

# Analýza starobylé DNA a rekonstrukce historie

Kristýna Brzobohatá

Laboratoř biologické a molekulární antropologie

Ústav experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta

Masarykova univerzita

[brzobohata@sci.muni.cz](mailto:brzobohata@sci.muni.cz)

XIX. ročník kurzu genetiky a molekulární biologie pro učitele středních škol

Brno 6. -7. 9. 2017

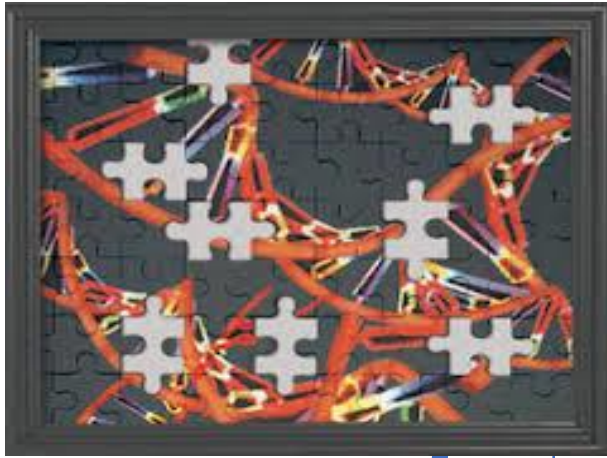
# Osnova:

- I. Co je starobylá DNA?
- II. Jak šel čas s výzkumem starobylé DNA?
- III. Čím se starobylá DNA liší od recentního genetického materiálu?
- IV. Jak zkoumat starobylou DNA – metodické pokroky?
- V. Výzkum evoluce rodu *Homo*
- VI. Fenotypování
- VII. Analýza metagenomu

# I. Co je starobylá DNA

- aDNA = ancient DNA, starobylá DNA, historická DNA
- Analýza aDNA zahrnuje výzkum jakéhokoliv biologického materiálu staršího 75 let (Graham, 2007)
- Výzkumem aDNA se zabývají obory molekulární antropologie, paleogenetika, molekulární archeologie, antropogenetika atd...

# Analýza starobylé DNA a rekonstrukce historie



Genetika  
Populační  
genetika  
Forenzní  
genetika

Evoluční  
biologie  
Antropologie  
Paleontologie

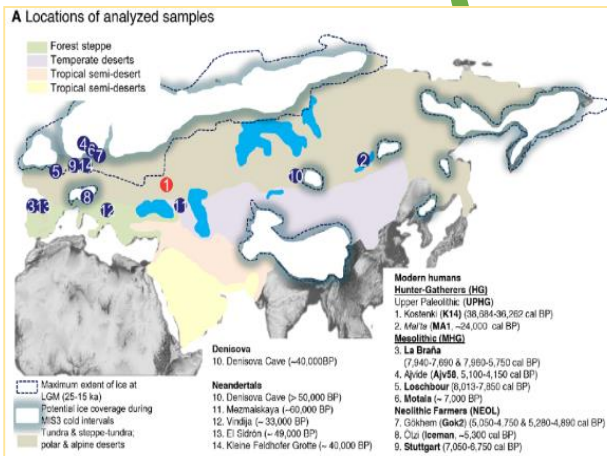
Biochemie  
Chemie

## aDNA

Bioinformatika  
Biostatistika

Historie  
Archeologie

Molekulární  
biologie



## II. Jak šel čas s výzkumem starobylé DNA?

1984 – Analýza aDNA (Higuchi *et al.*, 1984)

1985 – Analýza lidské aDNA (Pääbo 1985)

1988 – PCR aDNA (Pääbo *et al.*, 1988)

1991 – Analýza aDNA z kostí (Hagelberg *et Clegg*, 1991)

1992 – Analýza aDNA DNA komára zalitého v jantaru (Cano *et al.*, 1992)

1995 - 2000 – Protikontaminační opatření

1996 – Určení pohlaví (Stone *et al.*, 1996)

1997 – Analýza aDNA neandrtálce (Krings *et al.*, 1997)

2007 – gen z neandrtálce (Lalueza - Fox *et al.*, 2007)

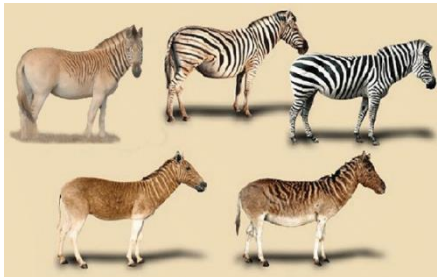
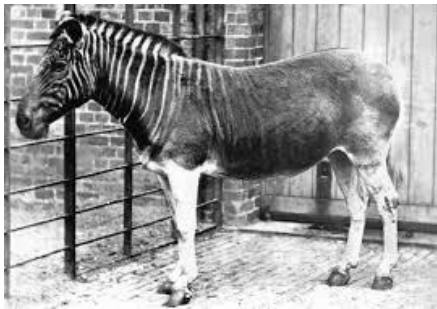
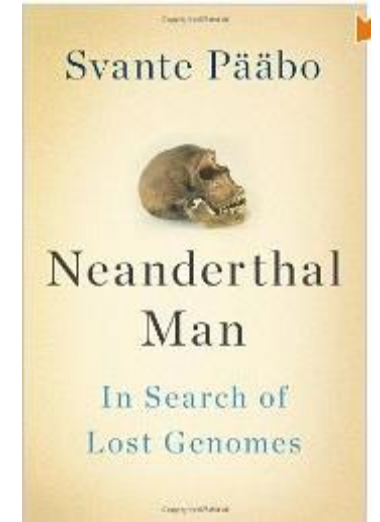
2007 – gen z archaického člověka (Krause *et al.*, 2007)

2010 – genom Denisované (Reich *et al.*, 2010)

2010 – genom neandrtálce (Green *et al.*, 2010)

2010 – genom archaického člověka (Ras *et al.*, 2010)

2014 – aDNA epigenom (Pedersen *et al.*, 2014)



# III. Čím se starobylá DNA liší od současné DNA?

Molekula starobylé DNA a její analýzy se v mnoha ohledech liší od recentní DNA (Oh *et al.*, 2012).

S výzkumem aDNA se pojí tyto zásadní komplikace:

- poškození řetězce aDNA, které vede k fragmentárnosti molekuly
- poškození bází, které vede k záměně nukleotidů, tzv. postmortem mutacím
- nízké množství DNA v templátu
- přítomnost cizorodých látek, tzv. inhibitorů, pocházejících z půdy, které negativně ovlivňují následné enzymatické reakce
- exogenní DNA (bakteriálního, rostlinného původu)
- nebezpečí kontaminace starobylého vzorku recentní DNA

# Posmrtné poškození DNA a inhibitory analýz

## Poškození během rozkladu organismu:

- Buněčné enzymy, bakterie, houby, rostliny, karnivorové...
- DNA je často metabolizována

## Poškození během diagenese:

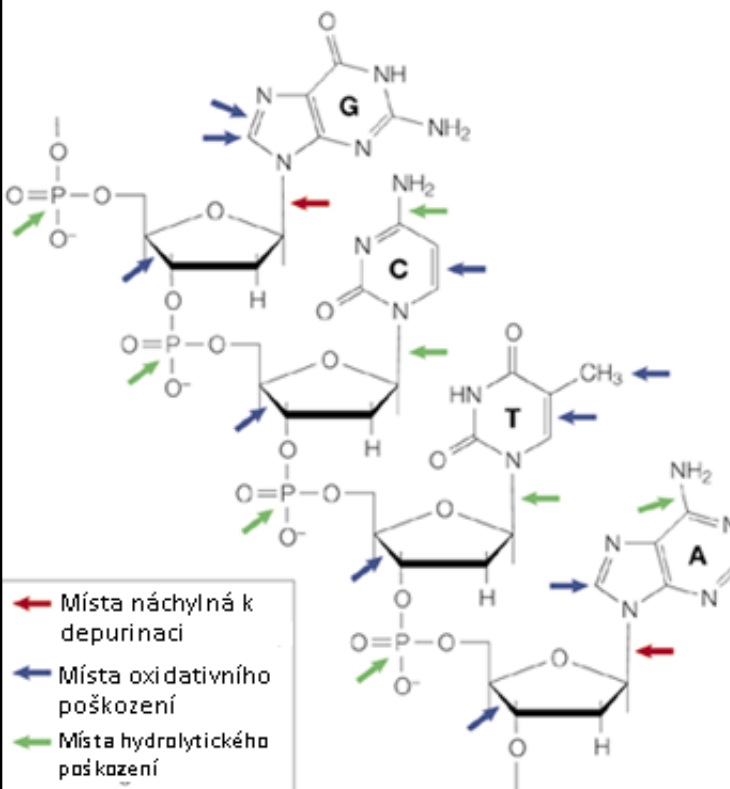
- vnějšími faktory: teplota, vlhkost, pH, expozice slunci...

Jedná se o **fyzikálně chemické** poškození **bez účasti enzymů**

Postihuje všechny části dvoušroubovice - fosfát, deoxribóza i nukleotidy

Nejčastěji se jedná o **hydrolytické** poškození způsobené vodou nebo **oxidativní** poškození následkem účinku volných radikálů.

Kombinací obou faktorů pak dochází k tzv. Maillardově reakci a vzniku cyklických sloučenin.



- Nejčastěji dochází k inhibici PCR
- Inhibitory PCR buď zastaví snižují její účinnost.

- Inhibitory jsou izolovány ze vzorku společně s DNA.

Mezi hlavní inhibitory patří:

**humínové kyseliny, fulvické kyseliny, tannin, hemanin, vápník atd.**

(Sutlović *et al.*, 2007)



# Verifikace analýz lidské aDNA



+ Souběžná DNA jiného živočišného druhu ze stejné lokality

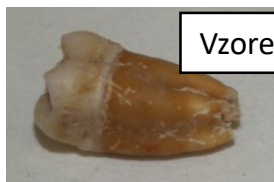


PCR s lidskými primery

Sterilní odběr *in situ*

Deponace

Očištění vzorku



Vzorek tkáně (zub/kost)

Izolace aDNA

+ Souběžná izolace NTC

Kvantifikace aDNA

ct nad 25  
NTC bez produktu PCR

Kontaminace

Amplifikace cílové sekvence u vzorků aDNA, NTC a pracovníků laboratoře

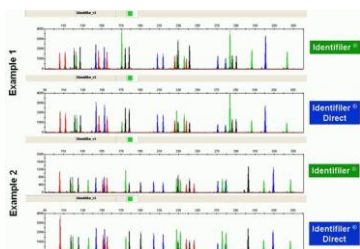
Zasazení do historického kontextu

VÝSLEDKY

Opakování experimentu v nezávislé laboratoři + porovnání výsledků

VALIDNÍ  
VÝSLEDKY

Porovnání výsledků STR profilů s profily pracovníků laboratoře





# Laboratoř biologické a molekulární antropologie (LBMA)

Jediné pracoviště v ČR přizpůsobené pro analýzy a DNA

Studijní obor, bakalářské i magisterské studium

Speciální biologie – Antropobiologie a antropogenetika

Absolventi tohoto oboru získají široké teoretické znalosti a praktické dovednosti jak z antropologické analýzy, tak metod molekulární biologie a genetiky aplikované na výzkum humánní DNA. Získají tak možnost širokého uplatnění v výzkumných laboratořích, v policejních laboratořích, ale i v archeologických institucích.

## Příklady výzkumů LBMA:

Eneolit – Kultura moravské malované keramiky (5. a 4. tis.př. n. l.)

Kultura zvoncovitých pohárů (2900 - 1800 př. n. l.)

Únětická kultura (2200 – 1700/1600 př. n. l.)

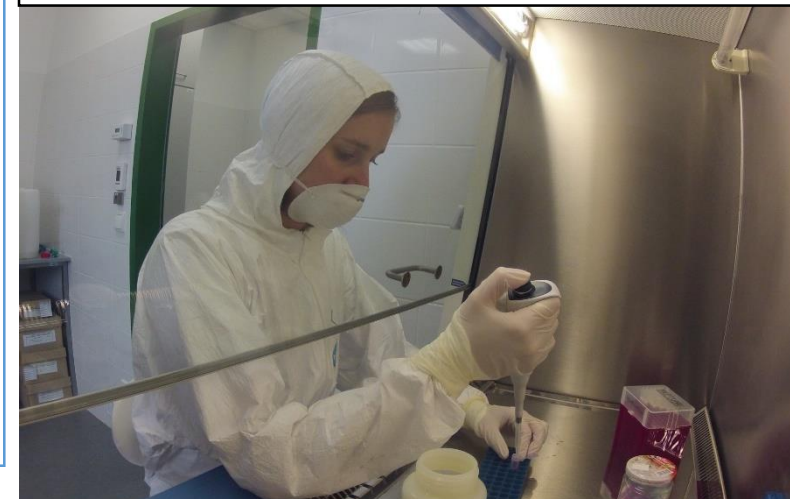
Velká Morava – Pohansko u Břeclavi, Znojmo Hradiště

Středověk – Diváky - Padělky za humny, kostnice u sv. Jakuba,

Porta Coeli v Předklášteří u Tišnova



Ukázka terénního výzkumu za protikontaminačních opatření (foto: Dadejová)



Ukázka pipetování v LBMA (foto: Pížová)

## IV. Jak zkoumat starobylou DNA?

- Masivní paralelní sekvenování = sekvenování nové generace (Next Generation sequencing (NGS))
- Touto metodou je možno souběžně číst velké množství sekvencí.
- Velmi vhodná metoda pro analýzu aDNA:
  - dokáže analyzovat i velmi malé množství templátu
  - odliší postmortem mutace od perimortem SNP
  - může detekovat pouze aDNA na základě poškození molekuly a tím autentifikovat výsledky
  - NGS posunulo limity stáří analyzovatelných vzorků (1 mil. let, 25 pb)



Ukázka sekvenátor pro NGS Illumina MiSeq (foto: <http://massgenomics.org>)

## V. Výzkum rodu *Homo*

Kdy a kde vznikl anatomicky moderní člověk?

S kým a kde se anatomicky moderní člověk na svých expanzích potkal?

Pokud už někoho potkal, měli spolu děti?

Jsou změny v archeologických nálezích odrazem technologického pokroku kultury nebo nahrazením původní populace novou?

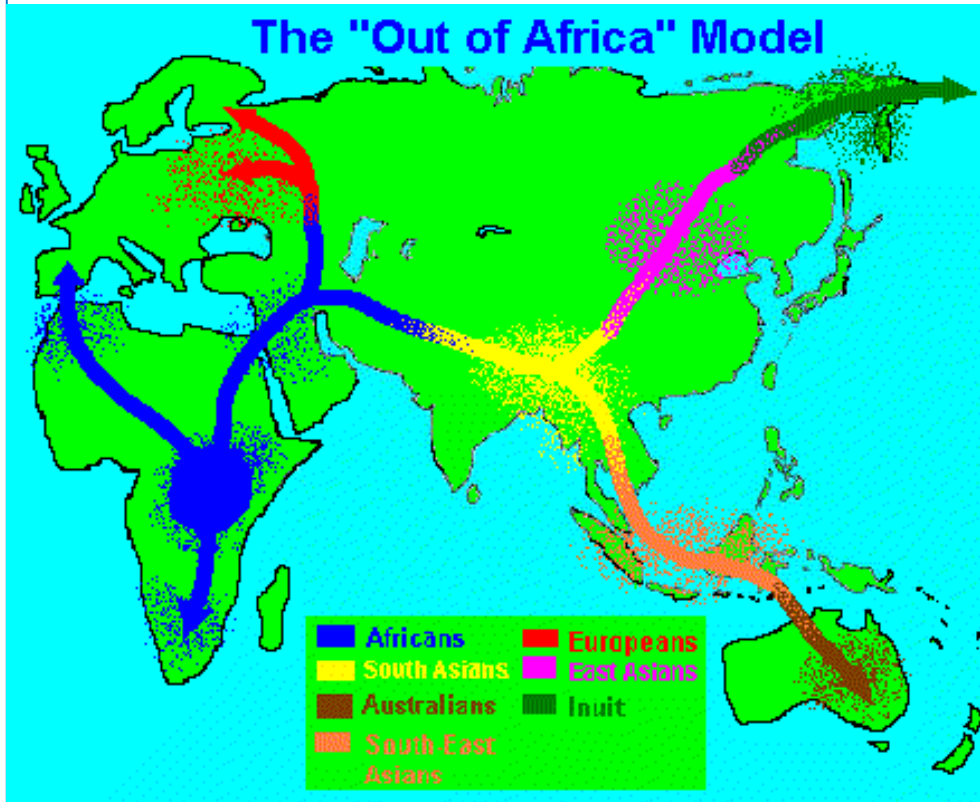
Zanechaly minulé populace potomky, kteří žijí dodnes na stejném místě nebo migrovali?



# Teorie původu moderního člověka

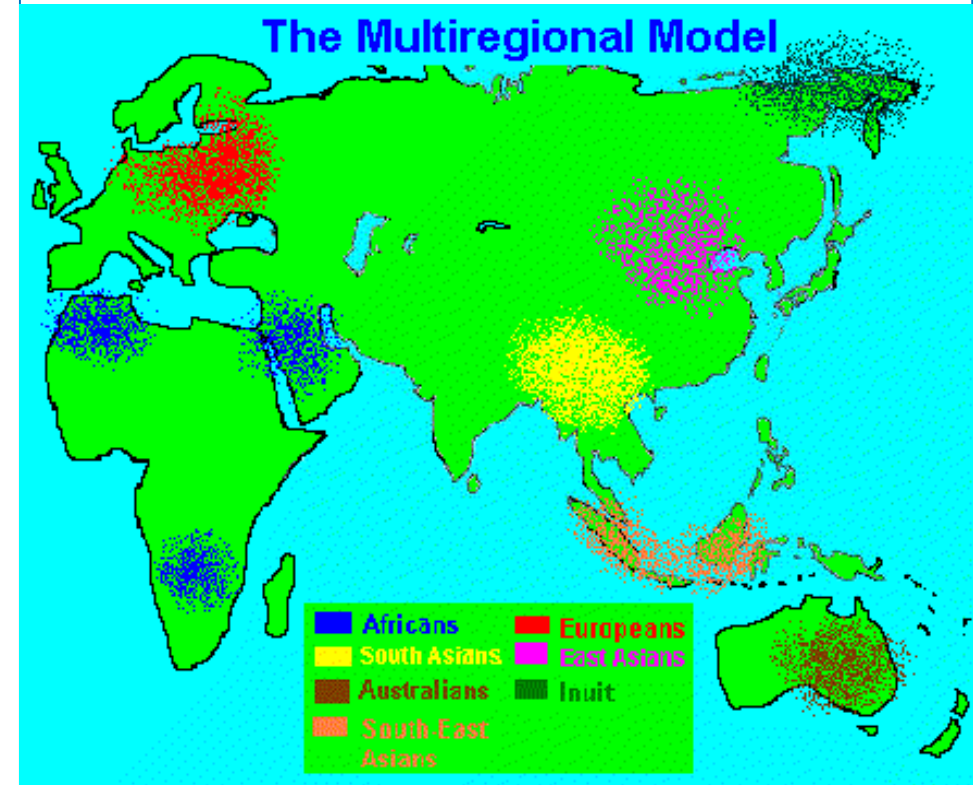
- „Out of Africa“

AMČ pochází z africké populace, která před 50000 - 60 000 lety migrovala z Afriky, osídlila zbytek světa a zcela nahradila lokální populace.



- Multiregionální model vývoje

Multiregionální model původu AMČ naopak předpokládá nezávislý vývoj *Homo sapiens sapiens* na několika místech najednou.



# Denisované, Homo neanderthalensis a AMČ

- Každý člověk mimoafrického původu v sobě nese 1,5 – 2,1% DNA Neandrtálce.
- Stopy DNA Denisovanů jsou patrné v obyvatelích dnešní JV Asie, především u Melanésanů a Aboridžinců (4-6%).



Článek prstu z něhož byl v roce 2010 osekvenován genom Denisovana (zdroj:<http://discovermagazine.com>)

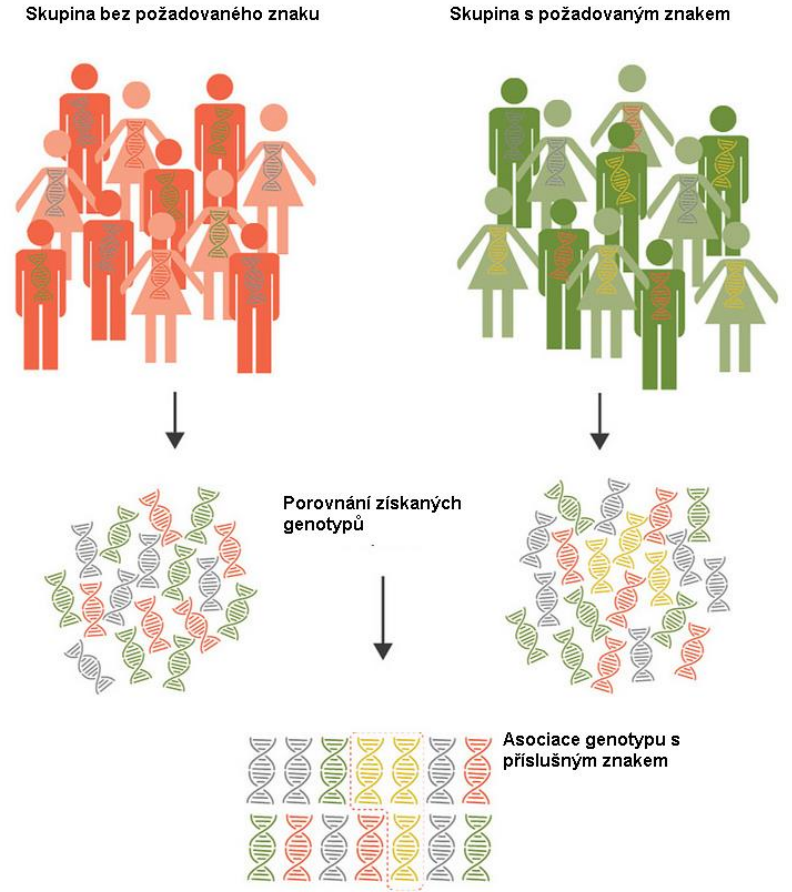


Mapa lokací, kde docházelo ke střetu Denisovanů, neandrtálců a AMČ (zdroj: <http://harvardmagazine.com>)

# VI. Fenotypování

- NGS umožnilo detekci jednonukleotidových polymorfismů (Single Nucleotide Polymorphism, SNP).
  - Komplexní znaky jsou dány právě kombinací takových polymorfismů v mnoha genech malého účinku.
- Fenotyp je soubor všech pozorovatelných vlastností a znaků živého organismu. Představuje výsledek spolupůsobení genotypu, epigenetiky a prostředí.
- Určení fenotypu z aDNA má význam pro studii selekce na tyto znaky, které jsou často výsledkem adaptačních procesů.
- Fenotypování v užším slova smyslu shrnuje odhadování vzhledu jedince na základě znalosti genotypu.

## Genomové asociační studie




## VII. Fenotypování - pigmentace

- Nejčastěji analyzovaným fenotypem je analýza barvy očí, vlasů a pokožky.
- Specifické alely v genu MC1R zapříčiňovaly světlé zbarvení pokožky a zrzavou barvu vlasů.
- Nejjednodušší je determinace barvy očí. Do ní zapojeno asi 15 genů, nicméně přes 90% variability leží pouze ve dvou genech HERC a OCA 2 a konkrétně v šesti polymorfismech.



Rekonstrukce podoby paleolitického Eskymáka z Grónska  
(obrázek:<https://anthropology.net>)

The HirisPlex System



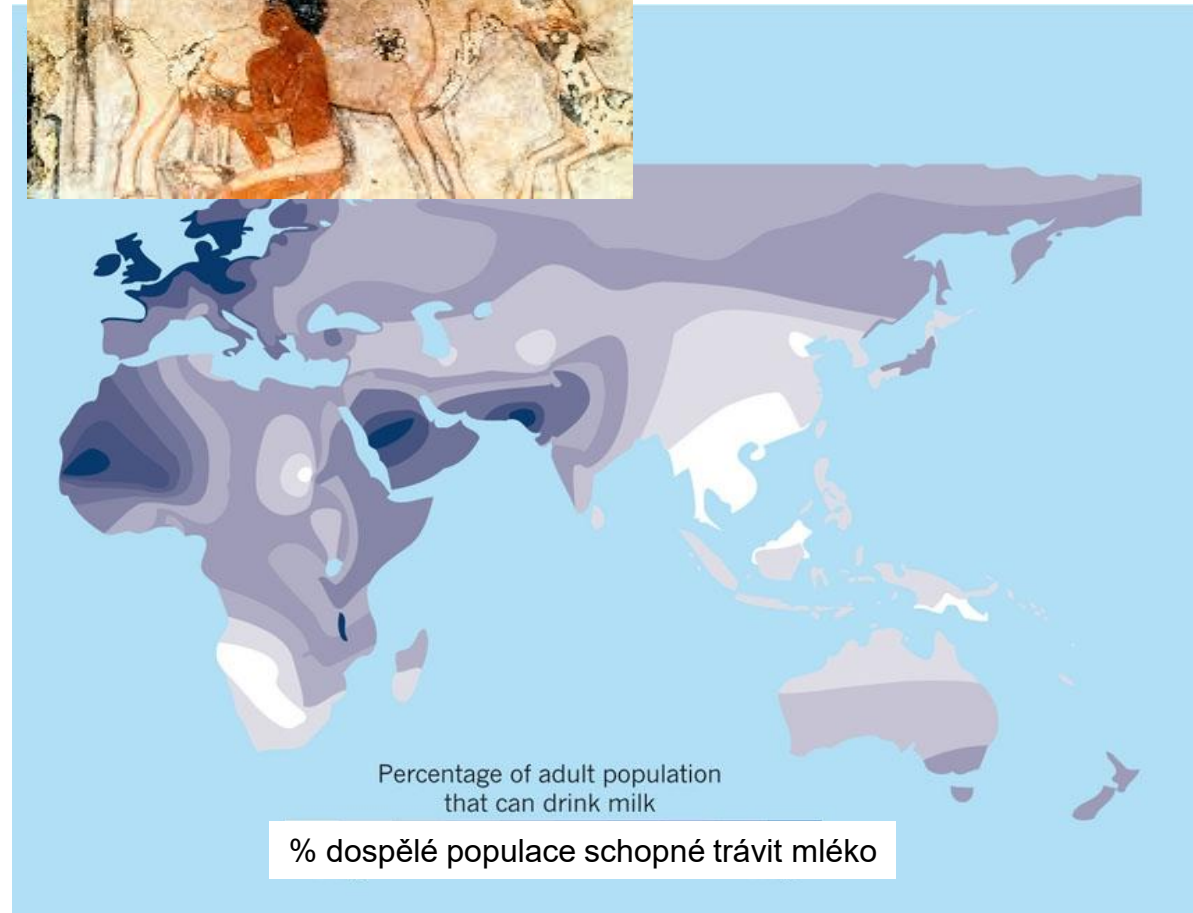
Gene	SNP	Allele	No. of Alleles
MC1R	rs86insA	A	0 1 2 NA
MC1R	rs11547464	A	0 1 2 NA
MC1R	rs885479	T	0 1 2 NA
MC1R	rs1805008	T	0 1 2 NA
MC1R	rs1805005	T	0 1 2 NA
MC1R	rs1805006	A	0 1 2 NA
MC1R	rs1805007	T	0 1 2 NA
MC1R	rs1805009	C	0 1 2 NA
MC1R	Y152OCH	A	0 1 2 NA
MC1R	rs2228479	A	0 1 2 NA
MC1R	rs1110400	C	0 1 2 NA
SLC45A2	rs28777	C	0 1 2 NA
SLC45A2	rs16891982	C	0 1 2 NA
KITLG	rs12821256	G	0 1 2 NA
EXOC2	rs4959270	A	0 1 2 NA
IRF4	rs12203592	T	0 1 2 NA
TYR	rs1042602	T	0 1 2 NA
OCA2	rs1800407	A	0 1 2 NA
SLC24A4	rs2402130	G	0 1 2 NA
HERC2	rs12913832	T	0 1 2 NA
ASIP	rs2378249	C	0 1 2 NA
SLC24A4	rs12896399	T	0 1 2 NA
TYR	rs1393350	T	0 1 2 NA
TYRP1	rs683	G	0 1 2 NA



Rekonstrukce podoby neandrtálce s mutací, která zapříčiňuje zrzavé zbarvení vlasů  
(foto:<https://www.theguardian.com/science/neanderthals>)

## VI. Fenotypování – laktázová perzistence

- V historii lidstva vzniklo několik nezávislých mutací způsobujících laktázovou perzistenci.
- V Evropská alela se patrně vyvinula během neolitu (před 5000 – 10000) lety na Blízkém Východě nebo ve střední Evropě jako reakce na pastevecký způsob života.
- Schopnost trávit mléko je selektivní výhodou, bylo zdrojem vody, vápníku, bílkovin atd.
- Naopak lidé, kteří jej navzdory rezistenci konzumovali, byli vysokou měrou vystaveni nebezpečí bakteriálních nákaz.
- Podle analýz starobylé DNA se v evropské neolitické populaci tato adaptace nevyskytovala.
- Na začátku doby bronzové se její četnost začala zvyšovat, ale stále se držela pod 10%.
- Vysokého zastoupení v populaci dosáhla perzistentní alela při osidlování Evropy proto-indoevropskou kulturou Yamnaya (Jámová kultura). Během 7500 let selekce došlo k tomu, že četnost perzistentní je alely je severovýchodních zemí okolo 75%.



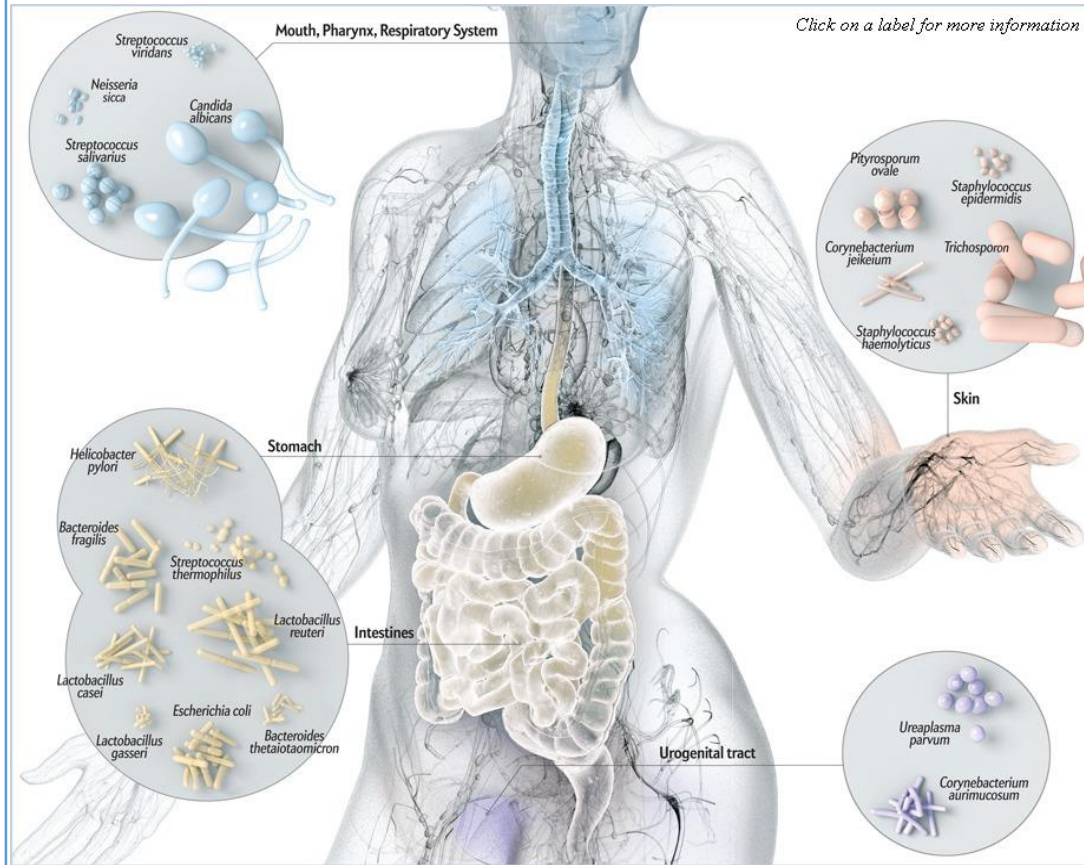
Mapa rozložení laktázové perzistence v (zdroj:<http://www.nature.com>)



# VII. Metagenomika

## Mikrobiom

Mikrobiom je souhrn všech mikroorganismů, jak patologických, tak neutrálních či dokonce symbiotických, které obývají stejné prostředí. V lidském těle je několik samostatných mikrobiomů. Už jsem zmiňovala střevní mikrobiomu, dále je významná také ústní mikrobiomu. Samostatný mikrobiom je na kůži, ve zvukovodu, v urogenitálním traktu nebo na prsních dvorcích v době kojení.



## Metagenomika

Metagenomika zkoumá mikrobiom, tedy všechny organismy, popř. bakterie, které obývají dané prostředí. Geneticky lze jednotlivé mikroorganismy určovat na základě analýzy bakteriálního genu 16s rRNA nebo zvolit tzv. shotgun sekvenování. Při druhém zmiňovaném přístupu „se sekvenuje veškerá DNA, co je ve vzorku“. Tedy DNA nejen bakterií, ale i eukaryot, archeí a virů. Získané sekvence jsou potom bioinformatickými nástroji porovnávány s databázemi a zařazovány do taxonů.

## VII. Metagenomika – analýza patogenů z kostí



*Mycobacterium tuberculosis* –  
tuberkulóza, Pottova choroba



*Treponema pallidum* - syfilis



*Mycobacterium leprae* - lepra

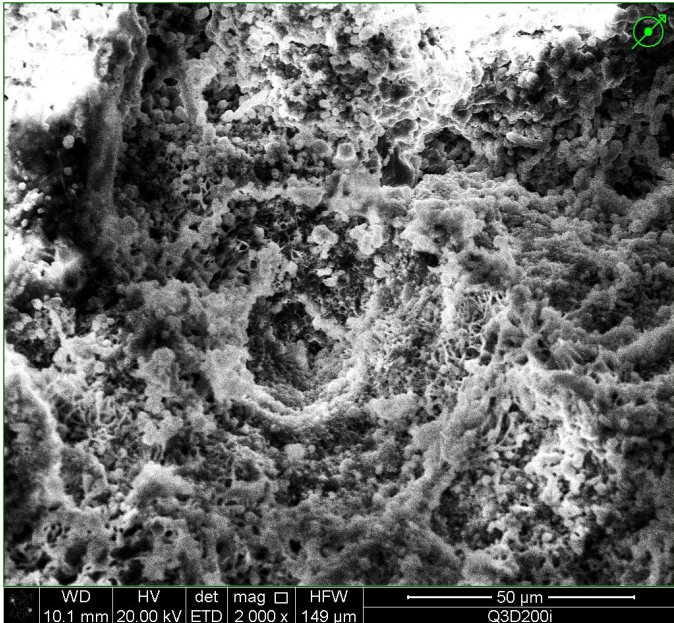
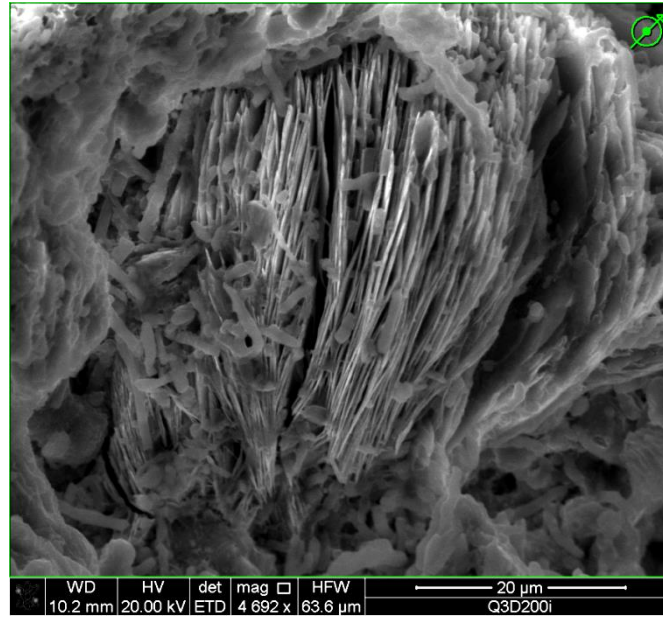
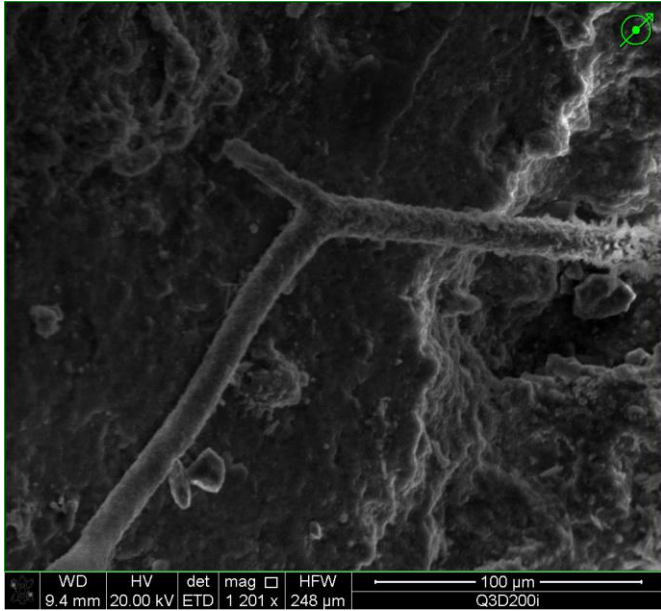
## VII. Metagenomika - analýza aDNA ze zubního kamene

Zubní kámen byl nalezen u dospělců všech populací na světě bez ohledu na stravu, hygienické návyky či životní styl.

Z hlediska zachovalosti DNA má zubní kámen mnoho výhod:

- postmortem těžko kolonizovatelný enviromentálními bakteriemi
- je fosilizován dávno před smrtí organismu
- během ukládání plaku jsou bakterie poměrně rychle zakomponovány do sedimentu a procesy, které jsou zodpovědné za rozklad buněčné DNA jsou pozastaveny
- krystaly vápníku jsou v zubním kameni větší než v kosti. DNA, která se k nim váže, tak má mnohem větší plochu pro afinitu
- jednou vytvořený zubní kámen je velmi těžké rozrušit, zničit nebo odstranit

## Analýza starobylé DNA a rekonstrukce historie



Co můžeme v zubním kamenu najít?

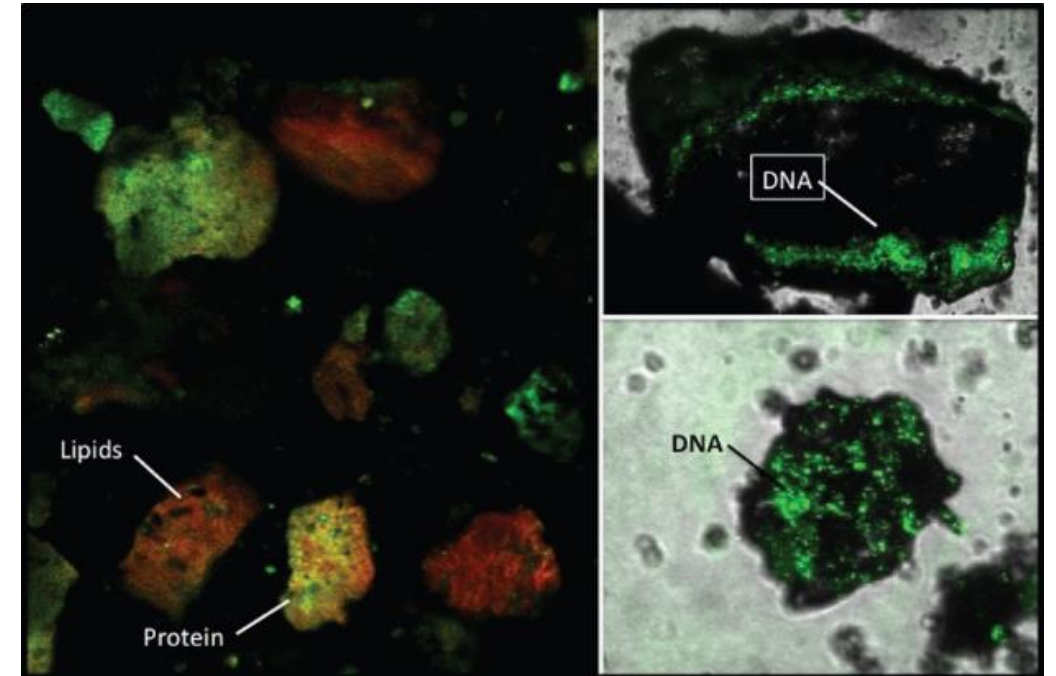
bakterie, patogeny, dietní mikrofosilie, polutanty...



Odběr zubního kamene pro analýzu aDNA  
(foto: Fialová)

## VII. Metagenomika - koprolity

- Koprolit = zkamenělý, zmrzlý nebo vysušený exkrement
- Mezi zdroje patří kulturní jámy, latrínové depoty, střeva mumifikovaných těl...
- Vhodné pro analýzu střevní mikroflóry, ale i složení stravy
- Většinou nelze výsledky analýz vztáhnout ke konkrétnímu jedinci, ale pouze na populační úrovni



Přítomnost DNA, bílkovin a lipidů ve vzorcích koprolitu. Detekce makromolekul byla stanovena použitím specifického cytochemického barvení [https://www.researchgate.net/publication/237098605\\_Microbial\\_Communities\\_in\\_Pre-Columbian\\_Coprolites](https://www.researchgate.net/publication/237098605_Microbial_Communities_in_Pre-Columbian_Coprolites)

# Závěrem....

- Analýza starobylé DNA se v řadě aspektů liší od analýzy recentní DNA.
- aDNA je fragmentární, poznamenaná postmortem mutacemi a hrozí nebezpečí kontaminace vzorku recentní DNA z prostředí.
- Všechny nebo většinu těchto problémů je možno obejít použitím metody sekvenace nové generace.
- Za využití NGS se posunuly limity stáří analyzovatelných vzorků a jejich kvality.