňuje kvalitu DNA?

- **biologické faktory** - nukleázy v odumírajících buňkách, mikroorganismy
- **fyzikální faktory** - záření
- **chemické faktory** - složení půdy, mikroorganismy

Příklady některých důsledků:

- fragmentace DNA (poškození cukrfosfátové kostry)
- modifikace bazí před izolací DNA
- modifikace bazí v průběhu PCR (lze ovlivnit částečně výběrem polymerázy)

Tyto procesy bohužel nelze ovlivnit!

Jak lze problémy alespoň částečně překonat?

= zabránit degradaci a kontaminaci již při odběru a analýze

- ochranné pomůcky, speciální postupy, maximální sterilita prostředí, nástrojů, pomůcek a roztoků
- systém negativních kontrol (bez aDNA)
- systém opakování = min. dva odběry, dvě oddělené izolace, dvě oddělená opakování PCR, nejlépe ve dvou různých laboratořích
- systém pozitivních kontrol
 - kontrolní amplifikace již potvrzeného specifického úseku pro aDNA
 - kontrolní amplifikace sekvence charakteristické pro moderní DNA nebo osoby pracující v laboratoři
- > 1000 molekul DNA templátu aDNA
- nová generace polymeráz – amplifikují i fragmentovanou a modifikovanou aDNA (Shapiro, 2008)
- izolovat DNA jen z kostí s vysokým obsahem aminokyselin = vysoká úspěšnost zisku kvalitní DNA (Poinar *et al.*, 1996; Serre *et al.*, 2004)



Analýza archaické DNA



1) Analýza aDNA člověka

2) Analýza první neandrtálské DNA

3) Analýza druhé neandrtálské DNA

4) Interpretace nalezených výsledků

- Byli Neandrtálci odděleným druhem nebo byli odlišným poddruhem a jsou součástí naší vlastní historie?

5) Křížili jsme se s Neandrtálci?

6) Další nálezy a izolace neandrtálské DNA

7) Analýza jaderných sekvencí a sekvenování genomu Neandrtálce

8) Proč Neandrtálci vyhynuli?

8) Děnisované – co o nich víme

Analýzou mtDNA neandrtálce se pokusíme odpovědět na často kladené otázky:

Byli Neandrtálci **odlišným druhem** nebo patří do vývojové linie moderního člověka?

Byli izolovanou skupinou nebo se **křížili s moderním člověkem**?

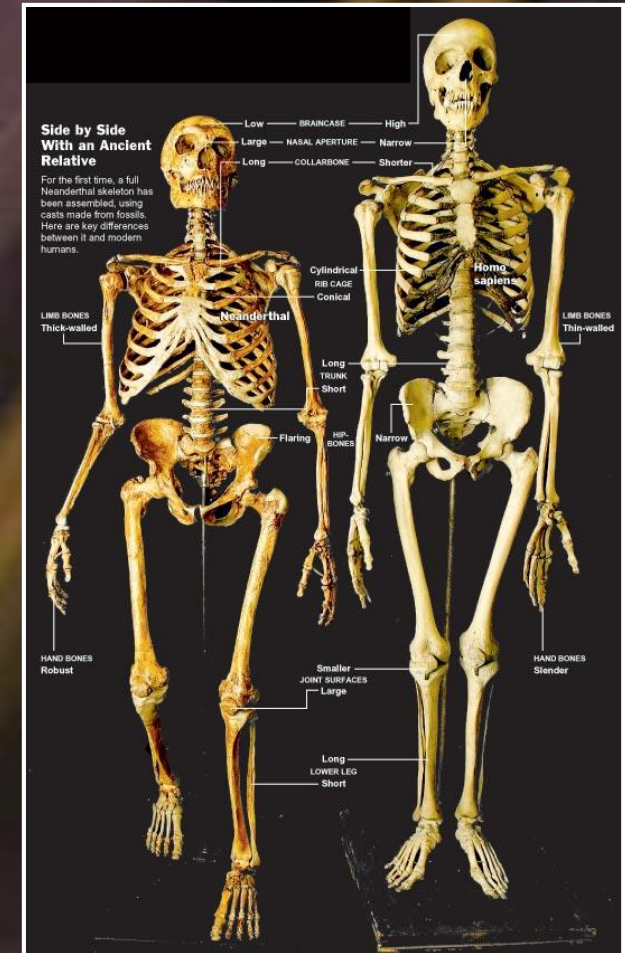
Máme v naší současné DNA nějaké **neandrtálské geny nebo sekvence**?

Proč Neandrtálci **zanikli**?

Co nám tyto výsledky říkají zajímavého pro naši diskuzi **o původu moderního člověka**?

Kdo byli Neandrtálci?

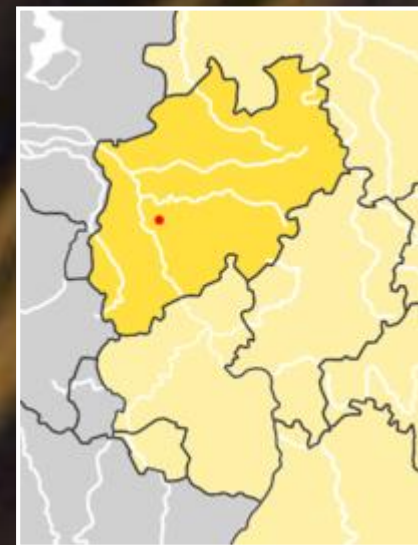
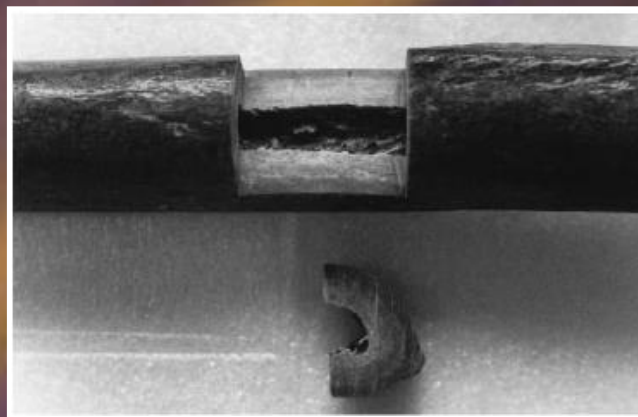
- *Homo neanderthalensis* nebo *Homo sapiens neanderthalensis*
- Žili v Evropě před zhruba 400 000 až 30 000 lety a v západní Asii asi před 150 000 lety
- první nález popsán v roce 1856 v údolí Neander v Německu



- nově na základě DNA analýz byl jejich výskyt prokázán dokonce i v Centrální Asii a na jihu Sibiře (Krause et al., 2007)

2) Analýza první neandrtálské DNA

- **v roce 1997 byla poprvé získána aDNA** – izolace mtDNA z pažní kosti Neandrtálce z roku 1856 (Mathias Krings *et al.*)



- konkrétně se jednalo o prvně nalezené pozůstatky Neandrtálského člověka v jeskyni **Feldhofer** v údolí Neander v Německu, žil před zhruba 35 000 až 70 000 lety (Larsen *et al.*, 1998)
- Kringsovi a kol. se podařilo analyzovat sekvenci dlouhou **378 pb (HVR1)**
- porovnali tuto sekvenci **s 994 různými sekvencemi žijícího moderního člověka**, provedli párová porovnání a hledali odlišnosti mezi neandrtálskou a moderní DNA

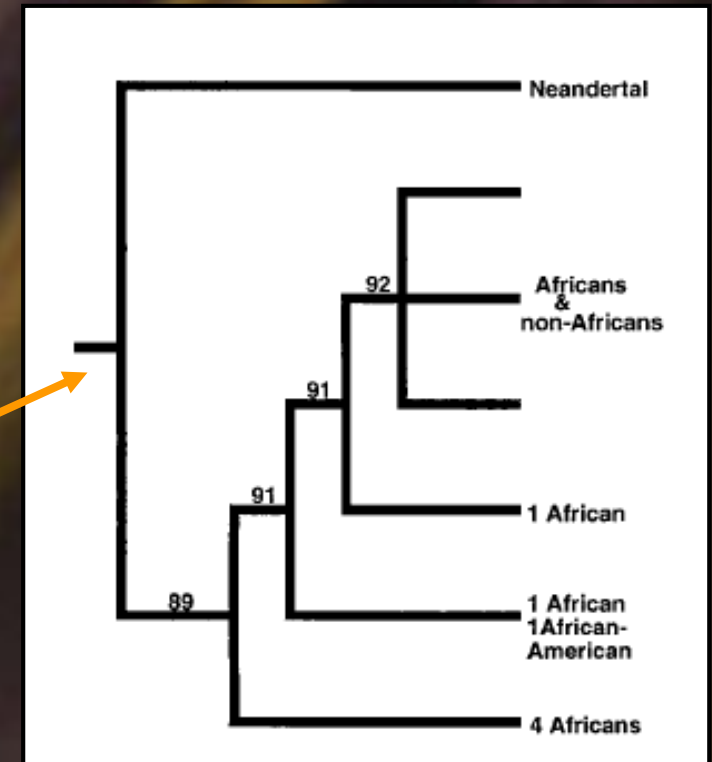
- našli **v průměru 27 odlišností** (rozdíly kolísaly od 22 do 36 v jednotlivých párových srovnáních)
- jako kontrolu provedli také srovnání **sekvencí moderní DNA** mezi sebou = průměrně **8 rozdílů** (1 až 24)

- průměrný počet rozdílů **v neandrtálské DNA** byl tedy asi **3x větší** oproti rozdílům v současné DNA (podíl vzorků s rozdíly 23 a 24 v moderní DNA tvořil jen 0,002 %)

= **Neandrtálci se geneticky odlišují od současných lidí**

- na základě tohoto srovnání však nelze odpovědět, zda-li byli Neandrtálci zcela oddělenou vývojovou linií

550 000 až 690 000 let



Analýza archaické DNA



1) Analýza aDNA člověka

2) Analýza první neandrtálské DNA

3) Analýza druhé neandrtálské DNA

4) Interpretace nalezených výsledků

- Byli Neandrtálci odděleným druhem nebo byli odlišným poddruhem a jsou součástí naší vlastní historie?

5) Křížili jsme se s Neandrtálci?

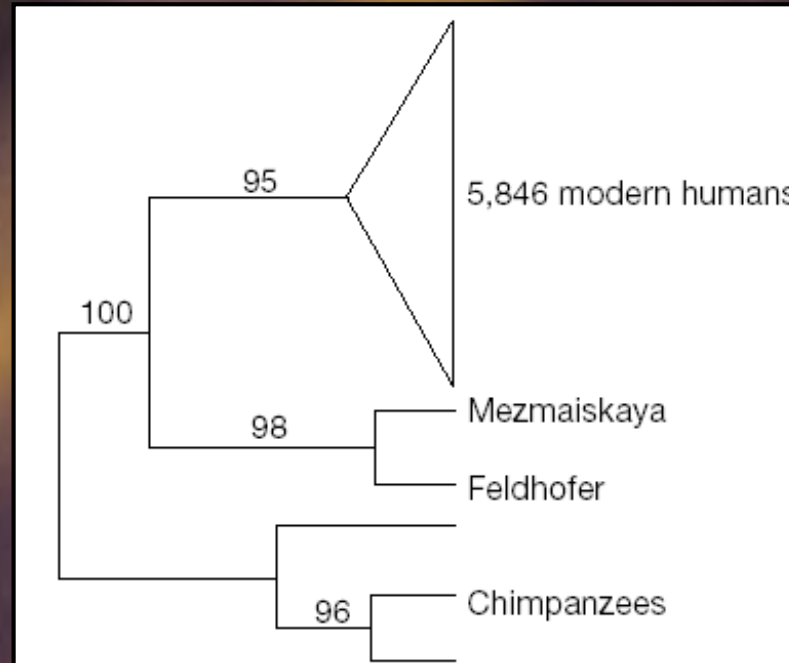
6) Další nálezy a izolace neandrtálské DNA

7) Analýza jaderných sekvencí a sekvenování genomu Neandrtálce

8) Proč Neandrtálci vyhynuli?

8) Děnisované – co o nich víme

= i tato neandrtálská mtDNA potvrdila jasnou genetickou odlišnost od DNA současných žijících lidí



Analýza archaické DNA



1) Analýza aDNA člověka

2) Analýza první neandrtálské DNA

3) Analýza druhé neandrtálské DNA

4) Interpretace nalezených výsledků

- Byli Neandrtálci odděleným druhem nebo byli odlišným poddruhem a jsou součástí naší vlastní historie?

5) Křížili jsme se s Neandrtálci?

6) Další nálezy a izolace neandrtálské DNA

7) Analýza jaderných sekvencí a sekvenování genomu Neandrtálce

8) Proč Neandrtálci vyhynuli?

8) Děnisované – co o nich víme

4) Interpretace nalezených výsledků

Byli Neandrtálci odděleným druhem nebo jsou součástí naší vlastní historie?

- jasná odlišnost neandrtálské mtDNA potvrzuje závěry na základě fosilních nálezů, tedy že **Neandrtálci jsou odlišní**

Existují dva názory:

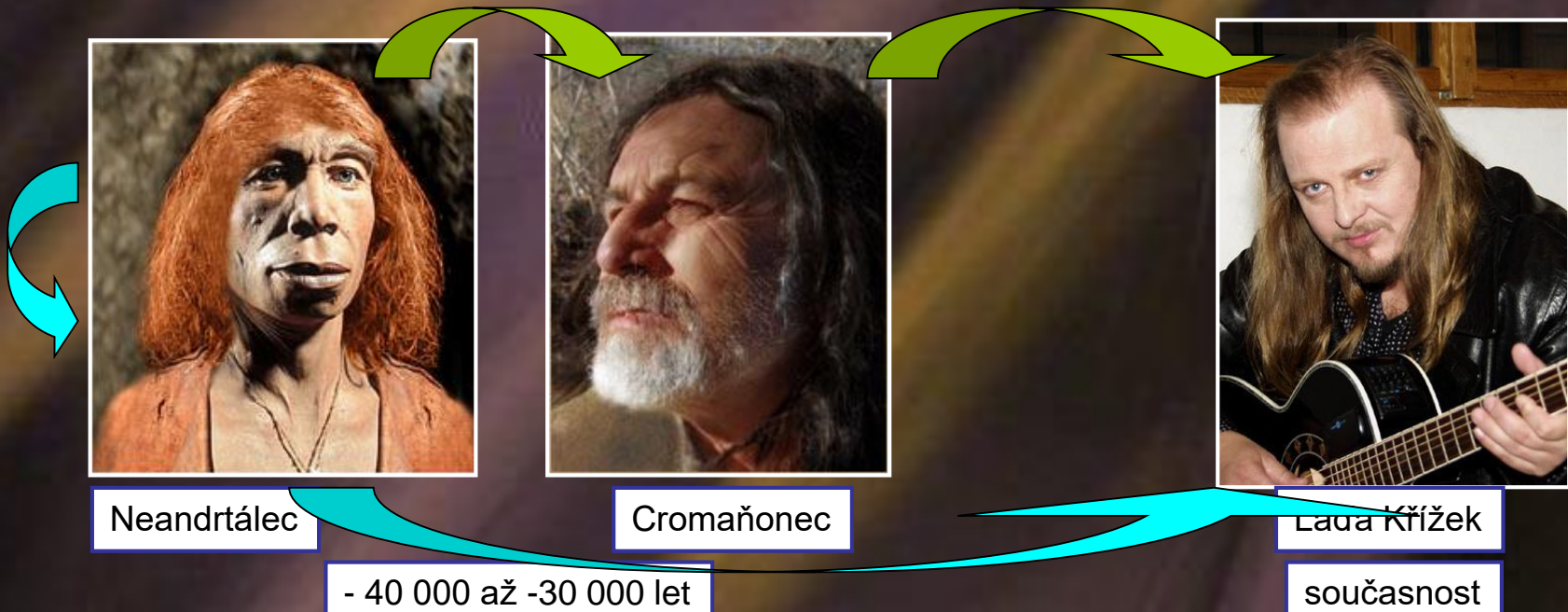
- 1) **Neandrtálci byli odlišným druhem**, který byl kompletně **nahrazen** moderním člověkem po jeho příchodu do Evropy.
 - tento názor však **nevylučuje možnost kulturních i sexuálních kontaktů**, i když asi s neplodným potomstvem v případě, že se jednalo o tak odlišné druhy, jak se zdá
- 2) Druhou možností je, že **Neandrtálci nebyli odlišným druhem**, ale byli součástí jedné vývojové linie, jak předpokládá **multiregionální model**.
 - pokud byli Neandrtálci součástí jedné vývojové linie, pak by měl existovat **genový tok mezi Neandrtálci a dalšími archaickými populacemi**
 - pokud nebyli reprodukčně izolovaní, pak musíme jejich **stopy** objevit také **v DNA současných lidí**

Abychom mohli podrobit zkoumání tyto dvě hypotézy na základě genetických údajů, pak potřebujeme mít k dispozici sekvenční DNA:

- 1) žijících lidí
- 2) Neandrtálců
- 3) fosílií anatomicky moderních lidí

Pak je potřeba prozkoumat genetické a evoluční vztahy:

- ✓ - neandrtálských populací mezi sebou
- ✓ - neandrtálských populací a populací současného člověka
- neandrtálských populací a populací starověkého moderního člověka z doby Neandrtálců
- populací starověkého moderního člověka a žijícího moderního člověka



Interpretace genetických údajů dvou neandrtálských jedinců ve srovnání s DNA žijícího člověka.

- mezi Feldhofer a Mezmaiskaya – **12 sekvenčních rozdílů**

x

- v rámci populace žijícího člověka v Evropě najdeme v průměru **5,3 rozdílů** (u Asiatů 6,3)
- 12 rozdílů (jako neandrtálci mezi sebou) má jen méně než 1 % žijících Evropanů

= je tu **statisticky významný rozdíl v počtu odlišností** v rámci současné žijící populace Evropanů a nežijících Neandrtálců (mezi 5,3 a 12 rozdílů)

- oproti tomu **uvnitř současné africké populace** je četnost rozdílů mezi jedinci v průměru **8,4**
- 12 rozdílů má 37 % žijících Afričanů

= v porovnání s Neandrtálci **statisticky nevýznamný rozdíl**

= odlišnosti mezi Neandrtálci navzájem jsou podobné jako mezi současnými Afričany

- ovšem nutno pamatovat, že **porovnáваме pouze dvě neandrtálské sekvence**, které ani nepochází z téže doby - Mezmaiskaya je 29 000 let stará a Feldhofer 35 000 až 70 000 let – **značný rozdíl ve stáří může stát za většinou rozdílů, jimiž se liší**

Jak velkou odlišnost bychom očekávali, pokud by byli Neandrtálci stejný druh jako moderní člověk?

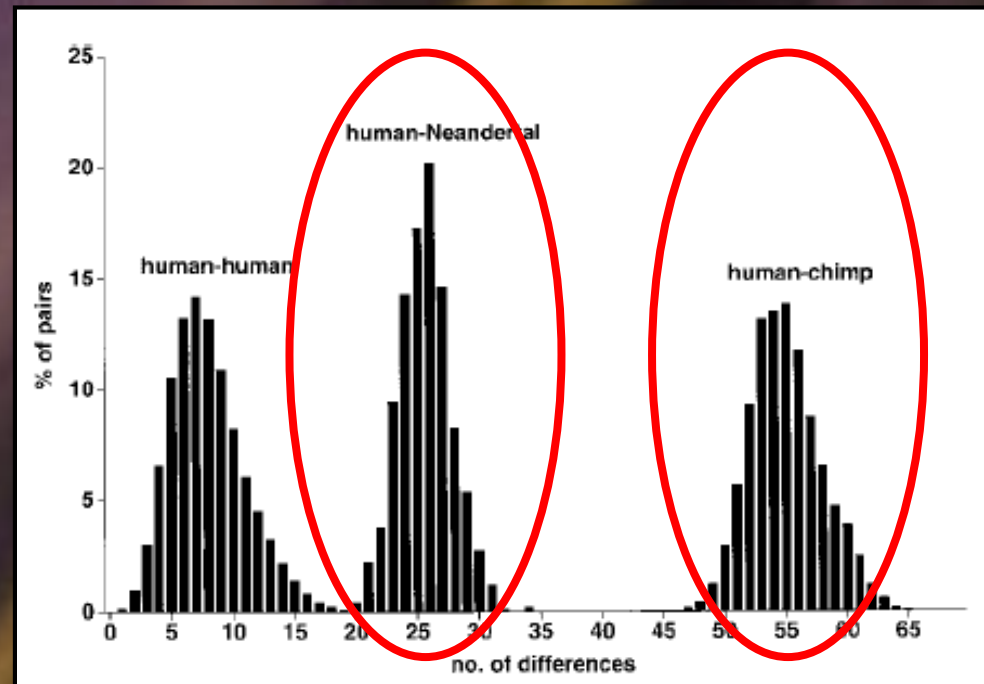
- podle Kringse *et al.* je to v průměru 8,0 změn – **27,2 změn je 3x více**

Odlišnost neandrtálské DNA je tedy asi 3x větší než je odlišnost mezi současnými lidmi, kteří jsou zástupci téhož druhu.

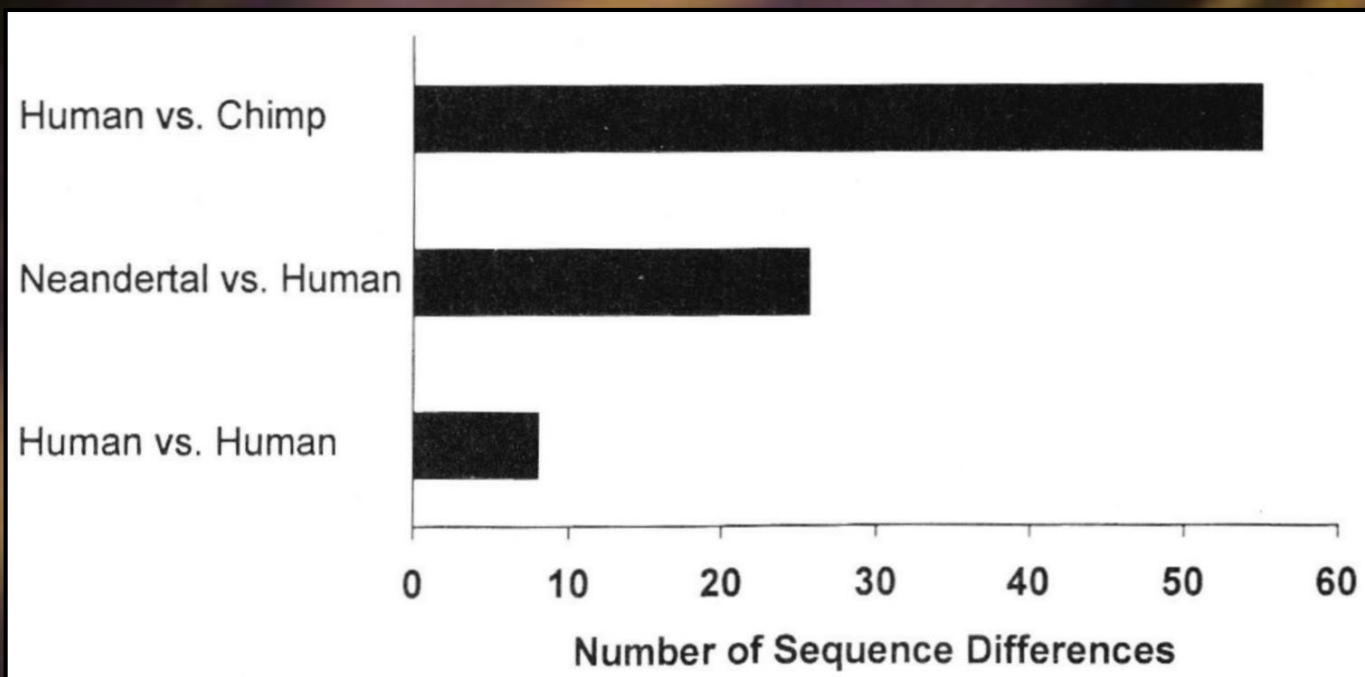
= Neandrtálci se (na základě dvou / tří sekvencí) spíše zdají být odlišným druhem od žijícího moderního člověka

Je však tento počet rozdílů dostatečný proto, abychom jednoznačně řekli: Neandrtálci byli z genetického hlediska odlišným druhem?

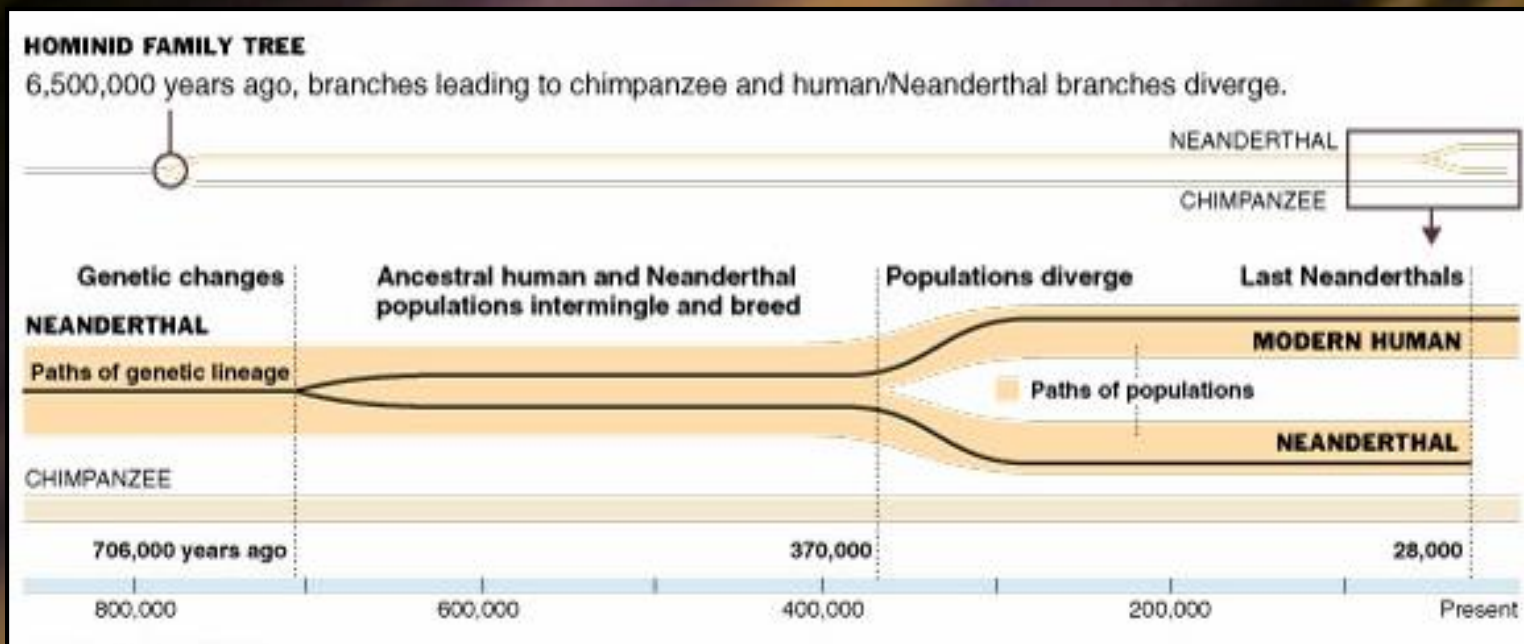
- Krings *et al.* také srovnali **986 sekvencí mtDNA žijících lidí s 16 sekvencemi žijících šimpanzů** (333 pb dlouhá sekvence, která se vyskytuje u obou druhů)
- v této sekvenci našli:
 - v průměru **25,6 rozdílů mezi Feldhoferem a žijícími lidmi (20-34)**
 - v průměru **55,0 rozdílů mezi lidmi a šimpanzi (46-67)**
- **mezi Neandrtálci a žijícími lidmi je i v této sekvenci opět trojnásobný rozdíl** ($25,6/8,0 = 3,2$) a **asi poloviční rozdíl oproti odlišnosti mezi žijícími lidmi a šimpanzi** ($25,6/55,0 = 0,47$)



- na obrázku jsou výsledky zachyceny graficky:
- Neandrtálci jsou geneticky odlišní od současných lidí, avšak tato odlišnost není tak velká, jako je odlišnost mezi současnými lidmi a šimpanzi

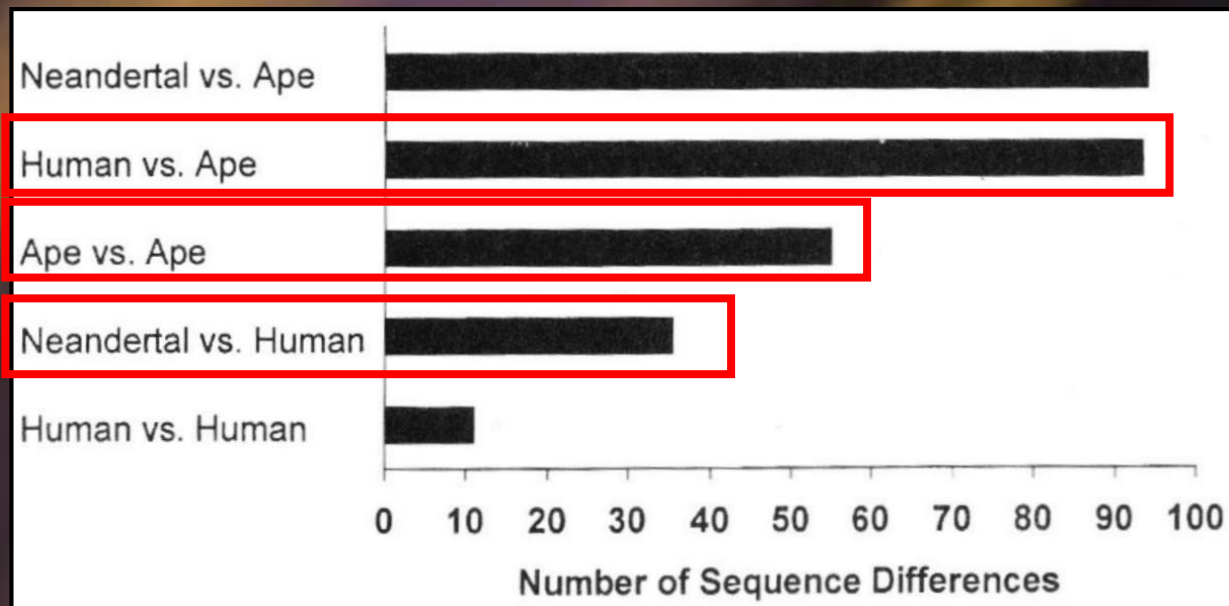


- tento **intermediární výsledek je očekávatelný**, protože šimpanzi se jako druh oddělili od lidí mnohem dříve (před asi 6 miliony let), zatímco Neandrtálci se od společného předka odvětvili **teprve v průběhu posledního milionu let**



- odhad doby oddělení Neandrtalců a moderního člověka **na základě molekulárních hodin** (kalibrace 4-5 milionů MRCA člověk-šimpanz) – **550 000 až 690 000** (v souladu s paleoantropologickými odhady)
- platí samozřejmě za předpokladu, že Neandrtálci byli odlišným druhem, v opačném případě údaje vypovídají o historii mtDNA, nikoliv o historii dávných populací člověka

- stejné analýzy byly provedeny také [pro druhou mtDNA Feldhofer](#)
- **výsledky** (viz obrázek) byly **stejně**:
 - rozdíly **mezi neandrtálskou DNA a DNA žijících lidí** jsou **větší** než rozdíly mezi žijícími lidmi, ale **menší** než rozdíly **mezi lidmi a opicemi** (zde šimpanz i bonobo)
 - odlišnost **mezi Neandrtálci a lidmi** je také **menší** než odlišnost **mezi zkoumanými opicemi** (avšak porovnávány byly dva odlišné druhy – šimpanz a bonobo)
- odhad **stáří MRCA Neandrtalců a moderního člověka** je **317 000 až 741 000** let (365 000 až 853 000 lety podle [Mezmaiskaya](#))



- odhad stáří společného předka obou neandrtálských zástupců je mezi 151 000 až 352 000 lety

- podle některých tak získané výsledky **potvrzují model nahrazení** – Neandrtálci a moderní člověk představují **odlišné druhy**, které se oddělily od společného předka (možná *H. heidelbergensis*) v období středního Pleistocénu
 - !!! **avšak** musíme mít na paměti, že **porovnáváme sekvence, které se liší stářím o několik desítek tisíc let** (rozdíl mezi neandrtálskou a současnou DNA)
- = velký rozdíl v sekvencích tak může být odrazem působení **genového posunu** za dobu **zhruba 40 000 let** (Nordborg, 1998)
- navíc jde o **stále malý počet analyzovaných sekvencí**

Rozmanitost Neandrtálské DNA ve vztahu k regionálním populacím aneb platnost multiregionálního modelu (Neandrtálci jsou poddruhem) stále žije

- porovnáme-li HVRI sekvenci prvního zástupce z Feldhoferu s DNA žijících lidí jednotlivých kontinentálních populací, získáme následující údaje:

Feldhofer x Evropani = průměrně 28,2 rozdílů

Feldhofer x Afričani = průměrně 27,2 rozdílů

Feldhofer x Asiati = průměrně 27,7 rozdílů

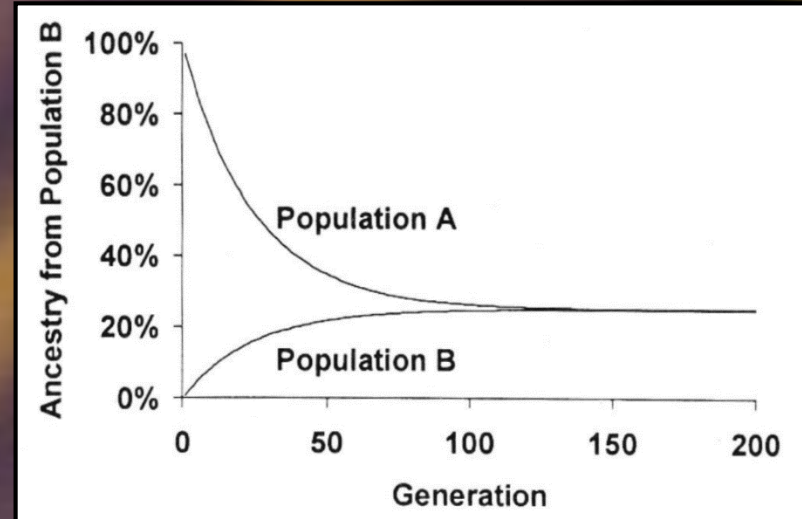
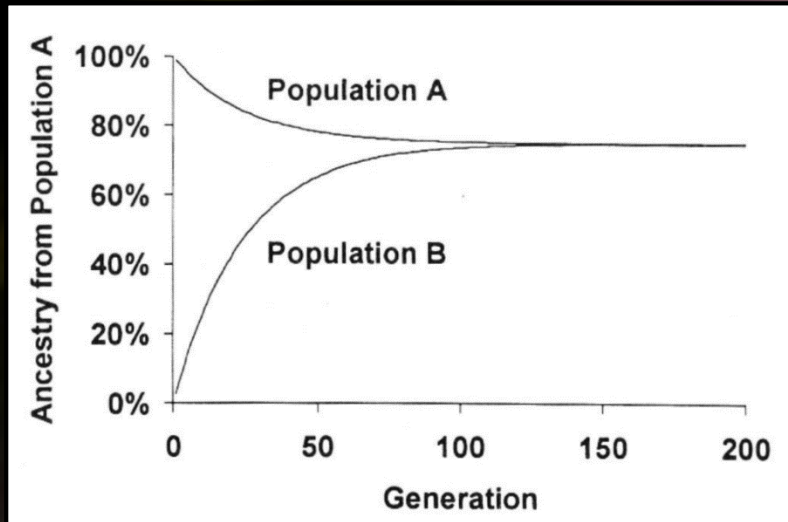
Feldhofer x původní Američani = průměrně 27,4 rozdílů

Feldhofer x Austrálie a Oceánie = průměrně 28,3 rozdílů

- velmi podobné údaje získáme i pro Feldhofer 2 (HVR1) a pro Mezmaiskaya

= odlišnost Neandrtálců je od všech regionálních populací stejná (neplatí pro genomovou DNA – viz později), jinými slovy nenalézáme tu očekávanou větší podobnost s Evropany v případě platnosti multiregionálního modelu

- podstata může být v dostatečně dlouho trvajícím **genovém toku**



- důsledkem dostatečně dlouho trvajícího genového toku je, že obě populace jsou si téměř podobné

= totéž mohlo nastat v případě populací moderního člověka, pokud trval genový tok dostatečně dlouho, pak je populace Evropanů stejně odlišná od původní Neandrtálské populace jako populace z ostatních regionů

= **oba modely** (nahrazení i multiregionální) **mohou tedy vést ke stejnému výsledku**

Byli tedy Neandrtálci odlišným poddruhem?

- pokud by Neandrtálci s námi sdíleli stejnou vývojovou linii (podle multiregionalistů), pak by jejich genetická odlišnost mohla nasvědčovat tomu, že byli odlišným poddruhem než je moderní člověk
- podle některých antropologů *Homo sapiens neanderthalensis* x *Homo sapiens sapiens* (poddruhy moderního člověka *Homo sapiens*)

Lze najít důkaz této alternativy také v DNA?

Byli tedy Neandrtálci odlišným poddruhem?

Jak velká je odlišnost v mtDNA mezi geneticky odlišnými poddruhy?



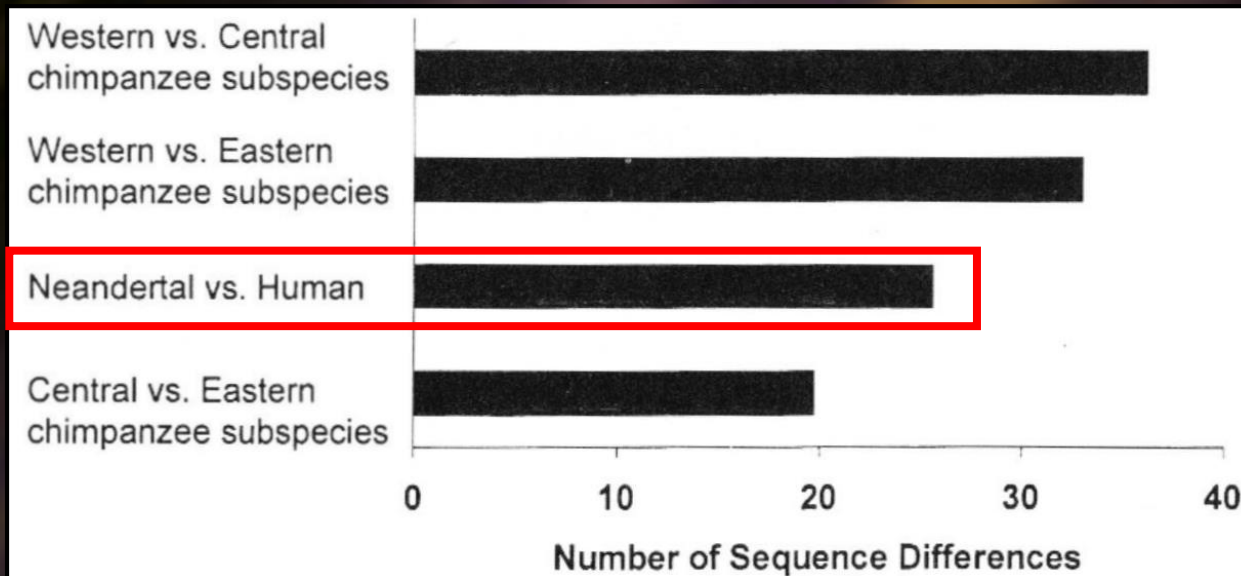
- Krings *et al.* porovnali sekvenčních odlišností v 312 pb dlouhé sekvenci mtDNA mezi jednotlivými poddruhy šimpanzů

Pan troglodytes schweinfurthii (východní poddruh)
Pan troglodytes troglodytes (centrální poddruh)
Pan troglodytes verus (západní poddruh)



- rozdíly mezi jednotlivými poddruhy šimpanze (312 pb oblasti HVRI):
 - mezi centrálním a východním poddruhem = průměrně 19,7 rozdílů
 - mezi západním a východním poddruhem = průměrně 33,0 rozdílů
 - mezi západním a centrálním poddruhem = průměrně 36,2 rozdílů

- mezi Neandrtálci a žijícími lidmi = průměrně 25,6 rozdílů



- počet rozdílů mezi Neandrtálci a žijícími lidmi **je menší** než mezi dvěma ze tří poddruhů šimpanzů

Neandrtálci a žijící moderní člověk mohou představovat odlišné poddruhy v rámci stejného druhu.

Prokázanou odlišnost mtDNA Neandrtálců v porovnání s DNA současného člověka je možné prozatím vysvětlit jak pomocí modelu nahrazení, tak i modelu multiregionálního.