**Analýza starobylé DNA a rekonstrukce historie**

Analýza starobylé DNA se pojí s mnoha komplikacemi, které vycházejí z její charakteristiky – nízké kvality, postmortem poškození, přítomnost nečistost a malého množství DNA ve vzorku. Obor molekulární antropologie vždy odrážel nejnovější postupy a metody, které se vyskytly na poli molekulární biologie, zejména pak forenzní genetiky.

Revoluční metodou, která způsobila nesmírný posun v možnostech zkoumání starobylé DNA je tzv. masivní paralelní sekvenování, které je také často nazýváno jako sekvenování nové generace. Z anglického názvu next generation sequencing pak vychází zkratka NGS, která je běžně používána v odborné i populárně naučné literatuře. Hlavní výhodou NGS je, že během jedné chvíle pochází k souběžnému čtení statisíců až miliónů sekvencí. I tato metoda má však při analýze starobylé DNA svoje nevýhody.

 Aplikace NGS na aDNA posunula limity ve stáří zkoumaného genetického materiálu. Dosud nejstarší analyzovaný vzorek pochází z koně nalezeného v permafrostu a je starý 560 – 780 tisíc let (Orlando *et al*., 2013). Odhadované maximální staří analyzovatelného vzorku je milion let, pokud je uložen v permafrostu (Hofreiter *et al.*, 2015). Za těchto podmínek se DNA rozpadá na oligonukleotidy, které jsou dlouhé 25 pb. Kratší úseky DNA už není možné touto metodou analyzovat.

 Další výhodou NGS při analýze genomů, a to nejen z aDNA, je, že je během stejného času dochází ke čtení mnoha molekul naráz, což zkoumat i polygenní znaky, které jsou kódovány mnoha geny s množstvím alel malého účinku. K těmto znakům, které jsou zkoumány u historických nálezů, patří například pigmentace, tedy barva očí, vlasů a pokožky. Proces, kdy je na základě znalosti genotypu odhadován fenotyp, je nazýván fenotypování a budeme se mu dále podrobněji věnovat.

 Další možnost využití NGS u vzorků aDNA spočívá v takzvaném metagenomickém přístupu. Zjednodušeně lze říci, že tato metoda čte veškerou DNA, co je ve vzorku. Analyzována je tak nejen lidská DNA, ale i DNA mikroorganismů, které hostují v našem organismu, ať už mu pomáhají, nebo, v případě patogenů, škodí.

**Výzkum předchůdců člověka**

Evoluce rodu *Homo* a osídlování planety Země člověkem a jeho předchůdci bylo vždy plné otázek a mnohdy i kontroverzních teorií, na které nedokázala archeologie nalézt odpovědi. Kdy a kde vznikl anatomicky moderní člověk? S kým a kde se anatomicky moderní člověk (AMČ) na svých expanzích potkal? A pokud už někoho potkal, měli spolu děti? Jsou změny v archeologických nálezech odrazem technologického pokroku kultury nebo nahrazením původní populace novou? Zanechaly minulé populace potomky, kteří žijí dodnes na stejném místě nebo migrovali?

 V otázce původu člověka se formovaly dvě základní teorie – první je známá jako „out of Africa“, druhá jak multiregionální model vývoje. První teorie tvrdí, že AMČ pochází z africké populace, která před 50000 - 60 000 lety migrovala z Afriky, osídlila zbytek světa a zcela nahradila lokální populace. Multiregionální model původ naopak předpokládá nezávislý vývoj *Homo sapiens sapiens* na několika místech najednou. Už od 80. let minulého století probíhaly výzkumy recentní populace a modelování historie z recentních genetických dat, ty však nepřinesly jednoznačné vysvětlení.

 Analýza starobylých genomů na řadu těchto otázek přinesla překvapivé odpovědi. V současné době bylo kompletně osekvenováno přes 500 genomů aDNA z jedinců, kteří žili od paleolitu až po dobu bronzovou. Průlomové objevy přinesl především rok 2010. V tomto roce byl osekvenován kompletní genom našeho nejbližšího příbuzného neandrtálce, konkrétně skelet z chorvatské jeskyně Vindija (Green *et al.,* 2010).

V témže roce, tedy 2010, byly v jeskyni Denisova na Sibiři objeveny kosterní pozůstatky dosud neznámého předka člověka, který byl pojmenován po místě nálezu jako Denisovan. aDNA byla v tomto případu extrémně dobře zachovalá a podařilo se získat sekvenci celého genomu. Byl to vůbec první případ, kdy byl znám dříve genom, než fyzický vzhled na základě antropologické analýzy (Reich *et al.,* 2010).

 Genom neandrtálce a Denisovana byl porovnán s genomem šimpanze a člověka z různých částí světa. Komparace dat potvrdila, že neandrtálec i Denisované měli potomstvo s AMČ. Tato odpověď je tedy v podstatě fúzí obou teorií o původu AMČ. Většina genomu lidstva neafrického původu skutečně pochází od afrických migrantů, nicméně, každý z nás si v obě nese 1,5 – 2,1% neadrtálčího původu. Shodu s neadrtálčím genomem však nemají obyvatelé Afriky. Je zajímavé, že více neandrtálce v sobě mají populace z východní Asie, ačkoliv zde nikdy nebyly nalezeny žádné pozůstatky. Data z genomů paleolitických AMČ poukazují na fakt, že zastoupení neadrtáčního původu v jejich DNA bylo vyšší, než je tomu u dnešní populace. Fosilie nalezená v Rumunsku (Pestera cu Oase), která je stará asi 37000 - 42000 let měla ve svém genomu zastoupenu neandrtálčí DNA z 6 – 9%, z čehož lze usoudit, že ke spojení AMČ s neandrtálcem došlo před šesti generacemi (Fu *et al*., 2015). AML se s neandrtálci mísili v několika vlnách, ale vždy na území západní Asie. Evropu pak kolonizovali jejich společní potomci (Slatkin *et* Racino, 2016). Podobně tomu bylo i v případě kontaktu AMČ s Denisovany, k mísení však došlo v JV Asii. Denisované měli jinou hybridizační historii než neandrtálci. Stopy jejich DNA jsou patrné v obyvatelích dnešní JV Asie, především u Melanésanů a Aboridžinců. Ačkoliv byly pozůstatky Denisovanů nalezeny pouze na Sibiři, stopy po jejich míšení jsou daleko rozlehlejší než je tomu u neandrtálců (Haber *et al*., 2016)

 Porovnání genomu AMČ, neadrtálce a Denisovana přineslo také zjištění, že měli společného předka v poměrně dávné historii, přibližně 1 milion let nazpět, patrně jím byl *Homo erectus*. Stopy po společném předku byly nalezeny i v mitochondriálním genomu nejstaršího analyzovaného předchůdce člověka. Jeho skelet byl nalezen v roce v jeskyni Sima de los Huesos ve Španělsku. Tento nález nebyl dosud taxonomicky zařazen, patrně však náleží k *Homo Heidelbergensis* (Meyer *et al.*, 2014)*.*

**Fenotypování**

Rozvoj metod NGS umožnil detekovat genetickou variabilitu až na úroveň jednonukleotidových polymorfismů, tedy záměn (mutací) v jednom místě. Komplexní znaky jsou dány právě kombinací takových polymorfismů v mnoha genech malého účinku. Ze znalosti genetické podstaty znaku vzniklo tzv. fenotypování. 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.

Fenotypové analýzy aDNA vycházejí především z poznatků, které byly získány z dat tzv. WGA studií – asociačních studií (např. multifaktoriální onemocnění s genetickými predispozicemi) a výzkumů pro forenzní využití. Tento pojem v užším smyslu shrnuje odhadování vzhledu jedince na základě znalosti genotypu a svůj základ má pochopitelně ve forenzních vědách, protože vzhled je v případě vyšetřování trestného činu velmi důležitý. Prvním fenotypovým znakem určeným z aDNA bylo pohlaví. Tato analýza je už v současnosti prováděna rutinně, proto se jí nebudu podrobněji věnovat.

 Dalším nejčastěji analyzovaným fenotypem je analýza barvy očí, vlasů a pokožky, zejména proto, že je minimálně ovlivněn prostředím. Již v roce 2007 bylo sekvenací kompletního genomu neandrtálce zjištěno, že nese specifické alely v genu (MC1R), které zapříčiňovaly světlé zbarvení pokožky a zrzavou barvu vlasů (Lalueza - Fox *et al*., 2007).

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. Determinace barvy vlasů a je pak ovlivněna asi dalšími 19 SNP (Fortes *et al*., 2013).

U vlasů je možno geneticky určit nejen jejich barvu, ale také tvar a v případě mužů také Y vázanou plešatost. Z tohoto hlediska je geneticky nejlépe prozkoumán paleolitický Eskymák nalezený v permafrostu v Grónsku. U něj bylo geneticky prokázáno, že měl jemné tmavé vlasy a počínající plaš s ustupující linií směrem od čela, jak můžete vidět na obrázku. Dále u toho muže byl určen také suchý typ ušního mazu (Rasmussen *et al.,* 2010).

Kromě vzhledu jsou analyzovány i další fenotypové znaky a to především ty, které podléhají selekčnímu tlaku, jsou například krevní skupiny, nebo schopnost metabolizovat dostupné zdroje živin. Vztah fenotypu a změny složení stravy je poměrně jednoduchý – většinou se mění specifická funkce enzymů zapojených do digesce cílových substrátů nebo vnímání chuti. Vlivem mutací dojde buď ke zvýhodnění, nebo znevýhodnění daného fenotypu v prostředí. S měnícími se prostředím mohou být rozdílné fenotypy pod rozdílným selekčním tlakem. Typickým příkladem takového fenotypu je laktázová perzistence. Laktáza je enzym, který štěpí laktózu na D-glukózu a D-galaktózu. Laktózová intolerance je způsobena neschopností organismu produkovat enzym laktáza v dospělosti. Pokud je laktázy nedostatek, mléčný cukr se ve střevech nestráví a jeho přebytkem se pak živí přirozené střevní bakterie, které při jeho zpracování produkují plyny (CO2 či H2) a další látky, které dráždí tlusté střevo a způsobují nadýmání, střevní koliky, průjmy a zvracení, atopické ekzémy, nechutenství, pálení žáhy, pocit plnosti a bolesti břicha. V historii lidstva se vyvinulo několik typů genetických adaptací, které způsobují, že i po odstavení je možno dále trávit mléčný cukr. V Evropě je nejhojněji zastoupena alela, která má za následek laktázovou aktivitu v dospělosti. Tato adaptace 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 dávala nositelům perzistentní alely velkou selektivní výhodu, 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 až během doby bronzové při osidlování Evropy proto-indoevropskou kulturou Yamnaya (Jámová kultura). Během 7500 let selekce došlo k tomu, že četnost perzistentní alely je severských zemí okolo 75% (Slatkin *et* Racino, 2016).

**Starobylý mikrobiom**

Další nesporný posun, který nabízejí metody sekvenace nové generace, spočívá v možnosti analýzy tzv. mikrobiomu. Aby bylo lépe porozuměno této tématice, nejdříve se vysvětlí, co je to MIKROBIOM. Ač se může zdát, že nadvláda člověka nad přírodou je neomezená, opak je pravdou. Žijeme ve světě mikroorganismů. Mikrobiom je souhrn všech mikroorganismů, jak patologických, tak neutrálních či dokonce symbiotických, které obývají stejné prostředí. V lidském těle je několik samostatných mikrobiomů. Samostatný mikrobiom je na kůži, ve zvukovodu, ve vagíně nebo na prsních dvorcích v době kojení atd. Rozhodně největší a nejpestřejší je mikrobiom střevní mikroflóry. Mikroorganismy, které kolonizovaly náš trávicí trakt, váží přibližně tolik, co játra a někdy se o nich hovoří jako o samostatném orgánu. Počet buněk tohoto ekosystému několikrát převyšuje počet buněk, které tvoří naše tělo. Mikrobiom je také zdrojem ohromné genetické variability. Mikrobiom má v našem těle řadu nezastupitelných funkcí – metabolizuje řadu substrátů, je zdrojem imunity a vytváří vitamíny. Řada výzkumů se také zabývá proměnou mikrobiomu na základě životního stylu, stravy, věku, léků, onemocnění atd. Bylo také zjištěno, že dojde – li působením negativních faktorů, jako jsou například širokospektrální antibiotika, je narušena druhová pestrost, kultura se stává velmi uniformní a je náchylná na osídlení prostředí dalšími patogenními druhy. Narušení mikrobiomu je jaké spojováno s řadou tzv. civilizačních onemocnění jako je obezita, diabetes II. typu, zubní kaz, arteroskleróza atd.

V minulosti byl výzkum mikrobiomu i ze živého člověka značně limitovaný tím, že většina mikroorganismů, nebyla kultivovatelná. Právě metoda sekvenace nové generace umožnila zkoumat mikrobiom metagenomickým přístupem. Zjednodušeně řečeno, metagenomická analýza zkoumá veškerou DNA obsaženou ve vzorku. Geneticky můžeme jednotlivé mikroorgamismy 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. Zde metoda trochu naráží na to, že většina mikroorganizmů nemá stabilní genom a díky řadě mechanizmů jako jsou transponovatelné elementy nebo CO dochází k tzv. horizontálnímu přenosu genů. Genetická informace tak přenášena pouze z generace na generaci, ale napříč kulturou, často ohledu na geny. Další komplikací je fakt, že spolu s původním mikrobiomem je zejména z historických vzorků, získána i spousta balastní DNA vnějšího původu, která pochází často z půdy nebo z enviromentální kontaminace.

Výzkum aDNA vždy následoval nejnovější trendy v oblasti genetiky a molekulární biologie a ne jinak tomu bylo i v případě výzkumu mikrobiomu. První analýzy zejména patogenů kolonizujících kostní tkáň, jako je například *Mycobasterium leprae, Mycobacterium tuberculosis* nebo *Treponema pallidum,* byly prováděny i metodou PCR a následného Sangerova sekvenování, nicméně úspěšnost analýz byla nízká a výsledky často nevěrohodné. S rozvojem metod NGS a znalostí složení recentního mikrobiomu, se dostalo do popředí i zkoumání mikroorganismů našich předků a vznikl tak obor paleomikrobiologie (Schuenemann et al., 2013; Müller *et al*., 2014). Tato věda zkoumá jednak vzorky z půdních, ledovcových, jezerních a mořských sedimentů, ale zaměřuje se i na analýzu mikrobiomu člověka. Zdroje aDNA pro analýzy bývají často velmi pestré. Prvním zdrojem je kosterní materiál, u něhož jsou stále cílem zájmu patogeny, ale to i ty, které nezpůsobují poškození tkáně. Řadě vědců se tak podařilo získat genom *Yersinia pestis*, která způsobuje morovou nákazu. Ve vzorcích byla potvrzena nejen její přítomnost, ale i geny virulence, které odhalily, jak se genom tohoto patogenu vyvíjel. Jelikož byly analyzovány genomy Yersinie z různých historických epidemií, byly také porovnány geny pro jejich virulenci (Cui *et al.*, 2013). Podobně tomu bylo i při výzkumu druhů *Mycobacterium complex*, který potvrdil neolitický rozvoj tohoto onemocnění (Müller *et al*., 2015).

Dalším významným zdrojem genetického materiálu pro výzkum lidského mikrobiomu je zubní kámen. 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. Zubní kámen je post mortem těžko kolonizovatelný enviromentálními bakteriemi. Chybí v něm kanálky, tubuly apod, které jsou přítomné v kostní tkáni. Za druhé je zubní kámen fosilizován dávno před smrtí organizmu. Během ukládání plaku jsou bakterie poměrně rychle zakomponovány do sedimentu a procesy, které jsou zodpovědné za rozklad buněčné DNA, jsou pozastaveny. Třetí výhodou pak je minerální složení. Krystaly s vápníkem jsou v zubním kameni několika typů a jsou mnohem větší než v kosti. DNA, která je známá jsou afinitou k hydroxyapatitu, tak má mnohem větší plochu na navázání. Takže jednou vytvořený zubní kámen je velmi těžké rozrušit, zničit nebo odstranit. Zubní kámen vzniká usazováním kalcium fostátu ze slin v různých formách krystalů. Do nově vznikajících usazenin jsou lapeny i konzervovány bakterie, dietní mikrofosilie, polutanty apod. Tento materiál je v hledáčku antropologů ji od 60. – 70. let 20. století. Zejména v 80. a 90. letech byl zkoumán mikroskopicky a to nejen u člověka, ale i u vyhynulých homininů (Warinner *et al*., 2015). Na počátku milénia se vědci zaměřily na analýzu prvků a z ní odvozenou analýzu stravy. V roce 2011 byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA pomocí transmisního elektronového mikroskopu. O rok později tým australských vědců potvrdil její přítomnost konvenční PCR a Sangerovým sekvenováním, v roce 2013 dánská vědkyně Adler se svými kolegy použila NGS s přístupem, kdy analyzovala bakteriální složení na základě analýzy sekvence genu rRNA. Rok 2014 pak přinesl výsledky Warrinner a kolegů, kteří aplikovali na výzkum zubního kamene shot gun metodou. Zde je uveden příklad výzkumu publikovaného v letošním roce v prestižním časopise Nature. V tomto článku se australská genetička Werich a její mezinárodní tým zabývá analýzou zubního kamene neandrtálců. Kvalitní data byla získána z neandrtálce ze španělské jeskyně El Sidrón a belgické jeskyně Spy. Analýzou mikrobiomu bylo prokázáno, že jídelníček neandrtálců byl v podstatě pokrokový a trendy neboť se živili lokální stravou. Data ze španělského neandrtálce potvrdila vysoký obsah rostlinné stravy, naopak u neandrtálce z Belgie bylo v zubním kameni nalezeno mnoho stop po celé řadě živočišných druhů. Ty to výsledky byly potvrzeny i analýzou izotopů. Co je však z celého výzkumu nejzajímavější, je, že španělský neandrtálec měl před smrtí zdravotní problémy. Byla u něj detekována bakterie, která je zodpovědná za průjmová onemocnění u člověka a měl dentální abces. Bolest si léčil topolem, který obsahuje přírodní kyselinu salicylovou, která je obsažena například v aspirinu, a také v jeho mikrobiomu byly nalezeny stopy pro přírodních antibiotikách (Weyrich *et al*., 2017).

**Citovaná literatura**

Cui, Y., Yu, C., Yan, Y., Li, D., Li, Y., Jombart, T., ... & Zhang, Y. (2013). Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, Yersinia pestis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(2), 577-582.

Fu, Q., Hajdinjak, M., Moldovan, O. T., Constantin, S., Mallick, S., Skoglund, P., ... & Viola, B. (2015). An early modern human from Romania with a recent Neanderthal ancestor. Nature, 524(7564), 216-219.

Green, R. E., Krause, J., Briggs, A. W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., ... & Hansen, N. F. (2010). A draft sequence of the Neandertal genome. science, 328(5979), 710-722.

Haber, M., Mezzavilla, M., Xue, Y., & Tyler-Smith, C. (2016). Ancient DNA and the rewriting of human history: be sparing with Occam’s razor. Genome biology, 17(1), 1.

H., Hofreiter, M. 2015. Optimal ancient DNA yields from the inner ear part of the human petrous bone. PloS one, 10: e0129102

Lalueza-Fox, C., Römpler, H., Caramelli, D., Stäubert, C., Catalano, G., Hughes, D., ... & De La Rasilla, M. (2007). A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. Science, 318(5855), 1453-1455.

Meyer, M., Fu, Q., Aximu-Petri, A., Glocke, I., Nickel, B., Arsuaga, J. L., ... & Pääbo, S. (2014). A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos. Nature, 505(7483), 403-406.

Müller, R., Roberts, C. A., & Brown, T. A. (2014). Biomolecular identification of ancient Mycobacterium tuberculosis complex DNA in human remains from Britain and continental Europe. American journal of physical anthropology, 153(2), 178-189.

Müller, Romy, Charlotte A. Roberts, and Terence A. Brown. "Genotyping of ancient Mycobacterium tuberculosis strains reveals historic genetic diversity." Proc. R. Soc. B. Vol. 281. No. 1781. The Royal Society, 2014.

Orlando, L., Ginolhac, A., Zhang, G., Froese, D., Albrechtsen, A., Stiller, M., ... & Johnson, P. L. (2013). Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. Nature, 499(7456), 74-78.

Rasmussen, M., Li, Y., Lindgreen, S., Pedersen, J. S., Albrechtsen, A., Moltke, I., ... & Bertalan, M. (2010). Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. Nature, 463(7282), 757.

Reich, D., Green, R. E., Kircher, M., Krause, J., Patterson, N., Durand, E. Y., ... & Maricic, T. (2010). Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. Nature, 468(7327), 1053.

Schuenemann, V. J., Singh, P., Mendum, T. A., Krause-Kyora, B., Jäger, G., Bos, K. I., ... & Nebel, A. (2013). Genome-wide comparison of medieval and modern Mycobacterium leprae. Science, 341(6142), 179-183.

Slatkin, M., & Racimo, F. (2016). Ancient DNA and human history. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(23), 6380-6387.

Warinner, C., Speller, C., & Collins, M. J. (2015). A new era in palaeomicrobiology: prospects for ancient dental calculus as a long-term record of the human oral microbiome. Phil. Trans. R. Soc. B, 370(1660), 20130376.

Weyrich, L. S., Duchene, S., Soubrier, J., Arriola, L., Llamas, B., Breen, J., ... & Farrell, M. (2017). Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. Nature, 544(7650), 357-361.