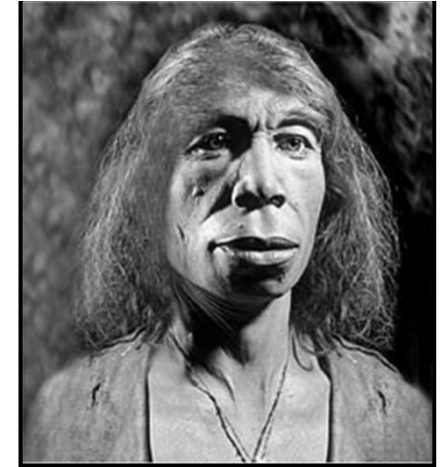




Analýza archaické DNA



- 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



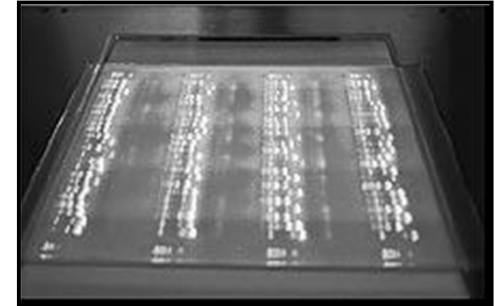
problémy:

- 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?

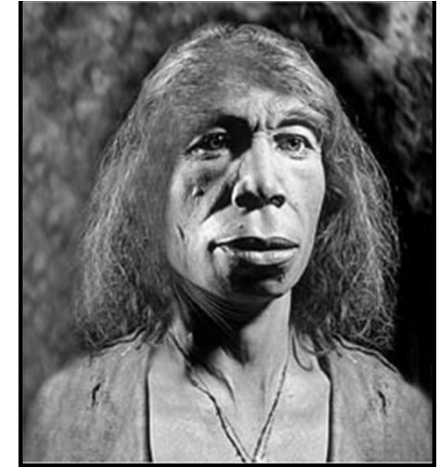
= zabránit degradaci a kontaminaci již při odběru a analýze

- 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?

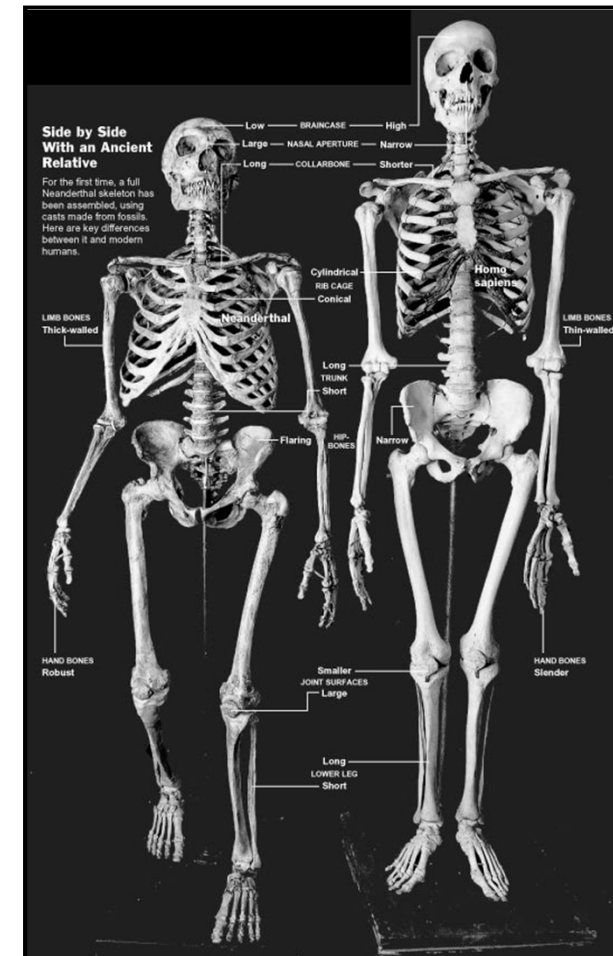
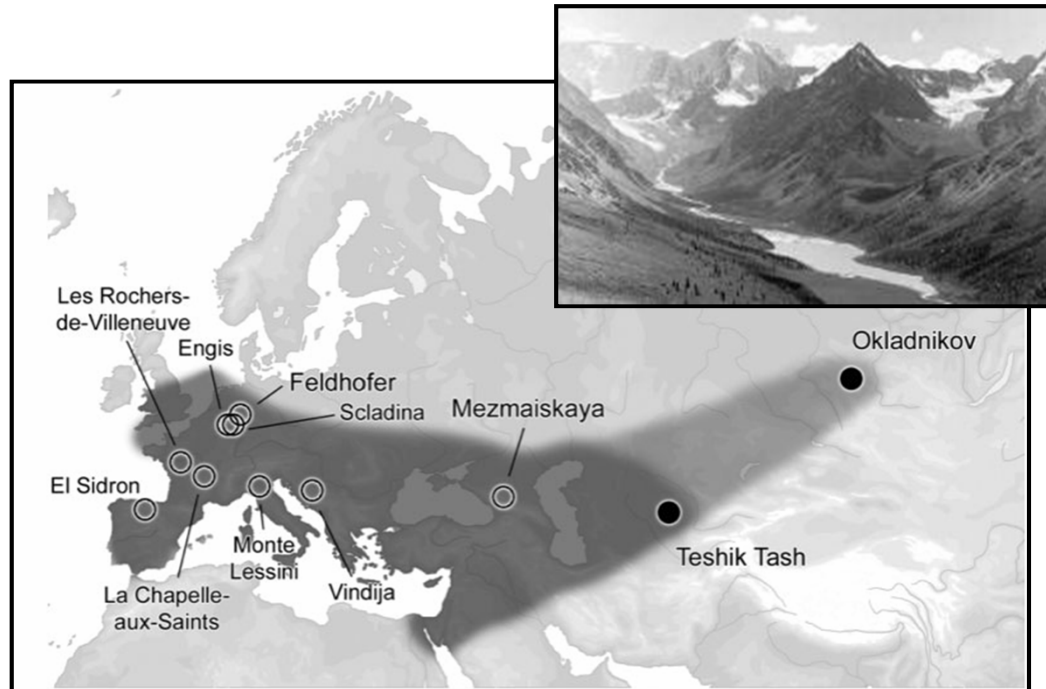
Máme v naší současné DNA nějaké neandrtálské geny nebo sekvence?

Proč Neandrtálci zanikli?

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

Kdo byli Neandrtálci?

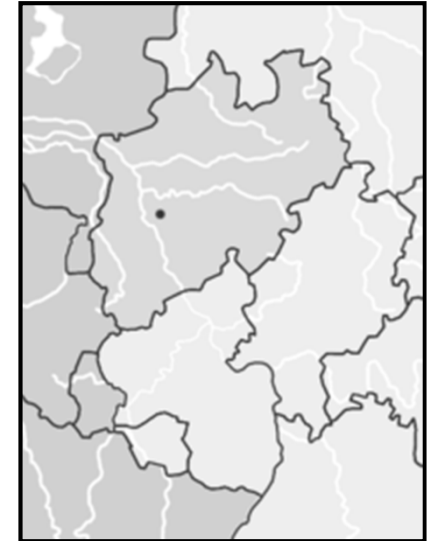
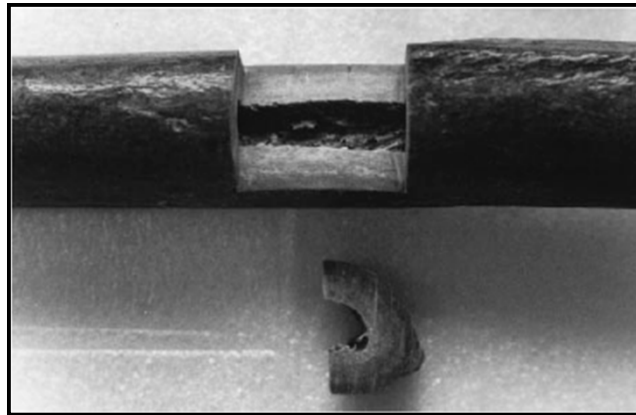
- *Homo neanderthalensis* nebo *Homo sapiens neanderthalensis*
- žili v Evropě před zhruba 400 000 až 30 000 lety a v západní Asii asi před 150 000 lety
- první nález popsán v roce 1856 v údolí Neander v Německu



- 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.*)



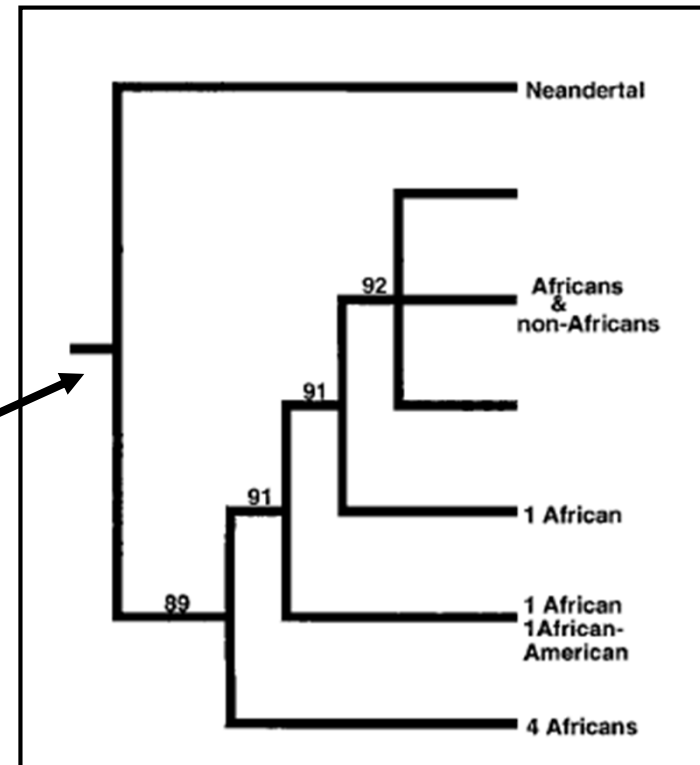
- konkrétně se jednalo o prvně nalezené pozůstatky Neandrtálského člověka v jeskyni **Feldhofer** v údolí Neander v Německu, žil před zhruba 35 000 až 70 000 lety (Larsen *et al.*, 1998)
- Kringsovi a kol. se podařilo analyzovat sekvenci dlouhou 378 pb (HVR1)
- porovnali tuto sekvenci s 994 různými sekvencemi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

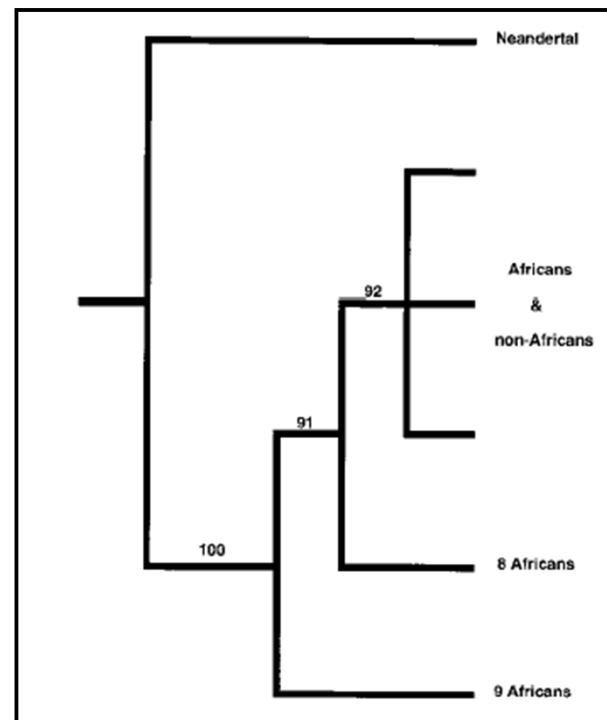
= **Neandrtálci se geneticky odlišují od současných lidí**

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

550 000 až 690 000 let

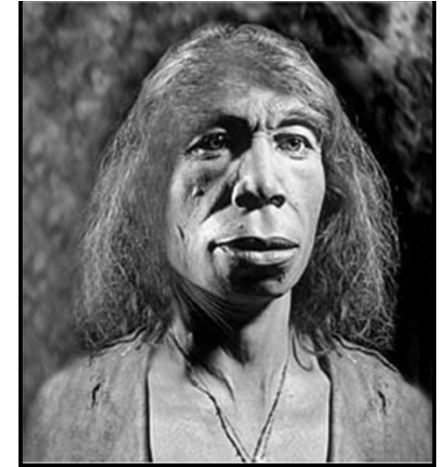


- později Krings *et al.* (1999) izolovali DNA z dalšího jedince z lokality **Feldhofer**
- vedle HVR1 se podařilo získat ještě 340 pb dlouhou sekvenci z hypervariabilního regionu (HVRII)
- získané výsledky byly velmi podobné výsledkům z roku 1997
- Neandrtálci se v HVRII regionu odlišují od žijících lidí v průměru na 35 místech (s rozpětím 29 až 43 rozdílů)



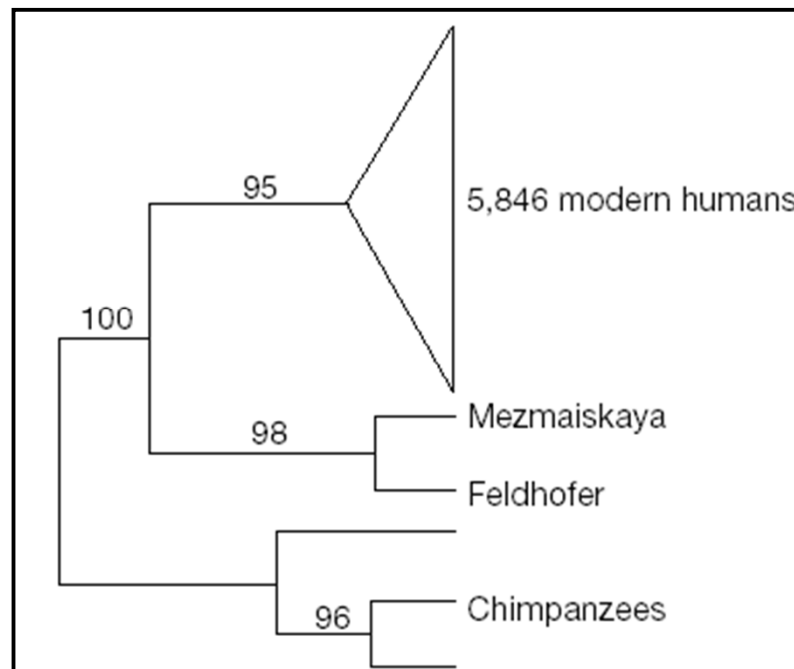


Analýza archaické DNA



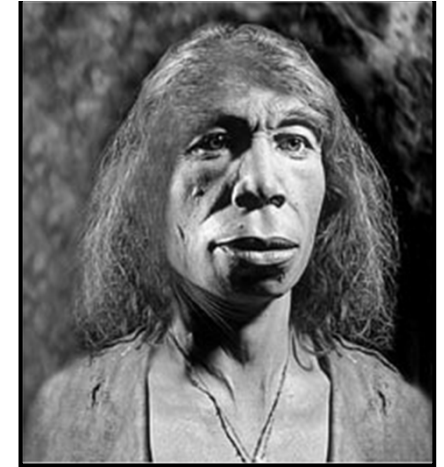
- 1) Analýza aDNA člověka
- 2) Analýza první neandrtálské DNA
- 3) Analýza druhé neandrtálské DNA
- 4) Interpretace nalezených výsledků
 - *Byli Neandrtálci odděleným druhem nebo byli odlišným poddruhem a jsou součástí naší vlastní historie?*
- 5) Křížili jsme se s Neandrtálci?
- 6) Další nálezy a izolace 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:

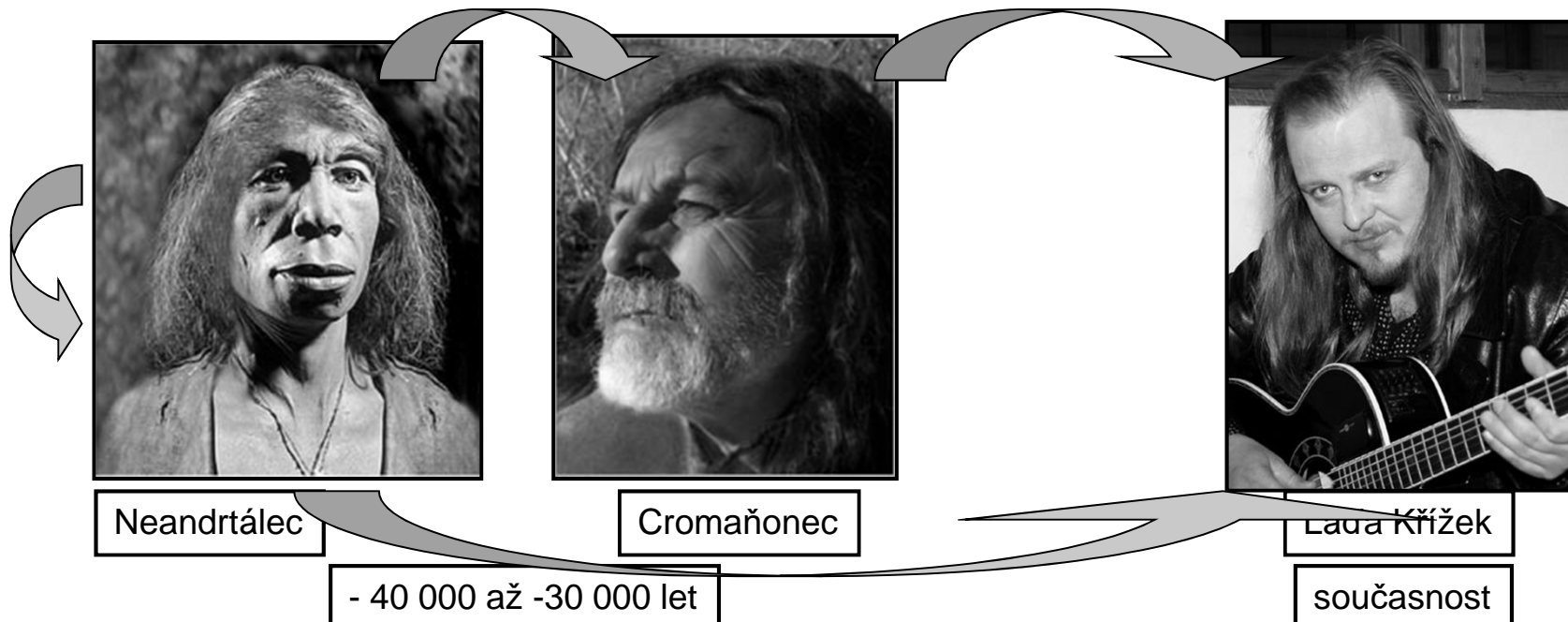
- 1) Neandrtálci byli odlišným druhem, který byl kompletně nahrazen moderním člověkem po jeho příchodu do Evropy.
 - tento názor však nevylučuje možnost kulturních i sexuálních kontaktů, i když asi s neplodným potomstvem v případě, že se jednalo o tak odlišné druhy, jak se zdá
- 2) Druhou možností je, 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 sekvence 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 Asiátů 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?

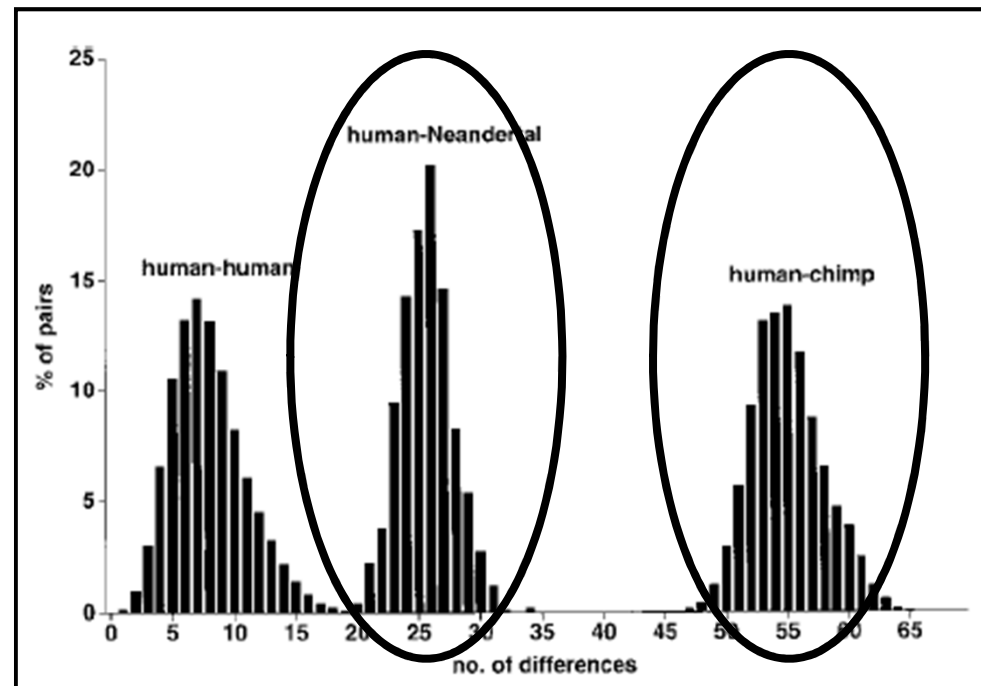
- podle Kringse *et al.* je to v průměru 8,0 změn – **27,2 změn je 3x více**

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

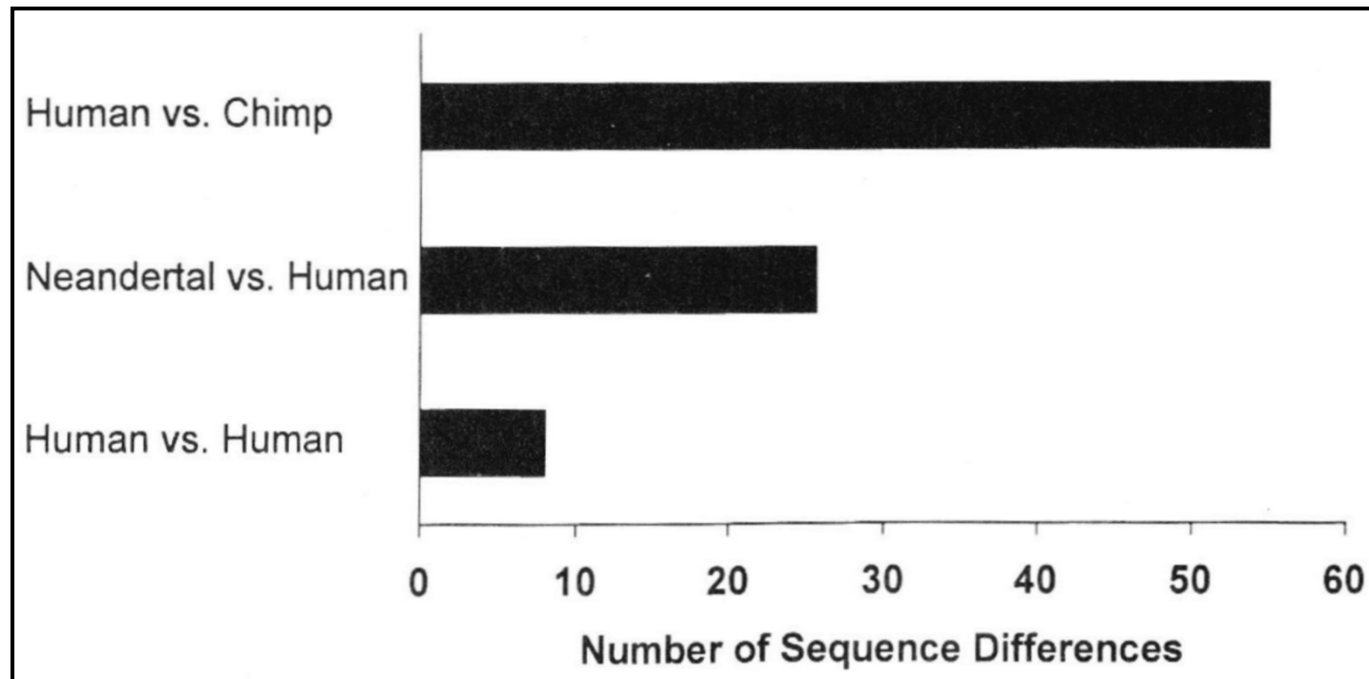
= Neandrtálci se (na základě dvou / tří sekvencí) spíše zdají být odlišným druhem od žijícího moderního člověka

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

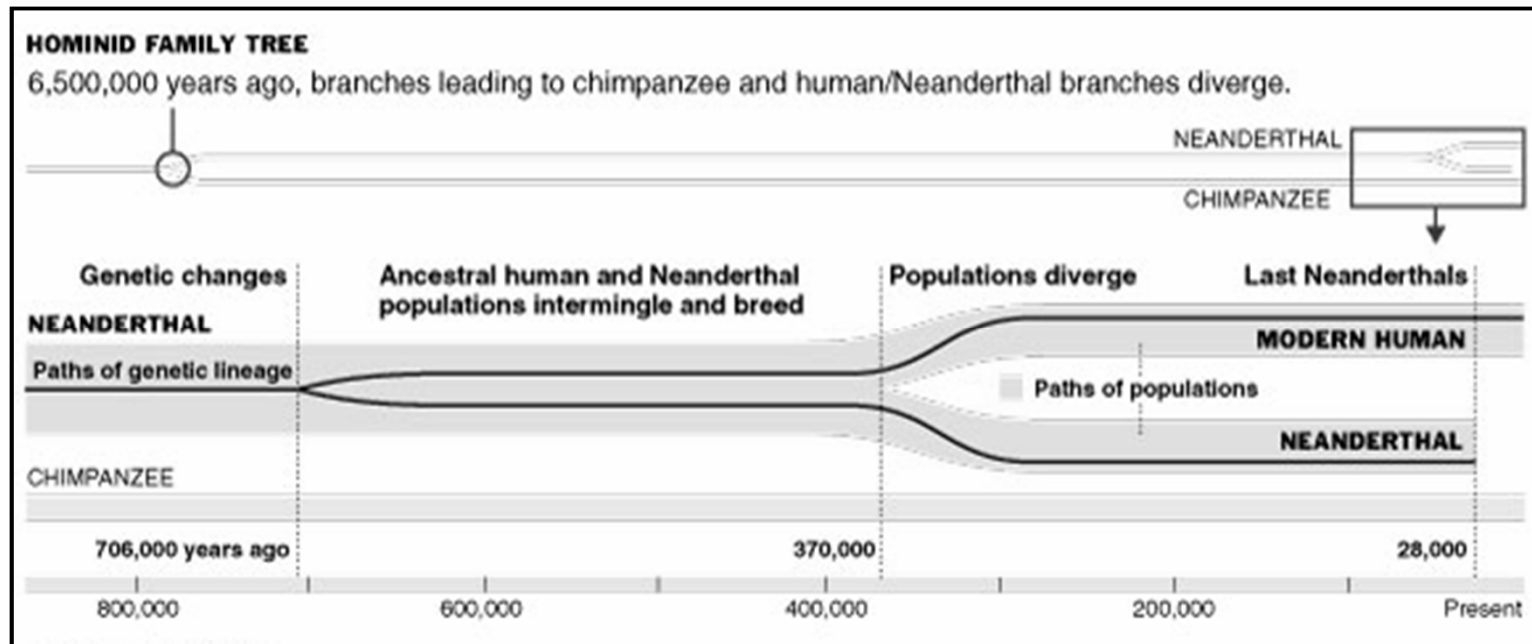
- Krings *et al.* také srovnali 986 sekvencí mtDNA žijících lidí s 16 sekvencemi žijících šimpanzů (333 pb dlouhá sekvence, která se vyskytuje u obou druhů)
- v této sekvenci našli:
 - v průměru 25,6 rozdílů mezi Feldhoferem a žijícími lidmi (20-34)
 - v průměru 55,0 rozdílů mezi lidmi a šimpanzi (46-67)
- 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

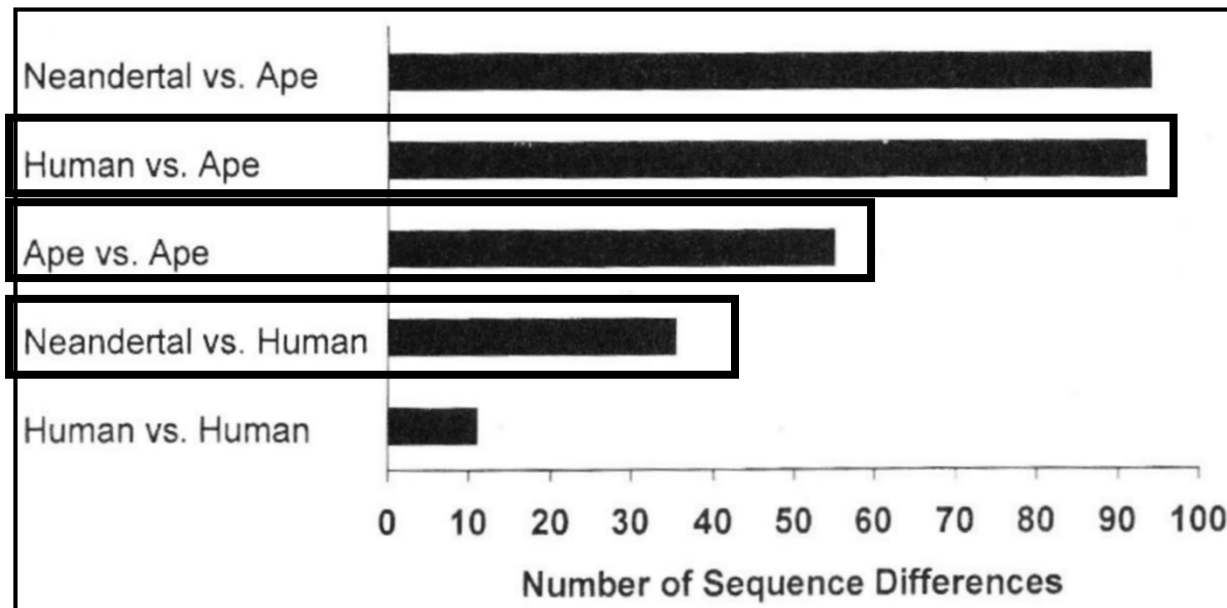


- tento intermediární výsledek je očekávatelný, protože šimpanzi se jako druh oddělili od lidí mnohem dříve (před asi 6 miliony let), zatímco Neandrtálci se od společného předka odvětvili teprve v průběhu posledního milionu let



- 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 stejné:
 - 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 Neandrtálců 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 porovnáваме 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

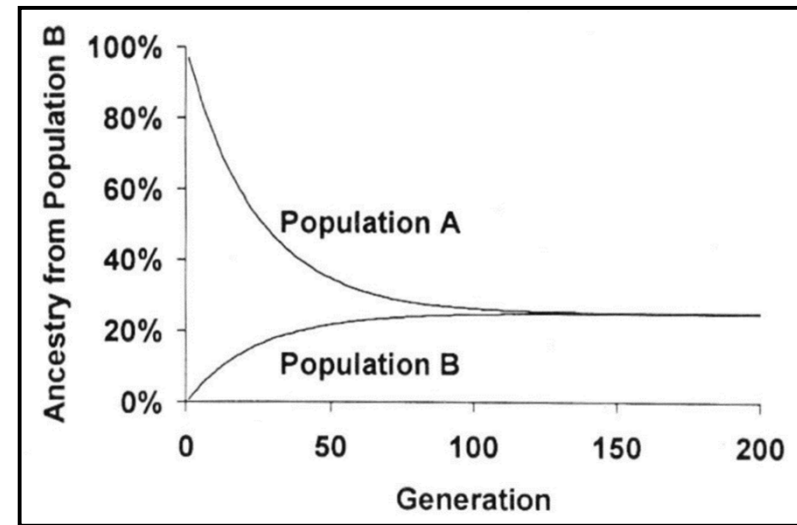
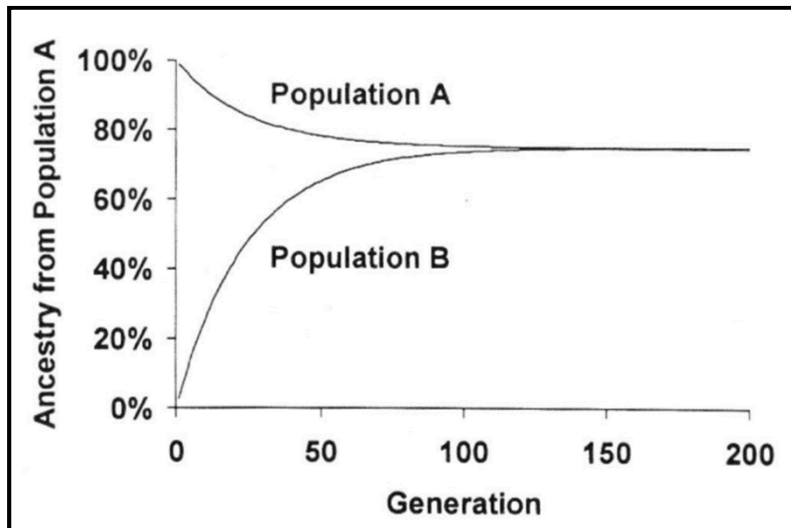
Feldhofer x původní Američani = průměrně 27,4 rozdílů

Feldhofer x Austrálie a Oceánie = průměrně 28,3 rozdílů

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

= odlišnost Neandrtálců je od všech regionálních populací stejná (neplatí pro genomovou DNA – viz později), jinými slovy nenalzáme 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?

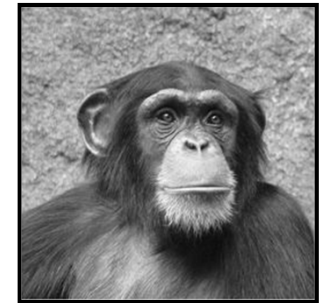


- Krings *et al.* porovnali sekvenčních odlišností v 312 pb dlouhé sekvenci mtDNA mezi jednotlivými poddruhy šimpanzů

Pan troglodytes schweinfurthii (východní poddruh)

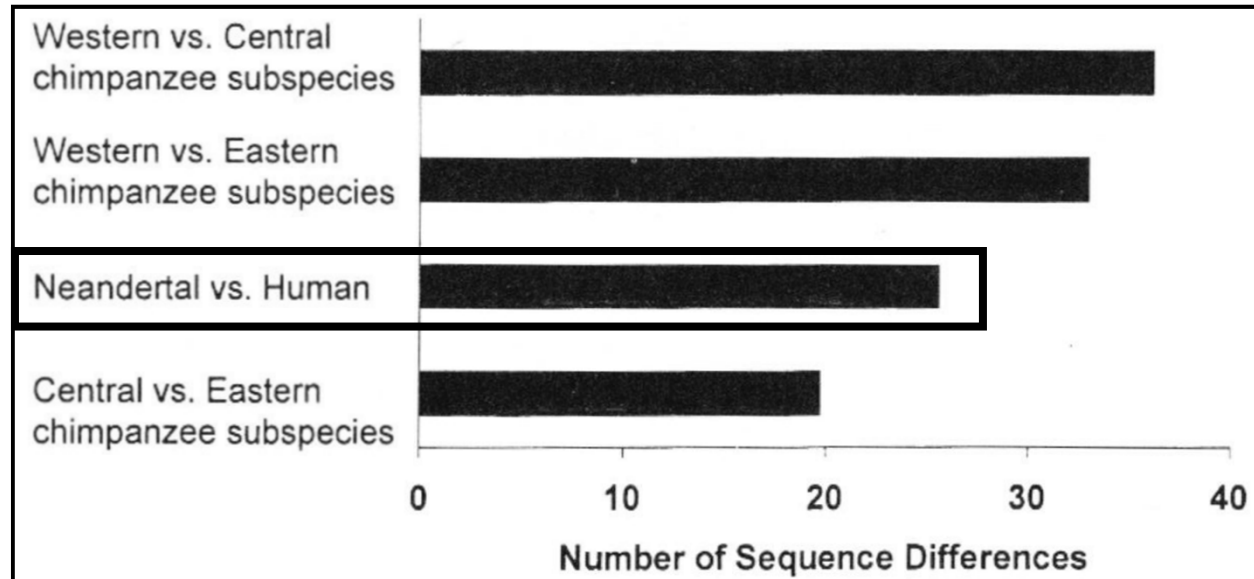
Pan troglodytes troglodytes (centrální poddruh)

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.