



Bi5130 Základy práce s lidskou aDNA

Mgr. et Mgr. Kristýna Brzobohatá

brzobohata@sci.muni.cz

Laboratoř biologické a molekulární antropologie,
ÚEB, PřF, Mu



aDNA a epigenetika

- 1) Epigenetické procesy
- 2) Metody detekce epigenetických procesů u historického materiálu
- 3) Výzkumy epigenomu u aDNA

Paleolitická DNA

- 1) Charakteristika paleolitu
- 2) aDNA předchůdců člověka
- 3) Kolonizace Světa *Homo sapiens sapiens*



Epigenetika

= studuje **změny v genové expresi** (a tedy obvykle i ve fenotypu), které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA.

= sběr regulačních procesů, které kontrolují kdy, jak a které **geny** budou „**vypínány a zapínány**“.

Epigenetické procesy jsou druhově, individuálně i tkáňové specifické, v průběhu života může docházet k jejich remodelaci a jsou ovlivněny okolím (stochastické efekty).

Epigenetické modifikace:

Zasahují buď přímo **DNA** – metylace DNA a histonová modifikace nebo **RNA** – microRNA

Vedou k fenotypovým změnám



Metylace DNA

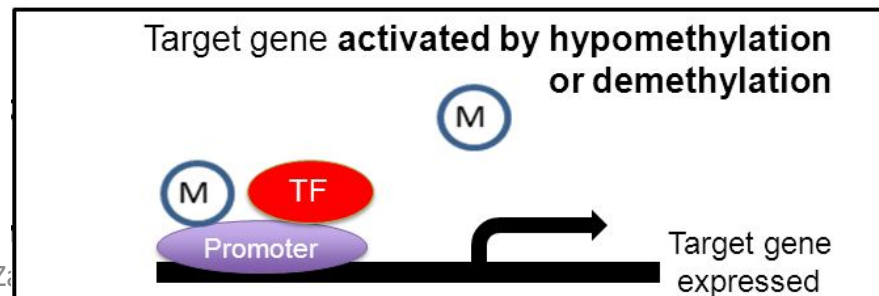
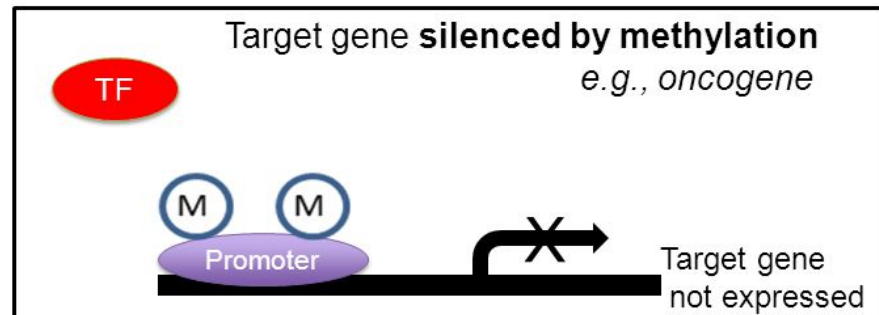
Cytosin - 5-methyl cytosin (5mC) u savců

Methyltransferázy přenášejí methyl (alkyl methanu) z S-adenosyl-1-methioninu na pátý uhlík cytosinové báze

CpG ostrůvky = akumulované CpG dinukleotidy, které se často vyskytují v oblasti promotoru. Asi 60 % genů má promotory asociované s těmito CpG ostrůvky. Ty jsou nemetylovány u aktivních genů, zde se váží transkripční faktory. Metylace této oblasti je spojena s inaktivací genů.

Sestavování metylačních map

Metylace je dědičná, ale princip není dosud zcela objasněn
Demethylace DNA probíhá pasivně při replikaci a aktivně na replikaci nezávislým způsobem (v zygotách a v pluripotentních zárodečných buňkách, určité oblasti DNA u neuronů či T lymfocytech).





Výzkumy aDNA epigenomů

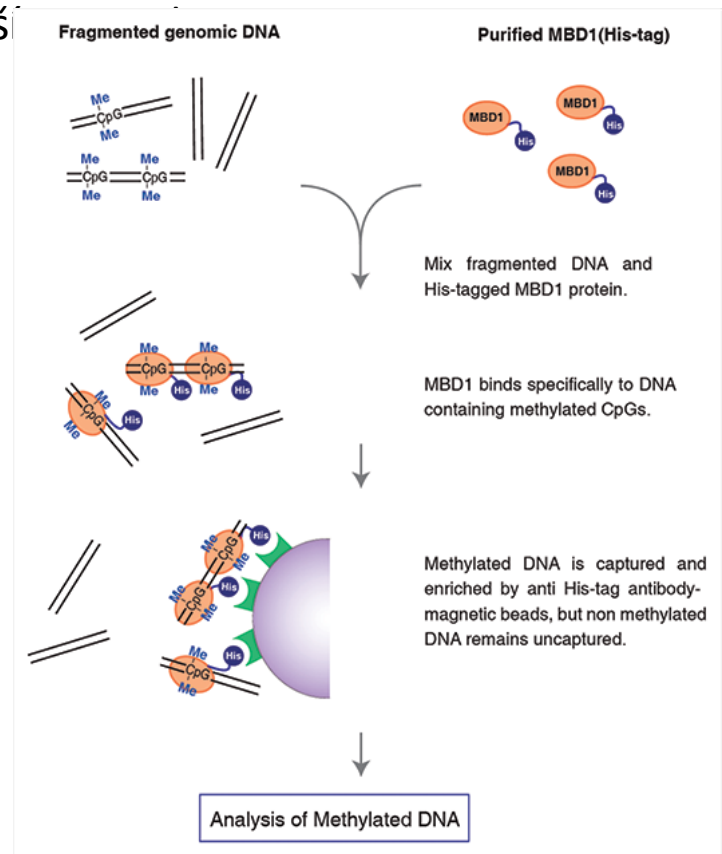
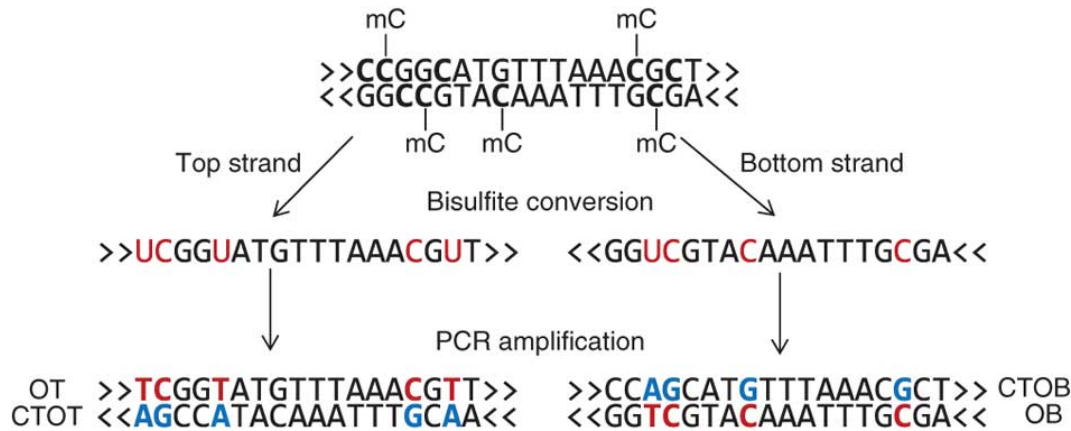
Přímá detekce 5mC nebo počítačové modelování z NGS dat

Přímá detekce 5mC využít buď **bisulfidovou sekvenaci** nebo **methyl- enrichment metodu**

Vzhledem k zachovalosti aDNA je detekovatelná především

Komplikace při bisulfidovém sekvenování u aDNA:

- Je možné zaměnit s postmortem modifikacemi
- Nelze použít na vzorky s malým obsahem aDNA
- Vzorek po konverzi nelze použít na jiné analýzy
- Je tkáňově specifická - pro kosterní materiál





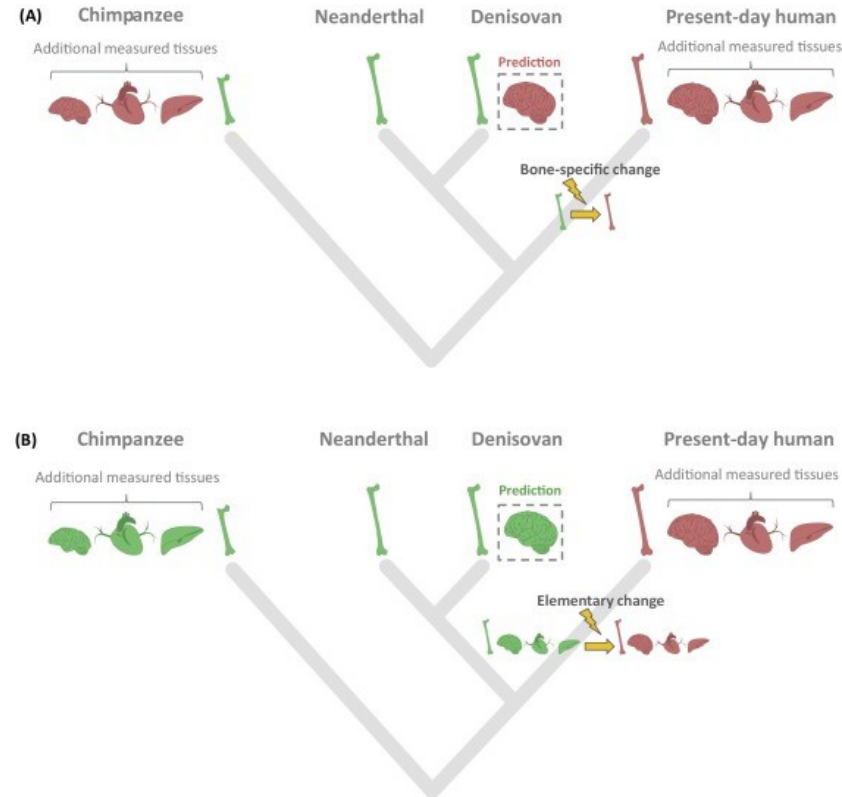
Výzkumy aDNA epigenomů

- Je tkáňově specifická - pro kosterní materiál

Metylační mapa neandrtálce a Denisovanů:

- Cca 2000 rozdílných metylovaných regionů ve srovnání se současným člověkem
- HOXD 10 region – zodpovědný za rozdíly v morfologii končetin
- Rozdíly patrně v translační aktivitě genů
- Dále metylace genů spojovaná s psychiatrickými onemocněními

Tkáňová metylace je u velkých primátů z 80% neměnná – z míry metylace kostí se dá odhadnout i metylace v dalších tkáních





Sekvenování 3. generace

- Sekvenace 1 molekuly DNA v reálném čase, včetně metylace DNA
- V současné době ve fázi testování
- Minimální náklady na přípravu vzorku
- Dostupné platformy:

Pacbio - <https://www.youtube.com/watch?v=NHCJ8PtYCFc>

Oxford Nanopore -

<https://www.youtube.com/watch?v=3UHw22hBpAk>



Paleolit

Nejdelší období lidských dějin

Střídání dob ledových a meziledových (pleistocénní klimatický cyklus)

Adaptibilita rodu homo na měnící se klimatické podmínky

Hlavním způsobem získávání potravy byl **lov a sběr plodin**

Nejstarší paleolit: před 4 - 1 mil. Let

Starý paleolit: před 1 mil. - 300 000 lety

Střední paleolit: před 300 000 - 40 000 lety

Mladý paleolit: 40 000 - 10 000 př. n. l

Pozdní paleolit: 10 000 - 8000 př. n. l.



Homo sapiens

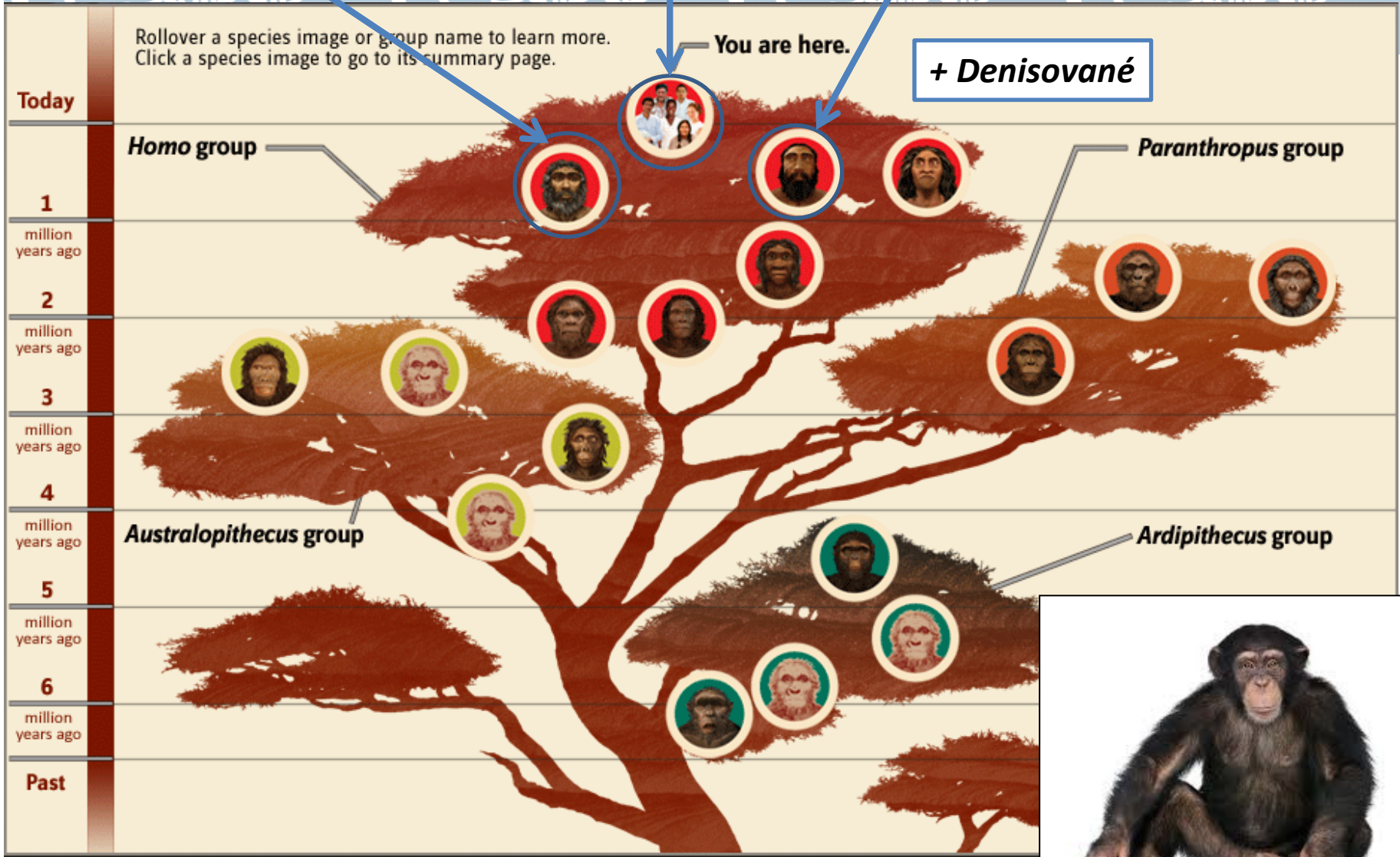
Homo heidelbergensis

Homo neanderthalensis

+ Denisované

Rollover a species image or group name to learn more.
Click a species image to go to its summary page.

You are here.



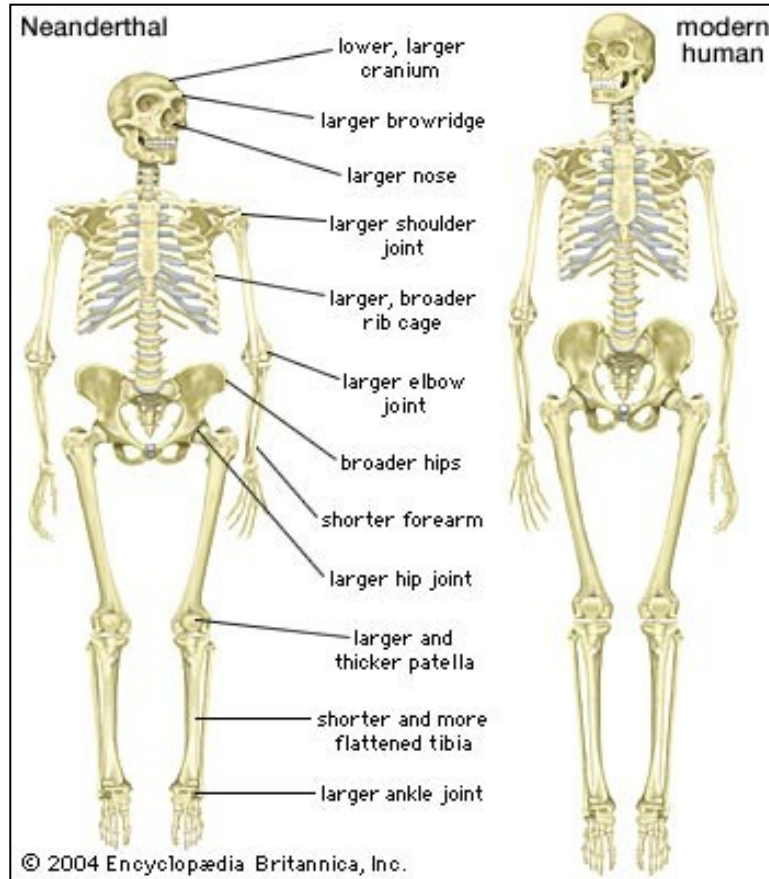
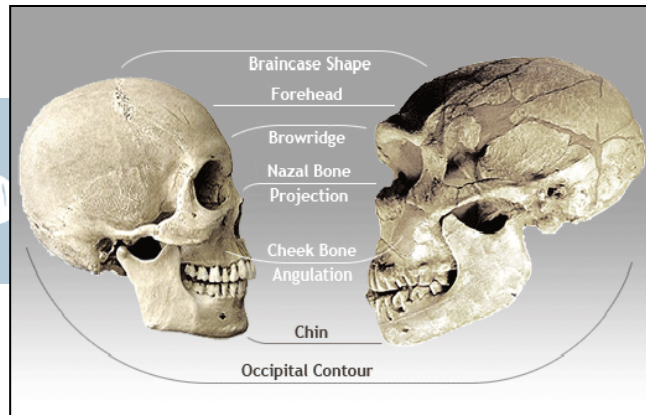


Homo neanderthalensis

- 1829 Belgická lokalita Engis; 1814 Forbesův lom v Gibraltaru
- 1856 Neandertal nedaleko Düsseldorfu „mousterská kultura“ (mousterien)
- ČR Šipka a Kůlna
- Používali oheň, pečovali o nemocné, stavěli přístřešky především z mamutích kostí a klů a dřeva

Výzkumy *Homo neanderthalensis*

- Výzkum kosterních pozůstatků
- Zubního kamene (Hardy et al., 2012)
- Nástrojů, šperků, zbraní
- Stop a dalších otisků těla
- Sídlišť
- Stravovacích zvyků



Paleolit



20 let výzkumů aDNA Homo Neanderthalensis

PHILOSOPHICAL
TRANSACTIONS B

rstb.royalsocietypublishing.org

Review

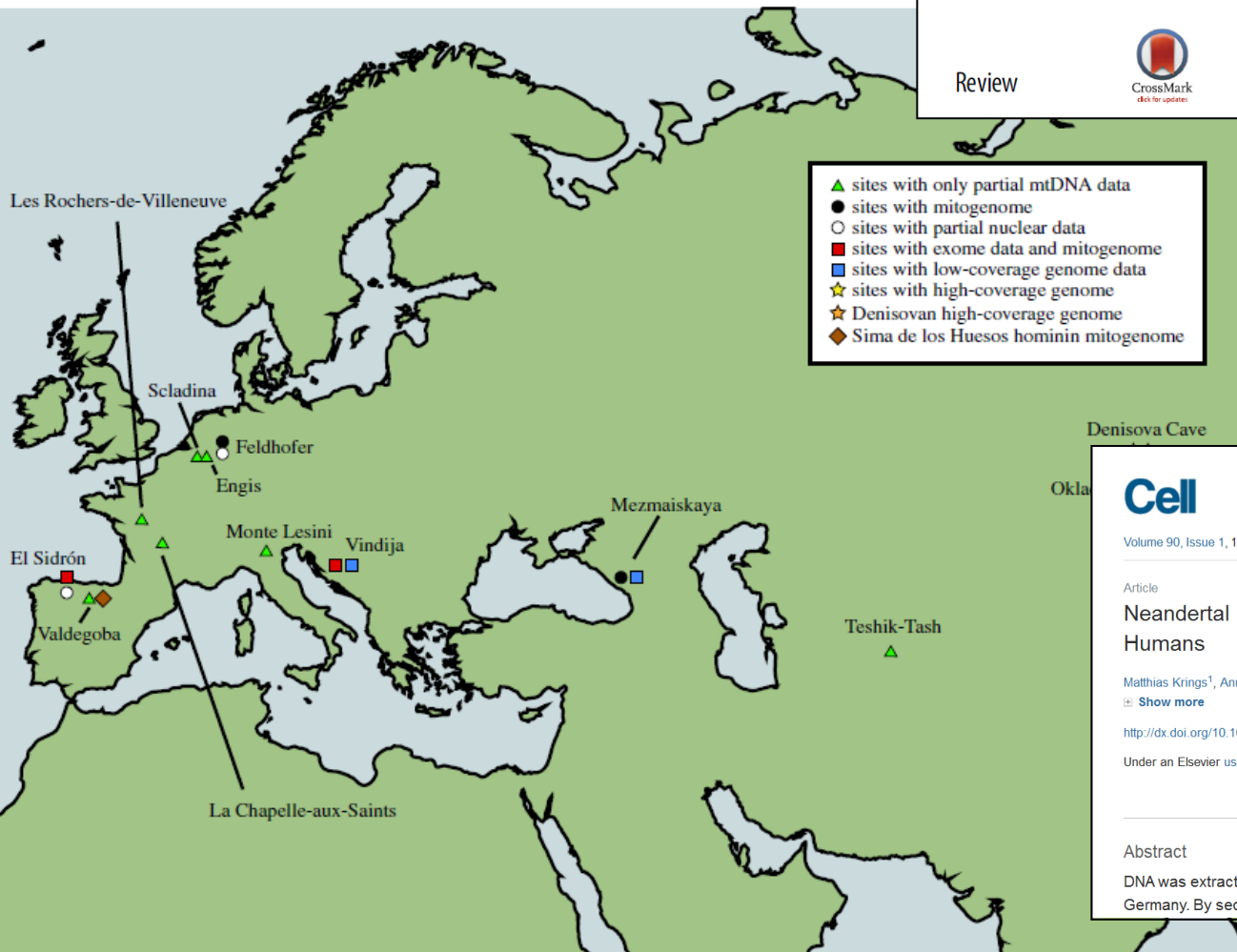


Almost 20 years of Neanderthal palaeogenetics: adaptation, admixture, diversity, demography and extinction

Federico Sánchez-Quinto and Carles Lalueza-Fox

Institute of Evolutionary Biology (CSIC-Universitat Pompeu Fabra), Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain

CL-F, 0000-0002-1730-5914



- ▲ sites with only partial mtDNA data
- sites with mitogenome
- sites with partial nuclear data
- sites with exome data and mitogenome
- sites with low-coverage genome data
- ★ sites with high-coverage genome
- ★ Denisovan high-coverage genome
- ◆ Sima de los Huesos hominin mitogenome

Cell

Volume 90, Issue 1, 11 July 1997, Pages 19–30

Article

Neanderthal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans

Matthias Krings¹, Anne Stone², Ralf W Schmitz², Heike Krainitzki⁴, Mark Stoneking², Svante Paabo¹

Show more

[http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80310-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80310-4)

Get rights and content

Under an Elsevier user license

Open Archive

Abstract

DNA was extracted from the Neanderthal-type specimen found in 1856 in western Germany. By sequencing clones from short overlapping PCR products, a hitherto

Paleolit



Výzkum aDNA Homo Neanderthalensis – metodický přístup

- Mt DNA
- NuDNA

DNA šimpanze

aDNA neandrtálce

aDNA *Homo sapiens*

Kompletní mitogenom
(Green *et al.*, 2008)

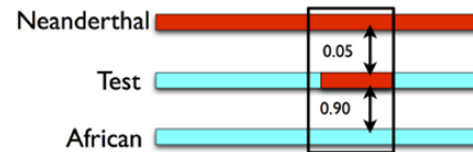
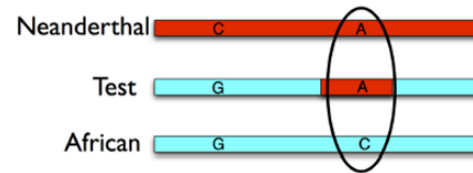
Shotgun NGS (Green *et al.*, 2008)

Target enrichment NGS
(Briggs *et al.*, 2009)

High coverage data

(Pfufer *et al.*, 2014; Meyer *et al.*, 2012)

Recentní DNA



Funkční studie

Demografické a migrační studie

Fylogenetické studie



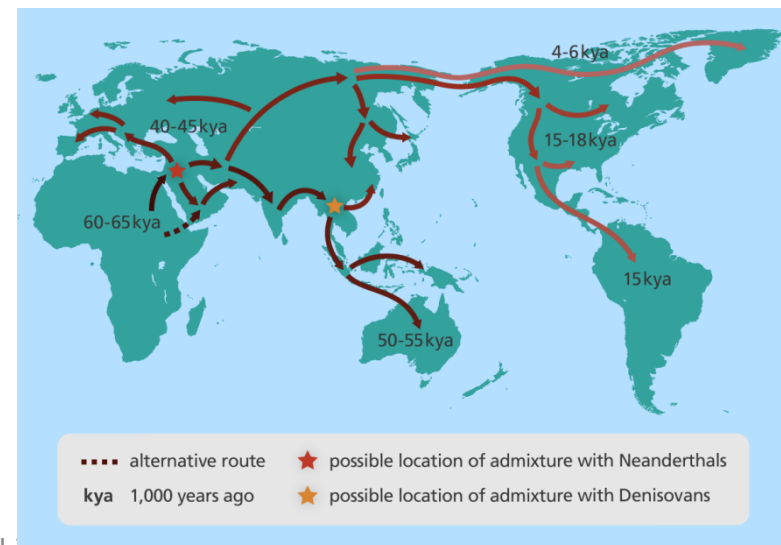
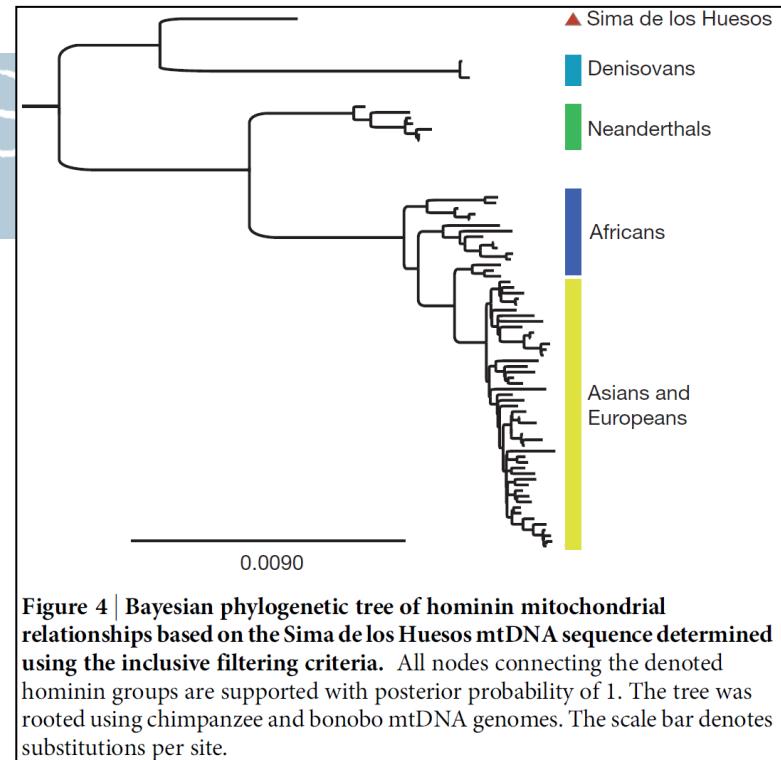
Fylogenetické studie – křížení *Homo neanderthalensis* s jeho současníky

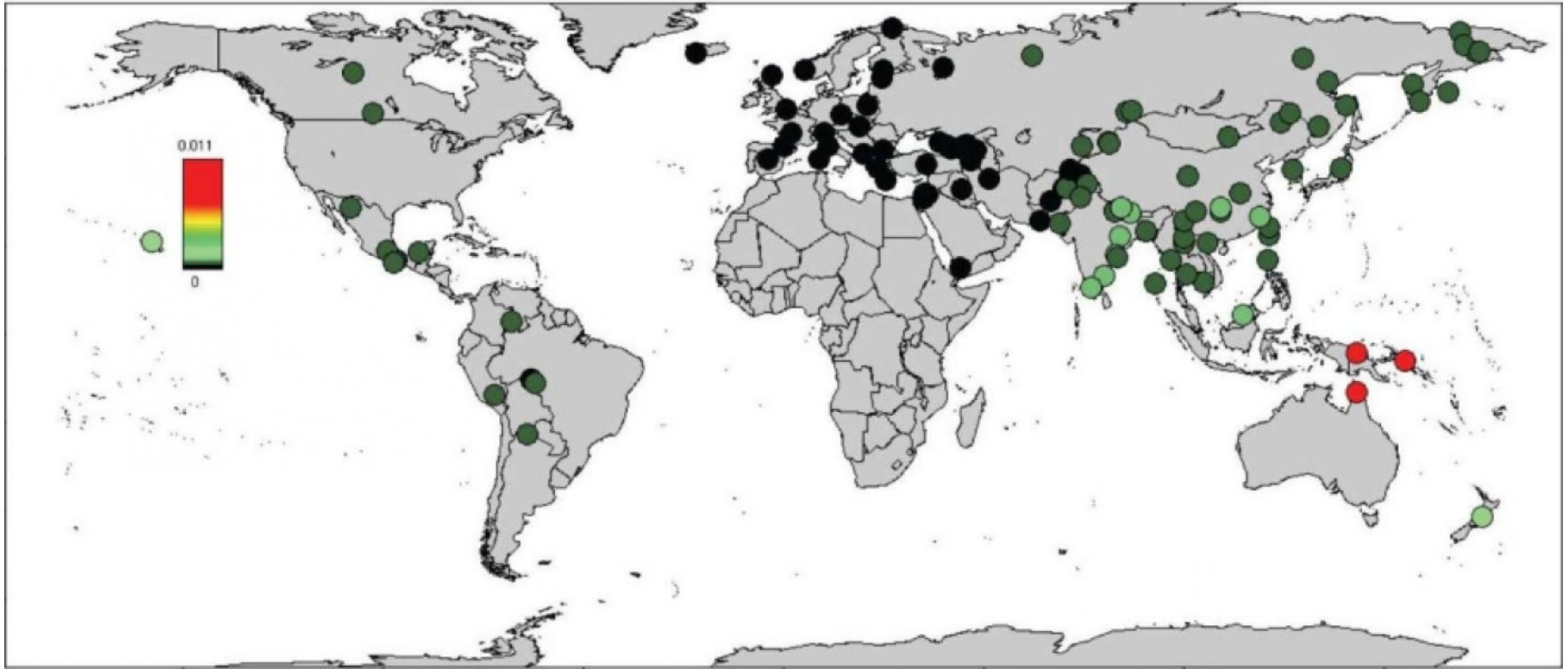
Homo neanderthalensis koexistoval v Evropě s *Homo sapiens* minimálně

Analýzy mtDNA z 90. let křížení neprokázaly, vznikly teorie, že tento fakt způsobila **biologická bariéra nebo kulturní nepochopení**.

Analýzou nuDNA to bylo křížení potvrzeno:

- Hybridizační zóna na Blízkém východě.
- Jelikož má každý člověk neafrického původu 1,5 – 2, 1% neandrtálčí DNA, ke zplazení společného potomka mohlo dojít jednou za 10 – 80 generací.
- Neandrtálci mají na X varianty genů pod negativní selekcí – nižší plodnost
- Nižší plodnost mohli mít také kříženci (Sankararaman et al., 2012)
- DNA neandrtálců byla nalezena i u afrických Masajů – „back to Africa“.





This map shows the proportion of the genome inferred to be Denisovan in ancestry in diverse non-Africans. The color scale is not linear to allow saturation of the high Denisova proportions in Oceania (bright red) and better visualization of the peak of Denisova proportion in South Asia.

Credit: Sankararaman et al./Current Biology 2016



Demografické studie

- High coverage data
- Malá efektivní populace – pouze přes 3000 neandrtálců (Briggs et al., 2009)
- Velký selekční tlak a tedy více nesynonymních mutací
- Vysoká heterozygotnost, nízká diverzita - svědčí o inbreedingu, životě v malých skupinách a bottle necku
- Starší nálezy neandrtálců se geneticky liší od mladších
- Liší se i západní neandrtálci od východních

Paleolit



• 78 rozdílů v sekvencích, které ovlivní strukturu proteinů

- **TLR** geny TLR jsou exprimovány na buněčném povrchu, kde se odhalování a reakce na složky bakterií, plísní a parazitů.
- **SPAG17** ovlivňuje pohyb spermií
- **TTF1** ovlivňuje transkripci ribozomálních genů
- **RPTN** přítomný v srdci, kůži, vlasech a potních žlázách
- **CAN15** microRNA molekuly, možná spojitost s metabolismem, kognitivním vývojem, morfologií hlavy a těla
- **MRC1** mutace způsobí, že příslušný regulační protein je méně aktivní, u neandrtálců patrně způsoboval světlou kůži a zrzavé vlasy, u lidí je velmi vzácná jiná forma.
- **FOXP2** gen ve spojitosti s řečí a jazykem (Lai et al. 2001). Neandrtálci gen mají, ale liší se. Mutace způsobují problémy s řečí a kontrolou obličejových svalů. Má pravděpodobně původ ještě před rozdělením populací Homo sap. a Homo nead.
- **TAS2R38** chutnačství hořkosti v brukvovité zelenině
- **Microcephalin** Ggn zodpovědný za velikost, spojitost s haploskupinou D: lidé z této skupiny mohly být pozitivně selektováni a mohli být právě potomky inbrední linie (Evans et al. 2006). Mutace vede k menšímu mozku bez vlivu na funkci. Je domněnka, že právě tato mutace vznikla u neandrtálců, ale tento jen u nich nebyl ještě nalezen (Green et al. 2010).
- **Predispozice k nemocem** (Sankararaman et al., 2014)